

Title	アデノウイルス由来小分子RNAと宿主RNAi機構との相互作用に関する解析と遺伝子組換えウイルスへの応用
Author(s)	町谷, 充洋
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/52258
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"> 大阪大学の博士論文について をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (町谷 充洋)	
論文題名	アデノウイルス由来小分子RNAと宿主RNAi機構との相互作用に関する解析と遺伝子組換えウイルスへの応用
論文内容の要旨	
アデノウイルス (Ad) のゲノムDNAには、RNAポリメラーゼⅢ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PKRの活性化を阻害することでAdの増殖を促進することが知られている。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。そこで本研究では、まずDicerによるVA-RNAの切断及びmivaRNAの産生がAd感染に及ぼす影響を解析した。その結果、全長のVA-RNA IによりVA-RNA欠損Adの増殖が促進したのに対し、Dicerによる切断で生じるmivaRNAIはVA-RNA欠損Adの増殖を全く促進しなかった。すなわち、DicerによるVA-RNAのプロセッシングはAdの増殖に必要ないことが示唆された。さらに、Dicerを強制発現した細胞において、VA-RNAコピー数の低下とともにAd増殖の阻害が観察された。一方で、Dicerノックダウン細胞ではVA-RNAコピー数の増加し、Ad増殖が促進されたことから、DicerはVA-RNAのコピー数を制御することで、Adの増殖を抑制していることが示された。上述のように、DicerのノックダウンがAdの増殖を大きく促進したことから、腫瘍溶解性AdのゲノムにDicerに対するShort-hairpin RNA (shDicer) 発現カセットを搭載しDicerをノックダウンすれば、より高い増殖能を示す腫瘍溶解性Adが開発できると考えた。そこで、shDicer発現腫瘍溶解性Adを開発し、評価を行ったところ、従来の腫瘍溶解性Adと比較して極めて高い増殖能および抗腫瘍効果を示した。また、DicerノックダウンによるAd増殖促進効果は、上記のVA-RNAの切断による影響に加えて、宿主のmiR-27が発現低下することで、miR-27の標的遺伝子であるCyclin G1が発現上昇し、Adの増殖が亢進されることを明らかにした。 一方で、VA-RNAは転写後、miRNAやsiRNAの成熟化と同様にExportin-5によって細胞質に輸送され、Dicerによる切断の後、RNA-induced silencing complex (RISC) にとりこまれる。従ってこれらの過程において、VA-RNAが競合的にmiRNAプロセッシング因子を阻害していると報告されているが、実際に非増殖型のAdベクターでshRNAを発現させた場合にこのような現象が起こっているかは明らかとされていない。そこで、shRNA発現Adベクターが発現するVA-RNAが、自身の発現するshRNAによるRNAiを阻害するか否か、VA-RNA欠損Adベクターを開発し検討した。その結果、VA-RNA欠損Adベクターは、従来のshRNA発現Adベクターと比較し高いノックダウン効率を示した。また、VA-RNA遺伝子を含むほぼ全てのウ	

ウイルス遺伝子を取り除いたHelper-dependent Ad (HD-Ad) ベクターについても、従来型Adベクターと比較しノックダウン効率の向上が見られた。すなわち、VA-RNAはshRNA発現AdベクターにおけるRNAi効果を阻害していることが明らかとなった。また、VA-RNA欠損AdベクターならびにHD-AdベクターはshRNA発現による標的遺伝子の高効率なノックダウンに向けた基盤ベクターとして有用であることが示された。

以上のように、VA-RNAが宿主RNAi機構と密接に関わっていることを明らかにするとともに、これらの知見を応用して新規遺伝子組換えAdを開発することに成功した。Ad感染細胞におけるVA-RNAの機能は未だ解明されていないことが多く、今後もその機能解析を行うことで、ウイルス及び宿主の生命現象の発見・解明につながると思われる。また、これらの知見が遺伝子組換えAdを用いた遺伝子治療研究の更なる進展に寄与することを期待したい。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (町 谷 充 洋)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教 授 水口 裕之
	副 査	教 授 中川 晋作
	副 査	教 授 八木 清仁

論文審査の結果の要旨

無脊椎動物や植物等においてウイルス感染に対する防御機構として機能するRNAiに対して、多くのウイルスが宿主のRNAiを抑制することでウイルス感染を成立させている。一方で、哺乳類細胞でRNAiが抗ウイルス機構として機能するかは明らかにされていないが、アデノウイルス（Ad）感染においては、感染後速やかに転写されたAd由来小分子RNAであるVA-RNAがRNAiを阻害する役割を担っていることが知られている。そのRNAi阻害機構としては、宿主のDicerによって、VA-RNAがマイクロRNA (miRNA) 様にプロセスされる過程で宿主のmiRNAプロセッシング経路を競合的に阻害することが挙げられる。しかしながら、VA-RNAが宿主のRNAi経路の阻害システムとして機能する意義はこれまでに明らかにされていなかった。そこで、申請者は、RNAiが哺乳類細胞における防御機構として機能するか否かの解明を目的として、VA-RNAと宿主RNAi機構との相互作用に着目し、宿主RNAi機構がAd感染に及ぼす影響を解析し、以下の結果を得た。

1. Dicer は、VA-RNA の切断を介して Ad の増殖を負に制御しており、Dicer のノックダウンが Ad の増殖を顕著に促進することが示された。
2. より高い抗腫瘍効果を示す新規腫瘍溶解性 Ad の開発を目指して、Dicer に対する short-hairpin RNA (shDicer) 発現腫瘍溶解性 Ad を開発した。shDicer 発現腫瘍溶解性 Ad は、従来の腫瘍溶解性 Ad と比較し、顕著に高い増殖能及び抗腫瘍活性を示した。
3. 宿主 miR-27 は Cyclin G1 の発現を抑制することで、Ad の増殖を阻害していることを明らかにした。
4. Doxycycline の添加で VA-RNA I の発現を誘導可能な VR293 細胞を用いることで、VA-RNA 欠損 Ad (AdΔVR) ベクターの産生・増幅に成功した。
5. 作製した AdΔVR ベクターを用いて、VA-RNA は short-hairpin RNA (shRNA) 発現 Ad ベクターにおける RNAi 効果を阻害していることを明らかにした。また、AdΔVR ベクターは shRNA 発現による標的遺伝子ノックダウンに向けた基盤ベクターとして有用であることを示した。

以上、本研究において、AdはVA-RNAを発現することで宿主RNAi機構を阻害しているが、一方で宿主も自身のRNAi機構を介してそのVA-RNAを切断し、さらにmiR-27を産生することでAd感染を抑制することが示された。すなわち、RNAi機構がAd感染に対する防御機構として機能していることが示された。また、Ad感染時におけるVA-RNAと宿主RNAi機構の相互作用を解明し応用することで、shDicer発現腫瘍溶解性AdやshRNA発現AdΔVRベクターなどの新規遺伝子組換えウイルスの開発に成功した。本研究の結果は、ウイルス及び宿主の生命現象の解明だけでなく、遺伝子組換えAdを用いた遺伝子治療研究の更なる進展に大きく貢献するものと期待されることから、極めて意義深く、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。