

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06926

研究課題名(和文) 宿主自然免疫ゲノム情報の発現制御に基づく革新的インフルエンザ予防・治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of next-generation nucleic acid medicines based on the anti-influenza viral regulatory antisense RNA

研究代表者

木村 富紀 (Kimura, Tomonori)

立命館大学・薬学部・教授

研究者番号：40186325

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質非コード性RNAが示す遺伝子発現制御機能を利用して次世代核酸医薬を開発する目的で、その制御ドメイン塩基配列からなるオリゴ核酸を作製し、生体における遺伝子発現制御効果を検証した。  
具体的には、抗ウイルス性自然免疫エフェクター分子をコードするインターフェロン(IFN)-1遺伝子mRNAの発現を転写後性に制御するIFN-1アンチセンスRNA(AS)に着目し、その制御ドメイン塩基配列から設計したantisense oligoribonucleotideが、新たに作製したインフルエンザウイルス感染モデル動物体内で示す自然免疫制御反応とその結果示されたウイルス力価の減衰を検証した。

研究成果の概要(英文)：We reported a natural antisense (AS) RNA as an important modulator of IFN-1 mRNA levels. We showed that IFN-1 AS promotes IFN-1 mRNA stability by transient duplex formation and inhibition of miR-1270-induced mRNA decay. Here, we performed a proof-of-concept experiment to verify the AS-mRNA regulatory axis exerts in vivo control over the expression of innate immunity by the proposed actions of IFN-1 AS. We established a guinea pig model system for influenza virus infection, which encodes a functional MX1 gene, an important antiviral effector in the type I IFN pathway. This system allowed us to investigate the effects of antisense oligoribonucleotides (asORNs) representing functional domains of guinea pig IFN-1 AS on gpIFN-1 mRNA levels and, consequently, on viral proliferation in the respiratory tract of influenza virus A-infected animals. The results indicate that, in light of the proposed actions, the asORNs may modulate the level of IFN-1 mRNA expression in vivo.

研究分野：RNA生物学、分子生物学、ウイルス学

キーワード：制御性RNA タンパク質非コード性RNA アンチセンスRNA 遺伝子発現制御 Proof-of-Concept実験

## 1. 研究開始当初の背景

2012年9月に、ENCODE (the Encyclopedia of DNA Elements) プロジェクトの完了報告がなされた。この中で、タンパク質をコードする遺伝子がわずか3%不足しか占めないヒトゲノムから、その80%以上に由来する転写産物が読み出される理由は、これら遺伝子の発現制御に関わるタンパク質非コード性(ncRNA)に起因する事が指摘された。この結果、これら制御性のncRNAをコードするDNA領域をRNA遺伝子と捉える、新たな遺伝子の概念が提唱された(The ENCODE Project Consortium, Nature, 2012)。

われわれは、ENCODEによる発表がなされる以前から、このncRNAのうち長鎖(200塩基以上)のncRNA(lncRNA)に分類される内因性のアンチセンスRNA(AS)に着目し、その転写後性の遺伝子発現制御について研究を進めて来た(Matsui et al., *Hepatology*, 2008)。さらには、Frontiers in Bioscience [Landmark edition; IF 4.249 (2013)]のManaging Editorとして、Special issue: Regulatory long non-coding RNAを企画・立案、編集し、ENCODEの完了に先立つ2012年1月にlncRNAの遺伝子発現制御機能に関するフォーラムを立ち上げた(下図)。このSpecial issueは、今年度に改訂を計画しており、既に研究業績の1にあげた総説(Nishizawa et al., *FBS Landmark edition*, 2015)を追加している。

図: FBS special issue on regulatory long non-coding RNA



このような研究背景のもと、われわれはこれまでに、lncRNAである内因性ASの機能中心塩基配列からなるアンチセンスオリゴボヌクレオチド(asORN)が、宿主抗ウイルス性自然免疫の主エフェクターをコードするヒトインターフェロン(IFN)- $\alpha$ 1 mRNAの発現を転写後性に増大する事を報告した。

## 2. 研究の目的

これまでに、ヒトIFN- $\alpha$ 1 mRNAを転写後性に安定化し、その発現を増大するASと、この安定化機能に関わる塩基配列を持つasORNは全長のASと同程度にmRNA発現を増加することを発見・報告した(Kimura et al., *CMLS*, 2013)。さらには、このasORNによる宿主自然免疫制御とウイルス力価の低下を生体レベルで証明するProof of Concept(POC)実験に最近成功した。本計画では、この創薬シーズを基にする自然免疫制御性抗ウイルス薬

を開発する目的で、前臨床試験に含まれる各種試験の内、最適化したasORNを使用し、初代培養細胞を含むヒト培養細胞を用いて作用メカニズムを検討する薬効薬理試験を実施する。

## 3. 研究の方法

- (1) Bioinformatics 解析と抗ウイルス生物活性測定によるモルモットIFN- $\alpha$ 1遺伝子の分子クローニング。
- (2) モルモットIFN- $\alpha$ 1 mRNA 2次構造から作成したセンスオリゴヌクレオチド(seODN)を用いたモルモットIFN- $\alpha$ 1 AS発現のノックダウン(KD)と本ASのIFN- $\alpha$ 1 mRNA認識ドメインのマッピング。
- (3) (2)で決定したモルモットIFN- $\alpha$ 1 AS上のmRNA認識ドメイン配列からなるasORNによるモルモットIFN- $\alpha$ 1 mRNA発現制御活性の検証。
- (4) Drug Delivery System(DDS)として採用した生体分解性PLGAナノ粒子へのasORN封入条件の、モルモット胎児線維芽細胞を用いた最適化。
- (5) asORNを封入したPLGAナノ粒子吸入投与に基づく、モルモットIFN- $\alpha$ 1 mRNA発現増大とウイルス力価の減衰を感染モルモット気道内で確認、評価。
- (6) (3)で決定したモルモットasORNの作用メカニズムをバイオフィーマティクスにより解析。
- (7) ヒト乳がんにおいて高発現し、その悪性転化に関わることが知られる*Erythropoietin-producing hepatocellular (EPH)A2*遺伝子アンチセンスRNAのノーザンブロットング並びに5'-RACEによる同定。
- (8) 上記(2)、(3)の方法を援用したEphA2 ASの同mRNA発現制御効果の検討。
- (9) 乳がん悪性転化の表現型である細胞増殖と遊走に及ぼすEphA2 ASの影響の検討: EphA2 AS KD細胞を用いた増殖曲線の作製とスクラッチアッセイ。
- (10) RNAseq法に基づくEphA2 AS KD細胞トランスクリプトームの網羅的解析。
- (11) (10)の結果で得た、EphA2 AS/mRNA/タンパク質の下流に位置し、乳がん細胞の増殖と遊走に関わるシグナル経路エフェクター分子のEphA2 AS KD細胞におけるレポーターアッセイ。

## 4. 研究成果

- (1) バイオフィーマティクスと抗ウイルス活性に基づくモルモットIFN- $\alpha$ 1遺伝子の分子クローニング。
- (2) モルモットIFN- $\alpha$ 1 AS発現のKD結果に基づくIFN- $\alpha$ 1 mRNA認識、発現制御ドメインの決定。
- (3) (2)で決定した発現制御ドメイン配列に基づき設計したasORNが示す

- IFN- $\alpha$ 1 mRNA 発現制御活性の確認。
- (4) ヒトインフルエンザウイルス A/PR/8/34 を感染させたモルモット気道局所に(3)の asORN を送達させるための DDS 系の樹立：DDS として採用した生体分解性 PLGA ナノ粒子への asORN 封入条件の至適化。
  - (5) asORN を封入した PLGA ナノ粒子吸入投与に基づく、モルモット IFN- $\alpha$ 1 mRNA 発現増大とウイルス力価の減衰を感染モルモット気道内で確認する Proof-of-concept 実験の実施、評価。
  - (6) バイオインフォマティクス解析による asORN 作用メカニズムの検討。
  - (7) (1)-(6)の研究成果を含む特願の公開(特開 2016-130227)と論文作成(投稿中)。本 asORN をシーズとする分子核酸医薬は、宿主抗ウイルス性自然免疫の早期立ち上げを介して、季節性インフルエンザ流行シーズンにおける感染予防を可能にするだけでなく、ノイラミニダーゼ阻害薬が無効な変異ウイルスに対する治療効果が期待できる優位性を有すると期待される。
  - (8) ノーザンプロットング並びに 5'-RACE による EphA2 AS の同定と塩基配列の決定。
  - (9) EphA2 AS KD と過剰発現並びに AS 変異体を用いた EphA2 AS による同 mRNA 発現制御メカニズムの解析。
  - (10) EphA2 AS KD 細胞のトランスクリプトーム解析と KD に伴い有意に変動する下流シグナル経路の特定。
  - (11) 特定したシグナル経路に固有なエフェクター分子に対するレポーターを用い、EphA2 AS による当該シグナル経路制御への機能的関与の検証。
  - (12) 乳がん悪性転化に関わる表現形質発現に対する EphA2 AS 関与の検証：乳がん細胞の増殖と遊走に対する EphA2 AS KD 効果の解析。
  - (13) (7) - (12)の成果をまとめた論文を準備中。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Noriyuki Yoshida and Tominori Kimura. Pathogen-associated regulatory non-coding RNAs and oncogenesis. *Frontiers in Bioscience (LandMark edition)*, **22**: 1599-1621, 2017 (査読有り). DOI: 10.2741/4560
  2. Mikio Nishizawa and Tominori Kimura. RNA networks that regulate mRNA expression and their potential as drug targets. *RNA & DISEASE*, **3**: e864, 2016 (査読有り). DOI: 10.14800/rd.864
  3. Tominori Kimura, Shiwen Jiang, Noriyuki Yoshida, Ryou Sakamoto and Mikio Nishizawa. Interferon-alpha competing endogenous RNA network antagonizes microRNA-1270. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **72** (14): 2749-2761, 2015 (査読有り). DOI: 10.1007/s00018-015-1875-5
- 〔学会発表〕(計 13 件)
1. 吉田 徳之、蔭 時文、坂本 凌、尾川 原 彩、近藤 芽衣、道淵 真史、木村 富紀: 内在性インターフェロン-alpha1 アンチセンス RNA はネットワークを形成し、miR-1270 に拮抗するアクセシビリティの高い ceRNA として機能する. Consortium of Biological Sciences 2017, 2017.
  2. 坂本 凌、吉田 徳之、木村 富紀: ヒト乳がん細胞増殖に関わる *EphA2* 遺伝子発現に対する Active Hexose Correlated Compound の効果検討. Consortium of Biological Sciences 2017, 2017.
  3. Ryou Sakamoto, Noriyuki Yoshida, Tominori Kimura: Effects of AHCC on *EphA2* gene expression for human mammary tumor cell transformation. International Congress on Nutrition and Integrative Medicine 2017, 2017.
  4. 坂本 凌、大高 時文、吉田 徳之、木村 富紀: ヒト乳がん細胞増殖と *EphA2* 遺伝子発現に及ぼす Active Hexose Correlated Compound の効果. 第 39 回日本分子生物学会年会、2016.
  5. Tokifumi Odaka, Ryou Sakamoto, Noriyuki Yoshida, Tominori Kimura: Effect of AHCC on metastatic mammary carcinoma-derived MDA-MB-231 cell proliferation, and *EphA2* gene expression that affects the tumor cell growth. International Congress on Nutrition and Integrative Medicine 2016, 2016.
  6. 木村 富紀、塚田 雄亮、大高 時文、辻元 広行: 非コード性 RNA に由来する核酸医薬シーズと生分解性 DDS の一体開発による新規抗インフルエンザ薬の創出. 日本核酸医薬学会第 1 回年会、2015.
  7. 吉田 徳之、西澤 幹雄、杉江 知治、奥村 忠芳、木村 富紀: 乳癌培養細胞並びに組織で同定した *EphA2* アンチセンス RNA 機能解析の試み. 第 38 回日本分子生物学会年会/ 第 88 回日本生化学会大会 合同大会、2015.
  8. Ryou Sakamoto, Noriyuki Yoshida, Shiwen Jiang, Tominori Kimura: Effects of AHCC on regulatory roles of natural antisense RNA for human breast cancer genome expression. International Congress on Nutrition and Integrative Medicine 2015, 2015.

9. 坂本 凌、蔣 時文、吉田 徳之、木村富紀：インターフェロン- $\alpha$ 1 アンチセンス RNA はネットワークを形成し、microRNA-1270 に拮抗する competing endogenous RNA として機能する。第 17 回日本 RNA 学会年会、2015。
10. 吉田 徳之、西澤 幹雄、杉江 知治、奥村 忠芳、木村 富紀：乳癌培養細胞並びに組織で同定した EphA2 アンチセンス RNA の解析。第 17 回日本 RNA 学会年会、2015。
11. 坂本 凌、蔣 時文、吉田 徳之、木村富紀：インターフェロン- $\alpha$ 1 アンチセンス RNA はネットワークを形成し microRNA-1270 に拮抗する。第 56 回日本組織細胞科学会・学術集会、2015。

〔図書〕(計 3 件)

1. 細川 眞澄男、木村 富紀、西澤 幹雄他(40 名) 統合医療機能性食品国際学会、「AHCC 臨床ガイドブック」、2017, 1-246. ISBN: 978-4-89801-585-8.
2. Masuo Hosokawa, Tominori Kimura, Mikio Nishizawa etc (38 authors), International Congress on Nutrition and Integrative Medicine, “Clinician’s guide to AHCC”, 2016, 1-300. ISBN: 978-4-9909264-0-3.
3. 池田 玲子、木村 富紀他 (27 名)、東京化学同人、「スタンダード薬学シリーズ II 4 日本薬学会編 生物系薬学 III. 生体防御と微生物」、2016, 1-342. ISBN: 978-4-8079-1710-5.

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：呼吸器ウイルス感染症の予防・治療剤  
 発明者：木村富紀、辻本 広行、塚田 雄亮  
 権利者：学校法人 立命館、ホソカワミクロン株式会社  
 種類：特許権  
 番号：特開 2016-130227  
 出願年月日：2016 年 7 月 21 日  
 国内外の別： 国内

取得状況(計 1 件)

名称：インターフェロン- $\alpha$  モジュレーター  
 発明者：木村富紀、西澤幹雄、蔣時文、西川正雄  
 権利者：学校法人立命館、学校法人関西医科大学、株式会社アミノアップ化学  
 種類：特許権  
 番号：特許 5794532 号  
 取得年月日：2015 年 08 月 21 日  
 国内外の別： 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

木村 富紀 (KIMURA, Tominori) 立命館大学・薬学部・教授、研究者番号：

40186325.

(2)研究分担者

西澤 幹雄 (NISHIZAWA, Mikio) 立命館大学・生命科学部・教授、研究者番号：40192687.

稲葉 宗夫 (INABA, Muneo)、関西医科大学・医学部・非常勤講師、研究者番号：70115947.

(3)連携研究者

吉田 徳之 (YOSHIDA, Noriyuki) 立命館大学・薬学部・助教、研究者番号：10363996.

蔣 時文 (JIANG, Shiwen) 大高 時文 (ODAKA, Tokifumi; 日本帰化名)、関西医科大学・医学部・助教、研究者番号：10548746.

(4)研究協力者

坂本 凌 (SAKAMOTO Ryoo)