

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860280

研究課題名(和文)慢性C型肝炎を対象とした新規核酸医薬治療法の開発

研究課題名(英文)Development of novel nucleic acid drugs for chronic hepatitis C virus infection

研究代表者

大野 慎一郎(OHNO, Shinichiro)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：90513680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では核酸による慢性C型肝炎の治療を実現するため、HCVの排除と線維化の治療を目的とした新規の核酸医薬とDDSの開発を目指した。改変型エクソソーム産生細胞を樹立するために、HCVのエンベロープ発現ベクターおよび、パッケージングベクターを作製した。本研究で樹立した改変型エクソソームは、肝細胞へ効率よく医薬を送達するためのDDSとして慢性C型肝炎の治療をはじめ幅広く応用出来る可能性がある。また改変型エクソソームに効率よく核酸医薬を封入するパッケージングシステムは、核酸医薬の実現化を推進することが期待される。

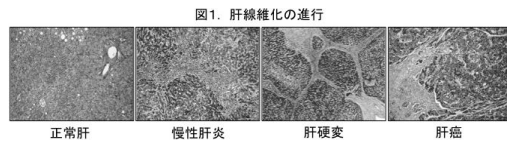
研究成果の概要(英文)：In order to achieve the treatment of chronic hepatitis C with a nucleic acid, the present study aimed at new development of nucleic acid drugs and DDS for the purpose of treatment of fibrosis and rejection of HCV. To establish a modified exosomes producing cell, the envelope expression vector of HCV and to prepare a packaging vector. Modified exosomes that were established in this study, it is possible that the beginning can be widely used for the treatment of chronic hepatitis C as a DDS for delivering efficient pharmaceutical into hepatocytes. Also packaging system enclosing the efficient nucleic acid medicine to a modified exosomes are expected to promote the realization of the nucleic acid drugs.

研究分野：分子病理学

キーワード：ドラッグデリバリー HCV

1. 研究開始当初の背景

慢性C型肝炎は高頻度に肝硬変から肝がんに移行する(図1)。国内での慢性肝疾患の70%はHCVが原因とされているが、新規薬剤の開発により、従来難治性である症例の奏効率が上昇している。一方で、薬剤の非適応症例や肝硬変に至った症例では、線維化の進行や発がんが制御不能であることが問題視されている。このような慢性C型肝炎の治療には、現行の治療法と異なるアプローチでウイルスを排除し、さらに線維化の進行を抑制する新規治療法の開発が必須である。



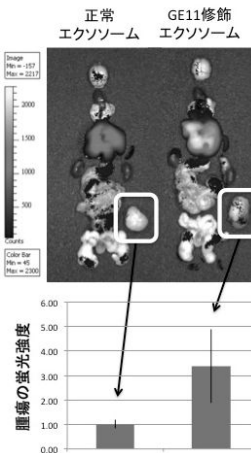
1本鎖RNAであるHCVゲノムは、タンパク質発現の鋳型であると同時に、遺伝子本体であるため、siRNAの標的として大きな効果が期待できる。核酸医薬が未だ実用化に至らないのは、分解酵素などにより不安定であること、病変部への送達率が低いことが主な原因と考えられる。したがって、核酸医薬を用いたC型肝炎ウイルスの排除にはHCV siRNAを安定に効率良く肝細胞に送達するDDSの開発が必須である。

一方で、肝線維化の機序にはTGF- β が中心的な役割を担っており、線維化治療の標的分子と考えられる。また、TGF- β の産生細胞は肝星細胞であるため、細胞特異性が求められる。このため肝星細胞に特異的なDDSの開発が必要である。

ウイルスベクターは遺伝子を高効率に導入する手段として有効であるが、がん遺伝子付近への導入遺伝子の挿入により、白血病、造血異常などの重篤な副作用が報告されている。

このことから応募者は、遺伝子挿入を伴わない核酸医薬のキャリアーとしてウイルスに注目し、ウイルスの外殻(エンベロープ)と同様の構造を持つ膜小胞体(エクソソーム)を応用したDDSの開発を行ってきた。エクソソームに標的特異性を付加するため、乳がんを高発現するEGFRの人工リガンドであるGE11ペプチドを修飾した。このエクソソームは乳がん細胞に高親和性であり、乳がんモデルマウスに投与することにより有意に腫瘍へ集積する(図2)。一般的にキャリアーの多くは標的細胞への到達が困難と言われているが、応募者はエクソソームに特異性分子を付加し、さらに腫瘍抑制性の核酸を内包することで乳がんモデルマウスでの腫瘍の抑制に成功した(Ohno et al., Mol Ther 2013)。

図2. GE11修飾エクソソームの腫瘍集積能の評価



2. 研究の目的

これまでの成果から、エクソソームが核酸医薬DDSとして有用であることを示した。一方で、エクソソームを応用したDDS開発の問題は、エクソソームの修飾や、核酸の内包される効率が低いことにある。本研究では、この問題を解決する

方法として以下の理由からHCVを応用したDDSを開発する着想に至った。

- HCVは肝細胞および肝星細胞に特異性のあるエンベロープ蛋白質をエクソソーム上に発現させることが可能である。
- 核酸医薬をHCVゲノムのパッケージング領域に付加することで、エクソソーム中へ高確率で内包することが実現可能である。
- HCVのゲノムは逆転写酵素を伴わないため遺伝子挿入による毒性がない。

したがって本研究では、エンベロープを発現するエクソソーム(改変型エクソソーム)による肝細胞および肝星細胞に特異的な核酸医薬のデリバリーシステムを構築し、HCV慢性感染および線維化に対する新規治療法の開発を試みる。

3. 研究の方法

HCVゲノム中へのリボザイム誘導性shRNA(RZshRNA)の構築

改変型エクソソーム内へshRNAを内包するため、HCVパッケージングベクターにTGF- β および、HCV特異的なshRNAを挿入する。shRNAは改変型エクソソームに内包された後にHCVゲノムから切り離すため、RNA切断活性を有するRNA(リボザイム)により切り出しが可能な構築をする。

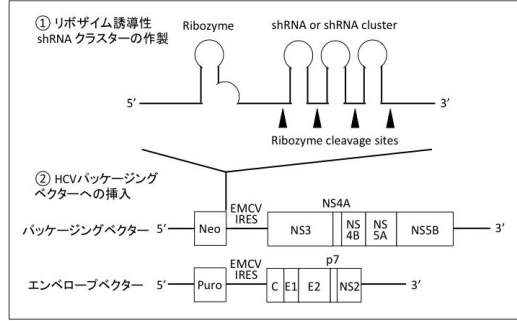
- 1) RZshRNAの構築

TGF- β およびHCV RNA特異的shRNAを構築する。shRNAの両端にはリボザイムの切断配列を挿入する。さらにリボザイムはshRNAの5'側に付加する。また、ノックダウン効率を高めるため、shRNAを複数連ねたものを作製する(図4)。

- 2) RZshRNAによるノックダウン効率の計測

リボザイムによるshRNAの切り出しは高濃度のマグネシウム存在下で行い、切断はノーザンブロット法を用いて確認する。また、切り

図4. リボザイム誘導性shRNAの構築およびHCVパッケージングベクターへの挿入



出された shRNA を改変型 HCV 導入肝細胞株および肝星細胞株へ導入し、HCV および TGF- α mRNA のノックダウン効率で機能性を評価する。細胞内で切断反応が起こる場合、またはノックダウン効果が低い場合は、誘導型リボザイムを応用することを検討する。

RZshRNA を内包した改変型エクソソームの構築

②-1) 改変型エクソソーム産生細胞の樹立
 改変型エクソソーム産生細胞株を樹立するために、HCV のエンベロープ発現ベクターをヒト肝細胞株へ導入する(図4)。産生された改変型エクソソームは ELISA および免疫電顕にて評価する。改変型エクソソームの標的細胞内への取込効率は蛍光標識した改変型エクソソームを肝細胞株および、肝星細胞株の培養液に添加し、蛍光顕微鏡を用いて評価する。

②-2) RZshRNA を内包した改変型エクソソームによるノックダウン効果の評価
 HCV パッケージングベクターに RZshRNA を挿入し、*in Vitro* 転写により RNA を合成する。合成 RNA を改変型エクソソーム産生細胞へ導入し、RZshRNA を内包する改変型エクソソームを産生する細胞を作製する。この細胞培養上清から改変型エクソソームを精製し、高濃度マグネシウム存在下でリボザイムを活性化することで shRNA の切断を誘導する。RZshRNA の内包効率および shRNA の切り出し効率は、qPCR 法およびノーザンブロット法を用いて評価する。ノックダウン効果は、改変型 HCV 導入肝細胞株および肝星細胞株を用いて、HCV および TGF- α mRNA の qPCR 法で評価する。ノックダウン効果が低い場合は、改変型エクソソーム量の改善および遺伝子型の異なる HCV ゲノムを用いた再構築を検討する。

モデルマウスを用いた線維化・HCV 抑制効果の評価

②-2 で作製した改変型エクソソームが、モデル動物内の肝臓へ shRNA を送達し、HCV および TGF- α mRNA をノックダウンするか検討する。

③-1) 肝線維化・HCV 感染モデルマウスの作成

四塩化炭素の連続投与にて肝線維化モデルマウスを作成する。肝線維化の発症は組織標本にて確認を行う。HCV 感染モデルマウスは、ルシフェラーゼ遺伝子を発現する改変型 HCV

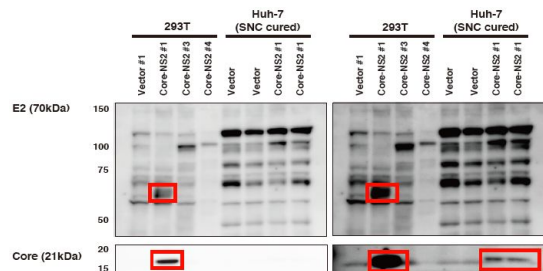
を導入したヒト肝がん細胞株を免疫不全マウスに移植して作成する。細胞の生着は、ルシフェリン投与による *in Vivo* イメージングシステム (IVIS) 解析を用いて確認する。

③-2) モデルマウスへの RZshRNA 内包改変型エクソソームの投与

蛍光標識した改変型エクソソームを、肝線維化・HCV 感染モデルマウスの尾静脈より投与し、肝細胞および肝星細胞での取り込みを IVIS およびルミノメーターで解析する。RZshRNA 内包した改変型エクソソームを、肝線維化・HCV 感染モデルマウスの尾静脈より投与する。TGF- α の産生および線維化は生化学的、組織学的手法を用いて評価する。HCV ゲノムコピー数に対する影響は IVIS および qPCR 法を用いて評価する。改変型エクソソームが生体に与える影響を確認するために、各臓器について組織学的手法を用いて評価を行う。

4. 研究成果

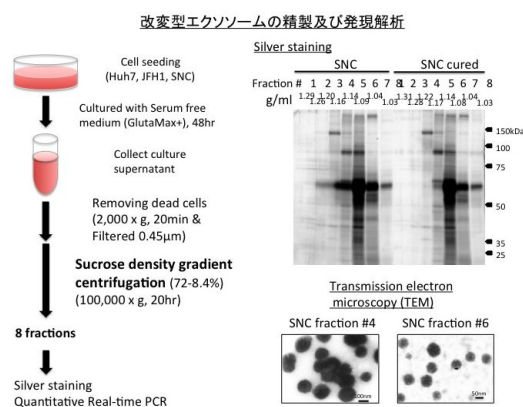
本研究では核酸による慢性 C 型肝炎の治療を実現するため、HCV の排除と慢性肝炎に伴う線維化の治療を目的とした新規の核酸医薬と DDS の開発を目指した。初めに、HCV のエンベロープを基礎にした改変型エクソソーム産生細胞を樹立するために、HCV のエンベロープ発現ベクターの作製を行った。HCV の全長 DNA より、HCV のエンベロープを構成する 5' 側の Core, E1, E2, P7, NS2 領域をサブクローニングし、エンベロープベクターを作製した。エンベロープベクターは、肝癌細胞株 Huh-7 およびヒト胎児腎細胞 HEK293 に導入し、HCV エンベロープを恒常的に発現する細胞株の樹立を試みた。結果、Huh-7 細胞では十分な発現が得られなかったが、HEK293 細胞で強いエンベロープタンパク質の発現を確認した(下図)。



また、HCV の全長 DNA より、HCV の複製を担う分子およびパッケージングシグナルを有する 3' 側の NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B 領域をサブクローニングし、パッケージングベクターを作製した。以上の実験から、改変型エクソソーム発現 HEK293 細胞の樹立および、核酸医薬を改変型エクソソームに内包するためのパッケージングベクターの作製に成功した。

改変型エクソソームの精製および発現の評価系は確立しており(下図)、四塩化炭素

の連続投与による肝線維化モデルマウスによる、肝線維化の in vivo 評価系が既に確立できている。従って、今後は、これらの in vivo および in vitro の評価系を用いて、改変型エクソソームの解析を行う。



本研究で樹立した改変型エクソソームは、肝細胞へ効率よく医薬を送達するためのDDSとして慢性C型肝炎の治療をはじめ幅広く応用出来る可能性があり、また改変型エクソソームに効率よく核酸医薬を封入するパッケージングシステムは、核酸医薬の実現化を推進することが期待される。

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2件)

大野慎一郎、黒田雅彦「エクソソームを用いた治療」エクソソームによる疾患研究の新展開、査読無し、BioClinica 社 Vol.29 No.6 p.34-37 JUNE 2014

大野慎一郎、高梨正勝、黒田雅彦「エクソソームによる核酸DDS」査読無し、Drug delivery system 第29巻2号 p.30-33. MAR 2014.

[学会発表](計7件)

大野慎一郎、板野華連、原田裕一郎、高梨正勝、須藤カツ子、池田徳彦、黒田雅彦 「肺がんを効果的に抑制する Mimic miRNA の新規形状の探索」第55回日本肺がん学会 2014年11月14～16日 京都国際会議場

Shin-ichiro OHNO, Karen ITANO, Yuichiro HARADA, Masakatsu TAKANASHI, Katsuko SUDO, Norihiko IKEDA, Masahiko KURODA. “The development of short form of mimic microRNA for lung cancer therapy” 第74回分子癌学会 2014年9月25～27日 パシフィコ横浜

大野慎一郎、板野華連、原田裕一郎、浅田浩太郎、老川桂生、高梨正勝、須藤カツ子、黒田雅彦 「肺がんを標的とする短縮型 Mimic miRNA の開発」第6回日本RNAi研究会 2014年8月28～30

日 広島プリンスホテル

大野慎一郎、板野華連、原田裕一郎、高梨正勝、須藤カツ子、黒田雅彦 「がんを効果的に抑制する短縮型 Mimic miRNA の開発」第33回分子病理学研究会 2014年7月25～26日 宮城蔵王ロイヤルホテル

大野慎一郎、板野華連、原田裕一郎、高梨正勝、須藤カツ子、黒田雅彦 「肺がんを効果的に抑制する短縮型 Mimic miRNA の新規形状の探索」第103回日本病理学会 2014年4月24～26日 広島国際会議場

Shin-ichiro OHNO, Karen ITANO, Yuichiro HARADA, Masakatsu TAKANASHI, Katsuko SUDO, Masahiko KURODA. “Lung cancer miRNA replacement therapy using novel class of miRNA” AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics. 2013年10月19～24日 Hynes Convention Center, Boston, MA, USA.

大野慎一郎、板野華連、原田裕一郎、高梨正勝、須藤カツ子、黒田雅彦 「高効率にがん抑制効果を発揮する miR-34a の新規形状の探索」第5回日本RNAi研究会 2013年8月29～31日 グランドプリンスホテル広島

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

大野 慎一郎 (Shin-ichiro OHNO)
東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：90513680

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：