

200500709A

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

RNAi 耐性ウイルス株の出現に対処する第二世代の RNAi 医薬品の開発

平成 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者：高久 洋

平成 18(2006) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告書	
RNAi 耐性ウイルス株の出現に対処する第二世代の RNAi 医薬品の開発	1
高久 洋	
II. 分担研究報告書	
1. 第二世代 RNAi ベクターによる免疫誘導回避の検討	4
橋本 香保子	
2. 第二世代 RNAi ベクターの作製と HIV-1 発現抑制能についての評価	6
黒崎 直子	
3. 第二世代 RNAi ベクターの薬剤耐性株に対する抗ウイルス活性の評価	8
山本 典生	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	10
IV. 研究成果の刊行物・別刷	13

研究要旨

現在認可を受けている抗 HIV 剤のうちヌクレオシド類似体などの逆転写阻害剤やプロテアーゼ阻害剤は薬剤耐性 HIV-1 変異体の出現とさらに長期服用による副作用の問題を抱えている。これらの化学療法剤に代わる治療法として、RNA interference (RNAi) 法を用いた遺伝子治療が考えられている。

しかし、最近 siRNA で HIV-1 感染細胞を約一ヶ月処理したところ HIV-1 遺伝子に変異と欠損が起こり、RNAi 効果が消失することが報告された。このように短期治療ではどの薬剤より強力な抗エイズ薬となりうると思われるが、現在実際に治療に用いられているような薬剤と同じ RNAi 耐性ウイルス株の問題が生じた。そこで本研究では、RNAi の高い機能を生かしつつ、長期にわたってウイルス産生を抑制出来るような遺伝子医薬品の開発を遂行する。具体的には、おとり核酸(decoy-RNA)またはガイド RNAs (EGSs) (tRNA スプライシング酵素であるリボザイム RNase P/tRNase Z が基質を認識し切断するための RNA 酵素) と siRNA を組合わせた遺伝子医薬品(siRNA/decoy-RNA or EGSs)の新機能解析とこれらを用い HIV-1 発現の長期抑制効果について検討した。また、従来の siRNA はインターフェロンを誘導するが、これらに対処できる新規の siRNA を見いだしたので、それらの作用機構を培養細胞系で明らかにしつつある。

分担研究者：橋本 香保子（千葉工業大学工学部 講師）

黒崎 直子（千葉工業大学工学部 講師）

山本 典生（東京医科歯科大学医学部助手）

価をした。また、ウイルス RNA の shRNA 標的部位の配列を解析し、shRNA 耐性株の出現についてもあわせて検討した。

また、HIV-1 tat RNA および vif RNA を標的とした RNaseP 誘導型 EGS(EGS-tat) と tRNaseZ 誘導型 EGS(EGS-vif)も同様にレンチウイルスベクターへ組込んだベクターを作製した。これらを SupT1 細胞へ導入した後、HIV-1_{NL4-3} を感染させた後、経時的に HIV-1 増殖抑制能について評価をした。

つぎに Jurkat 細胞に CS-TAR, CS-vif, CS-vif-TAR を M.O.I.=20 で導入し、数日培養した後野生株 HIV-1 (HXB2), 薬剤耐性 HIV-1(HXB2/K65R)をそれぞれ感染させ、p24 量を測定した。

さらに、新しくデザインされたプライマー・プローブを使用して real-time nested PCR を行い、その特異性を様々なコントロール実験によって評価した。測定には ABI7700 sequence detector system を用いた。

（倫理面への配慮）

HIV-1 の感染実験は P3 で行い、環境中への拡散が起こらないよう配慮した。

A. 研究目的

本研究は第二世代 RNAi ベクターの薬剤耐性 HIV-1 に対する抗ウイルス効果の評価を行うと共にその発現メカニズムを詳細に解析することを目的とする。現在使われている抗 HIV 剤は逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤が中心であるが、それぞれ薬剤耐性株の出現という問題を抱えている。この問題を解決するひとつの方法は、これらの薬剤とは異なる作用点を持ち薬剤耐性株に対しても有効なアプローチを含めた新規治療法を開発することであり、RNAi を用いた遺伝子治療は有力なアプローチと考えられる。そこで、vif に対する shRNA とデコイ TAR RNA を Dicer が認識できるリンカーにより結合した共発現ベクターと RNaseP/tRNaseZ 誘導型 EGS 発現レンチウイルスベクターを作製し、これらが薬剤耐性株に対して有効かどうかの評価を行うこととした。さらに、第二世代 RNAi ベクターが、ウイルスライフサイクル上のどの点に作用することで抗ウイルス効果を発揮するのか明らかにするため、特異性の高い新規 real-time nested PCR 法を開発した。

B. 研究方法

第二世代 RNAi ベクターは、HIV-1 vif を標的とした shRNA(CS-vif)とデコイ TAR(CS-TAR)を共発現するレンチウイルスベクター(CS-vif-TAR)を作製し、PBMC、H9 細胞、Jurkat 細胞に導入した。この細胞へ HIV-1_{NL4-3} を感染させた後、経時的に HIV-1 増殖抑制能について評

C. 研究結果

shRNA やデコイ TAR を単独で発現するベクターを細胞に導入して HIV-1 を感染させると、約 2～3 週間でウイルスの出現が見られたのに対し、shRNA とデコイ TAR を共発現する CS-vif-TAR は約 9 週間の長期間に渡り HIV-1 転写阻害効果が見られた。また、shRNA やデコイ TAR を単独発現させたのものより、共発現する CS-vif-TAR の方が、ウイルス変異の出現が遅れただけでな

く、その頻度も少なかった。

RNaseP 誘導型 EGS(EGS-tat)と tRNaseZ 誘導型 EGS(EGS-vif)も同様にそれぞれを単独導入した細胞より共発現のベクターを導入した細胞の方が、強い抗ウイルス活性を示し、後者では 90%以上も HIV-1 産生阻害効果を示した。

また、CS-vif-TAR は野生株 HIV-1 と同様、薬剤耐性 HIV-1 についてもウイルスの増殖を最も強く抑制した。抑制の程度は HIV-1 を M.O.I. = 1 で感染させた場合でも 90%という高い抑制活性を維持していた。CS-vif や CS-TAR でも抑制活性はあったが、CS-vif-TAR ほどではなかった (CS-vif では 60%程度の抑制、CS-TAR では 50%程度の抑制)。以上の結果からデコイ TAR と vif shRNA を結合させた small RNA は薬剤耐性株に対しても非常に有効であることが分かった。

さらに、第二世代 RNAi ベクターが、ウイルスライフサイクル上のどの点に作用することで抗ウイルス効果を発揮するのか明らかにするため、特異性の高い新規 real-time nested PCR 法を開発した。HIV-1 は逆転写の後にウイルス DNA を宿主細胞のゲノム中にインテグレーションさせるが、インテグレーションされた DNA を正確に定量することは従来の nested PCR 法では難しかった。それはインテグレーションされていないウイルス DNA が nested PCR の過程で増幅されてしまうからであるが、プライマー配列にタグをつける等の工夫を加えることで、非特異的増幅を大幅に減少させることに成功した。次はこの方法を用いて実際にウイルスライフサイクル中の標的段階を同定したい。

D. 考察

shRNA とデコイ RNA を組み合わせることで、shRNA によるウイルス変異株が出現してもデコイ RNA の抑制効果により、長期的にウイルス産生抑制効果を持続させることが可能であることが明らかとなった。

RNaseP 誘導型と tRNaseZ 誘導型 EGS も同様にそれぞれを単独ではなく、連続して発現するように設計することによりさらに高い抗 HIV-1 効果が得られることが示唆された。

また、CS-vif-TAR は薬剤耐性 HIV-1 の増殖を強く抑制することが明らかとなった。このことは、従来の HAART と本研究で用いている第二世代 RNAi ベクターを組み合わせることで、より効果の高い治療法が開発可能であることを意味している。このような新しい治療法の開発は極めて重要である。

E. 結論

vif shRNA とデコイ TAR を組み合わせた CS-vif-TAR は長期間野生型 HIV-1 の発現を抑制することや耐性ウイルスの発現遅延や発現頻度を減少することが明らかとなった。同時に CS-vif-TAR は薬剤耐性 HIV-1 の増殖を強く抑制することが明らかとなった。また、RNaseP 誘導型と tRNaseZ 誘導型 EGS も同様に高い抗ウイルス活性を持つことが明らかとなった。以上のことから、本研究によって作製された第二世代 RNAi ベクターは野生株の HIV-1 だけでなく、薬剤耐性株にも有効であることが示された。このことは第二世代 RNAi ベクターと従来の HAART を組み合わせることで、より効果の高い新規治療法の開発が可能であることを意味する。

また、最近 shRNA の直接の標的部位以外にも変異が発生していることが明らかとなった。そこで本研究では、作用機序の異なる decoy-RNA や EGS と shRNA のコンビネーションによる変異株に対処する方法を確立した。HIV-1 感染症の世界的な広がりや薬剤耐性株出現という問題を考えると、このような新しい治療法の開発は国際的にも社会的にも極めて大きな意義を持つ。

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nagawa T., Habu Y., Matsumoto N., Miyano-Kurosaki N., Takaku H. Long term transgene expression and inhibition of HIV-1 replication by a Cre/loxP-EBNA-1oriP HIV-1 dependent ribozyme vector: applications for HIV-1 gene therapy. *J.RNAi Gene Silencing*, 2, 145-153 (2006)
- 2) Barnor J.S., Miyano-Kurosaki N., Yamaguchi K., Sakamoto A., Ishikawa K., Yamamoto N., Osei-Kwasi M., Ofori-Adjei D., and Takaku H. The middle to 3' end of the HIV-1 vif gene sequence is important for vif biological activity and could be used for antisense oligonucleotide targets. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids.*, 24, 1745-1761 (2005)
- 3) Barnor J.S., Miyano-Kurosaki N., Yamaguchi K., Abumi Y., Ishikawa K., Yamamoto N., and Takaku H. Lentiviral-mediated delivery of combined HIV-1

- decoy tar and vif siRNA as a single RNA molecule that cleaves to inhibit HIV-1 in transduced cells. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids.*, 24, 431-434 (2005).
- 4) Habu Y., Miyano-Kurosaki N., Kitano M., Endo Y., Yukita M., Ohira S., Takaku H., Nashimoto M., and Takaku H. Inhibition of HIV-1 gene expression by retroviral vector-mediated small-guide RNAs that direct specific RNA cleavage by tRNase ZL. *Nucleic Acids Res.*, 33, 235-243 (2005).
- 5) Miyano-Kurosaki N., and Takaku H. Gene silencing of virus replication by RNA interference. Handbook of Experimental Pharmacology. Ed. Erdmann V.A., Brosius J., and Barciszewski H.J. *Springer, Berlin, Germany*, 173, pp151-171(2005).
- 6) Baba S., Takahashi K., Noguchi S., Takaku H., Koyanagi Y., Yamamoto Y., and Kawai G. Solution RNA structures of the HIV-1 dimerization initiation site in the kissing-loop and extended-duplex dimers. *J.Biochem.*, 138, 583-592(2005).
- 7) Abe T., Henmi H., Miyamoto H., Moriishi K., Tamura S., Takaku H., Akira S., and Matsuura Y. Involvement of the Toll-Like Receptor 9 Signaling Pathway in the Induction of Innate Immunity by Baculovirus. *J.Virol.*, 79, 2847-2858 (2005).
- 2.学会発表
- 海外
- 1) Takaku H., Barnor J.S., Yamaguchi K., Miyano-Kurosaki N. Second Generation Anti- HIV Short Hairpin RNA (Vif shRNAs and Decoy TAR RNAs) to Avoid RNAi-mediated Escape Mutant Phenomenon. The 18th International Conference on Antiviral Research, Barcelona, Spain (2005.4)
- 2) Habu Y., Barnor J.S., Takanami N., Miyano-Kurosaki N., Takaku H. Combinational Effect of Vif shRNA and APOBEC3G Associated Inhibition of HIV-1 Infection. The XIII International Congress of Virology, San Francisco, USA (2005.7)
- 3) Barnor J.S., Miyano-Kurosaki N., Abumi Y., Yamaguchi K., Ishikawa K., Yamamoto N., Takaku H. Novel Second Generation Anti- HIV shRNA Expression vif and Decoy TAR Arrest the Virus-breakthrough Phenomenon associated with signal-escape Variants.. 2005 International Meeting of the Institute of Human Virology, Baltimore, USA (2005.8)
- 国内
- 1) 高久洋： RNA interference (RNAi) による遺伝子治療。第46回日本臨床ウイルス学会 福岡 (2005.6)
- 2) 羽生勇一郎、黒崎直子、高久洋：RNaseP および tRNaseZ 誘導型 EGS 発現レンチウイルスベクターによる HIV-1 複製抑制。第53回日本ウイルス学会学術集会 横浜 (2005.11)
- 3) 権代拓麻、黒崎直子、高久洋：Phage Polymerase により合成された shRNA によるインターフェロン産生能と HIV-1 発現抑制効果の検討。第53回日本ウイルス学会 横浜 (2005.11)
- 4) 羽生勇一郎、Barnor J.S.、黒崎直子、米田和弘、山口和也、石川晃一、山本直木、Ofori-Adiei、高久洋：RNAi 耐性 HIV-1 株に対処する第2世代の RNAi 製剤。第19回日本エイズ学会学術集会・総会 熊本 (2005.12)
- 5) 大成亜季、黒崎直子、高久洋：HIV-1 non-coding 領域 (DIS) を標的とした shRNA による抗 HIV-1 活性の検討。第19回日本エイズ学会学術集会・総会 熊本(2005.12)
- H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)
- (1) 特願 2005-021960、副作用のない RNAi 医薬、2005.1.28.
- (2) 特願 2005-151602、RNAi 耐性ウイルス株を克服する新手法、2005.2.25.
- (3) 特願 2005-333406、核酸増幅方法、2005.11.17.
- (4) 特願 2005-145625、核酸増幅方法、2005.5.18.

研究要旨

これまで Phage Polymerase により合成された siRNA は、インターフェロン(IFN)を誘導し、非特異的な効果で標的遺伝子の発現を抑制することが知られていたが、shRNA の 5'オーバーハングに G 残基を付加することで IFN 産生を回避することを見出した。この手法で合成した HIV-1 の Dimerization Initiation Site (DIS)領域を標的とした shRNA(pppG(n)-shRNADIS)は配列特異的に遺伝子発現を抑制し、細胞変性効果も回避することができた。

A. 研究目的

Phage Polymerase により合成された siRNA は、インターフェロン(IFN)を誘導し、非特異的な効果で標的遺伝子の発現を抑制することが知られている。本研究では、shRNA の 5'オーバーハングに G 残基を付加することで IFN 産生を回避することを発見した。そこで HIV-1 の Dimerization Initiation Site (DIS)領域を標的とした shRNA(pppG(n)-shRNADIS)を合成し、その HIV-1 発現抑制効果について検討した。

B. 研究方法

HIV-DIS を標的とした shRNA(pppG(n)-shRNADIS) とルシフェラーゼ遺伝子を標的とした shRNA(pppG(n)-shRNALUC)(n=0,1,2,3)を T7 RNA ポリメラーゼを用いて合成した。合成した pppG(n)-shRNADIS と pNL4-3 を HeLa CD4 陽性細胞に導入し、細胞変性効果(CPE)ならびに 48 時間後の p24 抗原量を定量した。

C. 研究結果

HIV-DIS を標的とした shRNA(pppG(n)-shRNADIS) とルシフェラーゼ遺伝子を標的とした shRNA(pppG(n)-shRNALUC)(n=0,1,2,3)を HeLa CD4+細胞へ導入した結果、5'オーバーハングに含まれる G 残基数が 0 または 1 つでは IFN- β 産生が確認されたが、2 つおよび 3 つでは産生されなかった。また、G 残基数が 0 では CPE が観察されたが、2 つでは CPE はみられなかった。つぎに pppG(n)-shRNADIS と pNL4-3 を導入した細胞において、培養上清中の p24 抗原量を測定したところ、約 70% の減量がみられた。

D. 考察

5'オーバーハングに含まれる G 残基数を 2 つ以上付加することで IFN- β の産生を回避することができることが示唆された。また、DIS を標的とした shRNA を細胞に導入した場合も IFN は産生されず、p24 抗原の産生は抑

制されたことから、pppG(n)-shRNADIS は非特異的な RNA 発現制御ではなく、配列特異的に標的遺伝子発現を抑制することができることが示唆された。

E. 結論

Phage Polymerase により合成された shRNA は、IFN の産生を回避し、標的配列特異的にその発現を制御することを確認した。

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yamashita M., Shinnakasu R., Asou H., Kimura M., Hasegawa A., Hashimoto K., Hatano N., Ogata M. and Nakayama T.: Ras-ERK MAPK cascade regulate GATA3 stability and Th2 differentiation ubiquitin-preteasome pathway.: *J. Biol. Chem.* **280**, 29409-29419 (2005).

2) Miyamoto T., Kaneko T., Yamashita M., Tenda Y., Inami M., Suzuki A., Ishii S., Kimura M., Hashimoto K., Shimada H., Yahata H., Ochiai T., Saito I., DeGregori J. and Nakayama T.: Prolonged skin allograft survival by IL-10 gene-introduced CD4 T cell administration.: *Int. Immunol.* **17**, 759-768 (2005)

2. 学会発表

1) 西部好美、浜野隆一、橋本香保子、黒崎直子、高久洋：バキュロウイルスによる肝繊維化の改善。第 35 回日本免疫学会，横浜（2005.12）

2) 宮武克年、酒井亮、岩田拓哉、中山俊憲、高久洋、黒崎直子、板倉光夫、橋本香保子：関節リウマチにおける炎症性サイトカインの産生と分泌小胞移送分子発現の調節。第 35 回日本免疫学会，横浜（2005.12）

3) 酒井亮、宮武克年、岩田拓哉、高久洋、黒崎直子、
中山俊憲、板倉光夫、橋本香保子：TH1 細胞が示す
サイトカインの産生と細胞内分泌小胞核移送分子の発
現との相関：第 35 回日本免疫学会，横浜（2005.12）
学会，横浜（2005.11）

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

なし

研究要旨

第二世代 RNAi ベクターシステムとして vif に対する shRNA とデコイ TAR RNA を Dicer が認識できるリンカーにより結合した共発現ベクターを作製し、長期的 HIV-1 増殖抑制効果とそれに伴う変異ウイルス株の出現について検討した。shRNA とデコイを組み合わせることで、shRNA によるウイルス変異株が出現してもデコイ RNA の阻害効果により長期的にウイルス産生抑制効果を持続させることが可能であることを見出した。

A. 研究目的

RNAi は強力な遺伝子干渉ツールとして利用されているが、RNA ウイルスを標的とした場合、ウイルス配列に高頻度に変異が起こる問題を抱えている。本研究は第二世代 RNAi ベクターシステムとして vif に対する shRNA とデコイ TAR RNA を Dicer が認識できるリンカーにより結合した共発現ベクターを作製し、長期的 HIV-1 増殖抑制効果とそれに伴う変異ウイルス株の出現について検討を行った。

B. 研究方法

第二世代 RNAi ベクターは、HIV-1 vif を標的とした shRNA(CS-vif)とデコイ TAR(CS-TAR)を共発現するレンチウイルスベクター(CS-vif-TAR)を作製し、PBMC、H9 細胞、Jurkat 細胞に導入した。この細胞へ HIV-1_{NL4-3} を感染させた後、経時的に HIV-1 増殖抑制能について評価をした。また、ウイルス RNA の shRNA 標的部位の配列を解析し、shRNA 耐性株の出現についてもあわせて検討した。

さらに、HIV-1 tat RNA および vif RNA を標的とした RNaseP 誘導型 EGS(EGS-tat)と tRNaseZ 誘導型 EGS(EGS-vif)も同様にレンチウイルスベクターへ組込んだベクターを作製した。これらを SupT1 細胞へ導入した後、HIV-1_{NL4-3} を感染させた後、経時的に HIV-1 増殖抑制能について評価をした。

C. 研究結果

shRNA やデコイ TAR を単独で発現するベクターを細胞に導入して HIV-1 を感染させると、約 2～3 週間でウイルスの出現が見られたのに対し、shRNA とデコイ TAR を共発現する CS-vif-TAR は約 9 週間の長期間に渡り HIV-1 転写阻害効果が見られた。また、shRNA やデコイ TAR を単独発現させたものより、共発現する CS-vif-TAR の方が、ウイルス変異の出現が遅れただけでなく、その頻度も少なかった。

RNaseP 誘導型 EGS(EGS-tat)と tRNaseZ 誘導型 EGS(EGS-vif)も同様にそれぞれを単独導入した細胞より共発現のベクターを導入した細胞の方が、強い抗ウイルス活性を示し、後者では 90%以上も HIV-1 産生阻害効果を示した。

D. 考察

shRNA とデコイ RNA を組み合わせることで、shRNA によるウイルス変異株が出現してもデコイ RNA の抑制効果により、長期的にウイルス産生抑制効果を持続させることが可能であることが明らかとなった。

RNaseP 誘導型と tRNaseZ 誘導型 EGS も同様にそれぞれを単独ではなく、連続して発現するように設計することでさらに高い抗 HIV-1 効果が得られることが示唆された。

E. 結論

vif shRNA とデコイ TAR を組み合わせた CS-vif-TAR は長期間野生型 HIV-1 の発現を抑制することや耐性ウイルスの発現遅延や発現頻度を減少することを確認した。また、RNaseP 誘導型と tRNaseZ 誘導型 EGS も同様に高い抗ウイルス活性を持つことが明らかとなった。以上のことから、本研究によって作製された第二世代 RNAi ベクターと従来の HAART を組み合わせることで、より効果の高い新規治療法の開発が可能であることが期待される。

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Barnor J.S., Miyano-Kurosaki N., Yamaguchi K., Sakamoto A., Ishikawa K., Yamamoto N., Osei-Kwasi M., Ofori-Adjei D., and Takaku H. The

middle to 3' end of the HIV-1 vif gene sequence is important for vif biological activity and could be used for antisense oligonucleotide targets. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids.*, 24, 1745-1761 (2005).

2) Barnor J.S., Miyano-Kurosaki N., Yamaguchi K., Abumi Y., Ishikawa K., Yamamoto N., and Takaku H. Lentiviral-mediated delivery of combined HIV-1 decoy tar and vif siRNA as a single RNA molecule that cleaves to inhibit HIV-1 in transduced cells. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids.*, 24, 431-434 (2005).

3) Habu Y., Miyano-Kurosaki N., Kitano M., Endo Y., Yukita M., Ohira S., Takaku H., Nashimoto M., and Takaku H. Inhibition of HIV-1 gene expression by retroviral vector-mediated small-guide RNAs that direct specific RNA cleavage by tRNase ZL. *Nucleic Acids Res.*, 33, 235-243 (2005).

4) Miyano-Kurosaki N., and Takaku H. Gene silencing of virus replication by RNA interference. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Ed. Erdmann V.A., Brosius J., and Barciszewski H.J. Springer, Berlin, Germany, 173, pp151-171(2005). A novel role for Vpr of human immunodeficiency virus type 1 as a regulator of the splicing of cellular pre-mRNA. *Microbes Infect.* 7,1150-1160 (2005).

2. 学会発表

海外

1) Takaku H., Barnor J.S., Yamaguchi K., Miyano-Kurosaki N. Second Generation Anti- HIV Short Hairpin RNA (Vif shRNAs and Decoy TAR RNAs) to Avoid RNAi-mediated Escape Mutant Phenomenon. The 18th International Conference on Antiviral Research, Barcelona, Spain (2005.4)

2) Habu Y., Barnor J.S., Takanami N., Miyano-Kurosaki N., Takaku H. Combinational Effect of Vif shRNA and APOBEC3G Associated Inhibition of HIV-1 Infection. The XIII International Congress of Virology, San Francisco, USA (2005.7)

3) Hamazaki H., Ujino S., Abe T., Miyano-Kurosaki N., Shimotohno K., Takaku H. RNAi Expression Mediated Inhibition of HCV Replication. The XIII International Congress of Virology, San Francisco, USA (2005.7)

4) Barnor J.S., Miyano-Kurosaki N., Abumi Y., Yamaguchi K., Ishikawa K., Yamamoto N., Takaku H. Novel Second Generation Anti- HIV shRNA Expression vif and Decoy TAR Arrest the Virus-breakthrough Phenomenon associated with signal-escape Variants.. 2005 International Meeting of the Institute of Human Virology, Baltimore, USA (2005.8)

国内

1) 羽生勇一郎、黒崎直子、高久洋：RNaseP および tRNaseZ 誘導型 EGS 発現レンチウイルスベクターによる HIV-1 複製抑制。第 53 回日本ウイルス学会学術集会 横浜 (2005.11)

2) 鈴木等、金子央賢、黒崎直子、下遠野邦忠、高久洋：shRNA 発現ベクターによる HCV RNA の転写阻害の検討。第 53 回日本ウイルス学会学術集会 横浜 (2005.11)

3) 権代拓麻、黒崎直子、高久洋：Phage Polymerase により合成された shRNA によるインターフェロン産生能と HIV-1 発現抑制効果の検討。第 53 回日本ウイルス学会 横浜 (2005.11)

4) 羽生勇一郎、Barnor J.S.、黒崎直子、米田和弘、山口和也、石川晃一、山本直木、Ofori-Adiei、高久洋：RNAi 耐性 HIV-1 株に対処する第 2 世代の RNAi 製剤。第 19 回日本エイズ学会学術集会・総会 熊本 (2005.12)

5) 大成亜季、黒崎直子、高久洋：HIV-1 non-coding 領域 (DIS) を標的とした shRNA による抗 HIV-1 活性の検討。第 19 回日本エイズ学会学術集会・総会 熊本 (2005.12)

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1) 特願 2005-021960、副作用のない RNAi 医薬、2005.1.28.

2) 特願 2005-151602、RNAi 耐性ウイルス株を克服する新手法、2005.2.25.

研究要旨

薬剤耐性株に対して第二世代 RNAi ベクターが有効かどうかの評価を行うことを目的とした。第二世代 RNAi ベクターが、ウイルスライフサイクル上のどの点に作用することで抗ウイルス効果を発揮するのかを明らかにするために特異性の高い新規 real-time nested PCR 法を開発した。その結果、TAR-decoy と vif shRNA を結合させた small RNA は薬剤耐性株に対しても非常に有効であることが分かった。また、第二世代 RNAi ベクターが、ウイルスのライフサイクル上のどの点に作用するのか明らかにするために、プライマー配列にタグをつける等の工夫を加えて、非特異的増幅を大幅に減少させた特異性の高い新規 real-time nested PCR 法を開発した。

A.研究目的

本研究は第二世代 RNAi ベクターの薬剤耐性 HIV-1 に対する抗ウイルス効果の評価を行うと共にその抗ウイルス効果発現メカニズムを詳細に解析することを目的とする。現在使われている抗 HIV 剤は逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤が中心であるが、それぞれ薬剤耐性株の出現という問題を抱えている。この問題を解決するひとつの方法は、これらの薬剤とは異なる作用点を持ち薬剤耐性株に対しても有効なアプローチを含めた新規治療法を開発することであるが、RNAi を用いた遺伝子治療は有力なアプローチと考えられる。そこで、薬剤耐性株に対して第二世代 RNAi ベクターが有効かどうかの評価を行うこととした。さらに、第二世代 RNAi ベクターが、ウイルスライフサイクル上のどの点に作用することで抗ウイルス効果を発揮するのか明らかにするために、特異性の高い新規 real-time nested PCR 法を開発した。

B.研究方法

Jurkat 細胞に CS-TAR, CS-vif, CS-vif-TAR を M.O.I.=20 で導入し、数日培養した後に wild-type HIV-1 (HXB2), 薬剤耐性 HIV-1(HXB2/K65R)をそれぞれ感染させ、p24 を測定した。

また、新しくデザインされたプライマー・プローブをして real-time nested PCR を行い、その特異性を様々なコントロール実験によって評価した。測定には ABI7700 sequence detector system を用いた。

(倫理面への配慮)

HIV-1 の感染実験は P3 で行い、環境中への拡散が起らないよう配慮した。

C.研究結果

CS-vif-TAR は Wild-type HIV-1 と同様、薬剤耐性

HIV-1 についてもウイルスの増殖を最も強く抑制した。抑制の程度は M.O.I. = 1 で感染させた場合でも 90% という高い抑制活性を維持していた。CS-vif や CS-TAR でも抑制活性はあるが、CS-vif-TAR ほどではなかった（CS-vif では 60%程度の抑制、CS-TAR では 50%程度の抑制）。以上から TAR-decoy と vif shRNA を結合させた small RNA は薬剤耐性株に対しても非常に有効であることが分かった。

また、第二世代 RNAi ベクターが、ウイルスライフサイクル上のどの点に作用することで抗ウイルス効果を発揮するのか明らかにするために、特異性の高い新規 real-time nested PCR 法を開発した。HIV-1 は逆転写の後にウイルス DNA を宿主細胞のゲノム中にインテグレーションさせるが、インテグレーションされた DNA を正確に定量することは従来の nested PCR 法では難しかった。それはインテグレーションされていないウイルス DNA が nested PCR の過程で増幅されてしまうからであるが、プライマー配列にタグをつける等の工夫を加えることで、非特異的増幅を大幅に減少させることに成功した。次はこの方法を用いて実際にウイルスライフサイクル中の標的段階を同定したい。

D.考察

CS-vif-TAR が薬剤耐性 HIV-1 の増殖を強く抑制することが明らかとなった。このことは、従来の HAART と本研究で用いている第二世代 RNAi ベクターを組み合わせることで、より効果の高い治療法が開発可能であることを意味している。このような新しい治療法の開発は極めて重要であると我々は考える。

E.結論

TAR-decoy と vif sh RNA を組み合わせた CS-vif-TAR が薬剤耐性 HIV-1 の増殖を強く抑制することが明

らかとなった。本研究によって第二世代 RNAi ベクターが薬剤耐性株にも有効であることが示された。このことは第二世代 RNAi ベクターと従来の HAART を組み合わせることで、より効果の高い新規治療法が開発可能であることを意味する。HIV-1 感染症の世界的な広がりや薬剤耐性株出現という問題を考えると、このような新しい治療法の開発は国際的にも社会的にも極めて大きな意義を持つものと研究分担者は考える。

F.健康危険情報

特に無し

G.研究発表

1.論文発表

1) Norio Yamamoto, Chika Tanaka, YuFeng Wu, Myint Oo Chang, Yoshio Inagaki, Yasunori Saito, Toshio Naito, Hitoshi Ogasawara, Iwao Sekigawa, and Yasuo Hayashida, Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Integration by Using a Specific, Sensitive and Quantitative Assay Based on Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Virus Genes*. 32, 105-113 (2005)

2) Myint Oo Chang, Norio Yamamoto, Sankichi Horiuchi, Yu Feng Wu, Masahiro Fujimoto, and Naoki Yamamoto, Production and Characterization of a Monoclonal Antibody Specific to Nef-Associated Factor 1, Naf1 / A20-Binding Inhibitor of NF- κ B Activation, ABIN-1. *Hybridoma*. 24, 248-257 (2005)

3) Kuramitsu M, Hashizume C, Yamamoto N, Azuma A, Kamata M, Yamamoto N, Tanaka Y, Aida Y. A novel role for Vpr of human immunodeficiency virus type 1 as a regulator of the splicing of cellular pre-mRNA. *Microbes Infect.* 7, 1150-1160 (2005)

2.学会発表

山本典生、山本直樹、特異性を高めた改良型 Real-time nested PCR 法による HIV-1 provirus の定量. 第 19 回日本エイズ学会学術集会・総会, 熊本 s(2005.12)

H.知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

- 1) 特願 2005-333406、核酸増幅方法、2005.11.17.
- 2) 特願 2005-145625、核酸増幅方法、2005.5.18.

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
Takaku, H	Gene silencing of virus replication by RNA interference	Miyano-Kurosaki N., Takaku H.	Handbook of Experimental Pharmacology	<i>Springer</i>	<i>Berlin, Germany,</i>	2005	pp151-171
Miyano-Kurosaki, N	Gene silencing of virus replication by RNA interference	Miyano-Kurosaki N., Takaku H.	Handbook of Experimental Pharmacology	<i>Springer</i>	<i>Berlin, Germany,</i>	2005	pp151-171

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
Nagawa T., Habu Y., Matsumoto N., Miyano-Kurosaki N., Takaku H.	Long term transgene expression and inhibition of HIV-1 replication by a Cre/loxP-EBNA-1oriP HIV-1 dependent ribozyme vector: applications for HIV-1 gene therapy.	<i>J. RNAi Gene Silencing</i>	2	145-153	2006
Barnor J. S., Miyano-Kurosaki N., Yamaguchi K., Abumi Y., Ishikawa K., Yamamoto N., Takaku H.	The middle to 3' end of the HIV-1 vif gene sequence is important for vif biological activity and could be used for antisense oligonucleotide targets.	<i>Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids</i>	24	1745-1761	2005
Barnor J. S., Miyano-Kurosaki N., Yamaguchi K., Abumi Y., Ishikawa K., Yamamoto N., Takaku H.	Lentiviral-mediated delivery of combined HIV-1 decoy tar and vif siRNA as a single RNA molecule that cleaves to inhibit HIV-1 in transduced cells	<i>Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids</i>	24	431-434	2005
Habu Y., Miyano-Kurosaki N., Kitano M., Endo Y., Yukita M., Ohira S., Takaku H., Nashimoto M., Takaku H.	Inhibition of HIV-1 gene expression by retroviral vector-mediated small-guide RNAs that direct specific RNA cleavage by tRNase ZL	<i>Nucleic Acids Res</i>	33	235-243	2005
Baba S., Takahashi K., Noguchi S., Takaku H., Koyanagi Y., Yamamoto Y., Kawai G.	Solution RNA structures of the HIV-1 dimerization initiation site in the kissing-loop and extended-duplex dimers.	<i>J. Biochem</i>	138	583-592	2005
Yamashita M., Shinnakasu R., Asou H., Kimura M., Hasegawa A., Hashimoto K., Hatano N., Ogata M., Nakayama T	Ras-ERK MAPK cascade regulate GATA3 stability and Th2 differentiation ubiquitination-proteasome pathway.	<i>J. Biol. Chem.</i>	289	29409-29419	2005
Miyamoto T., Kaneko T., Yamashita M., Tenda Y., Inami M., Suzuki A., Ishii S., Kimura M., Hashimoto K., Shimada H., Yahata H., Ochiai T., Saito I., DeGregori J. and Nakayama T.	Prolonged skin allograft survival by IL-10 gene-introduced CD4 T cell administration.	<i>Int. Immunol.</i>	17	759-768	2005

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
Barnor J. S., Miyano-Kurosaki N., Yamaguchi K., Abumi Y., Ishikawa K., Yamamoto N., Takaku H.	The middle to 3' end of the HIV-1 vif gene sequence is important for vif biological activity and could be used for antisense oligonucleotide targets.	<i>Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids</i>	24	1745-1761	2005
Barnor J. S., Miyano-Kurosaki N., Yamaguchi K., Abumi Y., Ishikawa K., Yamamoto N., Takaku H.	Lentiviral-mediated delivery of combined HIV-1 decoy tar and vif siRNA as a single RNA molecule that cleaves to inhibit HIV-1 in transduced cells	<i>Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids</i>	24	431-434	2005
Habu Y., Miyano-Kurosaki N., Kitano M., Endo Y., Yukita M., Ohira S., Takaku H., Nashimoto M., Takaku H.	Inhibition of HIV-1 gene expression by retroviral vector-mediated small-guide RNAs that direct specific RNA cleavage by tRNase ZL	<i>Nucleic Acids Res</i>	33	235-243	2005
Yamamoto N., Tanaka C., Wu Y.-F., Chang M.-O., Inagaki Y., Saito Y., Naito T., Ogasawara H., Sekigawa I., Hayashida Y.	Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Integration by Using a Specific, Sensitive and Quantitative Assay Based on Real-Time Polymerase Chain Reaction.	<i>Virus Genes.</i>	32	105-113	2006
Chang M.-O., Yamamoto N., Horiuchi S., Wu Y.-F., Fujimoto M., Yamamoto N.	Production and Characterization of a Monoclonal Antibody Specific to Nef-Associated Factor 1, Naf1 / A20-Binding Inhibitor of NF- B Activation, ABIN-1,	<i>Hybridoma.</i>	24	248-257	2005
Kuramitsu M, Hashizume C, Yamamoto N, Azuma A, Kamata M, Yamamoto N, Tanaka Y, Aida Y.	A novel role for Vpr of human immunodeficiency virus type 1 as a regulator of the splicing of cellular pre-mRNA.	<i>Microbes Infect.</i>	7	1150-1160	2005

研究成果の刊行物・別刷

Gene Silencing of Virus Replication by RNA Interference

N. Miyano-Kurosaki · H. Takaku (✉)

Department of Life and Environmental Sciences and High Technology Research Center,
Chiba Institute of Technology, 2-17-1 Narashino, Tsudanuma, 275-0016 Chiba, Japan
hiroshi.takaku@it-chiba.ac.jp

1	General Mechanism of RNAi	151
2	Synthetic siRNAs	155
3	DNA Vector-Mediated siRNAs or Short Hairpin RNAs	156
4	Inhibition of HIV-1 Replication by RNAi	158
5	siRNA Agents Work as Ligands for Toll-Like Receptors	161
6	Virus Escape from RNAi	162
7	Using RNAi to Treat Other Viruses	163
8	Concluding Remarks	165
	References	166

Abstract Small interfering RNAs (siRNAs) are as effective as long double-stranded RNAs (dsRNAs) at targeting and silencing genes by RNA interference (RNAi). siRNAs are widely used for assessing gene function in cultured mammalian cells or early developing vertebrate embryos. They are also promising reagents for developing gene-specific therapeutics. The specific inhibition of viral replication is particularly well suited to RNAi, as several stages of the viral life cycle and many viral and cellular genes can be targeted. The future success of this approach will depend on the recent advances in siRNA-based clinical trials.

Keywords RNA interference · Gene silencing · Virus · Toll-like receptors · Virus escape

1 General Mechanism of RNAi

Eukaryotes have evolved a cellular defense system that responds to double-stranded (ds)RNAs and protects their genomes against these invading foreign elements. dsRNA delivery into cells has been used to elucidate the role of cellular genes that are homologous in sequence to the introduced dsRNAs by means of sequence-specific gene silencing (Fire et al. 1998). RNA interference (RNAi)-based reverse genetic analysis now provides a rapid link between se-

quence data and biological function. RNAi is particularly useful for the analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* (for reviews, see Hope 2001; Kim 2001). Effective gene silencing typically requires long dsRNAs (Parrish et al. 2000; Elbashir et al. 2001c). However, its application in vertebrates, including mammals, has proved to be difficult because of the presence of additional dsRNA-triggered pathways that mediate the non-specific suppression of gene expression (Caplen et al. 2000; Nakano et al. 2000; Oates et al. 2000; Zhao et al. 2001). These non-specific responses to long dsRNAs are not, however, triggered by small interfering RNAs (siRNAs) (Bitko and Barik 2001; Caplen et al. 2001; Elbashir et al. 2001a; Zhou et al. 2002). siRNAs can target genes as effectively as long dsRNAs (Elbashir et al. 2001c) and are widely used for assessing gene function in cultured mammalian cells or early developing vertebrate embryos (Harborth et al. 2001; Elbashir et al. 2002; Zhou et al. 2002). siRNAs are also promising reagents for developing gene-specific therapeutics (Tuschl and Borkhardt 2002). However, another major problem for using RNAi as a tool to inhibit viral replication is predicting the effectiveness of a specific siRNA. The difficulty lies in making siRNAs trigger silencing in a gene-specific manner without causing non-target-related biological effects or the emergence of escape variants by foreign siRNAs. Work over the past 2 years has allowed investigators to meet this challenge, and the siRNA approach has now been adopted as a standard methodology for sequence-specific silencing in mammalian cells. This review focuses on RNAi as it relates to mammalian systems and the application of siRNAs for targeting genes that are expressed in virus-infected cell lines.

Studies in plants and *Drosophila* have provided fundamental insights into the mechanism of RNAi, following the demonstration that RNAi was activated by dsRNAs and the suggestion that it might involve a derivative of dsRNAs (Fire et al. 1998; Fig. 1).

Biochemical characterization has shown that siRNAs are 21- to 23-nt dsRNA duplexes with symmetric 2- to 3-nt 3' overhangs, and 5'-phosphate and 3'-hydroxyl groups (Elbashir et al. 2001b; Fig. 1). This structure is characteristic of an RNase III-like enzymatic cleavage pattern, which led to the identification of the highly conserved Dicer family of RNase III enzymes as the mediators of dsRNA cleavage (Bernstein et al. 2001; Billy et al. 2001; Ketting et al. 2001).

Extensive biochemical and genetic evidence has allowed a better understanding of how long dsRNAs trigger degradation of the target messenger RNAs (mRNAs) (Fig. 1; for recent reviews, see Sharp 2001; Hannon 2002; McManus and Sharp 2002; Zamore 2002). Several studies have shown that this process is restricted to the cytoplasm (Hutvagner and Zamore 2002; Zeng and Cullen 2002; Kawasaki and Taira 2003). In the first step, Dicer cleaves long dsRNAs to produce siRNAs, which are incorporated into a multiprotein RNA-inducing silencing complex (RISC). There is a strict requirement for the siRNAs to be 5' phosphorylated in order to enter into the RISC (Nykanen et al. 2001; Schwarz et al. 2002). siRNAs that lack a 5' phosphate are rapidly phosphorylated by

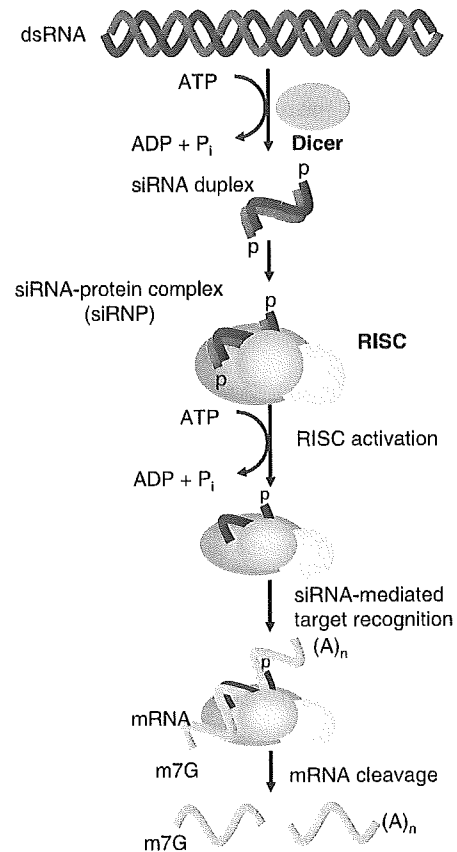


Fig. 1 Model for RNA-mediated interference and silencing. The cellular RNase III enzyme Dicer processes double-stranded RNA (*dsRNA*) to 21- to 23-nt short-interfering RNA (*siRNA*) duplexes in an ATP-dependent manner. The siRNAs are incorporated into a siRNA-ribonucleoprotein complex (*siRNP*), which uses ATP to rearrange itself into the RNA-induced silencing complex (*RISC*) by unwinding the siRNA duplex. Once unwound, the single-stranded antisense siRNA guides the *RISC* to mRNA with a complementary sequence, causing endonucleolytic cleavage of the target mRNA. The mRNA-cleavage products are then released and the *RISC* can be reactivated for another round of catalytic target RNA cleavage

an endogenous kinase (Schwarz et al. 2002). The duplex siRNA is unwound, leaving the antisense strand to guide the *RISC* to its homologous target mRNA for endonucleolytic cleavage. The target mRNA is cleaved at a single site in the center of the duplex region between the guide siRNA and the target mRNA, 10 nt from the 5' end of the siRNA (Elbashir et al. 2001a,b).

Interestingly, endogenously expressed siRNAs have not been found in mammals. However, related microRNAs (miRNAs) have been cloned from various organisms and cell types (Pasquinelli 2002; Fig. 2). These short (22 nt) RNA

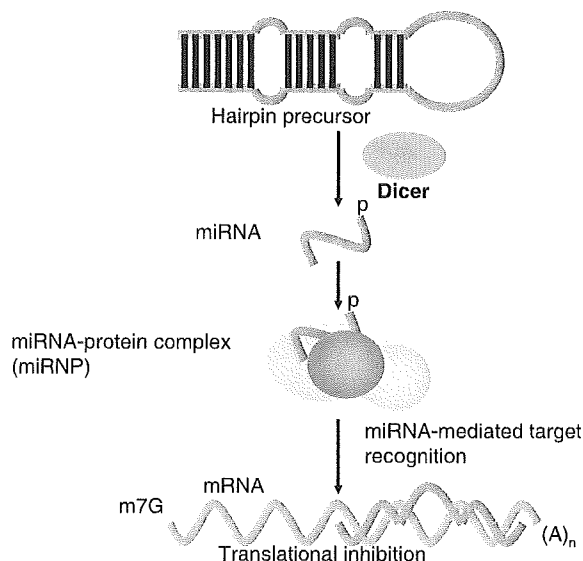


Fig. 2 MicroRNAs might use the same RNA-processing complex to direct silencing. Processing of the microRNA (*miRNA*) precursor hairpin (~70 nt) or long double-stranded RNA (dsRNA) would lead to single-stranded 21- to 23-nt RNA that is associated with the miRNA-protein complex (*miRNP*). This complex might direct either mRNA translation repression or mRNA target cleavage, depending on the degree of complementarity between the 21- to 23-nt RNA and the mRNA

species are produced by Dicer cleavage of longer (70 nt) endogenous precursors with imperfect hairpin RNA structures (Fig. 2). The miRNAs are believed to bind to sites that have partial sequence complementarity in the 3' untranslated region (UTR) of their target mRNAs, causing the repression of translation and the inhibition of protein synthesis (Pasquinelli and Ruvken 2002). More recently, Zeng et al. (2003) demonstrated that an endogenously encoded human miRNA was able to cleave an mRNA bearing fully complementary target sites, whereas an exogenously supplied siRNA could inhibit the expression of an mRNA bearing partially complementary sequences without inducing detectable RNA cleavage. These data suggest that miRNAs and siRNAs can use similar mechanisms to repress mRNA expression, and that the choice of mechanism might be largely, or entirely, determined by the degree of complementarity of the RNA target. In addition to Dicer, other PAZ/PIWI domain proteins (PPD), including eukaryotic translation-initiation factor 2C2 (eIF2C2), are likely to function in both pathways (Grishok et al. 2001; Hutvagner and Zamore 2002; Mourelatos et al. 2002).

Although the apparent lack of RNAi in mammalian cell culture was unexpected, yet RNAi has been found in mouse oocytes and early embryos (Svoboda et al. 2000; Wianny and Zernicka-Goetz 2000). Similarly, RNAi-related

transgenic-mediated co-suppression has been observed in cultured Rat-1 fibroblasts (Bahramian and Zarbl 1999). Notably, dsRNAs in the cytoplasm of mammalian cells have been reported to trigger profound physiological reactions that lead to the induction of interferon (IFN) synthesis (Lengyel 1987; Stark et al. 1998; Barber 2001). In the IFN response, dsRNAs that are longer than 30 bp bind and activate the protein kinase PKR and 2',5'-oligoadenylate synthetase (2',5'-AS) (Minks et al. 1979; Manche et al. 1992). Activated PKR suppresses translation by phosphorylating the translation-initiation factor eIF2 α , while activated 2',5'-AS causes mRNA degradation by stimulating RNase L. These responses are intrinsically sequence-non-specific with respect to the inducing dsRNAs.

2

Synthetic siRNAs

RNAi mediated by siRNAs is a powerful tool for dissecting gene function and drug-target validation. siRNAs can be synthesized in large quantities and thus can be used to analyze large numbers of sequences emerging from genome projects in a cost-effective manner. However, the phenomenon might reflect an incorrect sequence of RNAi, poor penetration of the mammalian cells by the nucleotides, or insufficient knowledge of the protein in question. siRNAs for gene-targeting experiments have only been introduced into cells via classic gene-transfer methods, such as liposome-mediated transfection, electroporation, and microinjection, all of which require the chemical or enzymatic synthesis of siRNAs (Donze and Picard 2002). Synthetic siRNA duplexes can be incubated with lipid formulations to generate liposomes containing siRNAs. In such formulations, cationic lipids bind to oligoribonucleotides through anion-cation and hydrophobic interactions. The efficiency of siRNA uptake is dependent upon the cell type. As high concentrations of cationic liposomes can be toxic, their application must be optimized for each type of target cell (Felgner et al. 1994). In particular, the transfection efficiency into suspension cells, such as T-cell lines and primary cells, using cationic liposomes is often less than 10%. Most of the cationic lipid reagents that are currently used for siRNAs are formulated as liposomes (lipofectamine) containing two lipid species: the polycationic lipid 2,3-dioleoyloxy-*N*-[2(spermine-carboxamido)ethyl] *N,N*-dimethyl-1-propanaminium trifluoroacetate (DOSPA) and the neutral lipid dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) (3:1 w/w). The efficient delivery of siRNAs by the lipofectamine reagent has been reported for siRNA-mediated RNAi in cultured mammalian cells (Caplen et al. 2001; Elbashir et al. 2001a; Garrus et al. 2001; Paul et al. 2002) and siRNA-mediated anti-acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) therapeutics (Gitlin et al. 2002; Jacque et al. 2002; Novina et al. 2002; Park et al. 2002, 2003). The further development of liposomes might enhance their ability to deliver siRNAs to a broader range of target cells.