

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 8 月 19 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510283

研究課題名(和文) 宿主自然免疫ゲノム情報の発現調節研究によるウイルス感染症の制御

研究課題名(英文) A modulator of human innate immunity that affects antiviral type 1 interferon response

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトインターフェロン-1 mRNAを安定・増大するアンチセンスRNAの機能ドメインに由来するアンチセンスリボオリゴヌクレオチド(ASORN)を用いて、生体における検証(POC)実験を行った。この目的のため、ヒトA型インフルエンザウイルス感染モルモットモデル系を樹立した。続いて、ASORNを感染局所に送達させるためのDrug Delivery Systemとして生体分解性PLGAナノ粒子を用い、ASORNの封入効率ならびにその遺伝子発現制御機能の最適化を図った。得られた結果を用いてASORNをモルモット気道局所に投与したところ、投与量依存性に抗ウイルス効果が確認され、目的のPOCを達成した。

研究成果の概要(英文)：We previously reported natural antisense RNA (AS) as an important modulator of human interferon-1 (IFN-1) mRNA levels by promoting the mRNA stability. Present study aims to validate the regulatory role of IFN-1 AS on the mRNA levels in vivo, thereby, acting as a possible antiviral reagent. We therefore established a guinea pig model system in order to evaluate the effects of IFN-1 AS in vivo. We employed a biodegradable nanospheres as a drug delivery system, which optimally contained the antisense oligoribonucleotide (ASORN), designed from the stabilization domain sequence of the AS. The nanospheres successfully delivered the ASORN to the human Influenza A virus-infected respiratory tract of the model animals, resulting in the reduction of the viral titers in the respiratory exudates from them. These results thus suggest that the IFN-1 AS drives the host innate immunity against viral infection in in vivo condition and may lead to therapeutic intervention by the ASORN.

研究分野：分子細胞生物学、分子ウイルス学

キーワード：機能性RNA long non-coding RNA natural antisense RNA nucleic acid medicine

## 1. 研究開始当初の背景

近年のトランスクリプトーム研究は、タンパク質をコードする遺伝子をわずか 2-3%しかコードしないヒトゲノムから、その 90%以上が転写されていることを明らかにした。この結果、タンパク質をコードする遺伝子以外に由来する転写産物(非コード RNA あるいは ncRNA)の機能に注目が集まるようになった。しかしながら、これら非コード RNAのうち、構造 ncRNA や抑制性短鎖 ncRNA については研究が進む一方、未だ機能不明な転写産物が多数残されており、中でも 200 塩基以上の長鎖の非コード RNA (lncRNA)は、調節性 RNA として遺伝子発現制御との関連から解析が待たれている。

われわれは、この lncRNA の調節機能に興味を持ち研究を進め、自然免疫の主たるエフェクター分子をコードするインターフェロン- $\alpha 1$  遺伝子 (IFNA1)の逆鎖から lncRNA であるインターフェロン- $\alpha 1$  アンチセンス RNA (IFN- $\alpha 1$  AS)が転写されることを見だし、これ迄に以下のような研究結果を得た。

- (1) IFN- $\alpha 1$  AS は、同 mRNA のコード領域が形成する RNA 二次構造中特定の本鎖構造を細胞質において認識し、転写後に IFN- $\alpha 1$  mRNA を安定化する結果、mRNA 発現レベル並びにタンパク質発現量を制御する。
- (2) IFN- $\alpha 1$  AS 上に mRNA 安定化ドメインを決定し、このドメインシーケンスからなるアンチセンスリボオリゴヌクレオチド(ASORN)が、全長の IFN- $\alpha 1$  AS と同程度に mRNA を安定化することを見いだした。
- (3) この IFN- $\alpha 1$  AS の効果を生体レベルで検証する目的で、インターフェロン応答遺伝子 (ISGs)を持ち、ヒトインフルエンザウイルス感染に際し個体間伝播があることから感染実験結果をヒトに外挿可能なモルモットをモデル動物に選択した。これまでに、モルモット IFNA1 遺伝子を特定し、インフルエンザウイルス感染に応じモルモット気道中に本遺伝子由来の mRNA と AS が発現することを確認した。また、インフルエンザウイルス感染のモルモット胎児線維芽細胞 104C1 細胞においても、ヒト細胞と同様、IFN- $\alpha 1$  mRNA の発現に連動してモルモット AS の発現誘導を認めた。

## 2. 研究の目的

インフルエンザウイルス感染モルモットモデルを構築し、これを用いてヒト培養細胞において確認した IFN- $\alpha 1$  AS による同 mRNA 安定性制御効果を検証し、この効果に基づく抗ウイルス効果を生体レベルで確認する。この目的に沿って、研究期間内に以下の項目を予定した：

- (1) IFN- $\alpha 1$  AS 及び同 mRNA の発現誘導が確認されたインフルエンザウイルス感

染モルモット胎児線維芽細胞 104C1 を用い、モルモット IFN- $\alpha 1$  AS 上に同 mRNA の安定化ドメインを定める。

- (2) このドメインの塩基配列を持つ ASORN を上記感染細胞に過剰発現し、mRNA 安定化効果を確認する。また、このドメインが認識するモルモット IFN- $\alpha 1$  mRNA 上のシーケンスから合成したセンスオリゴヌクレオチド (SODN)を導入すると、AS の発現抑制の結果 IFN- $\alpha 1$  mRNA が不安定化し、その発現量が減少することを検証する。
- (3) モルモット気道中のインフルエンザウイルス感染細胞へ、上記 ASORN の輸送を可能にする Drug delivery system (DDS) を構築する。
- (4) この DDS を用いて投与した ASORN の抗インフルエンザウイルス効果を、モルモット気道組織に発現する IFN- $\alpha 1$  mRNA と鼻汁中に分泌される同蛋白質の発現量の増大並びに分離されるウイルス力価の低下により検証する。

## 3. 研究の方法

本プロジェクトで樹立するインフルエンザウイルス感染モルモットモデルを用いて、IFN- $\alpha 1$  AS による同 mRNA 安定性制御効果とそれに基づく抗ウイルス効果の *in vivo* 検証を予定した。この目標を達成するため、以下の研究項目を実施した。

- (1) モルモット IFN- $\alpha 1$  AS 機能ドメインのマッピング。
- (2) SODN による IFN- $\alpha 1$  AS 発現阻害実験と ASORN による mRNA 安定化ドメインの過剰発現実験。
- (3) インフルエンザウイルス感染モルモットの気道に ASORN の投与を可能にする DDS の構築。
- (4) モルモットモデルにおける投与 ASORN の抗インフルエンザウイルス活性の検証。

## 4. 研究成果

### 実験目標

- (1) 104C1 モルモット培養細胞における DDS 候補の生体分解性ナノ粒子 (PLGA)による ASORN 導入効果の検討
- (2) モルモット SODN 導入による IFN- $\alpha 1$  AS の発現抑制実験と ASORN による IFN- $\alpha 1$  mRNA 安定化ドメインの過剰発現実験  
SODN の導入実験  
モルモット ASORN の過剰発現実験  
モルモット ASORN 封入 PLGA ナノ粒子の導入実験
- (3) ASORN 封入 PLGA ナノ粒子投与によるモルモット気道における抗ウイルス効果の判定

### 成果及び達成度

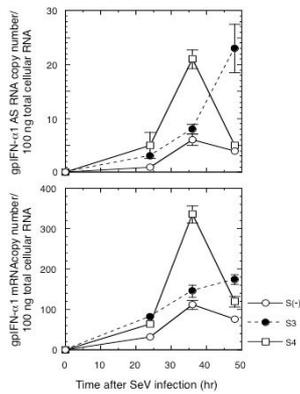
- (1) PLGA ナノ粒子への ASORN 封入条件の最適化:当初計画ではヒト用 ASORN を用いて実施する予定だったが、(2)で予定し

たモルモット ASORN 塩基配列を前倒して決定できたため、この ASORN を用いて封入条件を至適化し、平均粒子径: 106nm、asORN 含有率: 1.61%、表面荷電値: 35 mV を得た (達成度 100%)。

(2) 全長 AS と同等の mRNA 増大効果を示す塩基配列 (すなわち ASORN 塩基配列) の決定

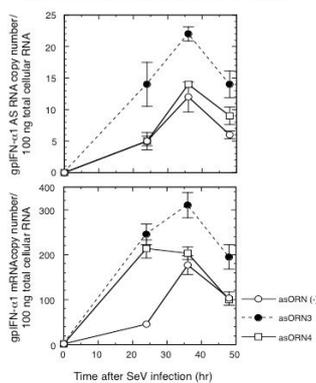
モルモット IFN- $\alpha$ 1 AS RNA の発現を抑制する SODN 効果の確認 (達成度 100%; Fig. 1)。(1)で決定した SODN 候補のうち、3 (S3), 4 (S4) がモルモット IFN- $\alpha$ 1 AS RNA と mRNA 発現に及ぼす効果を検討し、右に示す mRNA 増大効果を確認した。

Fig. 1 Effect of silencing of gpiFN- $\alpha$ 1 AS RNA on IFN- $\alpha$ 1 mRNA expression



ASORN によるモルモット IFN- $\alpha$ 1 mRNA 発現増大効果を確認した (達成度 100%; Fig. 2)。上記で使用した S3, S4 ODN に対応する asORN3, 4 を作製し、これらがモルモット IFN- $\alpha$ 1 AS

Fig. 2 Effects of asORN transfection on the expression levels of gpiFN- $\alpha$ 1 AS RNA/ mRNA

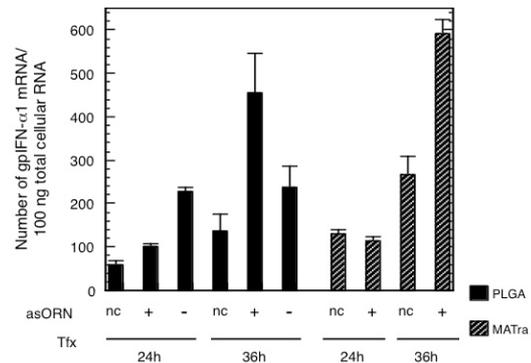


RNA と mRNA 発現に及ぼす効果をさらに検討した。Fig.2に示すように、S4ODNに由来する asORN4 は、IFN- $\alpha$ 1 AS RNA 発現に影響することなく、mRNA 発現を早期に増大させた。これに対し asORN3 は、IFN- $\alpha$ 1 mRNA のみならず、AS RNA も共に発現を増大させた。しかも、その発現の増大は、対照に比較し早期に、かつ asORN4 の増大効果を上回った。そこで、(2) 以降の実験には、asORN3 を用いることにした。

DDS として使用する生体分解性 PLGA ナノ粒子による核酸導入効果を、104C1 培養細胞を用いて検証実験した (達成度 100%; Fig. 3)。上述の asORN3 を封入する乳酸・グリコール酸共重合体 (PLGA) ナノ粒子を作製し、ヒトインフルエンザウイルス A/PR/8/34 (PR8) 感染モルモット胎児線維芽細胞 104C1 に導入した。感染 36 時間におけるモルモット IFN- $\alpha$ 1 mRNA 発現レベルの増大効果

を、市販の遺伝子導入試薬 (MATra 法)

Fig. 3 Effect of PLGA-package of asORN3 on gpiFN- $\alpha$ 1 mRNA expression levels



と比較したところ、mRNA 発現分子数は MATra 法に劣るものの、陰性対照を用いた補正後に得た asORN3 に特異的な IFN- $\alpha$ 1 mRNA 分子数の発現増大度は、PLGA 法による導入が、MATra 法を上回った。

(3) 培養細胞を用いて確認した IFN- $\alpha$ 1 AS RNA による同 mRNA 発現制御効果を、ヒトインフルエンザウイルス A/PR/8/34 (PR8) 感染モルモット気道において検証する POC 実験を完了した (達成度 100%; Fig.4,5)。

Fig. 4 Effect of asORN3 on IFN- $\alpha$ 1 mRNA expression in the guinea pig respiratory tract

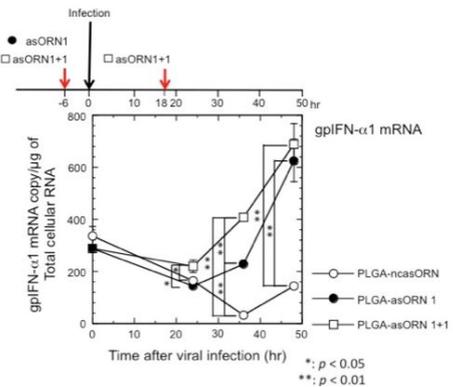
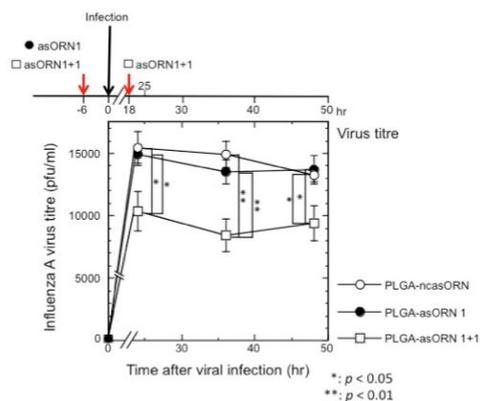


Fig. 5 Effect of asORN3 on PR8 virus titers in the nasal wash of infected guinea pigs

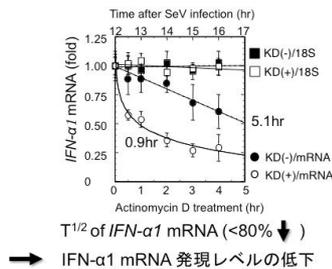


PR8 ウイルス感染モルモット気道組織において、PLGA-seODN3 投与回数に依存して IFN- $\alpha$ 1 mRNA 分子数の発現レベルの有意な増加と早期の出現を観察した (Fig. 4)。その結果、感染モルモット鼻汁から分離されるウイルス力価は、PLGA-asORN3 の投与回数に特

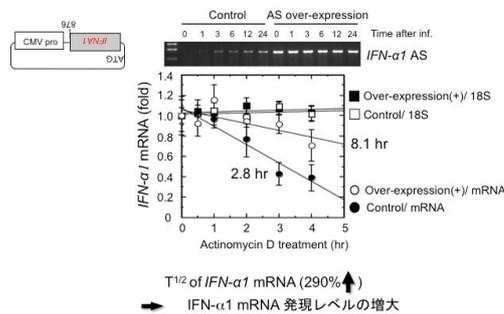
異的且つ有意に減少した (Fig. 5)。また、PLGA-asORN3 投与によるモルモット体重、直腸温、脾臓重量の有意な変動は認めなかった (結果省略)。以上の結果から、IFN- $\alpha$ 1 AS RNA による同 mRNA 安定性制御効果とそれに基づく抗ウイルス効果を in vivo 環境下に証明し得たと考え、目的とする POC 実験を完了した。

これらの研究成果に加え、「1.研究開始当初の背景」に述べた研究結果 (下図) を、

IFN- $\alpha$ 1 AS 発現抑制が同 mRNA 発現に及ぼす効果



IFN- $\alpha$ 1 AS の過剰発現が同 mRNA の発現に及ぼす効果



IFN- $\alpha$ 1 AS は同 mRNA の安定性を転写後に制御し、その発現を増大する。

「5. 主な発表論文等」に掲げた雑誌論文として出版した。また、この論文で報告したヒト IFN- $\alpha$ 1 AS による同 mRNA 安定化のための分子メカニズムを検討し、IFN- $\alpha$ 1 AS は IFN- $\alpha$  ファミリーを形成する他の mRNA と AS RNA 群ならびに細胞由来の特定の mRNA 群と協働する Competing endogenous mRNA ネットワークを形成し (右段上図参照) 機能することを報告した (5. 主な発表論文等に掲げた雑誌論文)。

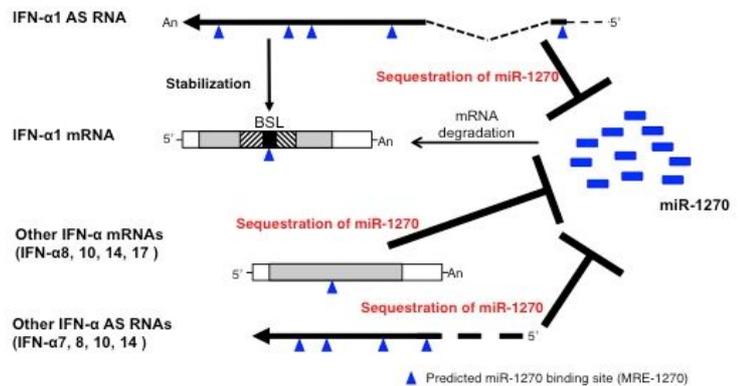
5. 主な発表論文等

(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 4 件)

Tominori Kimura, Shiwen Jiang, Noriyuki Yoshida, Ryou Sakamoto, Mikio Nishizawa. Interferon-alpha competing endogenous RNA network antagonizes microRNA-1270. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 査読あり、**72**: 2749-2761, 2015. DOI: 10.1007/s00018-015-1875-5. Mikio Nishizawa, Yukinobu Ikeya,

Tadayoshi Okumura, Tominori Kimura. Post-transcriptional inducible gene regulation by natural antisense RNA.



*Frontiers in Bioscience* (LandMark edition), 査読あり、**20**: 1-36, 2015. DOI: 10.2741/4297.

Emi Yoshigai, Takafumi Hara, Hiroyuki Inaba, Iwao Hashimoto, Yoshito Tanaka, Masaki Kaibori, Tominori Kimura, Tadayoshi Okumura, A-Hon Kwon and Mikio Nishizawa. Interleukin 1 $\beta$  induces Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Secretion from Rat Hepatocytes. *Hepatology Research*, 査読あり、**44**: 571-583, 2014. DOI: 10.1111/hepr.12157.

Tominori Kimura, Shiwen Jiang, Mikio Nishizawa, Maso Nishikawa, Iwao Hashimoto, Emi Yoshigai, Tadayoshi Okumura and Hisao Yamada.

Stabilization of human interferon- $\alpha$ 1 mRNA by its antisense RNA. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 査読あり、**70**: 1451-1467, 2013. DOI: 10.1007/s00018-012-1216-x.

[学会発表] (計 10 件)

Tominori Kimura, Noriyuki Yoshida, Ryo Sakamoto, Mikio Nishizawa.

Interferon-alpha1 antisense RNA collaborates with other members of the endogenous interfereon-alpha RNA network to antagonize microRNA-1270. 4<sup>th</sup> Zing Nucleic Acids Conference. 2014 年 12 月 06 日、Cancun, Mexico.

Tominori Kimura, Noriyuki Yoshida, Ryo Sakamoto, Mikio Nishizawa.

Interferon-alpha1 antisense RNA collaborates with other members of the endogenous interfereon-alpha RNA network to antagonize microRNA-1270. Cell Symposia on Regulatory RNA. 2014 年 10 月 21 日、Berkeley, CA, USA.

Shiwen Jiang, Noriyuki Yoshida, Mikio Nishizawa, Tominori Kimura. A long noncoding antisense RNA regulates the stability of interfereon- $\alpha$ 1 mRNA by functioning as a competeng endogenous RNA. 第 36 回日本分子生物学会年会、

2013年12月03日、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）。

蔣 時文、吉田 徳之、西澤 幹雄、木村 富紀。センダイウイルスにより誘導される内因性アンチセンス RNA によるヒトインターフェロン- $\alpha 1$  遺伝子の転写後性発現調節：分子作用メカニズムの解析。第 61 回日本ウイルス学会学術集会・総会、2013 年 11 月 12 日、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）。蔣 時文、中野 智明、木村 富紀。非コード性アンチセンス RNA は competing endogenous RNA としてインターフェロン- $\alpha 1$  mRNA の安定性を制御する。第 15 回 RNA 学会年会、2013 年 07 月 24 日、愛媛県民文化会館・ひめぎんホール（愛媛県松山市）。

Tomoaki Nakano, Shiwen Jiang, Tominori Kimura. Effect of AHCC on IFN- $\alpha 1$  antisense and mRNA expression levels: a molecular analysis of action. 21<sup>st</sup> International Congress on Nutrition and Integrative Medicine. 2013 年 07 月 27 日、ホテルロイトン札幌（北海道札幌市）。蔣 時文、吉開 会美、西澤 幹雄、中村 真一郎、木村 富紀。センダイウイルスにより誘導される内因性アンチセンス RNA によるヒトインターフェロン- $\alpha 1$  遺伝子の転写後性発現調節。第 60 回日本ウイルス学会学術集会。2012 年 11 月 14 日、グランキューブ大阪（大阪府大阪市）。

Tominori Kimura, Shiwen Jiang, Mikio Nishizawa, Emi Yoshigai. Stabilization of human interferon- $\alpha 1$  mRNA by its antisense RNA. Cold Spring Harbor Laboratory 2012 meeting on Regulatory and Non-coding RNAs. 2012 年 08 月 30 日、Cold Spring Harbor, NY, USA.

Shiwen Jiang, Tomoaki Nakano, Mikio Nishizawa, Tominori Kimura. Effect of AHCC on IFN- $\alpha 1$  antisense RNA and mRNA expression levels in the respiratory tract of influenza virus A/PR/8/34-infected guinea pigs. 20<sup>th</sup> International Congress on Nutrition and Integrative Medicine, 2012 年 7 月 21 日、ホテルロイトン札幌（北海道札幌市）。Tominori Kimura, Shiwen Jiang, Mikio Nishizawa, Emi Yoshigai, Tomoaki Nakano. Stabilization of interferon- $\alpha 1$  mRNA by its antisense RNA. 22<sup>nd</sup> CDB meeting on RNA Sciences in Cell and Developmental Biology II. 2012 年 06 月 11 日、RIKEN Center for Developmental Biology, Kobe, Japan.

〔図書〕（計 2 件）

Tominori Kimura, Research Media Ltd., International Innovation: High Hopes for Health. 2013, 120.

木村 富紀、コロナ社、生体科学 I：生物個体から分子へ。2012, 215。

〔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、辻元広行、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

番号：特願 2015-5435

出願年月日：2015 年 01 月 14 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

1) Research Story: ウイルス感染治療の創薬につながるアンチセンス RNA の機能を解明する：  
<http://www.ritsumei.ac.jp/research/special/story/story01.html/>

2) FBS: Regulatory long non-coding RNA:  
[https://www.bioscience.org/special-issue-details?editor\\_id=193](https://www.bioscience.org/special-issue-details?editor_id=193)

## 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

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

蔣 時文 (Jiang Shiwen) 立命館大学・総合科学技術研究機構・補助研究員  
研究者番号：10548746