

201030044A

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

アデノウイルスベクターを利用した C 型肝炎治療薬創製基盤技術の

開発に関する研究

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 櫻井 文教

平成 23 年 (2011 年) 5 月

目 次

I. 総括研究報告

アデノウイルスベクターを利用した C 型肝炎治療薬創製基盤技術の開発
(マイクロ RNA をノックダウン可能なアデノウイルス (Ad) ベクターおよび
高効率に RNA 干渉を誘導可能な Ad ベクターの開発) ----- 1
櫻井 文教

II. 分担研究報告

1. RNA pol I システムの構築 -----11
渡利 彰浩

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

無し

IV. 研究成果の刊行物・別刷

無し

「アデノウイルスベクターを利用した C 型肝炎治療薬創製基盤技術の開発」

総括研究報告書

マイクロ RNA をノックダウン可能なアデノウイルス（Ad）ベクターおよび

高効率に RNA 干渉を誘導可能な Ad ベクターの開発

主任研究者 櫻井 文教

大阪大学大学院薬学研究科 准教授

研究要旨

C型肝炎ウイルス（HCV）は、約 9.6kb のプラス鎖 RNA をゲノムに持つ RNA ウイルスである。HCV のキャリアは、全世界で 2 億人、国内では 200 万人にものぼり、HCV 感染患者は高い割合で慢性肝炎を引き起こし、肝硬変、肝癌へと進展する。現在、HCV に対する主な治療法は、ウイルスの複製を阻害するペグインターフェロン・リバビリン（ヌクレオチドアナログ）の併用療法が用いられているが、遺伝子型 1b の高ウイルス量症例では奏効率が 50%にとどまっており、C型肝炎克服に向けて新たな作用点をもつ C型肝炎治療薬の創製が必要不可欠となっている。

現在、C型肝炎治療薬の作用点として、肝臓特異的マイクロ RNA である miR-122a に大きな注目を集めている。miR-122a は、HCV ゲノムに作用することにより、HCV ゲノムの高効率な複製および翻訳を誘導する。そこで我々は、肝細胞における miR-122a を高効率に抑制することを目的に、miR-122a に対するタフデコイ RNA 発現アデノウイルス（Ad）ベクター（Ad-TuD-122aT）を作製した。レポーター遺伝子アッセイの結果、Ad-TuD-122aT は高効率に miR-122a を阻害可能であることが示された。

また他の C型肝炎治療薬の作用点として、HCV 感染受容体に注目されている。これまで HCV 感染受容体としては、CD81、Claudin-1、SR-BI、Occludin などが報告されているが、これまで HCV 感染受容体を *in vivo* において高効率に抑制可能な実験ツールが存在しなかったために、これら感染受容体の機能について十分に解析されていない。そこでまず本研究では、*in vivo* において高効率に RNA 干渉を誘導可能な Ad ベクターの開発に取り組んだ。まず、Ad ベクターゲノムの E1 遺伝子欠損領域にルシフェラーゼに対する short-hairpin RNA (shRNA) 発現カセットを挿入するとともに、E3 遺伝子欠損領域には RNA 干渉に関与するタンパク質（Argonaute 2 (Ago2)、Exportin-5、TAR RNA binding protein (TRBP)）遺伝子の発現カセットを挿入した。各種 shRNA 発現 Ad ベクターをルシフェラーゼ安定発現細胞に作用させ、ノックダウン効率を検討したところ、Ago2 を発現する shRNA 発現 Ad ベクターにおいて、他の shRNA 発現 Ad ベクターよりも優れたノックダウン効率を示した。今後は、HCV 感染受容体に対する shRNA 発現 Ad ベクターを作製し、ノックダウン効率を検討する予定である。

分担研究者

渡利 彰浩 大阪大学大学院薬学研究科
助教

協力研究者

水口 裕之 大阪大学大学院薬学研究科
教授

形山 和史 大阪大学大学院薬学研究科
助教

岡本小百合 大阪大学大学院薬学研究科
非常勤職員

小野かおり 大阪大学大学院薬学研究科
大学院生

古川 智久 独立行政法人医薬基盤研究所
特任研究員

樋口麻衣子 独立行政法人医薬基盤研究所
特任研究員

八木 清仁 大阪大学大学院薬学研究科
教授

近藤 昌夫 大阪大学大学院薬学研究科
准教授

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)は、約 9.6kb のプラス鎖 RNA をゲノムに持つ RNA ウイルスである。現在、世界には約 2 億人、本邦では 200 万人もの HCV 感染患者がおり、世界では年間 200~300 万人ずつ感染者が増加している。インターフェロン療法の進展に伴い C型肝炎の根治率は向上しているものの、依然として難治性 1b 型高ウイルス量患者に対しては奏効率が 50%にすぎず、C型肝炎克服に向けた新たな作用点を有する抗 HCV 薬の創製が急務となっている。

近年、新たな C型肝炎治療薬として、肝臓特異的 miRNA である miR-122a が高い注目を集めている。HCV ゲノムは、5' 非翻訳領域に miR-122a と相補的な配列を有する領域があり、恐らくこの領域に miR-122a が相互作用することにより、HCV ゲノムの複製および翻訳の促進を誘導しているものと考えられている。これまでに、HCV に感染したチンパンジー

に対し、miR-122a に対するアンチセンスオリゴ (Locked Nucleic Acid; LNA)を投与することにより、血清中 HCV ゲノム量を劇的に抑制されることが報告されている。しかし、アンチセンスオリゴをそのまま静脈内投与した場合、投与量のほとんどは腎臓に集積し、速やかな尿中排泄を受けてしまい、HCV の感染組織である肝臓に効率良くアンチセンスオリゴを送達可能な技術は未だ十分に確立していない。

一方で、Ad ベクターは従来より肝臓に高い親和性を有し、静脈内投与後投与量の 90%以上は肝臓に集積することが報告されている。従って、Ad ベクターを用いて高効率に miR-122a をノックダウン可能になれば、優れた抗 HCV 薬になるとともに、HCV 感染における miR-122a の機能解析に向けた優れた実験ツールになるものと期待される。Ad ベクターを用いて miRNA をノックダウンする手法としては、miRNA スポンジなどが報告されているが、近年、タフデコイ RNA (TuD-RNA)が開発された。TuD-RNA は、二つの miRNA binding domain (MBS)と二つの stem 構造から構成されている (Fig.1)。miRNA は MBS に強力に結合することにより、miRNA を阻害すると考えられる。これまでの報告より、TuD-RNA はアンチセンスオリゴである LNA や miRNA スポンジよりも強力に miRNA をノックダウンすることが示されている。そこで本研究では、miR-122a に対する TuD-RNA (TuD-122aT)を発現する Ad ベクター (Ad-TuD-122aT)を作製するとともに、その miR-122a のノックダウン効果について検討した。

また、抗 HCV 薬の新たな作用点として、HCV 感染受容体が報告されている。HCV 感染受容体としてはこれまでに、CD81、Occludin、Claudin-1、SR-BIなど報告されている。しかしながら、これら HCV 感染受容体の中で、どの分子が HCV 感染に重要なのか不明な点は多い。特に in vivo において各受容体の HCV 感染における役割を解析した報告はほとんどない。これは特に in vivo において、高効率な RNA 干渉を誘導可能な実験ツールが存在しないことが原因と考えられる。これら HCV 感染受容体の HCV 感染における役割が明らかになれば、HCV 感染受容体を作用点とする新規抗 HCV 薬の開発に向けて重要な指針を与

えるとともに、高効率に HCV 感染受容体をノックダウン可能なベクターは、C 型肝炎治療薬としても有望であると考えられる。

そこで我々は Ad ベクターに着目した。上述のように、Ad ベクターは肝臓に対し高い親和性を有していることから、HCV 感染受容体に対する shRNA を肝臓特異的に効率良く発現させることに適していると考えられる。しかし、高効率なノックダウンには多量の Ad ベクターが必要であり、Ad ベクターによる障害が誘導される危険性がある。従って、高効率に RNA 干渉を誘導可能な Ad ベクターの開発が必要不可欠である。そこで我々は、RNA 干渉に関与する Argonaute 2 (Ago2) ならびに Exportin-5 に着目した。Ago2 は、siRNA とともに RNA-induced silencing complex (RISC) を形成し、標的 mRNA を切断する。一方、Exportin-5 は核内で転写された shRNA を核外に輸送する。すなわち、shRNA とともにこれらの分子を過剰発現されてやれば、ノックダウン効率の向上が期待できると考えた。そこで本研究では、E1 遺伝子欠損領域に、shRNA 発現カセットを、E3 欠損領域に Ago2、Exportin-5、もしくは TRBP 発現カセットを挿入した Ad ベクターを開発し、ノックダウン効率を検討した。

B. 研究方法

1. タフデコイ発現 Ad ベクターの開発

タフデコイ RNA (TuD-RNA) 発現カセットは、以下のように作製した。まず TuD-RNA の前半部分をコードした合成オリゴ DNA (FP-TuD-BsmBI および RP-TuD-BsmBI) をアニーリングさせたのち、pHM5-hU6b の SwaI/XbaI site に挿入した。次に、作製したプラスミドを HindIII/XbaI で消化したのち、pBluescript II SK+ (Stratagene 社より購入) の HindIII/XbaI site に挿入し、pBS-hU6b-TuD-BsmBI を作製した。pBS-hU6b-TuD-BsmBI を BsmBI で消化したのち、TuD-RNA の後半部分をコードした合成オリゴ DNA をライゲーションすることにより、pBS-hU6b-TuD-NC (コントロール TuD-RNA 発現プラスミド) および pBS-hU6b-TuD-122aT (miR-122a に対する TuD-RNA 発現プラスミド) を作製した。さらに上

記プラスミドを SphI/XbaI で消化したのち、pHM5 の SphI/XbaI に挿入することにより、pHM5-hU6b-TuD-NC および pHM5-hU6b-TuD-122aT を作製した。なお用いた合成オリゴ DNA の配列を Table 1 に示す。

次に、TuD-RNA 発現 Ad ベクターの作製を試みた。なお、本 Ad ベクターにおいては、遺伝子発現効率を評価することを目的に、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 発現カセットも同時に搭載することにした。GFP 発現カセットを搭載するためには、GFP 発現カセットを含むプラスミド pHM11-GFP を ClaI で処理したのち、同じく ClaI で処理した pAdHM20 とライゲーションすることで、E3 欠損領域に GFP 発現カセットを挿入した (pAdHM20-GFP)。次に、E1 遺伝子欠損領域に TuD-RNA 発現カセットを挿入するために、pHM5-hU6b-TuD-NC および pHM5-hU6b-TuD-122aT を PI-SceI/I-CeuI で消化したのち、同じく PI-SceI/I-CeuI で消化した pAdHM20-GFP をライゲーションすることにより、Ad ベクタープラスミド pAdHM20-TuD-NC-GFP および pAdHM20-TuD-122aT-GFP を作製した (Fig.2)。

次に、Ad ベクターを調製するために、上記 Ad ベクタープラスミドを PacI で消化したのち、市販の遺伝子導入試薬を用いて 293 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションより 10-14 日後、細胞変性死が観察されたところで細胞を回収し、凍結融解を 3 回行い、細胞内に含まれる Ad ベクターを回収した。さらに多くの細胞に Ad ベクターを作用させることを繰り返すことで Ad ベクターを増幅させるとともに、CsCl を用いた超遠心法および透析により Ad ベクターを精製・回収した。Ad ベクターの物理化学的タイターについては、Maizel らの方法に従い、測定した。生物学的タイターについては、Adeno-X rapid titer kit (Invitrogen 社より購入) を用いて測定した。

また、作製した Ad ベクターの Huh7 細胞への遺伝子導入効率を検討するため、Huh7 細胞に各 MOI でウイルスを 1.5 時間作用させた。計 48 時間培養後、GFP 発現レベルを Flowcytometry にて解析した。

2. タフデコイ発現 Ad ベクターによる miR-122a ノックダウンに関する検討

miR-122a の標的配列 (miR-122a の完全相補配列) を 3' 非翻訳領域に挿入したレポーター遺伝子発現プラスミドは、以下の手法により作製した。miR-122a の標的配列を 2 コピーコードした合成オリゴ DNA を psiCheck2 (Promega 社より購入) の NotI/XhoI サイトに挿入し、psiCheck-122a を作製した。

次に、TuD-RNA による miR-122a のノックダウン効率について、以下の手法により検討した。miR-122a を高発現する Huh7 細胞を 3×10^4 cell/well で 24Well プレートに播種した。翌日、TuD-RNA 発現 Ad ベクターを Multiplicity of Infection (MOI) 25 および 100 で 1.5 時間作用させた。Ad ベクター作用より 24 時間後、psiCheck-122a および miR-122a の標的配列を含まないコントロールプラスミド psiCheck-2 を Lipofectamine2000 (Invitrogen 社より購入) を用いて導入した。上記プラスミドをトランスフェクションして 48 時間後、ウミシイタケおよびホタルルシフェラーゼの活性を測定した。

3. 各種 RNA 干渉関連タンパク質および shRNA 発現 Ad ベクターの作製

ヒト Ago2、Exportin-5、および TRBP 遺伝子のクローニングは、以下の通り行った。HeLa 細胞もしくは 293 細胞より回収した RNA を用いて逆転写反応を行うことにより、cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として、RT-PCR を行うことにより、各遺伝子を回収した。RT-PCR の条件は以下の通りである。用いたプライマーの配列を Table 2 に示す。Ago2 および TRBP 遺伝子に関しては、pcDNA3.1-hygro(+) にクローニングした。その後、Ago2 および TRBP 遺伝子を pcDNA3.1-hygro(+) より切り出し、pHM15-CMV にライゲーションした (pHM15-CMV-Ago2 および pHM15-CMV-TRBP)。Exportin-5 遺伝子については、pHM15-CMV に直接クローニングした (pHM15-CMV-Exp5)。

各種 RNA 干渉関連タンパク質および shRNA 発現 Ad ベクターに関しては、以下のように作製した。まず、

pAdHM23 を XbaI で消化したのち (プラスミドの backbone に XbaI サイト有り)、Klenow で処理することにより XbaI サイトを欠損させた。その後、E3 遺伝子欠損領域に存在する Csp45I サイトを XbaI サイトに変更することにより、pAdHM23XbaI を作製した。pAdHM23XbaI を XbaI で消化したのち、AvrII で消化した pHM15-CMV-Ago2、-Exp5、-TRBP とそれぞれライゲーションすることにより、pAdHM23-Ago2、-Exp5、-TRBP を作製した。さらに作製したプラスミドを、I-CeuI/PI-SceI で消化したのち、同じく I-CeuI/PI-SceI で消化した pHM5-hU6-siL (ホタルルシフェラーゼに対する shRNA 発現プラスミド) とライゲーションすることにより、pAdHM23-siL-Ago2、-Exp5、-TRBP を作製した (Fig.3)。

作製した上記 Ad ベクタープラスミドを、PacI で消化したのち、293 細胞にトランスフェクションすることにより、Ad ベクターを回収した。Ad ベクターの増幅・精製・タイター測定については、上記 1 と同様の方法で行った。

4. 上記 Ad ベクターによる RNA 干渉誘導に関する検討

96well プレートにホタルルシフェラーゼ安定発現 A549 細胞を 1×10^4 cells/well で播種した。翌日、各種 shRNA 発現 Ad ベクターを 1000 vector particle (VP)/cell で 1.5 時間作用させた。Ad ベクター作用より 48 時間後、LT2.0 (東洋インキ社より購入) を用いて、ルシフェラーゼ発現量を測定した。

C. 研究結果

1. タフデコイ RNA 発現 Ad ベクターによる miR-122a ノックダウンに関する検討

まずはじめに、作製した Ad ベクターの Huh7 細胞への遺伝子導入効率について、GFP の発現レベルを指標に評価した。その結果、Ad-GFP-TuD-NC、Ad-GFP-TuD-122aT とともに MOI10 で、それぞれ 23% および 25%、MOI100 でそれぞれ 72% および 60% の GFP 陽性細胞が観察され、高効率な遺伝子導入効率を有することが示された (Fig.4)。

そこで次に、実際に miR-122a に対する TuD-RNA を発現させることで、miR-122a をノックダウン可能か検討した(Fig.5)。Huh7 細胞に、各 Ad ベクターを作用させたのち、miR-122a の標的配列を含まない psiCheck-2 をトランスフェクションした場合には、どの Ad ベクターにおいても相対的なホタルルシフェラーゼ発現量の有意な減少は観察されなかった。それに対し、まず miR-122a の標的配列を挿入したプラスミド psiCheck-122a をトランスフェクションした場合には、コントロールの psiCheck-2 と比較して、相対的ホタルルシフェラーゼ発現量が約 20%に抑制されていた。これは、Huh7 細胞において内在的に高発現している miR-122a による遺伝子発現抑制効果と考えられる。また Ad-GFP-TuD-NC を作用させた群においても、効率良く相対的ホタルルシフェラーゼ発現量は抑制されていた。一方で、Ad-GFP-TuD-122aT 作用群では、MOI25 では約 58%、MOI100 では 79%まで相対的ルシフェラーゼ発現量が回復した。この結果より、Ad ベクターを用いて miR-122a に対する TuD-RNA を発現させることにより、miR-122a を効率良く抑制可能であることが示された。

2. 各種 RNA 干渉関連タンパク質および shRNA 発現 Ad ベクターによる高効率な RNA 干渉誘導に関する検討

siRNA および shRNA は、効率良く標的遺伝子の発現を抑制可能であることから、次世代の分子標的薬として期待されるとともに、現在では遺伝子機能解析のツールとしてなくてはならない存在となっている。そこで本研究では、shRNA 発現 Ad ベクターを用いて、HCV 感染受容体を効率良く抑制することを目的に、まず高効率に RNA 干渉を誘導可能な Ad ベクターを開発することを試みた。shRNA による RNA 干渉においては、まず核内において shRNA が転写されたのち、Exportin-5 を介して細胞質に輸送される。細胞質に輸送された shRNA は、細胞質内で Dicer で分解を受けたのち、Ago2 とともに RNA-induced silencing complex (RISC)を形成する。最終的に、RISC が標的 mRNA に結合することにより、mRNA を分解し遺伝子

発現を抑制する(Fig.6)。従って、shRNA による RNA 干渉の誘導においては、Exportin-5 と Ago2 が極めて重要な Factor であると考えられる。そこで本研究では、shRNA とともに Exportin-5 もしくは Ago2 を発現させることで、さらに効率良く RNA 干渉を誘導することを試みた。また、siRNA のプロセッシングに参与する TRBP 遺伝子を搭載した Ad ベクターも作製した。

そこで、ホタルルシフェラーゼを安定に発現する A549 細胞に対し、作製した Ad ベクターを種々の MOI で作用し、ノックダウン効率を検討した。その結果、従来の shRNA 発現 Ad ベクター(shRNA 以外には発現しない)では、1000 VP/cell で約 46%のノックダウン効率を示した (Fig.7)。それに対し、Ago2 を発現する Ad ベクターでは、60%のノックダウン効率と、従来の shRNA 発現 Ad ベクターと比較し、優れたノックダウン効率を示した。なお、TRBP もしくは Exportin-5 を過剰発現させた場合においては、有意なノックダウン効率の向上は観察されなかった。

D. 考察

1. タフデコイ RNA 発現 Ad ベクターによる miR-122a ノックダウンに関する検討

miR-122a は肝臓特異的な miRNA で、HCV の複製および翻訳を促進することで、HCV 感染に大きな役割を果たしていることが報告されている。これまでに miR-122a に対するアンチセンスオリゴ(LNA)を投与することにより、血中の HCV ゲノム量が大きく減少することが示されている。しかし、LNA 自体は肝臓に対し親和性を有しないことから、投与した LNA の大部分は肝臓に移行せず、尿中排泄を受けているものと予想される。従って、効率良く肝臓の miR-122a をノックダウンするためには、肝臓に対し miR-122a を抑制可能な薬物を送達・発現させる必要がある。そこで本研究では、Ad ベクターを用いて TuD-RNA を肝細胞で発現させることを試みた。

本研究では、TuD-RNA 発現 Ad ベクターを作用させることで、miR-122a の機能(遺伝子発現抑制効果)を抑制することに成功した。TuD-RNA は、その MBS 領域に標的の miRNA を結合させることで、その機能を

抑制すると考えられている。従って、TuD-RNA 自身は miRNA の分解は誘導しない。私どもが、実際に TuD-RNA 発現 Ad ベクターを作用させた細胞より RNA を回収し、定量的 RT-PCR により miR-122a の発現量を検討したところ、有意な抑制は観察されなかった (data not shown)。

上述のように、Ad ベクターは肝臓に高い親和性を有することから、TuD-RNA 発現 Ad ベクターは in vivo 投与後、肝臓において高効率に TuD-RNA を発現し miR-122a を抑制することが期待される。そこで我々は、マウスに TuD-RNA 発現 Ad ベクターを尾静脈内投与し、miR-122a の標的遺伝子 (SLC7A1, Hamp, AldoA) の発現が上昇するかどうか定量的 RT-PCR により検討した。しかしながら、上記標的遺伝子の発現は、ほとんど変化なかった (data not shown)。過去の報告より、miR-122a は SLC7A1 の発現を mRNA レベルではなく、翻訳レベルで抑制することが報告されている。従って、TuD-RNA を発現させ、miR-122a を阻害しても、mRNA レベルでは変化がなかったのかもしれない。

Ad ベクターは従来より in vivo 投与後、炎症性サイトカインや I 型インターフェロンの産生を誘導するなど、自然免疫を活性化することが知られている。これらの自然免疫活性化は組織障害を誘導することから、遺伝子治療研究においては (癌治療を除いて) マイナス面と捉えられることが多い。しかし、C 型肝炎治療においては、これまでもインターフェロンが有効な治療薬として使用されているように、Ad ベクターによる自然免疫活性化はポジティブに働くものと期待される。

2. 各種 RNA 干渉関連タンパク質および shRNA 発現 Ad ベクターによる高効率な RNA 干渉誘導に関する検討

これまでに HCV の感染受容体としては、CD81, Claudin-1, Occludin, SR-BI などが報告されている。これまでに、上記受容体を標的とした HCV 感染阻害薬は報告されておらず、上記受容体は抗 HCV 薬の作用点として期待されている。そこで我々は、RNA 干渉を用いて上記受容体をノックダウンすることにより、

HCV 感染を抑制可能なのではないかと考えた。しかし、恐らく HCV は上記受容体全てを利用して肝細胞に感染しているものと思われる (つまり、複数の感染ルートを紹介している)。従って、感染受容体をノックダウンして HCV 感染を誘導するには、極めて高効率に肝臓においてノックダウンを誘導しなければならない。上述のように Ad ベクターは肝臓に極めて高い親和性を有すること、またこれまでに shRNA 発現カセットを搭載することにより、RNA 干渉を誘導可能であることが報告されている。しかしながら一方で、Ad ベクターゲノムより転写される非コード RNA である VA-RNA が、Ago2 と結合し RISC を形成することから、shRNA と VA-RNA が競合する可能性が指摘されている。また、上記の感染受容体を全て同時にノックダウンしようとした場合、4 種の shRNA を発現させることにより、細胞内の Ago2 もしくは Exportin-5 が不足し、十分なノックダウン効果が得られない可能性がある。そこで本研究では、shRNA だけでなく、Ago2 もしくは Exportin-5 を発現させることにより、さらに高効率なノックダウンを示す Ad ベクターの開発を試みた。

本研究では、Ago2 を過剰発現させることにより、従来の shRNA 発現 Ad ベクターと比較し優れたノックダウン効率が得られた。一方で、TRBP および Exportin-5 を過剰発現させた場合には、ノックダウン効率の向上は得られなかった。この結果より、shRNA 発現 Ad ベクターによる RNA 干渉において、Ago2 の発現量はノックダウン効率を決める重要な要因であると考えられる。米国スタンフォード大学の Kay 教授らのグループもアデノ随伴ウイルスベクターを用いて shRNA を発現させる研究で、Ago2 を発現させることにより、さらに高いノックダウン効率が得られることを報告している。一方で、Exportin-5 の過剰発現によるノックダウン効率の向上は観察されなかった。恐らく shRNA の発現量に対して、十分量の Exportin-5 が発現しているものと予想される。

E. 結論

1. Ad ベクターを用いて miR-122a に対する TuD-RNA を発現させることにより、miR-122a を

高効率に抑制可能であることが示された。

2. shRNA とともに Ago2 を過剰発現させることで、高効率に RNA 干渉を誘導可能であることが示された。

来年度は、上記の本年度開発した基盤技術を用いて、HCV の感染抑制を目指した検討を行う予定である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

該当なし

G-2 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1 特許取得

該当なし

H-2 実用新案登録

該当なし

H-3 その他

該当なし

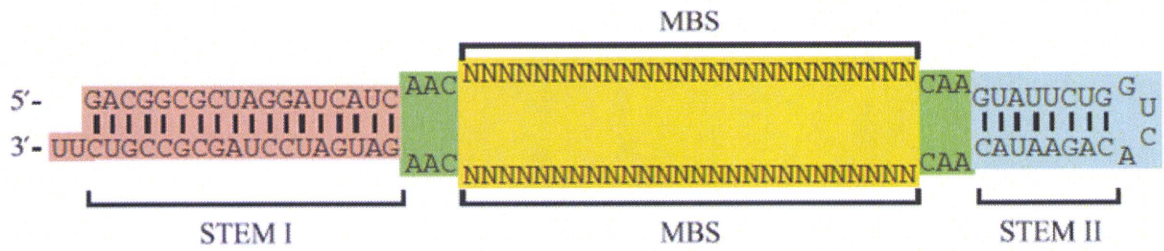


Fig.1 Representative Structure of the TuD-RNA.

MBS; miRNA-binding site.

(Cited from Haraguchi T., et al., Nucleic Acid Res., 37; e43 (2009))

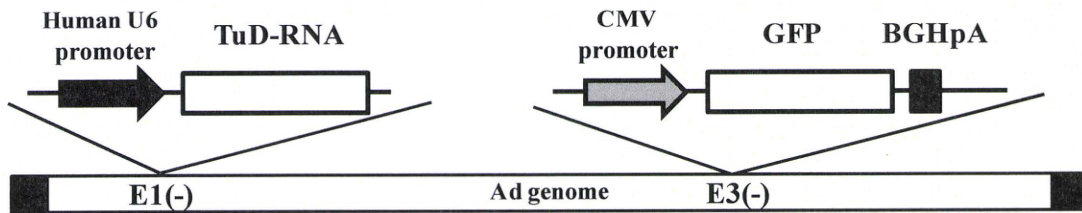


Fig.2 Ad vector genome containing the TuD-RNA expression cassette.

GFP; Green Fluorescence Protein, BGHpA; Bovine Growth Hormone poly A signal.

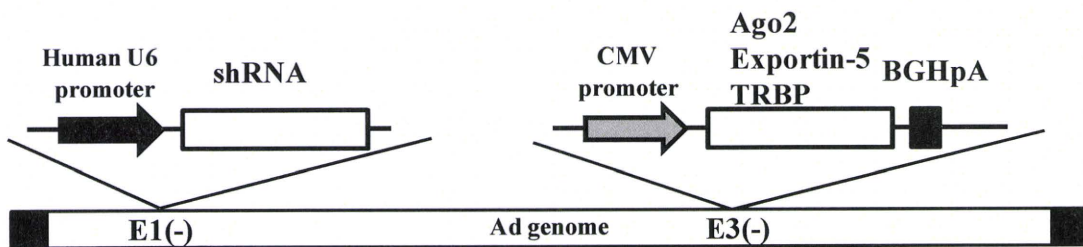


Fig.3 Ad vector genome containing shRNA- and RNAi-related protein Expression cassettes.

Ago; Argonaute.

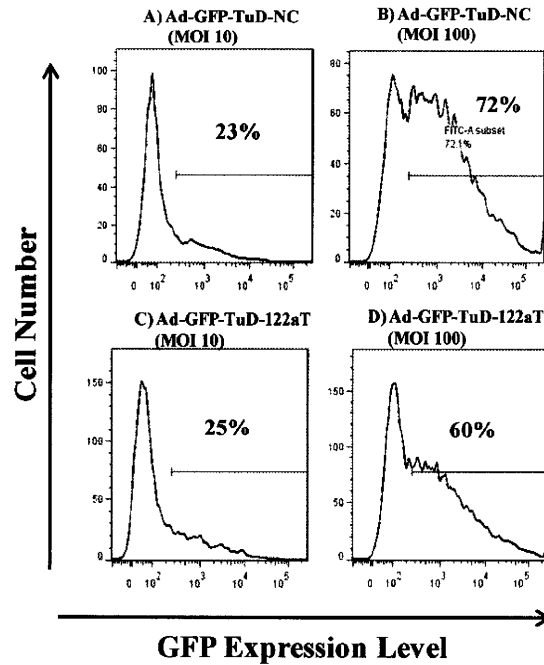


Fig.4 GFP expression levels in Huh7 cells following transduction with the TuD-RNA-expressing Ad vectors.

Huh7 cells were transduced with the TuD-RNA-expressing Ad vectors at the indicated MOIs for 1.5 h. Following a 48 h-incubation, GFP expression levels were examined by flowcytometry.

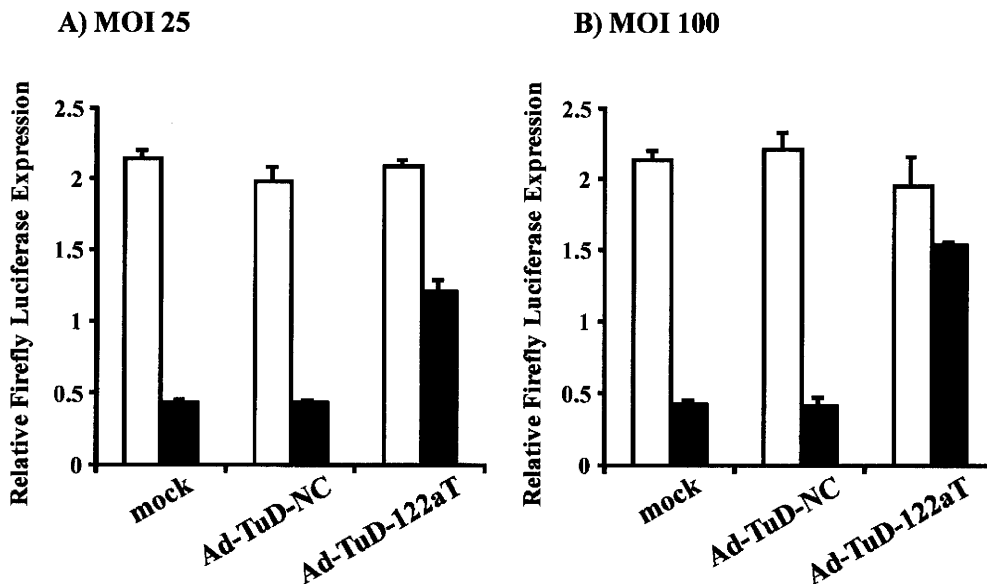


Fig.5 Inhibition of miR-122a in Huh7 cells following transduction with the TuD-RNA-expressing Ad vectors.

Huh7 cells were transduced with the TuD-RNA-expressing Ad vectors at the indicated MOIs for 1.5 h. Following a 24 h-incubation, renilla- and firefly luciferase expression plasmid (psiCheck-2 or psiCheck-122a) was transfected. renilla- and firefly luciferase expression levels were determined 48 h after plasmid transfection. Open bar; psiCheck-2, Closed bar; psiCheck-122a.

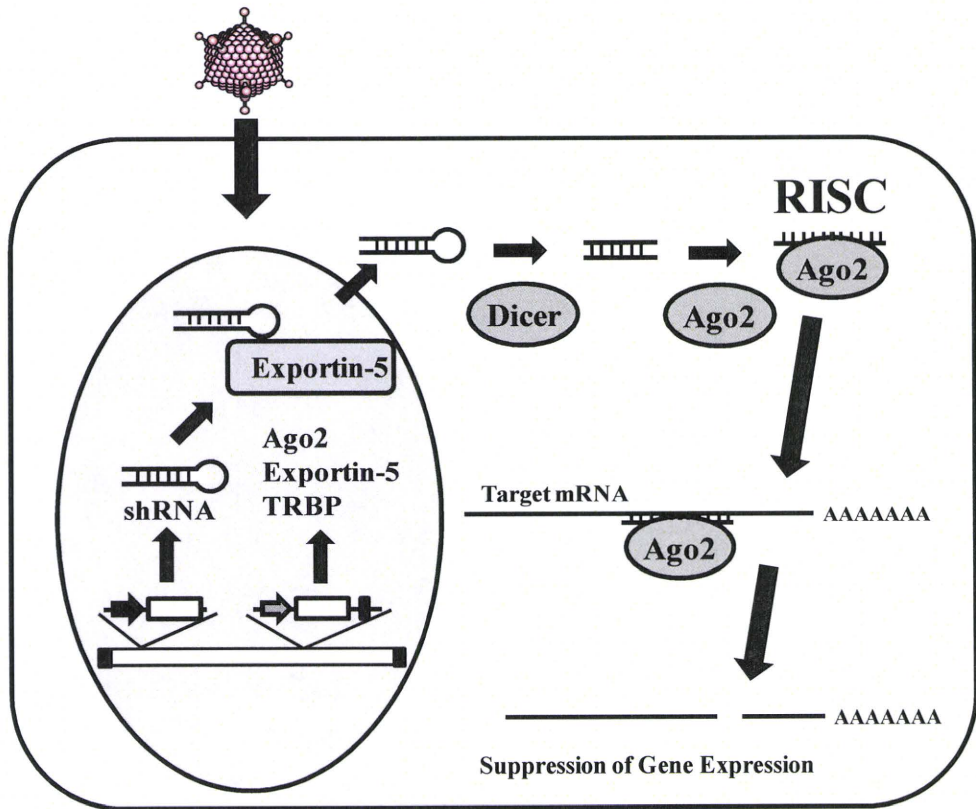


Fig.6 shRNA-mediated RNA interference.

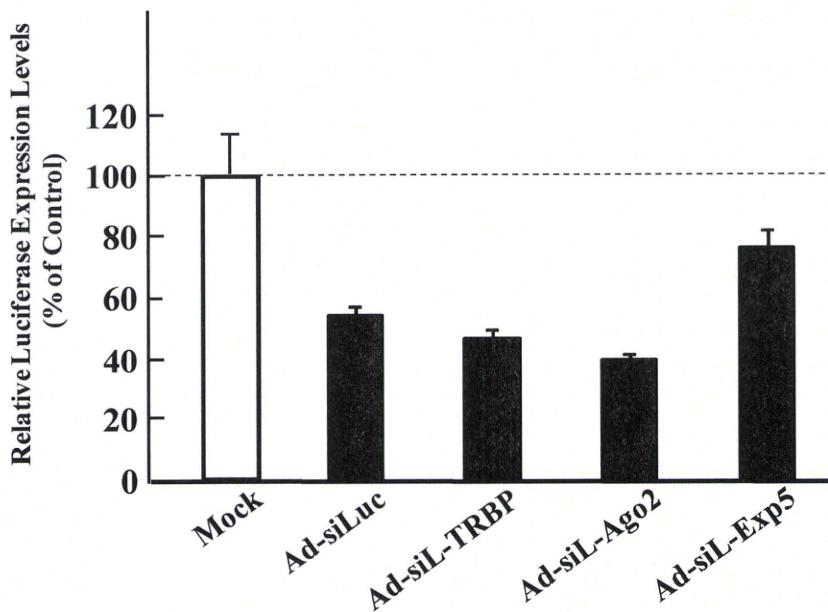


Fig.7 shRNA-mediated knockdown of firefly luciferase expression following transduction with the Ad vectors expressing shRNA and RNAi-related proteins.

Firefly luciferase-expressing A549 cells were transduced with the Ad vectors at 1000 VP/cell. Firefly luciferase expression was determined 48 h after transduction.

RNA pol I システムの構築

分担研究者 渡利彰浩 大阪大学大学院薬学研究科 助教

研究要旨

C型肝炎ウイルス（HCV）のキャリアは、全世界で2億人、国内では200万人にもものぼる。HCV感染患者は高い割合で慢性肝炎を引き起こし、肝硬変、肝癌へと進展する。現在、HCVに対する主な治療法はウイルスの複製を阻害するペグインターフェロン・リバビリンの併用療法が用いられているが、遺伝子型1bの高ウイルス量症例では奏効率が50%にとどまっており、C型肝炎克服に向けて新たな作用点をもつC型肝炎治療薬の創製が必要不可欠となっている。しかしながら、新薬開発のための基盤であるHCV感染評価系の開発は立ち遅れているのが現状である。実際、HCV長鎖RNAゲノム（9.6 kb）を肝臓に効率よく導入する方法が確立されていないため、依然としてHCV感染評価系には患者血清が使用されていることから、簡便なHCV感染評価系の開発がC型肝炎治療薬創製における重要課題となっている。

RNA polymerase I (pol I)発現系は rRNA (13 kb)発現に関与していることから、長鎖であるHCV RNAの発現も可能であると考えられる。そこで本研究では、肝臓への遺伝子導入に優れたアデノウイルス(Ad)ベクターに、長鎖RNA発現系であるRNA pol I発現カセットを組み込んだベクターの開発を試みた。まず、RNA pol I発現系Adベクターの遺伝子発現に関してレポーター遺伝子を用いることにより評価したところ、効率のよい遺伝子発現が可能であった。次に、RNA pol Iプロモーター下にHCVサブゲノムを組み込んだ発現プラスミドベクターの作製に成功し、HCV感染評価系としての有用性も確認した。そこで、RNA pol I発現系Adベクターを用いたHCVサブゲノム発現システムの構築を行ったが、有効なベクターの取得には至らなかった。この問題に対しRNA pol I発現系の発現調節機構の最適化を行い、HCVサブゲノム発現Adベクターを作製可能なプロモーターを開発した。このプロモーターを利用したHCVサブゲノム発現AdベクターではHCVサブゲノムの複製が確認されたことから、Adを用いたHCVサブゲノム発現システムの構築に世界で初めて成功した。

A. 研究目的

現在、世界には約2億人、本邦では200万人ものC型肝炎ウイルス(HCV)感染患者がおり、世界では年間200~300万人ずつ感染者が増加している。インターフェロン療法の進展に伴いC型肝炎の根治率は向上しているものの、依然として難治性1b型高ウイルス量患者に対しては奏効率が50%にすぎず、C型肝炎克服に向けた新たな作用点を有する抗HCV薬の創製が急務となっている。

現在行われているHCV活性評価系として、患者血清をヒト肝臓キメラマウスに投与する方法が用いら

れているが、この方法は汎用性に優れているとはいえない。もし、HCV RNAゲノムを効率よく肝臓に送達できるベクターが存在すれば、汎用性に優れたHCV感染小動物モデルの構築が可能になると考えられる。

RNA polymerase I (pol I) 発現系は rRNA (13 kb) 発現に関与していることから、HCV RNA (9.6 kb) の発現も可能であると考えられる。しかしながら、一般的なタンパク質発現系として汎用されている RNA pol II 発現系や micro RNA などの短鎖 RNA 発現系として利用されている RNA pol III 発現系と比較して、

RNA pol I 発現系ではベクターの開発が立ち遅れているのが現状である。そこで本研究では、肝臓への遺伝子導入に優れたアデノウイルス(Ad)ベクターに、長鎖 RNA 発現系である RNA pol I 発現カセットを搭載したベクターを開発することで、肝細胞に HCV ゲノムを効率良く導入する方法の開発を試みた。まず、RNA pol I 発現系 Ad ベクターを構築した。次に、RNA pol I プロモーター下に HCV サブゲノムを組み込んだプラスミドベクターを作製し、本ベクターの抗 HCV 評価系としての有用性を検討した。続いて Ad ベクターへの応用を試みたが HCV サブゲノム発現 Ad ベクターは作製出来なかった。そのため、RNA pol I 発現系の最適化を行った。

B. 研究方法

1. RNA pol I 発現系 Ad ベクターの開発

長鎖 RNA を肝臓へ効率よく送達することを目的として、RNA pol I 発現系 Ad ベクターの開発を行い、各種肝細胞株への遺伝子導入を検討した。遺伝子発現確認のためレポーター遺伝子として EGFP_{Luciferase} (EGFP 遺伝子と Luciferase 遺伝子の融合遺伝子) を用いた。

(1) 遺伝子組換え

ヒト RNA pol I プロモーターおよびマウス RNA pol I ターミネーターがコードされたプラスミド pHH21 (東京大学、河岡博士より譲渡)由来の RNA pol I 発現カセットを Ad ベクターシャトルプラスミド pHM5 (大阪大学、水口博士より譲渡) に組み込み、さらにヒト RNA pol I プロモーター下にレポーター遺伝子 EGFP_{Luciferase} を搭載した。各プラスミドの遺伝子組換えは以下の方法で行った。pHH21 の RNA Pol I プロモーターの上流に存在する AflIII サイトを切断し、酵素 Klenow fragment を用いて平滑末端化後に DNA 断片 EcoRI linker (TaKaRa)とのライゲーションを行った。ライゲーション産物を制限酵素 EcoRI で切断後、さらに RNA pol I ターミネーターの下流に存在する NheI サイトを切断することにより、RNA pol I 発現カセット DNA フラグメントを作製した。続いて、シャトルプラスミド pHM5 の

マルチクローニングサイト上にある EcoRI サイトおよび NheI サイトを切断し、RNA pol I 発現カセット DNA フラグメントとライゲーションし、ライゲーション産物によりコンピテントセル DH5 α (TOYOBO)をトランスフォーメーションさせた。形成した独立大腸菌クローンを培養し、プラスミド DNA を回収した後、制限酵素解析によりインサートを確認することで pHM5-Pol I を得た。次に、pHM5-Pol I の RNA pol I プロモーター下に存在する KpnI サイトを切断し、マルチクローニングサイト DNA フラグメントをライゲーションした。マルチクローニングサイト DNA フラグメントはセンス鎖 DNA; 5'-GCCATGGGATATCTCTAGAGGATCCGAGCTCGCGGCCGCGTAC-3' およびアンチセンス鎖 DNA; 5'-GCGGCCGCGAGCTCGGATCCTCTAGAGATATCCCATGGCGTAC-3' をハイブリダイゼーションさせたものを用いた。ライゲーション産物によりコンピテントセル DH5 α をトランスフォーメーションさせ、形成した独立大腸菌クローンを培養し、プラスミド DNA を回収した後、シーケンス解析により pHM5-Pol I-MCS を得た。続いて、pCMV-EGFP_{Luc} の EGFP_{Luciferase} 遺伝子の上流と下流の2カ所に存在する NcoI サイトを切断し、EGFP_{Luciferase} DNA フラグメントを作製した。pHM5-Pol I-MCS のマルチクローニングサイト上に存在する NcoI サイトを切断し、EGFP_{Luciferase} DNA フラグメントとライゲーションし、ライゲーション産物によりコンピテントセル DH5 α をトランスフォーメーションさせた。形成した独立大腸菌クローンを培養し、プラスミド DNA を回収した後、制限酵素解析を行うことで、ヒト RNA pol I 下に EGFP_{Luciferase} 遺伝子を配置した DNA カセットを有した Ad ベクターシャトルプラスミドである pP₁WT-EL を得た。

(2) Ad ベクターの作製

RNA pol I 発現カセット搭載 5 型 Ad ベクター Ad-pol I-EGFP_{Luc} は水口博士らが開発した *in vitro* ligation 法により作製した。pP₁WT-EL を制限酵素 I-CeuI および PI-SceI により切断し、I-CeuI および PI-SceI で制限酵素処理した pAdHM4 (5 型 Ad ベクタープラスミド) とライゲーションを行った。親ベクターにのみ存在す

る制限酵素 SmaI で切断したライゲーション産物によりコンピテントセル DH5 α をトランスフォーメーションさせた。形成した独立大腸菌クローンを培養し、制限酵素 HindIII で切断することにより、目的遺伝子の挿入を確認した。続いて、組換え Ad ベクタープラスミドを PacI で処理した後、SuperFect(QIAGEN 社)を用いて 293 細胞にトランスフェクションした。10~14 日間培養した後に CPE(cytopathic effect)を起こした 293 細胞を 1,200 rpm、5 分間遠心して回収し、少量の培養液に懸濁した。3 回凍結融解を繰り返すことにより溶液中に遊離した Ad ウイルスを 2,000 rpm、10 分間遠心して cell debris を除去した後に、新たな 293 細胞に感染させた。CPE が観察されると同様の操作を繰り返し、徐々に感染させる 293 細胞を増やすことで高タイトーの CVL(crude virus lysate)を得た。

回収した CVL は CsCl 密度勾配遠心法により精製した。CVL を 5 回凍結融解を繰り返すことにより Ad を溶液中に遊離させ、DNase および RNase 処理を 1 時間行った。比重 1.25~1.40 の CsCl 密度勾配上に重層し、35,000 rpm、18°C、1 時間遠心した。遠心チューブ内にできた下方のバンドを回収し、さらに比重 1.35 の CsCl 上に重層し、35,000 rpm、18°C で 16 時間遠心した。遠心チューブ内にできた下方のバンドを回収し、以下のバッファー[10mM Tris-HCl(pH7.4), 1 mM MgCl₂, 10% glycerol]を用いて 4°C で透析を行った。Ad の物理学的タイトーは Ad を TE 0.1% SDS 溶液で可溶化し 14,000 rpm、10 分間遠心を行った上清の 260 nm の波長の吸光度を測定し、以下の式を用いて算出した。精製した Ad は -80°C にて保存した。

Titer (VP/ml)=[OD₂₆₀-OD₂₆₀(blank)] × 1.1 × 10¹²

(3) Ad ベクター発現確認

Huh7 細胞、HepG2 細胞、SK HEP-1 細胞を 24-well plate に播種した。培養 24 時間後、培養液を除き Ad ベクターを 300、1000、3000 VP/cell で感染させた。感染 1.5 時間後、培養液を添加した。感染 24 時間後、培養液を除去し、細胞溶解剤 LC β (東洋インキ社)100 μ l を用いて細胞を溶解した。回収した細胞溶解液を -80°C で凍結、37°C で融解した後に 14,000 rpm 5 min

で遠心を行った。遠心後、上清 20 μ l のルシフェラーゼ活性を Luciferase assay system PGL5500(ピッカジーン、東洋インキ社)を用いて測定し、Ad ベクター遺伝子導入効率を評価した。

2. HCV サブゲノム発現プラスミドベクターの作製および抗 HCV 活性評価

RNA pol I 発現 Ad ベクターを用いた HCV 発現系を構築するにあたり、まず RNA pol I 発現プラスミドベクターを用いた HCV サブゲノム発現系を構築した。次に構築した HCV サブゲノム発現系の抗 HCV 薬評価系としての有用性を評価した。さらに、Ad ベクターへの応用を試みた。

(1) 遺伝子組換え

HCV サブゲノムレプリコンフラグメントは pRep-Feo (東京医科歯科大学、坂本博士より譲渡)からクローニングした。pHM5-Pol I-MCS の RNA pol I プロモーターの下流にある BsmBI サイトと RNA pol I ターミナーの上流にある BsmBI サイトを切断し、HCV サブゲノムレプリコンフラグメントとライゲーションした。ライゲーション産物によりコンピテントセル DH5 α をトランスフォーメーションさせた。形成した独立大腸菌クローンを培養し、プラスミド DNA を回収した後、制限酵素解析およびシーケンス解析を行うことにより pPol I-1bFeo を得た。続いて、pPol I-1bFeo のレポーター遺伝子と薬剤耐性遺伝子の融合遺伝子である Feo 遺伝子を制限酵素処理によりレポーター遺伝子 luciferase 遺伝子置き換え、pPol I-HCV を得た。

(2) HCV 評価系の構築

Huh7 細胞を 24-well plate に播種し、24 時間培養した後、HCV 発現プラスミド pPol I-HCV 0.8 μ g および遺伝子導入効率補正用プラスミド pCMV β 0.2 μ g を SuperFect により細胞へ導入した。遺伝子導入 2.5 時間後、各濃度のインターフェロンを含む細胞培養液に交換し、72 時間後 luciferase 活性、 β -galactosidase 活性および細胞生存率を測定した。Luciferase 活性

および β -galactosidase 活性は以下の方法により測定した。遺伝子導入 72 時間後、培養液を除去し、細胞溶解剤 LC β 100 μ l を用いて細胞溶解液を回収した。回収した細胞溶解液は -80°C で凍結、 37°C で融解した後、14,000 rpm、5 min で遠心を行い、Luciferase assay system PGL5500 を用いて上清 20 μ l のルシフェラーゼ活性を測定した。また、Luminescent β -gal Kit (Clontech)を用いて上清 20 μ l の β -galactosidase 活性を測定した。次に、細胞生存率は以下の方法によって測定した。遺伝子導入 72 時間後、細胞に WST-8 試薬(Nacalai tesque) を添加し、0.5~1 時間培養した後に培養上清の吸光度(450 nm)を測定した。Luciferase 活性は β -galactosidase 活性で補正し、インターフェロン非添加群を 100%として算出した。また、細胞生存率はインターフェロン非添加群を 100% として算出した。

(3) HCV サブゲノム発現 Ad ベクターの作製

研究方法1. (2)と同様の方法を用いて HCV サブゲノム発現 Ad ベクターの作製を試みた。

3. RNA pol I 発現系の最適化

HCV サブゲノム発現 Ad ベクターが作製できない原因の一つとして HCV 由来のプロテアーゼによる Ad ベクタータンパク質分解の可能性が予想された。そのため、3 種類の転写制御型 RNA pol I 発現系を作製し、その最適化を行った。

(1) 遺伝子組換え

テトラサイクリン(tet) *trans*-activator 結合配列 TRE と 3 種類の RNA pol I プロモーターフラグメント($-235 \sim -1$ 、 $-311 \sim -1$ 、 $-412 \sim -1$)とを融合させた tet 制御性 RNA pol I プロモーター(P₂₃₅、P₃₁₁、P₄₁₂)を作製した。Tet 制御性 CMV プロモーターがコードされたプラスミド pHM5-TREL2 (水口博士より譲渡)から TRE フラグメントの上流にある PI-SceI サイトおよび下流にある KpnI サイトで切り出すことにより、TRE フラグメントを作製した。3 種類の RNA pol I フラグメントは pHM5-Pol I をテンプレートとして PCR 法により増幅し

た。pHM5-Pol I 溶液(0.1 mg/ml) 1 μ l、10 x PCR buffer for KOD plus 5 μ l、2.5 mM MgSO₄ 2 μ l、2.5 mM dNTP mix 5 μ l、10 μ M primers 3 μ l、滅菌精製水 30 μ l、5 U/ μ l Takara kod plus 1 μ l を混合し PCR を行った。各 RNA pol I フラグメント用のプライマー配列は、P₂₃₅ Forward; 5' - GCGGTACCCGGGTCGAGACGGGCGG CCGGGAGGGCGT -3'、P₃₁₁ Forward; 5' - GCGG TACCCGGGTCGAGGTGTGTCCCGGTCGTAGGAG-3'、P₄₁₂ Forward; 5' - GCGGTACCCGGGTCGAG TCTTTCCTGCGTTATCCCCT -3'、Reverse (全フラグメント共通); 5' - GCTCTAGAGATATCGCTAGCGT -3'とした。PCR の条件は、 94°C 2 min の後、 94°C 30 sec、 59°C 30 sec、 68°C 30 sec を 35 サイクル。PCR 後、PCR 産物を電気泳動により分離・精製し、制限酵素 KpnI と XbaI により切断した。pHM5-Pol I-MCS の RNA pol I プロモーターの上流にある PI-SceI サイトおよび下流にある XbaI サイトを切断し、TRE フラグメントおよび RNA pol I フラグメントをライゲーションした。ライゲーション産物によりコンピテントセル DH5 α をトランスフォーメーションさせた。形成した独立大腸菌クローンを培養し、プラスミド DNA を回収した後、制限酵素解析およびシーケンス解析により、pP₂₃₅、pP₃₁₁、pP₄₁₂ を得た。次に、pCMV-EGFPLuc-IRES-neo の EGFPLuciferase 遺伝子の上流に存在する NheI サイトおよび下流に存在する BamHI サイトを切断することにより、EGFPLuciferase DNA フラグメントを作製した。pP₂₃₅、pP₃₁₁、pP₄₁₂ のマルチクローニングサイト上に存在する NheI サイトおよび BamHI サイトを切断し、EGFPLuciferase DNA フラグメントとライゲーションを行った。ライゲーション産物によりコンピテントセル DH5 α をトランスフォーメーションさせた。形成した独立大腸菌クローンを培養し、プラスミド DNA を回収した後、制限酵素解析により、pP₂₃₅-EL、pP₃₁₁-EL、pP₄₁₂-EL を得た。

(2) Tet 制御性 RNA pol I 発現系の機能評価

Huh7 細胞を 24-well plate に播種し、24 時間培養した後、Tet 制御性 RNA pol I 発現系プラスミド (pP₂₃₅-EL、pP₃₁₁-EL または pP₄₁₂-EL) 0.1 μ g、

tet 制御性 *trans*-activator 発現プラスミド (pHM5-tTA または pHM5-rtTA) 0.8 μg および遺伝子導入効率補正用プラスミド pCMV β 0.1 μg を SuperFect を用いて細胞に導入した。遺伝子導入 2.5 時間後、各濃度のドキシサイクリンを含む細胞培養液に交換し、遺伝子発現を誘導した。遺伝子発現誘導 48 時間後、luciferase 活性および β -galactosidase 活性を測定した。Luciferase 活性および β -galactosidase 活性は以下の方法により測定した。遺伝子導入 72 時間後、培養液を除去し、細胞溶解剤 LC β 100 μl を用いて細胞溶解液を回収した。回収した細胞溶解液は -80°C で凍結 37°C で融解した後に 14,000 rpm 5 min で遠心を行い、Luciferase assay system PGL5500 を用いて上清 20 μl のルシフェラーゼ活性を測定した。また、Luminescent β -gal Kit (Clontech) を用いて上清 20 μl における β -galactosidase 活性を測定した。Luciferase 活性は β -galactosidase 活性で補正することにより算出した。

(3) Ad ベクターの作製

AdP₂₃₅-EL および Ad-tTA はシャトルプラスミド pP₂₃₅-EL および pHM5-tTA から研究方法 1. (2) と同様の方法で作製・精製した。精製した Ad ベクターの生物学的タイターは Adeno-X rapid titer kit (Clontech) を用いて測定した。

(4) Ad ベクター発現確認

Huh7 細胞を 24-well plate に播種し、Ad-tTA (10 または 50 MOI) および AdP₂₃₅-EL (5 または 10 MOI) を共感染させた。感染 48 時間後に細胞溶解剤 LC β を用いて細胞溶解液を回収し、Luciferase assay system PGL5500 を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

4. HCV サブゲノム発現 Ad ベクターの作製

転写制御型 RNA pol I 発現系を用いて HCV サブゲノム発現 Ad ベクターの作製を行った。

(1) 遺伝子組換え

HCV サブゲノムレプリコンフラグメントは pPol I-1bFeo からクローニングした。pP₂₃₅ の RNA pol I プロモーターの下流にある BsmBI サイトと RNA pol I ターミナーの上流にある BsmBI サイトを切断し、HCV サブゲノムレプリコンフラグメントとライゲーションした。ライゲーション産物によりコンピテントセル DH5 α をトランスフォーメーションさせた。形成した独立大腸菌クローンを培養し、プラスミド DNA を回収した後、制限酵素解析を行うことにより、pP₂₃₅-1bFeo を得た。続いて、pP₂₃₅-1bFeo のレポーター遺伝子と薬剤耐性遺伝子とレポーター遺伝子の融合遺伝子である Feo 遺伝子を制限酵素処理によりレポーター遺伝子 renilla luciferase 遺伝子に置き換え、pP₂₃₅-HCV を得た。また、複製能欠損体 HCV サブゲノムフラグメントは pP₂₃₅-HCV をテンプレートとして PCR 法により作製した。pP₂₃₅-HCV 溶液 (0.1 mg/ml) 1 μl 、10 x PCR buffer for KOD plus 5 μl 、2.5 mM MgSO₄ 2 μl 、2.5 mM dNTP mix 5 μl 、10 μM primer A 3 μl 、10 μM primer B 3 μl 、滅菌精製水 30 μl 、5 U/ μl Takara kod plus 1 μl を混合し PCR を行うことにより PCR 産物 1 を得た。pP₂₃₅-HCV 溶液 (0.1 mg/ml) 1 μl 、10 x PCR buffer for KOD plus 5 μl 、2.5 mM MgSO₄ 2 μl 、2.5 mM dNTP mix 5 μl 、10 μM primer C 3 μl 、10 μM primer D 3 μl 、滅菌精製水 30 μl 、5 U/ μl Takara kod plus 1 μl を混合し PCR を行うことにより PCR 産物 2 を得た。PCR 産物 1 および 2 は 1% アガロースゲルを用いて電気泳動を行った後、QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN 社) を用いて精製した。PCR 産物 1 溶液 (0.1 mg/ml) 0.5 μl 、PCR 産物 2 溶液 (0.1 mg/ml) 0.5 μl 、10 x PCR buffer for KOD plus 5 μl 、2.5 mM MgSO₄ 2 μl 、2.5 mM dNTP mix 5 μl 、10 μM primer A 3 μl 、10 μM primer D 3 μl 、滅菌精製水 30 μl 、5 U/ μl Takara kod plus 1 μl を混合し PCR を行うことにより PCR 産物 3 を得た。プライマー配列は、primer A; 5' - TTTGACAGACTGCAGGTC CTGGATGACCAT-3'、primer B; 5' - CGCGCTTTC GCAGATCGTGAGTCCTGGAGCTTTGCAGCT-3'、primer C; 5' - CTCCAGGACTGCACGATCTGCGAAA GCGCGGGAACCCAGG -3'、primer D; 5' - CATCC TTGCCATAAGGTGGGCGCATACAT -3' とした。

PCR の条件は、94°C 2 min の後、94°C 30 sec, 50°C 30 sec, 68°C 2 min を 35 サイクル。PCR 後、PCR 産物 3 を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社)を用いて精製し、制限酵素 HpaI と MfeI により切断し、GDD 欠損 NS5B フラグメントを作製した。pP₁235-HCV の GDD モチーフの上流にある MfeI サイトおよび下流にある HpaI サイトを切断し、GDD 欠損 NS5B フラグメントをライゲーションした。ライゲーション産物によりコンピテントセル DH5 α をトランスフォーメーションさせた。形成した独立大腸菌クローンを培養し、プラスミド DNA を回収した後、シーケンス解析により、pP₁235- Δ GDD を得た。

(2) Ad ベクターの作製

HCV サブゲノム発現 Ad ベクター AdP₁235-HCV および複製能欠損体 HCV サブゲノム発現 Ad ベクター AdP₁235- Δ GDD は水口博士らが開発した *in vitro* ligation 法により作製した。pP₁235-HCV または pP₁235- Δ GDD を制限酵素 I-CeuI および PI-SceI により切断し、I-CeuI および PI-SceI で制限酵素処理した pAdHM36(35 型ファイバー改変 5 型 Ad ベクタープラスミド)とライゲーションを行った。親ベクターにのみ存在する制限酵素 SwaI で切断したライゲーション産物によりコンピテントセル DH5 α をトランスフォーメーションさせた。形成した独立大腸菌クローンを培養し、制限酵素 XhoI で切断することにより、目的遺伝子の挿入を確認した。続いて、組換え Ad ベクタープラスミドを PacI で処理した後、SuperFect(QIAGEN 社)を用いて 293 細胞にトランスフェクションした。10~14 日間培養した後に CPE を起こした 293 細胞を 1,200 rpm、5 分間遠心して回収し、少量の培養液に懸濁した。3 回凍結融解を繰り返すことにより溶液中に遊離した Ad ウイルスを 2,000 rpm、10 分間遠心して cell debris を除去した後に、新たな 293 細胞に感染させた。CPE が観察されると同様の操作を繰り返し、徐々に感染させる 293 細胞を増やすことで高タイトーの CVL(crude virus lysate)を得た。

回収した CVL は CsCl 密度勾配遠心法により精製した。CVL を 5 回凍結融解を繰り返すことにより Ad

を溶液中に遊離させ、DNase および RNase 処理を 1 時間行った。比重 1.25~1.40 の CsCl 密度勾配上に重層し、35,000 rpm、18°C、1 時間遠心した。遠心チューブ内にできた下方のバンドを回収し、さらに比重 1.35 の CsCl 上に重層し、35,000 rpm、18°C で 16 時間遠心した。遠心チューブ内にできた下方のバンドを回収し、以下のバッファー[10mM Tris-HCl(pH7.4), 1 mM MgCl₂, 10% glycerol]を用いて 4°C で透析を行った。Ad の物理学的タイトーは Ad を TE 0.1% SDS 溶液で可溶化し 14,000 rpm、10 分間遠心を行った上清の 260 nm の波長の吸光度を測定し、以下の式を用いて算出した。また、生物学的タイトーは Adeno-X rapid titer kit (Clontech)を用いて測定した。精製した Ad は -80°C にて保存した。

$$\text{Titer (VP/ml)} = [\text{OD}_{260} - \text{OD}_{260}(\text{blank})] \times 1.1 \times 10^{12}$$

(3) Ad ベクター発現確認

HCV サブゲノム発現 Ad ベクター AdP₁235-HCV の発現を HCV NS5A タンパク質を検出することで確認した。Huh7 細胞を 24-well plate に播種し、培養 24 時間後、培養液を除き AdP₁235-HCV (10 MOI) を Ad-tTA (50 MOI) と共感染させた。感染 1.5 時間後、培養液を添加した。感染 72 時間後、培養液を除去し、RIPA buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1% Nonidet P-40, 0.25% sodium deoxycholate, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% protease inhibitor cocktail] を用いて細胞を溶解した。回収した細胞溶解液は 14,000 rpm、5 min で遠心を行った。遠心後、上清のタンパク質濃度を BCA protein assay kit (Thermo 社)を用いて測定した。細胞溶解液は western blotting 法により、NS5A および β -actin の発現を確認した。細胞溶解液は最終濃度 30 mg/ml となるように 4 \times sample buffer [0.5M Tris-HCl (pH6.8), 20% 2-Mercaptoethanol, 8% SDS, 20% Sucrose, 0.008% Bromophenol blue] と混合し、100°C 5 min 処理した。細胞溶解液 30 μ g は 10% ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った後、polyvinylidene difluoride membrane に転写した。メンブランは 5%スキムミルクを用いて室温で 2 時間処理することによりブロッキングした。メンブランは抗 HCV

NS5A 抗体(Meridian Life Science 社)または抗 β -actin 抗体(Sigma 社)を用いて室温で2時間処理した後に、HRP 標識二次抗体(Millipore 社)を室温で1時間処理し、ECL Western Blotting Detection System (GE Healthcare 社)を用いて検出した。

また、HCV サブゲノム発現 Ad ベクター AdP_i235-HCV の発現をレポータータンパク質ルシフェラーゼの活性を測定することで確認した。Huh7 細胞を 24-well plate に播種し、AdP_i235-HCV (10 MOI) および Ad-tTA (50 MOI)を共感染させた。感染 1.5 時間後、ドキシサイクリン含有培養液を添加した。感染 48 時間後に Renilla Luciferase Assay System (Promega 社)を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

(4) Ad ベクター由来 HCV サブゲノムの複製能の検証
HCV サブゲノム発現 Ad ベクターAdP_i235-HCV 由来の HCV サブゲノム RNA が HCV NS5B (RNA 依存性 RNA polymerase) により複製されることを、複製能欠損体 HCV サブゲノム発現 Ad ベクターAdP_i235- Δ GDD のルシフェラーゼ活性と比較することにより検証した。Huh7 細胞を 24-well plate に播種した。培養 24 時間後、培養液を除き AdP_i235-HCV または AdP_i235- Δ GDD (3 MOI) を Ad-tTA (15 MOI) と共感染させた。感染 24 時間後、最終濃度 10 μ g/mlドキシサイクリン含有培養液を添加した。感染 72 時間後、培養液を除去し、Renilla Luciferase Assay System を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

また、一鎖 HCV RNA は HCV が NS5B により複製をした場合にのみ産生される。HCV サブゲノム発現 Ad ベクターAdP_i235-HCV 感染細胞において一鎖 HCV RNA が産生されることを検証した。Huh7 細胞を 24-well plate に播種した。培養 24 時間後、培養液を除き AdP_i235-HCV または AdP_i235- Δ GDD (3 MOI) を Ad-tTA (15 MOI) と共感染させた。感染 24 時間後、最終濃度 10 μ g/mlドキシサイクリン含有培養液を添加した。感染 72 時間後、トリプシン処理により細胞を回収しリン酸緩衝溶液に懸濁した。細胞懸濁液は High Pure RNA Isolation Kit (Roche 社)を用いて RNA

を精製した。精製 RNA は一鎖 HCV RNA 特異的 primer または GAPDH 特異的 primer を用いて逆転写反応を行うことにより cDNA を作製した。RNA 溶液(0.1 mg/ml) 2 μ l、2 μ M primers 1 μ l、滅菌精製水 7.5 μ l を混合し 65°C、5 min 処理し、すぐに氷上で 5 min 冷却した。10 x RT buffer 2 μ l、25 mM MgCl₂ 4 μ l、2.5 mM dNTP mix 2 μ l、40 U/ μ l RNase Inhibitor 0.5 ml、20 U/ μ l AMV Reverse Transcriptase XL 1 μ l を添加し 60°C、50 min 反応させた後に、85°C、5 min 処理した。各 primer の配列は一鎖 HCV RNA 特異的 primer: 5' - GCCAGCCCCCGATTGGGG -3'、GAPDH 特異的 primer: 5' - TCTACATGGCAACTGTGA -3' とした。cDNA は PCR 法により HCV NS3 および GAPDH を増幅し、2% アガロースゲルを用いて電気泳動を行い検出した。cDNA 溶液 1 μ l、10 x Ex Taq buffer 2 μ l、25 mM MgCl₂ 1.2 μ l、2.5 mM dNTP mix 1 μ l、10 μ M primers 1 μ l、滅菌精製水 12.7 μ l、5 U/ μ l TaKaRa Ex Taq 0.1 μ l を混合し PCR を行った。各 primer の配列は HCV NS3 Forward primer: 5' - ATGGCGCTATT ACGGCC -3'、HCV NS3 Reverse primer: 5' - TGGT CTACATTAGTGTAC -3'、GAPDH Forward primer: 5' - GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA -3'、GAPDH Reverse primer: 5' - GTGGTCGTTGAGGGC AATG -3' とした。PCR の条件は、95°C 2 min の後、95°C 10 sec、55°C 30 sec、72°C 30 sec を 35 サイクル。

C. 研究結果

1. RNA pol I 発現系 Ad ベクターの開発

RNA pol I 発現系 Ad ベクターを作製し、肝細胞株での遺伝子導入効率を解析した。Huh7 細胞、HepG2 細胞、SK HEP-1 細胞に RNA pol I 発現系 Ad ベクターを 300、1000、3000 VP/cell で導入した結果、いずれの肝細胞株においても Ad ベクター容量依存的な luciferase 活性の上昇がみられた。また、RNA pol I 発現系 Ad ベクターの遺伝子導入効率は Huh7 細胞が最も高く、次に SK HEP-1 細胞、HepG2 細胞の順であった (Figure 1)。

2. HCV サブゲノム発現プラスミドベクターの作製および抗 HCV 活性評価

HCV ゲノムの複製に必須でない構造タンパク質領域をレポーター遺伝子 luciferase に置き換えた HCV サブゲノムを RNA pol I 発現カセットに搭載した HCV サブゲノム発現プラスミドベクターを作製した (Figure 2A)。作製した HCV サブゲノム発現プラスミドベクターの活性を Huh7 細胞において評価した結果、活性の指標である luciferase 活性の上昇を確認した (Figure 2B)。続いて、作製した HCV サブゲノム発現プラスミドベクターを用いた HCV ゲノム発現系が抗 HCV 活性評価系として利用可能かどうか検討した。Huh7 細胞に HCV サブゲノム発現プラスミドベクターを導入し、抗 HCV 活性が知られているインターフェロンを添加した結果、インターフェロン投与量依存的な luciferase 活性の低下が観察された。その際、インターフェロンによる細胞生存率の低下は認められなかった。以上の結果より、構築した HCV サブゲノム発現プラスミドベクターを用いた抗 HCV 活性評価が可能であることが明らかとなった (Figure 3A, B)。そこで、続いて本コンストラクトを搭載した Ad ベクターの作製を試みたが、作製できなかった (data not shown)。

3. Ad ベクター作製における RNA pol I 発現系の最適化

HCV サブゲノム発現 Ad ベクターが構築できない原因の一つとして、HCV ゲノムにコードされているプロテアーゼによる Ad ベクタータンパク質分解の可能性が予想された。そのため、テトラサイクリン制御系を利用した 3 種類の転写制御型 RNA pol I 発現系を作成し、その最適化を行った。

Tet *trans*-activator 結合配列 TRE と 3 種類の RNA pol I プロモーターフラグメントを結合した融合プロモーターを作製した (Figure 4)。作製した RNA pol I プロモーターの活性を Tet-on、-off システムにて評価した。その結果、Tet-on システムにおいて、P_i235、P_i311 プロモーターはドキシサイクリン濃度依存的な転写制御が認められたが、P_i412 プロモーターは転写制御が認められなかった。一方、Tet-off システムで

はすべてのプロモーターでドキシサイクリン濃度依存的な転写制御が観察された。Tet-on と tet-off システムとを比較したところ、tet-on システムに比べ tet-off システムは優れた転写促進作用が観察された (Figure 5A, B)。ここで、HCV プロテアーゼによる Ad ベクタータンパク質の分解を抑えるには、転写非誘導時のプロモーター活性が低いほど適している。そこで、*trans*-activator 非添加時のプロモーター活性を評価したところ、P_i235 プロモーターが最も低い活性を示した。この結果、P_i235 プロモーターが最適なプロモーターであることが明らかとなった (Figure 6)。そこで、新たに構築した転写制御型 RNA pol I 発現系の Ad ベクターにおける有用性を検討した。Huh7 細胞に導入して検討した結果、P_i235 プロモーター搭載 Ad ベクターは tet-off システムにおいて *trans*-activator ベクター (Ad-tTA) の容量依存的な発現上昇が確認された (Figure 7)。従って、転写制御型 RNA pol I 発現系は Ad ベクターにおいても機能することが示された。

4. HCV サブゲノム発現 Ad ベクターの作製

転写制御型 RNA pol I 発現系を用いて HCV サブゲノム発現 Ad ベクター (Figure 8) の作製を試みたところ、CPE が観察されたことから、HCV サブゲノム発現 Ad ベクターの作製に成功した。そこで、肝細胞株 Huh7 細胞に精製した HCV サブゲノム発現 Ad ベクター感染させ、HCV NS5A タンパク質の発現を確認したところ、NS5A タンパク質の発現が確認された (Figure 9)。また、レポーター遺伝子の発現を調べたところドキシサイクリン濃度依存的なルシフェラーゼ活性が観察された (Figure 10)。以上の結果から、HCV サブゲノム発現 Ad ベクターの作製に成功した。

HCV は NS5B (RNA 依存性 RNA polymerase) により +鎖 HCV RNA から -鎖 HCV RNA を、そして -鎖 HCV RNA から +鎖 HCV RNA を産生することによりゲノムを複製する。特に NS5B 領域には複製に重要な GDD モチーフが存在し、その欠損体 AdP_i235-ΔGDD は複製能を示さないことが知られている。そこで、HCV サブゲノム発現 Ad ベクターから産生された HCV RNA が複製能を有しているかどうか