

平成30年6月6日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293118

研究課題名(和文) ウイルス由来非コードRNAのプロセッシング制御による新規腫瘍溶解性ウイルスの開発

研究課題名(英文) Development of a novel oncolytic virus by regulating the processing of virus-derived non-coding RNA

研究代表者

櫻井 文教 (SAKURAI, FUMINORI)

大阪大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：70370939

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：アデノウイルス(Ad)は、そのゲノムに2種類の小分子非コードRNA(VA-RNA)をコードしている。VA-RNAはAd増殖を促進すること、Dicerによりプロセッシングされ、miRNA様の小分子RNAを産生する。しかし、VA-RNAによるAdの増殖促進と、Dicerによるプロセッシングの関係は不明である。そこで本研究では、DicerによるVA-RNAのプロセッシングがAd増殖に及ぼす影響について検討した。その結果、VA-RNAはDicerによってプロセッシングされることでAdの増殖促進能を失うことを明らかにした。さらにその結果を基に、高い抗腫瘍効果を示す新規腫瘍溶解性Adを開発した。

研究成果の概要(英文)：An adenovirus (Ad) genome encodes two non-coding RNAs, VA-RNA I and VA-RNA II. Previous studies demonstrated that VA-RNAs enhance Ad infection and that Dicer processes VA-RNAs, producing miRNA-like small RNAs (mivaRNA); however, relationship between Dicer-mediated processing of VA-RNAs and VA-RNA-mediated enhancement of Ad infection remained to be elucidated. In this study, we examined the effects of Dicer-mediated processing of VA-RNAs on Ad infection. We demonstrated that Dicer-mediated processing of VA-RNA I resulted in loss of promotion activity of VA-RNA I for Ad infection. Based on these findings, we developed a novel oncolytic Ad showing superior antitumor effects.

研究分野：遺伝子治療学

キーワード：アデノウイルス 非コードRNA 腫瘍溶解性ウイルス Dicer

## 1. 研究開始当初の背景

RNA 干渉 (RNA interference: RNAi) は、感染したウイルスなどに由来する二本鎖 RNA (double-strand RNA: dsRNA) が、Dicer によって siRNA へとプロセスされ、RNA-induced silencing complex (RISC) に取り込まれたのち、配列依存的に標的 RNA を切断する現象である。RNAi は、あらゆる真核生物において保存されている。しかし、植物、昆虫、線虫などではウイルス由来 RNA を切断することで抗ウイルスシステムとして機能している一方で、哺乳類の細胞では、RNAi が抗ウイルスシステムとして機能するかは明らかになっていない。近年、哺乳類の未分化細胞 (マウス ES 細胞等) において RNAi が 2 種の RNA ウイルスに対して、そのウイルスゲノムを切断することで抗ウイルスシステムとして機能することが報告された。これらの報告により、哺乳類でも RNAi が抗ウイルスシステムとして働くことが示された。一方で、DNA ウイルスに対しての報告は未だない。むしろ、いくつかの DNA ウイルスは、ウイルス由来の miRNA を発現し、このような Post-transcriptional gene silencing を利用することで、細胞内をウイルス感染に有利な環境を整えている。ウイルス由来の miRNA も宿主の miRNA と同様の経路で成熟化される。すなわち、ゲノム DNA から転写された pre-miRNA は核から細胞質へと移行し、Dicer により miRNA へと切断され、RISC に取り込まれる。RISC に取り込まれたウイルス由来 miRNA はウイルス遺伝子、または宿主遺伝子の発現を抑制する。

アデノウイルス (Ad) のゲノム DNA には、RNA ポリメラーゼ によって転写される小分子 RNA (Virus-associated RNA I, II; VA-RNA I, II) がコードされており、インターフェロン誘導因子の 1 つである Double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) の活性化を阻害することで Ad の増殖を促進する。一方で近年、VA-RNA は、転写後、細胞質へ移行し、Dicer により VA-RNA 由来 miRNA (mivaRNA) へとプロセスされることが報告された。mivaRNA は、通常の miRNA と同様の機構で細胞の遺伝子発現を制御することにより、細胞内の環境を Ad の増殖に適した環境に整えているものと推察された。しかし未だに VA-RNA が Dicer によって切断されることが Ad の増殖にどのような影響を示すのか、mivaRNA を産生することは Ad の増殖に必須なのか明らかになっていない。このように、VA-RNA は RNAi と密接に相互作用しているものの、これが Ad 感染にどのような影響を及ぼすかは明らかとなっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、ウイルス由来小分子 RNA および RNA 干渉関連分子によるウイルス感染 (主には Ad) 制御機構を明らかにすることを目指す。さらに、これらの検討を通して得られた知見を、腫瘍溶解性 Ad の改良に応用する。

## 3. 研究の方法

### (1) Plasmids

VA-RNA I, II を共発現するプラスミド pAdVAntage は、Promega より購入した。VA-RNA I, II の発現を欠失したプラスミド pAdVAntage- NaeI は、過去に作製した。VA-RNA I のみを発現するプラスミド pVAI、VA-RNA II のみを発現するプラスミド pVAII は、pAdVAntage を制限酵素処理した DNA 断片の末端を T4 polymerase で平滑末端にした後、それぞれ再ライゲーションすることで得た。

野生型の VA-RNA I (wt-VAI) を発現し、VA-RNA II の発現を欠失した Ad ベクタープラスミド pAdΔVR7、mivaRNAI へとプロセスされる領域に変異を挿入した変異型 VA-RNA I (mut-VAI) を発現し、VA-RNA II の発現を欠失した Ad ベクタープラスミド pAdΔVR8 は、相同組換えにより作製した。

### (4) shDicer 安定発現細胞の作製

HeLa、SK HEP-1、HepG2、H1299 細胞に、H1T2 プロモーター制御下で shDicer を発現し、さらに 2A ペプチドでつながれた Tet repressor と monomeric red fluorescent protein (mRFP1) を共発現するレンチウイルスベクター (LV-H1T2-shDicer-ETR) を作用させることで、各 shDicer 発現細胞 (HeLa-shDicer、SK HEP-1-shDicer、HepG2-shDicer、H1299-shDicer 細胞) を得た。

### (5) Northern blotting analysis

各細胞から回収した total RNA 10 μg を 2 × 変性 Dye と混合し 85 °C で 5 分処理し、15% の変性ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。Hybond-N+メンブレンにトランスファーを行った後、<sup>32</sup>P 標識したプローブ (VA-RNA I: 5' -aggagcgcgtccccgttg-3'; VA-RNA II: 5' -gggctcgtccctgtttcc-3'; human U6: 5' -tgctaattcttctgtatcgt-3') と 37 °C で一晩ハイブリダイゼーションさせた。2 × SSC/0.1% SDS を用いてメンブレンを洗浄し、検出した。

### (7) Dicer によりプロセシングされた VA-RNA I の調製

VA-RNA I が Dicer に切断されて生じる VAΔmivaI は、*in vitro* transcription により作製した。もう一方の VA-RNA I の切断体である mivaRNAI は、Qiagen に合成を依頼した。

### (8) Reporter plasmids and reporter assay

mivaRNAI と mivaRNAI に変異が挿入された mut-mivaRNAI に相補的な配列を Renilla luciferase (Rluc) 遺伝子の 3' 非翻訳領域に有するレポータープラスミドは、psiCHECK-2 (Promega) を用いて作製した。

HEK293 細胞に各レポータープラスミドをトランスフェクションし、各 AdV を作用させた。

48時間後に、Luciferase活性を測定した。

(11) 腫瘍溶解性アデノウイルスのマウス皮下腫瘍に対する抗腫瘍効果

H1299 細胞、SK-OV-3 細胞 ( $2 \times 10^6$  cells/mouse) を、ヌードマウス (BALB/c nu/nu) の腹部皮下に移植した。腫瘍が長径約 5-6 mm まで達したところで各腫瘍溶解性 Ad ( $1 \times 10^7$  IFU/mouse) を腫瘍内投与した。さらに、投与 3 日後にもう一度同様に投与した。その後、経日的に腫瘍体積を測定した。

#### 4. 研究成果

(1) Dicer による VA-RNA のプロセッシング

Dicer によるプロセッシングが VA-RNA コピー数を制御しているか調べるため、Dicer ノックダウン細胞、もしくは Dicer 過剰発現細胞に、VA-RNA 発現プラスミド (pAdVantage) を導入し、VA-RNA および miRNA コピー数を解析した。Dicer ノックダウン細胞では、miRNAI および miRNAII コピー数の顕著な減少、VA-RNA I および VA-RNA II コピー数の有意な増加が見られた。一方で、Dicer 過剰発現細胞では、miRNAI および miRNAII コピー数の増加、VA-RNA I および VA-RNA II コピー数の有意な減少が見られた。さらに、野生型 Ad を用いた検討でも同様の結果が得られた。従って、Dicer が VA-RNA を切断し、そのコピー数を制御していることが示された。

(2) 切断体 VA $\Delta$ mival および miRNAI の PKR 阻害活性

次に、VA $\Delta$ mival および miRNAI が eIF2 $\alpha$  のリン酸化を阻害するかを検討した。まず、VA-RNA 発現プラスミドを導入した HeLa 細胞に polyI:C をトランスフェクションし、リン酸化 eIF2 $\alpha$  量を解析した。その結果、コントロールプラスミド (pAdVantage- $\Delta$ NaeI:  $\Delta$ NaeI) 導入細胞では eIF2 $\alpha$  リン酸化レベルが上昇したのに対し、VA-RNA I 発現プラスミド (pVAI) 導入細胞ではこれが抑制されていた。次に、VA $\Delta$ mival および miRNAI を HeLa 細胞に導入して同様の検討を行った。その結果、VA $\Delta$ mival および miRNAI を導入した HeLa 細胞にて、コントロール細胞と同様に、顕著な eIF2 $\alpha$  のリン酸化が見られた。以上の結果より、VA-RNA I は全長の状態で PKR 阻害活性を示し、Dicer により VA $\Delta$ mival および miRNAI に切断されることで、その PKR 阻害活性を失うことが示唆された。

(3) 切断体 VA $\Delta$ mival および miRNAI が Ad 増殖に与える影響

次に VA $\Delta$ mival および miRNAI が Ad の増殖に必要な VA-RNA 欠損型 Ad (Sub720) を用いて検討した。VA-RNA を過剰発現させた HeLa 細胞に Sub720 を作用させ、その増殖を検討したところ、VA-RNA の発現は有意に Sub720 の増殖を促進した。一方で、VA $\Delta$ mival および miRNAI を導入しても、Sub720 の増

殖は促進されなかった。従って、VA-RNA I は全長の状態で PKR を阻害し、Ad 増殖を促進するが、Dicer により切断されることで、その Ad 増殖促進活性を失うことが示唆された。

(4) Dicer による Ad 増殖の抑制

次に、Dicer が Ad 増殖を制御するか検討した。Dicer 過剰発現細胞、Dicer ノックダウン細胞に WT-Ad を感染させたのち、細胞内 Ad ゲノムコピー数、および子孫 Ad 粒子数を測定した。その結果、Dicer を過剰発現させた HeLa、H1299 細胞では、Ad ゲノムコピー数がそれぞれ約 35%、40% に減少した。さらに、Dicer 過剰発現 HeLa 細胞において、子孫 Ad 粒子数が 50% 以下に減少した。一方で、Dicer をノックダウンさせた HeLa、H1299 細胞では、Ad ゲノムコピー数がそれぞれ約 3.5、2.3 倍増加した。また、Dicer ノックダウン HeLa 細胞において、子孫 Ad 粒子数も約 6 倍に増加した。さらに、他の血清型の Ad でも Dicer ノックダウンによる Ad 増殖促進効果が見られた。以上の結果より、Dicer の発現は Ad の増殖を負に制御することが示された。

(5) Dicer と VA-RNA の PKR 阻害活性

前項で、Dicer は Ad 増殖を負に制御していることを示した。次に、これが Dicer による VA-RNA の切断でその PKR 阻害能を失ったことによるものか検討した。まず、Dox 添加で Dicer をノックダウンした HeLa-shDicer 細胞に、WT-Ad もしくは Sub720 を感染させ、eIF2 $\alpha$  のリン酸化レベルを解析した。コントロールとして、polyI:C 作用群の eIF2 $\alpha$  リン酸化レベルの解析を行い、Dox 添加による Dicer のノックダウンだけでは、eIF2 $\alpha$  のリン酸化レベルに変化がないことが示された。Dox 非添加時において、Sub720 の感染は顕著な eIF2 $\alpha$  のリン酸化を誘導した。一方で、WT-Ad 作用群は低いレベルで eIF2 $\alpha$  をリン酸化した。これは、WT-Ad 感染細胞にて効率的に VA-RNA が発現し、PKR を阻害したためだと思われる。また、Dox 添加で Dicer をノックダウンした WT-Ad 感染細胞は、Dox 非添加群と比較して、さらに低いレベルで eIF2 $\alpha$  がリン酸化された。Dicer のノックダウンが VA-RNA コピー数の増加につながったことから、Dox 非添加群と比較して、Dox 添加群 (Dicer ノックダウン群) では、より効率的に PKR の活性化が阻害され、eIF2 $\alpha$  のリン酸化が誘導されなかったものと考えられる。

次に、PKR 阻害が Ad 増殖を促進することを確認するために、PKR ノックダウン細胞における Ad の増殖を解析した。PKR のノックダウンにより、細胞内 Ad ゲノムコピー数が顕著に増加した。さらに、Dicer の過剰発現は Ad 増殖を阻害したが、PKR をノックダウンすることで Ad 増殖が回復した。以上の結果より、Dicer により VA-RNA が切断されると効率的に eIF2 $\alpha$  のリン酸化が生じるのに対して、Dicer のノックダウンによる VA-RNA コピー数の増

加は、eIF2  $\alpha$  のリン酸化阻害と Ad 増殖促進につながることを示された。

(8) shDicer 発現腫瘍溶解性 Ad の開発と各種癌細胞株での機能評価

腫瘍溶解性 Ad である Telomerase-specific replication-competent Ad (TRAD) は、Ad の増殖に必須である E1 遺伝子を腫瘍特異的プロモーターである hTERT プロモーターによって発現させることで、腫瘍細胞特異的に増殖し死滅させる腫瘍溶解性 Ad である。上記で得られた知見を、この TRAD に応用するために、TRAD ゲノムに shDicer 発現カセットを搭載した TRAD (TRAD-shDicer) を作製した。まず、TRAD-shDicer 感染細胞における Dicer の発現を解析したところ、従来型 TRAD、コントロールである Luciferase に対する shRNA (shLuc) を発現する TRAD (TRAD-shLuc) と比較して、TRAD-shDicer は顕著に Dicer の発現をノックダウンした。次に、各 TRAD 感染細胞における VA-RNA の発現を解析した。その結果、コントロールの TRAD と比較し、TRAD-shDicer 群で約 8 倍 VA-RNA コピー数が増加していた。さらに、HeLa 細胞での TRAD-shDicer の増幅を解析したところ、コントロールの TRAD と比較し、感染 48 時間後では細胞内 TRAD ゲノムコピー数、子孫 Ad 粒子数がそれぞれ約 8、12 倍に増加しており、TRAD-shDicer は高い増殖能を示した。他の癌細胞株でも同様の結果が得られた。そこで、TRAD-shDicer の殺細胞効果を検討したところ、コントロールの TRAD と比較して、TRAD-shDicer は各種癌細胞に対し高い殺細胞効果を示した。以上より、TRAD-shDicer は高い増殖能および殺細胞効果を示すことが明らかとなった。

(10) 腫瘍モデルマウスにおける shDicer 発現腫瘍溶解性 Ad の抗腫瘍効果

各種ヒト癌細胞 (H1299、SK-OV-3 細胞) を移植した担癌腫瘍マウスを用いて、TRAD-shDicer の抗腫瘍効果を解析した。PBS 投与群と比較して、従来型 TRAD、TRAD-shLuc 投与群でもある程度の腫瘍の退縮が見られた。一方で、TRAD-shDicer 投与群では、従来型 TRAD、TRAD-shLuc 投与群と比較して、さらに高い腫瘍退縮効果が見られた。以上より、TRAD-shDicer は、*in vivo* でも高い抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。

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 12 件)

1. Katayama Y, Terasawa Y, Tachibana M, Mizuguchi H, Sakurai F. Proteolytic disassembly of viral outer capsid proteins is crucial for reovirus-mediated type-I interferon induction in both reovirus-susceptible and reovirus-refractory tumor cells. *Biomed Res Int*. 468457. (2015).
2. Hotani T, Tachibana M, Mizuguchi H, Sakurai F. Reovirus double-stranded RNA genomes and polyI:C induce down-regulation of hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun*. 460: 1041-6. (2015).
3. Terasawa Y, Hotani T, Katayama Y, Tachibana M, Mizuguchi H, Sakurai F. Activity levels of cathepsins B and L in tumor cells are a biomarker for efficacy of reovirus-mediated tumor cell killing. *Cancer Gene Ther*. 22: 188-97. (2015)
4. Wakabayashi K, Machitani M, Shimizu K, Tachibana M, Sakurai F, Mizuguchi H. Quantitative Analysis of Virus-associated RNAi Expression following Transduction with a Replication-incompetent Adenovirus Vector In Vitro and In Vivo. *J. Mol. Genet. Med*. 9: 169. (2015)
5. Machitani M, Sakurai F, Wakabayashi K, Nakatani K, Shimizu K, Tachibana M, Mizuguchi H. NF- $\kappa$ B promotes leaky expression of adenovirus genes in a replication-incompetent adenovirus vector. *Sci Rep*. 6: 19922. (2016)
6. Machitani M, Sakurai F, Wakabayashi K, Tomita K, Tachibana M, Mizuguchi H. Dicer functions as an antiviral system against human adenoviruses via cleavage of adenovirus-encoded noncoding RNA. *Sci Rep*. 6: 27598. (2016)
7. Machitani M, Sakurai F, Wakabayashi K, Tachibana M, Fujiwara T, Mizuguchi H. Enhanced Oncolytic Activities of the Telomerase-Specific Replication-Competent Adenovirus Expressing Short-Hairpin RNA against Dicer. *Mol Cancer Ther*. 16: 251-259. (2017)
8. Machitani M, Sakurai F, Wakabayashi K, Nakatani K, Takayama K, Tachibana M, Mizuguchi H. Inhibition of CRISPR/Cas9-Mediated Genome Engineering by a Type I Interferon-Induced Reduction in Guide RNA Expression. *Biol Pharm Bull*. 40:272-277. (2017)
9. Machitani M, Sakurai F, Wakabayashi K, Takayama K, Tachibana M, Mizuguchi H. Type I Interferons Impede Short Hairpin RNA-Mediated RNAi via Inhibition of Dicer-Mediated

- Processing to Small Interfering RNA. *Mol Ther Nucleic Acids*. 6:173-182. (2017)
10. Sakurai F, Inoue S, Kaminade T, Hotani T, Katayama Y, Hosoyamada E, Terasawa Y, Tachibana M, Mizuguchi H. Cationic liposome-mediated delivery of reovirus enhances the tumor cell-killing efficiencies of reovirus in reovirus-resistant tumor cells. *Int J Pharm*. 524: 238-247. (2017)
  11. Machitani M, Sakurai F, Wakabayashi K, Nakatani K, Tachibana M, Mizuguchi H. MicroRNA miR-27 Inhibits Adenovirus Infection by Suppressing the Expression of SNAP25 and TXN2. *J Virol*. 91. pii: e00159-17. (2017)
  12. Machitani M, Sakurai F, Wakabayashi K, Nakatani K, Tachibana M, Kato N, Fujiwara T, Mizuguchi H. Suppression of Oncolytic Adenovirus-Mediated Hepatotoxicity by Liver-Specific Inhibition of NF- B. *Mol Ther Oncolytics*. 7: 76-85. (2017)
- [学会発表](計 30 件)
- 1) Machitani M, Sakurai F, Wakabayashi K, Tachibana M, Mizuguchi H. Evaluation of involvement of microRNA processing factors in adenovirus replication. American Society of Gene and Cell Therapy, 17<sup>th</sup> Annual Meeting. 2014 年 5 月 21-24 日.(米国ワシントン DC)
  - 2) Sakurai F, Terasawa Y, Tachibana M, Mizuguchi H. Cathepsin activity levels are a crucial determinant for reovirus oncolysis. American Society of Gene and Cell Therapy, 17<sup>th</sup> Annual Meeting. 2014 年 5 月 21-24 日.(米国ワシントン DC)
  - 3) 町谷充洋、櫻井文教、若林圭作、立花雅史、藤原俊義、水口裕之。マイクロ RNA プロセシング因子の制御による腫瘍溶解性アデノウイルスの機能向上。第 30 回日本 DDS 学会学術集会。2014 年 7 月 30-31 日。(東京)
  - 4) Machitani M, Sakurai F, Wakabayashi K, Tachibana M, Mizuguchi H. MicroRNA processing factors regulate adenovirus replication. 第 20 回日本遺伝子細胞治療学会。2014 年 8 月 6-8 日。(東京)
  - 5) Machitani M, Sakurai F, Wakabayashi K, Tachibana M, Fujiwara T, Mizuguchi H. Development of a novel oncolytic adenovirus expressing a short-hairpin RNA against a microRNA processing factor. 第 73 回日本癌学会学術集会。2014 年 9 月 25-27 日。(東京)
  - 6) Sakurai F, Katayama Y, Tachibana M, Mizuguchi H. Activity levels of cathepsins B and L are crucial factors determining reovirus-mediated tumor cell lysis. 第 73 回日本癌学会学術集会。2014 年 9 月 25-27 日。(東京)
  - 7) 櫻井文教、町谷充洋、若林圭作、立花雅史、水口裕之。Dicer はウイルス由来小分子 RNA (VA-RNA) の切断を介してアデノウイルスの感染を抑制する。第 62 回日本ウイルス学会学術集会。2014 年 10 月 10-12 日。(横浜)
  - 8) 若林圭作、町谷充洋、櫻井文教、立花雅史、水口裕之。Dicer のノックダウンによるアデノウイルスベクター用新規パッケージング細胞の開発。第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会。2014 年 11 月 14 日。(京都)
  - 9) 寶谷拓磨、立花雅史、水口裕之、櫻井文教。レオウイルスによる低酸素誘導因子 HIF-1a 発現量低下における核酸認識受容体の関与に関する検討。第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会。2014 年 11 月 14 日。(京都)
  - 10) 櫻井文教。非コード RNA による遺伝子発現制御機構を利用した遺伝子組換えアデノウイルスの開発。関西動物実験研究会 第 124 会研究会。2014 年 12 月 5 日。(京都)(招待講演)
  - 11) 町谷充洋、櫻井文教、若林圭作、立花雅史、水口裕之。RNA 干渉に関わる因子である Dicer はアデノウイルスに対する防御機構として機能する。日本薬学会第 135 年会。2015 年 3 月 25-28 日。(神戸)
  - 12) 若林圭作、町谷充洋、櫻井文教、立花雅史、水口裕之。Dicer ノックダウン細胞を用いたアデノウイルスベクター作製効率の改善に関する検討。日本薬学会第 135 年会。2015 年 3 月 25-28 日。(神戸)
  - 13) 櫻井文教、水口裕之。Post-transcriptional Gene Silencing 機構を利用した高機能型遺伝子組換えアデノウイルスの開発。日本薬学会第 135 年会。2015 年 3 月 25-28 日。(神戸)(招待講演)
  - 14) Machitani M, Sakurai F, Tachibana M, Mizuguchi H. NF- B mediates leaky expression of adenovirus genes in a replication-incompetent adenovirus vector. 第 21 回日本遺伝子治療学会学術集会。2015 年 7 月 25-26 日。(大阪)
  - 15) Wakabayashi K, Machitani M, Shimizu K, Tachibana M, Sakurai F, Mizuguchi H. Quantitative analysis of virus-associated RNAi expression following transduction with a replication-incompetent adenovirus vector *in vitro* and *in vivo*. 第 21 回日本遺伝子治療学会学術集会。2015 年 7 月 25-26 日。(大阪)
  - 16) Sakurai F, Machitani M, Fujiwara T, Mizuguchi H. Development of a potent

- oncolytic adenovirus *via* regulation of dicer-mediated processing of virus-associated RNAs. 第 21 回日本遺伝子治療学会学術集会 2015 年 7 月 25-26 日. (大阪)(招待講演)
- 17) Machitani M, Sakurai F, Tachibana M, Mizuguchi H. Reduction in the leaky expression of Ad genes from a replication-incompetent adenovirus vector by inhibition of NF- $\kappa$ B. 第 74 回日本癌学会学術集会 2015 年 10 月 8-10 日. (名古屋)
- 18) 町谷充洋、櫻井文教、若林圭作、立花雅史、藤原俊義、水口裕之. アデノウイルス由来小分子 RNA の機能特性に立脚した遺伝子治療用組み換えウイルスの開発. 第 65 回日本薬学会近畿支部総会・大会. 2015 年 10 月 17 日. (大阪)
- 19) Machitani M, Sakurai F, Wakabayashi K, Tachibana M, Mizuguchi H. Inhibition of NF- $\kappa$ B leads to suppression of Ad vector-mediated hepatotoxicities *via* reduction in the leaky expression of Ad genes. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会. 2015 年 11 月 22-24 日. (福岡)
- 20) Wakabayashi K, Machitani M, Shimizu K, Tachibana M, Sakurai F, Mizuguchi H. Expression profile of virus-associated RNAI following transduction with a replication-incompetent adenovirus vector *in vitro* and *in vivo*. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会. 2015 年 11 月 22-24 日. (福岡)
- 21) 町谷充洋、櫻井文教、若林圭作、立花雅史、水口裕之. アデノウイルス感染に対する防御機構としての Dicer の役割. 第 38 回日本分子生物学会年会. 2015 年 12 月 1-4 日. (神戸)
- 22) 町谷充洋、櫻井文教、若林圭作、立花雅史、水口裕之. miR-27b による Cyclin G1 の発現抑制がアデノウイルス感染に与える影響. 日本薬学会第 136 年会. 2016 年 3 月 26-29 日. (横浜)
- 23) Machitani M, Sakurai F, Wakabayashi K, Tachibana M, Mizuguchi H. Type I interferons impede short-hairpin RNA-mediated RNA interference *via* inhibition of dicer-mediated processing to small interfering RNA. 第 22 回日本遺伝子治療学会総会. 2016 年 7 月 26-30 日. (東京)
- 24) Wakabayashi K, Machitani M, Tachibana M, Sakurai F, Mizuguchi H. Small RNA derived from Adenovirus Virus-Associated RNA II, mivaRNA II, promotes Ad replication *via* post-transcriptional gene silencing. The 24<sup>th</sup> annual congress of European Society of Gene & Cell Therapy. 2016 年 10 月 18-21 日. (フィレンツェ)
- 25) 若林圭作、町谷充洋、櫻井文教、立花雅史、水口裕之. Molecular function of microRNA derived from Adenovirus. 第 39 回分子生物学会年会. 2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日. (横浜)
- 26) 町谷充洋、櫻井文教、若林圭作、中谷光佑、高山和雄、立花雅史、水口裕之. Type I interferons impede CRISPR/Cas9-mediated genome engineering *via* reduction in guide RNA expression. 第 39 回分子生物学会年会. 2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日. (横浜)
- 27) 若林圭作、町谷充洋、立花雅史、櫻井文教、水口裕之. Truncated form of virus-associated RNA II, mivaRNA II, promotes adenovirus replication in a post-transcriptional gene silencing manner. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会. 2017 年 10 月 24-26 日. (大阪)
- 28) 町谷充洋、櫻井文教、若林圭作、立花雅史、水口裕之. miR-27-mediated down-regulation of SNAP25 and TXN2 genes leads to inhibition of adenovirus infection. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会. 2017 年 10 月 24-26 日. (大阪)
- 29) 櫻井文教. Post-transcriptional Gene Silencing 機構を利用した高機能型遺伝子組換えアデノウイルスの開発. 阪大薬-医薬健康研ランチミーティング. 2018 年 2 月 23 日. (大阪)(招待講演)
- 30) 櫻井文教. ウイルスを基盤とした遺伝子治療薬の臨床開発の現状と今後の展望. 日本薬学会第 138 年会 2018 年 3 月 25-28 日. (金沢)(招待講演)
- [図書](計 0 件)
- [産業財産権]  
出願状況(計 0 件)  
取得状況(計 0 件)
- [その他]  
6. 研究組織  
(1)研究代表者  
櫻井 文教 (SAKURAI FUMINORI)  
大阪大学・大学院薬学研究所・准教授  
研究者番号: 70370939
- (2)研究分担者  
なし
- (3)連携研究者  
水口 裕之 (MIZUGUCHI HIROYUKI)  
大阪大学・大学院薬学研究所・教授  
研究者番号: 50311387  
立花 雅史 (TACHIBANA MASASHI)  
大阪大学・大学院薬学研究所・特任准教授  
研究者番号: 80513449