

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08492

研究課題名(和文) 長鎖ノンコーディングRNAを基軸としたC型慢性肝疾患の病態制御

研究課題名(英文) Control of Chronic Liver Diseases due to Hepatitis C Virus by Long Non-coding RNAs

研究代表者

島上 哲朗 (Shimakami, Tetsuro)

金沢大学・附属病院・特任教授

研究者番号：50436820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：長鎖ノンコーディングRNAのC型肝炎ウイルス(HCV)感染における役割を明らかにするため研究を実施した。HCV感染培養細胞のRNAを次世代シーケンサーで解析した所、長鎖ノンコーディングRNAの一つHULCの発現がHCV感染により増加することが明らかになった。HCV感染によるHULCの増加は、HCV感染チンパンジー、HCV感染マウスモデルでも認められた。またHCV感染培養肝細胞でHULCの発現を抑制したところHCV複製の低下を認め、この効果はHCVの翻訳過程の抑制を介していると考えられた。HULCは肝発癌の関与が示唆されており、HCVはHULCの発現を増加し肝発癌を誘発していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of long non-coding RNAs in HCV infection. The analysis on RNA of HCV-infected cultured hepatocytes by a next generation sequencer revealed that the RNA level of one of long non-coding RNAs, HULC, increased. The increase of HULC RNA level was observed not only in HCV-infected cultured hepatocytes, but also in an HCV-infected chimpanzee and a HCV-infected mouse. The knockdown of HCV by siRNA suppressed HCV replication as well as infectious virus production in HCV-infected cultured hepatocytes. This effect seemed to occur through the suppression of a translation step among HCV life cycles. Several recent reports show that HULC has the ability to promote hepatocarcinogenesis, therefore, the result of this study suggests a mechanism of hepatocarcinogenesis due to HCV infection through HULC.

研究分野：肝臓病学

キーワード：C型肝炎ウイルス 長鎖ノンコーディングRNA

1. 研究開始当初の背景

研究開始時 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た。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った。

2. 研究の目的

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 型肝炎疾患における肝線維化進展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て以下の解析を行った。

- (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 HULC が HCV 感染において発現誘導されること、また HULC 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 HULC 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 HULC 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解析する。
- (2) C 型肝炎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 HULC の発現量を比較し、ヒトにおける HCV 感染による HULC の発現の変化を解析する。

3. 研究の方法

- (1) RNA シークエンス法にて 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 HULC に着目し、HCV 培養細胞系を用いて、HULC 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。HULC 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 にて、さらに血中 ALT を測定した。

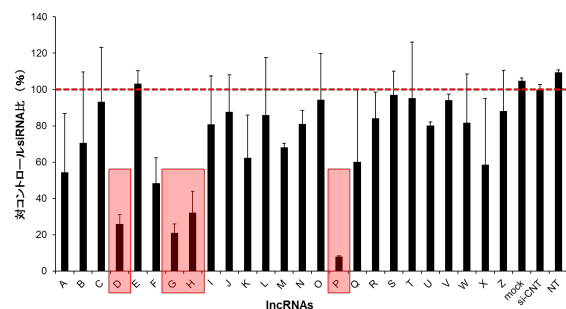
- (5) キメラマウスに遺伝子型 1b の HCV を感染させ、4 週間後にマウスを安楽死させ、肝組織を採取した。その後肝組織中の HCV RNA 量、HULC 量を定量 PCR 法にて解析した。
- (6) C 型肝炎慢性疾患患者で抗ウイルス療法による HCV の排除前後で肝生検が施行された 20 例を対象として、HCV 排除前後での HULC の肝組織中の発現量を定量 PCR 法で測定し、比較した。

4. 研究成果

- (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 HULC の発現誘導

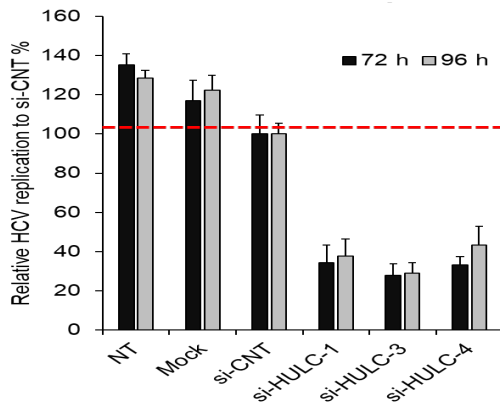
これら 4 種類の lncRNA のうち、既に lncRNA としてデータベースに登録されており、さらに肝臓における発現も報告されている lncRNA-H=HULC に着目した Huh-7.5 細胞に HJ3-5 ウイルスを MOI 0.01-1 で感染させ、lncRNA-H 発現量を定量 PCR 法で測定した。その結果、時間・MOI 依存性の HULC の発現誘導を認めた。

- (3) HULC 発現抑制による HCV 抑制

HULC 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 HULC 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 HULC 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、HULC によって最も強い効果を認めた(図2)。また、HULC 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。HCV 全ライフサイクルのうち HULC は HCV の蛋白翻訳過程を抑制することで HCV 複製を抑制していることが示唆された。

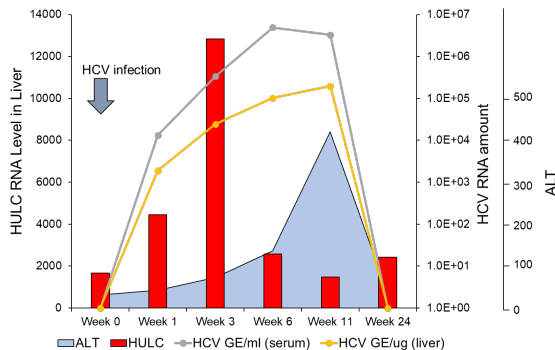
図2 HULC 発現抑制による HCV 複製抑制



(4) HCV 感染チンパンジーにおける HULC 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。HULC 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3)。

図3 HCV 感染チンパンジーにおける肝内 HULC 発現量

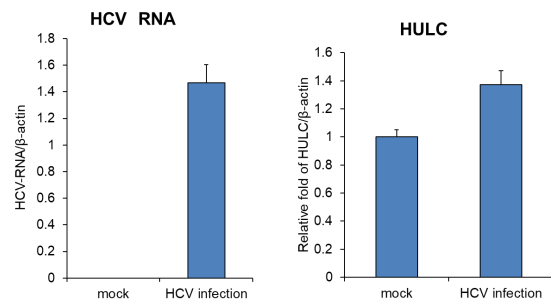


(5) HCV 感染マウスにおける HULC の発現誘導解析

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

る  $4.2 \times 10^7$  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 HULC 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 HULC の発現量は非感染マウスに比べて高値であった(図4)。

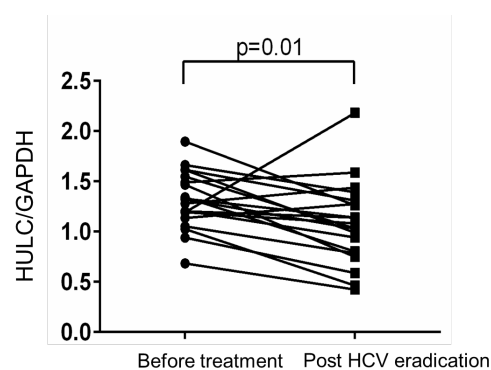
図4 HCV 感染キメラマウスにおける肝内 HCV RNA、HULC 発現量



(6) C 型慢性肝疾患患者におけるウイルス排除後の肝内 HULC 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 HULC 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 HULC の発現量の低下を認めた(図5)。

図5 HCV 排除前後における HULC の発現量の比較



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計6件)

- (1) Murai K, Shimakami T, Welsch C, Shirasaki T, Liu F, Kitabayashi J, Tanaka S, Funaki M, Omura H, Nishikawa T, Suminyadorj A, Honda M, Kaneko S. Unexpected Replication Boost by Simeprevir for Simeprevir-resistant Variants in Genotype 1a Hepatitis C Virus. *Antimicrob Agents Chemother.* 査読有. in press (2018 Apr accepted) doi:10.1128/AAC.02601-17.
- (2) Funaki M, Kitabayashi J, Shimakami T,

Nagata N, Sakai Y, Takegoshi K, Okada H, Murai K, Shirasaki T, Oyama T, Yamashita T, Ota T, Takuwa Y, Honda M, Kaneko S. Peretinoin, an acyclic retinoid, inhibits hepatocarcinogenesis by suppressing sphingosine kinase 1 expression in vitro and in vivo. *Sci Rep.* 査読有. 7(1):16978. 2017. doi:10.1038/s41598-017-17285-2.

- (3) Suda T, Shimakami T, Shirasaki T, Yamashita T, Mizukoshi E, Honda M, Kaneko S. Reactivation of hepatitis B virus from an isolated anti-HBc positive patient after eradication of hepatitis C virus with direct-acting antiviral agents. *J Hepatol.* 査読有. 67(5):1108-1111. 2017. doi:10.1016/j.jhep.2017.07.014.
- (4) Yamane D, Selitsky SR, Shimakami T, Li Y, Zhou M, Honda M, Sethupathy P, Lemon SM. Differential hepatitis C virus RNA target site selection and host factor activities of naturally occurring miR-122 3' variants. *Nucleic Acids Res.* 査読有. 45(8):4743-4755. 2017. doi:10.1093/nar/gkw1332.
- (5) Liu F, Shimakami T, Murai K, Shirasaki T, Funaki M, Honda M, Murakami S, Yi M, Tang H, Kaneko S. Efficient Suppression of Hepatitis C Virus Replication by Combination Treatment with miR-122 Antagonism and Direct-acting Antivirals in Cell Culture Systems. *Sci Rep.* 査読有. 6:30939. 2016. doi:10.1038/srep30939.
- (6) Stross C, Shimakami T, Haselow K, Ahmad MQ, Zeuzem S, Lange CM, Welsch C. Natural HCV variants with increased replicative fitness due to NS3 helicase mutations in the C-terminal helix 18. *Sci Rep.* 査読有. 6:19526. 2016. doi:10.1038/srep19526.

〔学会発表〕(計6件)

- (1) Tetsuro Shimakami, Regulation of Hepatitis C Virus Infection by Long Non-Coding RNA. 第68回 AASLD, 2017
- (2) Tetsuro Shimakami, Unexpected Enhancement of Replication Capacity by Simeprevir for Simeprevir-Resistant Variants in Genotype 1a Hepatitis C Virus. 第24回 International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2017
- (3) Tetsuro Shimakami, Effective Prevention of Direct-acting Antiviral-resistant Hepatitis C Virus

by Combination with Anti-miR-122 Therapy in Cell Culture. 第67回 AASLD, 2016

- (4) Tetsuro Shimakami, In Vitro Selection of Simeprevir-resistance Mutants for Hepatitis C Virus with NS3-Q80K Polymorphism in Genotype 1a, 第23回 International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2016
- (5) Tetsuro Shimakami, Regulation of Hepatitis C Virus Infection by Long Non-Coding RNA. 第22回 International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2015
- (6) Tetsuro Shimakami, Regulation of Hepatitis C Virus Infection by Long Non-Coding RNA. 第66回 AASLD, 2015

〔図書〕(計2件)

- (1) 島上哲朗、金子周一、DAA治療による肝発癌・再発抑制効果、肝胆膵(アークメディア) 76:269-275、2018
- (2) 島上哲朗、金子周一 C型慢性肝疾患の薬物治療 消化器の臨床(ヴァンメディカル) 19(6)412-418. 2016

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)  
取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等  
該当なし

6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
島上 哲朗 (SHIMAKAMI Tetsuro)  
金沢大学・附属病院・特任教授  
研究者番号: 50436820