

200727002B

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17年度～19年度 総合研究報告書

主任研究者 高久 洋

平成20(2008)年 4月

目 次

I. 総合研究報告書	
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	
(資料)	
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	
岡田 誠治	
(資料)	
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	
黒崎 直子	
(資料)	
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	
橋本 香保子	
(資料)	
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	
山本 典生	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	19
III. 研究成果の刊行物・別刷	27

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。また、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。第二世代 RNAi ベクターが、ウイルスライフサイクル上の作用点を明らかにした。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) (平成19年より参画)
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医歯学総合研究科・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。

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。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⁺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⁺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、ウェ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。

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、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。

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。

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れた後で、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、これは通常の診療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

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。

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。

一方、pppG(n=2)-shRNA での IFN- β の抑制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 からの認識が回避でき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着生は認められたが、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

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。

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間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ており、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）

特願 2005-021960、副作用のない RNAi 医薬、2005. 1. 28.
 特願 2005-151602、RNAi 耐性ウイルス株を克服する新手法、2005. 2. 25.
 特願 2005-333406、核酸増幅方法、2005. 11. 17.
 特願 2005-145625、核酸増幅方法、2005. 5. 18
 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) 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).
- 5) 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).
- 6) Abe T., Hemmi 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).
- 7) Nagawa T., Habu Y., Matsumoto N., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H. (2006) 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.
- 8) Ikeda M., Habu Y., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H. (2006) Suppression of HIV-1 replication by a combination of endonucleolytic ribozymes (RNase P and tRNase ZL). *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids.*, 25, 427-437.
- 9) Kitajima M., Hamazaki H., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H. (2006) Characterization of baculovirus *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus infection in mammalian cells. *Biochem.Biophys.Res. Comm.*, 343, 378-384.
- 10) Hamazaki H., Ujino S., Miyano-Kurosaki N., Shimotohno K., and Takaku H. (2006) Inhibition of hepatitis C virus RNA replication by short hairpin RNA synthesized by T7 RNA polymerase in hepatitis C virus subgenomic replicons. *Biochem.Biophys.Res. Comm.*, 343, 988-994.
- 11) Hamazaki H., Takahashi H., Miyano-Kurosaki N., Shimotohno K., and Takaku H. (2006) Inhibition of HCV replication in HCV replicon by siRNAs. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids.* 25, 801-805.
- 12) Hayafune M., Miyano-Kurosaki N., Park W.S., and Takaku H. (2006) Silencing of HIV-1 gene expression by siRNAs in transduced cells. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids.* 25, 795-799.
- 13) Hayafune M., Miyano-Kurosaki N., Park W.S., Moori T., and Takaku H. (2006) Silencing of HIV-1 gene expression by two types of siRNA expression systems. *Antiviral Chem.Chemother.*, 17, 241-249.
- 14) Kaneko H., Suzuki H., Abe T., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H. (2006) Inhibition of HIV-1 replication by vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein pseudotyped baculovirus vector-transduced ribozyme in mammalian cells. *Biochem.Biophys.Res. Comm.*, 349, 1220-1227.
- 15) Hayafune M., Miyano-Kurosaki N., Kusunoki A., Mouri Y., and Takaku H. (2006) HIV gene therapy using RNA virus systems. *Nucleic Acids Res. Symp.Ser.*, 50, 79-80.

- 16) 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**, 241-249.
- 17) 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**, 815-820.
- 18) 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 californica multiple nuclear polyhedrosis virus. *Molecular Therapy*, **16**, 261-268.
- 19) 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*, **36**, e18.
- 20) Noguchi K., Ishitu Y., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H. (2007) Expression of shRNA using intron splicing. *Nucleic Acids Symp.Ser.*, **51**, 409-410.
- 21) Kato K., Habu Y., and Takaku H. (2007) Non-sequence specific RNA inhibition of HIV-1 replication. *Nucleic Acids Symp.Ser.*, **51**, 411-412.
- 22) 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.* **15**, 376-378.
- 23) 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.
- 24) Someya T, Hosono K, Morimura K, Takaku H, and Kawai G. (2008) Recognition of a Bulged RNA by Peptides Derived from the Influenza NS1 Protein. *J Biochem.* **143**, 339-347.

学会発表
国際会議

- 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)
- 4) Abe T., Takahashi H., Miyano-Kurosaki N., Matsuura Y., and Takaku H. Baculovirus (CpG motifs) induces an innate immune response and confers protection from lethal influenza virus A and B infection in mice. The Second International Conference on Influenza Vaccines for the World, Vienna, Austria (2006.10)
- 5) Kitajima M., Abe T., Miyano-Kurosaki N., Hashimoto K., Nakayama T., and Takaku H. : Induction of Innate immunity by Baculovirus. 2006 ISCGT Japan, Chiba Japan (2006.10)
- 6) Gondai T., Miyano-Kurosaki N., Hashimoto K., and Takaku H.: Lack of interferon(IFN) Response to T7 Transcribed pppG(n)(n=2-3)-shRNA. XVII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Bern, Switzerland (2006.9)
- 7) Suzuki H., Kaneko H., Tamai N., Miyano-Kurosaki N., Shimotohno K., and Takaku H.: Short Hairpin siRNA Constructs Targeted to the HCV Core Protein Confer HCV RNA Suppression. XVII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Bern, Switzerland (2006.9)
- 8) Habu Y., Miyano-Kurosaki N., Ikeda M., and Takaku H.: Inhibition of HIV-1 Replication by a Combination of RNaseP and 3'tRNase-associated External Guide Sequences (EGSs) in Mammalian Cells. XVII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Bern, Switzerland (2006.9)
- 9) Hamazaki H., Ujino S., Miyano-Kurosaki N., Shimotohno K., and Takaku H.: Inhibition of Hepatitis C virus RNA Replication by Short Hairpin RNA Synthesized T7 RNA Polymerase in Hepatitis C virus Subgenomic Replicons. XVII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Bern, Switzerland (2006.9)
- 10) Suzuki H., Kaneko H., Tamai N., Miyano-Kurosaki N., Shimotohno K., and Takaku H.: Suppression of HCV RNA replication by baculovirus-mediated shRNA expression vectors. 13th International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses, Cairns, Australia (2006.8)
- 11) Ujino S., Hamazaki H., Miyano-Kurosaki N., Hashimoto K., Shimotohno K., and Takaku H.: 17-AAG, an Hsp90 inhibitor, affects hepatitis C virus (HCV) protein suppression. 13th International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses, Cairns, Australia (2006.8)
- 12) Gondai T., Yamaguchi K., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H.: Non-interferon(IFN) induction by shRNA synthesized by phage polymerase. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Kyoto, Japan (2006.6)
- 13) Ujino S., Hamazaki H., Miyano-Kurosaki N., Hashimoto K., and Takaku H.: 17-AAG, an Hsp90 inhibitor, affects hepatitis C virus (HCV) protein suppression. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Kyoto, Japan (2006.6)
- 14) Kitajima M., Abe T., Miyano-Kurosaki N., Hashimoto K., Nakayama T., and Takaku H.: Induction of anti-tumor immunity by the baculovirus Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Kyoto, Japan (2006.6)
- 15) Habu Y., Barnor J., Yamamoto N., Hashimoto K., Miyano-Kurosaki N., Ishikawa K., Yamamoto N., Ofori-Adjei

D., and Takaku H.: The second Generation RNAi Drug Agent Which Deals with RNAi Escape HIV-1 Variants. 19th International Conference on Antiviral Research, Puerto Rico, USA (2006.5)

16) Saitoh H., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H.: Inhibition of Influenza Virus A and B Production by RNA Interference. 19th International Conference on Antiviral Research, Puerto Rico, USA (2006.5)

17) Takaku H., Abe T., Takahashi H., and Miyano-Kurosaki N.: Baculovirus (CpG Motifs) Induces an Innate Immune Response and Confers Protection From Lethal Influenza Virus A and B Infection in Mice. 19th International Conference on Antiviral Research, Puerto Rico, USA (2006.5)

18) 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)

19) 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. 1st Vaccine Congress, Amsterdam, Netherlands (2007.12)

20) 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. 14th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, Glasgow, UK (2007.9)

21) 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, 10th Annual Meeting, Seattle, USA (2007.5).

21) 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. 20th International Conference on Antiviral Research. California, USA (2006.4-5).

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。

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イ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。一方、単球系における decoy-TAR RNA と shRNA-Vif の効果と耐性ウイルスの出現を *in vitro* で確認する系として、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。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 耐性ウイ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、これは通常の診療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、毎日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 Neur* 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)

- 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^{dim}CD16⁻ 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。また、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。さらに、第二世代 RNAi ベクターシステムとして HIV-1 non-coding 領域(DIS)に対する shRNA 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。そして、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

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。

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。

HIV-1 non-coding 領域(DIS)を標的とした shRNA を発現するレンチウイルスベクター (CS-U6-DIS, CS-U6-vif, CS-U6-lacZ) を作製し、それぞれを Sup T1 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_{NL4-3} を moi=0.1 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 shRNA 標的部位の配列を解析

し、shRNA 耐性株の出現についても同時に検討した。

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_{NL4-3} 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 14 日目まで高いウイルス産生阻害効果を示していたが、21 日目から培養上清中のウイルス量が増加しはじめ、49 日目では抗ウイルス活性は失われた。それに対して、DIS-shRNA の stable 細胞株では 90 日目においても強い抗ウイルス活性がみられた。

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-shRNA は 21 日目から HIV-1 標的配列の変異が出現しはじめ、35 日目には標的配列外の遺伝子配列にも変異や欠損がみられた。それに対して、DIS-shRNA は 49 日目でも変異ウイルスの出現はみられなかった。

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

さらに、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

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。一方、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 の組み合わせが不可能になった。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) 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).
- 5) 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).
- 6) Abe T., Hemmi 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).
- 7) Miyano-Kurosaki N., Kurosaki K., Takaku H., Hayafune M., Endo T., A. Tomoda A. (2006) 2-Aminophenoxazine-3-one suppresses the growth of mouse malignant melanoma B16 cells transplanted into C57/Bl6Cr Slc mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 29, 2197-2201.
- 8) Ikeda M., Habu Y., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H. (2006) Suppression of HIV-1 replication by a combination of endonucleolytic ribozymes (RNase P and tRNase ZL). *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 25, 427-437.
- 9) Hayafune M., Miyano-Kurosaki N., Park W.S., and Takaku H. (2006) Silencing of HIV-1 gene expression by siRNAs in transduced cells. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 25, 795-799.
- 10) Hayafune M., Miyano-Kurosaki N., Park W.S., Moori T., and Takaku H. (2006) Silencing of HIV-1 gene expression by two types of siRNA expression systems. *Antiviral Chem.Chemother.*, 17, 241-249.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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*, 16, 261-268.
- 14) 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.
- 15) 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) 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)
 - 4) Gondai T., Miyano-Kurosaki N., Hashimoto K., and Takaku H.: Lack of interferon(IFN) Response to T7 Transcribed pppG(n)(n=2-3)-shRNA. XVII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Bern, Switzerland (2006.9)
 - 5) Habu Y., Miyano-Kurosaki N., Ikeda M., and Takaku H.: Inhibition of HIV-1 Replication by a Combination of RNaseP and 3'tRNase-associated External Guide Sequences (EGSs) in Mammalian Cells. XVII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Bern, Switzerland (2006.9)
 - 6)Gondai T., Yamaguchi K., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H.: Non-interferon(IFN) induction by shRNA synthesized by phage polymerase. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Kyoto, Japan (2006.6)
 - 7)Habu Y., Barnor J., Yamamoto N., Hashimoto K., Miyano-Kurosaki N., Ishikawa K., Yamamoto N., Ofori-Adjei D., and Takaku H.: The second Generation RNAi Drug Agent Which Deals with RNAi Escape HIV-1 Variants. 19th International Conference on Antiviral Research, Puerto Rico, USA (2006.5)
 - 8)Barnor J.S., Miyano-Kurosaki N., Takaku H. Development of novel second-generation anti-HIV shRNAs for HIV gene therapy application. HIV DART 2006, Cancun, Mexico (2006.12)
 - 9)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, 10th Annual Meeting, Seattle, USA (2007.5).
 - 10) 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. 20th International Conference on Antiviral Research. California, USA (2006.4-5).

d

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 の抑制メカニズムを明らかにする。

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+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。

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), 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+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+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

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。

pppG(n)-shLuc3 (n=1, 1, 2, 3) を HeLa CD4+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- 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、G 残基数を 2 として 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、配列特異的な遺伝子発現を抑制することが示唆された。そして 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。

F. 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) 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-proteasome 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)
- 3) Hasegawa A., Miki T., Hosokawa H., Hossain MB., Shimizu C., Hashimoto K., Kimura MY., Yamashita M., Nakayama T.(2006) Impaired GATA3-dependent chromatin remodeling and Th2 cell differentiation leading to attenuated allergic airway inflammation in aging mice. *J Immunol.* **176**, 2546-2554.
- 4) 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.
- 5) 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) Gondai T., Miyano-Kurosaki N., Hashimoto K., and Takaku H.: Lack of interferon(IFN) Response to T7 Transcribed pppG(n)(n=2-3)-shRNA. XVII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Bern, Switzerland (2006.9)
- 2) Kitajima M., Abe T., Miyano-Kurosaki N., Hashimoto K., Nakayama T., and Takaku H.: Induction of anti-tumor immunity by the baculovirus Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Kyoto, Japan (2006.6)
- 3) Hayafune M., Mouri Y., Miyano-Kurosaki N., Hashimoto K., and Takaku H.: Human immunodeficiency virus type 1 does not escape from novel single-stranded DNase expression-mediated inhibition. 20th International Conference on Antiviral Research. California, USA (2006.4-5).

国内

- 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：第35回日本免疫学会，横浜（2005.12）学会，横浜（2005.11）
- 4) 酒井亮、宮武克年、篠原可奈、山本紘士、斎藤諒、宮澤悠樹、黒崎直子、高久洋、中山俊憲、板倉光夫、橋本香保子：抗原タンパク質提示に関与する分泌小胞輸送分子複合体の解析。第36回日本免疫学会 大阪（2006.12）
- 5) 鈴木友幸、橋本香保子、鈴木等、酒井亮、斎藤諒、宮澤悠樹、黒崎直子、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36回日本免疫学会 大阪（2006.12）
- 6) 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）。
- 7) 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）。
- 8) 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、sh-vif と TAR decoy を組み合わせた第二世代 RNAi ベクター(CS-vif/TAR)の薬剤耐性 HIV-1 に対する抗ウイルス効果の評価と、保存性の高い配列を標的とする第二世代 RNAi ベクターの構築と抗ウイルス効果の評価を行った。CS-vif/TAR については、薬剤耐性 HIV-1 にも有効であることが明らかとなった。CS-vif/TAR の作用点を調べるために特異性の高い定量 PCR 法を確立し解析を行ったところ、作用点はウイルスライフサイクルにおける前期と後期にあり、前期と後期の中でも後期が主な作用点であることが明らかとなった。また保存性の高い配列を標的とする第二世代 RNAi ベクターについても有効性が確認された。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

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、特異性の高い新規 real-time nested PCR 法を開発し、シングルラウンドインフェクション系を用いて評価した。

また、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った。

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。

A. 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 をバックボーンとして持ち、なおかつ

薬剤耐性変異を持ったクローン)をそれぞれ感染させ、p24 を測定した。薬剤耐性 HIV-1 としては、nRTI(nucleoside and nucleotide reverse transcriptase inhibitor)耐性ウイルスとして M41L(AZT, d4T 耐性)、K65R(d4T, ddI, ddC, abacavir, tenofovir 耐性)、T215Y(AZT, d4T 耐性)を用い、PI(protease inhibitor)耐性ウイルスとして D30N(nelfinavir 耐性)、G48V(saquinavir 耐性)、L90M(indinavir, ritonavir, saquinavir, nelfinavir, amprenavir, atazanavir 耐性)を用いた。

次に、env 欠損 VSV-G-pseudotyped NL4-3 (NL4-3 delta env/VSV-G)を用いたシングルラウンドインフェクション系を用いて、第二世代 RNAi ベクターの作用点を real-time PCR 法により解析した。測定には ABI7700 sequence detector system を用いた。

また、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。

(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。

B. 研究結果

CS-vif-TAR は Wild-type HIV-1 と同様、6 種類の薬剤耐性 HIV-1 についてもウイルスの増殖を強く抑制した (約 90%の抑制)。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、real-time PCR 法によってウイルス DNA および RNA の定量を行った。CS-vif-TAR, CS-vif では逆転写されたウイルス DNA の量が半分ほどに減少した。CS-TAR ではライフサイクル前期過程における減少はほとんど認められなかった。RNA については、CS-vif-TAR で最も減少しており、ついで CS-vif, CS-TAR の順であった。

次に、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ので、細胞を増殖させた後に感染実験を行う予定である。

D. 考察

CS-vif-TAR が種々の薬剤耐性 HIV-1 に対して有効であ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。

また、CS-vif-TAR の作用点は、ウイルスライフサイクルにおける前期と後期にあり、前期と後期の中でも後期が主な作用点であることが明らかとなった。前期過程で sh-vif によるウイルス RNA の分解がそれほど効率よく起こらないのは、ウイルス RNA が速やかに逆転写されてしまうからであろう。TAR decoy による転写抑制と sh-vif による RNA 分解の相乗効果によってウイルス複製が強く抑制されていると考えられる。

さらに、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 して培養上精中の 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。

H. 結論

本研究によって TAR-decoy と vif sh RNA を組み合わせた CS-vif-TAR が、多剤耐性変異株を含む薬剤耐性 HIV-1 の増殖を強く抑制すること、および抗ウイルス効果の作用点が主に後期過程にあることが明らかとなった。

また本研究によって、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。

従来行われてきた HAART、そして本研究で見出された CS-vif-TAR, RNAi-1, RNAi-2, RNAi-3, RNAi-6 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)

3 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- α -converting enzyme by the spike protein of SARS-CoV and angiotensin-converting enzyme 2 induces TNF- α 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.
 - 5) Yamamoto T, Miyoshi H, Yamamoto N, Yamamoto N, Inoue J, Tsunetsugu-Yokota Y. Lentivirus vectors expressing short hairpin RNAs against the U3-overlapping region of HIV nef inhibit HIV replication and infectivity in primary macrophages. Blood. 2006 Nov 15;108(10):3305-12.
 - 6) Shigeta S, Mori S, Yamase T, Yamamoto N, Yamamoto N. Anti-RNA virus activity of polyoxometalates. Biomed Pharmacother. 2006 Jun;60(5):211-9.
 - 7) Horiuchi S, Yamamoto N, Dewan MZ, Takahashi Y, Yamashita A, Yoshida T, Nowell MA, Richards PJ, Jones SA, Yamamoto N. Human T-cell leukemia virus type-I Tax induces expression of interleukin-6 receptor (IL-6R): Shedding of soluble IL-6R and activation of STAT3 signaling. Int J Cancer. 2006 Mar 23
 - 8) Yamamoto N, Tanaka C, Wu Y, Chang MO, 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. Virus Genes. 2006 Feb;32(1):105-13
 - 9) 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-kappa B Activation, ABIN-1 Hybridoma. 2005 Oct.
 - 10) 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. 2005 Jul;7(9-10):1150-60.

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.
- 2) 山本典生、山本直樹
NAF-1 による HIV-1 複製抑制メカニズムの解析
第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会 2006 年 12 月 3 日
- 3) 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 2005 年 12 月 3 日

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 in terference.	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 in terference.	Miyano-Kurosaki N., Takaku H.	Handbook of Experimental Pharmacology	<i>Springer</i>	<i>Berlin, Germany</i>	2005	pp151-171