

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

C型肝炎ウイルス感染特異的な  
長鎖ノンコーディングRNAの探索

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 島上 哲朗

平成26(2014)年 3月

## C型肝炎ウイルス感染特異的な長鎖ノンコーディングRNAの探索

### 研究組織

<u>研究代表者</u>		
島上 哲朗	金沢大学附属病院	特任助教
<u>研究分担者</u>		
白崎 尚芳	金沢大学医薬保健研究域保健学系	助教

# 目 次

## I . 総括研究報告

### C 型肝炎ウイルス感染特異的な長鎖ノンコーディングRNAの探索

島上 哲朗 ----- 1

## II . 分担研究報告

### 1 . C 型肝炎ウイルス感染特異的な長鎖ノンコーディングRNAの探索

島上 哲朗 ----- 7

### 2 . C 型肝炎ウイルス感染特異的な長鎖ノンコーディングRNAの探索

白崎 尚芳 ----- 11

III . 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 15

IV . 研究成果の刊行物・別刷 ----- 17

## ・ 総括研究報告

C型肝炎ウイルス感染特異的な長鎖ノンコーディングRNAの探索

研究代表者：島上 哲朗 金沢大学附属病院 助教

**研究要旨：**近年、200塩基以上のlong non-coding RNA(以下lncRNA)が、様々な疾患・病態において重要な役割を果たしていることが報告されている。本年度、C型肝炎ウイルス（以下HCV）感染特異的に発現が変化するlncRNA群を抽出し、それらのHCV複製における役割、および臨床的意義を検討した。

まず、ヒト肝癌細胞株にHCVを感染させ、全細胞RNAを回収し、次世代シーケンサーを用いてlncRNAの発現解析を行った。統計学的にHCV感染特異的に発現が増加するlncRNAを26個抽出した。次にこのlncRNA26個それぞれに対するsiRNAを作成し、HCV感染細胞に導入したところ、26個中4個のlncRNAの投与によりHCV複製の抑制を認めた。この中でlncRNAのデータベースに登録され、肝臓での発現も報告されているlncRNA-Hに着目し解析を行った。In vitroにおける解析から HCV感染によりlncRNA-Hの発現が誘導され、lncRNA-Hに対する複数のsiRNAの投与による発現抑制により、HCV複製は抑制され、lncRNA-HによるHCV複製抑制効果は、ゲノタイプ1a, 1b, 1a/11aキメラ株いずれに対しても認められた。またペグインターフェロン・リバビリン療法を施行された165例の治療前肝生検組織を用いて肝内のlncRNA-Hの発現量を測定した。その結果、ペグインターフェロン・リバビリン療法難治性であるIL28B ゲノタイプ minor群ではmajor群に比べてlncRNA-Hの発現量が有意に高値であった。

A. 研究目的

本研究の目的は以下である。

- 1) HCV感染特異的に発現が増減するlncRNAを探索する。
- 2) さらにそれらのlncRNAの中からHCV複製および感染を制御するlncRNAを同定する。
- 3) 同定したlncRNAによるHCV複製制御機構を解明する。
- 4) C型慢性肝炎感染肝組織におけるlncRNAの発現と、インターフェロン治

療効果およびインターフェロン治療抵抗性の関連を明らかにする。

B. 研究方法

- 1) RNA シーケンス法にて HCV 感染培養細胞由来 RNA の解析を行い、HCV感染特異的に発現が増減する lncRNA を抽出した。
- 2) HCV 培養細胞系において、1)において同定した lncRNA の過剰発現および発現抑制を行い、実際に HCV 感染を制御

する lncRNA の同定を行った。

- 2) で同定した lncRNA の中から lncRNA-H に着目し、HCV 培養細胞系を用いて、lncRNA による HCV 感染制御機構の解明を行った。
- ペグインターフェロン・リバビリン療法を施行された 165 例の治療前肝生検組織を用いて肝内の lncRNA-H の発現量を測定し、lncRNA-H の発現量とインターフェロン療法感受性因子である IL28B ゲノタイプ major 群と minor 群間で比較を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では感染性粒子を産生しうる HCV 細胞培養系も用いる。そのためウイルス粒子を形成する実験に関しては、必ず P2 ルームで施行するとともに、汚染事故には十分注意して行う。なお申請者が所属する研究グループは既に P2 ルームを有しており、HCV 感染実験での P2 ルームの使用に関しては、平成 24 年 6 月 12 日付けで文部科学大臣より確認を受け、更に金沢大学長より機関承認を得ている(金大 6 第 1316 号)。

またヒトゲノム・遺伝子解析研究が必要になった場合にはヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守し、インフォームドコンセントを得た症例の試料のみを用いて研究を行う。

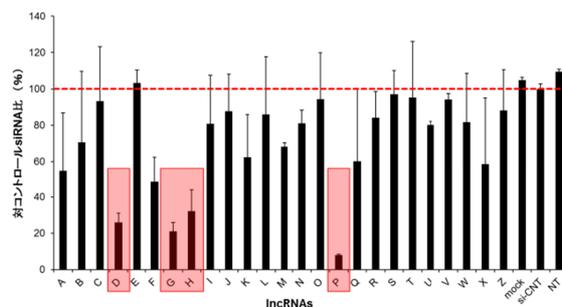
## C. 研究結果

- 細胞培養感染 HCV クローン(Ia/IIa キメラ、HJ3-5)をヒト肝癌細胞株(Huh7.5 細胞)に感染させ、感染後経時的に細胞全 RNA を回収した。また

HCV 感染後 NS5A 阻害剤を投与し、同様に細胞全 RNA を回収した。

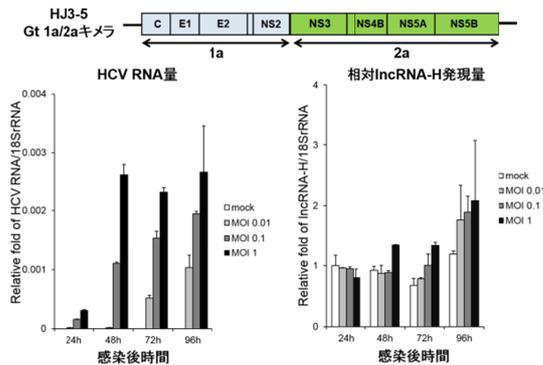
- これらの RNA のうち polyA を有する RNA のみ選択的に増幅し、次世代シーケンサー(Illumina HiSeq2000)を用いて lncRNA の発現解析を行った。さらに統計学的に HCV 感染特異的に発現が増加する lncRNA 群 26 個(A から Z)を抽出した。
- これら lncRNA 26 個に対する siRNA を作成し、HCV 感染細胞に投与し、HCV 複製における役割を検討した。その結果 lncRNA-D, G, H, P に対する siRNA 投与により HCV 複製抑制を認めた(図 1)。

図 1 lncRNA に対する siRNA 投与による HCV 複製に対する影響



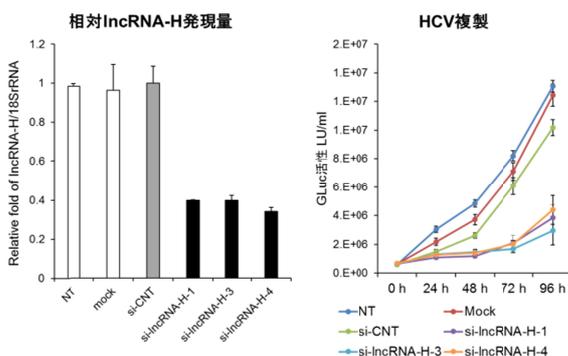
- これら 4 種類の lncRNA のうち、既に lncRNA としてデータベースに登録されており、さらに肝臓における発現も報告されている lncRNA-H に着目した。
- Huh7.5 細胞に HJ3-5 ウイルスを MOI 0.01-1 で感染させ、lncRNA-H 発現量を定量 PCR 法で測定した。その結果、時間・MOI 依存性の lncRNA-H の発現誘導を認めた(図 2)。

## 図2 HCV 感染による IncRNA-H の発現誘導



6) IncRNA-H に対する siRNA を 3 種類作成し、ヒト肝癌細胞株 (FT3-7 細胞) にそれぞれ導入したところ、全ての siRNA 導入で IncRNA-H の発現抑制を認めた。HJ3-5 複製 FT3-7 細胞において siRNA により IncRNA-H の発現を抑制したところ HCV 複製の抑制を認めた。いずれの siRNA の投与でも HCV 複製抑制効果を認めたが、si-IncRNA-H-3 によって最も強い効果を認めた (図3)。

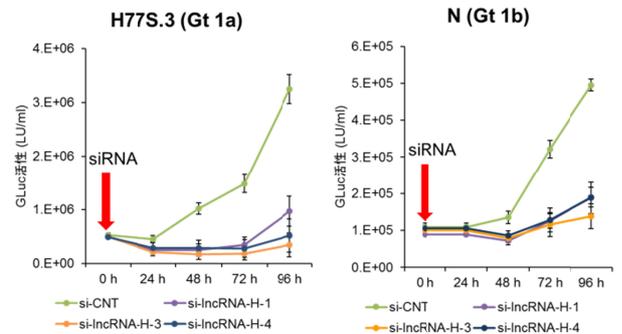
## 図3 IncRNA-H 発現抑制による HCV 複製抑制



7) 異なる HCV ゲノタイプである 1a H77S 株、1b N 株 (いずれもチンパンジー感染クローン) に対しても IncRNA-H の発現を抑制することで、

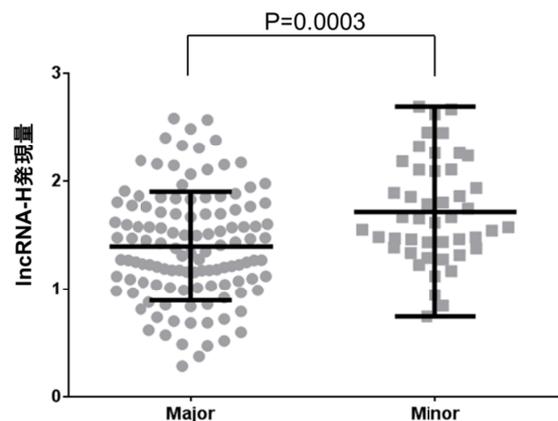
HCV 複製を抑制した (図4)。

## 図4 IncRNA-H による Gt 1a, Gt 1b HCV に対する複製抑制



8) ペグインターフェロンとリバビリン療法を施行された C 型慢性患者 165 例 (IL28B ゲノタイプ、major 119 例、minor 46 例) の治療前肝生検組織由来 RNA を用いて IncRNA-H 発現量を定量 PCR 法により測定した。IncRNA-H 量を IL28B major と minor 群で比較したところ、minor 群で有意に発現が高値であった (図5)

## 図5 IL28B ゲノタイプ別 IncRNA-H 発現量



## D. 考察

1) IncRNA-H は HCV 複製により発現が促進され、またその発現抑制により HCV 複製の抑制を認めたことから、抗 HCV 療法の新規治療標的と考えられた。

2) 肝内のIncRNA-Hの発現量は、インターフェロン療法難治性であるIL28B minor群において、感受性であるmajor群より高値であった。IncRNA-Hは、インターフェロン治療抵抗性に関与している可能性が示唆された。またIL28Bゲノタイプ同様にインターフェロン療法の治療効果予測に有用である可能性が示唆された。

## E. 結論

HCV 感染培養細胞由来 RNA を次世代シーケンサーを用いて解析し、HCV 感染を制御している可能性が考えられる IncRNA 群を 4 種類抽出した。そのうち既に IncRNA としてデータベースに登録され肝内での発現も報告されている IncRNA-H に着目して解析を行った。その結果 HCV 感染培養細胞系を用いた解析から、IncRNA-H の発現は HCV 感染により誘導され、さらに IncRNA-H の発現抑制により HCV の複製も抑制された。さらに IncRNA-H の肝内発現量は、インターフェロン療法難治性である IL28B minor 群において、感受性である major 群より高値であった。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Honda M, **Shirasaki T**, **Shimakami T**, Sakai A, Horii R, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Okada H, Murai K, Nakamura M, Mizukoshi E, Kaneko S.

Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes. *Hepatology*. 2013 (in press).

2) Spaniel C, Honda M, Selitsky SR, Yamane D, **Shimakami T**, Kaneko S, Lanford RE, Lemon SM. microRNA-122 abundance in hepatocellular carcinoma and non-tumor liver tissue from Japanese patients with persistent HCV versus HBV infection. *PLoS One*. 2013 Oct 9;8(10):e7686

3) **Shirasaki T**, Honda M, **Shimakami T**, Horii R, Yamashita T, Sakai Y, Sakai A, Okada H, Watanabe R, Murakami S, Yi M, Lemon SM, Kaneko S. MicroRNA-27a regulates lipid metabolism and inhibits hepatitis C virus replication in human hepatoma cells. *J Virol*. 2013 May;87(9):5270-86.

### 2. 学会発表

1) **Shirasaki T**, Honda M, **Shimakami T**, Murai K, Shiimoto T, Murakami S, Kaneko S. A secretory protein specifically induced by IL28B regulates interferon response. 第36回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013年12月

2) **Shimakami T**, Honda M, **Shirasaki T**, Funaki M, Takabatake R, Lemon SM, and Kaneko S. Acyclic Retinoid, Peretinoin, Inhibits Hepatitis C Virus Replication in Cell Culture. The 64<sup>rd</sup> AASLD2013, ワシントンDC, 2013年11月

3) **Shirasaki T**, Honda M, **Shimakami T**, Murai K, Shiimoto T, Okada H, Takabatake

R, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S.  
Impaired IFN signaling in chronic hepatitis  
C with advanced fibrosis via the TGF- $\beta$   
signaling pathway. The 64th AASLD 2013,  
ワシントンDC,2013年11月

4) **Shimakami T**, Honda, M, **Shirasaki T**,  
Funaki M, Takabatake R, Lemon SM, and  
Kaneko S. Acyclic Retinoid, Peretinoin,  
Inhibits Hepatitis C Virus Replication in  
Cell Culture. HCV meeting 2013, メルボ  
ルン , 2013年10月

5) **Shirasaki T**, Honda M, **Shimakami T**,  
Murai K, Shiimoto T, Okada H, Takabatake  
R, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S.  
Impaired IFN signaling in chronic hepatitis  
C with advanced fibrosis via the TGF- $\beta$   
signaling pathway. HCV meeting 2013, メ  
ルボルン , 2013年10月

#### H. 知的所有権の出願・取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

特記事項なし



## II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
分担研究報告書

C型肝炎ウイルス感染特異的な長鎖ノンコーディングRNAの探索

研究代表者：島上 哲朗 金沢大学附属病院 助教

**研究要旨：**近年、200塩基以上のlong non-coding RNA(lncRNA)が、様々な疾患・病態において重要な役割を果たしていることが報告されている。H25年度、研究代表者島上は、C型肝炎ウイルス感染特異的に発現が変化するlncRNA群を抽出し、それらのHCV複製における役割、および臨床的意義を検討した。

ヒト肝癌細胞株にHCVを感染させ、感染後24時間から72時間まで24時間おきに経時的にRNAを回収、また感染24時間後からNS5A阻害剤によりHCV複製を抑制し、NS5A阻害剤投与後48時間後にRNAを回収した。これらのRNAを次世代シーケンサーを用いて解析し、既存の遺伝子情報、統計学的手法を用いて、HCV感染特異的に発現が変化するlncRNA群26個を同定した。さらにこれらlncRNAに対するsiRNAを作成し、HCV複製細胞に投与したところ、4種のlncRNAに対するsiRNAの投与によりHCV複製の抑制を認めた。この中で既にlncRNAのデータベースに登録されているlncRNA-Hに着目して、ペグインターフェロン・リバビリン療法を施行された165例の治療前肝生検組織を用いて肝内のlncRNA-Hの発現量を測定した。その結果、ペグインターフェロン・リバビリン療法難治性であるIL28B ゲノタイプ minor群ではmajor群に比べてlncRNA-Hの発現量が有意に高値であった。

A. 研究目的

本年度は、HCV感染培養細胞由来RNAを解析してHCV感染特異的に発現が変化するlncRNAを抽出し、それらのHCV複製における役割およびC型慢性肝炎患者における臨床的意義を明らかにすることを目的とした。

24、48、72 時間後に細胞全 RNA を回収した。また感染 24 時間後に EC50 の 50 倍濃度（500pM）の NS5A 阻害剤を投与し、その 48 時間後（感染 72 時間後）に同様に RNA を回収した。さらにコントロールとして、HCV 感染なしの細胞から、24、72 時間後に RNA を回収した。

B. 研究方法

- 1) 細胞培養感染クローンである、遺伝子型 Ia H77S 株と IIa JFH1 株のキメラである HJ3-5 株をヒト肝癌細胞株（Huh7.5）に MOI 1 で感染させ、感染

- 2) これらの RNA のうち polyA を有する RNA のみ選択的に増幅し、次世代シーケンサー（illumina Hiseq2000）を用いて解析を行った。
- 3) 次世代シーケンサーにより発現を確

認された RNA のうち既存の遺伝子データベースとの照合を行い IncRNA のみ抽出した。さらにこれらの IncRNA の中から、HCV 感染後発現が増減し、NS5A 阻害剤の投与により HCV 感染による変化がキャンセルされ、細胞 passage の影響を受けない、IncRNA 群 26 個を統計学的手法を用いて抽出した。

- 4) これらの IncRNA 26 個に対する siRNA をそれぞれの IncRNA に対して 2-3 個作成し、HCV 感染培養細胞に導入し、HCV 複製における役割を検討した。
- 5) HCV 複製に影響を与えた IncRNA のうち既に IncRNA のデータベースに登録されている IncRNA-H に着目して、ペグインターフェロン・リバビリン療法を施行された 165 例の治療前肝生検組織を用いて肝内の IncRNA-H の発現量を測定し、IL28B ゲノタイプ (major と minor) との相関の有無を検討した。

(倫理面への配慮)

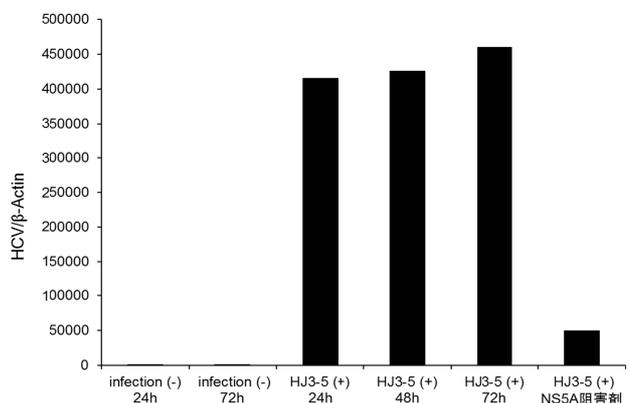
本研究では感染性粒子を産生しうる HCV 細胞培養系も用いる。そのためウイルス粒子を形成する実験に関しては、必ず P2 ルームで施行するとともに、汚染事故には十分注意して行う。なお申請者が所属する研究グループは既に P2 ルームを有しており、HCV 感染実験での P2 ルームの使用に関しては、平成 24 年 6 月 12 日付けで文部科学大臣より確認を受け、更に金沢大学長より機関承認を得ている(金大 6 第 1316 号)。またヒトゲノム・遺伝子解析研究が必要になった場合にはヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守し、インフォー

ムドコンセントを得た症例の試料のみを用いて研究を行った。

C. 研究結果

- 1) HCV 感染後および NS5A 阻害剤投与後回収した RNA 中の HCV RNA 量を定量 PCR 法により測定した。その結果 HCV 複製は感染後 24 時間後から確認され、また NS5A 阻害剤の投与により HCV 複製の効果的な抑制を認めた。

図 1 HCV 感染後 HCV RNA 量

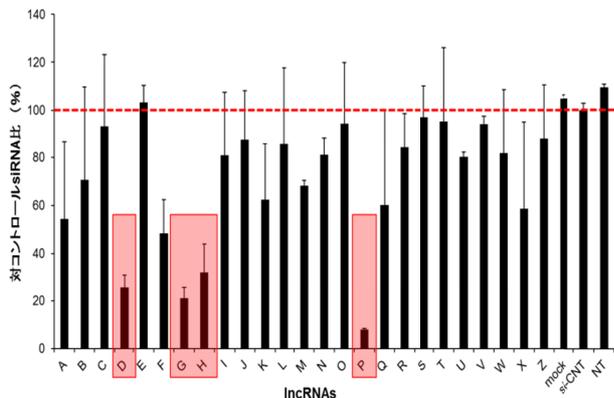


- 2) 次世代シーケンサーによる解析から抽出した HCV 感染特異的に発現が増減する IncRNA 26 個に対する siRNA を作成し、HCV 感染細胞に投与し、HCV 複製における役割を検討した。HCV は HJ3-5 株を用いた。また HCV 遺伝子中には分泌型ルチフェラーゼである Gaussia luciferase (GLuc) が挿入されているため、luciferase 活性を HCV 複製の指標として用いた (図 2)。その結果 IncRNA-D,G,H,P に対する siRNA 投与により HCV 複製の抑制を認めた (図 3)。

図 2 HJ3-5/GLuc2A

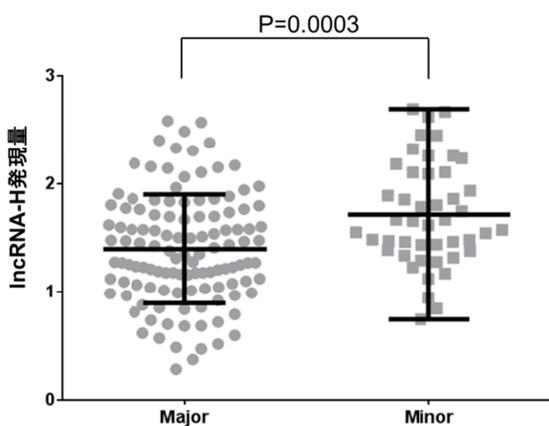


**図 3 IncRNA に対する siRNA 投与による HCV 複製に対する影響**



4) これら 4 種類の IncRNA のうち、既に IncRNA としてデータベースに登録されており、さらに肝臓における発現も報告されている IncRNA-H に着目した。ペグインターフェロンとリバビリン療法を施行された C 型慢性患者 165 例 (IL28B ゲノタイプ、major 119 例、minor 46 例) の治療前肝生検組織由来 RNA を用いて IncRNA-H 発現量を定量 PCR 法により測定した。IncRNA-H 量を IL28B major と minor 群で比較したところ、minor 群で有意に発現が高値であった (図 4)。

**図 4 IL28B ゲノタイプ別 IncRNA-H 発現量**



**D. 考察**

- 1) IncRNA-H は HCV 複製により発現が促進され、またその発現抑制により HCV 複製の抑制を認めたことから、抗 HCV 療法の新規治療標的と考えられた。
- 2) 肝内の IncRNA-H の発現量は、インターフェロン療法難治性である IL28B minor 群において、感受性である major 群より高値であった。IncRNA-H は、インターフェロン治療抵抗性に関与している可能性が示唆された。また IL28B ゲノタイプ同様にインターフェロン療法の治療効果予測に有用である可能性が示唆された。

**E. 結論**

HCV 感染培養細胞由来 RNA を次世代シーケンサーを用いて解析し、HCV 感染を制御している可能性が考えられる IncRNA 群を 4 種類抽出した。そのうち IncRNA-H の肝内発現量は、インターフェロン療法難治性である IL28B minor 群において、感受性である major 群より高値であった。

**F. 研究発表**

**1. 論文発表**

- 1) Shirasaki T, Honda M, **Shimakami T**, Horii R, Yamashita T, Sakai Y, Sakai A, Okada H, Watanabe R, Murakami S, Yi M, Lemon SM, Kaneko S. MicroRNA-27a regulates lipid metabolism and inhibits hepatitis C virus replication in human hepatoma cells. *J Virol.* 2013 May;87(9):5270-86.
- 2) Spaniel C, Honda M, Selitsky SR, Yamane D, **Shimakami T**, Kaneko S, Lanford RE,

Lemon SM. microRNA-122 abundance in hepatocellular carcinoma and non-tumor liver tissue from Japanese patients with persistent HCV versus HBV infection. PLoS One.2013 Oct 9;8(10):e76867

- 3) Honda M, Shirasaki T, **Shimakami T**, Sakai A, Horii R, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Okada H, Murai K, Nakamura M, Mizukoshi E, Kaneko S. Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes. Hepatology. 2013 (in press).

## 2. 学会発表

- 1) **Tetsuro Shimakami**, Masao Honda, Takayoshi Shirasaki, Masaya Funaki, Riuta Takabatake, Stanley Lemon, and Shuichi Kaneko. Acyclic Retinoid, Peretinoin, Inhibits Hepatitis C Virus Replication in Cell Culture, The 64<sup>rd</sup> AASLD2013, 2013年11月

## G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
特記事項なし



厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
分担研究報告書

C型肝炎ウイルス感染特異的な長鎖ノンコーディングRNAの探索

研究分担者：白崎 尚芳 金沢大学医薬保健研究域保健学系 助教

**研究要旨：**近年、200塩基以上のlong non-coding RNA(lncRNA)が、様々な疾患・病態において重要な役割を果たしていることが報告されている。H25年度、研究代表者島上は、C型肝炎ウイルス（HCV）感染特異的に発現変化するlncRNA26個の中からHCV複製を制御するlncRNAを4個同定し、その中で、lncRNA-Hに注目した。lncRNA-Hはおよそ500塩基のRNAであり、ヒト肝臓や肝細胞由来培養細胞で発現が認められる。島上は、C型慢性肝炎患者の肝生検サンプルによる網羅的遺伝子発現解析から、1L28Bマイナー型遺伝子を持つ患者でlncRNA-Hの発現が有意に高いことを明らかにした。そこで、H25年度、研究分担者白崎は、lncRNA-HのHCV複製における影響をHCVの培養細胞系を用いて解析した。

HCV感染によりlncRNA-Hの発現は感染ウイルス量及び時間依存的に増加した。lncRNA-Hに対するsiRNAを作成し、lncRNA-Hの発現抑制下で、HCV感染に与える影響を検討した。その結果、siRNAの濃度依存的にHCV複製の抑制を認めた。この複製抑制効果は異なるゲノタイプHCVにおいても認められた。この結果から、lncRNA-Hは、HCV複製に有利に働くlncRNAであり、HCV感染制御に対する新しい標的となる可能性があることが示唆された。来年度以降、lncRNA-HによるHCV複製制御機序の解明を行う予定である。

A. 研究目的

研究代表者島上は、HCV感染培養細胞由来RNAの次世代シーケンサーによる解析とC型慢性肝炎患者の肝生検サンプルによる網羅的遺伝子発現解析から、HCV感染を制御し得るlncRNAを同定した。その中から1L28B遺伝子多型と関連のあったlncRNA-Hに注目し、そのHCV複製制御機構を解明することを目的とした。

B. 研究方法

1) 細胞培養感染クローンである、遺伝子

型IIa JFH1株のキメラ（HJ3-5株）をヒト肝癌細胞株（Huh7.5及びFT3-7）に種々のMOI（0.01, 0.1, 1）で感染させ、感染24、36、48、72、96時間後に細胞全RNAを回収した。qRT-PCR法にてHCV RNA及びlncRNA-Hの発現量を測定した。

2) lncRNA-Hに対するsiRNAを3種類作成した。HCV持続複製細胞にsiRNAを導入し、HCV複製に与える影響を検討した。siRNA導入後、経時的に全RNA及び培養上清を回収しqRT-PCR法にて

HCV RNA 及び IncRNA-H の発現量を、Gaussia Luciferase 法により HCV 複製を測定した。

- 3) 上記の結果から、最も強く IncRNA-H の発現を抑制する siRNA (si-IncRNA-H-3) に対する濃度依存実験を行った。
- 4) 細胞培養感染クローンであるゲノタイプ Ia 型 H77S 株、Ib 型 N 株に対しても同様の実験を行い、HCV ゲノタイプの違いにおける IncRNA-H の HCV 複製に与える影響を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究では感染性粒子を産生しうる HCV 細胞培養系も用いる。そのためウイルス粒子を形成する実験に関しては、必ず P2 ルームで施行するとともに、汚染事故には十分注意して行う。なお申請者が所属する研究グループは既に P2 ルームを有しており、HCV 感染実験での P2 ルームの使用に関しては、平成 24 年 6 月 12 日付けで文部科学大臣より確認を受け、更に金沢大学長より機関承認を得ている(金大 6 第 1316 号)。

またヒトゲノム・遺伝子解析研究が必要になった場合にはヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守し、インフォームドコンセントを得た症例の試料のみを用いて研究を行う。

### C. 研究結果

- 1) HCV 感染により IncRNA-H の発現は感染ウイルス量及び時間依存的に増加した。感染 96 時間後では 24 時間後に比べおよそ 2 倍の IncRNA-H の発現増加を認めた。(図 1)
- 2) IncRNA-H に対する siRNA を 3 種類作

成した。IncRNA-H の発現を抑制し、HCV 感染に与える影響を検討した。その結果、3 種類の siRNA 全てで IncRNA-H の発現抑制を認めた。IncRNA-H の発現抑制下では HCV の複製は有意に抑制された。si-IncRNA-H-3 に最も強い抑制効果が認められた。(図 2)

- 3) 最も強く IncRNA-H の発現を抑制する siRNA (si-IncRNA-H-3) を種々の濃度 (10nM ~ 100nM) で処置し HCV 複製を測定した結果、siRNA 用量依存的に HCV 複製を抑制した。100nM 処置により HCV 複製を 5 分の 1 まで抑制することが出来た。(図 3)
- 4) 異なる HCV ゲノタイプである培養細胞感染クローン Ia H77S 株、Ib N 株に対しても IncRNA-H の発現を抑制することで、HCV 複製を有意に抑制した。(図 4)

図1 HCV感染によるIncRNA-Hの発現誘導

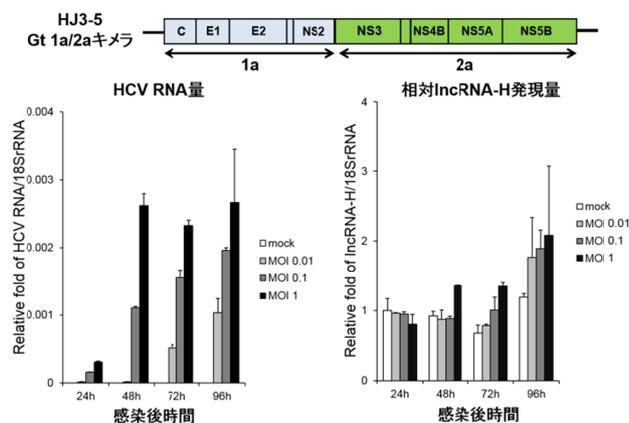


図2 IncRNA-H発現抑制によるHCV複製抑制

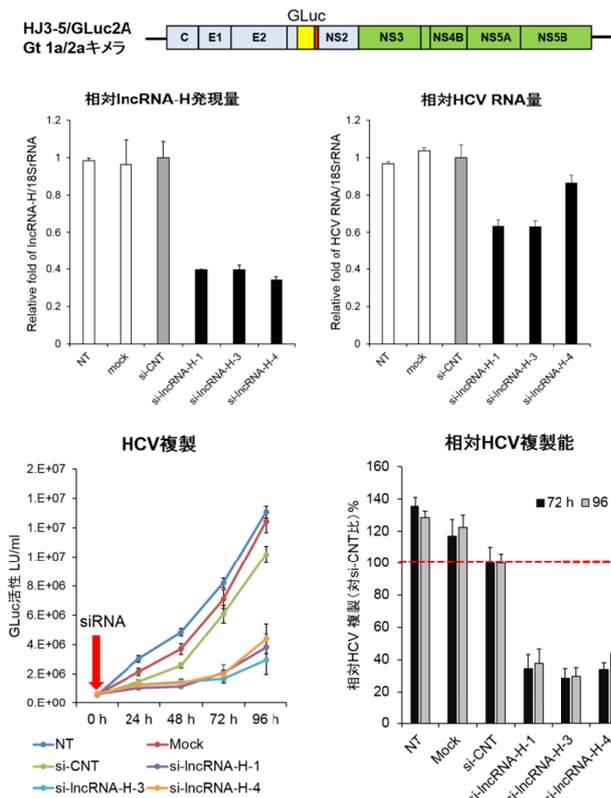


図3 si-IncRNA-HIによる用量依存性HCV複製抑制

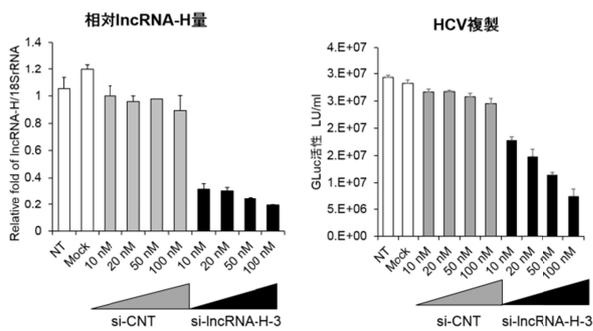
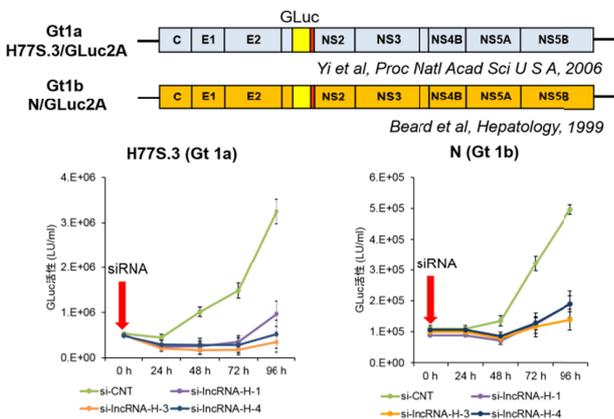


図4 IncRNA-HIによるGt1a, 1b HCVIに対する複製制御



## D. 考察

IncRNA-Hは、HCV複製により発現誘導するIncRNAである。このIncRNA-Hの発現をsiRNA処置により減少させることでHCV複製を有意に抑制させることが出来たことから、HCV感染に対する新しい標的となり得る可能性があることが示唆された。

## E. 結論

HCV複製を制御する機構を持つIncRNA-Hを同定した。来年度以降、IncRNA-HによるHCV複製制御機序の解明を行う予定である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) **Shirasaki T**, Honda M, Shimakami T, Horii R, Yamashita T, Sakai Y, Sakai A, Okada H, Watanabe R, Murakami S, Yi M, Lemon SM, Kaneko S. MicroRNA-27a regulates lipid metabolism and inhibits hepatitis C virus replication in human hepatoma cells. *Journal of Virology*. 2013 May;87(9):5270-5286.
- 2) Honda M, **Shirasaki T**, Shimakami T, Sakai A, Horii R, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Okada H, Murai K, Nakamura M, Mizukoshi E, Kaneko S. Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes. *Hepatology*. 2013 Oct.

### 2. 学会発表

- 1) **Shirasaki T**, Honda M, Shimakami T, Murai K, Shiimoto T, Murakami S, Kaneko

S. A secretory protein specifically induced by IL28B regulates interferon response. 第36回日本分子生物学会年会, 2013年12月

2) **Shirasaki T**, Honda M, Shimakami T, Murai K, Shiimoto T, Okada H, Takabatake R, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S. Impaired IFN signaling in chronic hepatitis C with advanced fibrosis via the TGF- $\beta$  signaling pathway. The 64th AASLD 2013, 2013年11月

3) **Shirasaki T**, Honda M, Shimakami T, Murai K, Shiimoto T, Okada H, Takabatake R, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S. Impaired IFN signaling in chronic hepatitis C with advanced fibrosis via the TGF- $\beta$  signaling pathway. HCV meeting 2013, 2013年10月

#### G. 知的所有権の出願・取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

特記事項なし



### III．研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Shirasaki T</u> , Honda M, <u>Shimakami T</u> , Horii R, Yamashita T, Sakai Y, Sakai A, Okada H, Watanabe R, Murakami S, Yi M, Lemon SM, Kaneko S.	MicroRNA-27a regulates lipid metabolism and inhibits hepatitis C virus replication in human hepatoma cells.	J Virol	87(9)	5720-5786	2013
Spaniel C, Honda M, Selitsky SR, Yamane D, <u>Shimakami T</u> , Kaneko S, Lanford RE, Lemon SM.	microRNA-122 abundance in hepatocellular carcinoma and non-tumor liver tissue from Japanese patients with persistent HCV versus HBV infection.	PLoS One	8(10)	e76867	2013
Honda M, <u>Shirasaki T</u> , <u>Shimakami T</u> , Sakai A, Horii R, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Okada H, Murai K, Nakamura M, Mizukoshi E, Kaneko S.	Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes.	Hepatology	-	-	(in press)