

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14595

研究課題名(和文) ウイルス感染症に治療効果を示すRNA分解型核酸医薬の開発研究

研究課題名(英文) Development of RNase H-mediated antiviral oligonucleotides.

研究代表者

越後谷 裕介 (ECHIGOYA, Yusuke)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：90609950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、プラス鎖一本鎖RNAをゲノムとして持つ日本脳炎ウイルス(JEV)をモデルとして、RNA分解型アンチセンス核酸(ASO gapmer)が有意なウイルス増殖抑制効果を有することを明らかにした。また、JEVの増殖抑制を誘導するためには、ASO gapmerの標的ウイルスRNAに対する相補的な塩基配列および修飾核酸の特異性が重要であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA/RNA様の修飾核酸からなるアンチセンス核酸(ASO)はRNAを標的とする新たな創薬シーズとして期待されている。しかし、ASOのウイルスRNAに対する有効性や作用メカニズムについては不明な点が多い。本研究ではASO gapmerの日本脳炎ウイルス(JEV) RNAに対する特異的な分解作用が明らかとなり、ASO gapmerが抗ウイルス薬として応用できる可能性が示された。本知見は、日本脳炎のみならず特效薬の開発が困難なウイルス感染症に対する新たな治療コンセプトの確立に貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Antisense oligonucleotides (ASO) to induce RNase H-mediated degradation of target RNA, called ASO gapmer, are expected to be novel antiviral therapeutics. The present study revealed that ASO gapmer effectively inhibits the proliferation of the Japanese encephalitis virus (JEV) in vitro. The result showed that the antiviral effects of ASO gapmer are caused in a sequence- and chemistry-dependent manner. The findings could facilitate the development of antiviral oligonucleotide therapeutics against not only JEV but also other flavivirus species representing public health threats, such as dengue virus, Zika virus, West Nile virus, and yellow fever virus.

研究分野：核酸医薬、実験動物学、獣医学

キーワード：アンチセンス核酸 RNA分解 日本脳炎 ウイルスRNA

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アンチセンス核酸(antisense oligonucleotide, ASO)は標的 mRNA に特異的に結合し、ウイルス増殖を抑制するため次世代の抗ウイルス薬になると期待されている。しかし、mRNA からタンパク質への翻訳または機能的 RNA 領域の構造阻害による ASO 作用機序では、ウイルス RNA 自体を分解・除去することはできず、ウイルスの再増殖が懸念される。また標的細胞への ASO 取込み効率の改善は高い治療効果を得るための課題である。申請者は様々なアンチセンス療法の開発を通して、細胞取込み効率および RNA への結合力が強化された架橋型修飾核酸を用いた RNA 分解型アンチセンス核酸(ASO gapmer)が新たなウイルス治療法になる可能性に着目した。本研究では、我が国をはじめとするアジア諸国で問題となっている致死的な人獣共通感染症を引き起こす日本脳炎ウイルスをモデルとして、ゲノム自体が mRNA であるプラス鎖一本鎖 RNA(+ssRNA)ウイルスに治療効果を示す ASO gapmer を用いた新たなウイルス治療法を開発する。

### 2. 研究の目的

+ssRNA をゲノムに持つフラビウイルス科には病原性が高いウイルス種が多く、公衆衛生上大きな問題となる感染症を引き起こす。特に我が国をはじめとするアジア諸国で問題となっている致死的な日本脳炎ウイルス(JEV)は小児や高齢者で重篤化しやすいが、現在治療法はない。一報、RNA を標的とするアンチセンス核酸(ASO)は遺伝性疾患をはじめとする様々な疾患で製剤化または臨床試験が実施されているが、ウイルス感染症に対する有効性については不明な点が多い。本研究では、日本脳炎ウイルスをモデルとして、+ssRNA、すなわち mRNA をゲノム構造に持つウイルス種に対して、RNA 分解型アンチセンス核酸(ASO gapmer)が効果的な新規治療薬となる可能性を示す。

### 3. 研究の方法

#### (1) JEV の RNA ゲノム/mRNA に特異的に結合する ASO gapmer 配列の設計

JEV では標的とする RNA 領域により抗ウイルス作用が異なると考えられる(Khromykh et al, J Virol, 2001)。そこで JEV 株間で保存性が高いゲノム領域を決定し、ASO gapmer の長さ、または修飾核酸と天然核酸の組成比が異なる ASO gapmer を設計した。異なる遺伝子型を持つ JEV 株への応用性は、Virus Pathogen Resource から抽出した JEV RNA 配列データを用いて解析した。

#### (2) ASO gapmer の *in vitro* スクリーニング

JEV 標準株である JaGAr 01 株を感染させた Vero 細胞に、(1)で設計した複数の ASO gapmer をスクリーニング用に最適化した濃度で処置した。ASO gapmer で処置した JEV 感染 Vero 細胞から回収した上清を用いてプラークアッセイを行い、JEV 感染粒子数(PFU/mL)の減少を指標に効果的な ASO gapmer を選定した。

#### (3) 抗 JEV ASO gapmer の濃度依存的効果

(2)のスクリーニング試験において、高い JEV 増殖抑制作用を示した ASO gapmer を異なる濃度で JEV 感染 Vero 細胞に作用させ、JEV に対する濃度依存的な薬理学的効果を調べた。

#### (4) ASO gapmer による JEV RNA 分解メカニズムの解析

JEV RNA 分解効果に対する ASO gapmer の塩基配列および修飾核酸の特異性を調べるため、標的とする JEV RNA と相補的に結合できない塩基に置換した ASO gapmer を複数設計した。これら置換 ASO gapmer の JEV 感染性粒子に対する増殖抑制効果をプラークアッセイにより調べた。ASO gapmer の JEV RNA 分解効果は、標的の塩基配列を持つ合成 JEV RNA、RNaseH および置換 ASO gapmer を用いた生化学的な RNA 分解アッセイにより解析した。

#### (5) ヒト神経細胞における ASO gapmer の JEV 増殖抑制効果と毒性試験

JEV は神経細胞に感染し、致死的な脳炎を発症させる。上記の実験で高い有効性が認められた ASO gapmer のヒト神経芽細胞株(SK-N-SH 細胞)における JEV 増殖抑制効果をプラークアッセイにより調べた。ASO gapmer のヒト神経芽細胞に対する細胞毒性は、ASO gapmer 処置後の細胞の形態学的性状および生存状態によって評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) JEV RNA 標的 ASO gapmer の配列決定と *in silico* 解析による汎用性

ASO gapmer の標的 JEV RNA 配列を決定するため、NCBI GenBank 上の複数の JEV RNA ゲノム配列を入手した。JEV 株間の塩基配列のアライメント解析を実施し、機能的な高度保存領域(conserved sequence, CS)、および RNA 二次構造予測プログラム(RNAfold)から算出された Stem loop 領域の 2 箇所を ASO gapmer 標的領域に決定した(図 1)。ASO gapmer の配列は、

標的 RNA への結合力の指標である  $T_m$  値、および標的 JEV RNA の結合部位、および架橋型修飾核酸と天然核酸(DNA)の組成比を最適化することで決定した(図 2)。設計した ASO gapmer の標的 RNA 配列の保存性をデータベース解析したところ、本邦およびアジア諸国で流行している遺伝子 I 型および III 型において高度に保存されていることが明らかとなった。

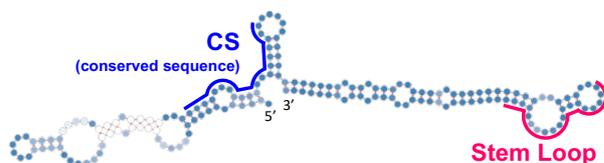


図1. ASO gapmerが標的とするJEV RNA領域の二次構造予測モデル  
JEV株間で保存性が高い領域(CS)とStem loop(一本鎖部位)を標的としてASOを複数設計。

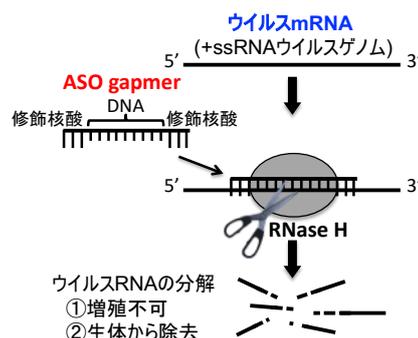


図2. RNA分解型アンチセンス核酸(ASO gapmer)を用いた抗ウイルス作用の模式図

## (2) 抗 JEV ASO gapmer のスクリーニング試験および濃度依存的試験

JEV 標準株 JaGAR 01 株を感染させた Vero 細胞における ASO gapmer の JEV 増殖抑制効果をプラークアッセイにて評価したところ、Stem loop を標的とする ASO gapmer が CS 標的 ASO gapmer またはコントロール ASO gapmer と比べて、有意な JEV 増殖抑制を示すことが明らかとなった。Stem loop 領域において有意な効果を示した 3 種類の ASO gapmer について、異なる濃度で抗ウイルス作用を評価したところ、濃度依存的な JEV 増殖抑制効果が明らかとなり(図 3)、抗 JEV ASO gapmer の薬剤としての可能性を示す重要な基礎的知見を得ることができた。

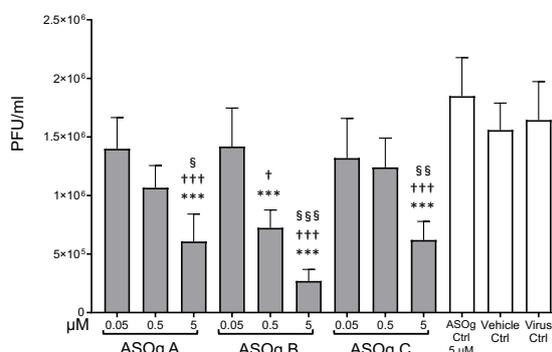


図3. ASO gapmer(ASOg)の濃度依存的試験  
0.05 MOIで感染後、ASOg各濃度で処置(N = 6、平均、標準偏差)。対数値を用いたANOVA-Tukey Kramerで統計解析。ASOg Ctrlに対して\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$ ; 同ASOg 0.05  $\mu\text{M}$ に対しては†で、0.5  $\mu\text{M}$ に対しては‡で示されている。

## (3) JEV 増殖抑制効果における ASO gapmer の塩基配列および修飾核酸の有効性

抗 JEV ASO gapmer の核酸配列の特異性が JEV 増殖抑制効果に及ぼす影響を調べるために、標的 RNA への結合力にかかわる修飾核酸鎖の 2 または 1 塩基を標的 JEV RNA へ結合できない塩基に置換した ASO gapmer、および RNA 分解酵素 RNase H が作用する DNA 鎖の塩基を同様に置換した ASO gapmer を設計した。また修飾核酸の JEV RNA への結合効果を調べるために、修飾核酸領域を DNA に置換した ASO を合成し、オリジナルの ASO gapmer と比較した。標的とする JEV RNA に完全に相補的ではない置換 ASO gapmer および DNA のみの ASO の JEV 増殖抑制効果は、オリジナルの ASO gapmer と比較して有意に減少した。さらに、ASO gapmer と合成 JEV RNA の結合複合体の消失を指標にした生化学的アッセイにおいて、置換 ASO gapmer の標的 RNA 分解効果はオリジナルの ASO gapmer に比べて低くなることが示された。すなわち、ASO gapmer が RNA 分解を介した抗ウイルス作用を発揮するためには、標的とするウイルス RNA 配列と完全に一致する塩基配列を持つこと、配列内における修飾核酸の適切な配置の必要性が明らかとなった。

## (4) ヒト神経芽細胞における ASO gapmer の有効性と安全性

上記実験で JEV 増殖抑制効果が高く、配列および修飾核酸の特異性が確認された ASO gapmer のヒト神経芽細胞(SK-N-SH 株)における抗 JEV 作用をプラークアッセイにより評価した。JEV RNA の Stem loop 領域を標的とする 3 種類の ASO gapmer において濃度依存的な JEV 増殖抑制効果が認められた。興味深いことに、ヒト神経芽細胞における JEV 増殖抑制効果は、Vero 細胞における試験と比べて、低い ASO gapmer 濃度で観察された。一方、細胞毒性については、高濃度の ASO gapmer で処置した JEV 感染ヒト神経芽細胞では、細胞の剥離や萎縮などの形状変化が観察された。この細胞変性作用が、ASO の配列依存的な毒性、すなわちヒト

細胞に発現する RNA への非特異的な結合によるものかを調べるため、現在ヒト全ゲノムデータベース(GGGenome)を用いて解析を進めている。ASO gapmer の化学物質としての細胞毒性については、MTT アッセイによる評価を検討している。

JEV 野外株に対する ASO gapmer の増殖抑制効果については、我々が所有するウイルス株が本邦で現在流行の中心である遺伝子 I 型(GI)株であることをシーケンス解析により同定することができた。したがって、ヒト神経芽細胞において JEV GI 型に対する ASO gapmer の効果を結論付けた後、JEV GI 型を感染させたマウスにおける ASO gapmer の有効性・安全性を詳細に評価する必要がある。

RNA を標的とする医薬品の開発が世界的に進められている一方で、ウイルス RNA を標的とする ASO gapmer の有効性に関する情報は限られている。ASO gapmer の作用メカニズムの解明や動物生体における効果など様々な課題は残されているが、JEV をモデルとして実施した本研究によって、ASO gapmer が新たなウイルス治療法となる可能性を支持する多くの新知見を得ることができたと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件／うち国際共著 8件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Lim KRQ, Woo S, Melo D, Huang Y, Dzierlega K, Shah MNA, Aslesh T, Roshmi RR, Echigoya Y, Maruyama R, Moulton HM, Yokota T.	4. 巻 119(9)
2. 論文標題 Development of DG9 peptide-conjugated single- and multi-exon skipping therapies for the treatment of Duchenne muscular dystrophy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	6. 最初と最後の頁 e2112546119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2112546119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Echigoya Y, Trieu N, Duddy W, Moulton HM, Yin H, Partridge TA, Hoffman EP, Kornegay JN, Rohret FA, Rogers CS, Yokota T.	4. 巻 22(23)
2. 論文標題 A Dystrophin Exon-52 Deleted Miniature Pig Model of Duchenne Muscular Dystrophy and Evaluation of Exon Skipping	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International journal of molecular sciences	6. 最初と最後の頁 13065
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222313065	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Lim KRQ, Bittel A, Maruyama R, Echigoya Y, Nguyen Q, Huang Y, Dzierlega K, Zhang A, Chen YW, Yokota T.	4. 巻 29
2. 論文標題 DUX4 Transcript Knockdown with Antisense 2'-O-Methoxyethyl Gappers for the Treatment of Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Therapy	6. 最初と最後の頁 848 ~ 858
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ymthe.2020.10.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Lim KRQ, Maruyama R, Echigoya Y, Nguyen Q, Zhang A, Khawaja H, Sen Chandra S, Jones T, Jones P, Chen YW, Yokota T.	4. 巻 117
2. 論文標題 Inhibition of DUX4expression with antisense LNA gappers as a therapy for facioscapulohumeral muscular dystrophy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	6. 最初と最後の頁 16509 ~ 16515
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1909649117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sato M, Shiba N, Miyazaki D, Shiba Y, Echigoya Y, Yokota T, Takizawa H, Aoki Y, Takeda S, Nakamura A.	4. 巻 520
2. 論文標題 Amelioration of intracellular Ca <sup>2+</sup> regulation by exon-45 skipping in Duchenne muscular dystrophy-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 179 ~ 185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.09.095	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Echigoya Y, Lim KRQ, Melo D, Bao B, Trieu N, Mizobe Y, Maruyama R, Mamchaoui K, Tanihata J, Aoki Y, Takeda S, Mouly V, Duddy W, Yokota T.	4. 巻 27
2. 論文標題 Exons 45-55 Skipping Using Mutation-Tailored Cocktails of Antisense Morpholinos in the DMD Gene	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Therapy	6. 最初と最後の頁 2005 ~ 2017
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymthe.2019.07.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 越後谷 裕介	4. 巻 1
2. 論文標題 ウイルス性疾患に対するアンチセンス核酸医薬品の開発現状と課題	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medical Science Digest-核酸医薬の最前線-	6. 最初と最後の頁 8 ~ 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Lim KRQ, Echigoya Y, Nagata T, Kuraoka M, Kobayashi M, Aoki Y, Partridge T, Maruyama R, Takeda S, Yokota T.	4. 巻 27(1)
2. 論文標題 Efficacy of Multi-exon Skipping Treatment in Duchenne Muscular Dystrophy Dog Model Neonates.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Therapy	6. 最初と最後の頁 76 ~ 86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymthe.2018.10.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Echigoya Y, Lim KRQ, Nakamura A, Yokota T.	4. 巻 8
2. 論文標題 Multiple Exon Skipping in the Duchenne Muscular Dystrophy Hot Spots: Prospects and Challenges	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Personalized Medicine	6. 最初と最後の頁 41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jpm8040041	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計3件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 岡本俊輔、越後谷裕介、瀬川太雄、佐藤雪太、伊藤琢也
2. 発表標題 RNA分解型アンチセンス人工核酸による日本脳炎ウイルス増殖抑制効果
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 速水李誉、越後谷裕介、岡本俊輔、伊藤琢也、佐藤雪太
2. 発表標題 日本脳炎ウイルスに増殖抑制効果を示すRNA構造阻害型アンチセンス人工核酸の開発
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 越後谷 裕介
2. 発表標題 デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対するアンチセンス核酸カクテル療法の開発
3. 学会等名 日本筋学会 第5回学術集会 シンポジウム1「最新ゲノム解析による遺伝学的診断と運動器疾患の新たな治療戦略」(招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

日本大学生物資源科学部 動物医科学研究センター  
<http://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~nuverc/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------