

論文の内容の要旨

論文題目 shRNAを発現するVA RNA欠失アデノウイルスベクターによるC型肝炎
ウイルス複製抑制の検討

氏名 裴 崢

序論

遺伝子治療などに応用されているウイルスのE1とE3領域を欠失した第1世代アデノウイルスベクター(FG-AdV)はほぼ全長のウイルスゲノムが残存しているが、ウイルスタンパク質のプロモーターをトランスに活性化するE1領域を欠失しているため、E1タンパク質を恒常的に発現している293細胞以外ではウイルスの複製は起きず目的遺伝子のみを一過性に発現するベクターである。問題であった*in vivo*投与における肝臓での炎症反応は、中井らにより原因ウイルスタンパク質が同定され、目的遺伝子発現のためにEF1 α プロモーターを用いるだけで殆ど炎症反応を誘起しない「低炎症FG-AdV」となることが報告され、FG-AdVの遺伝子治療への応用の可能性が拡大した。

近年、RNA干渉(RNAi)技術は*in vitro*や*in vivo*における遺伝子機能解析に広く応用されている。一般的にはsmall interfering RNA (siRNA)やmicro RNAをトランスフェクションにより細胞に導入し標的遺伝発現を抑制するが、人工的に設計したshort-hairpin RNA(shRNA)をU6あるいはH1などのPol IIIプロモーターから発現する方法もあり、FG-AdVは、任意のプロモーターを利用可能であるためshRNA導入法として有用性が高く、既に多くの論文が報告されている。しかしアデノウイルスにはPol IIIにより転写される2種類のvirus-associated RNA (VA RNA)と呼ばれるnon-coding RNAが発現しており、FG-AdVにおいてもVA RNAは唯一発現している。

VA RNAにはVA IとVA IIがあり、Exportin 5、RISC、Dicerなどを飽和することにより細胞内のRNA干渉機構を攪乱したり、インターフェロン(IFN)により誘導されるprotein kinase Rに直接結合し不活化することで、ウイルス増殖に適した環境を整備する機能が知られている。また、VA RNA自体がmiRNA様にプロセスされ、複数の細胞遺伝子発現を抑制していることも報告された。VA RNAはウイルス複製には必須ではないため、VA RNA欠失FG-AdV (VA欠失AdV)の作製が試みられたが、作製効率が極めて低く、VA欠失AdVを用いた宿主細

胞遺伝子発現への影響や、shRNA活性の拮抗効果などの検討は未だなされていなかった。

前川らは、部位特異的組換え酵素FLP/FRT系を用いてVA欠失AdVを高効率に作製する方法の作製に成功した(Maekawa *et al.*, *Sci. Rep.*, 2012)。そこで私は作製が可能となったVA欠失AdVを用いることによりVA RNAがshRNA活性を拮抗するかどうかについての検討が可能になると考え、shRNAを応用したC型肝炎ウイルス(HCV)に対する遺伝子治療を最終目的として、VA欠失あるいはVA保持AdV(FG-AdV)を作製し検証を行った。

材料と方法

VA欠失AdV作製には、ヒト型・温度安定型FLP(hFLPe)を高度に発現する293細胞由来の細胞株hde12細胞を用いた。FG-AdV作製には293細胞、HCV複製系として、レプリコン保持細胞としては遺伝子型1bのHuH 5-15細胞と遺伝子型2aのSGR-JFH1/LucNeo (以下SGR-JFH1)細胞を感染細胞系としてはJFH-1感染細胞を用いた。また、細胞内外のウイルスDNA検出とベクター力価測定法の確立にはサル腎臓由来のCV-1細胞とヒト子宮頸癌由来のHeLa細胞を用いた。本研究に用いたFG-AdVの作製は定法に従って行った。VA欠失AdVは、hde12細胞を用いてFRTで挟まれたVA RNA領域をhFLPeにより環状に切り出すことにより調製した。

リアルタイムPCR (qPCR)には、Applied Biosystems社のABIPRISM 7000を用いた。Southern法によるDNA構造解析とHCVのNS5Aタンパク質の検出は定法通りに行い、Digoxigenin発光の検出はFuji Film社のLAS-4000により行った。

結果と考察

VA RNAはアデノウイルスの増殖に必須ではないが、VA RNA欠失アデノウイルスの力価は293細胞でも1/60以下に低下するため、ウイルス複製効率は低下する。そのため、FG-AdVで通常用いている293細胞におけるベクター複製を応用した力価測定法によるVA欠失AdVの正確な力価測定は不可能である。私は、qPCR法による標的細胞へのベクターDNA導入コピー数を用いた力価測定法を考案した。細胞外に残存するベクターDNA量が多い場合にはqPCRによるコピー数の定量は不可能であるため、細胞内外のベクターDNAを識別する方法としてCre/loxPを応用した。Cre依存的にstufferが切り出される標的AdVあるいは標的プラスミドとCre発現AdVをCV-1細胞に同時に導入し、細胞から総DNAを抽出後Southern法によりDNA構造を解析した。細胞内で発現したCreによりプロセスされたDNA、すなわち細胞内のDNAを定量した結果、トランスフェクションではわずか $9\pm 2\%$ のみが細胞内に導入されており、多くのDNAは細胞表面に残存していた。一方FG-AdVでは、 $92\pm 3\%$ のベクターDNAがCreによりプロセスされており、細胞表面に残存したベクターDNAは僅かであり、qPCRにより正確なベクターの導入コピー数を算出することが可能であると結論した。

次に、qPCRに用いるプライマー／プローブを目的遺伝子挿入領域に近接したpIXの領域に設計し、pIXを含むプラスミドとコスミドを用いてベクターDNAの検出感度と直線範囲の検討を行った結果、直線範囲は 10^3 から 10^9 コピーであり、プラスミドコピー数とThreshold cycle (Ct値)の対比ではCt値7から27までは対数の直線性があり、相関係数(r^2)は0.99であり、DNAサイズとは無関係であった。以上の結果をもとに、CV-1細胞に導入した段階希釈をしたFG-AdVを用いて希釈率に対するCt値の直線性の範囲内で各細胞に導入されたウイルスゲノムコピー数の算出が可能であることを示した。しかし、このqPCRによるコピー数の算出は、基本的に感染する条件が全て同じでなければ相互の比較は出来ないため、本研究の様に複数のベクターの力価を揃えて感染する場合には、各々のベクター力価を再度検討する必要が生じる。そこで私は既に力価が既知であるコントロールベクターを応用して、相対的力価としてベクター力価を算出する新規アデノウイルスベクター力価測定法を考案した。すなわち、コントロールベクターを力価測定時に同時に感染し、そこで得られたCt値と目的ベクターのCt値を比較する方法である。細胞条件の違いはコントロールベクターのCt値にも反映されるため、異なった時期に定量したベクター力価の相互比較が可能になった。

また、FG-AdVではE1領域に目的遺伝子発現単位を挿入するが、Pol IIIにより発現するshRNA挿入領域の至適化は行われていなかった。私はGFPあるいはCreに対するshRNAをヒトU6プロモーターから発現する発現単位をE1あるいはE4右側に転写方向が左向きあるいは右向きに有する4種類のFG-AdVを作製し、GFPあるいはCre発現抑制効果をqPCRにより定量した。その結果、意外なことにE4右側に左向きに挿入した場合に最も高いshRNA活性を示した。この原因として、Pol IIIプロモーターの活性を高める特異な配列がこの近傍に存在している可能性やE1領域近傍にはpIXのプロモーター領域が残存しているため、Pol IIIプロモーター活性を減弱している可能性が考えられた。

これらの結果を受け、E4左向きにHCVに対するshRNA発現単位を挿入したVA欠失AdVあるいはVA保持AdV (FG-AdV)を作製した。shRNAは2種類用いた。shRNA331 (本研究ではsh331と省略)はHCVゲノムの5'端322塩基目から342塩基目までを標的とし、HCV複製を効率的に抑制することが既に報告されている。shRNA277 (sh277と省略)は279塩基目から297塩基目までを標的とし、遺伝子型問わずよく保存されている領域であり本研究で新しく構築した。HCV複製系としては、HCVの遺伝子型1bと2aのHCVレプリコンRNAを恒常的に発現するHuH 5-15(1b)とSGR-JFH1細胞(2a)を用いた。陽性コントロールとしては、IFN発現ベクター(IFN)を、陰性コントロールとしてはゲノム上に相補的な配列がない市販のshRNA (shNC)を用いた。各々のVA欠失AdVあるいはFG-AdVを作製後、新規ベクター力価測定法により力価測定を行い、導入コピー数が揃うように調製し、MOI 2あるいはMOI 10で各々の細胞に導入した。その結果、遺伝子型1b、2aいずれのHCVレプリコンに対してもVA欠失AdVが有意

に高いHCV複製抑制効果を示した。shRNAとしては、sh277、sh331いずれも同程度の抑制効率を示したが、1bではsh277の方が若干高い抑制効率を、2aではsh331の方が高い抑制効率を示した。IFNでは、MOI 2でもほぼ100%HCVの複製を抑制するため、VA RNAの影響について十分に検証が出来ないものの、VA欠失AdVとFG-AdVでは抑制効果に差が認められなかったことから、VA RNAの影響はshRNAの抑制効果に特化している可能性がある。

また、sh277とsh331を発現するVA欠失AdVの共感染を行ったところ、いずれの遺伝子型由来のレプリコン細胞においても、共感染の方が単独感染よりも高いHCV複製抑制効果を示した。興味深いことに、shNCとの共感染において、両細胞でsh331の活性は低下するが、sh277では変わらなかった。これらの結果はshRNAからsiRNAのプロセッシング過程のどこかでコントロールshRNAはsh331と競合するが、sh277と競合しない可能性を示唆していた。

HCVの感染細胞系であるJFH1ウイルス感染細胞を用いて、同様の解析を行い、レプリコン細胞と同様にVA欠失AdVの方が有意に高いHCV複製抑制効率を示した。また、HCVのNS5Aタンパク質発現においても、VA欠失AdVではほぼNS5Aタンパク質の発現は確認されず、IFNと同程度の発現抑制を示した。

以上の結果から、私はFG-AdVで残存していたVA RNAがshRNAのsiRNAへの成熟過程での競合拮抗によりshRNAの効果を減弱させることを初めて示した。GFPに対するshRNAを用いた結果でも同様の傾向は認められたが、FG-AdVとの差はHCVよりも少なかった。その原因として、HCVは自己複製しており、特に複製の初期段階での抑制効率増幅の差が反映された可能性がある。またHCVではmiR-122が複製促進に関与していることが知られており、VA RNAがmiR-122と相互作用をした可能性もあると考えている。

FG-AdVは肝臓での炎症が報告されていたが、中井らの開発した「低炎症FG-AdV」により炎症は最小限に留められる様になった。VA RNAはIFNを誘導して炎症を引き起こすという報告もあり、VA欠失AdVはその点でも遺伝子治療用ベクターとして有用性が高い。shRNAとIFNのHCV複製抑制メカニズムは全く異なるため相加的に働くことが予想され、両者を併せ持つベクターは約半数の患者で認められるIFN抵抗性慢性C型肝炎に対して、HCVの複製を直接抑制することでC型肝炎を治療する方法を相加として100%の治療効果を目指す新しい遺伝子治療法として有用性が高いのではないかと考える。