

総括研究報告書

抗 C 型肝炎ウイルス活性と高いインターフェロン誘導能を併せ持つ

高機能型核酸医薬の創製に関する研究

研究代表者 山口 朋子  
独立行政法人医薬基盤研究所 研究員

研究要旨

現在、全世界で 2 億人の HCV 感染者が存在し、さらにその数が年間 300 万人ずつ増加していることから、革新的抗 HCV 薬の開発が期待される。中でも核酸医薬には大きな期待が寄せられており、特にデンマークの Santaris ファーマ社が開発中の miR-122 を阻害する LNA (miR-122 は HCV の複製に必須) は、臨床試験で有望な結果を示している。しかし既存の核酸医薬は、副作用軽減のため自然免疫活性化能を大きく低減させており、患者自身の免疫機能を利用できていない。そこで本研究においては、抗 HCV 活性に加えて、自然免疫を活性化し I 型 IFN を誘導可能な核酸医薬を開発することとした。

これまでの研究により、細胞質において非自己 RNA を認識する RIG-I (Retinoic acid-inducible gene-1) を活性化させると高効率に IFN 産生を誘導できることが報告されている。RIG-I は、5'末端に 3 リン酸基を持つ二本鎖 RNA と高い親和性を有することから、本研究では miR-122a のアンチセンス配列に RIG-I に結合可能な 5'末端に三リン酸基をもつ二本鎖 RNA をつなげた新規アンチセンスオリゴヌクレオチド (Antisense oligo nucleotide; ASO) を作製し、HCV 増殖抑制効果を検討した。また、核酸医薬の I 型 IFN 産生誘導を評価するために、自然免疫活性化による I 型 IFN 産生誘導を評価可能な培養細胞系の評価を行った。

**分担研究者**

櫻井 文教 大阪大学大学院薬学研究科  
准教授

**A. 研究目的**

近年、抗 HCV 薬として Small Interfering RNA (siRNA) や Locked Nucleic Acid (LNA) などの核酸医薬が注目され、臨床試験でも優れた治療効果が得られている。しかし既存の核酸医薬は、副作用軽減のため自然免疫を活性化しないよう設計されており、患

者の免疫機能が活用されていない。優れた核酸医薬を開発するには、免疫賦活化能を付与する必要がある。そこで、本研究では、C 型肝炎ウイルス (HCV) の感染を抑制可能な核酸医薬を化学修飾することで、本来の抗 HCV 活性に加えて、インターフェロン (IFN) を誘導可能な我が国独自の高機能型核酸医薬を創製することを目的とする。

**B. 研究方法**

本研究は、研究代表者 山口、分担研究者 櫻井の計 2 名で遂行した。当該年度においては、高効率に

自然免疫を活性化するとともに、複数の標的遺伝子をノックダウン可能な分岐型 Small interfering RNA (siRNA)を開発し、その効果について検討した。さらに、自然免疫活性化による IFN 誘導効率に IL28B 遺伝子の一遺伝子多型 (Single Nucleotide Polymorphism; SNP) が関与する可能性が示唆されている。そこで、新規 HCV 感染評価系として注目される iPS 細胞における IL28B 遺伝子の SNP について解析した(山口)。また、LNA122-DS の HCV 増殖抑制効果について検討した(櫻井)。

### C. 研究結果

- (1) HCV ゲノム 5' 非翻訳領域を標的とした siRNA 配列の選択をした。
- (2) 5' 末端に 3リン酸基を有した分岐型 siRNA (3ptsRNA) の作製を行った。
- (3) 3ptsRNA のノックダウン効率に関する検討を行った結果、3ptsRNA は siRNA が 3 本連結した形状であってもノックダウン効率が低下することなく、優れたノックダウン効率を示すことが明らかとなった。
- (4) 3ptsRNA による I 型 IFN 誘導に関する検討を行った結果、3ptsRNA は RIG-I のリガンドとして報告されている 5' 末端に 3 リン酸基を持つ二本鎖 RNA (19 塩基) よりも 1000 倍以上高い IFN- $\beta$  の発現を誘導した。また I 型 IFN のみならず、III 型 IFN である INF- $\lambda$  も極めて高効率に誘導された。
- (5) 各種 iPS 細胞における IL28B 遺伝子近傍の SNP 解析を行った結果、ヒト iPS 細胞 2 株がマイナーアリル (T/G) であった。その他の株についてはすべてメジャーアリル (T/T) であった。
- (6) Huh7.5.1 1b Feo 細胞における LNA122-DS による HCV レプリコン抑制効果に関する検討を行った結果、LNA122-DS 導入群では mock と比較して、HCV レプリコン RNA レベル (HCV レプリコン RNA 由来のルシフェラーゼ活性) を 22% まで抑制した。
- (7) Hec1B/miR-122 Con1 細胞における LNA122-DS による HCV レプリコン抑制効果に関する検討を行った結果、LNA122-DS は miR-122 を阻害可

能であるとともに、1 型 IFN を誘導することで高効率に HCV を抑制可能であることが示された。

- (8) Hec1B/miR-122 Con1 細胞における LNA122-DS による IFN-stimulated gene (ISG) の発現誘導解析した結果、LNA122-DS は Hec1B/miR-122 Con1 細胞においても効率よく ISG の発現を誘導することが示された。
- (9) LNA122-DS による HCVcc 増殖抑制効果に関する検討した結果、LNA122-DS は HCV レプリコンのみならず、HCVcc の増殖を従来の miR-122 に対する ASO よりも高効率に抑制可能であることが示された。

### D. 結論

1. 5' 末端に 3リン酸基を持つ分岐型 siRNA である 3ptsRNA を開発した。3ptsRNA は、高効率に I 型 IFN を誘導可能であるとともに、従来の siRNA と同程度のノックダウン効率を示した。
2. 各種ヒト iPS 細胞における IL28B 遺伝子近傍の SNP を解析したところ、各細胞株で異なる SNP を有していることが明らかとなった。
3. LNA122-DS は、Hec1B/miR-122 細胞において 1 型 IFN ならびに ISG の発現を誘導可能であった。
4. LNA122-DS は Hec1B/miR-122 細胞において、HCV レプリコンならびに HCVcc の増殖を抑制可能であった。
5. LNA122-DS は、1 型 IFN の発現を誘導しない Huh7.5.1 1b Feo 細胞においても、従来の miR-122 に対する従来のアンチセンスオリゴヌクレオチドよりも高い HCV レプリコン抑制効果を示した。