The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	長鎖RNA発現アデノウイルスベクターを用いたC型肝炎ウイルスゲノム発現系の開発
Author(s)	吉田, 孟史
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59422
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、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

【８】

氏　　名	吉　田　孟　史（よし　だ　たけ　し）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬学）
学　位　記　番　号	第　２５１６７　号
学 位 授 与 年 月 日	平成 24 年 3 月 22 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第４条第１項該当 薬学研究科分子薬科学専攻
学　位　論　文　名	**長鎖ＲＮＡ発現アデノウイルスベクターを用いたＣ型肝炎ウイルスゲノム発現系の開発**
論 文 審 査 委 員	（主査） 教　授　八木　清仁 （副査） 教　授　土井　健史　　教　授　水口　裕之　　教　授　辻川　和丈

論 文 内 容 の 要 旨

C型肝炎ウイルス（HCV）は9.6 kbのRNAをゲノムに持つプラス鎖RNAウイルスである。HCV感染は慢性肝炎、肝硬変を引き起こし、最終的には肝細胞癌に至る。日本で200万人、世界中では2億人もの感染者が存在すると推定されている。これまで、C型肝炎治療には複製阻害薬であるインターフェロン（IFN）とリバビリンの併用療法が用いられてきたが、奏効率は50%に過ぎなかった。2011年、新たにプロテアーゼ阻害剤が認可され、ポリメラーゼ阻害剤も臨床試験中であるが、これらウイルス側を標的とした阻害剤では薬剤耐性ウイルスの出現が報告されている。そのため、薬剤耐性ウイルスが出現しにくい宿主因子を標的としたHCV複製阻害薬の開発が期待されている。しかし、HCVゲノム導入法開発の遅延により、HCV複製に関わる創薬ターゲットはほとんど明らかとなっていない。

HCVゲノム導入法としてはHCV粒子の感染とHCV RNAのエレクトロポレーション導入法がある。HCV粒子は培養細胞で産生したHCVあるいは患者血清が用いられている。培養細胞で産生可能なHCV株は特殊なHCV株のみであること、患者血清は入手が困難かつ遺伝子工学的な解析が不可能であることなどの問題がある。HCV RNAのエレクトロポレーション導入法は、細胞障害性や導入効率の問題から*in vivo*や初代培養細胞などへは適用できない。以上のことから、汎用性、導入効率に優れたHCVゲノム導入法の確立が新たなHCV複製阻害薬開発の課題であると考えられる。

哺乳類細胞におけるRNA発現系は、rRNAを発現するRNA polymerase I系、mRNAを発現するRNA polymerase II系、tRNAなどの短鎖RNAを発現するRNA polymerase III系に大別され、現在一般的な遺伝子発現ではRNA polymerase II系、siRNAなどの発現系ではRNA polymerase III系が利用されている。RNA polymerase I系はrRNA（13 kb）の発現に関与していることから、この長鎖RNA発現系RNA polymerase I発現ベクターを用いれば、利便性の高いHCVゲノムの導入が可能になると考えられるものの、RNA polymerase I発現系の開発は立ち遅れている。

本研究では、*in vitro*、*in vivo*遺伝子導入ベクターとして汎用されているアデノウイルス（Ad）ベクターにRNA polymerase I発現系を搭載することで、利便性の高いHCVゲノム導入基盤技術の構築を試みた。また、ヒトiPS細胞由来肝細胞は、HCV感受性や治療効果などが異なる患者細胞から作製可能であり、HCV侵入、複製、治療に関与する宿主因子を解析可能な細胞として注目されている。そこで、本ベクターを用いたヒトiPS細胞由来肝細胞でのHCV複製解析の可否を検証した。

HCVゲノムとして、レポーターとしてのルシフェラーゼ遺伝子とHCVの複製に必須な遺伝子領域（NS3– NS5B）を融合させたHCVサブゲノムを用い、このcDNAをRNA polymerase Iプロモーターの下流に搭載したHCVサブゲノム発現プラスミドを作製し、HCVが複製可能なHuh7細胞においてその発現を検証した。HCVサブゲノム発現プラスミド導入細胞では高いルシフェラーゼ活性が確認され、その発現はIFN濃度依存的に抑制された。以上よりRNA polymerase I発現系を用いたHCVサブゲノムの発現を確認した。

次に、HCVサブゲノム発現コンストラクトを搭載した5型Adベクターの作製を試みたがAdベクターは産生されなかった。この原因として、①HCVサブゲノム発現コンストラクト（8.8 kb）がAdのパッケージングリミット（最大8.2 kb）を超えてしまっている可能性、②HCVサブゲノムにコードされているプロテアーゼがAdタンパク質を切断することでAdベクター産生が阻害されている可能性が考えられた。そこで、5型Adベクターのファイバーを35型Adのファイバーに置換し、最大8.8 kbのサイズの目的遺伝子を搭載可能となったAd5/F35ベクターを利用した。また、HCV由来プロテアーゼの影響を抑えるために転写制御可能なRNA polymerase I-テトラサイクリン誘導システム（Tetシステム）を構築した。

RNA polymerase I-TetシステムおよびAd5/F35ベクターを用いることでHCVサブゲノム発現Adベクター（AdP_I235-HCV）の作製に成功した。HCVサブゲノム発現Adベクター導入Huh7細胞では、HCV NS5Aタンパク質およびルシフェラーゼタンパク質の発現が確認できた。さらに、複製酵素であるHCV NS5B（RNA依存性RNA polymerase）の機能欠損変異体（AdP_I235-ΔGDD）を用いてHCV複製能を検証した。Huh7細胞にHCVサブゲノム発現Adベクターを導入し、転写誘導条件下で24時間培養した後、転写抑制条件下で48時間培養し、ルシフェラーゼ活性およびHCV複製産物であるマイナス鎖HCV RNAの発現を解析した。その結果、AdP_I235-ΔGDDではこれらの発現がほとんど認められないのに対し、AdP_I235-HCVでは認められ、HCV NS5Bタンパク質依存的に複製していることが示された。さらに、HCVサブゲノム発現Adベクター導入Huh7細胞にIFNを処理したところ、濃度依存的なルシフェラーゼ活性の低下が認められ、HCVサブゲノム発現Adベクターを用いてIFNによるHCV複製阻害解析が可能であることが示唆された。

ヒトiPS細胞およびヒトiPS細胞由来肝細胞にHCVサブゲノム発現Adベクターを導入し、転写誘導条件下で24時間培養後、さらに転写抑制条件で48時間培養し、ルシフェラーゼおよびHCVゲノムの発現を解析した。AdP_I235-HCV導入iPS細胞由来肝細胞ではHuh7細胞と同等のルシフェラーゼおよびHCVゲノムの発現が確認されたが、ヒトiPS細胞では非常に低い発現しか確認されなかった。AdP_I235-ΔGDD導入細胞はいずれの細胞においてもルシフェラーゼおよびHCVゲノムの発現はほとんど認められなかった。また、AdP_I235-HCV導入iPS細胞由来肝細胞にIFNを添加したところ、濃度依存的なルシフェラーゼ活性の低下が認められた。以上の結果から、HCVサブゲノム発現Adベクターを用いることでヒトiPS細胞由来肝細胞においてHCV複製解析およびIFNによる複製阻害解析が可能であることが示唆された。

本論文では、転写誘導性RNA polymerase I発現系を搭載したAdベクターシステムを初めて開発し、本システムにHCVサブゲノムを搭載したAdベクターがNS5B依存的に複製を示すこと、本ベクター感染細胞がIFN依存的なHCVゲノム複製阻害を示すことから、HCV複製評価系としての応用が示唆された。さらに、本システムを用いてヒトiPS細胞由来肝細胞がHCV複製評価系として機能することを初めて見出した。これらの結果は、長鎖RNA発現AdベクターによるHCVゲノム導入法がHCV研究において有用であることを示唆するものであり、HCV研究において課題の一つであったHCVゲノムの簡便な導入を可能にした。これによりHCVの創薬研究および基礎研究のさらなる進展が期待される。

論文審査の結果の要旨

当該論文は長鎖RNAを発現しうるRNA polymerarse I発現系を搭載したアデノウイルスベクターを構築しC型肝炎ウイルス（HCV）サブゲノムをiPS細胞由来肝細胞を含め種々の細胞に導入しうること、またHCVサブゲノムが複製しうるを実証している。本研究はHCV複製に関わる宿主側因子の解明、HCVワクチンの開発につながる重要な結果を含んでいることから、博士論文としてふさわしい内容と判断した。