

## 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

#### 分担研究報告書

## I 型インターフェロン産生誘導を評価可能な培養細胞系の評価に関する検討

## および分岐型 Small Interfering RNA による HCV 増殖抑制に関する検討

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

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200万人にものぼり、世界で最大のウイルス感染症の一つである。HCV感染患者は高い割合で慢性肝炎を発症し、その後、肝硬変、肝癌へと移行することから、革新的治療薬の開発は緊急的な課題であるといえる。現在、C型肝炎に対する主な治療法としては、HCVの複製を阻害するペグインターフェロンおよびリバビリンの併用療法が主流であるが、遺伝子型1bの高ウイルス量症例では奏効率が約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、新たなC型肝炎治療薬として、Small interfering RNA (siRNA)や Antisense oligonucleotide (ASO)などの核酸医薬に大きな注目が集まっている。従来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いる。しかし、C型肝炎治療薬としてI型インターフェロン (IFN) が用いられていること、HCVに対する免疫を誘導することでより高い治療効果が期待できることを考慮すると、核酸医薬により高い抗HCV活性を付与するには、核酸医薬本来の抗HCV活性に加えて、自然免疫活性化能を付与する必要がある。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。本年度は、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ロ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。

分担研究者  
櫻井 文教 大阪大学大学院薬学研究科  
准教授

協力研究者  
川端 健二 独立行政法人医薬基盤研究所  
プロジェクトリーダー

水口 裕之 大阪大学大学院薬学研究科  
教授

高山 和雄 大阪大学大学院薬学研究科  
大学院生

林 晃平 大阪大学大学院薬学研究科  
大学院生

Ong Tyng Tyng 大阪大学大学院薬学研究科  
大学院生

國戸 偉丸 大阪大学薬学部 学部生

坂本 直哉 北海道大学大学院医学研究科  
教授

加藤 宣之 岡山大学大学院医歯薬総合研究科  
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ことから、その革新的治療薬の開発は世界的な緊急課題であると言える。インターフェロン療法に伴い 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 薬として Small interfering RNA (siRNA)や Antisense oligonucleotides (ASO)などの核酸医薬が注目を集めている。たとえば、HCV の増殖に肝細胞特異的 microRNA である miR-122a が重要であることが明らかとなっており、miR-122a に対する ASO を作用させることで HCV の感染を抑制可能である。既に miR-122a に対する ASO は、欧米のベンチャ

ー企業によって臨床試験が行われており、第 2 相試験においても有望な結果が得られている。これら既存の核酸医薬は副作用軽減のために自然免疫を活性化しないように設計されている。しかし、C 型肝炎治療薬として I 型インターフェロン (IFN) が使用されていることを考慮すると、もし核酸医薬により本来の抗 HCV 活性に加えて、I 型 IFN が産生誘導可能となれば、さらに高い治療効果が期待できると考えた。

そこで本研究では、核酸医薬に自然免疫活性化能を付与し I 型 IFN を産生誘導することを試みた。昨年度の検討としては、I 型 IFN 産生誘導に重要なパターン認識受容体の発現および I 型 IFN 産生能を各種肝細胞株を用いて検討した。また今後、ヒト iPS 細胞由来肝細胞は、ヒト初代肝細胞に代わる新たな HCV 感染評価系として利用されていくことが予想される。これまでにヒト iPS 細胞由来肝細胞に HCV レプリコンを導入することにより、HCV レプリコンが増殖・維持されることが報告されている。そこで、ヒト iPS 細胞およびヒト iPS 細胞由来肝細胞におけるパターン認識受容体の発現を検討した。本年度は、I 型 IFN を高効率に活性化するとともに、複数の標的配列を同時にノックダウンすることを目的に、5'末端に 3 リン酸基を有する複数の siRNA を連結させた分岐型 siRNA (3ptsRNA)を開発し、その機能を評価した。また近年、自然免疫活性化による I 型 IFN 誘導に、IL28B 遺伝子近傍の一塩基多型 (Single nucleotide polymorphism; SNP) が影響することが報告されている。そこで、各種 iPS 細胞における IL28B 遺伝子近傍の SNP について解析した。

## B. 研究方法

### 1. HCV ゲノム 5'非翻訳領域を標的とした siRNA 配列の選択

HCV ゲノムのなかでも最も保存性が高く(各種遺伝子型で保存されている)、かつ変異が入りにくい領域である HCV ゲノム 5'非翻訳領域に対して、siRNA 11 種を設計した。また 3'非翻訳領域に対しても 1 種の siRNA を設計した。siRNA の設計に関しては、過去の文献および siDirect (<http://sidirect2.nai.jp/>)を用いて行った。HCV レプリコン発現細胞である

Huh7.5.1. 1b Feo 細胞を 48-well plate に  $2 \times 10^4$  cells/well で播種した。翌日、細胞に siRNA を最終濃度 25 nM で Lipofectamine RNAiMAX を用いて Transfection した。Transfection 48 時間後、ピッカジン LT2.0 を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。Negative Control siRNA としては、AllStars Negative Control siRNA (Qiagen) を用いた。

## 2. 5' 末端に 3リン酸基を有した分岐型 siRNA (3ptsRNA) の作製

上記 1 で選択した siRNA を連結することで、3ptsRNA を設計した。Negative control 3ptsRNA としては、Green fluorescence protein (GFP)、 $\beta$ -galactosidase (LacZ)、chloramphenicol acetyl transferase (CAT) に対する siRNA を連結したものを、用いた。設計した配列をコードした合成オリゴ DNA と T7 RNA polymerase enzyme kit (MEGAscript kit, Ambion) を用いて各 Strand を合成した。各 Strand は、15% denaturing PAGE で泳動後、回収した。回収した RNA は、混合後、98 °C でインキュベートしたのち、室温で徐々に冷却することによってアニーリングさせた。各 Strand がアニーリングし 3ptsRNA が形成されているか否かについては、電気泳動により確認した。

## 3. Dicer による 3ptsRNA の切断実験

10pmol の 3ptsRNA を Recombinant Human Turbo Dicer Enzyme (Genlantis) と混合し、37 °C で 18 時間インキュベートした。その後、電気泳動により Dicer による切断を確認した。

## 4. 3ptsRNA のノックダウン効率に関する検討

上記 1 と同様の方法により、3ptsRNA を Huh7.5.1 1b Feo 細胞に Lipofectamine RNAiMAX を用いて導入した。Transfection 48 時間後に、ルシフェラーゼアッセイによりノックダウン効率を検討した。

## 5. 3ptsRNA による I 型 IFN 誘導に関する検討

ヒト不死化肝細胞株である PH5CH8 細胞 (岡山大学・加藤宣之先生より供与) を 24-well plate に  $1 \times 10^5$  cells/well で播種した。翌日、3ptsRNA を

Lipofectamine RNAiMAX を用いて最終濃度 25nM で Transfection した。Poly I:C については、最終濃度 2.5  $\mu$ g/mL で Transfection した。Transfection 12 時間後に Isogen を用いて RNA を回収し、Real-time RT-PCR により mRNA level を解析した。

## 6. 各種 iPS 細胞における IL28B 遺伝子近傍の SNP 解析

各種ヒト iPS 細胞よりゲノム DNA を回収したのち、ABI Taqman allelic discrimination kit (ABI 社) を用いて、IL28B 遺伝子近傍の SNP である rs8099917 について解析した。

(倫理面への配慮)

ヒト iPS 細胞における SNP 解析については、(独) 医薬基盤研究所および大阪大学における倫理審査を受け、承認されたのちに実施した。

## 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

まず 3ptsRNA の作製にあたり、HCV ゲノムを高効率にノックダウン可能な siRNA の配列を選択することとした。標的配列としては、HCV ゲノムの 5' 非翻訳領域とした。HCV ゲノムの 5' 非翻訳領域は、miR-122a の標的配列が存在するなど、各種 Genotype で保存性が高く、また変異が生じにくい部位であることから、今回選択した。また 3ptsRNA の作製に用いる各 Strand の合成は、in vitro transcription によって行うため、GG で始まることとなる。そこで siDirect および過去の報告から、5' 末端が GG を持つ siRNA を選択し、そのノックダウン効率を検討した。その結果、60% 以上のノックダウン効率を示す siRNA 3 種を同定した。そこで、これら 3 種の siRNA を用いて 3ptsRNA を設計することとした。

### 2. 5' 末端に 3リン酸基を有した分岐型 siRNA (3ptsRNA) の作製

上記 1 で選択した siRNA 3 種を連結させた 3ptsRNA を開発した (Figure 1)。siRNA 間には、スペーサーとし

て4塩基挿入した。また、HCV ゲノムに対してアンチセンス鎖が RISC に残るように、アンチセンス鎖の3'末端が2塩基突出した形状にした。その結果、3ptsRNA は1本差 RNA のみ、また2本の Strand のみをアニーリングしたものよりもバンドが上昇していたことから、3本の RNA 鎖が設計通りアニーリングしていることが示唆された。なお、一本鎖 RNA のみを泳動した場合、また2本の Strand のみをアニーリングしたものを泳動した場合にはそれぞれ Strand によってバンドの位置が異なったが、これは RNA 鎖が分子内で高次構造を取ったためと推察された。

### 3. Dicer による 3ptsRNA の切断実験

3ptsRNA は細胞内において、Dicer によって切断されることで siRNA として機能するものと予想される。そこで、3ptsRNA が Dicer によって切断されるか否か検討した。その結果、Dicer で処理したところ、従来の siRNA と同じ位置にバンドが確認されたことから、3ptsRNA は Transfection 後、細胞内において Dicer によって切断されることが示唆された。

### 4. 3ptsRNA のノックダウン効率に関する検討

そこで次に、3ptsRNA のノックダウン効率について検討した。Huh7.5.1 1b Feo 細胞に 3ptsRNA を Transfection したところ、5nM で約 50%、25nM で約 85%と、従来の siRNA と同程度のノックダウン効率を得られた(3ptsRNA は1分子に siRNA を3分子含むことから、3ptsRNA の3倍の濃度の siRNA と比較した)。以上の結果より、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。なお、Huh7.5.1 細胞は RIG-I 遺伝子に変異が生じているため、RIG-I を介した自然免疫活性化を示さない。従って本結果は 3ptsRNA の RNA 干渉によるノックダウン効率のみを評価していると言える。

### 5. 3ptsRNA による I 型 IFN 誘導に関する検討

次に 3ptsRNA が肝細胞に導入後、I 型 IFN を誘導可能か検討した。前述のように Huh7.5.1 細胞は RIG-I 遺伝子に変異が入っているために、RIG-I リガンドに

よる自然免疫活性化を評価できない。また昨年度の検討より、HepG2 や Hep3B などの Cell line も RIG-I のリガンドに不応性であることから、PH5CH8 細胞を用いて 3ptsRNA による I 型 IFN 産生誘導について検討した。その結果、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。

### 6. 各種 iPS 細胞における IL28B 遺伝子近傍の SNP 解析

ヒト iPS 細胞 12 株における rs8099917 の SNP について検討したところ、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。

## D. 考察

昨年度は、RIG-I のリガンドを作用させることで自然免疫活性化により I 型 IFN の発現上昇を示すヒト細胞株の探索を行った。それらの結果をふまえ、本年度は、高効率に I 型 IFN を誘導可能かつ高いノックダウン効率を示す新規核酸医薬 3ptsRNA の開発を試みた。これまでに複数の siRNA を連結させた分岐型 siRNA について幾つかのグループより開発されている (Nakashima *et al.*, Cehm Commun., 2011, Chang *et al.*, Nucleic Acid Ther., 2012, Lee *et al.*, Mol Cells., 2013)。これらの分岐型 siRNA は、従来の siRNA と同等のノックダウン効率を示すこと、ノックダウンが長期間にわたり持続することが報告されている。本研究では、これらの分岐型 siRNA の 5'末端に、3リン酸基を付与することにより、高効率なノックダウンに加えて、RIG-I を介した高い I 型 IFN 誘導能を付与できるのではないかと考えた。これまでに CpG オリゴ DNA を同様の分岐型の形状にすることで、高効率に自然免疫を活性化可能であることが報告されている (Mohri *et al.*, J.Control.Release, 2012)。実際に、3ptsRNA は従来の siRNA の 5'末端に3リン酸基を付与したものと比較して、高効率に I 型 IFN 発現を誘導した。

3ptsRNA が高効率に I 型 IFN を誘導したメカニズムとしては 2 つ考えられる。一つは、siRNA を連結して分岐型にすることで遺伝子導入試薬 (Lipofectamine RNAiMAX) と複合体を形成しやすくなり、細胞内に取り込まれる量が増加したために I 型 IFN 産生量が増加したと考えられる。もう一つは、RIG-I はリガンドが結合したのち、二量体もしくは多量体を形成してシグナルを下流に伝える。3ptsRNA では、RIG-I のリガンドとなりうる 5' 末端の 3 リン酸基がお互いに近傍に存在するため、RIG-I の多量体化が速やかに起こるものと予想される。

今回、3ptsRNA は I 型 IFN のみならず、III 型 IFN も高効率に誘導することが示された。III 型 IFN も I 型 IFN と同様、抗 HCV 活性を有することが報告されている。これまでに III 型 IFN も RIG-I の下流分子である IPS-1 を介して発現誘導されることが報告されていることから、本検討においても 3ptsRNA が RIG-I を介して III 型 IFN の発現を誘導したものと考えられる。

siRNA の末端構造 (平滑末端か突出末端か) は、RISC において siRNA のどちらの Strand が RISC に残るかを左右する重要な要因である (Sano *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2008)。すなわち、siRNA のアンチセンス鎖 (RISC に残るべき Strand) の 3' 末端が 2 塩基突出した末端構造を取る必要がある。また、HCV の RNA ゲノムはプラス鎖であり、複製の際にマイナス鎖も形成されるが、マイナス鎖には RISC がアクセスできないため、siRNA の標的にはなりえないことが報告されている (Lisowski *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2013)。そこで本検討では、HCV ゲノムのプラス鎖を効率よくノックダウンできるよう、3ptsRNA のアンチセンス鎖の 3' 末端が 2 塩基突出した構造になるように設計した。実際に予備検討では、アンチセンス鎖の 3' 末端を 2 塩基突出した構造にしたものは、平滑末端にしたものよりも高いノックダウン効率を示した。一方で、RIG-I を介した I 型 IFN 誘導については、突出末端よりも平滑末端の方が高効率に I 型 IFN を誘導することが報告されている (Schlee *et al.*, *Immunity*, 2009)。今後、3ptsRNA において平滑末端と突出末端で、I 型 IFN 誘導効率に違いがみられるか検討する予定である。

近年、iPS 細胞由来肝細胞 (iPS-Hepa) は新たな HCV 感染評価系として注目を集めている。iPS-Hepa では自然免疫が機能していることから、HCV が高効率に感染することは困難かもしれないが、逆に HCV による自然免疫活性化評価系として利用可能であると期待される。特に種々の遺伝的バックグラウンドを有するヒト由来細胞より調製可能な iPS 細胞は、遺伝的バックグラウンドの影響を評価するのに適していると言える。IL28B 遺伝子近傍の SNP は、IFN およびリハビリ療法の治療効果の予測因子として臨床応用されているが、rs8099917 がマイナーの患者では治療開始前より肝臓での ISG の発現が高いことが知られている。すなわち、rs8099917 が肝細胞における自然免疫活性化に影響している可能性が示唆される。そこで、本年度はまず各種 iPS 細胞における IL28B 遺伝子近傍の SNP について検討した。その結果、メジャーアリルおよびマイナーアリルをもつ iPS 細胞が判明したことから、今度これらの SNP が核酸医薬による自然免疫活性化に及ぼす影響について検討する予定である。

## E. 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。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

G-1 論文発表

- (1) Machitani M., Sakurai F., Katayama K., Tachimana M., Suzuki T., Matsui H., **Yamaguchi T.**, Mizguchi H.

Improving the adenovirus vector-mediated RNAi efficiency by lacking the expression of virus-associated RNAs., *Virus Res.*, in press.

- (2) **Yamaguchi T.**, Tashiro K., Tanaka S., Katayama S., Ishida W., Fukuda K., Fukushima A., Araki R., Abe M., Mizuguchi H., Kawabata K. Two-step differentiation of mast cells from induced pluripotent stem cells., *Stem Cells Dev.*, 22, 726-734 (2013)

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**

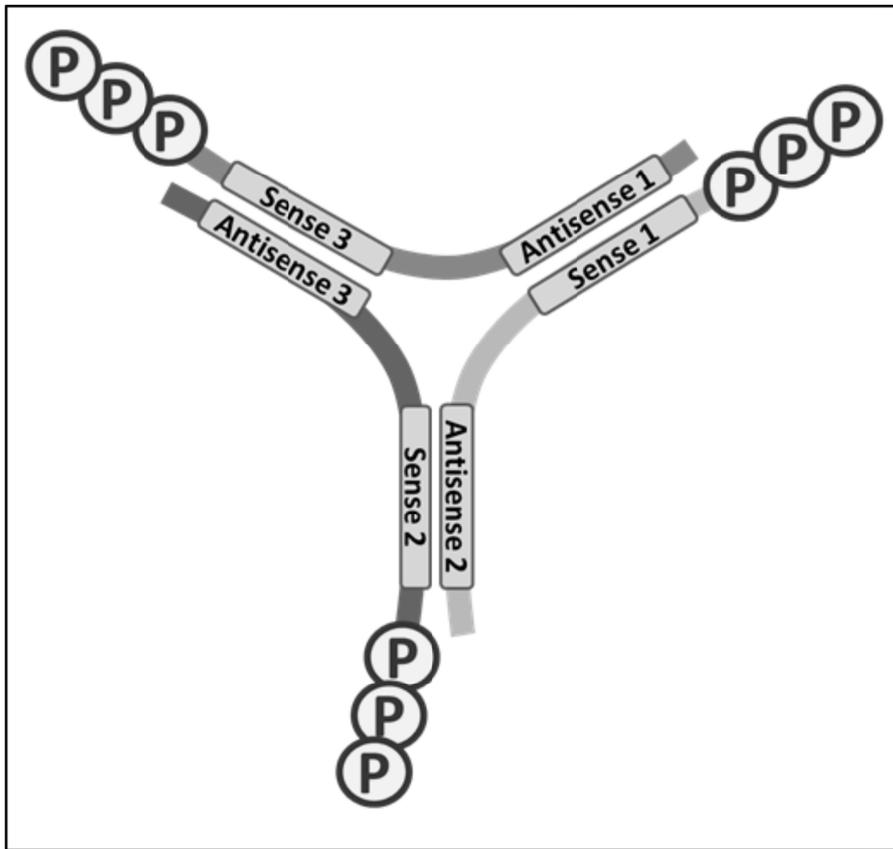
該当なし

**H-2 実用新案登録**

該当なし

**H-3 その他**

該当なし



**Figure 1** Model structure of trimeric triphosphate siRNA (3pt-siRNA)