

201227013B

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

平成22年度～平成24年度 総合研究報告書

研究代表者

櫻井 文教

平成25(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19

III. 研究成果の刊行に関する一覧表47

IV. 研究成果の刊行物・別刷49

「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」

miR-122a を阻害することで HCV 複製を抑制可能なアデノウイルス（Ad）ベクターおよび 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。

本研究では、新たな 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 および HCV 感染受容体に着目した。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 を高効率に抑制可能なタフデコイ RNA 発現アデノウイルス（Ad）ベクターを作製し、HCV レプリコンを抑制することに成功した。さらに HCV 感染受容体の発現を高効率に抑制することを目的に、Ago2 を共発現させることで高効率に RNA 干渉を誘導可能な Ad ベクターを開発した。本 Ad ベクターは HCV 感染受容体の高効率ノックダウンに向けて極めて有用な基盤ベクターになるものと期待される。

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

立花 雅史 大阪大学大学院薬学研究科
准教授

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

町谷 充洋 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 大阪大学大学院薬学研究科
特別研究員
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。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 などの RNA 干渉関連遺伝子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。さらに HCV 感染受容体に対する shRNA 発現カセットを作製し、上記 Ad ベクターに搭載してノックダウン効率を検討した。

B. 研究方法

1. タブデコイ発現 Ad ベクターの開発

タブデコイ 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 の配列は以下の通りである。

TuD-control-sense;
5' -catcaacaagccacaacgaatctctatatcatcaagtattctgtcacagaataacaacaagccacaacgaatctctatatcatcaag-3'

TuD-control-antisense;

5' -tcacattgatgatagagattcgttggtgcttgttattctgtgaccagaataacttgatgatagagattcgttggtgcttgtt-3'

TuD-122a-sense;

5' -catcaaccaaacaccattgatcttcacactccacaagtattct

ggtcacagaataacaaccaaacaccattgatcttcacactccacaag-3', TuD-122a-antisense;

5' -tcacattgatggagtggaagatcaatgggtgttgggttattctgtgaccagaataacttgatggagtggaagatcaatgggtgttgggtt-3 (下線部は miRNA binding sequence (MBS)).

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. タフデコイ発現 Ad ベクターによる HCV レプリコンの抑制に関する検討

HCV レプリコン発現細胞 (Huh7.5.1-1bFeo) は、北海道大学大学院医学研究科・坂本直哉先生より供与いただいた。Huh7.5.1-1bFeo 細胞を 96 穴プレートに、 1×10^4 cells/well で播種した。24 時間後、タフデコイ発現 Ad ベクターを MOI (multiplicity of infection) 25, 50, 100 で 1.5 時間作用させた。ウイルス作用 48 時間後、LT.2.0 (東洋インキ) を加え、ルシフェラーゼ活性を測定した。

また HCV レプリコン RNA 量の定量に関しては、上記と同様に Ad ベクターを作用させたのち、Total RNA を回収した。Total RNA 2ug に対し、HCV ゲノム特異的なプライマー (RC21; 5'-ctc ccg ggg cac tcg caa gc-3') を用いて、逆転写反応を行った。得られた cDNA ならびにプライマー (RC21 および RC1; 5'-gtc tag cca tgg cgt tag ta-3'), SYBR Premix Ex Taq II (Takara Bio) を用いて、定量的 PCR を行った。また内

因性コントロールとして、GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) の発現を従来法に従い定量した。

4. 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 Ago1, 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。Ago1, 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、各遺伝子を pcDNA3.1-hygro(+) より切り出し、pHM15-CMV にライゲーションした (pHM15-CMV-Ago1, -Ago2, -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-Ago1, -Ago2, -Exp5, -TRBP とそれぞれライゲーションすることにより、pAdHM23-Ago1, -Ago2, -Exp5, -TRBP を作製した (Fig.3)。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-siLuc (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-siLuc-Ago1, -Ago2, -Exp5, -TRBP を作製した。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。

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。

5. 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 もしくは 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 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。

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。

6. HCV 受容体に対する shRNA 発現 Ad ベクターの作製

過去に HCV 受容体として機能することが報告されている SR-BI, CD81, Claudin-1, Occludin に対する shRNA 発現カセットは、以下のように作製した。shRNA 配列をコードした合成オリゴヌクレオチド (Table 1)をアニーリングしたのち、pHM5-hU6 の ClaI および XbaI サイトにクローニングした。作製した

shRNA 発現カセットを、既に E3 欠損領域に Ago2 発現カセットが挿入されている Ad ベクタープラスミド pAdHM23-Ago2 の E1 欠損領域に improved in vitro ligation 法により挿入した。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、上記と同様に Ad ベクターを増幅・精製した。また Ad ベクターのタイター測定に関しても上記と同様に検討した。については Maizel らの方法に従い測定した。

7. 上記 Ad ベクターによる各種 HCV 受容体ノックダウンに関する検討

12well プレートに Huh7 細胞(ヒト肝癌由来細胞株)を 1×10^5 cells/well で播種した。翌日、各種 shRNA 発現 Ad ベクターを 3000 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、Total RNAを回収し、定量的 RT-PCRにより各種 HCV 受容体の発現量を定量した。

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、相対的な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. タフデコイ RNA 発現 Ad ベクターによる HCV レプリコン抑制に関する検討

次に miR-122a に対するタフデコイ RNA 発現 Ad ベクターを HCV レプリコン発現細胞に作用させ、HCV レプリコン抑制効果を検討した。HCV レプリコン発現細胞としては、東京医科歯科大学・坂本直哉先生の作製された Huh7.5.1-1bFeo 細胞を使用した。この HCV レプリコン発現細胞は、HCV の 1b 型(HCV-N)をベースとして作製されており、HCV ゲノムのうち構造遺伝子領域がルシフェラーゼ遺伝子で置換されているため、ルシフェラーゼの活性を測定することで HCV レプリコンのレベルを評価することが可能である。miR-122a に対するタフデコイ RNA 発現 Ad ベクター(Ad-TuD-122aT)作用群では、Ad-TuD-122aT のタイトル依存的にルシフェラーゼの値が減少し、MOI100 においてはコントロールのタフデコイ RNA 発現 Ad ベクター(Ad-TuD-NC)作用群の 29%まで抑制された。一方で、Ad-TuD-NC 作用群では有意なルシフェラーゼ発現の抑制は観察されなかった(Fig.6)。なお、Ad ベクターを作用させることによる有意な細胞毒性は観察されなかった。

次に、実際に HCV レプリコンのコピー数が miR-122a を阻害することにより抑制されているか検討した。Strand-specific RT-PCR により HCV レプリコンのコピー数を定量したところ、Ad-TuD-122aT 作用群では有意なコピー数の低下が観察された。MOI100 で Ad-TuD-122aT を作用させた場合では、Ad-TuD-NC 作用群と比較して 45%まで減少してい

た。

以上の結果より、miR-122a に対するタフデコイ RNA 発現 Ad ベクターは、HCV の感染・増殖を効率よく抑制可能であることが示唆された。

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.7)。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関与する 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.8)。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。

しかし上記で用いたホタルルシフェラーゼ発現 A549 細胞は、コントロールの Ad ベクターを作用させることでルシフェラーゼの活性が変化するなど、正確にノックダウン効率が評価できていない恐れがあったため、ホタルルシフェラーゼ安定発現 SK Hep-1 細胞を用いて同様に検討を行った。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.9)。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)。

4. 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得られる現象が、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.10A)。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.10B)。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。

5. HCV 感染受容体ノックダウンに関する検討

次に各種 HCV 受容体に対する shRNA 発現カセットを Ago2 発現 Ad ベクターに搭載することにより、高効率に HCV 受容体をノックダウン可能か検討した。Huh-7 細胞に、各種 shRNA 発現 Ad ベクターを作用させ、Real-time RT-PCR により HCV 受容体 mRNA 量を測定したところ、CD81 に関しては約 50%のノックダウンが観察されたものの、SR-BI、Occludin、Claudin-1 については明らかなノックダウンは観察されなかった(Fig.11)。これについては、再度 Ad ベクターの確認および再構築を行っている。

D. 考察

1. タフデコイ RNA 発現 Ad ベクターによる miR-122a ノックダウンおよび HCV レプリコン抑制に関する検討

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。

上述のように、miR-122a の HCV 増殖促進メカニズムとしては、以下の 2 つが報告されている。miR-122a が HCV ゲノムの 5'-UTR および 3'-UTR に存在する部分的相補配列に結合することにより、①HCV ゲノムの安定性が向上する、②HCV ゲノムの翻訳効率が向上する。現在のところ、これに関しては結論が出ていないが、恐らく両方のメカニズムにより HCV の感染・増殖が促進されているものと考えられる。しかし、miR-122a は生体での Cholesterol を含む脂質代謝にも関与することが知られており、miR-122a のアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与した個体では、血中の Cholesterol および Triglyceride 濃度の減少が観察されている。一方で、細胞内の脂質の貯蔵庫である Lipid-droplet は、HCV の感染増殖に極めて重要な働きをしており、HCV の構造タンパク質が非構造タンパク質を Lipid-droplet に recruit し、複製複合体を形成することが知られている。従って、miR-122a は HCV ゲノムの安定化および翻訳の向上だけでなく、細胞

内の脂質代謝を制御することにより、HCV の感染増殖を促進している可能性も考えられる。

本研究では、Ad-TuD-122aT 作用群において、ルシフェラーゼ発現量に関しては Ad ベクターのタイター依存的な発現低下が認められたのに対し、HCV レプリコンのコピー数の検討においてはタイター依存的な低下が観察されなかった。この原因については不明であるが、上述のように miR-122a は HCV ゲノムの安定性と翻訳効率の向上の両者に関与している可能性が高いが、HCV ゲノムより発現する RNA polymerase によって HCV ゲノムの複製が起こっていることを考慮すると、HCV ゲノムコピー数の方が miR-122a 阻害の影響を受けやすいのかもしれない。

また HCV ゲノムコピー数の検討においては、有意差はないものの、Ad-TuD-NC 作用群においても抑制される傾向が強くみられた。これは、Ad ベクターより発現される小分子 RNA である VA-RNA の影響が考察された。VA-RNA は非増殖型 Ad ベクターからも大量に発現し、Ago2 とともに RNA-induced silencing complex (RISC) を形成することが報告されている。従って、Ad ベクターを作用させることにより、VA-RNA が発現し、Ago2 が VA-RNA と RISC を形成することで miR-122a の生成が阻害され、HCV ゲノムコピー数の低下につながった可能性が考えられた。

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、Ago1、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を得られることを報告している。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、Ago2 に取り込まれた shRNA 量が減少し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。

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が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。

Ago2 発現カセットを搭載した Ad ベクターに HCV 受容体に対する shRNA 発現カセットを搭載することにより、HCV 受容体の高効率ノックダウンを試みたが、本 Ad ベクターを Huh-7 細胞に作用させたところ、CD81 以外では明らかなノックダウンは観察されなかった。この原因としては、shRNA の配列がよくないのかもしれない。今回使用した shRNA の配列は、既に高効率なノックダウンが報告されている siRNA の配列を参考に作製したが、siRNA と shRNA とでは最適な配列が異なることが知られており、shRNA の配列を最適化する必要があるかもしれない。今後は、shRNA の配列を検討する予定である。

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

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。さらに TuD-RNA 発現 Ad ベクターを用いて HCV レプリコンを高効率に抑制することに成功した。
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。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。さらに shRNA 発現 Ad ベクターを用いて、HCV 感染受容体の一つである CD81 の発現を抑制することに成功した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

1. Sakurai F, Furukawa N, Higuchi M, Okamoto S, Ono K, Yoshida T, Kondoh M, Yagi K, Sakamoto N, Katayama K, Mizuguchi H. Suppression of hepatitis C virus replicon by adenovirus vector-mediated expression of tough decoy RNA against miR-122a. *Virus Res.* 165: 214-8. (2012)
2. Yoshida T, Takayama K, Kondoh M, Sakurai F, Tani H, Sakamoto N, Matsuura Y, Mizuguchi H, Yagi K. Use of human hepatocyte-like cells

derived from induced pluripotent stem cells as a model for hepatocytes in hepatitis C virus infection. *Biochem Biophys Res Commun.* 416: 119-24. (2011)

G-2 学会発表

1. 櫻井文教、古川智久、樋口麻衣子、岡本小百合、小野かおり、形山和史、立花雅史、近藤昌夫、八木清仁、坂本直哉、水口裕之。Tough Decoy RNA 発現アデノウイルスベクターによる miR-122a 阻害と C 型肝炎ウイルス増殖阻害に関する検討。遺伝子デリバリー研究会 2011. 2011 年 9 月 1-2 日。大阪。
2. 山根誠司、吉田孟史、高山和雄、近藤昌夫、櫻井文教、谷英樹、坂本直哉、松浦善治、水口裕之、八木清仁。ヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いた HCV 感染モデルの作製。日本薬学会第 132 年会。2012 年 3 月 28-31 日。札幌。
3. 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
4. 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
5. 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

6. 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

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

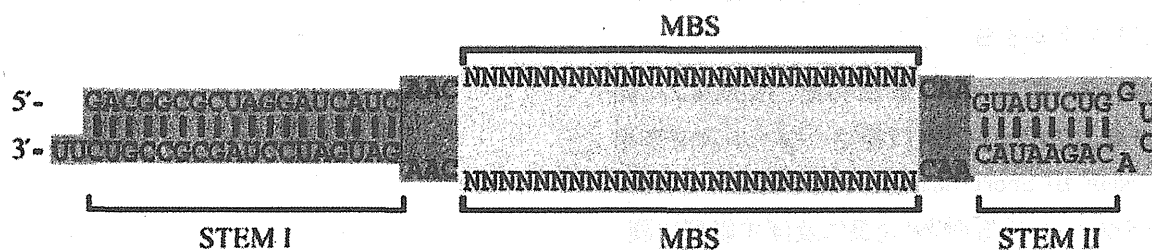


Fig.1 Representative Structure of the TuD-RNA.

MBS; miRNA-binding site.

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

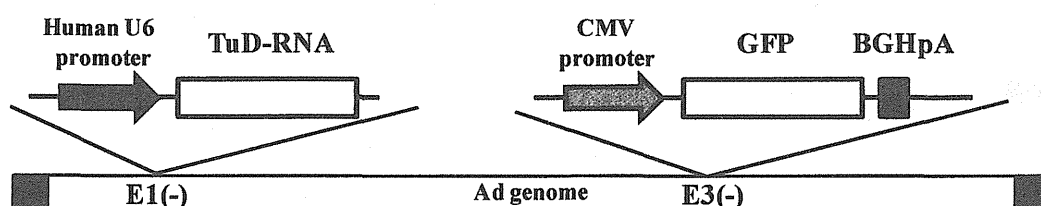


Fig.2 Ad vector genome containing the TuD-RNA expression cassette.

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

Table 1. Oligonucleotides for shRNA against HCV receptors

shCD81-F	5'-cg <u>gatcgatgacctcttctcc</u> ttcaagaga <u>ggagaagaggatcatc</u> gac tttt ggaa t-3'
shCD81-R	5'-ctagattccaaaaa <u>gatcgatgacctcttctcc</u> tctcttgaa <u>ggagaagaggatcatc</u> gac t-3'
shClaudin1-F	5'-cg <u>taacattaggaccttagaa</u> ttcaagaga <u>ttctaaggctcta</u> atgta tttt ggaa t-3'
shClaudin1-R	5'-ctagattccaaaaa <u>taacattaggaccttagaa</u> tctcttgaa <u>ttctaaggctcta</u> atgta-3'
shSR-BI-F	5'-cg <u>gcagcaggctcta</u> aagaac ttcaagaga <u>gttctaaggacctgctgc</u> tttt ggaa t-3'
shSR-BI-R	5'-ctagattccaaaaa <u>gcagcaggctcta</u> aagaac tctcttgaa <u>gttctaaggacctgctgc</u> -3'
shOccludin-F	5'-cg <u>gaagaaagatggacag</u> gta ttcaagaga <u>tacctgtccatcttcttc</u> tttt ggaa t-3'
shOccludin-R	5'-ctagattccaaaaa <u>gaagaaagatggacag</u> gta tctcttgaa <u>tacctgtccatcttcttc</u> -3'

Underlines indicate the sense and antisense sequences of shRNA.

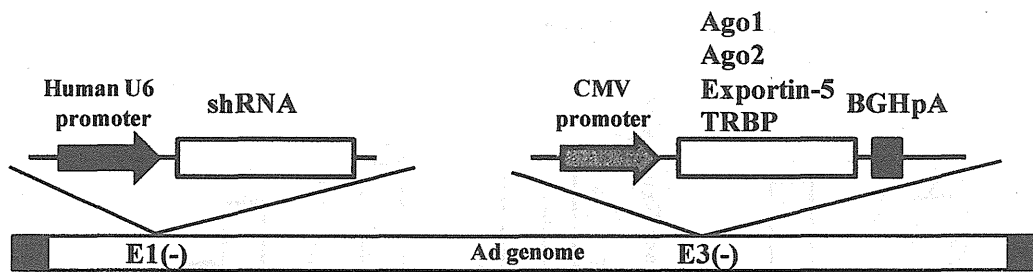


Fig.3 Ad vector genome containing shRNA- and RNAi-related protein Expression cassettes.
Ago; Argonaute.

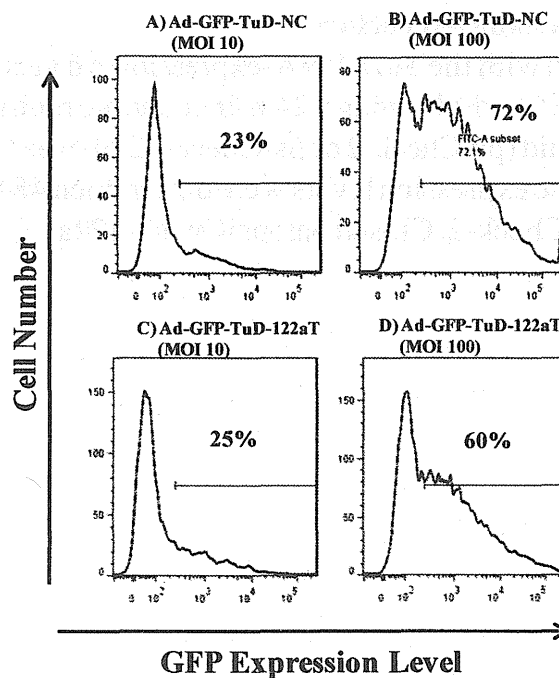


Fig.4 GFP expression levels in Huh7 cells following transduction with the TuD-RNA-expressing Ad vectors.
Huh7 cells were transduced with the TuD-RNA-expressing Ad vectors at the indicated MOIs for 1.5 h. Following a 48 h-incubation, GFP expression levels were examined by flowcytometry.

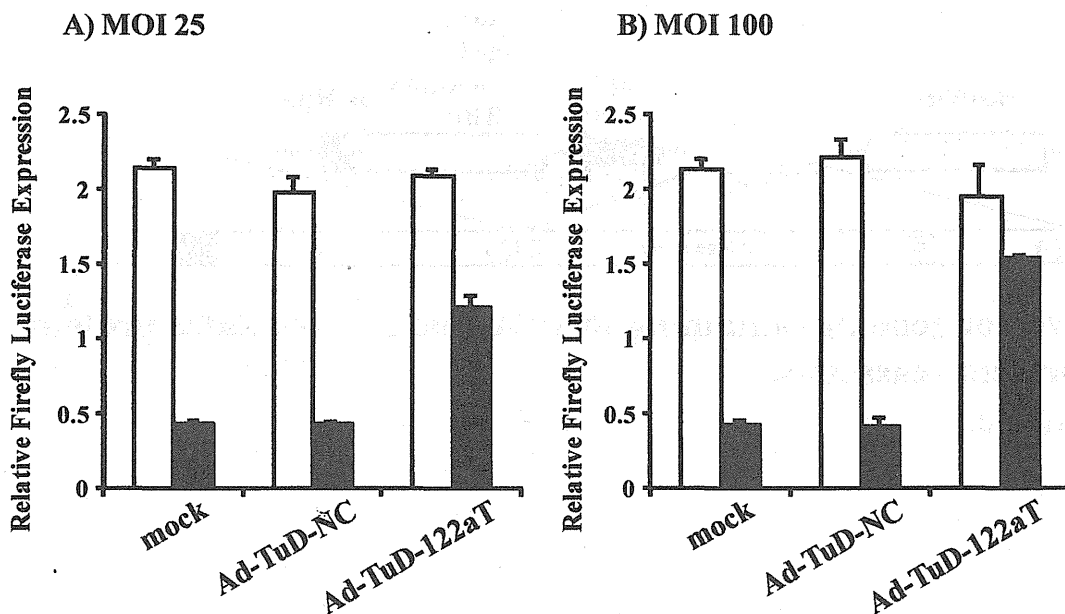


Fig.5 Inhibition of miR-122a in Huh7 cells following transduction with the TuD-RNA-expressing Ad vectors.

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.

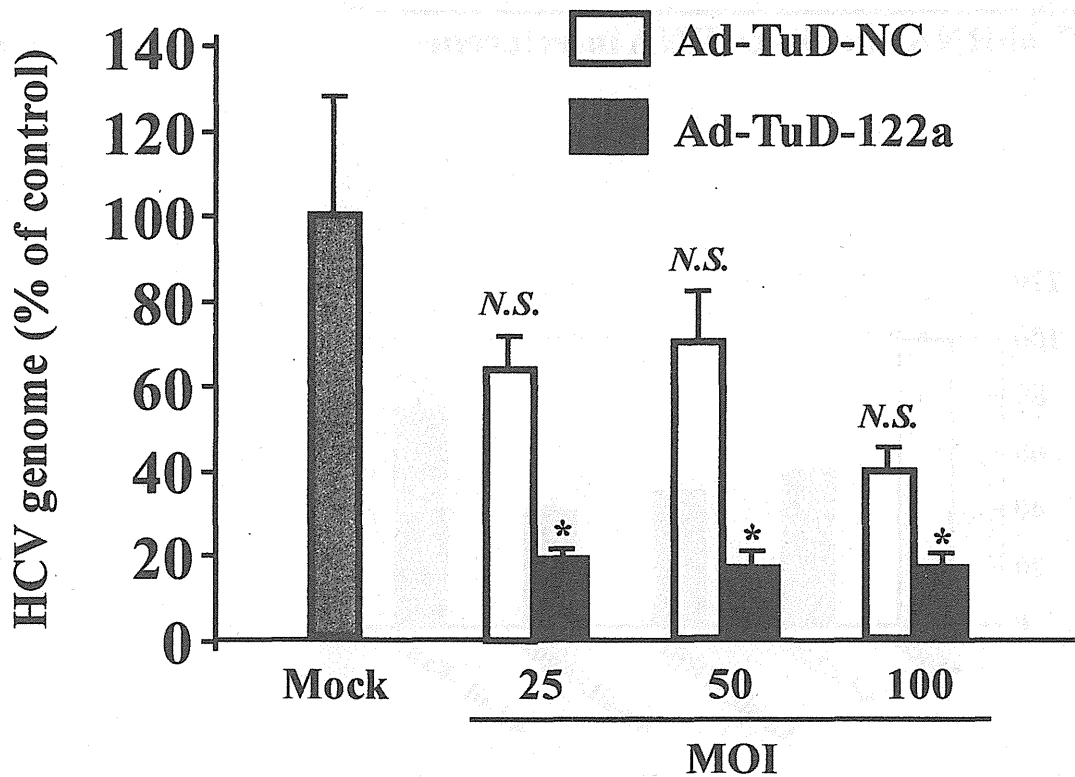
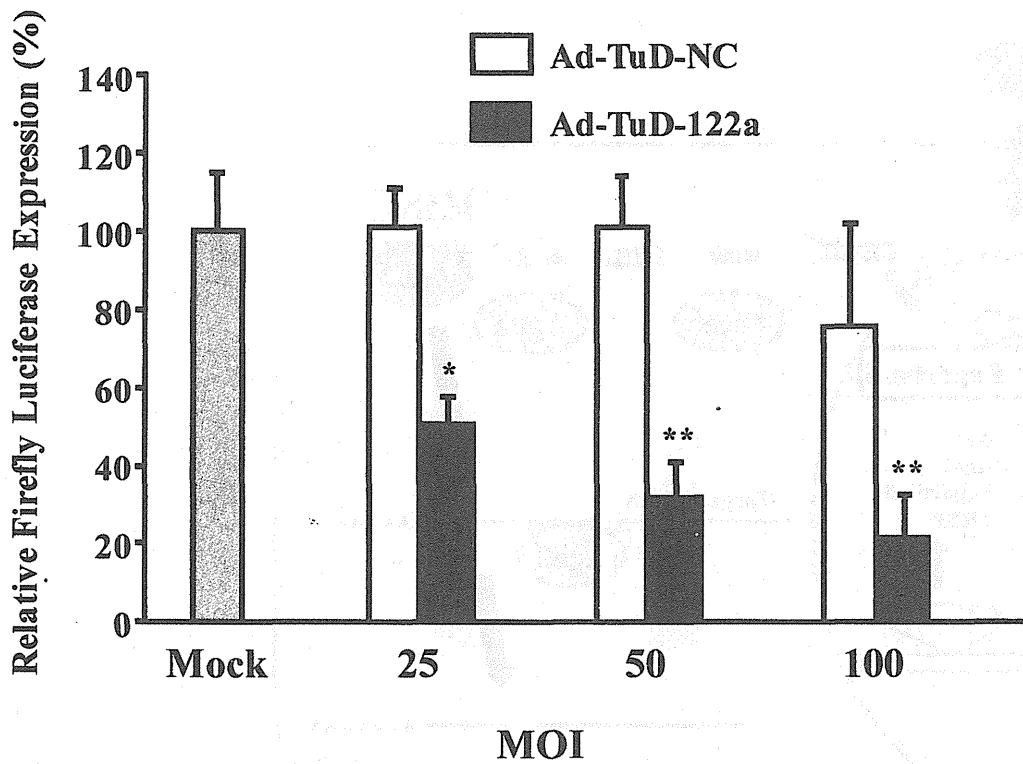


Figure 6. Suppression of the HCV replicon by Ad vector-mediated TuD-122a expression. (Upper Graph) Firefly luciferase expression levels and (Lower Graph) HCV replicon RNA levels in Huh-7.5.1 1bFeo cells following transduction with the Ad vectors. All the data are shown as the means \pm S.D. (n=3). N.S.: not significant. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$ between mock-transduced cells and cells transduced with Ad-TuD-122a.

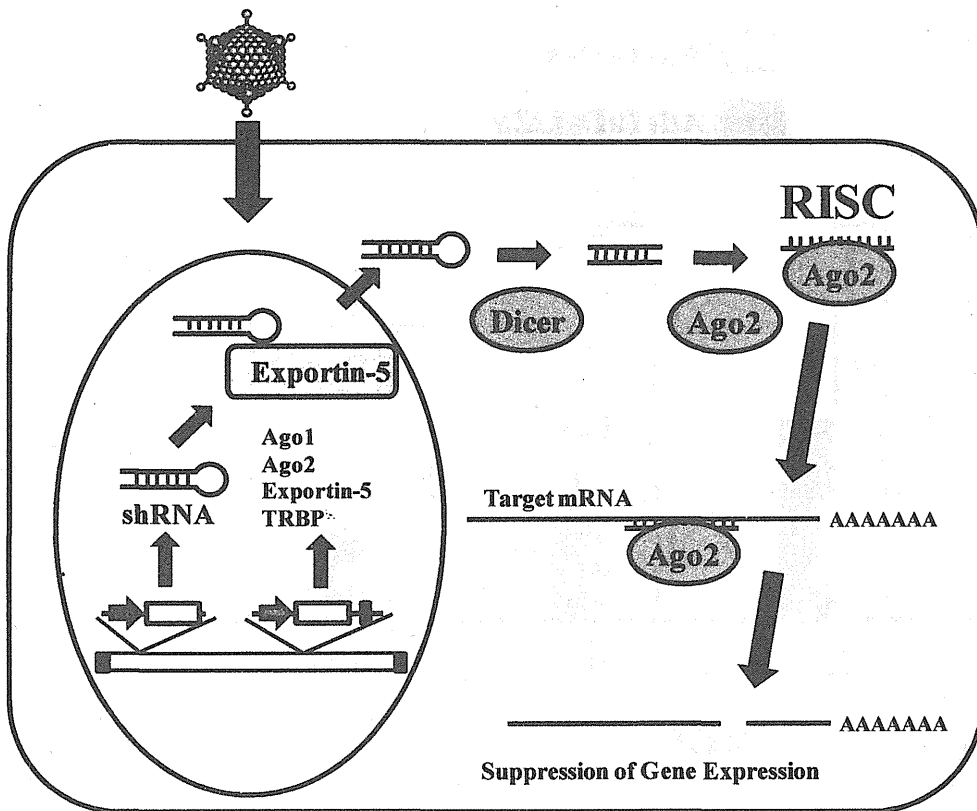


Fig.7 shRNA-mediated RNA interference.

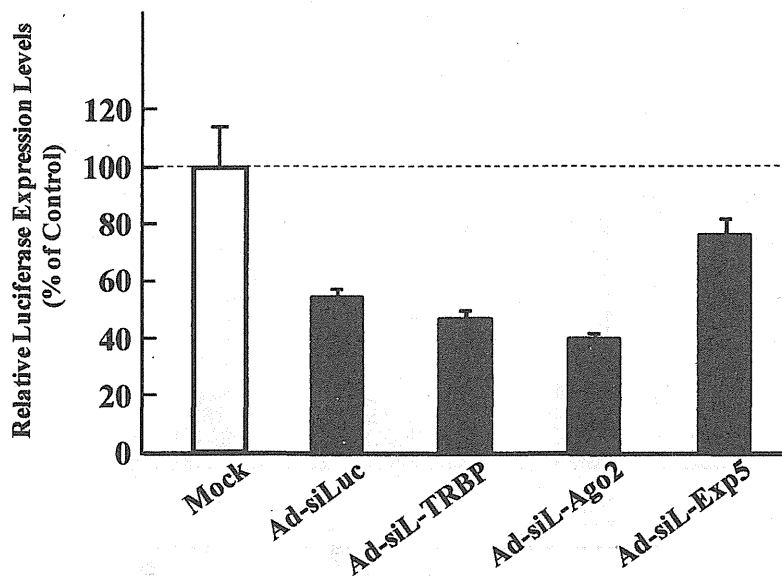


Fig.8 shRNA-mediated knockdown of firefly luciferase expression following transduction with the Ad vectors expressing shRNA and RNAi-related proteins.

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

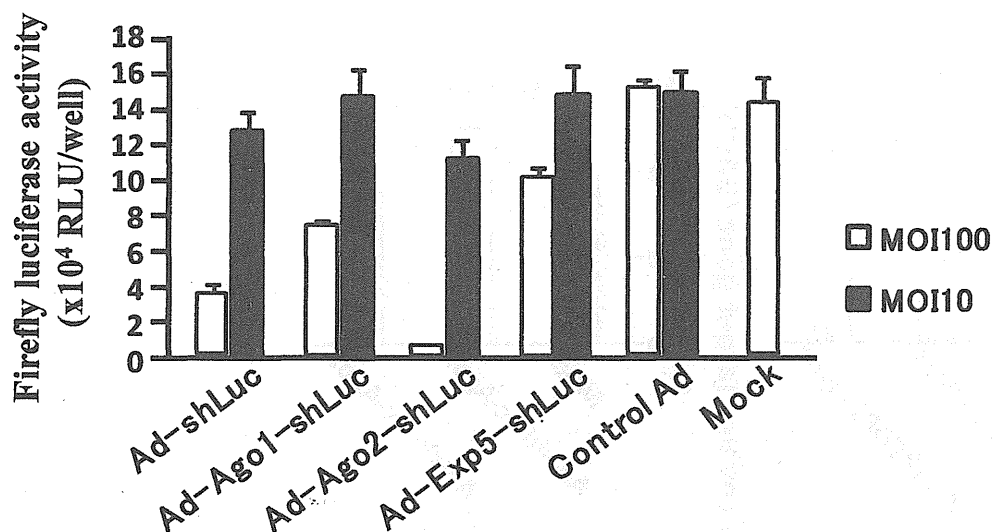


Fig.9 shRNA-expressing Ad vector-mediated knockdown of Firefly luciferase gene.

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 chemiluminescence assay 48 hr after transduction.

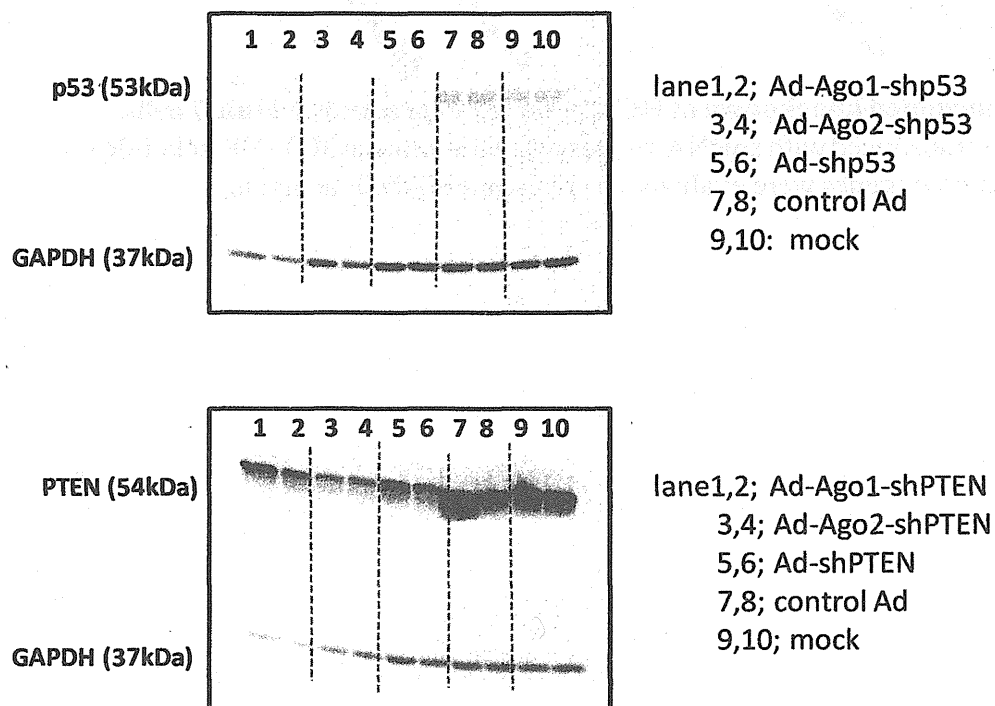


Fig.10 shRNA-expressing Ad vector-mediated knockdown of endogenous gene expression.

(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.

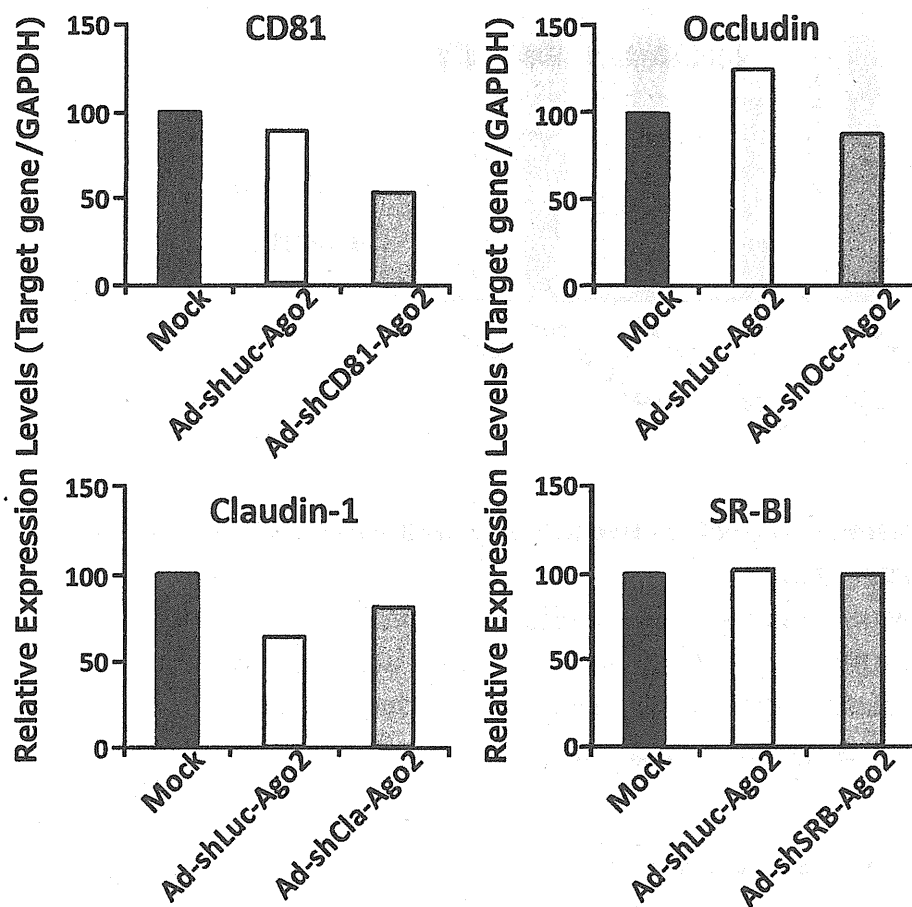


Fig.11 shRNA-mediated knockdown of HCV receptor expression in Huh-7 cells. Huh-7 cells were transduced with shRNA-expressing Ad vectors at 3000 VP/cell. mRNA levels of HCV receptor genes were evaluated by real-time RT-PCR analysis.