

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24年度～26年度 総合研究報告書

研究代表者 島上 哲朗

平成27(2015)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	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 . 総合研究報告

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 ----- 11

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 ----- 19

III . 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 27

IV . 研究成果の刊行物・別刷 ----- 29

厚生労働科学研究費補助金

[肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業）]

総合研究報告書

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。しかしながらC型肝炎ウイルス（HCV）感染におけるlncRNAの意義は不明であり、本研究では、新たな抗HCV療法の標的となりえるlncRNAの同定を行なうこと、さらにC型慢性肝疾患におけるインターフェロン治療反応性や肝発癌などの様々な病態におけるlncRNAの関与を明らかにすることを目的とした。まずHCV培養細胞系を用いた検討から、lncRNA-HがHCV感染により発現が誘導され、さらにlncRNAの発現抑制によりHCV複製が抑制されることを明らかにした。またチンパンジー、キメラマウスにおいてもHCV感染により肝内のlncRNA-Hの発現誘導を認めた。さらにHCV排除前後で肝生検を施行されたC型慢性肝疾患患者において、lncRNA-Hの肝内の発現量を測定したところHCV排除により有意にlncRNA-Hの発現量の低下を認めた。またC型慢性肝疾患患者において抗ウイルス療法前の肝組織中、および血清中のlncRNA-Hの発現量を測定し、インターフェロン治療感受性予測因子であるIL28Bゲノタイプ別に比較した。その結果IL28マイナー症例の肝内・血清中のlncRNA-Hの発現量は、IL28Bメジャー患者に比べ有意に高値であることを見いだした。これらの結果からHCV感染は、lncRNA-Hは抗ウイルス療法の新規治療標的となりえることが示唆された。またlncRNA-Hは、インターフェロン感受性に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

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。C型肝炎ウイルス（HCV）とnon-coding RNAに関しては、短鎖型non-coding RNAであるmicroRNA-122 (miR-122)が、HCV複製に促進的に働き、有力な治療標的であることが明らかとなったが、lncRNAとHCV感染との関連は未解明である。本研究では、新たな抗HCV療法の標的となりえるlncRNAの同定を行なうこと、さらにC型慢性肝疾患におけるインターフェロン治療反応性や肝発癌などの様々な病態におけるlncRNAの関与を明らかにすることを目的とした。

この目的のため以下の検討を行った。

- 1) HCV感染培養細胞由来のRNAを次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析しHCV感染特異的に発現が増減する lncRNA群を探索する。
- 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。

これらの *in vitro*における解析から、lncRNAの一つである lncRNA-HがHCV感染において発現誘導されること、また lncRNA-Hの発現抑制によりHCV複製が抑制されることを明らかにした。さらに lncRNA-Hに着目して、*in vivo*における意義を以下の点から解析した。

- 1) *In vitro*において認められた HCV 感染による lncRNA-H の発現誘導が、マウス、チンパンジーなどの *in vivo*においても認められるかどうかを検討する。
- 2) C型慢性肝疾患患者で抗ウイルス療法による HCV 排除前後の肝組織中の lncRNA-H の発現量を比較し、ヒトにおける HCV 感染による lncRNA-H の発現の変化を検討する。
- 3) C型慢性肝疾患患者の抗ウイルス療法前の肝組織中及び血清中の lncRNA-H 発現量を定量 PCR 法にて測定し、IL28B ゲノタイプと lncRNA-H 発現量の相関の有無を検討した。

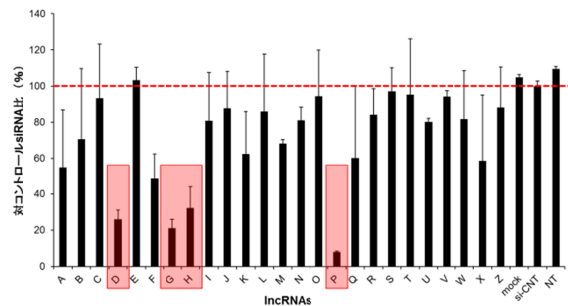
B. 研究方法

- 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。
- 3) 上記で同定した lncRNA の中から lncRNA-H に着目し、HCV 培養細胞系を用いて、lncRNA-H による HCV 感染制御機構の解明を行った。
- 4) チンパンジーに HCV を含む血清を投与し、投与前、1 週、3 週、6 週、11 週、24 週後に、肝生検、血清の採取を行った。各タイムポイントで得られた肝組織由来 RNA を次世代シーケンサーによる RNAseq により解析した。lncRNA-H 量に関しては RNAseq のデータを用いて測定した。また肝組織中・血清中の HCV RNA 量を定量 PCR 法にて、さらに血中 ALT を測定した。
- 5) キメラマウスに遺伝子型 1b の HCV を感染させ、4 週間後にマウスを安楽死させ、肝組織を採取した。その後肝組織中の HCV RNA 量、lncRNA-H 量を定量 PCR 法にて解析した。
- 6) C型慢性肝疾患患者で抗ウイルス療法による HCV の排除前後で肝生検が施行された 20 例を対象として、HCV 排除前後での lncRNA-H の肝組織中の発現量を定量 PCR 法で測定し、比較した。
- 7) 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、IL28B ゲノタイプ (major と minor) との相関の有無を検討した。

8) テラプレビル併用ペグインターフェロン、リバビリン療法を施行された C 型慢性肝疾患患者 80 例 (IL28B ゲノタイプ メジャー、マイナー 各々 40 例) に関して治療開始前の血清中 lncRNA-H 量を定量 PCR にて測定して IL28B ゲノタイプに (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 感染特異的に発現が変化する

lncRNA 群の検索

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 (Huh-7.5 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。次にこれら lncRNA 26 個に対する siRNA を作成し、HCV 感染細胞に投与し、発現抑制の HCV 複製に与える影響を検討した。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

2) HCV 感染による lncRNA-H の発現誘導

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。Huh-7.5 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)。

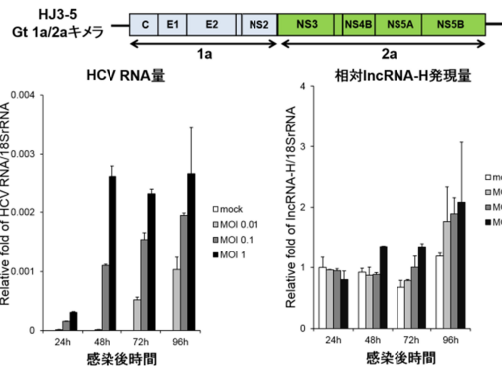


図2 HCV 感染による IncRNA-H の発現誘導

3) IncRNA-H 発現抑制による HCV 抑制

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

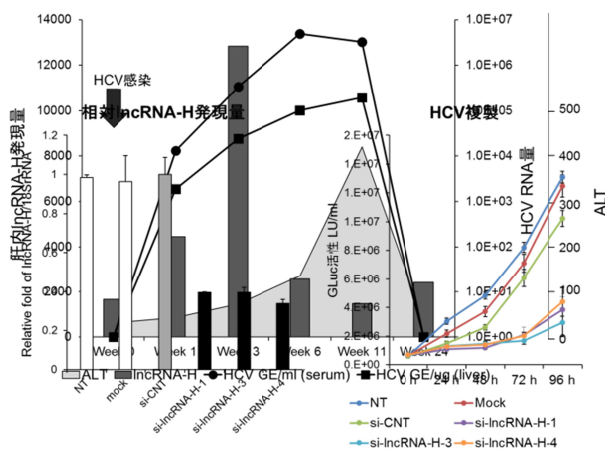
抑制を認めた。HJ3-5 複製 FT3-7 細胞において siRNA により IncRNA-H の発現を抑制したところ HCV 複製の抑制を認めた。いずれの siRNA の投与でも HCV 複製抑制効果を認めしたが、si-IncRNA-H-3 によって最も強い効果を認めた (図 3)。また、IncRNA-H 発現抑制による HCV 複製の抑制は、遺伝子型 1a、1b、2a、1a/2a キメラいずれの HCV に対しても認めた。さらに複製抑制のみでなく、感染粒子産生の抑制も認めた。

図3 IncRNA-H 発現抑制による HCV 複製抑制

4) HCV 感染チンパンジーにおける IncRNA-H の発現誘導解析

HCV の感染により HCV RNA は 1 週後から 11 週後まで持続的に肝内、血清で持続的に検出されたが、24 週後には肝内、血清中で検出されなかった。また血清 ALT 値は感染直後より 11 週後まで増加傾向を示したが、HCV RNA が陰性化した 24 週後には正常化した。これらの結果から HCV は少なくとも 11 週後まで持続感染し、急性肝炎を惹起したが、24 週後には自然排除されたと考えられた。IncRNA-H の発現量に関しては、HCV RNA の増加と共に、3 週後まで著明に増加し、その後低下傾向を示し、ウイルス排除時には、感染前の値に復した (図 4)。

図4 HCV 感染チンパンジーにおける肝内 IncRNA-H 発現量



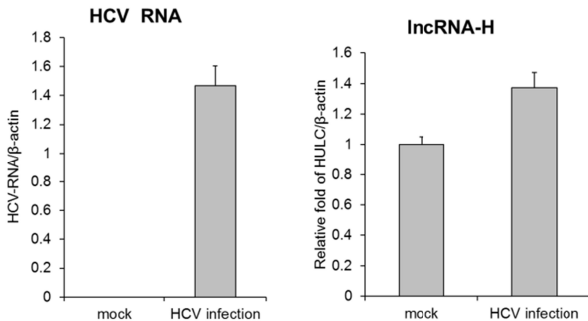
5) HCV 感染マウスにおける IncRNA-H の発現誘導解析

キメラマウスに HCV に感染させ、1 週間後にマウスより採血し HCV RNA 量を測定したところ 4.2×10^7 copies/ml 存在し、持続感染が成立したものと判断した。28 日後 HCV 感染

マウスおよび非感染マウスを安楽死後、肝組織から全 RNA を抽出し、HCV RNA と

IncRNA-H 発現量を定量 PCR にて測定した。その結果 HCV RNA は HCV 感染マウスにおいて検出され、28 日後まで持続感染したと考えられた。また HCV 感染マウスの IncRNA-H の発現量は非感染マウスに比べて高値であった (図 5)。

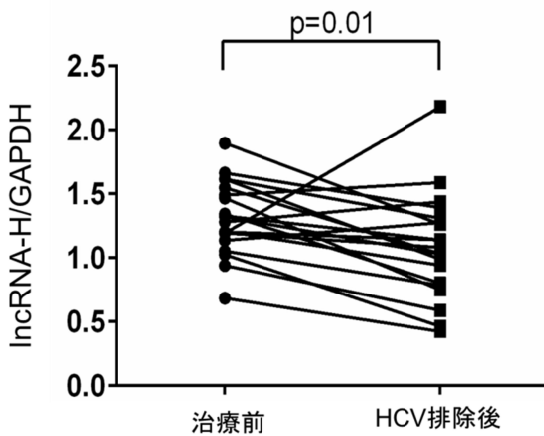
図 5 HCV 感染キメラマウスにおける肝内 HCV RNA、IncRNA-H 発現量



6) C 型慢性肝疾患患者におけるウイルス排除後の肝内 IncRNA-H 発現量

C 型慢性肝疾患患者で抗ウイルス療法による HCV の排除前後で肝生検が施行された 20 例を対象として、HCV 排除前後での IncRNA-H の肝組織中の発現量を定量 PCR 法で測定し、比較した。その結果、HCV 排除により有意に IncRNA-H の発現量の低下を認めた (図 6)。

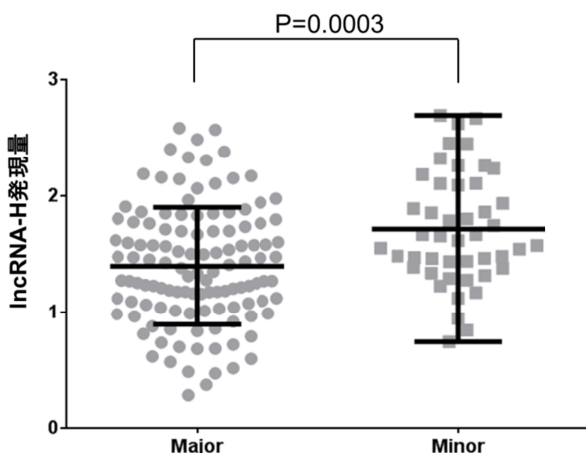
図 6 HCV 排除前後における IncRNA-H の発現量の比較



7) IL28B ゲノタイプ別肝組織中 IncRNA-H 発現量の比較

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 7)。

図 7 IL28B ゲノタイプ別肝組織中 IncRNA-H 発現量

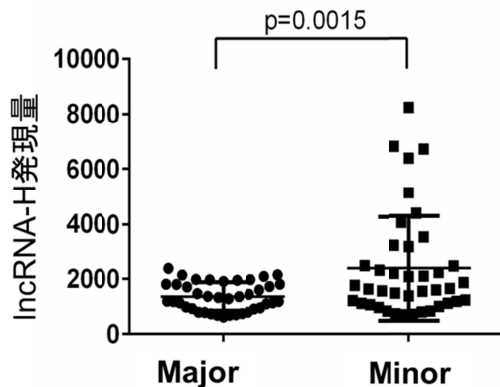


8) IL28B ゲノタイプ別血清中 IncRNA-H 発現量の比較

テラプレビル併用ペグインターフェロン、リバビリン療法を施行された C 型慢性肝疾患患者 80 例 (IL28B ゲノタイプ メジャー、マイナー 各々 40 例) に関して治療開始前の血清中 IncRNA-H 量を定量 PCR にて測定して IL28B ゲノタイプによる IncRNA-H の発現量を比較した。肝内

と同様血清中においても IncRNA-H の発現量は IL28B マイナー患者では有意に IL28B メジャー患者に比べて高値であった（図 8）。

図 8 IL28B ゲノタイプ別血清中 IncRNA-H 発現量



D. 考察

- 1) In vitro において 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) チンパンジーおよびキメラマウスへの HCV 感染により、培養細胞系と同様に IncRNA-H の肝内での発現誘導を認めた。さらに C 型慢性肝疾患患者において抗ウイルス療法による HCV 排除により IncRNA-H の肝内での有意な発現の低下を認めた。今回の検討により in vivo においても HCV 感染により IncRNA-H の発現が誘導されることを明らかにした。
- 3) IncRNA-H は、既報から肝発癌との関与が示唆されている。そのため HCV により IncRNA-H の発現誘導は C 型慢性肝疾患患者における肝発癌機序の解明の手がかりとなる可能性が考えられる。
- 4) HCV 排除後、IncRNA-H の発現が低下する患者と低下しない患者が存在した。今後 HCV 排除後の IncRNA-H の発現量の変化と、HCV 排除後の肝発癌との関連についても検討を行う。すなわち IncRNA-H は HCV 排除後の肝発癌に関するバイオマーカーとなり得る可能性が考えられ、その観点から今後も症例数を増やして検討を行う。
- 5) 肝内、および血清の 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

In vitro における解析から HCV の感染により発現が誘導される IncRNA-H を同定した。In vivo においても in vitro と同様に HCV 感染による IncRNA-H の発現誘導を認めたため、IncRNA-H は抗 HCV 療法の新規治療標的と考えられた。

また IL28B ゲノタイプマイナー患者の肝内、血清中 lncRNA-H 発現量はメジャー患者に比べて有意に高値であり、lncRNA-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、あるいは新規のインターフェロン治療の効果予測のマーカーとなり得る可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

研究代表者 島上哲朗

論文発表

- 1) Selitsky SR, Baran-Gale J, Honda M, Yamane D, Masaki T, Fannin EE, Guerra B, Shirasaki T, **Shimakami T**, Kaneko S, Lanford RE, Lemon SM, Sethupathy P. Small tRNA-derived RNAs are increased and more abundant than microRNAs in chronic hepatitis B and C. *Sci Rep*. 2015 Jan 8;5:7675.
- 2) Shirasaki T, Honda M, **Shimakami T**, Murai K, Shiimoto T, Okada H, Takabatake R, Tokumaru A, Sakai Y, Yamashita T, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S. Impaired IFN signaling in chronic hepatitis C patients with advanced fibrosis via the TGF- β signaling pathway. *Hepatology*. 2014 Nov;60(5):1519-30.
- 3) Yamane D, McGivern DR, Wauthier E, Yi M, Madden VJ, Welsch C, Antes I, Wen Y, Chugh PE, McGee CE, Widman DG, Misumi I, Bandyopadhyay S, Kim S, **Shimakami T**, Oikawa T, Whitmire JK, Heise MT, Dittmer DP, Kao CC, Pitson SM, Merrill AH Jr, Reid LM, and Lemon SM. Regulation of the hepatitis C virus RNA replicase by endogenous lipid peroxidation. *Nature Medicine*. 2014 Aug;20(8):927-35.
- 4) Li Y, Masaki T, **Shimakami T**, Lemon SM. hnRNP L and NF90 Interact with Hepatitis C Virus 5'-Terminal Untranslated RNA and Promote Efficient Replication. *J Virol*. 2014 Jul 1;88(13):7199-7209.
- 5) **Shimakami T**, Honda M, Shirasaki T, Takabatake R, Liu F, Murai K, Shiimoto T, Funaki M, Yamane D, Murakami S, Lemon SM, Kaneko S. The acyclic retinoid Peretinoin inhibits hepatitis C virus replication and infectious virus release in vitro. *Sci Rep*. 2014 Apr 15;4:4688.
- 6) 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*. 2014 Mar;59(3):828-38.
- 7) 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

- 8) 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.
- 9) Welsch C, **Shimakami T**, Hartmann C, Yang Y, Domingues FS, Lengauer T, Zeuzem S, Lemon SM. Peptidomimetic escape mechanisms arise via genetic diversity in the ligand-binding site of the hepatitis C virus NS3/4A serine protease. Gastroenterology. 2012. 142(3):654-63
- 10) Welsch C, Schweizer S, **Shimakami T**, Domingues FS, Kim S, Lemon SM, Antes I. Ketoamide resistance and hepatitis C virus fitness in val55 variants of the NS3 serine protease. Antimicrob Agents Chemother. 2012. 56(4):1907-15.
- 11) **Shimakami T**, Yamane D, Welsch C, Hensley L, Jangra RK, Lemon SM. Base pairing between hepatitis C virus RNA and microRNA 122 3' of its seed sequence is essential for genome stabilization and production of infectious virus. J Virol. 2012. 86(13):7372-83.
- 12) **Shimakami T**, Yamane D, Jangra RK, Kempf BJ, Spaniel C, Barton DJ, Lemon SM. Stabilization of hepatitis C virus RNA by an Ago2-miR-122 complex. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012. 109(3):941-6.

書籍発表

- 1) **島上哲朗**、酒井明人、金子周一 C型肝炎、肝硬変患者、キャリアのフォローアップ戦略とエビデンス 日本臨床 2015年1月 73巻増刊号1、788-92
- 2) **島上哲朗**、山根太典、Lemon S miR-122-Ago2複合体によるC型肝炎ウイルスRNAの安定化、2012年、実験医学、30:1444-8

研究分担者 白崎尚芳

論文発表

- 1) **Shirasaki T**, Honda M, Shimakami T, Murai K, Shiimoto T, Okada H, Takabatake R, Tokumaru A, Sakai Y, Yamashita T, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S. Impaired IFN signaling in chronic hepatitis C patients with advanced fibrosis via the TGF- β signaling pathway. Hepatology. 2014 Nov;60(5):1519-30
- 2) Shimakami T, Honda M, **Shirasaki T**, Liu F, Murai K, Shiimoto T, Funaki M, Yamane D, Murakami S, Lemon SM, Kaneko S. The Acyclic Retinoid Peretinoin Inhibits Hepatitis C Virus Replication and Infectious Virus Release in Vitro. Scientific Reports. 2014 Apr 15;4:4688
- 3) Honda M, **Shirasaki T**, Shimakami T, Sakai A, Horii R, Arai K, Yamashita T, Sakai Y,

Yamashita T, Kaneko S. Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes. *Hepatology*. 2014 Mar;59(3):828-838

- 4) Takayama H, Misu H, Iwama H, Chikamoto K, Saito Y, Murao K, Teraguchi A, Lan F, Kikuchi A, Saito R, Tajima N, **Shirasaki T**, Matsugo S, Miyamoto K, Kaneko S, Takamura T. Metformin Suppresses Expression of the Selenoprotein P Gene via an AMP-activated Kinase (AMPK)/FoxO3a Pathway in H4IIEC3 Hepatocytes. *The Journal Of Biological Chemistry*. 2014 Jan;289(1):335-345.
- 5) **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.
- 6) Okada H, Honda M, Jean S. Campbell, Sakai Y, Yamashita T, Takebuchi Y, Hada K, **Shirasaki T**, Takabatake R, Nakamura M, Sunakozaka H, Tanaka T, Nelson Fausto, Kaneko S. Acyclic retinoid targets platelet-derived growth factor signaling in the prevention of hepatic fibrosis and hepatocellular carcinoma development. *Cancer Research*. 2012 Sep;72(17):4459-71

学会発表

研究代表者 島上哲朗

国内学会

- 1) **島上哲朗**、本多政夫、金子周一 IL28B Genotype , ISGs発現量 , 前治療反応を用いたテラプレビル併用抗HCV 療法における治療効果予測と至適治療期間に関する検討 第50回日本肝臓学会総会 シンポジウム1-8 (2014年5月東京)
- 2) **島上哲朗**、本多政夫、金子周一 前治療無効例に対するテラプレビル併用3剤併用療法48週間延長投与に関する検討 第100回日本消化器病学会総会 シンポジウム6-9 (2014年4月東京)
- 3) **島上哲朗**、本多政夫、金子周一. プロテアーゼ阻害剤耐性C型肝炎ウイルスのRNA複製能・感染性粒子産生能に関する検討、第48回日本肝臓学会総会、2012年6月

国際学会

- 1) **Shimakami T**, Honda M, Shirasaki T, Liu F, Funaki M, Murai K, Shiimoto T, Murakami S, and Kaneko S. Regulation of Hepatitis C Virus Infection by Long Non-Coding RNAs. *The Liver Meeting 2014(65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease)(2014年11月ボストン)Poster 1776*
- 2) **Shimakami T**, Honda M, Shirasaki T, Liu F, Funaki M, Murai K, Shiimoto T, Murakami S, and Kaneko S. Regulation of Hepatitis C Virus Infection by Long Non-Coding RNAs. 21st

International Symposium on Hepatitis C Viruses (2014年9月バンフ) Poster P3.66

- 3) **Shimakami T**, Honda M, Shirasaki T, Murakami S, and Kaneko S. ACYCLIC RETINOID, PERETINOIN, INHIBITS HEPATITIS C VIRUS REPLICATION AND INFECTIOUS VIRUS RELEASE IN CELL CULTURE. The 49th Meeting of the European Association for the Study of the Liver (2014年4月ロンドン) Poster 1701
- 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, The 64rd AASLD2013, Poster, 2013年11月(ワシントン)
- 5) **Shimakami T**, Yamane D, Honda M, Kaneko S, and Lemon SM. miR-122 stabilizes Hepatitis C Virus RNA by an Ago2-dependent mechanism, The 10th single topic conference, Poster, 2012年11月(東京)
- 6) **Shimakami T**, Honda M, Shirasaki T, Funaki M, Takabatake R, Lemon SM, and Kaneko S. Inhibition of Hepatitis C Virus Replication by Acyclic Retinoid, The 63rd AASLD2012, Poster, 2012年11月(サンフランシスコ)

研究分担者 白崎尚芳

国内学会

- 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, Okada H, Murakami S, Kaneko S. Gene expression profile of primary hepatocyte and differential innate antiviral response of IFN- α and IL28B. 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月
- 3) **白崎尚芳**, 本多政夫, 金子周一. 慢性C型肝炎におけるIFN治療抵抗性とTGF- β シグナル 第77回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会, 2012年6月

国際学会

- 1) **Shirasaki T**, Honda M, Shimakami T, Murai K, Shiimoto T, Misu H, Takamura T, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S. LECT2 Specifically Induced by IL28B Regulates Interferon Response and HCV Replication. 65th AASLD 2014, 2014年11月
- 2) **Shirasaki T**, Honda M, Shimakami T, Murai K, Shiimoto T, Misu H, Takamura T, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S. LECT2 Specifically Induced by IL28B Regulates Interferon Response and HCV Replication. HCV meeting 2014, 2014年10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- β signaling pathway. The 64th AASLD 2013, 2013年11月

- 4) **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- β signaling pathway. HCV meeting 2013, 2013年10月
- 5) **Shirasaki T**, Honda M, Shimakami T, Okada H, Lemon S, Murakami S, Kaneko S. Gene expression profile of primary hepatocyte and differential innate antiviral response of IFN- α and IL28B. The 63rd AASLD 2012, 2012年11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

厚生労働科学研究費補助金

[肝炎等克服実用化研究事業（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。しかしながらC型慢性肝疾患におけるlncRNAの意義は不明であり、本研究ではC型肝炎ウイルス（以下HCV）感染によるlncRNAの役割を明らかにすることを目的とした。研究分担者白崎はHCVの培養細胞系を用いた検討から、lncRNA-HがHCV感染により発現が誘導され、さらにlncRNAの発現抑制によりHCV複製が抑制されることを見いだした。研究代表者島上は、チンパンジー、キメラマウスにおいてHCV感染によるlncRNA-Hの発現誘導の有無を検討した。その結果HCV感染チンパンジー、キメラマウスにおいて、培養細胞系と同様にHCV感染による肝内のlncRNA-Hの発現誘導を認めた。さらにHCV排除前後で肝生検を施行されたC型慢性肝疾患患者において、lncRNA-Hの肝内の発現量を測定したところHCV排除により有意にlncRNA-Hの発現量の低下を認めた。またC型慢性肝疾患患者において抗ウイルス療法前の肝組織中、および血清中のlncRNA-Hの発現量を測定し、インターフェロン治療感受性予測因子であるIL28Bゲノタイプ別に比較した。その結果IL28マイナー症例の肝内・血清中のlncRNA-Hの発現量は、IL28メジャー患者に比べ有意に高値であることを見いだした。これらの結果からHCV感染は、lncRNA-Hの発現を誘導することがin vivoにおいても明らかとなった。またlncRNA-Hは、インターフェロン感受性に関与している可能性が示唆された。

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 型慢性肝炎におけるインターフェロン治療効果やインターフェロン治療抵抗性、肝発癌などの様々な病態における lncRNA の関与を検討する。

研究分担者白崎は、HCV感染培養細胞のRNAを網羅的に解析して、lncRNAの一つであるlncRNA-HがHCV感染において発現誘導

されること、また lncRNA-H の発現抑制により HCV 複製が抑制されることを明らかにした。lncRNA-H は、500 塩基の lncRNA で既に lncRNA のデータベース (lncRNA db; <http://lncrnadb.org/>) に登録されている。さらにヒト肝癌組織、血清、肝癌細胞株での発現が複数報告されているが、C 型慢性肝疾患、および HCV 感染における意義は不明である。

研究代表者島上は、研究代表者白崎が *in vitro* において同定した lncRNA-H に関して *in vivo* における意義を以下の点から解析した。

- 1) *In vitro* において認められた HCV 感染による lncRNA-H の発現誘導が、マウス、チンパンジーなどの *in vivo* においても認められるかどうかを検討した。
- 2) C 型慢性肝疾患患者で抗ウイルス療法による HCV 排除前後の肝組織中の lncRNA-H の発現量を比較し、ヒトにおける HCV 感染による lncRNA-H の発現の変化を検討した。
- 3) C 型慢性肝疾患患者の抗ウイルス療法前の肝組織中及び血清中の lncRNA-H 発現量を定量 PCR にて測定し、IL28B ゲノタイプと lncRNA-H 発現量の相関の有無を検討した。

B. 研究方法

- 1) チンパンジーに HCV を含む血清を投与し、投与前、1 週、3 週、6 週、11 週、24 週後に、肝生検、血清の採取を行った。各タイムポイントで得られた肝組織由来 RNA を次世代シーケンサーによる RNAseq により解析した。lncRNA-H

量に関しては RNAseq のデータを用いて測定した。また肝組織中・血清中の HCV RNA 量を定量 PCR 法にて、さらに血中 ALT を測定した。

- 2) キメラマウスに遺伝子型 1b の HCV を感染させ、4 週間後にマウスを安楽死させ、肝組織を採取した。その後肝組織中の HCV RNA 量、lncRNA-H 量を定量 PCR 法にて解析した。
- 3) C 型慢性肝疾患患者で抗ウイルス療法による HCV の排除前後で肝生検が施行された 20 例を対象として、HCV 排除前後での lncRNA-H の肝組織中の発現量を定量 PCR 法で測定し、比較した。
- 4) 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、IL28B ゲノタイプ (major と minor) との相関の有無を検討した。
- 5) テラプレビル併用ペグインターフェロン、リバビリン療法を施行された C 型慢性肝疾患患者 80 例 (IL28B ゲノタイプ メジャー、マイナー 各々 40 例) に関して治療開始前の血清中 lncRNA-H 量を定量 PCR にて測定して IL28B ゲノタイプに (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

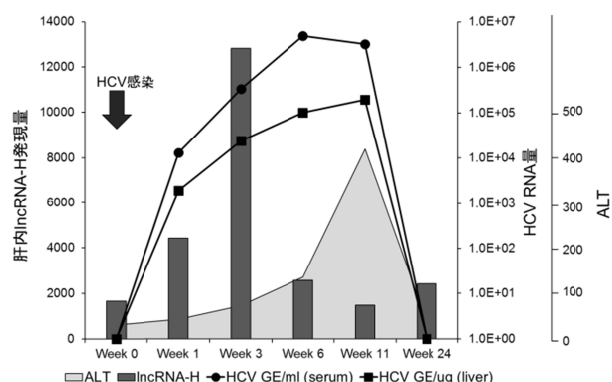
関しては、平成 24 年 6 月 12 日付けで文部科学大臣より確認を受け、更に金沢大学長より機関承認を得ている(金大 6 第 1316 号)。またヒトゲノム・遺伝子解析研究が必要になった場合にはヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守し、インフォームドコンセントを得た症例の試料のみを用いて研究を行った。

C. 研究結果

1) HCV 感染チンパンジーにおける IncRNA-H の発現誘導解析

HCV の感染により HCV RNA は 1 週後から 11 週後まで持続的に肝内、血清で持続的に検出されたが、24 週後には肝内、血清中で検出されなかった。また血清 ALT 値は感染直後より 11 週後まで増加傾向を示したが、HCV RNA が陰性化した 24 週後には正常化した。これらの結果から HCV は少なくとも 11 週後まで持続感染し、急性肝炎を惹起したが、24 週後には自然排除されたと考えられた。IncRNA-H の発現量に関しては、HCV RNA の増加と共に、3 週後まで著明に増加し、その後低下傾向を示し、ウイルス排除時には、感染前の値に復した(図 1)。

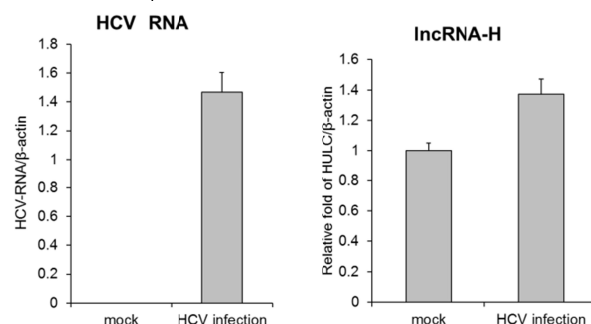
図 1 HCV 感染チンパンジーにおける肝内 IncRNA-H 発現量



2) HCV 感染マウスにおける IncRNA-H の発現誘導解析

キメラマウスに HCV に感染させ、1 週間後にマウスより採血し HCV RNA 量を測定したところ 4.2×10^7 copies/ml 存在し、持続感染が成立したものと判断した。28 日後 HCV 感染マウスおよび非感染マウスを安楽死後、肝組織から全 RNA を抽出し、HCV RNA と IncRNA-H 発現量を定量 PCR にて測定した。その結果 HCV RNA は HCV 感染マウスにおいて検出され、28 日後まで持続感染したと考えられた。また HCV 感染マウスの IncRNA-H の発現量は非感染マウスに比べて高値であった(図 2)。

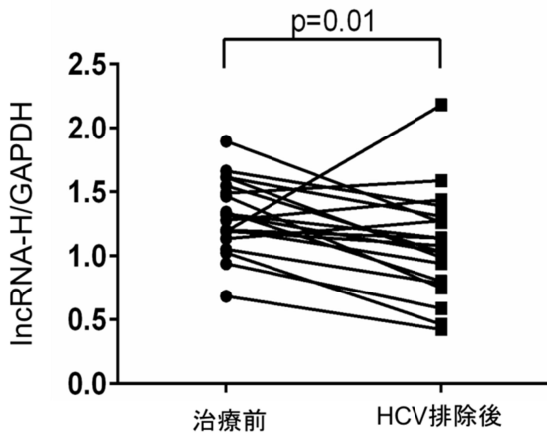
図 2 HCV 感染キメラマウスにおける肝内 HCV RNA、IncRNA-H 発現量



3) C 型慢性肝疾患患者におけるウイルス排除後の肝内 IncRNA-H 発現量

C 型慢性肝疾患患者で抗ウイルス療法による HCV の排除前後で肝生検が施行された 20 例を対象として、HCV 排除前後での IncRNA-H の肝組織中の発現量を定量 PCR 法で測定し、比較した。その結果、HCV 排除により有意に IncRNA-H の発現量の低下を認めた(図 3)。

図 3 HCV 排除前後における IncRNA-H の発

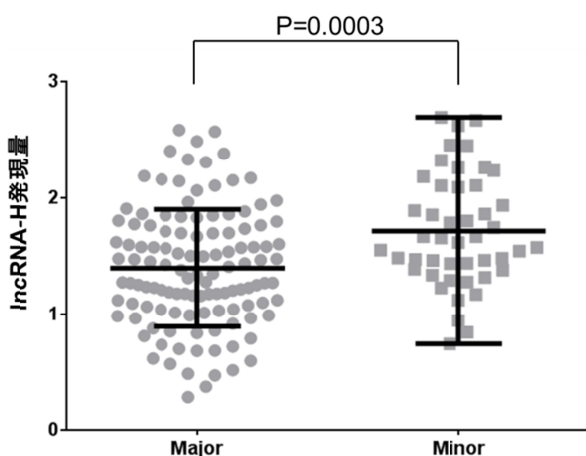


現量の比較

4) IL28B ゲノタイプ別肝組織中 IncRNA-H 発現量の比較

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 ゲノタイプ別肝組織中 IncRNA-H 発現量

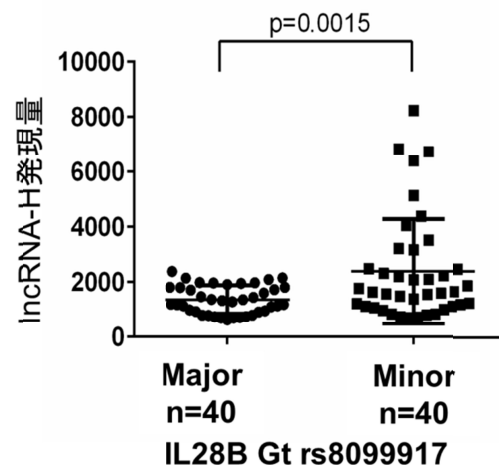


5) IL28B ゲノタイプ別血清中 IncRNA-H

発現量の比較

テラプレビル併用ペグインターフェロン、リバビリン療法を施行された C 型慢性肝疾患患者 80 例 (IL28B ゲノタイプ メジャー、マイナー 各々 40 例) に関して治療開始前の血清中 IncRNA-H 量を定量 PCR にて測定して IL28B ゲノタイプによる IncRNA-H の発現量を比較した。肝内と同様血清中においても IncRNA-H の発現量は IL28B マイナー患者では有意に IL28B メジャー患者に比べて高値であった (図 5)。

図 5 IL28B ゲノタイプ別血清中 IncRNA-H 発現量



D. 考察

- 1) チンパンジーおよびキメラマウスへの HCV 感染により、培養細胞系と同様に IncRNA-H の肝内での発現誘導を認めた。さらに C 型慢性肝疾患患者において抗ウイルス療法による HCV 排除により IncRNA-H の肝内での有意な発現の低下を認めた。今回の検討により *in vivo* においても HCV 感染により IncRNA-H の発現が誘導されることを明らかにした。
- 2) IncRNA-H は、肝発癌との関与が示唆さ

れている。そのため HCV により lncRNA-H の発現誘導は C 型慢性肝疾患患者における肝発癌機序の解明の手がかりとなる可能性が考えられる。

- 3) HCV 排除後、lncRNA-H の発現が低下する患者と低下しない患者が存在した。今後 HCV 排除後の lncRNA-H の発現量の変化と、HCV 排除後の肝発癌との関連についても検討を行う。すなわち lncRNA-H は HCV 排除後の肝発癌に関するバイオマーカーとなり得る可能性が考えられ、その観点から今後も症例数を増やして検討を行う。
- 4) 肝内、および血清の lncRNA-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。lncRNA-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

In vivo においても in vitro と同様に HCV 感染による lncRNA-H の発現誘導を認めた。

また IL28B ゲノタイプマイナー患者の肝内、血清中 lncRNA-H 発現量はメジャー患者に比べて有意に高値であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

論文発表

- 1) Selitsky SR, Baran-Gale J, Honda M, Yamane D, Masaki T, Fannin EE, Guerra B, Shirasaki T, **Shimakami T**, Kaneko S, Lanford RE, Lemon SM, Sethupathy P. Small tRNA-derived RNAs are increased and more abundant than microRNAs in chronic hepatitis B and C. *Sci Rep.* 2015 Jan 8;5:7675.
- 2) Shirasaki T, Honda M, **Shimakami T**, Murai K, Shiimoto T, Okada H, Takabatake R, Tokumaru A, Sakai Y, Yamashita T, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S. Impaired IFN signaling in chronic hepatitis C patients with advanced fibrosis via the TGF- β signaling pathway. *Hepatology.* 2014 Nov;60(5):1519-30.
- 3) Yamane D, McGivern DR, Wauthier E, Yi M, Madden VJ, Welsch C, Antes I, Wen Y, Chugh PE, McGee CE, Widman DG, Misumi I, Bandyopadhyay S, Kim S, **Shimakami T**, Oikawa T, Whitmire JK, Heise MT, Dittmer DP, Kao CC, Pitson SM, Merrill AH Jr, Reid LM, and Lemon SM. Regulation of the hepatitis C virus RNA replicase by endogenous lipid peroxidation. *Nature Medicine.* 2014 Aug;20(8):927-35.
- 4) Li Y, Masaki T, **Shimakami T**, Lemon SM. hnRNP L and NF90 Interact with Hepatitis C Virus 5'-Terminal Untranslated RNA and Promote Efficient Replication. *J Virol.* 2014 Jul 1;88(13):7199-7209.
- 5) **Shimakami T**, Honda M, Shirasaki T, Takabatake R, Liu F, Murai K, Shiimoto T, Funaki M, Yamane D, Murakami S, Lemon SM, Kaneko S. The acyclic retinoid

- Peretinoin inhibits hepatitis C virus replication and infectious virus release in vitro. *Sci Rep*. 2014 Apr 15;4:4688.
- 6) 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*. 2014 Mar;59(3):828-38.
- 7) 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
- 8) 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.
- 9) Welsch C, **Shimakami T**, Hartmann C, Yang Y, Domingues FS, Lengauer T, Zeuzem S, Lemon SM. Peptidomimetic escape mechanisms arise via genetic diversity in the ligand-binding site of the hepatitis C virus NS3/4A serine protease. *Gastroenterology*. 2012. 142(3):654-63
- 10) Welsch C, Schweizer S, **Shimakami T**, Domingues FS, Kim S, Lemon SM, Antes I. Ketoamide resistance and hepatitis C virus fitness in val55 variants of the NS3 serine protease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012. 56(4):1907-15.
- 11) **Shimakami T**, Yamane D, Welsch C, Hensley L, Jangra RK, Lemon SM. Base pairing between hepatitis C virus RNA and microRNA 122 3' of its seed sequence is essential for genome stabilization and production of infectious virus. *J Virol*. 2012. 86(13):7372-83.
- 12) **Shimakami T**, Yamane D, Jangra RK, Kempf BJ, Spaniel C, Barton DJ, Lemon SM. Stabilization of hepatitis C virus RNA by an Ago2-miR-122 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012. 109(3):941-6.

書籍発表

- 1) **島上哲朗**、酒井明人、金子周一 C型肝炎、肝硬変患者、キャリアのフォローアップ戦略とエビデンス 日本臨床 2015年1月 73巻増刊号1、788-92
- 2) **島上哲朗**、山根太典、Lemon S miR-122-Ago2複合体によるC型肝炎ウイルスRNAの安定化、2012年、実験医学、30:1444-8

2. 学会発表

国内学会

- 1) **島上哲朗**、本多政夫、金子周一 IL28B Genotype, ISGs発現量, 前治療反応を用いたテラプレビル併用抗HCV療法における治療効果予測と至適治療期間に関する検討 第50回日本肝臓学会総会 シンポジウム1-8 (2014年5月東京)

2) **島上哲朗**、本多政夫、金子周一 前治療無効例に対するテラプレビル併用3剤併用療法48週間延長投与に関する検討 第100回日本消化器病学会総会 シンポジウム6-9 (2014年4月東京)

3) **島上哲朗**、本多政夫、金子周一. プロテアーゼ阻害剤耐性C型肝炎ウイルスのRNA複製能・感染性粒子産生能に関する検討、第48回日本肝臓学会総会、2012年6月

国際学会

1) **Shimakami T**, Honda M, Shirasaki T, Liu F, Funaki M, Murai K, Shiimoto T, Murakami S, and Kaneko S. Regulation of Hepatitis C Virus Infection by Long Non-Coding RNAs. The Liver Meeting 2014(65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease)(2014年11月ボストン)Poster 1776

2) **Shimakami T**, Honda M, Shirasaki T, Liu F, Funaki M, Murai K, Shiimoto T, Murakami S, and Kaneko S. Regulation of Hepatitis C Virus Infection by Long Non-Coding RNAs. 21st International Symposium on Hepatitis C Viruses (2014年9月バンフ) Poster P3.66

3) **Shimakami T**, Honda M, Shirasaki T, Murakami S, and Kaneko S. ACYCLIC RETINOID, PERETINOIN, INHIBITS HEPATITIS C VIRUS REPLICATION AND INFECTIOUS VIRUS RELEASE IN CELL CULTURE. The 49th Meeting of the European Association for the Study of the Liver (2014年4月ロンドン) Poster 1701

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, The 64rd AASLD2013, Poster, 2013年11月(ワシントン)

5) **Shimakami T**, Yamane D, Honda M, Kaneko S, and Lemon SM. miR-122 stabilizes Hepatitis C Virus RNA by an Ago2-dependent mechanism, The 10th single topic conference, Poster, 2012年11月(東京)

6) **Shimakami T**, Honda M, Shirasaki T, Funaki M, Takabatake R, Lemon SM, and Kaneko S. Inhibition of Hepatitis C Virus Replication by Acyclic Retinoid, The 63rd AASLD2012, Poster, 2012年11月(サンフランシスコ)

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

[肝炎等克服実用化研究事業（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：現在C型慢性肝炎に対する標準治療は、従来のペグインターフェロンとリバビリン併用療法に加え、プロテアーゼ阻害剤を加えた3剤併用療法となり、HCV排除率は70-80%にまで向上した。しかし、今後プロテアーゼ阻害剤耐性ウイルスによるbreakthrough肝炎、またインターフェロンの副作用などによる治療困難例への対策が必要となる。そのため既存治療とは異なる作用機序の新規抗HCV療法の開発が急務と考えられる。さらに抗HCV療法の中心薬であるインターフェロン治療効果予測因子の検索、またインターフェロン治療抵抗性機序の解明が急務と考えられる。

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。短鎖non-coding RNA(ncRNA)である肝特異的microRNA、microRNA-122(miR-122)によるHCV複製制御機構はC型肝炎ウイルス（以下HCV）の培養細胞系において明らかとなった（Shimakami et al, PNAS, 2012）。その後miR-122に対するアンチセンス療法の有用性は、HCV感染チンパンジー、およびC型肝炎患者に対して施行されたPhase2a臨床試験においても明らかとなった。

今回の検討では、HCV複製を制御しうるlncRNAを同定し、その機能的役割を解明することを目的とした。次世代シーケンズ法を用いて、HCV感染培養細胞由来RNAを網羅的に解析し、HCV感染特異的に発現が変化するlncRNAを探索した。その結果HCV感染特異的に発現誘導されるlncRNA(lncRNA-H)を同定した。lncRNA-Hに対するsiRNAを作成し、HCV感染培養細胞に導入することで、lncRNA-Hノックダウン細胞を作成した。lncRNA-Hノックダウン細胞では、HCV複製及び感染性粒子産生能が顕著に抑制された。このHCV抑制効果はHCVの種々のゲノタイプにおいても同様であった。更に、lncRNA-Hノックアウト細胞を作成しHCV複製を検討した結果、lncRNA-Hノックアウト細胞ではHCV複製はほぼ完全に抑制されることが明らかとなった。HCV感染におけるlncRNA-Hの発現誘導は転写因子c-Junを介していることを示唆する結果を得た。以上の結果から、lncRNA-Hは、HCV複製により発現誘導するlncRNAであり、このlncRNA-Hの発現を抑制させることでHCV複製を顕著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る。

A. 研究目的

- 1) HCV 感染特異的に発現が増減する lncRNA を探索する。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。
- 2) 同定した lncRNA による HCV 複製制御機構を解明する。
- 3) HCV 感染による lncRNA の発現誘導機序を解明する。

B. 研究方法

- 1-1) 細胞培養感染クローンである、遺伝子型 a H77S株と a JFH1株のキメラである HJ3-5株をヒト肝癌細胞株 (Huh7.5) に感染させ経時的に細胞全 RNA を回収した。感染 24 時間後に NS5A 阻害剤を投入し、その 48 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 RNA を回収した。
- 1-2) これらの RNA のうち polyA 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。
- 1-3) 上記により発現が認められた RNA のうち既存の遺伝子データベースと照合を行い lncRNA のみ抽出した。その中から HCV 感染特異的に発現誘導される lncRNA を 26 個同定した。
- 1-4) 上記の lncRNA 26 個に対する siRNA を 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。
- 2-1) 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。

- 2-2) 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、継時的に全 RNA 及び培養上清を回収し qRT-PCR 法にて HCV RNA 及び lncRNA-H の発現量を、Gaussia Luciferase 法により HCV 複製を測定した。
- 2-3) 上記の結果から、最も強く lncRNA-H の発現を抑制する siRNA (si-lncRNA-H-3) に対する濃度依存実験を行った。
- 2-4) 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 lncRNA-H の HCV 複製に与える影響を検討した。
- 2-5) siRNA を用いて lncRNA-H ノックダウン細胞を作成し、その細胞に HCV 感染クローンである、遺伝子型 IIa JFH1 株のキメラ (HJ3-5 株) 感染させた。その後、培養上清を Huh7.5 細胞に処置し 72 時間後、96 時間後の HCV-core 蛋白質陽性細胞を算出し、感染性粒子産生能を評価した。
- 2-6) lncRNA-H の HCV 複製制御機序をより詳細に解明するため恒常的 lncRNA-H ノックアウト細胞を作成した。ノックアウト細胞は Zinc Finger

Nuclease システムを用いて lncRNA-H 特異的な遺伝子切断を行った。細胞はプラストサイジン耐性株を選択的に培養することによりクローン化した。lncRNA-H ノックアウト細胞に HCV 感染クローンである HJ3-5G1uc2A 株を感染させ経時的に HCV 複製をモニターした。

3-1) Huh7.5 細胞に c-Jun の発現プラスミドを導入し c-Jun 過剰発現細胞を作成した。上記の細胞に HCV を感染させ lncRNA-H の発現を検討した。更に抗 HCV 薬であるシメプレビルを処置し、HCV 複製を抑制させたときの lncRNA-H の発現を検討した。

(倫理面への配慮)

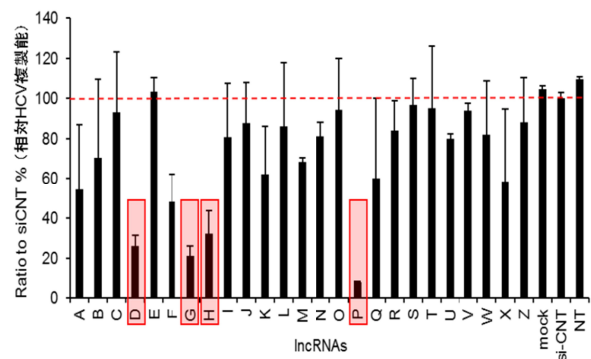
本研究では感染性粒子を産生しうる HCV 細胞培養系も用いる。そのためウイルス粒子を形成する実験に関しては、必ず P2 ルームで施行するとともに、汚染事故には十分注意して行う。なお申請者が所属する研究グループは既に P2 ルームを有しており、HCV 感染実験での P2 ルームの使用に関しては、平成 24 年 6 月 12 日付けで文部科学大臣より確認を受け、更に金沢大学長より機関承認を得ている(金大 6 第 1316 号)。

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

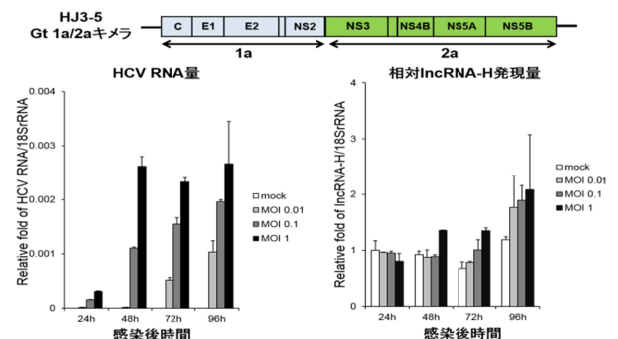
1) 次世代シーケンス法による解析から HCV 感染特異的に発現が増加している lncRNA 候補 26 個 (A~Z) を抽出した。次に各々の lncRNA に対する siRNA を 2~3 個作成し、HCV 複製培養細胞に遺伝子導入することで lncRNA の発現を抑制し、HCV 複製に与える影響を検討した結果、lncRNA-D, G, H, P の発現抑制により HCV 複製の著明な抑制を認めた(図 1)。その中で既に lncRNA として GeneBank に登録されている lncRNA-H に着目してその後の解析を行った。

図 1 lncRNA-A-Z における HCV 複製制御



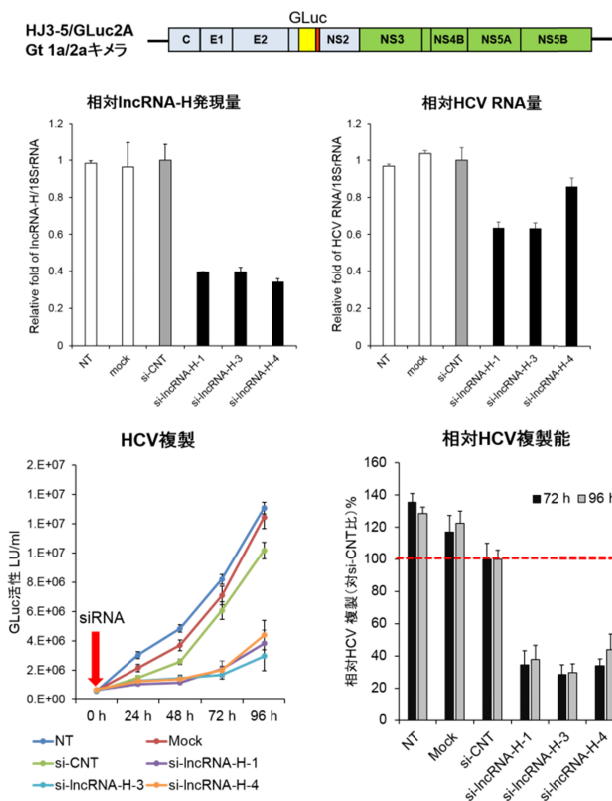
2-1) HCV 感染により lncRNA-H の発現は感染ウイルス量及び時間依存的に増加した。感染 96 時間後では 24 時間後に比べおよそ 2 倍の lncRNA-H の発現増加を認めた(図 2)。

図 2 HCV 感染による lncRNA-H の発現誘導



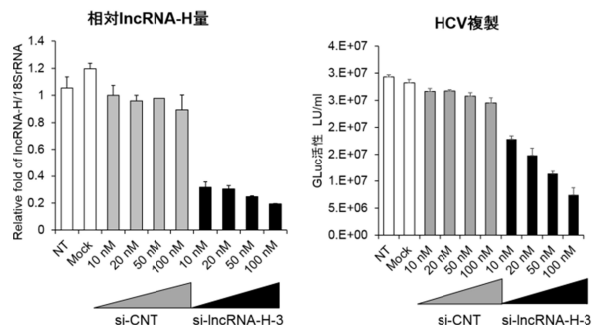
2-2) lncRNA-H に対する siRNA を 3 種類作成した。lncRNA-H の発現を抑制し、HCV 感染に与える影響を検討した。その結果、3 種類の siRNA 全てで lncRNA-H の発現抑制を認めた。lncRNA-H の発現抑制下では HCV の複製は有意に抑制された。si-lncRNA-H-3 に最も強い抑制効果が認められた (図 3)。

図 3 lncRNA-H の発現抑制による HCV 複製抑制



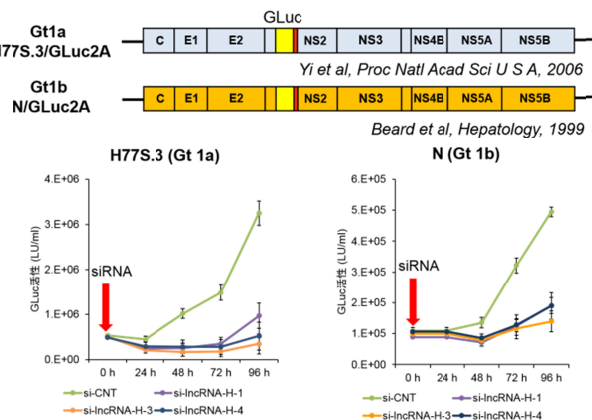
2-3) 最も強く lncRNA-H の発現を抑制する siRNA (si-lncRNA-H-3) を種々の容量 (10nM ~ 100nM) で処置し HCV 複製を測定した結果、siRNA 用量依存的に HCV 複製を抑制した。100nM 処置により HCV 複製を 5 分の 1 まで抑制することが出来た (図 4)。

図 4 lncRNA-H の発現抑制による HCV 複製抑制



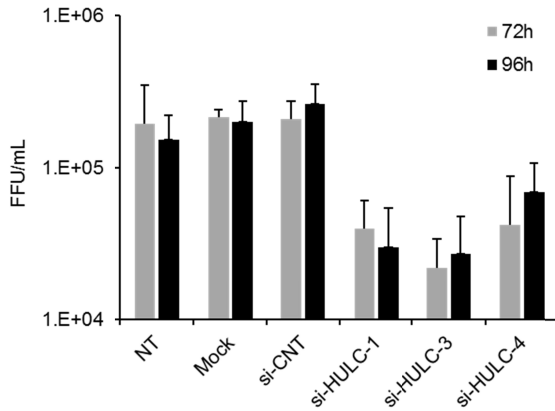
2-4) 異なる HCV ゲノタイプである感染クローン Ia H77S 株、Ib N 株に対しても lncRNA-H の発現を抑制することで、HCV 複製を有意に抑制した (図 5)。

図 5 lncRNA-H による Gt1a, 1b HCV に対する複製抑制



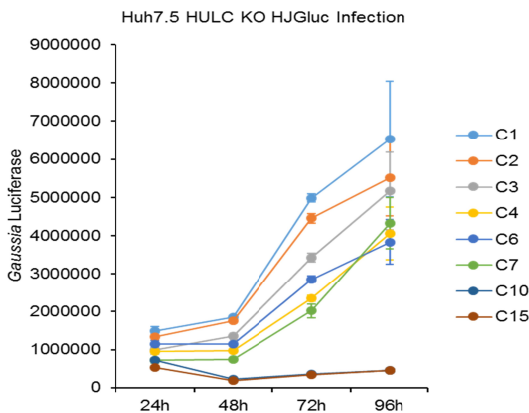
2-5) lncRNA-H ノックダウン細胞では HCV の感染性粒子産生能が顕著に減少した。lncRNA-H は HCV 複製のみならず感染性粒子産生能にも影響を与える lncRNA である (図 6)。

図 6 lncRNA-H の発現抑制の感染性粒子産生に与える影響



2-6) Huh7.5 細胞の IncRNA-H 恒常的ノックアウト細胞を作成しクローン化した (Huh7.5-IncRNA-H KO C-10, C15)。この細胞では、HCV 複製は顕著に抑制された (図 7)。

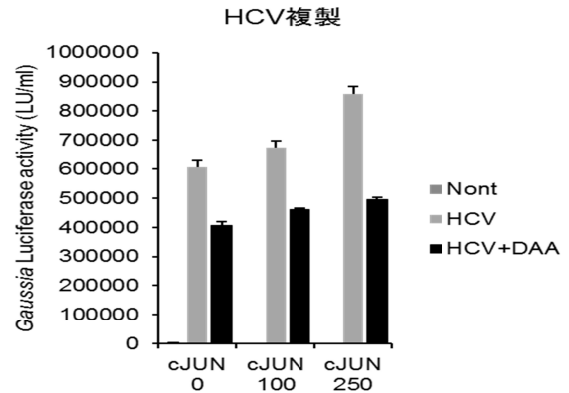
図 7 IncRNA-H ノックアウト細胞における HCV 複製



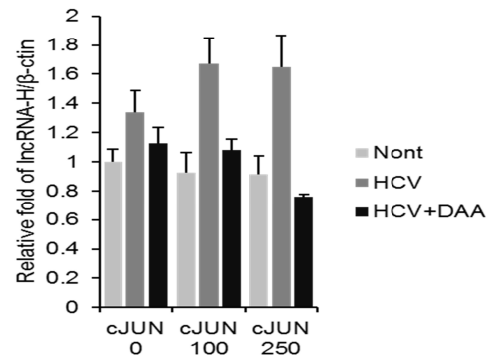
3) IncRNA-H のプロモータ領域の解析から c-Jun(AP1)結合領域が存在することをみいだした。そのため c-Jun に着目し、HCV 感染による IncRNA-H 発現抑制機序の解明を行った。c-Jun の過剰発現により用量依存性の HCV 複製の増強を認められた。また HCV 感染なしの細胞では c-Jun の過剰発現を行っても IncRNA-H の発現誘導は認めなかったが、HCV 感染を伴った場合は著明な IncRNA-H の誘導

を認めた (図 8)。

図 8 c-Jun を介した IncRNA-H の発現誘導



IncRNA-H 発現量



D. 考察

本研究は HCV 感染特異的 IncRNA を同定しその機能的役割を解明することを目的とした。次世代シーケンサーを用いた検討から、HCV 感染特異的に発現誘導される IncRNA を 26 個同定し、siRNA を用いた検討から HCV 複製を制御する IncRNA を 4 個同定した。それら IncRNA の中で本研究は IncRNA-H に着目した。IncRNA-H は、HCV 複製により発現誘導する IncRNA でありその発現誘導は c-Jun を介していることが示唆された。IncRNA-H ノックアウト細胞における HCV 複製の顕著な抑制やノックダウン細胞における感染性粒子産生能の著明な抑制効果から、IncRNA-H は HCV 複製に必須な IncRNA であることが強く示唆さ

れる。よって新規治療標的の候補となる可能性が十分に考えられる。

E. 結論

HCV 感染特異的に発現誘導される lncRNA を同定した。更にその lncRNA は HCV 感染を制御し、HCV の生活環に必須な lncRNA である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) **Shirasaki T**, Honda M, Shimakami T, Murai K, Shiimoto T, Okada H, Takabatake R, Tokumaru A, Sakai Y, Yamashita T, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S. Impaired IFN signaling in chronic hepatitis C patients with advanced fibrosis via the TGF- β signaling pathway. *Hepatology*. 2014 Nov;60(5):1519-30
- 2) Shimakami T, Honda M, **Shirasaki T**, Liu F, Murai K, Shiimoto T, Funaki M, Yamane D, Murakami S, Lemon SM, Kaneko S. The Acyclic Retinoid Peretinoin Inhibits Hepatitis C Virus Replication and Infectious Virus Release in Vitro. *Scientific Reports*. 2014 Apr15;4:4688
- 3) Honda M, **Shirasaki T**, Shimakami T, Sakai A, Horii R, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Kaneko S. Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes. *Hepatology*. 2014 Mar;59(3):828-838

- 4) Takayama H, Misu H, Iwama H, Chikamoto K, Saito Y, Murao K, Teraguchi A, Lan F, Kikuchi A, Saito R, Tajima N, **Shirasaki T**, Matsugo S, Miyamoto K, Kaneko S, Takamura T. Metformin Suppresses Expression of the Selenoprotein P Gene via an AMP-activated Kinase (AMPK)/FoxO3a Pathway in H4IIEC3 Hepatocytes. *The Journal Of Biological Chemistry*. 2014 Jan;289(1):335-345.
- 5) **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.
- 6) Okada H, Honda M, Jean S. Campbell, Sakai Y, Yamashita T, Takebuchi Y, Hada K, **Shirasaki T**, Takabatake R, Nakamura M, Sunakozaka H, Tanaka T, Nelson Fausto, Kaneko S. Acyclic retinoid targets platelet-derived growth factor signaling in the prevention of hepatic fibrosis and hepatocellular carcinoma development. *Cancer Research*. 2012 Sep;72(17):4459-71

2. 学会発表

国内学会

- 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, Okada H, Murakami S, Kaneko S. Gene expression profile of primary hepatocyte and differential innate antiviral response of IFN- α and IL28B. 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月

3) **白崎尚芳**, 本多政夫, 金子周一. 慢性C型肝炎におけるIFN治療抵抗性とTGF- β シグナル 第77回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会, 2012年6月

国際学会

1) **Shirasaki T**, Honda M, Shimakami T, Murai K, Shiimoto T, Misu H, Takamura T, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S. LECT2 Specifically Induced by IL28B Regulates Interferon Response and HCV Replication. 65th AASLD 2014, 2014年11月

2) **Shirasaki T**, Honda M, Shimakami T, Murai K, Shiimoto T, Misu H, Takamura T, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S. LECT2 Specifically Induced by IL28B Regulates Interferon Response and HCV Replication. HCV meeting 2014, 2014年10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- β signaling pathway. The 64th AASLD 2013, 2013年11月

4) **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- β signaling pathway. HCV meeting 2013, 2013年10月

5) **Shirasaki T**, Honda M, Shimakami T, Okada H, Lemon S, Murakami S, Kaneko S. Gene expression profile of primary hepatocyte and differential innate antiviral response of IFN- α and IL28B. The 63rd AASLD 2012, 2012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

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
島上哲朗、酒井明人、金子周一	C型肝炎、肝硬変患者、キャリアのフォローアップ戦略とエビデンス	工藤正俊	日本臨牀増刊号最新肝臓病学	日本臨牀社	大阪	2015年	73巻増刊号1,788-92
島上哲朗、山根大典、Stanley Lemon	miR-122-Ago2複合体によるC型肝炎ウイルスRNAの安定化	一戸敦子	実験医学	羊土社	東京	2012年	1444-8

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
Selitsky SR, Baran-Gale J, Honda M, Yamane D, Masaki T, Fannin EE, Guerra B, <u>Shirasaki T</u> , <u>Shimakami T</u> , Kaneko S, Lanford RE, Lemon SM, Sethupathy P	Small tRNA-derived RNAs are increased and more abundant than microRNAs in chronic hepatitis B and C	Scientific Reports	5	7675	2015
<u>Shirasaki T</u> , Honda M, <u>Shimakami T</u> , Murai K, Shiimoto T, Okada H, Takabatake R, Tokumaru A, Sakai Y, Yamashita T, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S	Impaired IFN signaling in chronic hepatitis C patients with advanced fibrosis via the TGF- β signaling pathway	Hepatology	60	1519-30	2014
Yamane D, McGivern DR, Wauthier E, Yi M, Madden VJ, Welsch C, Antes I, Wen Y, Chugh PE, McGee CE, Widman DG, Misumi I, Bandyopadhyay S, Kim S, <u>Shimakami T</u> , Oikawa T, Whitmire JK, Heise MT, Dittmer DP, Kao CC, Pitson SM, Merrill AH Jr, Reid LM, and Lemon SM	Regulation of the hepatitis C virus RNA replicase by endogenous lipid peroxidation	Nature Medicine	20	927-35	2014
Li Y, Masaki T, <u>Shimakami T</u> , Lemon SM.	hnRNP L and NF90 Interact with Hepatitis C Virus 5'-Terminal Untranslated RNA and Promote Efficient Replication	Journal of Virology	88	7199-209	2014
<u>Shimakami T</u> , Honda M, <u>Shirasaki T</u> , Takabatake R, Liu F, Murai K, Shiimoto T, Funaki M, Yamane D, Murakami S, Lemon SM, Kaneko S	The acyclic retinoid Peretinoin inhibits hepatitis C virus replication and infectious virus release in vitro	Scientific Reports	4	4688	2014

Honda M, <u>Shirasaki T</u> , <u>Shimakami T</u> , Sakai A, Horii R, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Kaneko S	Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes	Hepatology	59	828-38	2014
Takayama H, Misu H, Iwama H, Chikamoto K, Saito Y, Muraio K, Teraguchi A, Lan F, Kikuchi A, Saito R, Tajima N, <u>Shirasaki T</u> , Matsugo S, Miyamoto K, Kaneko S, Takamura T.	Metformin Suppresses Expression of the Selenoprotein P Gene via an AMP-activated Kinase (AMPK)/FoxO3a Pathway in H4IIEC3 Hepatocytes.	The Journal Of Biological Chemistry	289	335-45	2014
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	e76867	2013
<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	Journal of Virology	87	5270	2013
Welsch C, <u>Shimakami T</u> , Hartmann C, Yang Y, Domingues FS, Lengauer T, Zeuzem S, Lemon SM.	Peptidomimetic escape mechanisms arise via genetic diversity in the ligand-binding site of the hepatitis C virus NS3/4A serine protease	Gastroenterology	142	654-63	2012
Welsch C, Schweizer S, <u>Shimakami T</u> , Domingues FS, Kim S, Lemon SM, Antes I	Ketoamide resistance and hepatitis C virus fitness in val55 variants of the NS3 serine protease	Antimicrobial Agents Chemotherapy	56	1907-15	2012
<u>Shimakami T</u> , Yamane D, Welsch C, Hensley L, Jangra RK, Lemon SM	Base pairing between hepatitis C virus RNA and microRNA 122 3' of its seed sequence is essential for genome stabilization and production of infectious virus	Journal of Virology	86	7372-83	2012
<u>Shimakami T</u> , Yamane D, Jangra RK, Kempf BJ, Spaniel C, Barton DJ, Lemon SM.	Stabilization of hepatitis C virus RNA by an Ago2-miR-122 complex	Proc Natl Acad Sci U S A	109	941-6	2012
Okada H, Honda M, Jean S. Campbell, Sakai Y, Yamashita T, Takebuchi Y, Hada K, <u>Shirasaki T</u> , Takabatake R, Nakamura M, Sunakozaka H, Tanaka T, Nelson Fausto, Kaneko S	Acyclic retinoid targets platelet-derived growth factor signaling in the prevention of hepatic fibrosis and hepatocellular carcinoma development	Cancer Research	72	4459-71	2012