The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	アデノウイルス由来小分子RNAによるウイルス増殖促進メカニズムの解明
Author(s)	若林, 圭作
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/72312
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　若林 圭作　）	
論文題名	アデノウイルス由来小分子RNAによるウイルス増殖促進メカニズムの解明

近年の分子生物学の進歩に伴い、遺伝子操作によって有益な特性を有した遺伝子組換えウイルスを創出するウイルス工学がめざましい発展を遂げている。所謂「風邪症候群」を引き起こす病原ウイルスであるアデノウイルス（Ad）は、比較的低病原性であることや、ウイルスゲノムが二本鎖DNAであり遺伝子組換えが比較的容易であること、ウイルス遺伝子の機能解析が進んでいることなどから、遺伝子組換えウイルスの開発研究が最も進んでいるウイルスの一つである。これまでにAdを基本骨格とした様々な特性を有するウイルスベクターや腫瘍溶解性ウイルスが開発されており、一部は遺伝子治療・ウイルス療法の医薬品として既に臨床開発に進み、優れた治療効果も報告されている。

このように、Adを基盤とした新しいバイオ技術は、がんや遺伝性の難治性疾患の新たな治療法となることが期待されている一方で、臨床応用に向けては克服すべき課題も残されている。その一つとしては、遺伝子組換えAdの投与後に誘導される自然免疫の活性化が挙げられる。Adは、生体投与後、ウイルス由来の成分が自然免疫受容体に認識されることで、多量の炎症性サイトカインの産生と、それに伴う組織障害を引き起こす。Adによる自然免疫活性化は、がん治療やワクチンベクターとして用いる場合には治療効果に寄与するものの、その他の場合には大きな問題となる。

また、がん細胞特異的に増殖し、がん細胞を死滅させる腫瘍溶解性Adは、新規抗がん剤として大きな期待が寄せられており、多数の臨床研究が進行中であるものの、十分な治療効果が得られない症例も多くみられることから、さらなる改良が望まれている。腫瘍溶解性Adには、遺伝子組換えにより種々の治療遺伝子発現カセットを搭載することができるため、現在では治療効果の増強を目的とした遺伝子発現カセットを搭載したものが盛んに研究されている。一方で、ウイルスの増殖効率そのものを高めるような改良はほとんど行われていない。

私は、上記の課題の克服に向けて、Adゲノムにコードされる約160塩基の小分子ノンコーディングRNAであるVirus-associated RNA（VA-RNA)に着目した。遺伝子治療およびウイルス療法で使用される遺伝子組換えAdは、5型Adを基本骨格としているが、5型Adは、VA-RNAIとVA-RNAIIの2種類のVA-RNAをコードしている。VA-RNAI, IIともに、Adの感染増殖を促進することが知られているが、依然としてそれらの機能は不明な点が多いのが現状である。当研究室を含む過去の研究では、VA-RNAが細胞内の核酸認識センサーであるRetinoic Acid Inducible Gene-I（RIG-I)/Melanoma Associated Gene-5（MDA5)を介した経路により、I型インターフェロン（IFN)の産生を誘導することで、自然免疫を活性化することが明らかとなっている。加えて当研究室では、VA-RNAがshort-hairpin RNA（shRNA）のプロセシングを競合的に阻害することで、shRNA発現AdベクターによるRNA干渉の効果を低下させることを報告している。こうした背景から、Adベクター作用時に発現するVA-RNAが、副作用の発現や、導入遺伝子の発現低下に何らかの形で寄与している可能性が考えられた。しかしながら、現在汎用されている非増殖型AdベクターにもVA-RNA遺伝子がコードされているものの、AdベクターのVA-RNA発現プロファイルは詳細には明らかとなっていなかった。そこでまず初めに、非増殖型Adベクター、および野生型Ad作用後のVA-RNA発現プロファイルを、培養細胞およびマウスを用いて定量的に解析した。その結果、AdベクターからもVA-RNAが発現するものの、その発現量は、野生型Adと比較すると数百～数千分の一程度と極めて低いものであった。本検討結果は、Adベクターから発現される低発現量のVA-RNAであっても、Adベクターを用いた遺伝子治療の妨げとなることを示唆するものであり、今後のAdベクターの技術開発における重要な知見になるものと期待される。

次に、VA-RNAによるAd感染増殖促進機構の解明に向けて解析を行った。これまでに、VA-RNAIが抗ウイルス応答に重要なDouble-stranded RNA-dependent protein kinase（protein kinase R; PKR）の活性化を阻害することで、ウイルスの感染増殖を正に制御することが知られている。これに対して、VA-RNAIIは、VA-RNAIと約60％相同な配列を有しているが、VA-RNAIと比較してPKRの阻害能が低いことが報告されている。さらに近年、VA-RNAが宿主細胞のマイクロRNA（miRNA）の成熟化に関わる酵素であるDicerによって切断され、VA-RNA由来miRNA（mivaRNA）を産生することが明らかとなった。miRNAは、その配列に依存して標的遺伝子の発現を抑制する分子であり、ウイルスゲノムより転写され、ウ

イルスの感染に寄与するウイルス由来miRNAもいくつか報告されている。mivaRNAも、何らかの標的遺伝子の発現を抑制することでAdの感染増殖に寄与すると考えられた。ところが当研究室のこれまでの研究で、VA-RNAIに由来するmivaRNAIは、Adの感染増殖を促進せず、むしろVA-RNAIはDicerによってmivaRNAIにプロセシングされることでその機能を失うことが明らかとなっている。それに対して、mivaRNAIIは、mivaRNAIよりもRISC中に多く取り込まれていることが報告されていることから、mivaRNAIIが、miRNA様に機能することで、Adの感染増殖に寄与しているのではないかと考えた。しかし、mivaRNAIIの機能については全く明らかとなっていなかったことから、VA-RNAIIの生理機能の解明に向けて、mivaRNAIIに着目し、検討を行った。

まず、mivaRNAIIを導入した細胞におけるAdの感染増殖を評価したところ、mivaRNAII導入細胞ではAdゲノムの増殖が2倍以上促進された。そこで、mivaRNAIIによるAdの増殖促進機構を明らかにするため、マイクロアレイ及び*in silico*解析により、mivaRNAIIの標的遺伝子の同定を試みた。絞り込んだいくつかの標的候補遺伝子について検討したところ、Cullin 4A (CUL4A)がmivaRNAIIの標的遺伝子であること、さらにmivaRNAIIがCUL4Aの発現を抑制することで、Adの増殖を促進することが明らかとなった。CUL4Aは、他のタンパク質と会合し、E3ユビキチンリガーゼとして機能することが知られている。タンパク質のユビキチン化はプロテアソームによる分解の目印となるが、CUL4Aに関しても、分解の標的となるタンパク質がいくつか報告されている。そこで、CUL4Aの発現低下により、それらの標的タンパク質の発現レベルがどのように変化するか検討したところ、CUL4Aの発現低下によってc-Junの発現が増加すること、およびc-JunがAdの増殖に寄与することを見出した。c-Junは転写因子AP-1の構成因子であることから、c-JunがAdゲノムに作用し転写を誘導していることが考えられた。そこで、ChIPアッセイによる検討を行ったところ、c-JunがAdゲノムに結合することが示された。以上の結果より、mivaRNAIIは、CUL4Aの発現を抑制することで、c-Junの発現を増加させ、それによってAd遺伝子の発現を誘導しAdの感染増殖を促進していることが示された。本研究では、VA-RNAIIがAdの感染増殖を促進する機構を明らかにするとともに、Adの感染増殖に関与する新たな生体側因子を同定することに成功した。これらの知見は、遺伝子組換えAdの改良に向けても有用な情報になるものと期待される。

様式7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　若林　圭作　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主査　教授	水口　裕之
	副査　教授	斎藤　達哉
	副査　教授	岡田　直貴

論文審査の結果の要旨

アデノウイルス (Ad) は、所謂「風邪症候群」を引き起こす病原ウイルスであるが、比較的低病原性であることや、ウイルスゲノムが二本鎖DNAであり遺伝子組換えが容易であること、ウイルス遺伝子の機能解析が進んでいることなどから、遺伝子組換えウイルスの開発研究が最も進んでいるウイルスの一つである。これまでにAdを基本骨格とした様々な特性を有するウイルスベクターや腫瘍溶解性ウイルスが開発されており、一部は遺伝子治療・ウイルス療法の医薬品として既に臨床開発に進み、優れた治療効果も報告されている。一方で、これら基盤技術の実用化に向けては克服すべき課題も残されており、さらなる技術開発に向けた基礎的研究は非常に重要である。そこで本研究ではその一環として、Adゲノムにコードされる約160塩基の小分子ノンコーディングRNAであるVirus-associated RNA (VA-RNA)に着目した。

第一章では、Adベクターが発現するVA-RNAの発現プロファイルを明らかにした。当研究室を含む過去の研究では、VA-RNAが細胞内の核酸認識センサーであるRetinoic Acid Inducible Gene-I (RIG-I)/Melanoma Associated Gene-5 (MDA5)を介した経路により、自然免疫を活性化することが明らかとなっている。加えて当研究室では、VA-RNAがshort-hairpin RNA（shRNA）のプロセシングを競合的に阻害することで、shRNA発現AdベクターによるRNA干渉の効果を低下させることを報告している。故に、Adベクター作用時に発現するVA-RNAが、副作用の発現や、導入遺伝子の発現低下に何らかの形で寄与している可能性が考えられたが、AdベクターのVA-RNA発現プロファイルは詳細には明らかとなっていなかった。本研究成果により、Adベクター投与時にわずかに発現するVA-RNAがこれらの現象を引き起こすことが示唆され、今後のAdベクターの技術開発における重要な知見が得られた。

第二章では、Adベクター等の基本骨格として汎用されている5型Adが発現する2種類のVA-RNA（VA-RNAI, II）のうち、これまで研究が進んでいなかったVA-RNAIIの生理機能の解明を試みた。その結果、VA-RNAIIのプロセシング産物であるmivaRNAIIが、Post-transcripitonal gene silencingによってCUL4Aの発現を抑制することで、Adの増殖を促進することが明らかとなった。これにより、既知のVA-RNAIの生理機能とは対照的なVA-RNAIIの機能が明らかとなり、ウイルス学的な観点において大変興味深い知見が得られた。加えて、CUL4Aの発現抑制によるAdの増殖促進メカニズムを詳細に解析したことにより、c-JunやJNKがAdの増殖に寄与するという、Adと宿主の相互作用に関する新しい知見を得ることに成功した。

以上の研究成果は、Adベクターによる遺伝子治療研究や腫瘍溶解性Adによるがん治療研究への応用に向けても極めて有用であることから、本論文は極めて意義深く、博士(薬科学)の学位論文に値するものと認める。