

200727002A

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医薬品の開発に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 高久 洋

平成20(2008)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 医薬品の開発に関する研究	1
高久 洋	
II. 分担研究報告	
1. HIV-1 感染マウスを用いた第二世代 RNAi 医薬品の評価に関する研究	5
岡田 誠治	
2. 新たな第二世代 RNAi ベクターシステムの作製と HIV-1 発現抑性能についての評価に関する研究	8
黒崎 直子	
3. 第二世代 RNAi ベクターによる免疫誘導回避の検討に関する研究	10
橋本 香保子	
4. 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とそのメカニズムの解析に関する研究	12
山本 典生	
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	18

## 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

主任研究者：高久 洋（千葉工業大学工学部 教授）

## 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 変異体の出現ととも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 vif-shRNA-decoy TAR RNA の組合せでこの問題を解決した。高度免疫不全マウス (NOD/Scid/Jak3 欠損マウス) にレンチウイルスが誘導する decoy-TAR RNA と shRNA-Vif をレンチウイルスで遺伝子導入した細胞のマウス体内における増殖・維持は困難であった。長期培養したヒト T 細胞がマウス体内で増殖することは確認したので、今後、遺伝子導入法の工夫により *in vivo* における薬剤効果の評価系の樹立は可能であると考えられる。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た。

分担研究者：岡田 誠治	(熊本大学・エイズ学研究センター・予防開発分野・教授)
黒崎 直子	(千葉工業大学・工学部・生命環境科学科・准教授)
橋本 香保子	(千葉工業大学・工学部・生命環境科学科・講師)
山本 典生	(東京医科歯科大学大学院歯学総合研究科・助教)

## A. 研究目的

エイズは多剤併用療法 (HAART 療法) により慢性疾患化へと変化しつつある反面、多剤耐性株の出現を増大と難治治療例を増加させることが長期療養の潜在的問題点の一端である。この解決のため、RNAi システムの利用を考えた。しかし、RNAi 耐性ウイルス株の出現、shRNA による IFN 誘導といった問題点が明らかとなってきた。本研究では第二世代 RNAi の RNAi 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メカニズムを詳細に解析することを目的とする。また、ここで構築した機能性 RNA 発現ベクターの抗 HIV-1 活性を評価するために使用したウイルスは、野生株のみならず、これまでに分離された薬剤耐性ウイルスを用いて抗ウイルス活性を検討し、単に RNAi 耐性ウイルス株に対してではなく、今まで問題となっている薬剤耐性ウイルス株に対してもその長期にわたって HIV-1 ウイルス増殖抑制可能な遺伝子医薬品 (shRNA) の開発を目指す。そのために、HIV-1 感染モデルマウスを用いて *in vivo* における薬剤効果の評価系を樹立する。そして、*in vitro* である程度の効果が確認されている decoy-TAR RNA と shRNA-Vif の *in vivo* における効果を確認する。

## B. 研究方法

shRNA は HIV-1 の PBS (primer binding site) 下流にある DIS 領域において 21 塩基を標的としたものを 5 種類 T7 RNA ポリメラーゼを用いて合成した。shRNA は HeLa CD4<sup>+</sup>細胞に導入した際の IFN 産生と CPE をそれぞれ検討した。つぎに shRNA (100pmol) を HIV-1 発現プラスミド (pNL-luc または pNL4-3) と共に HeLa CD4<sup>+</sup>細胞へ導入し、48 時間培養後の細胞内のルシフェラーゼ活性または上清中の p24 蛋白質量を測定した。また、ウエスタンブロット法にて各種ウイルスタンパク質 (Pr55gag, vif, tat, nef) の発現も確認した。つぎに、これらの shRNA 配列を組込んだレンチウイ

ルスベクターを作製し、Sup T1 細胞に感染させた。そこに野生株ウイルスを感染させ、感染阻害効果ならびに耐性ウイルス株の出現について検討した。千葉工業大学の羽生・高久らによって開発されたヒト T 細胞の長期培養系にレンチウイルスを用いて decoy-TAR RNA と shRNA-Vif を遺伝子導入する。遺伝子導入された T 細胞を放射線照射した高度免疫不全マウス (NOD/Scid/Jak3 欠損マウス) に移植、更に HIV-1 JRFL 株を攻撃接種する。2 週間後にマウス体内のヒト CD4 陽性 T 細胞数、細胞内 p24、マウス血清中 p24 などを測定して、decoy-TAR RNA と shRNA-Vif の *in vivo* における効果を判定する。また、ヒト臍帯血由来造血幹細胞にレンチウイルスを用いて decoy-TAR RNA と shRNA-Vif を遺伝子導入し、更に NOD/Scid/Jak3 欠損マウスに移植する。移植後 12 週間以降に T 細胞の出現を確認した後、HIV-1 JRFL 株を攻撃接種する。経時的にマウスから採血し、p24 と CD4 陽性 T 細胞の割合を計測することにより、decoy-TAR RNA と shRNA-Vif の *in vivo* における効果を判定する。

(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。

## C. 研究結果

本年度は pppG (n=2)-shRNA での IFN-β の抑制をメカニズムを詳細にするため、コントロールとして pppG (n=2) siRNA を作製した。その結果 pppG (n=2) siRNA では IFN-β の産生が確認された。また dsRNA による RIG-I 認識、さらに下流の IRF-3 の活性化を検討したところ、pppG (n=2)-shRNA ではいずれの場合でも関与は認められなかった。一方、pppG (n=2) siRNA と pppG (n=0, 1)-shRNA は活性化された。これらの結果から pppG (n=2)-shRNA は 5' - 末端には 2 つの G 残基と二重鎖部位はヘアピン構

造を有することで、TLR, RIG-I からの認識が回避されることが明らかとなった。また shRNA と decoyRNA を組み合わせることで RNAi 耐性ウイルスに対しても長期的な抗 HIV-1 効果が確認できた。さらに、ガイド RNA-EGSs、(tRNase Z が基質を認識し切断するための RNA 酵素) は EGS 耐性ウイルスの出現は回避できたことから shRNA-EGS の組み合わせが可能となった。

つぎに、ヒト T 細胞の長期培養系により増殖した T 細胞を NOD/Scid/Jak3 欠損マウスに移植したところ 2-4 週にわたりマウス体内において T 細胞が増殖することを確認した。そこで、レンチウイルスが誘導する decoy-TAR RNA と shRNA-Vif を遺伝子導入し、さらに遺伝子導入された T 細胞を放射線照射した高度免疫不全マウス (NOD/Scid/Jak3 欠損マウス) に移植、更に HIV-1 JRFL 株の攻撃接種を試みた。しかし、移植後の細胞の生着の割合が不安定であり、効果判定には至っていない。今後、マウスに生着しやすいドナーの選択により、安定した評価系の樹立を目指す。また、ヒト臍帯血由来造血幹細胞をヒト SCF+IL-6 の存在下で培養し、レンチウイルスが誘導する decoy-TAR RNA と shRNA-Vif を遺伝子導入を試みた。GFP を指標として 90%以上の細胞への遺伝子導入が可能であった。これらの細胞を放射線照射した NOD/Scid/Jak3 欠損マウスに移植した。移植 12 週後に解析したところヒト細胞のマウスへの生着は認められたが、遺伝子導入された GFP 陽性細胞は、ほとんど認められなかった。遺伝子導入後の造血幹細胞が分化してしまった可能性が高いため、遺伝子導入期間の短縮などの改良を試みている。

サブタイプ間で保存性の高い配列を選出したところ、gag, pol, LTR にそのような配列が見出された (6 種類)。それらを標的とする RNAi ベクターを構築し、分子クローンプラスミドと RNAi ベクターを co-transfection して培養上精中の p24 量を測定したところ、4 種類 (RNAi-1, RNAi-2, RNAi-3, RNAi-6) について p24 量の低下を認めた。つぎに、これらを用いてレンチウイルスベクターを作製し、jurkat T 細胞株に遺伝子導入を行った。しかしながら、これらのレンチウイルスベクターは、パッケージング細胞内において働いてしまい、ウイルス粒子の産生効率の大きな低下が見られた。CS-vif-TAR の抗ウイルス活性については、感染後 1 週間前後で control だけでなく、CS-TAR や CS-vif でもウイルス量のはっきりとした増加が認められた。一方、vif-TAR ではウイルスの複製が低く抑えられていた。さらに薬剤耐性株でも同様の傾向が認められ、特に CS-vif-TAR では、感染後 2 週間でも control と比較してウイルス量の低下が認められた。

#### D. 考察

T7 RNA ポリメラーゼを用いて合成した pppG (n=2)-shRNA は 5' 末端には 2 つの G 残基と二重鎖部位はヘアピン構造を有することで、TLR, RIG-I からの認識を回避できることが示唆された。また shRNA と decoyRNA を組み合わせることで RNAi 耐性ウイルスに対しても抗 HIV-1 効果が認められた。さらに EGS に対しても EGS 耐性ウイルスの出現は回避できたことから shRNA-EGS の組み合わせが可能となった。

サブタイプ間で保存性の高い配列を選出し、それらを標的とする RNAi ベクターを構築し、分子クローンプラスミドと co-transfection して評価したところ、ウイルス産生の低下が示唆された。これらは gag, pol, LTR を標的としており、全長を持つウイルス RNA を標的とすることで gag, pol タンパク質を減少させ、ウイルスの産生を抑制してい

ることが示唆された。CS-vif-TAR については、野生型株でも薬剤耐性株でも感染後 2 週間でウイルス量の低下が認められたことから、RNAi ベクターとして有望であると思われる。

高度免疫不全マウス (NOD/Scid/Jak3 欠損マウス) にレンチウイルスが誘導する decoy-TAR RNA と shRNA-Vif を遺伝子導入した T 細胞と造血幹細胞を用いた系の樹立を試みた。しかし、レンチウイルスで遺伝子導入した細胞のマウス体内における増殖・維持は困難であった。長期培養したヒト T 細胞がマウス体内で増殖することは確認したので、今後、遺伝子導入法の工夫により *in vivo* における薬剤効果の評価系の樹立は可能であると考えられる。

一方、RNAi 医薬品の新たな標的としての Nef の有用性を確認した。今後、従来の薬剤に加えて RNAi 医薬品の有効性が期待できるため、その *in vivo* における評価系の樹立は重要である。

#### E. 自己評価

##### 1) 達成度について

T7 RNA ポリメラーゼを用いて合成した pppG (n=2)-shRNA は TLR, RIG-I からの認識を回避できることが示唆された。shRNA と decoyRNA を組み合わせることで RNAi 耐性ウイルスに対しても抗 HIV-1 効果が認められたので目的が達成できた。

サブタイプ間で保存性の高い領域をウイルス株の配列を比較して選出し、それを標的とする RNAi ベクターを構築することができた。さらに、少なくとも transfection による実験においてウイルス産生を抑制するものを見出すことが出来た。今後は CS-vif-TAR 耐性ウイルスの長期培養した場合の評価の解析等を行う必要がある。

RNAi 医薬品の効果や副作用を *in vivo* で確認する系の樹立を目指し、高度免疫不全マウス (NOD/Scid/Jak3 欠損マウス) にレンチウイルスを用いて decoy-TAR RNA と shRNA-Vif を遺伝子導入した T 細胞と造血幹細胞を用いた系の確立を試みたが、1 年間と期間が短かったこともあり、期間内での達成はできなかった。しかし、長期培養系で得られた T 細胞がマウス体内で増殖可能なことを見出し、今後 HIV-1 感染モデルマウスを用いた *in vivo* における RNAi 医薬品の評価系を樹立が期待できる。また、RNAi 医薬品の新たな標的として Nef が有望であることを示すことが出来た点は評価できる。

##### 2) 成果の学術的・国際的・社会的意義について

エイズは現在でも非常に多数の患者が世界中にあり、HIV-1 感染症は人類が解決すべき大きな問題である。HIV-1 は非常に変異を起こす率が高いことが知られており、それが治療に対する耐性を獲得しやすいことにつながっている。保存性の高い配列を標的にすることは、様々なウイルス株に対して有効であることと耐性が生じにくいことの 2 つが期待され、有望な治療戦略であると考えられる。治療に耐性のウイルス株の問題を解決するには、作用点が異なる治療戦略を含んだ新たな併用療法を開発することが有効と思われるが、本研究で用いた RNAi ベクターはその候補となりうるであろう。エイズは国際的・社会的に大きな問題であることから、本研究の国際的・社会的意義は大きいと思われる。

##### 3) 今後の展望について

shRNA と decoyRNA を組み合わせることで RNAi 耐性ウイルスに対しても抗ウイルス効果は高く、長期治療が可能になった。

また、野生型株でも薬剤耐性株でも感染後 2 週間でウイルス量の低下が認められたことから、RNAi ベクターとして有望であると思われる。サブタイプ間で保存性の高い配列を選出し、それらを標的とする RNAi ベクターを構築に成功したが、今後は、これまで評価してきた CS-vif-TAR 等を組み合わせて、より効果の高い RNAi ベクターの開発を行う。また、安定して RNAi 医薬品の評価が可能なマウス系の確立を目指す。平行して、新たな分子標的としての Nef に対する RNAi 医薬品の開発を試みる。

#### F. 結論

5'側に 2 つ以上の G 残基を付加することにより、これまで問題視されてきた shRNA の非特異的な遺伝子抑制とサイトカインの産生を抑えることができることが明らかとなった。また shRNA の新たな標的として DIS 領域が同時に複数のウイルスタンパク質の発現を抑制するだけでなく、耐性ウイルスの出現も避けられる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を意味する。また shRNA の新たな標的として DIS 領域が同時に複数のウイルスタンパク質の発現を抑制するだけでなく、耐性ウイルスの出現も避けられる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を意味する本研究によって、RNAi 耐性ウイルスに対する TAR-decoy と vif sh RNA を組み合わせた CS-vif-TAR は RNAi 耐性ウイルスに対しても長期間にわたり抗ウイルス活性を示した。従来行われてきた HAART と CS-vif-TAR とを組み合わせることで、多剤耐性変異株を含む薬剤耐性 HIV-1 の増殖をも抑制し、より効果の高い新規治療法が開発可能であると思われる。decoy-TAR RNA と shRNA-Vif を標的とした RNAi 医薬品の in vivo における評価系の樹立をめざした。そして、長期培養系で樹立した T 細胞が NOD/Scid/Jak3 欠損マウス体内で増殖可能であることを見出した。近い将来、ヒト免疫系を構築した免疫不全マウスを用いた前臨床試験の確立により、RNAi 医薬品を始めとする新規抗 HIV-1 薬の早期の認可が可能になることが期待できる。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考えられる。

#### G. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

特開 2007-195440 バキュロウイルスベクターを利用した HIV 感染症治療薬 平成 19 年 8 月 9 日

#### H. 研究発表

##### 原著論文

1) Suzuki H., Kaneko H., Tamai N., Shimotohno K., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H. (2007) Suppression of Hepatitis C virus core protein by short hairpin RNA expression vectors in the core protein expression Huh-7 cells. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*. **26**, 815-820.

2) Gondai T., Yamaguchi K., Hashimoto K., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H. (2007) Lack of interferon (IFN) response to T7 Transcribed pppG (n)(n=2,3) -shRNA. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*. **26**, 805-808..

3) Kitajima M., Abe T., Miyano-Kurosaki N., Taniguchi M., Nakayama T., and Takaku H. (2008) Induction of NK cell-dependent antitumor immunity by the Autographa alifomica multiple nuclear polyhedrosis virus. *Molecular Therapy*, **16**, 261-268.

4) Gondai T., Yamaguchi K., Miyano-Kurosaki N., Habu Y., and Takaku H. (2008) Short-hairpin RNAs synthesized by T7 phage polymerase do not induce interferon. *Nucleic Acids Research*, in press.

5) Noguchi K., Ishitu Y., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H. (2007) Expression of shRNA using intron splicing. *Nucleic Acids Symp.Ser.*, **51**, 409-410.

6) Kato K., Habu Y., and Takaku H. (2007) Non-sequence specific RNA inhibition of HIV-1 replication. *Nucleic Acids Symp.Ser.*, **51**, 411-412.

7) Kitajima M., and Takaku H. (2008) Induction of antitumor-acquired immunity by baculovirus Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus infection in mice. *Clin.Vaccine Immunol.***16**, 261-268.

8) Miyatake K., Inoue H., Hashimoto K., Takaku H., Takata Y., Yasui N., and Itakura M. (2007) The effects of PKC 412 (CGP41251) on the proliferation and lipopolysaccharide-induced inflammatory responses of RAW 264.7 macrophages. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **360**, 115-121.

#### 学会発表

##### 国内

1) 古川亜矢子、水内祐基、河合文隆、羽生勇一郎、杉山隆一、高久洋、永田崇、片平正人：HIV 感染の防御に関する APOBEC3G の構造機能解析。第 30 回日本分子生物学会、第 80 回日本生化学大会合同大会 横浜 (2007. 12)

2) 鈴木等、齋藤大史、黒崎直子、下遠野忠、松浦善治、高久 洋：shRNA 発現バキュロウイルスベクターによる感染症治療。第 17 回アンチセンスシンポジウム 金沢 (2007, 12)。

3) 後藤丈基、野口耕生、石津賀夫、黒崎直子、高久洋：shRNA 発現システムの開発 第 17 回アンチセンスシンポジウム 金沢 (2007, 12)。

4) 羽生勇一郎、山本典生、日吉真照、黒崎直子、石川晃一、松田昌和、岡田誠治、松浦互、山本直樹、高久洋：shRNA decoy RNA 共発現レンチウイルスベクターによる HIV-1 複製阻害効果の検討。第 21 回日本エイズ学会 広島 (2007. 11)

5) 杉山隆一、羽生勇一郎、長沼晴樹、古川亜矢子、永田崇、片平正人、高久洋：Hsp70 による HIV-1 ウイルス粒子形成への影響。第 21 回日本エイズ学会 広島 (2007. 11)

6) Chang Myint Oo、鈴木友幸、笠井勇太、渡辺恵、高久洋：HIV-1 GagVLPs inhibit HIV-1 replication by induction of innate and adapted immune responses through activation of human dendritic cells and NK cells. 第 21 回日本エイズ学会 広島 (2007. 11)

7) 杉山隆一、羽生勇一郎、長沼晴樹、高久洋：APOBEC3G

と Hsp70 の相互作用による HIV-1 ウイルス粒子形成への影響。第 55 回日本ウイルス学会 札幌 (2007.10)

8) 毛利友香、鈴木等、志田壽利、高久洋：HTLV-1 Rex タンパク質による RNase III-Dicer の活性阻害。第 55 回日本ウイルス学会 札幌 (2007.10)

9) Chang Myint Oo, 鈴木友幸、笠井勇太、渡辺恵、高久洋：HIV GagVLPs induction of innate and acquired immunity activation of human dendritic cells, T cells and NK cells. 第 55 回日本ウイルス学会 札幌 (2007.10)

10) 高久洋、西部好美、金子央賢、浜野隆一、橋本香保子、松浦善治：バキュロウイルスによる肝硬変の改善 第 66 回日本癌学会学術総会 横浜 (2007.10)

11) 野口耕生、石津賀夫、黒崎直子、高久洋：shRNA 発現システムの開発。9<sup>th</sup> RNA ミーティング 名古屋 (2007.7)

#### 国際会議

1) Takaku H.: Hsp90 inhibitors as novel HCV chemotherapeutic agents. Recent Status and Future Prospect of Antiviral Chemotherapy (The Korea-Japan Basic Scientific Cooperation), Jeju, Korea (2007.12)

2) Chang Myint Oo, Suzuki T., and Takaku H.: HIV-GagVLPs induce activation of innate and adapted immune responses by activation of dendritic cells, T cells and NK cells. 1<sup>st</sup> Vaccine Congress, Amsterdam, Netherlands (2007.12)

3) Ujino S., Yamaguchi S., Tobita R., Miyano-Kurosaki N., Shimotohno K., and Takaku H.: Inhibition of Hsp90 and the proteasome promotes hepatitis C virus genome suppression. 14<sup>th</sup> International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, Glasgow, UK (2007.9)

4) Habu Y., Miyano-kurosaki N., and Takaku H.: Inhibition of HIV-1 replication by a combination of RNase P and 3'tRNase-associated external guide sequences American society of Gene Therapy, 10<sup>th</sup> Annual Meeting, Seattle, USA (2007.5).

5) Hayafune M., Mouri Y., Miyano-Kurosaki N., Hashimoto K., and Takaku H.: Human immunodeficiency virus type 1 does not escape from novel single-stranded DNzyme expression-mediated inhibition. 20<sup>th</sup> International Conference on Antiviral Research. California, USA (2006.4-5).

厚生労働科学省研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
分担研究報告書

HIV-1 感染マウスを用いた第二世代 RNAi 医薬品の評価

分担研究者 岡田 誠治 熊本大学エイズ学研究センター予防開発分野 教授

**研究要旨** 高度免疫不全マウス (NOD/Scid/Jak3 欠損マウス) にヒトの末梢血由来単核球を移植し、更に HIV-1 を攻撃接種することによりエイズマウスモデルを樹立した。本系を用いて、decoy-TAR RNA と shRNA-Vif を標的とした RNAi 医薬品の *in vivo* における評価系の樹立をめざした。そして、長期培養系で樹立した T 細胞が NOD/Scid/Jak3 欠損マウス体内で増殖可能であること見出した。近い将来、ヒト免疫系を構築した免疫不全マウスを用いた前臨床試験の確立により、RNAi 医薬品を始めとする新規抗 HIV-1 薬の早期の認可が可能になることが期待できる。

### A. 研究目的

近年、HIV-1 感染者は世界的に増加しているが、我国においても増加の一途をたどっている。HAARRT の登場により、エイズは治療可能な疾患となったが、現時点では治療は望めず、薬剤の長期服用による薬剤耐性ウィルスの出現や副作用の問題が生じている。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 HIV-1 ウィルス増殖抑制可能な遺伝子医薬 (shRNA) の開発を目指す。そのために、HIV-1 感染モデルマウスを用いて *in vivo* における薬剤効果の評価系を樹立する。そして、*in vitro* である程度の効果が確認されている decoy-TAR RNA と shRNA-Vif の *in vivo* における効果を確認する。更に新たな RNAi 医薬品の標的として HIV-1 Nef を設定し、その機能解析を行う。これらの一連の研究により、HIV-1 感染における RNAi 医薬品の実用化を目指す。

### B. 研究方法

千葉工業大学の羽生・高久らによって開発されたヒト T 細胞の長期培養系にレンチウィルスを用いて decoy-TAR RNA と shRNA-Vif を遺伝子導入する。遺伝子導入された T 細胞を放射線照射した高度免疫不全マウス (NOD/Scid/Jak3 欠損マウス) に移植、更に HIV-1 JRFL 株を攻撃接種する。2 週間後にマウス体内のヒト CD4 陽性 T 細胞数、細胞内 p24、マウス血清中 p24 などを測定して、decoy-TAR RNA と shRNA-Vif の *in vivo* における効果を判定する。また、ヒト臍帯血由来造血幹細胞にレンチウィルスを用いて decoy-TAR RNA と shRNA-Vif を遺伝子導入し、更に NOD/Scid/Jak3 欠損マウスに移植する。移植後 12 週間以降に T 細胞の出現を確認した後、HIV-1 JRFL 株を攻撃接種する。経時的にマウスから採血し、p24 と CD4 陽性 T 細胞の割合を計測することにより、decoy-TAR RNA と shRNA-Vif の *in vivo* における効果を判定する。一方、単球系における decoy-TAR RNA と shRNA-Vif の効果と耐性ウィルスの出現を *in vitro* で確認する系として、単球性白血球細胞株 U937 に decoy-TAR RNA と shRNA-Vif を遺伝子導入した細胞株を樹立した。この細胞株にさまざまな HIV-1 の感染を試みる。更に長期培養による decoy-TAR RNA と shRNA-Vif 耐性ウィルスの出現を確認する。

HIV-1 Nef 蛋白は、HIV-1 の病原性に深く関与していることが知られている。そこで、RNAi 医薬品開発のもうひとつの標的としてマクロファージにおける HIV-1 Nef に対する siRNA の効果を解析する系を樹立する。そのために、単球系細胞株 TF-1-fms に活性化誘導型 Nef 蛋白を遺伝子導入した細胞株：TF-1-fms-nef-ER を用いて、Nef 活性化のマクロファージ機能への影響を解析する。

(倫理面への配慮)

ヒト由来試料 (末梢血・臍帯血等) を用いた研究は、熊本大学大学院医学薬学研究部等倫理委員会の承認を受け、規則に従い実施した。また、免疫不全マウスの作成及び移植実験等の動物実験は、熊本大学本荘地区動物実験委員会の承認を得た上で「熊本大学動物実験指針」に従い実施した。

1) 研究対象者に対する人権擁護上の配慮

研究に用いる臍帯血・末梢血は、他の研究目的には使用しない。臍帯血・末梢血は匿名処理を行うため、個人情報流出することはない。また、同意書に署名後も試料採取・使用までの期間に同意を撤回することを可能としている。

2) 研究方法による研究対象者に対する利益・不利益

本研究により、直接提供者が医学上の利益・不利益を得ることはない。

3) 危険性の排除

臍帯血は臍帯を切り離した後で、臍帯・胎盤に残った血液を採取するため、新生児と母体への影響はない。また、臍帯血の採取は母子共に安全な分娩のみに限るとし、臍帯血採取によって分娩時の危険性が増す可能性を排除した。

末梢血は、医師が問診した上で健康に問題ないと判断した場合に限り、医師が採血した。採血に伴う身体への危険性はありうるが、これは通常の診察行為を越えるものではない。一回の採取量は 10-100 ml であり、採血量は、毎回本人の了解のもとに決定した。

4) インフォームドコンセントに係わる状況

臍帯血採取に関しては、協力医療機関の医療スタッフ (医師) が本研究の趣旨を説明し、臍帯血提供の同意を得られた方のみ同意書に署名していただいた。この際、説明を行った医療スタッフ名を明記し、同意書は協力医療機関において厳重に保管している。

末梢血採取に関しては、熊本大学エイズ学研究センターのスタッフ（医師）が直接本研究の趣旨を説明し、末梢血提供の同意を得られた方のみ同意書に署名していただいた。この際、説明を行った医師名を明記し、同意書はエイズ学研究センターにおいて厳重に保管している。

#### 5) 実験動物に対する動物愛護上の配慮

動物実験は、「熊本大学動物実験指針」を遵守し、極力動物の苦痛軽減に配慮して行った。動物実験における実験処置に対する倫理基準では、カテゴリーB（動物に対してほとんど不快感を与えないと思われる実験）レベルの実験であり、解析時には「動物の処分方法に関する指針」を遵守して、頸椎脱臼により安楽死させた。

### C. 研究結果

まず、ヒトT細胞の長期培養系により増殖したT細胞をNOD/Scid/Jak3欠損マウスに移植したところ2-4週にわたりマウス体内においてT細胞が増殖することを確認した。そこで、レンチウイルスを用いてdecoy-TAR RNAとshRNA-Vifを遺伝子導入し、更に遺伝子導入されたT細胞を放射線照射した高度免疫不全マウス（NOD/Scid/Jak3欠損マウス）に移植、更にHIV-1 JRFL株の攻撃接種を試みた。しかし、移植後の細胞の生着の割合が不安定であり、効果判定には至っていない。今後、マウスに生着しやすいドナーの選択により、安定した評価系の樹立を目指す。

また、ヒト臍帯血由来造血幹細胞をヒトSCF+IL-6の存在下で培養し、レンチウイルスを用いてdecoy-TAR RNAとshRNA-Vifを遺伝子導入を試みた。GFPを指標として90%以上の細胞への遺伝子導入が可能であった。これらの細胞を放射線照射したNOD/Scid/Jak3欠損マウスに移植した。移植12週後に解析したところヒト細胞のマウスへの生着は認められたが、遺伝子導入されたGFP陽性細胞は、ほとんど認められなかった。遺伝子導入後の造血幹細胞が分化してしまった可能性が高いため、遺伝子導入期間の短縮などの改良を試みている。

単球性白血病細胞株U937にdecoy-TAR RNAとshRNA-Vifを遺伝子導入した細胞株を樹立した。現在、この細胞株を用いてdecoy-TAR RNAとshRNA-VifのHIV-1複製における影響を解析中である。

単球系細胞株TF-1-fmsに活性化誘導型Nef蛋白を遺伝子導入した細胞株：TF-1-fms-nef-ERを用いて、Nef蛋白がhckと結合することによりマクロファージの重要な受容体であるM-CSF受容体の機能を攪乱することを見出した。

### D. 考察

高度免疫不全マウス（NOD/Scid/Jak3欠損マウス）にレンチウイルスを用いてdecoy-TAR RNAとshRNA-Vifを遺伝子導入したT細胞と造血幹細胞を用いた系の樹立を試みた。しかし、レンチウイルスで遺伝子導入した細胞のマウス体内における増殖・維持は困難であった。長期培養したヒトT細胞がマウス体内で増殖することは確認したので、今後、遺伝子導入法の工夫により*in vivo*における薬剤効果の評価系の樹立は可能であると考えられる。

一方、RNAi医薬品の新たな標的としてのNefの有用性を確認した。Nefは、マクロファージ系細胞においてM-CSF受容体を介したシグナル伝達を攪乱する機能があることを見出した。

今後、従来の薬剤に加えてRNAi医薬品の有効性が期待

できるため、その*in vivo*における評価系の樹立は重要である。

### E. 結論

decoy-TAR RNAとshRNA-Vifを標的としたRNAi医薬品の*in vivo*における評価系の樹立をめざした。そして、長期培養系で樹立したT細胞がNOD/Scid/Jak3欠損マウス体内で増殖可能であることを見出した。近い将来、ヒト免疫系を構築した免疫不全マウスを用いた前臨床試験の確立により、RNAi医薬品を始めとする新規抗HIV-1薬の早期の認可が可能になることが期待できる。

### F. 健康危機情報

該当なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- Ohsugi T, Kumadaka T, Okada S, and Urano T; HTLV-1 Tax promotes oncogenesis not only in immature T cells but also mature T cells. *Nature Medicine* 13(5):527-528, 2007
- Suzu S, Hiyoshi M, Yoshidomi Y, Harada H, Takeya M, Kimura F, Motoyoshi K, and Okada S; M-CSF-mediated macrophage differentiation but not proliferation is correlated with increased and prolonged ERK activation. *J Cell Physiol* 212(2):519-525, 2007
- Harada H, Goto Y, Ohno T, Suzu S, and Okada S; Proliferative activation up-regulates the expression of HIV-1 receptors on NK cells and induces HIV-1 infection of NK cells. *Eur J Immunol* 37(8): 2148-2155, 2007
- Koda M, Nishio Y, Kamada T, Someya Y, Okawa A, Mori C, Yoshinaga K, Okada S, Moriya H, and Yamazaki M; Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mobilizes bone marrow-derived cells into injured spinal cord and promotes functional recovery after compression-induced spinal cord injury in mice. *Brain Res* 1149:223-231, 2007
- Nishio Y, Koda M, Kamada T, Someya Y, Kadota R, Mannoji C, Miyashita T, Okada S, Okawa A, Moriya H, and Yamazaki M; Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) attenuates neuronal death and promotes functional recovery after spinal cord injury in mice. *J Neuropath Exp Neu* 66(8):724-731, 2007
- Ohsugi T, Kumasaka T, Okada S, Ishida T, Yamaguchi K, Horie R, Watanabe T, and Umezawa K; Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) therapy reduces tumor formation in mice inoculated with Tax-deficient adult T-cell leukemia-derived cell lines. *Cancer Lett* 257(2):206-215, 2007
- Yamamoto K, Suzu S, Yoshidomi Y, Hiyoshi M, Harada H, and Okada S; Erythroblasts highly express the ABC transporter Bcrp1/ABCG2 but do not show the side population (SP) phenotype. *Immunol Lett* 114(1):52-58, 2007
- Harada H, Murakami T, Tea SS, Takeuchi A, Koga T, Okada S, Suico MA, Shuto T and Kai H; Heat shock suppresses human NK cell cytotoxicity via regulation of perforin. *Int J Hyperthermia* 23(8):657-665, 2007
- Hiyoshi M, Suzu S, Yoshidomi Y, Hassan R, Harada H,



Sakashita N, Akari H, Motoyoshi K, and Okada S; Interaction between Hck and IV-1 Nef negatively regulates cell surface expression of M-CSF receptor. *Blood* 111(1):52-58, 2008

2. 学会発表  
(国際学会)

1. Seiji Okada, Hideki Harada, and Shinya Suzu. Natural killer cells are potent targets for human immunodeficiency virus infection. (Invited Lecture). The Asia-Africa International Network Symposium of JSPS Asia and Africa Science Platform and The Fourth LiverCare Center Symposium. (Khon Kaen, Thailand) Feb. 19-20, 2008
2. Sumako Iwanaga, Ayumi Ono, Hideki Harada, Shinya Suzu, and Seiji Okada. Proliferation and differentiation of functional human B lymphocytes from cord blood mononuclear cells in the NOD/Scid/Jak3 deficient mice. The Asia-Africa International Network Symposium of JSPS Asia and Africa Science Platform and The Fourth LiverCare Center Symposium. (Khon Kaen, Thailand) Feb. 19-20, 2008
3. Ayumi Ono, Sumako Iwanaga, Shinya Suzu, and Seiji Okada. Influence of genetic background of the immunodeficient mice for the human PBMC engraftment. (Poster Award) The Asia-Africa International Network Symposium of JSPS Asia and Africa Science Platform and The Fourth LiverCare Center Symposium. (Khon Kaen, Thailand) Feb. 19-20, 2008

(国内学会)

1. 岩永寿満子、小野歩、原田英樹、鈴伸也、岡田誠治. 高度免疫不全マウス(NOD/Scid/ jak-3 欠損マウス)体内におけるヒトB細胞の増殖と分化. 第17回日本サイトメトリー学会学術集会 2007年7月5-6日、浦安
2. 村上 徹, 原田英樹, Tea SEOW SHI, 竹内 晃, 古賀友紹, 岡田誠治, Mary Ann SUICO, 首藤 剛, 甲斐広文. パーフォリンの発現調整 を介したNK細胞活性化制御機構. 日本ハイパーサーミア学会第24回大会 2007年9月14-15日、名古屋
3. 鈴 伸也、日吉真照、吉富友香、元吉和夫、岡田誠治. Src キナーゼ Hck による M-CSF レセプター輸送・成熟過程の負の制御. 第69回日本血液学会総会、2007年10月11-13日、横浜
4. 水上拓郎、浜口功、滝澤和也、倉光球、百瀬暖佳、内藤誠之郎、益見厚子、岡田誠治、山口一成. 髄外造血機構を用いた造血幹細胞ニッチの解析. 第69回日本血液学会総会、2007年10月11-13日、横浜
5. 日吉真照、鈴 伸也、吉富友香、原田英樹、岡田誠治. HIV Nef の宿主細胞内チロシンキナーゼに対する影響. 第55回日本ウイルス学会学術集会、2007年10月21-23日、札幌
6. 大杉剛生、熊坂利夫、岡田誠治、浦野徹. ヒトT細胞白血病ウイルスI型(HTLV-1) Tax 遺伝子導入マウスの病態解析. 第55回日本ウイルス学会学術集会、2007年10月21-23日、札幌
7. 村上徹、原田英樹、鈴伸也、メリーアン・スイコ、首藤剛、甲斐広文、岡田誠治. 麻黄湯とサイトカインの併用による潜伏感染細胞からのHIV発現誘導促進作用. 第55回日本ウイルス学会学術集会、2007年10月21-23日、札幌
8. Omar Dessouki, Hideki Harada, Shinya Suzu, and Seiji Okada. Characterization of a minor human NK cell sub-populations, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup> cells. 第37回日本免疫学会総会・学術集会(東京)2007年11月20-22日、東京
9. 吉富友香、鈴 伸也、日吉真照、岡田誠治. HIV-1 Nef タンパク質のゴルジ体における機能. 第21回日本エイズ学会学術集会総会、2007年11月28日-11月30日、広島
10. 羽生勇一郎、山本典生、日吉真照、黒崎直子、石川晃一、松田唱和、岡田誠治、杉浦瓦、山本直樹、高久洋. shRNA, decoyRNA 強発現レンチウイルスベクターによるHIV-1複製阻害効果の検討. 第21回日本エイズ学会学術集会総会、2007年11月28日-11月30日、広島

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)  
該当なし

#### 研究要旨

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 vif-shRNA-decoy TAR RNA の組合せでこの問題を解決した。さらに、ガイド RNA-EGSs、(tRNase Z が基質を認識し切断するための RNA 酵素)の抗ウイルス活性の評価と shRNA-EGS の組み合わせの可能性を検討した。高度免疫不全マウス (NOD/Scid/Jak3 欠損マウス) にヒト T 細胞がマウス体内で増殖することは確認したので、今後、遺伝子導入法の工夫により *in vivo* における薬剤効果の評価系の樹立は可能であると考えられる。

#### 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。本研究ではガイド RNA-EGSs、(tRNase Z が基質を認識し切断するための RNA 酵素)の抗ウイルス活性の評価と shRNA-EGS の組み合わせの可能性を検討した。本研究での最終目的である動物モデルでの遺伝子医薬品 vif-shRNA-decoy TAR RNA の抗ウイルス活性を評価するため、高度免疫不全マウス (NOD/Scid/Jak3 欠損マウス) にヒト T 細胞がマウス体内での移植について検討をした。

#### B. 研究方法

EGS ベクターは、HIV-1vif 領域を標的とした EGS を発現するレンチウイルスベクター (CS-U6-vif-EGS, CS-U6-vif-shRNA, CS-U6-lacZ) を作製し、それぞれを MT-4 細胞に  $moi=20$  で感染させ、stable 細胞を樹立した。それぞれの細胞に HIV-1<sub>NL4.3</sub> を 10pg で感染させた後、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 EGS と shRNA 標的部位の配列を解析し、EGS と shRNA 耐性株の出現についても同時に検討した。

ヒト T 細胞の長期培養系にレンチウイルスを用いて decoy-TAR RNA と shRNA-Vif を遺伝子導入する。遺伝子導入された T 細胞を放射線照射した高度免疫不全マウス (NOD/Scid/Jak3 欠損マウス) に移植、更に HIV-1 JRFL 株を攻撃接種する。

#### C. 研究結果

vif-shRNA の stable 細胞株では HIV-1 感染後 8 日目

で高いウイルス産生阻害効果を示していた。一方、vif-EGS は 4 日目から培養上清中のウイルス量が増加しはじめ、12 日目では抗ウイルス活性は失われた。また、培養上清中のウイルス遺伝子配列を解析したところ、vif-EGS では 4 日目から HIV-1 標的配列の変異が出現しはじめた。それに対して、vif-shRNA は 8 日目でも変異ウイルスの出現はみられなかった。

また、ヒト臍帯血由来造血幹細胞をヒト SCF+IL-6 の存在下で培養し、レンチウイルスが誘導する decoy-TAR RNA と shRNA-Vif を遺伝子導入を試みた。GFP を指標として 90%以上の細胞への遺伝子導入が可能であった。これらの細胞を放射線照射した NOD/Scid/Jak3 欠損マウスに移植した。移植 12 週後に解析したところヒト細胞のマウスへの生着は認められたが、遺伝子導入された GFP 陽性細胞は、ほとんど認められなかった。遺伝子導入後の造血幹細胞が分化してしまった可能性が高いため、遺伝子導入期間の短縮などの改良を試みている。

#### D. 考察

shRNA と decoyRNA を組み合わせることで RNAi 耐性ウイルスに対しても抗 HIV-1 効果が認められた。さらに EGS に対しても EGS 耐性ウイルスの出現は回避できなかったことから shRNA-EGS の組み合わせができなくなった。しかし、EGS の HIV-1 mRNA の阻害機能は非常に高く EGS と decoy TAR RNA の併用が期待できる。

高度免疫不全マウス (NOD/Scid/Jak3 欠損マウス) にレンチウイルスが誘導する decoy-TAR RNA と shRNA-Vif を遺伝子導入した T 細胞と造血幹細胞を用いた系の樹立を試みた。しかし、レンチウイルスで遺伝子導入した細胞のマウス体内における増殖・維持は困難であった。長期培養し

たヒト T 細胞がマウス体内で増殖することは確認したので、今後、遺伝子導入法の工夫により *in vivo* における薬剤効果の評価系の樹立は可能であると考えられる。

#### E. 結論

さらにEGSに対しても EGS 耐性ウイルスの出現は回避できなかったことから shRNA-EGS の組み合わせができなくなった。しかし、EGS の HIV-1 mRNA の阻害機能は非常に高く EGS と decoy TAR RNA の併用が期待できる。また、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。

長期培養したヒト T 細胞がマウス体内で増殖することは確認したので、今後、遺伝子導入法の工夫により *in vivo* における薬剤効果の評価系の樹立は可能であると考えられる。

#### E. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

なし

#### F. 健康危険情報

特に無し

#### G. 研究発表

##### 論文発表

- 1) Suzuki H., Kaneko H., Tamai N., Shimotohno K., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H. (2007) Suppression of Hepatitis C virus core protein by short hairpin RNA expression vectors in the core protein expression Huh-7 cells. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*. in press.
- 2) Gondai T., Yamaguchi K., Hashimoto K., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H. (2007) Lack of interferon (IFN) response to T7 Transcribed pppG (n)(n=2,3) -shRNA. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*. in press.
- 3) Kitajima M., Abe T., Miyano-Kurosaki N., Taniguchi M., Nakayama T., and Takaku H. (2008) Induction of NK cell-dependent antitumor immunity by the Autographa alifornica multiple nuclear polyhedrosis virus. *Molecular*

*Therapy*, in press.

- 4) Gondai T., Yamaguchi K., Miyano-Kurosaki N., Habu Y., and Takaku H. (2007) Short-hairpin RNAs synthesized by T7 phage polymerase do not induce interferon. *Nucleic Acids Research*, in press.
- 5) Noguchi K., Ishitu Y., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H. (2007) Expression of shRNA using intron splicing. *Nucleic Acids Symp.Ser.*, **51**, 409-410.

#### 国際会議

- 1) Habu Y., Miyano-kurosaki N., and Takaku H.: Inhibition of HIV-1 replication by a combination of RNase P and 3'tRNase-associated external guide sequences American society of Gene Therapy, 10<sup>th</sup> Annual Meeting, Seattle, USA (2007.5).
- 2) Hayafune M., Mouri Y., Miyano-Kurosaki N., Hashimoto K., and Takaku H.: Human immunodeficiency virus type 1 does not escape from novel single-stranded DNAzyme expression-mediated inhibition. 20<sup>th</sup> International Conference on Antiviral Research. California, USA (2006.4-5).

#### 国内

- 1) 鈴木等、齋藤大史、黒崎直子、下遠野忠、松浦善治、高久 洋：shRNA 発現バキュロウイルスベクターによる感染症治療。第 17 回アンチセンスシンポジウム 金沢 (2007, 12)。
- 2) 後藤丈基、野口耕生、石津賀夫、黒崎直子、高久洋：shRNA 発現システムの開発 第 17 回アンチセンスシンポジウム 金沢 (2007, 12)。
- 3) 羽生勇一郎、山本典生、日吉真照、黒崎直子、石川晃一、松田昌和、岡田誠治、松浦互、山本直樹、高久洋：shRNA decoy RNA 共発現レンチウイルスベクターによる HIV-1 複製阻害効果の検討。第 21 回日本エイズ学会 広島 (2007. 11)
- 4) 野口耕生、石津賀夫、黒崎直子、高久洋：shRNA 発現システムの開発。9<sup>th</sup> RNA ミーティング 名古屋 (2007. 7)

#### 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。さらに、pppG(n=2)-shRNA での IFN-β の抑制をメカニズムを詳細にするため、コントロールとして pppG(n=2) siRNA を作製した。その結果 pppG(n=2) siRNA では IFN-β の産生が確認された。また dsRNA による RIG-I 認識、さらに下流の IRF-3 の活性化を検討したところ、pppG(n=2)-shRNA ではいずれの場合でも関与は認められなかった。一方、pppG(n=2) siRNA と pppG(n=0, 1)-shRNA は活性化された。これらの結果から pppG(n=2)-shRNA は 5' 末端には 2 つの G 残基と二重鎖部位はヘアピン構造を有することで、TLR, RIG-I からの認識が回避されることが明らかとなった。

#### 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 発現抑制効果と shRNA による副反応について検討した。さらに、pppG(n=2)-shRNA での IFN-β の抑制をメカニズムを明らかにする。

#### B. 研究方法

ホタルルシフェラーゼ遺伝子を標的とした pppG(n)-shRNALuc3(n=1,1,2,3) と pppG(n)-siRNALuc3(n=0) を T7 RNA ポリメラーゼを用いて *in vitro* 転写合成した。それを HeLa CD4<sup>+</sup>細胞へ導入したときの副反応を IFN-β 産生、CPE 解析、MTS assay にて検討した。

つぎに、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<sup>+</sup>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。

また、ウイルス非感染下で shRNA 導入による副反応も IFN-β 産生、CPE 解析、MTS assay にて検討した。

さらに、IRF3 の活性化による IFN-β 産生を調べるため

に pIRF3-Luc を構築した。

#### C. 研究結果

pppG(n)-shLuc3(n=1,1,2,3) を HeLa CD4<sup>+</sup>細胞へ導入した結果、n=0,1 では IFN-β 産生、CPE、細胞生存率の低下が見られたが、n=2 および 3 ではそのような現象はみられなかった。そこで、IFN-β 産生を産生しなかった n=2 の pppG(n)-shDIS を合成し、HIV-1 抑制効果を検討したところ、約 70% の抗 HIV-1 活性が得られた。また、shRNA 導入後の IFN-β 産生、CPE、細胞生存率の低下はみられなかった。さらに、pppG(n=2)-shRNA での IFN-β の抑制をメカニズムを詳細にするため、コントロールとして pppG(n=2) siRNA を作製した。その結果 pppG(n=2) siRNA では IFN-β の産生が確認された。また dsRNA による RIG-I 認識、さらに下流の IRF-3 の活性化を検討したところ、pppG(n=2)-shRNA ではいずれの場合でも関与は認められなかった。一方、pppG(n=2) siRNA と pppG(n=0, 1)-shRNA は活性化された。これらの結果から pppG(n=2)-shRNA は 5' 末端には 2 つの G 残基と二重鎖部位はヘアピン構造を有することで、TLR, RIG-I からの認識が回避されることが明らかとなった。

#### D. 考察

ホタルルシフェラーゼ遺伝子を標的とした shRNA の 5' オーバーハングに含まれる G 残基数が 2 または 3 で IFN-

pppG(n=2)-shRNA は 5' 末端には 2 つの G 残基と二重鎖部位はヘアピン構造を有することで、TLR, RIG-I からの認識が回避されることが判明した。

#### E. 結論

Phage Polymerase により合成された shRNA は、IFN の産生を回避し、標的細胞に傷害を与えることなく、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. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

なし

#### G. 健康危険情報

特に無し

#### H. 研究発表

##### 論文発表

- 1) Gondai T., Yamaguchi K., Hashimoto K., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H. (2007) Lack of interferon (IFN) response to T7 Transcribed pppG(n)(n=2,3) -shRNA. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*. in press.
- 2) Miyatake K., Inoue H., Hashimoto K., Takaku H., Takata Y., Yasui N., and Itakura M. (2007) The effects of PKC 412 (CGP41251) on the proliferation and lipopolysaccharide-induced inflammatory responses of RAW 264.7 macrophages. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*

360, 115-121.

##### 学会発表

##### 国際会議

- 1) Hayafune M., Mouri Y., Miyano-Kurosaki N., Hashimoto K., and Takaku H.: Human immunodeficiency virus type 1 does not escape from novel single-stranded DNzyme expression-mediated inhibition. 20<sup>th</sup> International Conference on Antiviral Research. California, USA (2006.4-5).

##### 国内

1. 鈴木友幸、Chang Myint Oo、笠井勇太、宮澤悠樹、酒井亮、斎藤諒、山本紘士、北島雅之、橋本香保子、高久洋：バキュロウイルス感染樹状細胞による免疫応答解析。第 37 回日本免疫学会 東京 (2007. 11)。
2. 宮澤悠樹、鈴木友幸、矢野孝之、酒井亮、山本紘士、斎藤諒、Chang Myint Oo、橋本香保子、高久洋：昆虫病原性バキュロウイルスの感染が誘導する自然免疫活性の解析。第 37 回日本免疫学会 東京 (2007. 11)。
3. 斎藤諒、酒井亮、山本紘士、宮武克年、宮澤悠樹、高久洋、板倉光夫、山中俊憲、橋本香保子、脾臓 B 細胞の分化にともなう分泌小胞輸送複合体分子の解析、第 37 回日本免疫学会 東京 (2007. 11)。

#### 研究要旨

本研究では、世界で最も広く分布するグループ M のウイルスについてサブタイプ間で保存性の高い配列を抽出し、それを標的とする RNAi ベクターを構築してそのベクターの抗ウイルス効果について評価を行った。サブタイプ間で保存性の高い配列としては、gag, pol, LTR にそのような配列が見出された（6 種類）。それらを標的とする RNAi ベクターを構築し、分子クローンプラスミドと RNAi ベクターを co-transfection して培養上精中の p24 量を測定したところ、4 種類(RNAi-1, RNAi-2, RNAi-3, RNAi-6)について p24 量の低下を認めた。これらの RNAi ベクターを組み合わせることによって、さらに効果の高い RNAi ベクターを開発できると期待される。

#### 研究目的

HIV-1 は変異を起こしやすいウイルスであるが、変異を起こしにくい配列も存在する。本研究では、世界で最も広く分布するグループ M のウイルスについて、サブタイプ間で保存性の高い配列を抽出し、それを標的とする RNAi ベクターを構築し、そのベクターの抗ウイルス効果について評価を行う。また、高い抗ウイルス活性を示した RNAi ベクターを組み合わせることにより、さらに高い抗ウイルス活性を持つ RNAi ベクターの開発を目指す。保存性の高い配列を標的とした RNAi ベクターは様々なウイルス株に対して有効であること、エスケープミュータントが発生しにくいことが期待される。

また、これまでに報告してきた第二世代 RNAi ベクター CS-Vif-TAR について、2 週間の長期培養におけるウイルス複製抑制効果について解析を行う。

#### A. 研究方法

サブタイプ間で保存性の高い領域を、ウイルス株の配列を比較して抽出した。抽出された配列を標的とする RNAi ベクターを構築し、分子クローンプラスミドと RNAi ベクターを co-transfection して培養上精中の p24 量を測定した。測定には CLEIA 法を用いた。また、RNAi 発現カセットを含んだレンチウイルスベクターを作製し jurkat 細胞に RNAi 発現カセットを導入した。導入効率の評価を EGFP 陽性率によって行った。

CS-Vif-TAR の抗ウイルス活性の評価については、

jurkat T 細胞株に CS-vif-TAR, CS-vif, CS-TAR, CS-vifRan-mTAR(control)に HXB-2 およびプロテアーゼ阻害剤耐性株を M.O.I. = 0.01 で感染させ、p24 量を経時的に測定した。

(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。

#### B. 研究結果

サブタイプ間で保存性の高い配列を抽出したところ、gag, pol, LTR にそのような配列が見出された（6 種類）。それらを標的とする RNAi ベクターを構築し、分子クローンプラスミドと RNAi ベクターを co-transfection して培養上精中の p24 量を測定したところ、4 種類(RNAi-1, RNAi-2, RNAi-3, RNAi-6)について p24 量の低下を認めた。次に、これらを用いてレンチウイルスベクターを作製し、jurkat T 細胞株に遺伝子導入を行った。しかしながら、これらのレンチウイルスベクターは、パッケージング細胞内において働いてしまい、ウイルス粒子の産生効率の大きな低下が見られた。jurkat T 細胞株への遺伝子導入効率を EGFP 陽性率で評価したところ、コントロールベクターの導入効率の 1/10 から 1/100 に減少していた。現在、感染実験に供するには EGFP 陽性細胞数が不足しているため、細胞を増殖させた後に感染実験を行う予定である。

CS-vif-TAR の抗ウイルス活性については、感染後 1

週間前後で control だけでなく、CS-TAR や CS-vif でもウイルス量のはっきりとした増加が認められた。一方、vif-TAR ではウイルスの複製が低く抑えられていた。薬剤耐性株でも同様の傾向が認められた。CS-vif-TAR では、感染後 2 週間でも control と比較してウイルス量の低下が認められた。

#### D. 考察

サブタイプ間で保存性の高い配列を抽出し、それらを標的とする RNAi ベクターを構築することが出来た。それらの抗ウイルス効果を、まず分子クローンプラスミドと RNAi ベクターを co-transfection して培養上清中の p24 量を測定することにより評価したところ、ウイルス産生を低下させるものが見出された。これらは gag, pol, LTR を標的としており、全長を持つウイルス RNA を標的とすることで gag, pol タンパク質を減少させ、ウイルスの産生を抑制していると推測される。今回構築した RNAi ベクターでは、ウイルス粒子の産生効率の大きな低下が見られたが、これはパッケージングプラスミド中の gag, pol や RNAi ベクター中の LTR 配列を標的として RNA を分解してしまうためと考えられる。今後はこの問題を解決するために、codon-optimized gag-pol プラスミドなど、標的配列を別の配列に置換したプラスミドをウイルス作製に使う必要があると思われる。

CS-vif-TAR については、野生型株でも薬剤耐性株でも感染後 2 週間でウイルス量の低下が認められたことから、RNAi ベクターとして有望であると思われる。さらに長期間培養を行い、CS-vif-TAR 耐性ウイルスが取ればその配列を解析する必要があるだろう。

#### H. 結論

本研究によって、保存性の高い配列を標的とした新たな RNAi ベクター開発の可能性が示唆された。本研究で見出された RNAi ベクターを組み合わせることで、さらに効果の高い RNAi ベクターが開発されることが期待される。従来行われてきた HAART、これまでに有効性が示されてきた TAR-decoy と vif sh RNA を組み合わせた CS-vif-TAR、そして本研究で見出された RNAi ベクターを組み合わせることで、多剤耐性変異株を含む薬剤耐性 HIV-1 の増殖をも抑制しうるより効果の高い新規治療法が開発可能であると思われる。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。

#### I. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

1 件

#### J. 健康危険情報

特に無し

#### K. 研究発表

##### 論文発表

- 1) Saitoh Y, Yamamoto N, Dewan MZ, Sugimoto H, Martinez B VJ, Iwasaki Y, Matsubara K, Qi X, Saitoh T, Imoto I, Inazawa J, Utsunomiya A, Watanabe T, Masuda T, Yamamoto N, Yamaoka S. Overexpressed NF-kappa B inducing kinase contributes to the tumorigenesis of adult T-cell leukemia and Hodgkin Reed-Sternberg cells. Blood 2008 in press
- 2) Shiori Haga, Norio Yamamoto, Chikako Nakai -Murakami, Yoshiaki Osawa, Kenzo Tokunaga, Tetsutaro Sata, Naoki Yamamoto, Takehiko Sasazuki, and Yukihito Ishizaka. Modulation of TNF- $\alpha$ -converting enzyme by the spike protein of SARS-CoV and angiotensin-converting enzyme 2 induces TNF- $\alpha$  production and facilitates viral entry. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 in press.
- 3) Ujike M, Nishikawa H, Otaka A, Yamamoto N, Yamamoto N, Matsuoka M, Kodama E, Fujii N, Taguchi F. Heptad repeat-derived peptides block the protease-mediated direct entry from cell surface of SARS coronavirus but not entry via endosomal pathway. J Virol. 2008 Jan;82(1):588-92
- 4) Qi X, Koya Y, Saitoh T, Saitoh Y, Shimizu S, Ohba K, Yamamoto N, Yamaoka S, Yamamoto N. Efficient induction of HIV-1 replication in latently infected cells through contact with CD4(+) T cells: Involvement of NF-kappaB activation. Virology. 2007 May 10;361(2):325-34.

##### 口頭発表

##### 国内

- 1) 山本典生、田中千香、佐藤人美、山本陽子、山本直樹、

山岡昇司. NAF1 の HIV-1 複製抑制性ドメインについて  
の検討. 日本エイズ学会、2007 年、広島.



## 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
Suzuki H., Kaneko H., Tamai N., Shimotohno K., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H.	Suppression of Hepatitis C virus core protein by short hairpin RNA expression vectors in the core protein expression Huh-7 cells.	Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids	26	815-820	2007
Gondai T., Yamaguchi K., Hashimoto K., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H.	Lack of interferon (IFN) response to T7 Transcribed pppG (n)(n=2,3)-s hRNA.	Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids	26	805-808	2007
Miyatake K., Inoue H., Hashimoto K., Takaku H., Takata Y., Nakano S., Yasui N., and Itakura M.	PKC 412 (CGP41251) modulates the proliferation and lipopolysaccharide-induced inflammatory responses of RAW 264.7 macrophages.	Biochem. Biophys. Res. Comm.	360	115-121	2007
Noguchi K., Ishitu Y., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H.	Expression of shRNA using intron splicing.	Nucleic Acids Symp. Ser.	51	409-410	2007
Kato K., Habu Y., and Takaku H.	Non-sequence specific RNA inhibition of HIV-1 replication.	Nucleic Acids Symp. Ser.	51	411-412	2007
Kitajima M., Abe T., Miyano-Kurosaki N., Taniguchi M., Nakayama T., and Takaku H.	Induction of NK cell-dependent antitumor immunity by the Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus.	Molecular Therapy	16	261-268	2008
Kitajima M., and Takaku H.	Induction of antitumor-acquired immunity by baculovirus Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus infection in mice.	Clin. Vaccine Immunol.	15	376-378	2008
Gondai T., Yamaguchi K., Miyano-Kurosaki N., Habu Y., and Takaku H.	Short-hairpin RNAs synthesized by T7 phage polymerase do not induce interferon.	Nucleic Acids Res.		In press	2008
Someya T., Hosono K., Morimura K., Takaku H., and Kawai G.	Recognition of a bulged RNA peptides derived from the influenza NS1 protein.	J. Biochem.		In press	2008

Ohsugi T., Kumadaka T., Okada S., and Urano T.	The Tax protein of HTLV-1 promotes oncogenesis in not only immature T cells but also mature T cells.	Nature Medicine	13	527-528	2007
Suzu S., Hiyoshi M., Yoshidomi Y., Harada H., Takeya M., Kimura F., Motoyoshi K., and Okada S.	M-CSF-mediated macrophage differentiation is correlated with increased and prolonged ERK activation.	J. Cell Physiol	212	519-525	2007

Harada H., Goto Y., Ohno T., Suzu S., and Okada S.	Proliferative activation up-regulates the expression of HIV-1 receptors on NK cells and induces HIV-1 infection of NK cells.	Eur. J. Immunol.	37	2148-2155	2007
Ohsugi T., Kumadaka T., Okada S., Ishida T., Yamaguchi K., Horie R., Watanabe T., and Umezawa K.	Dehydroxymethylepoxy-quinomicin (DHMEQ) therapy reduces tumor formation in mice inoculated with Tax-deficient adult T-cell leukemia-derived cell lines.	Cancer Lett.	257	206-215	2007
Koda M., Nishio Y., Kamada T., Someya Y., Okawa A., Mori C., Yoshinaga K., Okada S., Moriya H., and Yamazaki M.	Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mobilizes bone marrow-derived cells into injured spinal cord and promotes functional recovery after compression-induced spinal cord injury in mice.	Brain Res.	1149	223-231	2007
Nishio Y., Koda M., Kamada T., Someya Y., Kadota R., Mannoji C., Miyashita T., Okada S., Okawa A., Moriya H., and Yamazaki M.	Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) attenuates neuronal death and promotes functional recovery after spinal cord injury in mice.	J.Neuropath Exp. Neur.	66	724-731	2007
Yamamoto K., Suzu S., Yoshidomi Y., Hiyoshi M., Harada H., and Okada S. .	Erythroblasts highly express the ABC transporter Bcrpl/ABCG2 but do not show the side population (SP) phenotype .	Immunol Lett.	114	52-58	2007
Harada H., Murakami T., Tea SS., Takeuchi A., Koga T., .Okada S., Suico MA., Shuto T., and Kai H.	Heat shock suppresses human NK cell cytotoxicity via regulation of perform.	Int. J. Hyperthermia	23	657-665	2007
Hiyoshi M., Suzu S., Yoshidomi Y., Hassan R., Harada H., Sakashita N., Akari H., Motoyoshi K., and Okada S.	Interaction between Hck and HIV-1 Nef negatively regulates cell surface expression of M-CSF receptor.	Blood	111	52-58	2008

Qi X., Koya Y., Saitoh T., Saitoh Y., Shimizu S., Ohba K., Yamamoto N., Yamaoka S., and Yamamoto N.	Efficient induction of HIV-1 replication in latently infected cells through contact with CD4 (+) T cells.	Virology	361	325-334	2007
---	---	----------	-----	---------	------

Ujike M., Nishikawa H., Otaka A., Yamamoto N., Yamamoto N., Matsuoka M., Kodama E., Fujii N., and Taguchi F.	Heptad repeat-derived peptides block the protease-mediated direct entry from cell surface of SARS coronavirus but not entry via endosomal pathway.	J. Virol.	82	588-592	2008
---	--	-----------	----	---------	------

## 研究成果の刊行物・別刷