

20142302/B

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)

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

平成24～26年度 総合研究報告書

研究代表者 山口朋子

平成27(2015)年4月

目 次

I. 総括研究報告

- 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 ----- 1
山口 朋子（独立行政法人医薬基盤研究所 幹細胞制御プロジェクト）

II. 分担研究報告

- 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
----- 5
山口 朋子（独立行政法人医薬基盤研究所 幹細胞制御プロジェクト）

- miR-122aに対する阻害能とI型インターフェロン誘導能を兼ね備えたアンチ
センスオリゴヌクレオチドの開発 ----- 22
櫻井 文教（大阪大学大学院 薬学研究科）

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 42

IV. 研究成果の刊行物・別刷

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) LNA-122DS を作製した。また、新規 ASO と同様に 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) を開発した。その後、LNA-122DS および 3ptsRNA による自然免疫活性化能および 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

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。

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

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。H24 年度においては、主に 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、I 型インターフェロンを高効率に誘導可能な核酸医薬の開発を試みた。H25 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 siRNA (3ptsiRNA) 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)。H26 年度においては、5'末端に 3 リン酸基を有する複数の siRNA を連結させた 3ptsiRNA による自然免疫活性化能について更に詳細に検討を進めるとともに、HCV レプリコン増殖抑制能について検討した(山口)。また、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 ASO である LNA122-DS の自然免疫活性化機構ならびに 3 型 IFN 発現誘導について検討した(櫻井)。

C. 研究結果

- (1) 各種肝細胞株のなかで、RIG-I を介した自然免疫活性化能(インターフェロン産生能)を有している株を検討し、選別した。
- (2) Real-time RT-PCR 法によるインターフェロン発現定量系を確立した。
- (3) ヒト iPS 細胞および iPS 細胞由来肝細胞における自然免疫受容体(RIG-I、Toll-like Receptor など)の発現を解析した。
- (4) 標的遺伝子の発現を阻害可能かつインターフェロンを誘導可能な核酸医薬品を開発した。
- (5) 高効率に HCV ゲノムをノックダウン可能な siRNA をスクリーニングし、その配列を決定した。

- (6) HCV に対する siRNA を連結させた多足型 siRNA を開発し、HCV ゲノムに対し優れたノックダウン効率を示すことを明らかにした。
- (7) 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。
- (8) 5'末端に 3リン酸基を有した分岐型 siRNA (3ptsiRNA)の作製を行った。
- (9) 3ptsiRNA のノックダウン効率に関する検討を行った結果、3ptsiRNA 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。
- (10) 3ptsiRNA による I 型 IFN 誘導に関する検討を行った結果、3ptsiRNA 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-β 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-λ も極めて高効率に誘導された。
- (11) 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 株がマイナーアレル (T/G)であった。その他の株についてはすべてメジャーアレル (T/T)であった。
- (12) 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。
- (13) 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、I 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。
- (14) 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。

- (15) 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。
- (16) 3ptsRNA の末端構造は、Blunt end および Sticky end どちらにおいても同等のノックダウン効率および自然免疫活性化能を有することが示された。
- (17) 3ptsRNA は主に RIG-I を介して自然免疫を活性化しているが、TLR3 も少なからず 3ptsRNA による自然免疫活性化に関与していることが明らかとなった。
- (18) 3ptsRNA 作用群において HCV レプリコンゲノムのノックダウンと自然免疫活性化による更なる HCV 増殖の抑制は観察されなかったものの、核酸医薬によって自然免疫を活性化することにより HCV 増殖を抑制可能であることが示された。
- (19) LNA122-DS は I 型 IFN のみならず、III 型 IFN を誘導可能であることが示された。
- (20) LNA122-DS による 3 型 IFN の発現誘導においても RIG-I が主に関与していることが明らかとなった。
- (21) LNA122-DS は肝細胞において自然免疫を活性化し、従来の ASO である miR-122a に対する ASO より高い HCV 増殖抑制効果を示すものの、それにおける自然免疫活性化の寄与は低いことが示唆された。

D. 結論

1. 3ptsRNA は、主に RIG-I を介して自然免疫を活性化させること、そのためには 5'末端の 3リン酸基が重要であることが示された。
2. 3ptsRNA の末端は、Blunt end、Sticky end どちらでも同等の自然免疫活性化能およびノックダウン効率を有することが示された。
3. LNA122-DS は、主に RIG-I を介して 3 型 IFN の発現を誘導することが示された。
4. LNA122-DS による HCV 増殖抑制効果は、miR-122a 阻害や自然免疫活性化以外の経路

も存在することが示された。

E. 結論

1. 各種ヒト肝細胞株のなかで、RIG-I のリガンドに対し高い感受性を示したのは PH5CH8 細胞であった。他の細胞株においては、ほとんど I 型 IFN 産生はみとめられなかった。
2. 来年度は本成果を基に、I 型 IFN を誘導可能な核酸医薬による抗 HCV 活性の評価を進めていく予定である。
3. miR-122a 阻害能と I 型 IFN 産生誘導可能な新規 ASO である LNA122-DS を作製した。
4. LNA122-DS は、従来用いられてきた miR-122a の阻害剤と同程度の miR-122a 阻害能を有し、かつ I 型 IFN が産生誘導可能であることを示した。
5. 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。
6. 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。
7. LNA122-DS は、Hec1B/miR-122 細胞において I 型 IFN ならびに ISG の発現を誘導可能であった。
8. 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。
9. LNA122-DS は、I 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。
10. 3ptsRNA は、主に RIG-I を介して自然免疫を活性化させること、そのためには 5'末端の 3リン酸基が重要であることが示された。
11. 3ptsRNA の末端は、Blunt end、Sticky end どちらでも同等の自然免疫活性化能およびノックダウン効率を有することが示された。

12. LNA122-DS は、主に RIG-I を介して III 型 IFN の発現を誘導することが示された。
13. LNA122-DS による HCV 増殖抑制効果は、miR-122a 阻害や自然免疫活性化以外の経路も存在することが示された。

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)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、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。H24 年度は、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。H25 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ノックダウン可能な分岐型 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。さらに、H26 年度は、H25 年度に開発した分岐型 siRNA の IFN 誘導機構に関して詳細に検討を行った。さらに、HCV 増殖抑制能についても検討した。

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

立花 雅史 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
実験補助員

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

福原 崇介 大阪大学微生物病研究所
助教

松浦 善治 大阪大学微生物病研究所
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、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の増殖に肝臓特異的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の感染を抑制することが可能である。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。まず、H24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。H25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。H26 年度は、3ptsRNA による自然免疫活性化能について更に詳細に検討を進めるとともに、HCV レプリコン増殖抑制能について検討した。

B. 研究方法

1. 各種ヒト肝細胞株におけるパターン認識受容体発現解析

各種ヒト肝細胞株として、Huh-7、HepG2、Hep3B、PH5CH8 細胞 (岡山大学・加藤宣之先生より供与) における RIG-I、IPS-1、TLR3 の発現レベルを定量的 RT-PCR により検討した。具体的には、各種肝細胞株より Total RNA を回収後、Superscript VILO cDNA Synthesis kit (Invitrogen) を用いて逆転写反応を行い cDNA を合成した。その cDNA を用いて定量的 RT-PCR を行った。用いたプライマーの配列は以下の通りである。RIG-I-F; 5'-GACTGGACGTGGCAAACAA-3', RIG-I-R; 5'-TTGAATGCATCCAATATACACTTCTG-3', IPS-1-F; 5'-TTGTAGAGATTCTGCCTTACCTG-3', IPS-1-R; 5'-AGGGTATTGAAGAGATGCCA-3' TLR3-F; 5'-CAAACACAAGCATTGCGAATCTG-3' TLR3-R; 5'-AAGAAAGTTGTATTGCTGGTGGT-3'.

2. 各種ヒト肝細胞株における I 型 IFN 産生誘導に関する検討

上述の各種ヒト肝細胞株を 12 穴プレートに 1×10^5 cells/well で播種した。播種 24 時間後、RIG-I のリガンドとなる 3 リン酸基を 5'末端に有する二本鎖 RNA (100nM) をトランスフェクション試薬 (Lipofectamine2000、Invitrogen) を用いて導入した。トランスフェクションしてから 24 時間後、細胞より Total RNA を回収し、上述と同様に定量的 RT-PCR により I 型 IFN 発現量を検討した。用いたプライマー

の配列は以下の通りである。IFN- β -F; 5'-ATGACCAACAAGTGTCTCCTCC-3', IFN- β -R; 5'-GCTCATGGAAAGAGCTGTAGTG-3'.

3. 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解析

ヒト iPS 細胞 (Tic 株および Dotcom 株、独立行政法人医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンクより入手) およびそれより分化誘導した肝細胞より Total RNA を回収し、上述と同様に定量的 RT-PCR によりパターン認識受容体および HCV 感染受容体の発現を解析した。分化誘導方法の概略は Figure 1 に示す。HCV 感染受容体遺伝子の発現解析に用いたプライマー配列は以下の通りである。CD81-F; 5'-ACCTCCTGTATCTGGAGCTGG-3', CD81-R; 5'-TTGGCGATCTGGTCCTTGTG-3' SR-BI-F; 5'-TCGCAGGCATTGGACAAACT-3' SR-BI-R; 5'-CTCCTTATCCTTTGAGCCCTTTT-3', Occludin-F; TCAAACCGAATCATTATGCACCA-3', Occludin-R; 5'-AGATGGCAATGCACATCACAA-3', Claudin-F; 5'-GTGGAGGATTTACTCCTATGCCG-3', Claudin-R; 5'-ATCAAGGCACGGGTTGCTT-3'.

4. 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.rnai.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 2×10^4 cells/well で播種した。翌日、細胞に siRNA を最終濃度 25nM で Lipofectamine RNAiMAX を用いて Transfection した。Transfection 48時間後、ピッカジーン 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、All Stars Negative Control siRNA (Qiagen) を用

いた。

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

H25年度、HCVゲノムを切断可能なsiRNA配列を設計した。これらsiRNAを連結することで、3ptsiRNAを設計した。Negative control 3ptsiRNAとしては、Green fluorescence protein (GFP)、 β -galactosidase (LacZ)、chloramphenicol acetyl transferase (CAT)に対するsiRNAを連結したものを生じた。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3ptsiRNA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。

6. Dicerによる3ptsiRNAの切断実験

10pmolの3ptsiRNA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。

7. 3ptsiRNAのノックダウン効率に関する検討

上記と同様の方法により、3ptsiRNA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。

8. 3ptsiRNA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 1×10^5 cells/wellで播種した。翌日、3ptsiRNA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 μ 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。

9. 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。

10. 3ptsiRNAの5'末端3リン酸基の除去に関する検討

上記5で合成した3ptsiRNA用のRNA Strand (Single strand)をCalf Intestine Phosphatase (CIP)で8時間以上処理することにより、5'末端の3リン酸基を取り除いた。その後、カラム精製によりRNA Strandを精製したのち、上記5と同様に3ptsiRNAを調製した。3ptsiRNAのTransfection実験に関しては、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 1×10^5 cells/wellで播種した。翌日、3ptsiRNAをLipofectamine RNAiMAXを用いて最終濃度25 nMでTransfectionした。Poly I:Cについては、最終濃度2.5 μ 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。

11. 3ptsiRNAによるI型IFN誘導における自然免疫受容体の関与に関する検討

二本鎖RNAを認識することが報告されているToll-like receptor 3 (TLR3)およびRetinoid acid-inducible gene-1 (RIG-I)に対するsiRNAを、Reverse TransfectionによりPH5CH8細胞に最終濃度50nMでLipofectamine RNAiMAXを用いて導入した。24時間後、3ptsiRNA(最終濃度25 nM)、5'ppp-dsRNA(5'末端に3リン酸基を有する19塩基長の二本鎖RNA、Invivogen、最終濃度2.5ng/ μ l)、およびpoly I:C(最終濃度2.5 ng/ μ l)をLipofectamine RNAiMAXを用いてTransfectionした。Transfection 4時間後に培地交換を行い、Transfection 12時間後にTotal RNAを回収し、定量的RT-PCRにより、

Type I および III IFN の mRNA 量を検討した。

12. HCVレプリコンに対する3psiRNAのHCV増殖抑制効果に関する検討

HCVレプリコン発現 Hec1B/miR-122a 細胞 (miR-122a を過剰発現する Hec1B 細胞(ヒト子宮内膜癌細胞株)、Hec1B/miR-122a-Con1 細胞)を 24 well plate に 1×10^5 cells/well で播種した。翌日、作製した 3psiRNA を Lipofectamine RNAiMAX を用いて終濃度 25 nM で Transfection した。Transfection 4 時間後に培地交換を行うとともに、Transfection 48 時間培養後に Total RNA を回収し、定量的 RT-PCR により HCV ゲノム量を定量した。また Transfection 12 時間後に Total RNA を回収し、Hec1B/miR-122a-Con1 細胞における自然免疫応答能を評価した。

(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. 各種ヒト肝細胞株におけるパターン認識受容体発現解析

これまでに種々のヒト肝細胞株が樹立されていることから、まず核酸医薬の認識に関与することが報告されているパターン認識受容体 (RIG-I, TLR3 および RIG-I の下流分子である IPS-1) が、各種ヒト肝細胞株 (HepG2, Hep3B, PH5CH8 細胞) (Huh-7 細胞は RIG-I 遺伝子に変異が入っていることから本検討の対象から外した) においてどの程度発現しているか検討した (Figure 2)。その結果、HepG2 細胞では RIG-I, TLR3 とともに 3 種の細胞株のなかで最も低かった。TLR3 に関しては PH5CH8 細胞が、RIG-I に関しては Hep3B が最も高い値を示した。IPS-1 については 3 種の細胞で大きな違いは見られなかった。

2. 各種ヒト肝細胞株における I 型 IFN 産生誘導に関

する検討

次に各種ヒト肝細胞株に RIG-I のリガンドである 5' 末端に 3 リン酸基を有する二本鎖 RNA を Transfection し、IFN- β 発現を検討した (Figure 3)。そうしたところ、Huh-7、HepG2、Hep3B 細胞においては顕著な IFN- β の発現は誘導されなかった。それに対し PH5CH8 細胞においては約 1000 倍高い IFN- β の発現が誘導された。また Transfection 後の TLR3、RIG-I、IPS-1 の発現についても検討したところ、PH5CH8 細胞においては Transfection 後、TLR3 および RIG-I の発現が著明に上昇していた (Data not shown)。その他の細胞においては明らかな発現上昇は見られなかった。また IPS-1 についても有意な発現上昇は観察されなかった。

3. 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解析

次に、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 (TLR3、RIG-I、IPS-1) の発現を検討した (Figure 4)。まずヒト iPS 細胞に関しては、Tic および Dotcom 株を使用した (両者とも Human dermal fibroblast より樹立)、両者で発現に大きな違いが見られた。まず Tic 株では、Human primary hepatocyte (PH) と比較し、RIG-I、IPS-1 は高い値を示した。一方で TLR3 の発現は PH よりも低かった。Dotcom 株では、TLR3、RIG-I、IPS-1 とともに PH と比較して低いものであった。しかしながら Tic、Dotcom 株ともに Hepatocyte に分化誘導することによって TLR3、RIG-I、IPS-1 は上昇し、PH と同程度もしくは PH 以上の発現を示した。

4. ヒト iPS 細胞およびヒト iPS 細胞由来肝細胞における HCV 感染受容体の発現解析

次に、ヒト iPS 細胞およびヒト iPS 細胞由来肝細胞における HCV 感染受容体 (CD81, SR-BI, Claudin, Occludin) の発現について検討した (Figure 5)。こちらに関しても細胞株によって大きな違いが見られた。まず Tic については、CD81、Occludin の発現は iPS 細胞の状態ですでに PH よりも高い値を示しており、肝細胞に分化誘導することで逆にその発現レベルは

PH と同程度まで減少した。一方、未分化状態 (iPS 細胞) での SR-BI、Claudin の発現は PH と比較し非常に低いものであった。これは肝細胞に分化誘導することで値は上昇したものの、PH と比較すると依然として低いものであった。Dotcom 株においては、4 種全ての感染受容体において未分化状態 (iPS 細胞) では、その発現は PH と比較すると低いものであったが、肝細胞に分化誘導することによって Claudin 以外は PH とほぼ同レベルまで発現上昇していた。

5. HCV ゲノム 5' 非翻訳領域を標的とした siRNA 配列の選択

まず 3ptsiRNA 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 3ptsiRNA 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 3ptsiRNA を設計することとした。

6. 5' 末端に 3 リン酸基を有した分岐型 siRNA (3ptsiRNA) の作製

上記で選択した siRNA 3 種を連結させた 3ptsiRNA を開発した (Figure 6)。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、3ptsiRNA 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。

7. Dicer による 3ptsiRNA の切断実験

3ptsiRNA 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、3ptsiRNA 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、3ptsiRNA 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。

8. 3ptsiRNA のノックダウン効率に関する検討

そこで次に、3ptsiRNA 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 3ptsiRNA 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 (3ptsiRNA は 1 分子に siRNA を 3 分子含むことから、3ptsiRNA の 3 倍の濃度の siRNA と比較した)。以上の結果より、3ptsiRNA 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 3ptsiRNA 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。

9. 3ptsiRNA による I 型 IFN 誘導に関する検討

次に 3ptsiRNA 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 3ptsiRNA による I 型 IFN 産生誘導について検討した。その結果、3ptsiRNA 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- β 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-λも極めて高効率に誘導された。

10. 3ptsRNA の 5'末端 3 リン酸基の除去に関する検討

まず 3ptsRNA による自然免疫活性化機構を検討するために、CIP 処理によって 5'末端の 3リン酸基を取り除いた 3ptsRNA を調製し、I 型および III 型 IFN 誘導能を検討した。これまでに、RIG-I による二本鎖 RNA の認識においては 5'末端の 3リン酸基が重要であることが報告されている。CIP 処理した 3ptsRNA では、従来の 3ptsRNA と比較し、IFN-β および IFN-λ の mRNA 量とも 1/100 以下に減少した。以上の結果より、3ptsRNA による I 型および III 型 IFN 誘導においては、5'末端の 3 リン酸基が極めて重要であることが明らかとなった。しかし、CIP 処理した 3ptsRNA において、I 型 IFN の mRNA 量はほぼ No-treated cells と同レベルまで減少したが、III 型 IFN の mRNA 量は Non-treated cells と比較し依然として高いレベルであった。これは、3ptsRNA が RIG-I のみならず、他の自然免疫受容体に認識され、IFN の発現を誘導しているものと考察された。

次にさらに 3ptsRNA の末端の構造が IFN 発現誘導に及ぼす影響について検討した。これまでに、RIG-I を介した自然免疫活性化においては、Sticky end よりも Blunt end の方が IFN 発現誘導能が高いことが報告されている。そこで、5'リン酸基を有する末端部位が Blunt end の 3ptsRNA と、Sticky end の 3ptsRNA を調製し、その IFN 誘導能を検討した。その結果、Blunt end、Sticky end とともにほぼ同程度の I 型および III 型 IFN 発現誘導能を示した。なお、siRNA における末端構造は、RNA 鎖のどちらが RNA-induced silencing complex (RISC) に取り込まれるか決定する上で重要な因子である。そこで、Blunt end および Sticky end の 3ptsRNA による HCV ゲノムのノックダウン効率について検討したところ、こちらにおいても両者の間に有意な差は見られなかった。以上の結果より、3ptsRNA においては末端構造は Blunt end および Sticky end どちらにおいても同等のノックダウン効率および自然免疫活性化能を有することが示された。

11. 3ptsRNA による I 型 IFN 誘導における自然免疫受容体の関与に関する検討

さらに 3ptsRNA による自然免疫活性化に関する自然免疫受容体を明らかにすることを目的に、二本鎖 RNA を認識する自然免疫受容体である RIG-I および TLR3 を siRNA でノックダウンした細胞に対し、3ptsRNA を Transfection し、IFN 発現誘導能について検討した。まず RIG-I および TLR3 に対する siRNA のノックダウン効率について検討したところ、RIG-I および TLR3 とともに 50 nM で約 50% まで mRNA 量を減少させた。そこで次に RIG-I もしくは TLR3 をノックダウンした細胞に 3ptsRNA を作用させたところ、Control siRNA 前処理群と比較し、IFN-β および IFN-λ とともに約 50% mRNA 量が減少した。一方で、TLR3 をノックダウンした場合には IFN-β および IFN-λ とともに有意な発現量の低下は観察されなかった。しかしながら、RIG-I および TLR3 の両者をノックダウンしたところ、RIG-I のみをノックダウンした場合と比較し、わずかではあるが各種 IFN mRNA 量の更なる減少が観察された。以上の結果より、3ptsRNA は主に RIG-I を介して自然免疫を活性化しているが、TLR3 も少なからず 3ptsRNA による自然免疫活性化に関与していることが明らかとなった。

12. HCV レプリコンに対する 3ptsRNA の HCV 増殖抑制効果に関する検討

これまでに検討より、3ptsRNA は優れた I 型および III 型 IFN 誘導能を有するとともに、HCV ゲノムに対するノックダウン効率を有することから、次に HCV レプリコン発現細胞を用いて、HCV 増殖抑制効果に関して検討を行った。HCV レプリコン細胞としては、miR-122a を過剰発現するヒト子宮内膜癌細胞株である Hec1B/miR-122a 細胞に Con1 株の HCV レプリコンを導入した細胞を用いた。Hec1B 細胞は肝細胞ではないものの、miR-122a を過剰発現させているため、HCV レプリコンが複製可能であること、Huh7.5.1 細胞とは異なり、二本鎖 RNA により自然免疫が活性化することを確認している。まず

Hec1B/miR-122a-Con1 細胞に 3psiRNA を Transfection したところ、Non-treated cells と比較し、IFN- α は約 50 倍、IFN- λ は 100 倍以上高い mRNA 量が誘導された。

つぎに Hec1B/miR-122a-Con1 細胞に 3psiRNA を Transfection し HCV レプリコン増殖抑制効果について検討したところ、3psiRNA 作用群では HCV レプリコンゲノム量は 25 nM で約 25% にノックダウンされた。しかし、Control の siRNA (HCV ゲノムに対する siRNA) を 75nM で Transfection したところ、3psiRNA と同程度のノックダウン効率が得られた。自然免疫活性化能を有する Control の 3psiRNA (HCV ゲノムをノックダウンしない) においても、I 型および III 型 IFN 発現を誘導することで、約 50% まで HCV レプリコンゲノム量が減少した。以上の結果より、3psiRNA 作用群において HCV レプリコンゲノムのノックダウンと自然免疫活性化による更なる HCV 増殖の抑制は観察されなかったものの、核酸医薬によって自然免疫を活性化することにより HCV 増殖を抑制可能であることが示された。

13. 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 株がマイナーアレル (T/G) であった。その他の株についてはすべてメジャーアレル (T/T) であった。

D. 考察

本検討では、I 型 IFN を誘導可能な核酸医薬の開発に先立ち、自然免疫活性化により I 型 IFN 産生誘導を評価可能なヒト肝細胞株の評価を行った。

4 種の肝細胞株の中で、RIG-I リガンド添加後、有意な IFN- β 産生を示したのは PH5CH8 細胞のみであった。その他の細胞については、ほとんど IFN- β 産生は見られなかった。RIG-I や IPS-1 の発現レベルを見ると、HepG2 は低いものの、Hep3B は PH5CH8 細胞と同程度の発現を示していることから、パターン認識受容体の発現レベルと自然免疫活性化による IFN

産生能とは無関係であることが示された。従って、今後核酸医薬による I 型 IFN 産生を評価する際には使用する細胞株に注意する必要があることが示された。

一方で Huh-7 細胞では有意な I 型 IFN 産生は観察されなかった。Huh-7 細胞は他の肝細胞株と比較し、HCV の感染・増殖に重要な miR-122a を発現しており、Huh-7 細胞の Subclone である Huh-7.5.1 細胞は HCV レプリコン細胞の材料として、世界で汎用されている。しかし、Huh-7.5.1 細胞は RIG-I 遺伝子に変異が入っており、そのために HCV レプリコンが安定して維持されることが知られている。Huh-7 細胞は様々な遺伝子変異を有する細胞の集団であり、中には RIG-I に変異を持たない細胞も存在するものと考えられたが(実際に Huh-7 細胞に RIG-I のリガンドを加えて I 型 IFN 産生を観察している論文も存在する)、本検討に用いた Huh-7 細胞では I 型 IFN 産生は観察されなかった。

RIG-I リガンドの導入により高い I 型 IFN 産生誘導を示した PH5CH8 細胞であるが、この細胞では miR-122a の発現量が Huh-7 細胞と比較すると極めて低かった (data not shown)。本研究では、miR-122a を阻害することで HCV の感染・増殖を抑制するとともに、I 型 IFN 産生を誘導することでさらなる抗 HCV 活性を誘導可能な核酸医薬の開発を目指しているが、PH5CH8 細胞が miR-122a を発現していないのであれば、I 型 IFN 産生は評価できても miR-122a 阻害による抗 HCV 活性を評価できないことになる。したがって、本研究で開発した上述のような核酸医薬は他の細胞で評価する必要があることが示された。

これまでに HCV の NS3/4A が IPS-1 を分解することにより、RIG-I/IPS-1 経路による I 型 IFN 産生を抑制することが報告されている。しかし実際に HCV 感染患者の肝臓では I 型 IFN の発現が上昇していること、NS3/4A による IPS-1 分解を報告している論文では、多くの HCV もしくは HCV レプリコンを感染・発現させていること (HCV レプリコン発現細胞では HCV レプリコンゲノムコピー数が 10^4 以上といわれているが、実際の HCV 感染患者では 10 コピー以下) から、実

際の HCV 感染患者の肝細胞においても RIG-I リガンドを導入することで I 型 IFN 産生が誘導可能であると考えた。また核酸医薬本来の抗 HCV 活性により HCV ゲノム量が減少し、NS3/4A 発現量が減少すれば、IPS-1 発現量も回復し、RIG-I/IPS-1 経路による I 型 IFN 産生も回復するものと考えている。

近年、新たな HCV 感染評価系として、ヒト iPS 細胞由来肝細胞に大きな注目が集まっている。ヒト iPS 細胞由来肝細胞の利点としては、①ヒト初代肝細胞と比べて入手しやすいこと、②様々な遺伝的バックグラウンドを有する細胞を利用できること、③TALEN などの組換え酵素を利用することで遺伝子操作を加えた細胞を利用して感染に重要なメカニズムを評価可能であることなどが挙げられる。既にヒト iPS 細胞由来肝細胞に HCV が感染可能であることが報告されており、今後益々ヒト iPS 細胞由来肝細胞が HCV 感染評価系として利用されるものと期待される。しかしこれまでにヒト iPS 細胞由来肝細胞における HCV 増殖や、HCV 感染受容体の発現レベルについては解析が進められているものの、パターン認識受容体などの解析については検討が進められていない。今後、ヒト iPS 細胞由来肝細胞における自然免疫応答を調べていくことで HCV 感染による自然免疫応答について、さらに研究が進んでいくものと期待される。

H24 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、H25 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 およびリバビリン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、H25 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、今後これらの 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。

H26 年度は、3ptsRNA による自然免疫活性化メカニズムについて検討を進めるとともに、RNA 干渉と自然免疫活性化の両方の作用によって更なる HCV 増殖抑制効果が観察されるか検討を行った。

二本鎖 RNA を認識して自然免疫を活性化する自然免疫受容体としては、主に TLR family と RLR (RIG-like receptor) family が同定されている。一方、核酸医薬の場合、主に細胞質において機能を発揮することから、細胞質に効率よくデリバリーする必要がある。従って核酸医薬によって自然免疫を活性化する場合においても、細胞質にて自然免疫受容体に認識された方が自然免疫活性化と核酸医薬本来の薬理作用の両方を効率よく誘導できるのではないかと考えた。そこで今回は細胞質にて二本鎖 RNA を認識し自然免疫を活性化する RIG-I を標的として

3ptsRNA を設計・開発した。これまでの報告より RIG-I は、①5'末端に 3 リン酸基を有する 19bp 以上の二本鎖 RNA を強く認識するとともに、②Sticky end よりも Blunt end を有する二本鎖 RNA によって強く活性化することが明らかとなっている。まず初めに CIP 処理により 5'末端の 3 リン酸基を除いた 3ptsRNA を調製し、自然免疫活性化能を検討した。その結果、CIP 処理により I 型および III 型 IFN の mRNA 量は 100 倍以上減少した。従って、3ptsRNA による自然免疫活性化においては 5'末端の 3 リン酸基が極めて重要であることが示された。一方で、CIP 処理した 3ptsRNA の場合、IFN- β mRNA 量はほぼバックグラウンドレベルであり、約 1/1000 に発現が抑制された。しかし、III 型 IFN の場合には約 1/100 に mRNA 量が減少しただけであり、Non-treated cells と比較すると、依然として 100 倍以上の mRNA が検出された。従って III 型 IFN に関しては 5'末端の 3 リン酸基依存的な誘導経路と非依存的な誘導経路が存在するのかもしれない。

さらに 3ptsRNA による自然免疫活性化経路について検討したところ、RIG-I をノックダウンすることで大きく I 型および III 型 IFN 発現量が減少したことから、3ptsRNA は設計通り RIG-I に認識されることで自然免疫を活性化することが明らかとなった。一方で TLR3 については、TLR のみをノックダウンしても 3ptsRNA による IFN 発現誘導には大きな影響は観察されなかった。しかし、TLR3 と RIG-I の両者を同時にノックダウンした場合には、RIG-I のみをノックダウンした場合と比較して優位に高いノックダウン効率が得られた。従って 3ptsRNA は主に RIG-I を介して自然免疫を活性化するものの、TLR3 も一部関与することが明らかとなった。TLR3 は主にエンドソーム/ライソゾーム膜に局在することが知られている。従って 3ptsRNA は内在化後、エンドソーム/ライソゾームを脱出する以前に TLR3 に認識されていることが示唆された。

これまでに siRNA の末端構造 (Blunt or Sticky end) は、siRNA のどちらの RNA 鎖が RISC に取り込まれるかを決定する重要な因子であることが明らかとなっている。すなわち、アンチセンス鎖の 3'末端

が 2 塩基突出した構造の方が高いノックダウン効率を有することが報告されている(Sano et al., *Nucleic Acid Res.*, 2008)。一方で、RIG-I による自然免疫活性化においては 5'末端に 3 リン酸基を有する末端が Blunt end の方が高い自然免疫活性化能を有することが明らかとなっている(Schlee et al., *Immunity*, 2009)。そこで 3ptsRNA では末端構造を Blunt にすべきか Sticky にすべきか明らかにするため、末端が Blunt end のものと Sticky end のものを調製し、HCV ゲノムに対するノックダウン効率を自然免疫活性化能を検討した。その結果、まずノックダウン効率については、平均値では Sticky end の方が高いノックダウン効率を示したが、Blunt end と比較し有意な差は観察されなかった。これは HCV ゲノムの場合、複製過程でマイナス鎖も形成されるため、3ptsRNA のどちらの Strand が取り込まれても HCV ゲノムのプラス鎖マイナス鎖とどちらかがノックダウンされたためと考察された。次に自然免疫活性化能について検討したところ、こちらについても Blunt end および Sticky end とともに同程度の IFN 発現誘導を示した。これは 3ptsRNA は複雑な構造をとるために、単純な二本鎖 RNA とは RIG-I の認識機構が異なる可能性が考えられた。以上の結果より、3ptsRNA では Sticky end を有していても優れたノックダウン効率および自然免疫活性化能を有することが示された。

これまでに HCV レプリコン発現細胞としては Huh7.5.1 細胞が汎用されている。Huh7.5.1 細胞は RIG-I 遺伝子に変異を有しているため、HCV レプリコンゲノムによる自然免疫活性化が起こらず HCV レプリコンが増殖しやすい環境となっている。一方で Huh7.5.1 細胞では自然免疫活性化が HCV 増殖に及ぼす影響を評価できない。実際に我々も Huh7.5.1 細胞に 3ptsRNA を作用させたところ、IFN 発現の誘導は観察されなかった。そこで本検討では Hec1B 細胞を用いた。Hec1B 細胞は子宮内膜癌細胞株であるが、miR-122a を過剰発現させることで HCV ゲノムが増殖可能であることが報告されている。さらに我々の検討において Hec1B/miR-122a 細胞では RIG-I 経路が機能していることが示された。そこで Hec1B/miR-122a 細胞より作製された HCV レプリコ

ン発現細胞に 3ptsRNA を Transfection し、HCV レプリコン増殖抑制能について検討した。しかしながら、Hec1B/miR-122a-Con1 細胞では自然免疫活性化と RNA 干渉による HCV ゲノムノックダウンの相加効果は観察されなかった。この理由としては、Hec1B/miR-122a 細胞では自然免疫活性化による HCV ゲノム増殖抑制効果が弱いのかもしれない。Hec1B 細胞は I 型 IFN 受容体が発現していない。一方で、RIG-I 経路が活性化すると I 型 IFN 非依存的に IFN-stimulated gene (ISG) の発現が誘導されることが報告されており、Hec1B 細胞でも I 型 IFN 非依存的に ISG が誘導され、HCV レプリコンゲノム量が低下したと思われる。しかしながら I 型 IFN による ISG 発現誘導が起こらないために、十分な抑制が観察されなかったと思われる。現在のところ、HCV レプリコンが維持・増殖可能で、自然免疫活性化も同時に評価可能な細胞は他に報告されていない。今後そのような評価系が開発されれば、3ptsRNA の機能に関しても、より詳細に解析できるものと期待される。

E. 結論

1. 各種ヒト肝細胞株のなかで、RIG-I のリガンドに対し高い感受性を示したのは PH5CH8 細胞であった。他の細胞株においては、ほとんど I 型 IFN 産生はみとめられなかった。
2. 5'末端に 3 リン酸基を持つ分岐型 siRNA である 3ptsiRNA を開発した。3ptsiRNA 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。
3. 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。
4. 3ptsiRNA は、主に RIG-I を介して自然免疫を活性化させること、そのためには 5'末端の 3 リン酸基が重要であることが示された。
5. 3ptsiRNA の末端は、Blunt end, Sticky end どちらでも同等の自然免疫活性化能およびノックダウン効率を有することが示された。

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

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., Mizuguchi 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

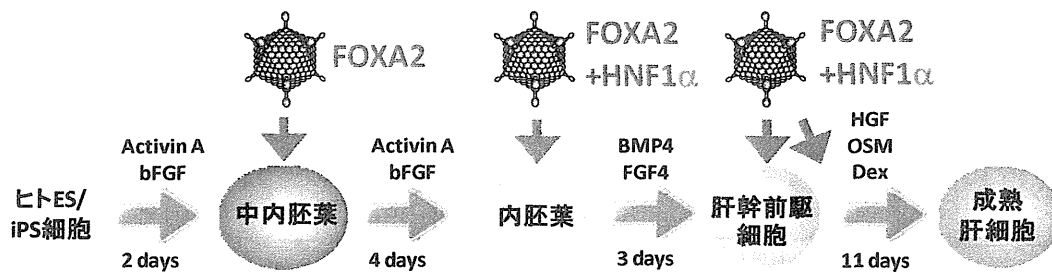


Fig.1 Differentiation of human induced pluripotent stem cells into differentiated hepatocytes by transduction with adenovirus vectors expressing FOXA2 and HNF1 α .

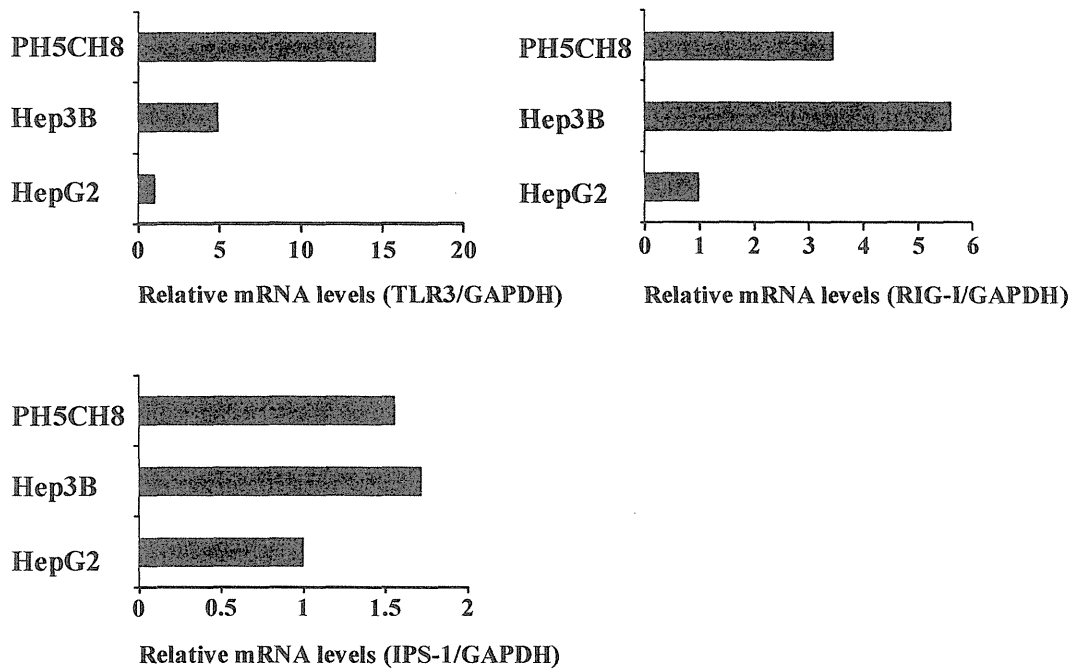


Fig.2 mRNA levels of pattern recognition receptors in human hepatocyte cell lines. mRNA levels of TLR3, RIG-I, and IPS-1 were determined by real-time RT-PCR, and were normalized by those in HepG2 cells.

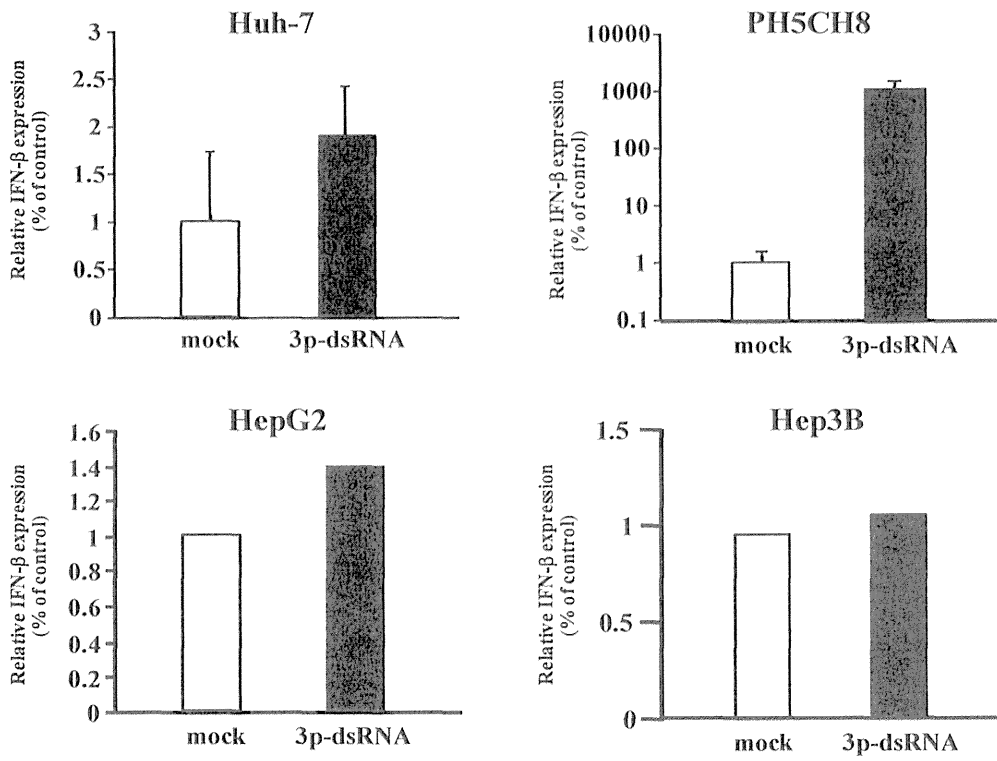


Fig.3 RIG-I ligand-induced IFN- β expression in human hepatocyte cell lines.
 Cells were transfected with triphosphated double-stranded RNA. IFN- β mRNA levels were determined by real-time RT-PCR 12 hrs after transfection.
 3p-dsRNA; 5'-triphosphated double-stranded RNA.