

論文審査の結果の要旨

氏名：岡本 俊輔

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

論文題名：日本脳炎ウイルスに対する RNA 分解型アンチセンス核酸の有効性に関する研究

審査委員：(主 査)	教授	伊藤 琢也
(副 査)	教授	遠矢 幸伸
	教授	小川 健司
	准教授	越後谷 裕介

アンチセンス核酸 (Antisense Oligonucleotide: ASO) は 15-30 塩基長の一本鎖の修飾核酸で構成され、標的 RNA へ配列特異的に結合することで、その機能を調節する。1998 年にサイトメガロウイルス性網膜炎に対する ASO 医薬 (fomivirsen) が初めて承認されて以来、現在までに遺伝性疾患を対象とした 9 種類の ASO が新薬として承認されている。近年では臨床試験および非臨床試験において、ウイルス RNA を標的とする ASO の有効性が多数報告されており、ASO はウイルス感染症に対する新たな治療手段として注目されている。

ASO の中でも RNA 分解型 ASO は、修飾核酸鎖が DNA 鎖を挟み込んだ構造をしており、結合した標的 RNA を内在性 RNase H の誘導により分解することができる。そのため、ウイルス RNA を生体内から除去できる画期的な治療法となることが期待されている (図 1)。特に本邦で開発された修飾核酸である Locked nucleic acid (LNA: 図 2) を用いた RNA 分解型 ASO (LNA gapmer) は、新型コロナウイルスや A 型インフルエンザウイルスといった病原性の高い RNA ウイルスに対して増殖抑制効果を示すことが報告されている。LNA gapmer が有望なウイルス治療戦略となる可能性が支持される一方、全世界で公衆衛生学的問題を引き起こしているフラビウイルス感染症に対する LNA gapmer の有効性と抑制メカニズムについては不明な点が多い。

フラビウイルス科に分類される日本脳炎ウイルス (Japanese encephalitis virus: JEV) はプラス鎖一本鎖 RNA ゲノムを持ち、蚊によって媒介されるアルボウイルスである。JEV はアジア地域に広く分布し、その遺伝子型 (G) は G I 型から G V 型が存在するが、特に G I 型および G III 型が広く蔓延している。ヒトが JEV に感染し発症した場合、急性脳炎が引き起こされる。世界では年間推計 69,000 件の発症報告があり、幼少児や老人で致死率が高く、現在有効な治療法は存在しない。

そこで本研究では、日本脳炎治療薬の開発を目指して、JEV RNA を標的とする LNA gapmer の抗ウイルス効果および作用メカニズムの解明を試みた。最初に JEV ゲノム 3' 非翻訳領域 (Untranslated region: UTR) を標的とする LNA gapmer を複数設計し、Vero 細胞を用いて JEV 増殖抑制効果が高い LNA gapmer を選定した。次に、配列が一部異なるミスマッチ LNA gapmer を用いた細胞試験および生化学的 RNA 分解アッセイにより、配列および修飾核酸特異性に関わる LNA gapmer の JEV RNA 分解メカニズムを解析した。最後に、ヒトにおける LNA gapmer の有効性および安全性を JEV 感染モデルであるヒト神経芽細胞腫由来株を用いた感染実験および *in silico* 解析により検証した。

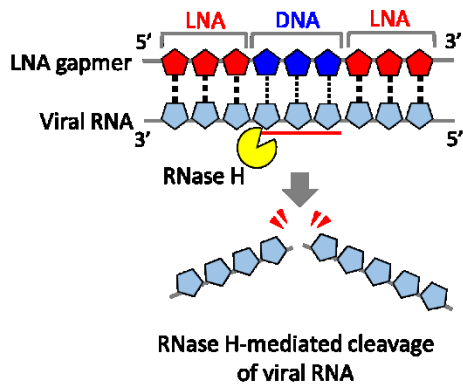


図1: LNA gapmerは標的ウイルスRNAに配列特異的に結合後、RNase Hによる標的ウイルスRNAの分解を誘導する。

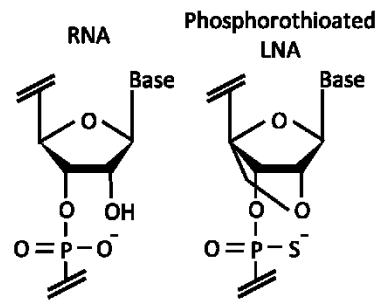


図2: RNAおよびホスホロチオエート化LNAの構造。LNAはRNAのリボース環にO2'-C4'メチレン結合が施されている。ホスホロチオエート化(S化)により、リン酸結合部位の酸素原子が硫黄原子に置換されている。

1. LNA gapmer による JEV 増殖抑制効果の証明および効果的な標的領域の選定

JEV RNA ゲノムの 3' UTR は JEV の複製に必須であることが報告されている。そこで本研究では、JEV 標準株である JaGAR 01 株 (GIII 型) の 3' UTR の塩基配列およびその二次構造を標的とした 9 種類の LNA gapmer を設計した。すなわち、3' UTR 内の同一配列 2 か所を標的とする LNA gapmer 1、JEV の複製に不可欠な 3' UTR conserved sequence モチーフ I (CS I) を標的とする LNA gapmer 2 および 3、ならびに LNA gapmer が結合しやすいと予測される一本鎖構造の 3' UTR stem-loop 領域を標的とする LNA gapmer 4~9 を設計した。全ての LNA gapmer は安定性を付与するヌクレアーゼ耐性および細胞内取り込み効率を上昇させるため、リン酸部にホスホロチオエート修飾を施して合成した (図 2)。スクリーニング試験として、JaGAR 01 株感染 Vero 細胞にリポフェクションで 5 μ M の LNA gapmer を導入し、その培養上清を用いたプラークアッセイを Vero 細胞で行うことにより JEV の増殖抑制効果を評価した。その結果、LNA gapmer 1、2 および 3 では JEV 増殖抑制効果が示されなかったが、3' UTR stem-loop 領域を標的とする LNA gapmer 4~9 全てで有意な JEV 増殖抑制効果が認められた。次に、最も効果が高かった LNA gapmer 8 およびその LNA 組成または塩基長を改変した LNA gapmer 7 および 9 を 0.05、0.5 および 5 μ M で試験したところ、これら 3 つの LNA gapmer は 0.5 μ M から有意な濃度依存性の JEV 増殖抑制効果を示した。

以上、LNA gapmer が JEV に対して有意な増殖抑制効果を示すこと、および JEV の 3' UTR stem-loop 領域は LNA gapmer が抗ウイルス活性を示すために重要な領域であることが明らかとなった。

2. LNA gapmer の配列および修飾核酸特異的な抗 JEV メカニズムの解明

LNA gapmer による RNase H 依存的なウイルス RNA 分解メカニズムについては不明な点が多い。そこで、最も効果が高いことが判明した LNA gapmer 8 を基準に、LNA 鎖または RNase H 結合 DNA 領域に 1 または 2 塩基の変異を導入したミスマッチ LNA gapmer および LNA を持たない ASO (all DNA) を設計し (図 3)、配列および修飾核酸特異性に関わる LNA gapmer の JEV RNA 分解メカニズムの解明を試みた。

プラークアッセイでは、オリジナルの LNA gapmer 8 と比べて全てのミスマッチ LNA gapmer および all DNA において有意に減弱された JEV 増殖抑制効果が観察された。また本研究では、LNA gapmer の細胞内における JEV RNA 分解効果を評価するため、RNase H の添加によって生じる LNA gapmer と合成標的 JEV RNA の複合体のバンド消失を指標とした生化学的 RNA 分解アッセイを構築した (図 4)。本分解アッセイによって、LNA gapmer は RNase H 依存的かつ経時的に JEV RNA 配列を分解すること、ならびにミスマッチ LNA gapmer および all DNA では JEV RNA に対する結合親和性または分解活性が顕著に低下することが明らかと

なった。

以上、ブランクアッセイおよび RNA 分解アッセイの結果の一致により、JEV RNA 標的 LNA gapmer は塩基配列および修飾核酸特異的に RNase H 介在性 RNA 分解を誘導し、抗 JEV 活性を発揮していることが示された。

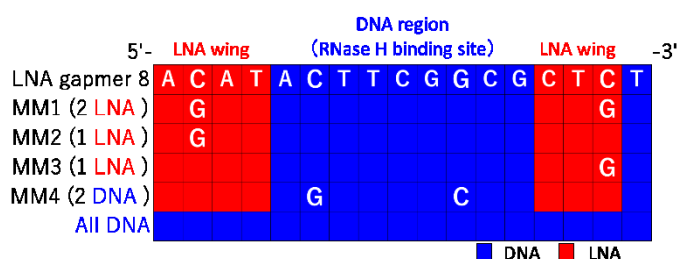


図3: 本研究で用いたミスマッチLNA gapmerの配列。ミスマッチ塩基はオリジナルのLNA gapmer 8と比較して白い文字で示されている。MM: ミスマッチLNA gapmer。

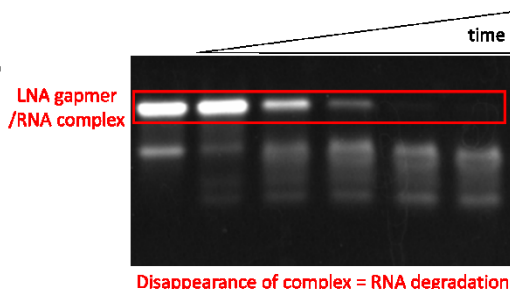


図4: 生化学的RNA分解アッセイにおける電気泳動ゲル。LNA gapmerおよび合成標的JEV RNAの複合体のバンド消失を指標としてLNA gapmerによるJEV RNA分解効果を評価した。

3. ヒト神経芽細胞腫由来株を用いた JEV 感染実験および *in silico* 解析による LNA gapmer の有効性および安全性試験

脳の神経細胞に感染する JEV の治療薬開発のためには、LNA gapmer の有効性および安全性をヒト神経細胞において評価する必要がある。また、抗ウイルス LNA gapmer では異なる RNA ゲノム配列を持つ JEV 遺伝子型または野外株に対して広域スペクトル活性を有することが求められる。そこで LNA gapmer の有効性および安全性を JEV 感染モデルの一つであるヒト神経芽細胞腫由来株 (SK-N-SH 細胞) における JEV 野外株 (G I・III型) を用いた感染実験および *in silico* 解析によって評価した。

ブランクアッセイにより、本研究で開発した LNA gapmer は SK-N-SH 細胞において JaGAR 01 株の感染粒子の増殖を 0.05 μ M から有意に抑制することが明らかとなった。また RT-qPCR では、LNA gapmer が標的とする JEV RNA 領域の発現量が有意に低下することが示された。細胞毒性試験では、ブランクアッセイにおいて試験した濃度での LNA gapmer による有意な細胞生存率の低下は認められなかった。Blast 解析において本 LNA gapmer に完全に相補的なヒト RNA 配列は検出されず、本 LNA gapmer による配列特異的な副反応が生じる可能性は低いことが明らかとなった。

LNA gapmer の JEV 野外株に対する有効性を推定するため、データベース上の JEV 292 株の RNA ゲノム配列を収集し、JEV 3' UTR stem-loop 領域の配列保存性を確認した。その結果、LNA gapmer が標的とする JEV 3' UTR stem-loop 領域は、JEV G I、III、IVならびに V型において高度 (>97%) に保存されていることが判明した。実際に G I型 2 株および GIII型 2 株の JEV 野外株を SK-N-SH 細胞に感染させて本 LNA gapmer の有効性を調べたところ、4 株全ての野外株に対して本 LNA gapmer は有意な増殖抑制効果を示すことが実証できた。

以上、抗 JEV LNA gapmer の SK-N-SH 細胞における有効性および安全性、ならびに異なる遺伝子型を示す様々な JEV 野外株に対して幅広く適用できる可能性が明らかとなった。

本研究では、LNA gapmer が配列および修飾核酸特異的に RNase H 依存性の JEV RNA 分解を誘導し、細胞内での JEV 感染粒子の産生を効果的に抑制することを実証した。また、JEV 株間で高度に保存されている JEV 3' UTR stem-loop 領域は、抗 JEV LNA gapmer の開発において有望な標的であることが明らかとなった。これらの結果は JEV RNA を標的とする LNA gapmer が日本脳炎に対する特異的治療法となり得る可能性

を強く示している。本研究成果は、JEV を含む病原性フラビウイルスに対する LNA gapmer 療法の開発を支持する重要な知見と考えられる。

本論文は、JEV をモデルとして、LNA gapmer が蚊媒介性フラビウイルスの RNA を分解し、感染性ウイルス粒子の増殖を効果的に抑制することを初めて証明した。すなわち、本論文は、LNA gapmer による JEV RNA の分解機序が日本脳炎の特異的治療法となる可能性を示していると共に、本研究コンセプトが他の病原性ウイルスに対する治療手段としても応用可能な点で意義が大きい。ウイルス RNA を標的とする革新的な治療モダリティの開発に関する本論文は、獣医学および医学の発展に寄与する重要な知見として評価できる。

よって本論文は、獣医学術上重要な知見が多く含まれていて、博士（獣医学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

令和 6年 2月 15日