

201227013A

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 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 櫻井 文教

平成 25 年 (2013 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)

櫻井 文教1

II. 分担研究報告

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

渡利 彰浩9

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

C 型肝炎ウイルス受容体を高効率にノックダウン可能なアデノウイルス (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。

近年、HCV の生活環が明らかになるにつれて、C 型肝炎治療薬の新たな標的分子が同定されている。その代表が HCV の感染受容体である。HCV 感染受容体としては、これまでに CD81、Scavenger receptor B type I (SR-BI)、Occludin、Claudin-1 などが同定されており、これらの発現・機能を制御することで HCV 感染を抑制する試みが行われている。しかしこれまでに 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。昨年度は、上記感染受容体に対する Short-hairpin RNA (shRNA) 発現カセットを搭載した Ad ベクターを作製し、HCV 感染受容体のノックダウンを試みた。しかし十分なノックダウンが観察されなかったことから、再度高効率なノックダウン効率を目指す shRNA 発現 Ad ベクターの構築および特性解析を行った。

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

立花 雅史 大阪大学大学院薬学研究科
助教

町谷 充洋 大阪大学大学院薬学研究科
大学院生

岡本小百合 大阪大学大学院薬学研究科
実験補助員

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、抗 HCV 薬の新たな作用点として、HCV 感染受容体が注目を集めている。HCV 感染受容体としてはこれまでに、CD81、Occludin、Claudin-1、SR-BI が報告されている。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が多い。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。そこで昨年度は、各種 HCV 受容体に対する shRNA 発現カセットを搭載した Ad ベクターを作製し、HCV 受容体のノックダウン効率を検討した。しかし十分なノックダウン効率が得られなかった。そこで今年度は高効率なノックダウン効率を示す shRNA 発現 Ad ベクターについて再度検討を行うことで、HCV 受容体を高効率にノックダウン可能な Ad ベクター開発に向けた基盤を構築することを目指した。

B. 研究方法

1. HCV 受容体に対する shRNA 発現 Ad ベクターの作製

まずヒト Ago1、Ago2、Exportin-5 発現プラスミド (pHM15-CMV-Ago1, -Ago2, -Exp5) を AvrII で消化したのち、XbaI で消化した pAdHM23XbaI とライゲーションし、pAdHM23-Ago1, -Ago2, -Exp5 をそれぞれ作製した。さらにそれらプラスミドを、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-Ago1, -Ago2, -Exp5 を作製した (Fig. 1, 2)。

作製した Ad ベクタープラスミドを PacI 処理したのち、293 細胞に導入し、従来法に従い、Ad ベクターを増幅・精製した。Ad ベクターの物理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) を用いて測定した。p53 や PTEN に対する shRNA 発現カセットを搭載した Ad ベクターについても同様に作製した。

2. ホタルルシフェラーゼ安定発現細胞の樹立

SK HEP-1 細胞を 12 穴プレートに 1×10^5 cells/well で播種し、翌日、前項で得られた Luciferase 発現レンチウイルスベクター、LV-RVLuP 含有培養上清 1ml を作用させた。2 日間培養後、ウイルス感染効率を

FACS で確認した。培養を続けスケールアップ後、Venus 陽性細胞を FACSAria にてソーティングによって Luciferase 発現 SK HEP-1 細胞、SK HEP-1-Luc 細胞を得た。

3. 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 SK Hep-1 細胞を 1×10^4 cells/well で播種した。翌日、各種 shRNA 発現 Ad ベクターを各濃度で 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。

p53 および PTEN のノックダウンについては、それぞれ A549 細胞および HeLa 細胞に各種 shRNA 発現 Ad ベクターを各濃度で作用させた。Ad ベクター作用より 48 時間後、細胞を回収し、Western blotting により p53 および PTEN の発現量を検討した。具体的には、Ad ベクター作用 48 時間培養後、細胞を回収し、cell lysis buffer に懸濁し、タンパク濃度を protein assay kit (Bio-Rad) を用いて測定した。15 μ g のタンパクを 12.5% アクリルアミドゲルを用いて還元条件下で電気泳動した。電気泳動後、ゲルを PVDF メンブレン (Millipore) に転写し、4% スキムミルクでブロッキングした。ブロッキング後、1 次抗体 anti-p53 antibody (Santa Cruz) もしくは anti-PTEN antibody (Cell Signaling) を加え、反応させた。さらに、2 次抗体 anti-mouse IgG HRP-linked antibody (Cell Signaling) を加え、反応させた。反応後、メンブレンを ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (American Biosciences) で発色させ、LAS-3000 (Fujifilm) で検出した。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立大学法人大阪大学・遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得たのちに行った。なお本研究においては、公知の細胞株以外のヒト由来の試料は使用していない。

C. 研究結果

1. RNA 干渉関連遺伝子発現カセットを搭載した shRNA 発現 Ad ベクターに関する検討

H22年度に RNA 干渉関連遺伝子発現カセットを搭載した shRNA 発現 Ad ベクターを開発し、そのノックダウン効率について検討した結果、Ago2 を共発現させることで高効率なノックダウンが得られる、という結果を得た。しかしながら、HCV 感染受容体に対する shRNA 発現カセットを Ago2 発現 Ad ベクターに搭載したが、期待したような高効率なノックダウンが観察されなかった。その理由について検討を進めたところ、一つの原因として RNA 干渉関連遺伝子の発現が低いことが示唆された。また以前に使用していたホタルルシフェラーゼ発現細胞では、コントロール Ad ベクターを作用させるだけでルシフェラーゼ活性が変動してしまい、shRNA 発現 Ad ベクターの活性を正確に評価できなかった。そこで再度、RNA 干渉関連遺伝子発現カセットを搭載した shRNA 発現 Ad ベクターを作製し、ノックダウン効率について検討を行った。

まずホタルルシフェラーゼ安定発現細胞に対して、各種 shRNA 発現 Ad ベクターを作用させ、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 (Ad-shLuc) が MOI100 で 76% ルシフェラーゼ活性を低下させたのに対し、Ago2 を共発現させることで (Ad-Ago2-shLuc) で 96% ルシフェラーゼ活性を抑制した (Fig.3)。一方で、Ago1 (Ad-Ago1-shLuc) や Exportin-5 (Ad-Exp5-shLuc) を共発現させた場合においては、逆に Ad-shLuc と比較しルシフェラーゼ活性の上昇が見られた。なお各種 shRNA 発現 Ad ベクターを作用させた場合においても、有意な細胞毒性は観察されなかった (data not shown)。

2. 内因性遺伝子に対する shRNA 発現 Ad ベクターによるノックダウンに関する検討

次に、RNA 干渉関連遺伝子を共発現させることで高効率なノックダウン効率が見られる現象が、内因性遺伝子についても観察されるか検討した。標的遺伝子としては、既に我々が shRNA 発現 Ad ベクターを用いてノックダウンすることに成功している p53 および

PTEN を選択した。まず A549 細胞に p53 に対する shRNA (shp53) 発現 Ad ベクターを作用させたところ、従来型 shp53 発現 Ad ベクター (Ad-shp53) ならびに Ago2 を共発現する shp53 発現 Ad ベクター (Ad-Ago2-shp53) 作用群において有意なノックダウンが観察された (Fig.4A)。なお、Ad-shp53 および Ad-Ago2-shp53 の間に明らかな差は観察されなかった。

さらに PTEN に対する shRNA (shPTEN) 発現カセットを搭載した Ad ベクターについても検討したところ、従来型 shPTEN 発現 Ad ベクター作用群において、未処理細胞群と比較して PTEN 発現量の低下が観察された (Fig.4B)。しかし、Ago2 の共発現によりさらなる PTEN 発現量の低下が見られた (Ad-Ago2-shPTEN)。一方、Ago1 を共発現させた場合には、PTEN 発現のさらなる抑制は見られなかった。以上の結果より、標的遺伝子にもよるが、Ago2 を共発現させることで、より高効率に標的遺伝子をノックダウン可能であることが明らかとなった。

D. 考察

本年度は、HCV 受容体を高効率にノックダウン可能な shRNA 発現 Ad ベクターの開発に先立ち、その基盤ベクターとなりうる高効率に RNA 干渉を誘導可能な Ad ベクターを構築するとともに、その特性解析を行った。本検討に関しては H22 年度に予備的に行ったが、その後 RNA 干渉関連遺伝子発現カセットに不具合が見つかったことから、再度検討した。

まずはじめに標的遺伝子としてホタルルシフェラーゼを選択し、ノックダウン効率を検討したところ、各 RNA 干渉関連遺伝子の中で、Ago2 を過剰発現させることでノックダウン効率の向上が観察された。一方で、Ago1 や Exportin-5 を共発現させた場合にはノックダウン効率の向上は見られず、むしろ低下した。Ago1 でノックダウン効率が低下した理由としては、Ago1 が過剰発現したことで shRNA が Ago1 に取り込まれたためと推察された。一方で、Exportin-5 の共発現においてノックダウン効率が低下した理由については不明である。しかし近年、Ad が発現する低分子

RNA である VA-RNA が Exportin-5 を阻害することによりウイルスの増殖をサポートすることが報告されており、Exportin-5 を過剰発現させることで Ad ベクターによる遺伝子導入に何らかの影響があったのかもしれない。

一方、内因性の遺伝子を標的とした場合には、PTEN では Ago2 を過剰発現させることでノックダウン効率の向上が観察されたが、p53 を標的とした場合には従来型の shRNA 発現 Ad ベクターでも Western blotting でほとんどバンドが消失しており、従来型の shRNA 発現 Ad ベクターでも十分なノックダウン効率を得られることが明らかとなった。従って shRNA 発現 Ad ベクターを用いてノックダウンする場合には、標的遺伝子の発現量や標的タンパク質の半減期などの遺伝子発現特性を加味して、従来の shRNA 発現 Ad ベクターでも可能か考慮する必要があるものと思われる。

近年、shRNA 発現 Ad ベクターによる標的遺伝子ノックダウンに影響する新たな因子として、Ad ベクターが発現する小分子 RNA (VA-RNA) に注目が集まっている。VA-RNA は Ad ベクターゲノムより転写されたのち、Exportin-5 によって核外に輸送され、Dicer による切断を受けたのち、Ago2 とともに RISC を形成する。すなわち、VA-RNA は shRNA と全くおなじ Processing を受けるため、shRNA の Processing を競合阻害する。従って、Ad ベクターゲノムより VA-RNA 遺伝子を取り除けば、shRNA によるノックダウン効率が向上する可能性がある。申請者らは既に VA-RNA 遺伝子を取り除いた Ad ベクターの開発に成功している。それらに shRNA 発現カセットを搭載し、ノックダウン効率を検討したところ、劇的ではないものの、ノックダウン効率の向上が観察された。本 Ad ベクターは高効率な shRNA 発現 Ad ベクターの基盤ベクターになるものと期待される。現在、本 Ad ベクターを用いて HCV 感染受容体の抑制に向けて研究を進めている。

E. 結論

RNA 干渉関連遺伝子のうち、Ago2 を共発現させることで最も高効率なノックダウンが得られた。また内

因性の標的遺伝子に対しても高効率なノックダウンが可能であった。これらの結果を踏まえて、再度 HCV 感染受容体に対する shRNA 発現 Ad ベクターを作製中である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

特に無し。

G-2 学会発表

- 1) Kiyohito Yagi, Takeshi Yoshida, Seiji Yamane, Kazuo Takayama, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Fuminori Sakurai, Naoya Sakamoto, Yoshiharu Matsuura, Hiroyuki Mizuguchi, Evaluation of HCV infection and replication using human iPS cell-derived hepatocytes, 19th International Symposium on Hepatitis C virus and Related viruses, Oct. 5-9, 2012, Venice, ITALY
- 2) Mitsuhiro Machitani, Kazufumi Katayama, Fuminori Sakurai, Hayato Matsui, Tomoko Yamaguchi, Takayuki Suzuki, Hiroyuki Miyoshi, Kenji Kawabata, Hiroyuki Mizuguchi: ENHANCEMENT OF ADENOVIRUS VECTOR-MEDIATED RNAi EFFECT BY LACKING VA-RNA EXPRESSION, 第 18 回日本遺伝子治療学会総会, 熊本, 2012 年 6 月 28-30 日
- 3) 町谷充洋、櫻井文教、立花雅史、形山和史、松井勇人、鈴木孝幸、川端健二、水口裕之: アデノウイルス由来小分子 RNA の欠損による shRNA 発現アデノウイルスベクターにおける RNAi 効果の増強, 第 28 回日本 DDS 学会学術集会, 札幌, 2012 年 7 月 4-5 日
- 4) 町谷充洋、櫻井文教、形山和史、松井勇人、鈴木孝幸、立花雅史、水口裕之: ウイルス由来小分子 RNA が Short-hairpin RNA 発現アデノウイルスベクターによる RNAi 効果に及ぼす影響に関する検討, 日本薬学会第 133 年会, 横浜, 2013 年 3 月 28-30 日

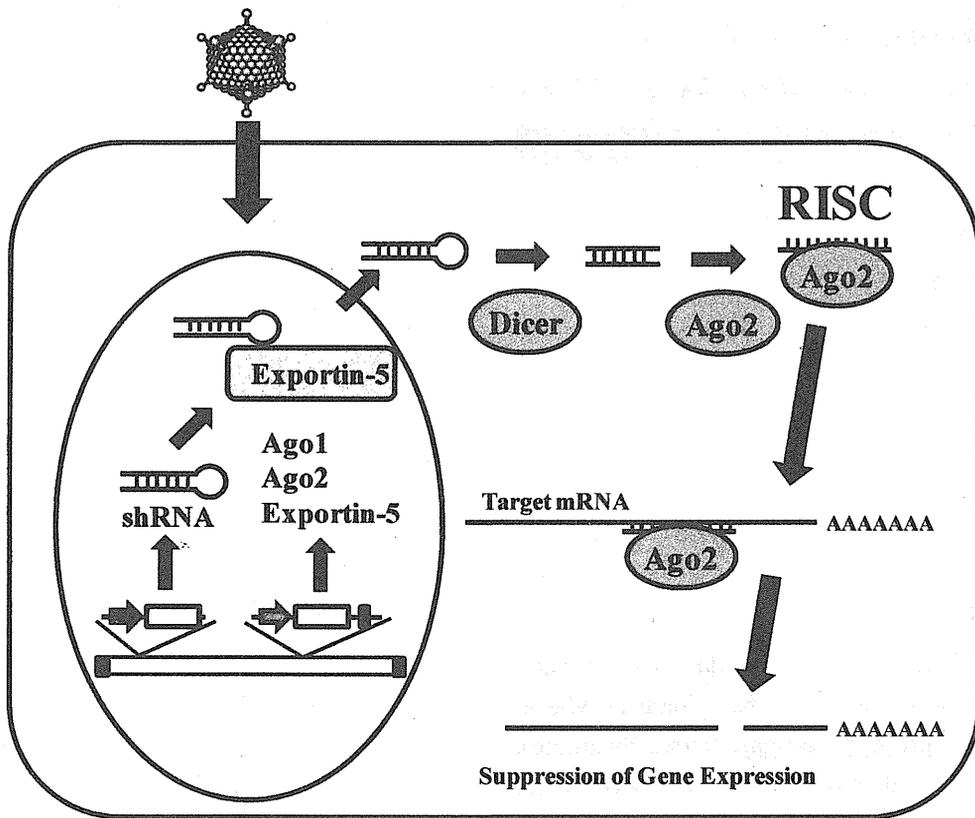


Fig.1 shRNA-mediated RNA interference.

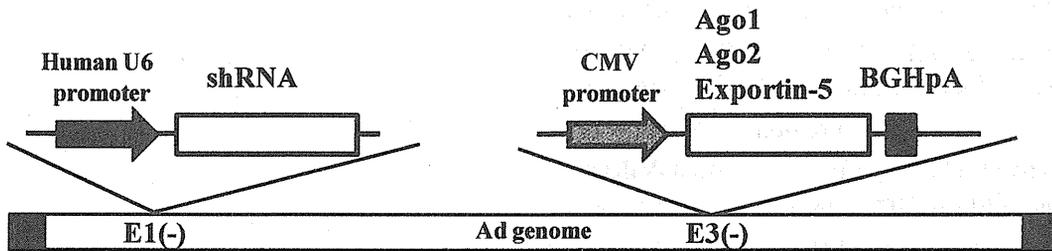


Fig.2 Ad vector genome containing shRNA- and RNAi-related protein Expression cassettes.

Ago; Argonaute.

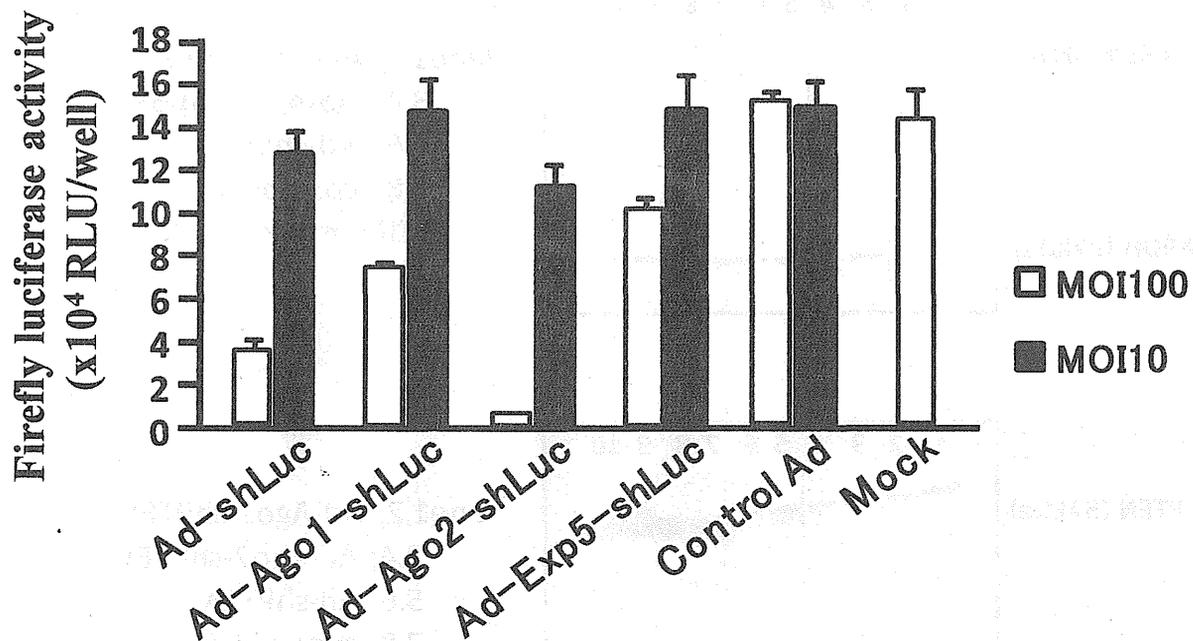


Fig.3 shRNA-expressing Ad vector-mediated knockdown of Firefly luciferase gene.

SK-Hep-1 cells stably expressing firefly luciferase were transduced with the Ad vectors expressing shRNA against firefly luciferase at MOI 10 or 100. Luciferase activity in the cells were determined by chemiluminascence assay 48 hr after transduction.

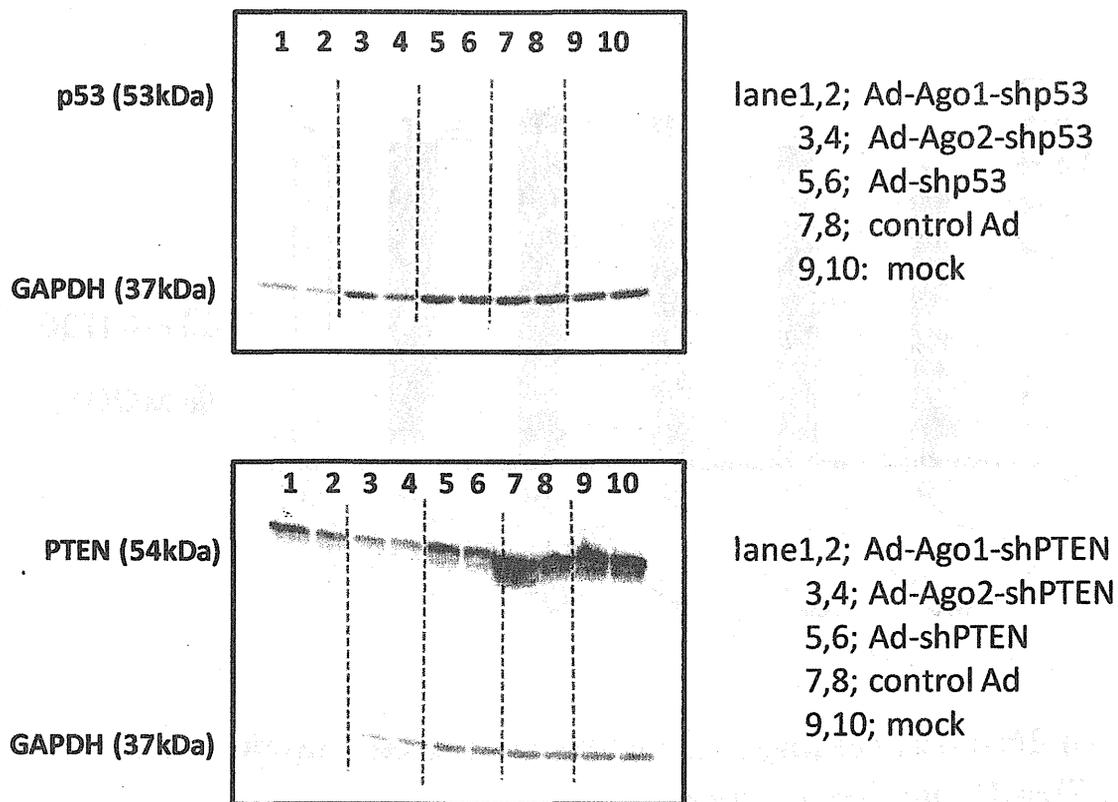


Fig.4 shRNA-expressing Ad vector-mediated knockdown of endogenous gene expression.

(A) Knockdown of p53 gene. (B) Knockdown of PTEN. A549 cells (A) and HeLa cells (B) were transduced with the Ad vectors expressing shRNA against p53 or PTEN at MOI 100. Expression levels of p53 and PTEN in the cells were evaluated by Western blotting analysis 48 hr after transduction.

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

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

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(IFN)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。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。

昨年度は HCV サブゲノム発現 Ad ベクターを用いた HCV 複製解析系が、HCV 複製阻害薬の開発や HCV 複製機構の解明に応用可能な解析系であるかを検証した。本年度は、RNA polymerase I 発現系および Helper-dependent Ad ベクターを用いることで遺伝子導入効率に優れた HCV フルゲノム導入法の開発を試みた。

HCV genotype 2b のゲノム cDNA を RNA polymerase I 発現系シャトルプラスミドへと搭載し、HCV ゲノムの発現を解析したところ、Huh7 細胞において HCV ゲノムの発現が確認された。本発現系を Helper-dependent Ad ベクターへと搭載することで、*in vivo* での HCV フルゲノムの導入が可能となると考えられる。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス(HCV)は日本で 200 万人、世界中では 2 億人もの感染者が存在すると推定されている。HCV の慢性持続感染は 10~30 年かけて慢性肝炎、肝硬変を引き起こし、さらに 5~10 年で肝細胞癌に至る。本邦における肝細胞癌患者の約 8 割は HCV 感染者であり、C 型肝炎は最も深刻な肝疾患である。これまで、C 型肝炎に対する治療法は複製阻害薬であるインターフェロン(IFN)およびリバビリンの併用療法が用いられてきたが、奏効率は 50%に過ぎなかった。2011 年、新たにプロテアーゼ阻害剤が認可され、ポリメラーゼ阻害剤についても臨床試験が行われてい

る。しかしながら、これらはいずれもウイルス側の因子を標的としており、薬剤耐性ウイルスの出現が報告されている。そのため、薬剤耐性ウイルスが出現しにくい HCV 複製に関わる宿主因子を標的とした新規治療法が開発が期待されている。

HCV は約 9.6 kb の一本鎖プラス鎖 RNA をゲノムにもつ RNA ウィルスでフラビウイルス科に分類される。HCV 感染機構は肝細胞内への侵入および複製ステップに大別され、それぞれの感染段階に関与する宿主因子の同定が耐性ウイルスの出現を回避する新たな治療戦略として注目されている。昨今の HCV 侵入機構解析により、HCV 感染受容体として CD81、

scavenger receptor class B type I (SR-BI)、claudin-1、occludin が同定され、抗 claudin-1 抗体などが HCV 感染阻害薬シーズとして注目されている。一方、HCV 複製機構については、HCV 複製解析系開発の遅延により、cyclophilin や miR-122 などしか明らかとなっていない。

HCV が感染可能な宿主はヒトとチンパンジーに限られる。そのため、*in vivo* HCV 複製解析系にはチンパンジーまたは免疫不全マウスにヒト肝細胞を移植したヒト肝臓キメラマウスが用いられている。*In vitro* ではヒト初代培養細胞やヒト肝臓由来培養細胞株 (Huh7 細胞) が用いられている。また、ヒト induced pluripotent stem cell (iPS) 細胞から肝細胞への分化誘導技術の進展に伴い、様々な患者から樹立されたヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いることで HCV 複製能の違いや、抗 HCV 薬に対する効果の違いを解析可能であり、新たな HCV 複製解析系として注目されている。しかしながら、HCV ゲノム導入法の問題から利用には至っていない。HCV ゲノム導入法としては HCV 粒子を感染させる方法と HCV RNA をエレクトロポレーション法により導入させる方法がある。HCV 粒子は培養細胞で産生した HCV あるいは患者血清が用いられている。培養細胞で産生可能な HCV 株は、日本では感染の少ない遺伝子型 2a に属し劇症肝炎という C 型肝炎では特殊な病態を示す JFH-1 株のみである。患者血清は入手が困難であり、遺伝子工学的な解析が不可能であるなどの問題点がある。HCV RNA のエレクトロポレーション導入法は、これらの問題点を解決可能であるが、細胞障害性や導入効率の問題から *in vivo* や初代培養細胞などへは適用できない。以上のことから、汎用性に優れ、導入効率の高い HCV ゲノム導入法の確立が新たな抗 HCV 薬開発の課題であると考えられる。

昨年度までに、*in vitro*、*in vivo* 遺伝子導入ベクターとして汎用されている Ad ベクターに長鎖 RNA 発現 RNA polymerase I 発現系を搭載することで、利便性の高い HCV サブゲノム導入基盤技術を構築した。また、HCV サブゲノム発現 Ad ベクターを用いた HCV 複製解析系が、HCV 複製阻害薬の開発や HCV 複製機

構の解明に応用可能な解析系であるかを検証した。本年度は Helper-dependent Ad ベクターに長鎖 RNA 発現 RNA polymerase I 発現系を搭載することで、利便性の高い HCV フルゲノム導入基盤技術の構築を試みた。

B. 研究方法

B.1 細胞培養

Huh7 細胞は 10% fetal bovine serum (FBS) 含有 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) を用いて 37 °C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下で培養した。なお、本研究において使用した FBS は全て 56 °C、30 分間の非働化処理を行った後、使用した。

B.2 HCV フルゲノム polI 発現系シャトルプラスミドの作製

HCV フルゲノム polI 発現系シャトルプラスミドである pHM18-HCV は以下の方法で作製した。

まず、pHM5-TREP235-MCS よりテトラサイクリン制御 polI 発現カセットを、テトラサイクリン制御 polI プロモーター上流に MfeI サイトを付加したプライマー (5'-ATTGCAATTGTGAAAGTCGAGCTCGGTACC-3') および polI ターミネーター下流に AflIII サイトを付加したプライマー (5'-ACGGCTTAAGGTAGCGAAAGCTTGATGCC-3') を用いて PCR 法により増幅した。増幅した断片に対して MfeI 消化及び AflIII 消化したのち、EcoI 消化および AflIII 消化を行った pHM18-U6-GFP に、T4DNA リガーゼを用いたライゲーション反応によりテトラサイクリン制御 polI 発現カセットを挿入し、pHM18-TREP235-MCS を作製した。次に、挿入したテトラサイクリン制御 polI カセットに、以下に示す 3 段階のステップにより HCV フルゲノム cDNA (遺伝子型 2b 型) の挿入を行った。なお、用いた HCV フルゲノム cDNA は、東京医科歯科大学 坂本直哉 博士より御供与頂いた。まず、鑄型とした HCV cDNA の最下流に存在する BamHI サイトから 3' 末端までの領域を、以下に示すプライマー (5'-GCCGGATCCACTCCCCCTTC-3')、及び下流に BsmBI サイトを付加したプライマー

(5'-AATTAActgtctcaGGGACATGATCTGCAGAGAGACCA-3')を用いてPCR法により増幅した。増幅した断片に対してBamHI消化及びBsmBI消化したのち、BamHI消化及びSpeI消化したpHM18-TREP235-MCSに、T4DNAリガーゼを用いたライゲーション反応により挿入することでHCV cDNAの3'側の一部を挿入し、pHM18-TREP235-3' HCVを作製した。次に、鑄型としたHCV cDNAの5'末端から、HCV cDNAの最上流に存在するSpeIサイトまでの領域を、上流にBsmBIを付加したプライマー(5'-TTAATTCGTCTCGTATTGACCTGCCCTAATAGGGCGCA-3')、及び下流にBamHIを付加したプライマー(5'-AATTAAGGATCCACCCACTAGTAGTACGACCCGCT-3')を用いてPCR法を行うことでHCV cDNAの5'側の一部を増幅した。増幅した断片に対してBsmBI消化及びBamHI消化したのち、BamHI消化したpHM18-TREP235-3' HCVに、T4DNAリガーゼを用いたライゲーション反応により挿入し、pHM18-TREP235-5' 3' HCVを作製した。次に、HCV cDNAに対してSpeI消化及びBamHI消化したのち、得られた断片を、SpeI消化及びBamHI消化したのちにアルカリフォスファターゼ反応により脱リン酸化処理を施したpHM18-TREP235-5' 3' HCVに、T4DNAリガーゼを用いたライゲーション反応により挿入することでpHM18-HCVを作製した。なお、遺伝子組み換えの各段階において、作製したプラスミドの挿入断片の塩基配列は、シーケンス解析(ジーンデザイン社に委託)を行うことで正しいものであることを確認している。

B. 3 HCVフルゲノム polI 発現系シャトルプラスミドの発現確認

Huh7細胞を24-well plateに播種し、培養した。培養24時間後、培養液を除きpHM18-HCV2bまたはpHM18-MCSをtTA発現プラスミドとともにFugene HD (Promega社)を用いてコトランスフェクションした。24時間後、トリプシン処理により細胞を回収しPBSに懸濁した。細胞懸濁液よりHigh Pure RNA Isolation Kitを用いてRNAを精製した。精製RNAはSuperScript

VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen社)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 µl、5 x VILO Reaction Mix 4 µl、10 x SuperScript Enzyme Mix 2 µl、滅菌精製水 12 µlを混合し25 °C、10 min処理し、42 °C、60 min反応させた後に、85 °C、5 min加熱した。cDNAはPCR法によりHCVゲノムおよび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 µl、10 x Ex Taq buffer 2 µl、25 mM MgCl₂ 1.2 µl、2.5 mM dNTP mix 1 µl、10 µM primers 1 µl、滅菌精製水 12.7 µl、5 U/µl TaKaRa Ex Taq 0.1 µlを混合しPCRを行った。各 primer の配列は、HCV genome Forward primer: 5' - CTCCCGGGGCACTCGCAAGC -3'、HCV genome Reverse primer: 5' - GTCTAGCCATGGCGTTAGTA -3'、GAPDH Forward primer: 5' - TCTTCACCACCATGGAGAAG -3'、GAPDH Reverse primer: 5' - ACCACCTGGTGCTCAGTGTA -3'とした。

C. 研究結果

結果はD項にまとめて記載する。

D. 考察

HCVフルゲノム polI 発現系シャトルプラスミドの発現確認

HCV複製機構の解明が遅延する原因の一つとして、HCVゲノムの導入効率の低さがある。当研究グループが開発したRNA polymerase I発現系およびAdベクターを利用したHCVサブゲノム導入法は、導入効率に優れ、HCV複製阻害剤の効果や細胞のHCV複製能を評価可能であり、汎用性に優れたHCV複製解析系である。そこで本年度は、Adベクターを利用してHCVフルゲノム発現系の構築を試みた。

HCVフルゲノム(遺伝子型2b、約9 kbp)をpolI発現系シャトルプラスミド(Figure 1)へ搭載し、Huh7細胞においてHCVゲノムの転写が起こるかを確認した。HCVフルゲノム polI 発現系シャトルプラスミド作製した後、本プラスミドをHuh7細胞に導入し、24時間後までRNA polymerase I依存的な転写を誘導した。導入24

時間後、複製の際にしか産生されない一鎖 HCV RNA の発現を RT-PCR 法により解析した結果、HCV フルゲノムを搭載しない polI 発現系シャトルプラスミドを導入した細胞では HCV ゲノムの転写は認められなかったものの、HCV フルゲノム搭載 polI 発現系シャトルプラスミドの導入した細胞では一鎖 HCV RNA の発現が確認された (Figure 2)。以上の結果から、polI プロモーター制御下において HCV フルゲノムの転写が可能であることが示された。

E. 結論

1. 約 9 k bp の HCV フルゲノム (遺伝子型 2b) をポリメラーゼ I 発現カセットに挿入した HCV フルゲノム発現プラスミドを作製した。
2. 作製した HCV フルゲノム発現プラスミドを Huh7 細胞に導入することにより、HCV フルゲノム RNA が発現することを確認した。

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

Yagi K., Yoshida T., Yamane S., Takayama K., Watari A., Kondoh K., Sakurai F., Sakamoto N., Matsuura Y., Mizuguchi H., Evaluation of HCV infection and replication using human iPS cell-derived hepatocytes., HCV2012 19th International Symposium on Hepatitis C virus and Related viruses 2012, Oct 5-9, Venice, ITALY.

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

I. 研究協力者

大阪大学大学院薬学研究科:

- ・ 八木清仁 (教授)
- ・ 近藤昌夫 (准教授)
- ・ 松久幸司 (大学院生)



Figure. 1 Schematic construct of HCV genome-expression cassette. The HCV replicon gene was driven by the RNA pol I promoter (P_I) and terminator (T_I).

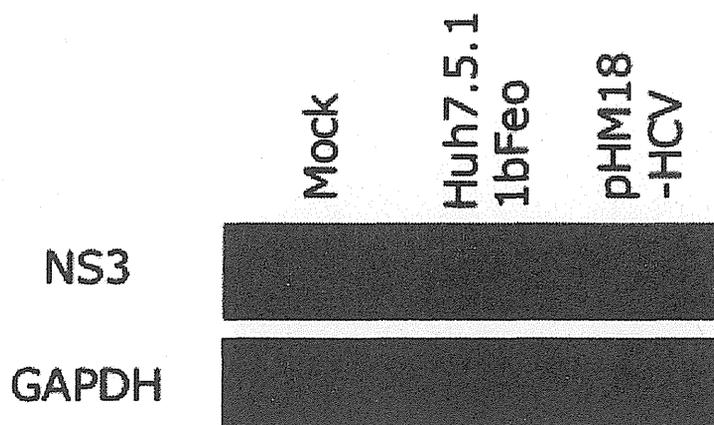


Figure. 2 Expression of minus-stranded HCV RNA in the pHM18-HCV-transfected cells. Huh7 cells were transfected with pHM18-HCV. After 24 h, the total RNA was collected. Then RT-PCR analysis was performed for detection of minus-stranded HCV NS3 and GAPDH. The PCR products were separated on 2% agarose gel. Huh7 cells and Huh7.5.1 1bFeo cells were used as the negative and positive controls, respectively. GAPDH was used as a loading control.

