

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

日本大学大学院獣医学研究科獣医学専攻

博士課程

岡本俊輔

2023

目次

第 1 章	序論	1
第 2 章	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	27
2.1	はじめに	28
2.2	材料および方法	29
2.2.1	JEV RNA 二次構造の予測	29
2.2.2	LNA gapmer の設計および合成	30
2.2.3	培養細胞	30
2.2.4	日本脳炎ウイルス株	31
2.2.5	トランスフェクション	32
2.2.6	プラークアッセイ	33
2.2.7	統計解析	34
2.3	成績	36
2.3.1	JEV ゲノム RNA の 3'UTR を標的とする LNA gapmer の 設計	36
2.3.2	スクリーニング試験	37
2.3.3	濃度依存性試験	38

2.4	考察	43
2.5	小括	45
第 3 章	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	47
3.1	はじめに	48
3.2	材料および方法	49
3.2.1	ミスマッチ LNA gapmer の設計および合成	49
3.2.2	トランスフェクション	50
3.2.3	プラークアッセイ	51
3.2.4	生化学的 RNA 分解アッセイ	51
3.2.5	統計解析	52
3.3	成績	53
3.3.1	ミスマッチ LNA gapmer の設計および合成	53
3.3.2	プラークアッセイによる LNA gapmer の塩基配列 および修飾核酸特異的な JEV 増殖抑制効果の解析	54
3.3.3	生化学的 RNA 分解アッセイによる LNA gapmer の RNase H 依存的な JEV RNA 分解効果の解析	54
3.3.4	生化学的 RNA 分解アッセイによる LNA gapmer の塩基 配列および修飾核酸特異的な JEV RNA 分解効果の解析	55

3.4	考察	65
3.5	小括	67
第 4 章	ヒト神経芽細胞腫由来細胞株を用いた JEV 感染実験および <i>in silico</i> 解析による LNA gapmer の有効性および安全性試験	69
4.1	はじめに	70
4.2	材料および方法	71
4.2.1	培養細胞	71
4.2.2	日本脳炎ウイルス株	72
4.2.3	JEV RNA 二次構造の予測	72
4.2.4	トランスフェクション	73
4.2.5	プラークアッセイ	74
4.2.6	遺伝子型別および LNA gapmer 標的領域の確認のためのシーケンス解析	75
4.2.7	リアルタイム RT-qPCR	75
4.2.8	細胞毒性試験	77
4.2.9	JEV RNA 標的 LNA gapmer のヒト DNA および RNA に対するオフターゲット効果の解析	78
4.2.10	JEV 野外株における LNA gapmer 標的領域の保存性解析	78

4.2.11	統計解析	79
4.3	成績	87
4.3.1	JEV RNA 標的 LNA gapmer のヒト神経芽細胞腫由来細胞株における抗ウイルス効果	87
4.3.2	LNA gapmer の細胞毒性効果	88
4.3.3	ヒト RNA に対する LNA gapmer の配列依存的なオフターゲット効果の <i>in silico</i> 解析	89
4.3.4	抗ウイルス LNA gapmer の JEV 遺伝子 I から V 型に対する有効性の <i>in silico</i> 解析による予測	90
4.3.5	遺伝子 I および III 型に属する異なる JEV 野外株に対する LNA gapmer の抗ウイルス効果	91
4.4	考察	102
4.5	小括	109
第 5 章	総論	112
	謝辞	119
	引用文献	120

第 1 章

序論

1. 核酸医薬の特徴および難治性疾患治療薬としての有望性

修飾核酸を基本骨格とするアンチセンス核酸 (Antisense oligonucleotide : ASO) は、遺伝性疾患や感染症などの難治性疾患に対する新たな創薬手段となる核酸医薬として期待されている。核酸医薬とは、15 から 30 塩基程の天然核酸および修飾核酸で構成される核酸配列であり、生体に存在する相補的な核酸配列に直接作用し、化学合成により製造ができる医薬品である¹。遺伝子治療薬も同じ核酸で構成されるが、数千塩基以上の天然核酸で構成されるプラスミドベクターまたはウイルスベクターによって生体内で遺伝子発現を介して作用し、生物学的に製造される医薬品であるという点で核酸医薬とは異なっている

²。核酸医薬は抗体医薬および低分子医薬品と共に分子標的治療薬に分類され、抗体医薬および低分子医薬品の特徴を併せ持っている。すなわち、抗体医薬が標的タンパク分子に高い特異性を有するのと同様に、核酸医薬は標的 RNA 配列に応じた高い特異性を持つ。加えて、核酸医薬は低分子医薬品と同様に、化学合成により製造可能なことから、安定的かつ迅速に供給することができる。

核酸医薬はこれら抗体医薬と低分子医薬品がタンパク質を標的とするのに対し、従来の医薬品では標的とできなかった RNA を標的とできる点で異なっている

³。RNA を標的とする核酸医薬には ASO、small interfering (si) RNA および micro (mi) RNA の種類に大別される。いずれも messenger (m) RNA を標的とするが、ASO は pre-mRNA および miRNA も標的とすることができる。また、例外として特定のタンパク質を標的とするデコイ、アプタマーおよび CpG

オリゴといった核酸医薬も存在する^{4,5}。表 1-1 に示すように⁶、核酸医薬は 1998 年に医薬品として初承認されてから現在（2023 年 11 月時点）までの短い期間で全 19 種類が承認されている。現在も感染症を含め代謝疾患、がんおよび神経疾患など様々なヒト疾患に対する核酸医薬品が開発されており、多数の臨床試験が進行中である⁷。特に ASO は、上市された核酸医薬 19 種類中の 10 種類を占めており、これまで治療薬がなかった遺伝性疾患をはじめとする難治性疾患の治療薬として有望視されている（表 1-1）。

2. ASO の抗ウイルス治療薬としての有望性

ASO は一本鎖の修飾核酸で構成され、標的 RNA に配列特異的に結合することで、その機能を調節する。近年、ウイルス感染症を含む様々な疾患に対して、ASO による治療アプローチの有効性が報告されている^{7,8}。1998 年に AIDS 患者で惹起されるサイトメガロウイルス（Cytomegalovirus: CMV）性網膜炎に対する点眼薬である fomivirsen が ASO 医薬として初めて承認された。その後、9 種類の ASO 医薬が遺伝性疾患に対して承認されてきたが、fomivirsen 以来ウイルス感染症に対する ASO 医薬は未だ承認されていない（表 1-1）。しかし最初に実用化された ASO がウイルス性炎症を制御する治療薬であったことから、ASO は有望なウイルス治療戦略になることが期待されている。実際に、ウイルスに対する ASO の有効性は培養細胞や動物を用いた非臨床試験において多数報告されている⁹。また、多くの臨床試験に

において CMV¹⁰⁻¹³、A 型インフルエンザウイルス (Influenza A virus : IAV)¹⁴、エボラウイルス (Ebola virus : EBOV)、マールブルグウイルス (Marburg virus : MARV)¹⁵、B 型肝炎ウイルス (Hepatitis B virus : HBV)¹⁶⁻¹⁹、C 型肝炎ウイルス (Hepatitis C virus : HCV)²⁰⁻²²、ウェストナイルウイルス (West Nile virus : WNV)^{23, 24} およびヒト免疫不全ウイルス 1 型 (Human immunodeficiency virus-1)^{25, 26} といったヒトへの病原性が高く、新興および再興感染症ならびに性感染症など公衆衛生学上問題となる多くの RNA ウィルスに対して抗ウイルス ASO が試験されている (表 1-2)。臨床応用のためにはさらなる研究が必要であるが、これらの研究はウイルス RNA 標的 ASO の創薬モダリティとしての発展を支持している。

3. ASO の作用メカニズム

ASO は主に標的 RNA の構造阻害または RNase H を介した標的 RNA の分解による二つのメカニズムを介して作用する (図 1-1)²⁷。前者の ASO は構造阻害型 (steric block) ASO と呼ばれており、DNA および修飾核酸が交互に配置されることにより、または全て修飾核酸により構成される。Steric block ASO は、標的 RNA に強固に結合することにより RNA の機能を阻害する作用を持つ。すなわち、細胞質内において標的 mRNA の翻訳開始部位に結合することで mRNA 発現を制御する作用、核内において pre-mRNA のスプライシング調節部位に結合することでスプライシングを制御する作用、

および miRNA に結合することで miRNA による mRNA 発現を制御する作用を有する。Steric block ASO では現在までにデュシェンヌ型筋ジストロフィーや脊髄性筋萎縮症に対する治療薬として 6 品目が米国、欧州および、本邦において上市されている（表 1-1）²⁸。

二つのメカニズムのうち後者の標的 RNA の分解を誘導する ASO は、RNA 分解型 ASO (gapmer ASO) と呼ばれており、中央の DNA 鎖および DNA 鎖の両端に隣接する修飾核酸鎖で構成される。Gapmer ASO は標的 RNA に結合し DNA および RNA の二本鎖を形成する。ASO の DNA 鎖と結合し二本鎖となった標的 RNA は核内および細胞質内において RNase H により認識され分解される²⁹。現在、複数の gapmer ASO が遺伝性疾患に対して承認および臨床試験が行われてきている^{30,31}。これまでに承認された gapmer ASO としては、ホモ接合型家族性高コレステロール血症を適応とする mipomersen、遺伝性 ATTR アミロイドーシスを適応とする inotersen、家族性高カイロミクロン血症を適応とする volanesorsen、筋萎縮性側索硬化症を適応とする tofersen が挙げられる。Mipomersen は *apolipoprotein B100* mRNA を標的とする³²。アポリポタンパク質 B100 の産生を抑制し、Low-density Lipoprotein コレステロールの産生を抑制することで薬効を示す。Inotersen は *transthyretin* mRNA を標的とし、変異型および野生型トランスサイレチンの産生を抑制することで薬効を示す³³。Volanesorsen は *apolipoprotein C3* mRNA を標的とする^{34,35}。アポリポタンパク質 C-III の産

生を抑制し、血中トリグリセリド濃度を減少させることで薬効を示す。

Tofersen は *superoxide dismutase 1 (SOD1)* mRNA を標的とし、SOD1 タンパク質の産生を抑制することで薬効を示す³⁶。このように標的 RNA を分解する gapmer ASO は病因となる mRNA を標的とすることで臨床応用されている。すなわち、gapmer ASO がウイルス RNA に対しても分解と発現抑制を誘導できることが明らかとなれば、ASO 介在性のウイルス分解メカニズムが有望な治療法となる可能性が高いと考えられる。

4. ウイルス感染症に対する ASO の臨床応用

ウイルス RNA を標的とする steric block ASO においては CMV に対する fomivirsen が承認されており、IAV、EBOV、MARV、HCV ならびに WNV といった 5 種類のウイルスに対する臨床試験が行われている（表 1-2）。Fomivirsen はサイトメガロウイルスの *MIE* mRNA に結合する。*MIE* mRNA の IE2 タンパク質への結合を阻害することにより、IE2 タンパク質の発現レベルを低下させることで薬効を示す³⁷。IAV に対する AVI-7100 は matrix segment mRNA に結合し、M1 および M2 タンパク質へのスプライシングを防ぐことで薬効を示す¹⁴。EBOV および MARV に対する AVI-6002 および AVI-6003 は VP24 および VP35 タンパク質をコードする mRNA へ結合し、その翻訳を阻害することで薬効を示す¹⁵。HCV に対する AVI-4065 は HCV ゲノム RNA の翻訳を調節している 5'UTR に結合することで薬効を示す³⁸。

このように steric block ASO の抗ウイルス活性およびメカニズムは多くのウイルス種において示されている。一方、ウイルス RNA を標的とする gapmer ASO はこれまでに CMV に対する ISIS 13312、GEM132、HBV に対する bepirovirsen、IONIS-HBV-LRx、RG6004、ALG-020572、HCV に対する ISIS 14803 および HIV に対する GEM-91、GEM-92 の臨床試験が行われた実績がある。Bepirovirsen および bepirovirsen に N-アセチルガラクトサミンを付加した IONIS-HBV-LRx は HBV mRNA の保存領域を切断し、HBV タンパク質発現レベルを低下させることで薬効を示す。RG6004 は HBV RNA 転写物の保存配列を切断し、HBV タンパク質発現レベルを低下させることで薬効を示す。ALG-020572 は HBV の S open reading frame (ORF) を切断し、HBs Ag の発現を低下させることで薬効を示す。ISIS 14803 は Internal ribosome entry site (IRES) 内の HCV mRNA 翻訳開始領域を切断し、HCV RNA 発現レベルを低下させることで薬効を示す。GEM-91 および GEM-92 は HIV の *gag* mRNA の AUG 領域を切断することで薬効を示す。このように gapmer ASO による標的 RNA 分解効果は 4 種類のウイルスに対する臨床試験において評価されているが、ウイルス RNA を標的とした gapmer ASO は未だ承認されていない。加えて gapmer ASO の抗ウイルス活性およびメカニズムについての報告は少なく (表 1-3)、不明な点が多いためさらなる研究が必要である。

5. ウイルス RNA を標的とする ASO に使用される修飾核酸の開発状況

上記の標的 RNA に対する構造阻害および分解メカニズムを介した ASO の有効性を高めるため、これまでに多数の修飾核酸が開発されている⁴ (図 1-2)。修飾核酸においては核酸を構成する塩基部、リン酸部、糖部のうち、主にリン酸部と糖部が化学修飾の対象である³⁹。リン酸部の代表的な修飾として、核酸のリン酸部の非架橋酸素原子が硫黄原子に置換される Phosphorothioate (PS) 修飾が挙げられる。PS 修飾によって ASO のヌクレアーゼに対する耐性が高まり、血中半減期が改善される³⁹。また、血中タンパク質に対する結合親和性を上昇させることにより、ASO の血中滞留性を上昇させ、肝臓による代謝を緩やかにしている。これまでに CMV に対する fomivirsen が PS 修飾を用いた steric block ASO として上市されている³⁷。

糖部修飾核酸のうち 2'位に修飾を施した代表的なものとして 2'-O-methyl (2'-OMe)、2'-O-methoxyethyl (2'-MOE) および 2'-deoxy-2'-fluoro-D-arabinonucleic acid (FANA) が挙げられる。2'-OMe は DNA の糖部における 2'位の水酸基を 2'-O-メチル基に置換した構造をしており、負電荷に帯電しているため、可溶性および陽イオン性脂質やタンパク質に対する結合性が上昇している⁴⁰。DNA と比べて RNA への結合親和性とヌクレアーゼ耐性が改善されており免疫刺激が低減されていることから、これまでに主に siRNA として上市されている (表 1-1)⁴¹。2'-OMe 自体は RNase H により認識されないため、2'-OMe による配列の中央に DNA 鎖を挿入することで gapmer

ASOとして使用できる⁴²。2'-OMeはCMV¹²¹³およびHIV²⁵に対するgapmer ASOとして臨床試験が行われた。2'-MOEは2'-OMeを起点として開発された修飾核酸であり、糖部における2'位の水酸基を2'-O-メトキシエチル基に置換した構造をしている^{39, 41, 43}。2'-MOEは2'-OMeと同様に負電荷に帯電しており、RNase Hにより認識されない。特に2'-OMeと比べて、ヌクレアーゼ耐性と標的RNAへの結合親和性が上昇している。また標的RNAへの結合親和性が高められたことから、非特異的なタンパク質への結合が減少し、毒性が低減されている。2'-MOEはsteric block ASOおよびgapmer ASOの両機序のASO医薬品として広く実用化されている(表1-1)。2'-MOEを用いた抗ウイルスASOは、CMVおよびHBVに対するgapmer ASOとして臨床試験が行われた実績がある。FANAはフラノース環の2'β位をフッ素原子に置換しており、生体内での安定性および標的RNAへの結合力が上昇している⁴⁴。加えてDNA様の性質を有していることからRNase Hによる標的RNAの切断を誘導できる⁴⁵。さらにFANAはヒトCD34⁺細胞において効果的に標的mRNAをノックダウンできることが報告されている⁴⁶。これらの特性からFANAはHIV-1に対するgapmer ASOとして非臨床試験が行われた⁴⁷。糖部におけるフラノース環の2'位および4'位を架橋した修飾核酸は架橋型人工核酸(Bridged Nucleic Acid: BNA)と称され、ウイルスに対して使用されているBNAとして2',4'-constrained ethyl bicyclic nucleic acid (cEt)が挙げられる。cEtは2'-MOEのメチレン基をC4'位に結合した後、

末端の o-メチルを除去した構造をしている⁴⁸。2'-MOE と比べてさらに毒性が低減されており RNase H を介する標的 RNA の分解を誘導する。そのため主に gapmer ASO として肺がんおよび乳がんといった疾患に対して臨床試験が行われている⁴⁹。ウイルスに対しては最近新型コロナウイルスに対する cEt を用いた gapmer ASO の非臨床試験が行われた⁵⁰。リン酸部および糖部全体を置換した修飾核酸の代表的なものとして phosphorodiamidate morpholino oligomer (PMO) および peptide nucleic acid (PNA) が挙げられる。PMO は DNA の糖部のリボース五員環を六員環のモルフォリノ環に、リン酸部のアニオン性酸素原子を非イオン性ジメチルアミノ基に置換した構造であり、電荷を持たず親水性である⁵¹。RNase H による標的 RNA の切断を誘導しないため、主に steric block ASO として使用されている⁵²。PMO は臨床応用において最も実績がある修飾核酸であり、多種のウイルスに対して増殖抑制効果が報告されているが⁵²、実用化には至っていない。そのような中でペプチドを付加した PMO やグアニジンを付加した vivo-PMO、Sarepta Therapeutics 社が独自に開発したピペラジンを付加した PMO plus といった改良型 PMO による効果的な抗ウイルス作用が報告されており、一部は臨床試験まで進められている (表 1-2)⁵²。PNA は DNA のデオキシリボースリン酸骨格を N- (2-アミノエチル) グリシンを単位とする骨格に置き換えた構造をしており⁵³、ヌクレアーゼに対する耐性が高められている。また電氣的に中性であることから標的 RNA に高い結合親和性を有する。標

的 mRNA の転写および翻訳を阻害する steric block ASO としてがんや遺伝性疾患に対する非臨床試験が行われている⁵⁴。ウイルスに対しては HBV および HIV-1、日本脳炎ウイルス（Japanese encephalitis virus：JEV）に対する増殖抑制効果が報告されている。このように、これまで開発されてきた多数の修飾核酸を用いた ASO は、様々なウイルス性疾患に対して臨床応用が進められている。しかし、これらの修飾核酸では標的臓器への送達方法および標的配列への結合親和性、細胞への取り込み効率、毒性が課題となっているため、有効性と安全性がより改善された修飾核酸の開発が求められている³⁹。

6. LNA を用いた ASO の医薬品としての可能性

新たに医薬品としての応用が期待されている修飾核酸として、近年 LNA を用いた核酸医薬研究が精力的に実施されている⁵⁵。LNA は本邦で開発された修飾核酸であり、核酸糖部のフラノース環 2'位の酸素原子と 4'位の炭素原子がメチレンで固定されているため BNA に分類される⁵⁶。すなわち糖部の立体構造が N 型の立体配座（パッカリング）に固定されることで、標的 RNA への結合親和性およびヌクレアーゼ耐性が従来の修飾核酸に比べて飛躍的に向上されている⁵⁷。LNA は電荷を持つことから細胞取り込み効率が高く⁵⁰、他の修飾核酸に比べて半減期が短いことが報告されている^{58, 59}。LNA 自体は RNase H により認識されないため、steric block ASO および

gapmer ASO の両機序を併せ持つ ASO として研究が進められている⁶⁰。LNA を搭載した steric block ASO は C 型肝炎⁶¹ および血液悪性腫瘍⁶² に対して臨床試験が行われた実績がある。また、LNA を用いた gapmer ASO は HBV 感染症^{18, 19, 63}、緑内障⁶⁴ および前立腺がん⁶⁵ に対して臨床試験が行われた実績がある。すなわち LNA を搭載した steric block ASO および gapmer ASO の両方でウイルス感染症を含む様々な疾患に対する治療薬としての可能性が報告されている。

7. 抗ウイルス薬としての RNA 分解型 ASO の可能性

全てのウイルスの複製および増殖は mRNA を介して行われていることから、理論上 ASO は全てのウイルス RNA を治療標的とすることができる。特にプラス一本鎖 RNA ウイルスはゲノム自体が mRNA として働くため⁶⁶、ウイルスゲノム RNA に直接作用することができる ASO は、有望なウイルス治療戦略になる可能性が極めて高いと考えられる。実際にプラス一本鎖 RNA ウイルスであり、公衆衛生学上の世界的な脅威となっているフラビウイルス科の様々なウイルス種⁵² や新型コロナウイルス (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2: SARS-CoV-2)⁶⁷⁻⁷² に対する非臨床試験において、ASO の抗ウイルス作用が多数報告されている (表 1-3)。特に、gapmer ASO は直接的にウイルス RNA を分解することで感染細胞から除去できると考えられ、また変異したウイルス RNA の配列に対して相補的にな

るように化学的に再合成できるという利点を有している。さらに、ASO の標的配列をウイルス株間または種間で保存性が高い領域に設計できた場合には、異なる株または種のウイルス感染症に幅広く有効性を示す ASO 医薬となることが期待される。以上のことから、gapmer ASO はウイルス RNA の変異に対応した配列特異的な有効性を示すだけでなく、1 種類の ASO で複数のウイルス疾患に適用できる汎用性の高い治療戦略となる可能性を有している。

8. LNA gapmer 療法のウイルス治療薬としての可能性

現在 LNA を用いた gapmer ASO (LNA gapmer) は、ウイルス RNA への配列特異的な結合と RNase H 誘導を介したウイルス RNA 切断を誘導する新規ウイルス治療法になることが期待されている^{9,73} (図 1-3)。前述のように LNA gapmer は標的 RNA への結合親和性およびヌクレアーゼに対する耐性が飛躍的に高められており⁷⁴、その治療学的な有効性は様々な遺伝性疾患に対する研究により実証されている⁷⁵⁻⁷⁷。最近の研究では in vitro および in vivo において SARS-CoV-2 に対する LNA gapmer の有効性が示されている^{69-72, 78}。また、獣医学領域において問題となっている豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: PRRSV) に対する LNA gapmer の抗ウイルス効果も報告されている⁷⁹。これらの事実は様々なウイルス性疾患に対する効果的な LNA gapmer 療法の臨床応用

への可能性を支持している。しかし、世界的に公衆衛生学上の脅威となっているフラビウイルス科ウイルスに対するウイルス RNA 標的 LNA gapmer の有効性および作用メカニズムについては不明な点が多い。本研究では蚊媒介性フラビウイルス科ウイルスのモデルとして JEV に対する RNase H 依存的な LNA gapmer の抗ウイルス効果を解析した。

9. 日本脳炎ウイルスの疫学

JEV は、ヒトに重篤な症状を示すデングウイルス(Dengue virus: DENV)、黄熱ウイルス (Yellow fever virus: YFV)、WNV およびジカウイルス (Zika virus: ZIKV) と同じフラビウイルス科オルソフラビウイルス属に分類される蚊媒介性アルボウイルスである^{80, 81}。JEV はアジアおよびオーストラリア北部、南東部において最も臨床的に重要かつ一般的なウイルス性脳炎の原因であり、アジア居住者および流行地への渡航者にとって深刻な公衆衛生学の問題となっている^{80, 82}。JEV は遺伝子 (G) I 型から V 型の 5 種類の遺伝子型に分類される⁸³。これらの遺伝子型のうち G I 型および G III 型はアジア全域で流行している遺伝子型である。G I 型は東アジアおよび東南アジア全域からオーストラリア北部にかけて分布している (図 1-4)。G III 型は東アジアおよび東南アジア全域に分布している。G II 型はタイ南部からオーストラリア北部にかけて分布しており、G IV 型はインドネシアに分布している。G V 型は希少な遺伝子型でありマレーシア⁸⁴、チベット^{85, 86} および韓国^{87, 88} に

において分離された報告がある。このように JEV は G I 型および G III 型を中心として異なる遺伝子型の株が広く分布している。近年、地球温暖化やヒトの移動から生じた蚊の生息域の拡大により 30 億人を超える人口が JEV 感染リスク下にさらされている。ワクチンによる予防は行われているが、全世界で年間 69,000 件の症例が推定されている⁸⁰。本邦においては、過去 15 年間において 80% 以上の高いワクチン接種率が報告されているが、増幅動物であるブタの JEV 抗体獲得状況から、ヒトの感染リスクは依然として高いと推定されている⁸⁹。また、現在上市されている JEV に対するワクチンは全て G III 型を基に製造されており⁹⁰、他の遺伝子型 JEV 株、特に近年韓国において蚊からの分離の報告が増加している GV 型に対する有効性が低い可能性が報告されている^{87, 91}。近年の本邦においては 2018 年を除いて、毎年 10 人前後の患者が発生しており^{92, 93}、2023 年 1 月から 10 月においても 4 件の JEV の症例が報告されている⁹⁴。JEV の発症率は 0.1~1% と報告されているが発症した場合、意識障害、頭痛、嘔吐および痙攣などの急性脳炎症状を呈し、特に小児および高齢者では重症化しやすい。急性脳炎症状の進行により約 18% の患者が死に至り、約 44% の患者に生活の質に影響を与える永続的な神経学的後遺症が残ると報告されている⁸⁰。これまでにミノサイクリンの投与や、免疫グロブリン療法による治療法の開発が試みられてきたが、現在利用できる日本脳炎への特異的治療法はない⁹⁵。このように JEV は有効なワクチンは開発されているがヒトに対する高い感染リスクが報告されてお

り、発症した場合重篤な症状を呈するため JEV 治療薬の開発は急務である。

10. 抗 JEV ASO の開発状況

上述のようにフラビウイルス科ウイルスは一本鎖プラス鎖 RNA ゲノムを持つことから、ゲノム RNA 自体が mRNA として機能している⁶⁶。すなわち ASO はフラビウイルス mRNA のみならずゲノム RNA と結合し分解を誘導できるため、フラビウイルス科ウイルスは ASO のウイルス増殖抑制効果を調べるための適切なウイルスモデルの一つであると考えられる。実際にフラビウイルス科ウイルスに有効性を示す ASO の非臨床試験は多数報告されている（表 1-4）。フラビウイルス科ウイルスの中でも、特に JEV は様々な病原株の膨大なゲノム情報が利用可能であること、および Bio safety level-2 で取り扱いが可能であることから ASO のウイルス増殖抑制効果を調べるための適切なウイルスモデルの一つであると考えられる。

JEV は約 11,000 塩基長の一本鎖プラス鎖 RNA ゲノムを持つ。JEV ゲノムは core protein (C)、pre-membrane protein (pre-M)、envelope protein (E) の 3 種類の構造タンパク質および nonstructural protein 1 (NS1)、nonstructural protein 2A (NS2A)、nonstructural protein 2B (NS2B)、nonstructural protein 3 (NS3)、nonstructural protein 4A (NS4A)、nonstructural protein 4B (NS4B) および nonstructural protein 5 (NS5) の 7 種類の非構造タンパク質をコードする単一のオープンリーディングフレ

ームならびに 5'側および 3'側の非翻訳領域 (Untranslated region : UTR) で構成されている⁸⁰。JEV の UTR は遺伝子型の特異性と関連しフラビウイルス科ウイルスの一般的な構造および cis 作用要素を有していることが報告されている⁹⁶。JEV の 5'および 3'UTR の conserved sequence (CS) I モチーフは JEV の複製に必須である。これまでに、CS I モチーフを標的としたペプチド抱合型 PMO⁹⁷、vivo-PMO⁹⁸ および PNA⁹⁹ (図 1-2) といった修飾核酸を用いた steric block ASO が JEV の増殖抑制に有効であることが示されている。また PNA を搭載した steric block ASO を用いた研究では、5'および 3'UTR のステムループ構造が抗ウイルス活性を誘導するための標的候補として報告されている⁹⁹ (表 1-4)。このように JEV にはウイルス RNA を標的とする ASO の有効性を追究するのに適したツールとしての実績がある。しかし、JEV の感染を制御する抗ウイルス LNA gapmer の有効性は未だ検討されていない。

本研究では JEV RNA を標的とする LNA gapmer の有効性および作用メカニズムを *in vitro* において明らかにすることを目的として以下の検討を行った。まず第 2 章では、JEV ゲノム 3'UTR を標的とする LNA gapmer を複数設計し、Vero 細胞を用いて LNA gapmer の JEV 増殖抑制効果の実証と最も効果が高い LNA gapmer の選定を行った。次の第 3 章では、第 2 章において最も効果が高かった LNA gapmer および配列が一部異なる mismatches 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、

LNA gapmer が JEV RNA を直接的に分解すること、ならびに配列および修飾核酸特異的な JEV RNA 分解メカニズムの検証を試みた。最後に、第 4 章では本研究で開発した LNA gapmer のヒトにおける有効性および安全性を調べるため、JEV 感染モデルの一つであるヒト神経芽細胞腫由来細胞株および JEV 野外株を用いた JEV 感染実験および *in silico* 解析を実施した。

表 1-1 これまでに上市された核酸医薬（2023年11月13日時点）⁶

Drug (Product name)	Mechanism	Chemistry	Delivery method	Approval agency, year	Target	Disease	Target organ	Route
Fomivirsen (Vitravene)	Steric block ASO	PS	Naked	FDA, 1998 EMA, 1999	major IE2 mRNA	Cytomegalovirus retinitis	Eye	IVT
Pegaptanib (Macugen)	Aptamer	2'-F 2'-OMe	Naked (PEG conjugate)	FDA, 2004 EMA, 2006 PMDA, 2008	VEGF-165	Neovascular age-related macular degeneration	Eye	IVT
Mipomersen (Kynamro)	Gapmer ASO	PS 2'-OMe	Naked	FDA, 2013	ApoB-100 mRNA	Homozygous familial hypercholesterolaemia	Liver	SC
Eteplirsen (Exondys51)	Steric block ASO	PMO	Naked	FDA, 2016	DMD pre-mRNA	Duchenne muscular dystrophy	Muscle	IV
Nusinersen (Spinraza)	Steric block ASO	PS 2'-MOE	Naked	FDA, 2016 EMA, 2017	SMN 2 pre-mRNA	Spinal muscular atrophy	CNS	IT
CpG1018 (HEPLISAV-B)	CpG oligonucleotide	PS	Naked	FDA, 2017 EMA, 2019	TLR-9	Hepatitis B infection	Dendritic cell	IM
Inotersen (Tegsedi)	Gapmer ASO	PS 2'-MOE	Naked	FDA, 2018 EMA, 2018	TTR mRNA	Hereditary transthyretin amyloidosis, polyneuropathy	Liver	SC
Patisiran (Onpattro)	siRNA	2'-OMe	Lipid nanoparticle	FDA, 2018 EMA, 2018 PMDA, 2019	TTR mRNA	Hereditary transthyretin amyloidosis, polyneuropathy	Liver	IV
Volanesorsen (Waylivra)	Gapmer ASO	PS 2'-MOE	Naked	EMA, 2019	ApoCIII mRNA	Familial chylomicronaemia syndrome	Liver	SC
Givosiran (Givlaari)	siRNA	PS,2'-F 2'-OMe	GalNAc c - conjugate	FDA, 2019 EMA, 2020 PMDA, 2021	ALAS1 mRNA	Acute hepatic porphyria	Liver	SC
Golodirsen (Vyondys 53)	Steric block ASO	PMO	Naked	FDA, 2019	DMD pre-mRNA	Duchenne muscular dystrophy	Muscle	IV
Viltolarsen (Viltepso)	Steric block ASO	PMO	Naked	PMDA, 2020 FDA, 2020	DMD pre-mRNA	Duchenne muscular dystrophy	Muscle	IV
Lumasiran (Oxlumo)	siRNA	PS,2'-F 2'-OMe	GalNAc c - conjugate	FDA, 2020 EMA, 2020	HAO 1 mRNA	Primary hyperoxaluria type 1	Liver	SC
Inclisiran (Leqvio)	siRNA	PS,2'-F 2'-OMe	GalNAc c - conjugate	EMA, 2020	PCSK9 mRNA	Primary hypercholesterolemia	Liver	SC
Casimersen (Amondys 45)	Steric block ASO	PMO	Naked	FDA, 2021	DMD pre-mRNA	Duchenne muscular dystrophy	Muscle	IV
Vutrisiran (Amvuttra)	siRNA	PS,2'-F 2'-OMe	GalNAc c - conjugate	FDA, 2022 EMA, 2022 PMDA, 2022	TTR mRNA	Hereditary transthyretin amyloidosis, polyneuropathy	Liver	SC
Tofersen (Qalsody)	Gapmer ASO	PS (partial) 2'-MOE	Naked	FDA, 2023	SOD1 mRNA	Amyotrophic lateral sclerosis	CNS	IT
Avacincaptad pegol (Izervay)	Aptamer	2'-OMe 2'-F	PEG- conjugated	FDA, 2023	Complement factor C5	geographic atrophy secondary to age-related macular degeneration	Eye	IVT
Nedosiran (Rivfloza)	siRNA	PS (partial) 2'-OMe, 2'-F	GalNAc- conjugate	FDA, 2023	LDHA mRNA	Primary hyperoxaluria type 1	Liver	SC

FDA, Food and Drug Administration; EMA, European Medicines Agency; PMDA, Pharmaceuticals and Medical Devices Agency; IVT, Intravitreal administration; SC, Subcutaneous administration; IV, Intravenous administration; IT, Intrathecal administration; IM, Intramuscular administration

表 1-2 上市または臨床試験が実施されたウイルス RNA を標的とする ASO (2023 年 11 月 30 日時点)

Drug (Other name)	Sponsor	Mechanism	Chemistry	Virus	Viral genome	Target	Route	Status	Reference
Fomivirsen (ISIS 2922)	Ionis Pharmaceuticals	Steric block	PS	CMV	dsDNA	major IE2 mRNA	IVT	Approved Phase II, NCT00002356 (Completed, 2005) Phase II, NCT00002156 (Completed, 2005) NA, NCT00002187 (Completed, 2005) NA, NCT00002355 (Completed, 2005)	(Bege and Borbás, 2022) ³⁷
GEM 132	Hybridon	Gapmer	PS 2'-OMe	CMV	dsDNA	IE mRNA	IVT IV	Phase II Phase I	(Bennett et al., 1998) ¹² (Scholz et al., 2001) ¹³ (Henry et al., 2001) ¹⁰
ISIS 13312	Ionis Pharmaceuticals	Gapmer	PS 2'-MOE	CMV	dsDNA	major IE2 mRNA	IVT	Phase II Phase I	(Kwoh, 2007) ¹¹
Radavirsen (AVI-7100)	Sarepta Therapeutics	Steric block	PMO plus	IAV	(-)ssRNA	M segment mRNA	IV	Phase I, NCT01747148 (Completed, 2016) Phase I, NCT01375985 (Terminated, 2011)	(Beigel et al., 2018) ¹⁴
AVI-6002 (AVI-7357+AVI-7539)	Sarepta Therapeutics	Steric block	PMO plus	EBOV MARV	(-)ssRNA	VP24 and VP35 mRNA	IV	Phase I, NCT01353027 (Completed, 2011)	(Heald et al., 2014) ¹⁵
AVI-6003 (AVI-7287+AVI-7288)	Sarepta Therapeutics	Steric block	PMO plus	EBOV MARV	(-)ssRNA	VP24 and VP35 mRNA	IV	Phase I, NCT01353040 (Completed, 2011)	(Heald et al., 2014) ¹⁵
Bepirovirsen (IONIS-HBVRx)	Ionis Pharmaceuticals	Gapmer	2'-MOE	HBV	dsDNA	Common sequence in all HBV mRNAs	SC	Phase I, NCT06058390 (Not yet recruiting) Phase II, NCT05276297 (Active) Phase II, NCT05330455 (Recruiting) Phase III, NCT05630807 (Recruiting) Phase III, NCT05630820 (Recruiting)	(Yuen et al., 2021) ¹⁶
ALG-020572	Aligos Therapeutics	Gapmer	GalNac-conjugated LNA	HBV	dsDNA	S ORF	SC	Phase I, NCT05001022 (Terminated, 2022)	(Vaillant, 2022) ¹⁹ (Hui et al., 2022) ¹⁰⁰
IONIS-HBV-LRx (GSK3389404)	Ionis Pharmaceuticals	Gapmer	GalNac-conjugated 2'-MOE	HBV	dsDNA	Common sequence in all HBV mRNAs	SC	Phase I, NCT02647281 (Completed, 2017) Phase II, NCT03020745 (Completed, 2019)	(Han et al., 2023) ¹⁷
RG6004 (RO7062931)	Hoffmann-La Roche	Gapmer	GalNac-conjugated LNA	HBV	dsDNA	Common sequence in all HBV RNA transcripts	SC	Phase I, NCT03038113 (Completed, 2019) Phase I, NCT03505190 (Completed, 2019)	(Cheung et al., 2023) ¹⁸
ISIS 14803	Ionis Pharmaceuticals	Gapmer	PS	HCV	(+)ssRNA	IRES	IV	Phase I/II, NCT00062816 (Completed, 2004) Phase II, NCT00035945 (Completed, 2004)	(McHutchison et al., 2006) ²⁰
AVI-4065	Sarepta Therapeutics	Steric block	PMO	HCV	(+)ssRNA	5'UTR	SC	Phase I/II, NCT00229749 (Terminated, 2007) Phase I, NCT00381433 (Completed, 2006)	(Pawlotsky et al., 2007) ³⁸ , (Cholongitas and Papatheodoridis, 2008) ¹⁰¹
AVI-4020	Sarepta Therapeutics	Steric block	PMO	WNV	(+)ssRNA	5'UTR and C region	IV	Phase I, NCT00091845 (Terminated, 2004) Phase I, NCT00387283 (Completed, 2009)	(Ronca et al., 2021) ²³ (SAREPTA THERAPEUTICS, 2006) ¹⁰² (Vikram et al., 2004) ¹⁰³
GEM-91	Hybridon	Gapmer	PS	HIV-1	(+)ssRNA	Gag mRNA	IV	Phase II Phase I	(Ivanova et al., 2006) ²⁵
GEM-92	Hybridon	Gapmer	2'-O-Me, PS	HIV-1	(+)ssRNA	Gag mRNA	PO IV	Phase I	(Ivanova et al., 2006) ²⁵

NA, Not applicable

表 1-3 ウイルス RNA を標的とした RNA 分解型 ASO(gapmer ASO)の非臨
症試験

Family	Virus	Viral genome	Chemistry	Target region	Cells or animals	Reference
Hepadnaviridae	HBV	dsDNA	GalNac-conjugated LNA	HBsAg and HBx regions	HepG2.2.15 cells, dHepaRG cells, dHepaRG ASGPR1/2 cells, C57BL/6 mice	(Javanbakht et al., 2018) ¹⁰⁴
			2'-MOE	Common sequence in all HBV mRNAs	Huh-7.5-NTCP cells	(Yu et al., 2023) ¹⁰⁵
			2'-O-Me NPS, 2'-MOE NPS, 2'-O-Et NPS, 2'-O-alkyl NPS, 2'-O-Me-OPS, 2'-MOE OPS	DR2 region, HBs mRNA	HepG2.2.15 HBV cells,	(Martinez-Montero et al., 2023) ¹⁰⁶
			GalNac-conjugated 2' MOE PS, GalNac-conjugated 2' MOE NPS	DR2 region	Adeno-associated virus/HBV mouse model	
Orthomyxoviridae	IAV	(-) ssRNA	LNA	PB2 segment genome RNA	MDCK cells, BALB / c mice	(Hagey et al., 2022) ⁷⁰
Flaviviridae	HCV	(+) ssRNA	LNA	IRES	replicon-expressing Huh-7 clone 9b cells, CD-1 mice	(Laxton et al., 2011) ¹⁰⁷
			Amino-modified LNA	Coding region	Huh-luc cells, neo-ET cells	(Mutso et al., 2015) ¹⁰⁸
Coronaviridae	SARS-CoV-2	(+) ssRNA	LNA	3'UTR	Vero E6 cells	(Lulla et al., 2021) ⁷¹
			LNA	5'UTR, ORF1a, ORF1b, N segment genome RNA	hACE2-expressing HEK-293T cells,	(Dhorne-Pollet et al., 2022) ⁷²
			LNA	ORF1b	VeroE6/TMPRSS2 cells	
			LNA	5' leader sequence, S region	Huh-7 cells	(Zhu et al., 2022) ⁶⁹
			LNA	258-276 nt, 28,743-28,792 nt	Huh-7 cells, ACE2-TMPRSS2-Huh-7.5 cells, A549-hACE2 cells, syrian hamster	(Hagey et al., 2022) ⁷⁰
			cEt	all region	H1437 cells, iAEC2 cells	(Qiao et al., 2023) ⁵⁰
			LNA	all SARS-CoV-2 genome RNA without S segment	Vero E6 cells	(Dauksaite et al., 2023) ¹⁰⁹
			LNA	Helicase gene, 3CLpro gene, PLpro gene, RdRp gene	Vero E6 cells	(Jayasinghe et al., 2023) ¹¹⁰
			LNA	Helicase gene	NSG-SGM3 mice	
			LNA	slippery site on ribosomal frameshift	HEK 293T-ACE2 cells, GBM6138 cells	(Knizhnik et al., 2023) ¹¹¹
Retroviridae	HIV-1	(+) ssRNA	LNA	PBS, DIS, SD, The gag initiation codon	HEK 293T cells	(Jakobsen et al., 2007) ¹¹²
			FANA	tat/rev region, U5 region, DIS (within 5'UTR)	primary human peripheral blood mononuclear cells	(Takahashi et al., 2019) ⁴⁷
Togaviridae	PRRS	(+) ssRNA	LNA	Nsp9 gene	Marc-145 cells Pulmonary alveolar macrophages	(Zhu et al., 2018) ⁷⁹

表 1-4 フラビウイルス科ウイルスに対するウイルス RNA 標的 ASO の非臨床試験

Virus	Mechanism	Chemistry	Target viral RNA region	Cells or animals	Reference
DENV	Steric block	Arg-rich peptide-conjugated PMO	AUG region, 5'CS, 3'CS, Stem loop in 5'UTR, Stem loop in 3'UTR	Vero cells	(Kinney et al., 2005) ¹¹³
DENV	Steric block	Peptide-conjugated PMO	5'UTR, 3'UTR, 3'CS, AUG region	BHK cells	(Holden et al., 2006) ¹¹⁴
DENV	Steric block	PMO, Peptide-conjugated PMO	Stem loop in 5'UTR, 3'CS	AG129 mice	(Stein et al., 2008) ¹¹⁵
DENV	Steric block	Vivo-PMO	Stem loop in 3'UTR	Monocyte-derived dendritic cells	(Phumesin et al., 2019) ¹¹⁶
HCV	Gapmer	PS	C region, AUG region	HepG2 cells	(Alt et al., 1997) ¹¹⁷
HCV	Steric block, or gapmer	PS	5'UTR	HepG2 cells	(Alt et al., 1999) ¹¹⁸
	Steric block, or gapmer	methyl-oligodeoxynucleotides			
	Steric block, or gapmer	Benzylphosphonates oligodeoxynucleotides			
HCV	Steric block	PMO	IRES	BALB/c mice	(McCaffrey et al., 2003) ¹¹⁹
HCV	Steric block	Amino-modified PNA, LNA	IRES	CV-1 cells	(Nulf and Corey, 2004) ¹²⁰
HCV	Steric block	PNA	IRES	Huh-7.5 cells	(Alotte et al., 2008) ¹²¹
	Steric block, or gapmer	Amino-modified PNA			
	Steric block, or gapmer	PS			
HCV	Steric block, or gapmer	LNA	IRES	Huh-7 cell clone 9B replicon, CD-1 mice	(Laxton et al., 2011) ¹⁰⁷
HCV	Steric block	LNA	SL9266/PK sequences	Huh 7.5 cells	(Tuplin et al., 2015) ¹²²
HCV	Steric block or gapmer	Amino-modified LNA	Coding region	Huh-luc/neo-ET cells	(Mutso et al., 2015) ¹⁰⁸
WNV	Steric block	Arg-rich peptide conjugated PMO	5'UTR, 3'UTR, 5'CS, 3'CS I, AUG region	BHK cells	(Deas et al., 2005) ¹²³
			5'UTR, 3'CS I, AUG region	Vero cells	
WNV	Steric block or gapmer	PS and/or 2'-O-Me	RCS2, 3'CS I or 3'CS II	Vero cells	(Torrence et al., 2006) ¹²⁴
WNV DENV JEV SLEV YFV	Steric block	Arg-rich peptide-conjugated PMO	5'UTR, 3'CS I	Vero cells, C3H/HeN(C3H) mice	(Deas et al., 2007) ¹²⁵
WNV	Steric block	Peptide-conjugated PMO	5'UAR, 3'UAR	Vero cells	(Zhang et al., 2008a) ¹²⁶
WNV	Steric block	Peptide-conjugated PMO	3'UAR	BHK-21 cells	(Zhang et al., 2008b) ¹²⁷
JEV	Steric block	Peptide-conjugated PNA	5'UTR, Stem loop in 3'UTR, 5'CS I, 3'CS I	BHK-21 cells	(Yoo et al., 2009) ⁹⁹
JEV	Steric block	Octaguanidinium dendrimer-conjugated PMO	5'UTR, 3'CS I	BALB/c mice	(Nazmi et al., 2010) ⁹⁸
JEV	Steric block	Peptide-conjugated PMO	5'UTR, 3'CS I, AUG region 3'CS I	J774E cells, Neuro2A cells, Vero cells BALB/c mice	(Anantpadma et al., 2010) ⁹⁷

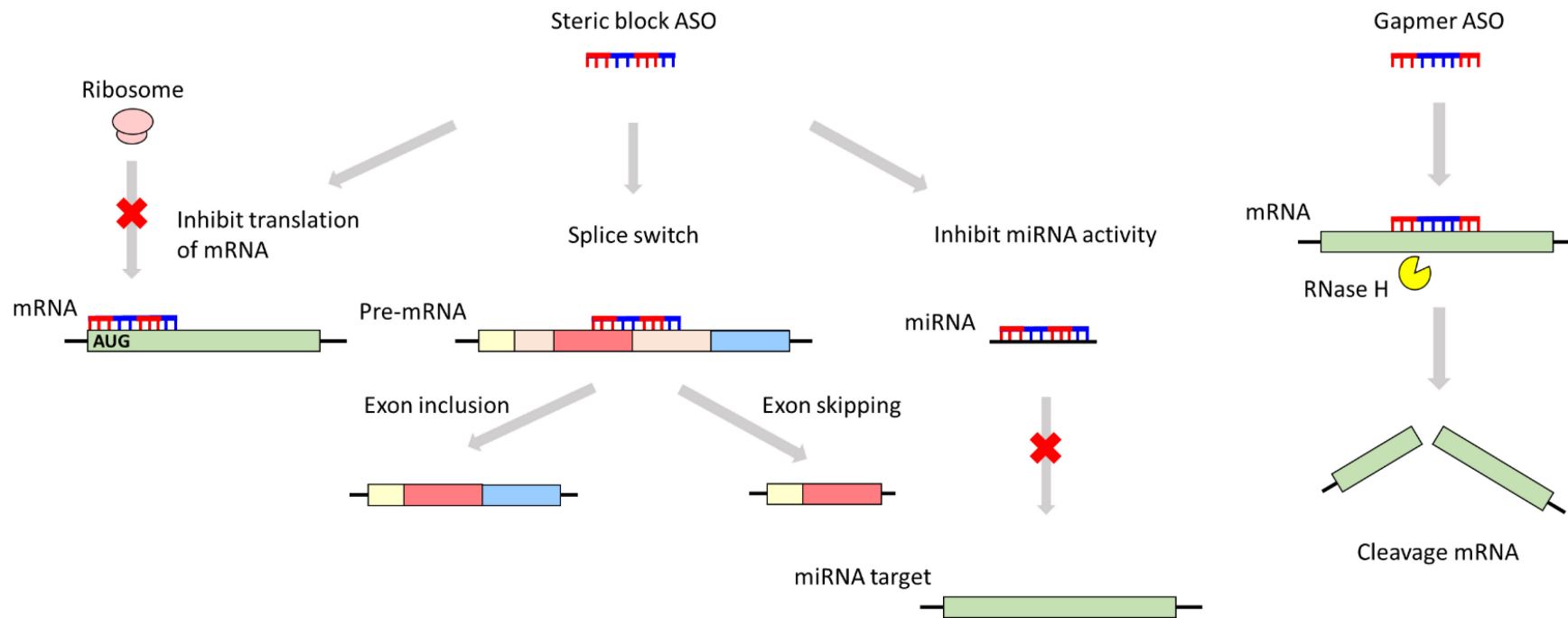


図 1-1 構造阻害型 (steric block) ASO および RNA 分解型 (gapmer) ASO の作用メカニズム ²⁷

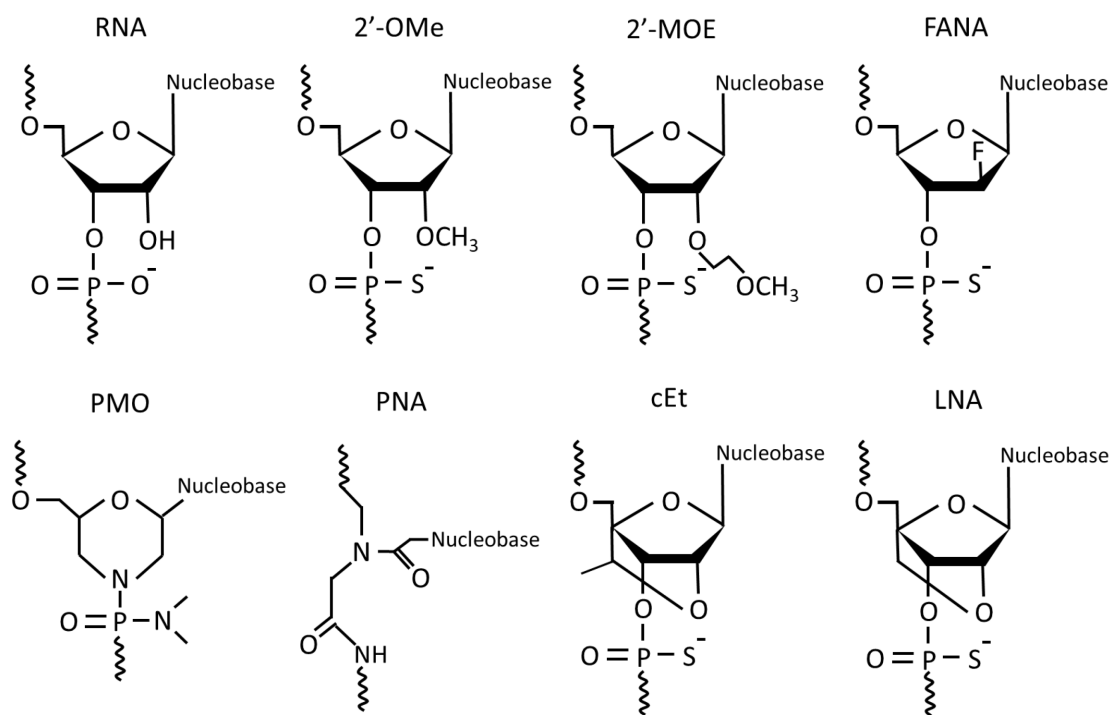


図 1-2 天然核酸の RNA およびウイルス RNA 標的 ASO として使用された代表的な修飾核酸の化学構造

2'-OMe、2'-MOE、FANA、cEt および LNA は PS 修飾が施されている。

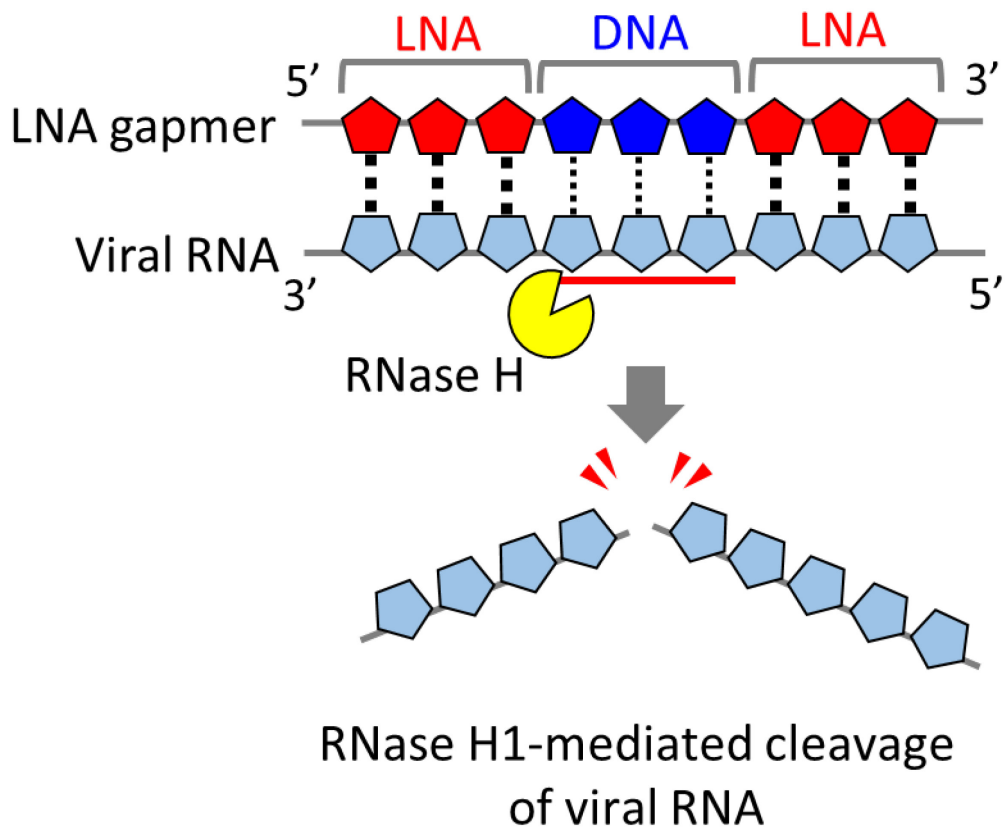


図 1-3 LNA gapmer のウイルス RNA 分解メカニズム。

LNA gapmer は配列相補的にウイルス RNA に結合し、LNA gapmer の DNA 領域と結合しヘテロ二本鎖となったウイルス RNA を RNase H を誘導することで切断する。

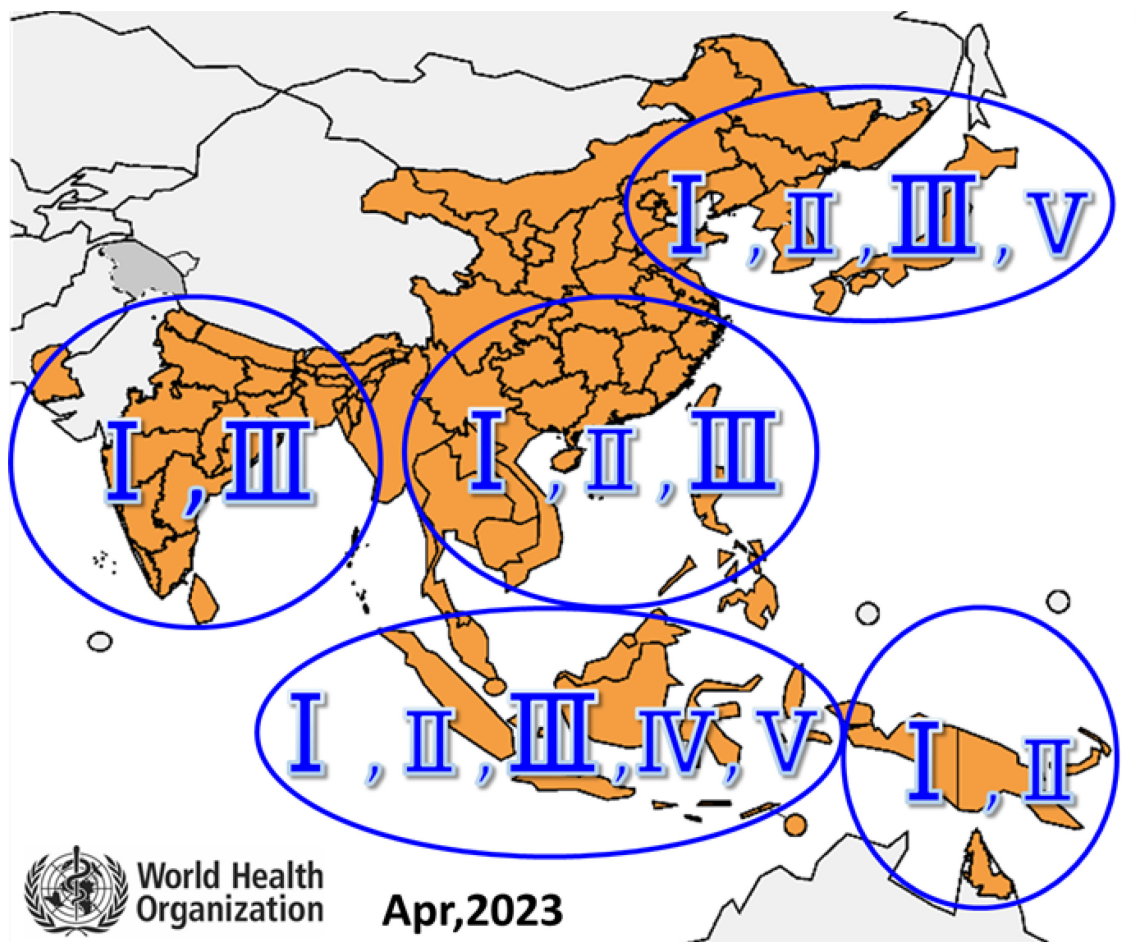


図 1-4 JEV 遺伝子型の分布状況⁸³

世界保健機関（World Health Organization : WHO）のホームページ¹²⁸を一部改変。

第 2 章

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

2.1 はじめに

これまでに SARS-CoV-2^{69-72, 129, 130} や IAV⁷⁰ といった病原性の高いウイルスに対する LNA gapmer の増殖抑制効果が報告されている。しかし、JEV はじめ、全世界で公衆衛生学的な問題となっているフラビウイルス科オルソフラビウイルス属ウイルスに対する LNA gapmer の有効性は明らかとなっていない。

JEV はフラビウイルス科オルソフラビウイルス属に分類され、約 11,000 塩基長の一本鎖プラス鎖 RNA ゲノムを持つ。JEV ゲノムは C、pre-M、E の 3 種類の構造タンパク質および NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B および NS5 の 7 種類の非構造タンパク質をコードする単一のオープンリーディングフレームならびに 5'側および 3'側の UTR で構成されている。このうち 3'UTR には JEV ゲノムの環状化を引き起こす 3'UTR conserved sequence (CS) I モチーフや、宿主細胞の解糖系酵素であるグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) と相互作用することでゲノムの複製を促進する 3'UTR stem-loop 領域など JEV ゲノム RNA の複製に関わる重要な領域が複数保存されている^{131, 132}。実際に、JEV 3'UTR の CS I または stem-loop 領域を標的とした steric block ASO による JEV 増殖抑制効果が報告されており、JEV 3'UTR は抗 JEV ASO の効果的な標的領域であることが示唆されている。

そこで本章では、蚊媒介性オルソフラビウイルス属ウイルスのモデルとして多数の分離株のゲノム配列がオンラインデータベースに登録されており、ASOの研究開発に用いられた実績のある JEV に着目し、3'UTR を標的とする LNA gapmer の JEV に対する増殖抑制効果を解析した。はじめに JEV の部分的な 3'UTR の RNA 二次構造を、RNAfold プログラムを用いて予測し、JEV ゲノムの複製に重要な 3'UTR CSI モチーフおよび 3'UTR stem-loop 領域に対して複数の LNA gapmer を設計した。設計した LNA gapmer の JEV 増殖抑制効果は Vero 細胞を用いたスクリーニング試験により解析した。さらにスクリーニング試験において選定した最も効果の高かった LNA gapmer の濃度依存的な JEV 増殖抑制効果を解析した。

2.2 材料および方法

2.2.1 JEV RNA 二次構造の予測

JEV JaGAr01 株 (GIII 型、accession no. AF069076.1) の完全長ゲノム配列は NCBI GenBank から得られた。RNA fold program¹³³ を用いて、全長 JEV ゲノム配列 10,700 塩基以降の領域である 3'UTR の一部のゲノム二次構造を 37°C の温度条件で予測した (アクセス日: 2022 年 11 月 29 日)。

2.2.2 LNA gapmer の設計および合成

2.2.1 で予測した JEV JaGAr 01 株 RNA 二次構造を基に LNA gapmer を 9 種類設計した (図 2-1、表 2-1)。LNA gapmer 1 は 3'UTR 内の同配列二か所を標的としており QIAGEN (Venlo, The Netherlands) に設計を委託した (ID: LG00204874)。LNA gapmer 2 から 9 は、他の JEV 株のゲノム配列も参考に、JaGAr 01 株の 3'UTR の配列および予測した二次構造を基に設計した。LNA gapmer 2 および 3 は 3'UTR CS I モチーフを、LNA gapmer 4 から 9 は 3'UTR stem-loop 領域を標的とした。コントロール LNA gapmer は LNA および DNA 組成比を考慮し、JEV RNA およびヒトゲノム DNA 配列に相補的にならないように設計した。これらのうちコントロール LNA gapmer 4 は既報から引用した¹³⁴。全ての LNA gapmer は PS 修飾を付加して、HPLC グレードで合成した (Ajinomoto Bio-Pharma Services GeneDesign, Inc., Osaka, Japan)。

2.2.3 培養細胞

Vero 細胞は、理化学研究所バイオリソース研究センター (RIKEN BRC: RCB0001) より得られた。Vero 細胞は増殖培地すなわち 10% 非働化ウシ胎子血清 (FBS; GE health care, IL, USA) および 0.5% 抗生物質溶液 (50 units/mL penicillin and 50 µg/mL streptomycin; Wako, Osaka, Japan) 添加 Eagle's minimal essential medium 培地 (EMEM 培地、Wako、製品番号: 051-

07615) を用いて 37°C、5%CO₂ 条件下で培養した。細胞の凍結保存には Cell Bunker 2 (ZENOGEN PHARMA, Fukushima, Japan) を用いて -80°C で 8 時間以上冷却した。その後、液体窒素中において凍結細胞を保存した。

2.2.4 日本脳炎ウイルス株

JEV JaGAr 01 株は日本大学生物資源科学部 獣医学科 獣医伝染病学研究室 泉對博 教授から分与された。JaGAr 01 株は Vero 細胞において以下の方法で 3 回継代した。Vero 細胞を T75 フラスコに播種し、>95% confluency になるまで増殖させた。その後、JEV 液を室温で解凍し、2% FBS および 0.5% 抗生物質溶液を含む EMEM 培地で 10⁻² 倍希釈した。T75 フラスコから培養上清を除去し、1.5 ml の 10⁻² 倍希釈 JEV 液を接種した。15 分毎に tiltingしながら、37°C・5%CO₂ 条件下で 60 分間インキュベートした。T75 フラスコから JEV 液を除去し、2% FBS および 0.5% 抗生物質溶液添加 EMEM 培地を 15 ml 加え、細胞変性効果 (Cytopathic effect : CPE) が観察されるまで T75 フラスコをインキュベートした。CPE が観察された後、培養上清を回収し、2000 ×g、15 分、室温で遠心した。遠心後、上清を 0.3 ml ずつクライオチューブに分注し、-80°C で保存した。ウイルスストックの力価は Multiplicity of infection (MOI) を決定するためにブランクアッセイにより定量した。

2.2.5 トランスフェクション

スクリーニング試験および濃度依存性試験においては、Vero 細胞を細胞培養用 24 well plate に 1.0×10^5 個/well で播種した。その後、24 well plate にて 95% confluency の細胞を得るため、 $37^\circ\text{C} \cdot 5\% \text{CO}_2$ 条件下で 24 時間培養した。培養した Vero 細胞にスクリーニング試験においては 0.1 MOI で、濃度依存性試験においては、0.05 MOI で JEV を感染させた。JEV 希釈液には抗生物質を含まない 2%FBS 添加 EMEM 培地（維持培地）を用いた。LNA gapmer のトランスフェクションは Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いたリポフェクション法により行った。0.1 または 0.05 MOI に調整した JEV 液をそれぞれ 100 μL /well 接種し、15 分毎に tilting しながら $37^\circ\text{C} \cdot 5\% \text{CO}_2$ 条件下で 1 時間インキュベートした。インキュベートの間、Opti-MEM(Thermo Fisher Scientific)を溶媒として 0.15 から 15 μM の LNA gapmer および 3 μL の Lipofectamine RNAiMAX を含む 80 μL の混合溶液を調整した。その後 LNA gapmer を終濃度である 0.05 から 5 μM に調整するために抗生物質を含まない 5% BS 添加 EMEM 培地で 240 μL の容量に 3 倍希釈した。JEV を Vero 細胞に 1 時間接種した後、各 well に 800 μL の抗生物質を含まない 5% FBS 添加 EMEM 培地を加えた。ウイルス液をアスピレーターで除去後、上記で用意した LNA 溶液 230 μL を Vero 細胞に添加し 4 時間処置することで LNA gapmer を Vero 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションに続いて Vero 細胞を、800

μL の抗生物質を含まない 5%FBS 添加 EMEM 培地を用いて洗浄し、維持培地で培養した。培養した上清をスクリーニング試験では感染から 29 時間後 (29 hours post infection, hpi) に、濃度依存性試験では 24 hpi に回収シブ
ラークアッセイに用いた。

2.2.6 プラークアッセイ

Vero 細胞を細胞培養用 12 well plate に 2.0×10^5 個/well 播種し、増殖培地中で培養した。増殖培地を除去後、95%以上の confluency の Vero 細胞に維持培地で希釈した 10 倍階段希釈ウイルス培養上清 100 μL を接種した。15 分毎に tilting しながら $37^\circ\text{C} \cdot 5\% \text{CO}_2$ 条件下で 1 時間感染させた。感染後、細胞を維持培地で洗浄し、1 mL の半流動培地 (1%メチルセルロース (Wako)、2% FBS および 0.5%抗生物質溶液を含む EMEM 培地) を重層した。72 時間の培養後、細胞を固定するために 500 μL の 10%中性緩衝ホルマリン (Wako) を各 well に加え、12 well plate を UV 下で 30 分間静置した。細胞の固定後、細胞を超純水で 3 回洗浄し 0.5%クリスタルバイオレット (Merck, Hessen, Germany) で染色した。スクリーニング試験においては 10^{-4} 倍および 10^{-5} 倍希釈のウイルス培養上清を接種した well の、濃度依存性試験においては 10^{-3} 倍および 10^{-4} 倍希釈のウイルス培養上清を接種した well のプラーク数を数え、ウイルス力価を PFU/mL として算出した。異なる希釈倍率のウイルス培養上清から算出した二つの

PFU/mL の平均の値を統計解析に用いた。

2.2.7 統計解析

少なくとも 3 回の独立したトランスフェクション実験から得られたデータを平均値およびその標準偏差で表した。統計解析では PFU/mL を正規分布に従うデータにするため対数に変換し、GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, CA, USA) を用いて、一元配置分散分析に続く post hoc Tukey-Kramer multiple comparison test により解析した。 p 値は 0.05 未満で統計的に有意と判定した。

表 2-1 本研究で使用した LNA gapmer の配列および化学修飾

Name	Sequence (5'→3')	Target Regions of the JEV genome (JaGAr 01, Accession No. AF069076.1)	Length (mer)
LNA gapmer 1	^m C ^ T ^ ^m C ^ t ^ a ^ a ^ a ^ c ^ c ^ t ^ c ^ t ^ a ^ G ^ T ^ ^m C	10,749–10,763; 10,827–10,841	15
LNA gapmer 2	G ^ G ^ T ^ g ^ t ^ c ^ a ^ a ^ t ^ a ^ t ^ g ^ c ^ T ^ G ^ T	10,863–10,878	16
LNA gapmer 3	T ^ ^m C ^ ^m C ^ c ^ a ^ g ^ g ^ t ^ g ^ t ^ c ^ a ^ a ^ T ^ A ^ T	10,868–10,883	16
LNA gapmer 4	A ^ ^m C ^ T ^ t ^ c ^ g ^ g ^ c ^ g ^ c ^ t ^ c ^ t ^ G ^ T ^ G	10,956–10,971	16
LNA gapmer 5	A ^ ^m C ^ T ^ t ^ c ^ g ^ g ^ c ^ g ^ c ^ t ^ c ^ t ^ G ^ T ^ g	10,956–10,971	16
LNA gapmer 6	T ^ T ^ ^m C ^ g ^ g ^ c ^ g ^ c ^ t ^ c ^ t ^ g ^ t ^ G ^ ^m C ^ ^m C	10,958–10,973	16
LNA gapmer 7	A ^ ^m C ^ A ^ t ^ a ^ c ^ t ^ t ^ c ^ g ^ g ^ c ^ g ^ c ^ T ^ ^m C ^ T	10,952–10,968	17
LNA gapmer 8	A ^ ^m C ^ A ^ T ^ a ^ c ^ t ^ t ^ c ^ g ^ g ^ c ^ g ^ ^m C ^ T ^ ^m C ^ t	10,952–10,968	17
LNA gapmer 9	A ^ ^m C ^ A ^ t ^ a ^ c ^ t ^ t ^ c ^ g ^ g ^ c ^ g ^ ^m C ^ T ^ ^m C	10,952–10,967	16
Control LNA gapmer 1	A ^ ^m C ^ T ^ c ^ t ^ c ^ g ^ t ^ c ^ a ^ a ^ c ^ c ^ A ^ A ^ T	NA	16
Control LNA gapmer 2	G ^ T ^ A ^ a ^ c ^ t ^ c ^ g ^ t ^ c ^ g ^ t ^ a ^ A ^ ^m C ^ A	NA	16
Control LNA gapmer 3	^m C ^ G ^ A ^ a ^ t ^ a ^ g ^ t ^ t ^ a ^ g ^ t ^ a ^ G ^ ^m C ^ G	NA	16
Control LNA gapmer 4	G ^ A ^ ^m C ^ c ^ a ^ a ^ t ^ c ^ t ^ c ^ g ^ t ^ t ^ A ^ G ^ T	NA	16

N, LNA; n, DNA; m, C5-methylcytosine; ^, phosphorothioate; NA, not applicable.

2.3 成績

2.3.1 JEV ゲノム RNA の 3'UTR を標的とする LNA gapmer の設計

JEV のゲノムの機能および ASO の試験に関する既報⁹⁷⁻⁹⁹を参考に 15 から 17 塩基長で構成される 9 種類の LNA gapmer を JEV の複製に必須な領域である 3'UTR の様々な部位に対して設計した (表 2-1、図 2-1)。試験された全ての LNA gapmer はヌクレアーゼ耐性および標的 RNA に対する結合親和性を増加させる PS 修飾を施して合成した。設計のために JaGAr 01 株の部分的な 3'UTR (278 塩基) の RNA 二次構造を、RNAfold プログラムを用いて予測した。QIAGEN により設計された LNA gapmer 1 が、3'UTR の同配列の異なる部位二か所を標的とすることが確認された。LNA gapmer 2 および 3 は JEV RNA の複製に必須なゲノムの環状化に必要な 3'UTR CS I モチーフを標的とするように設計された。本研究において予測した JEV JaGAr 01 株の 3'UTR CS I モチーフは既報において予測された GP78 株および JaOArS982 株の CS I モチーフ^{98, 135}と異なり折り畳まれた二次構造をしていた。LNA gapmer 4、5、6、7、8 および 9 は一本鎖構造を形成する 3'UTR stem-loop 領域を標的としていることが確認され、これら LNA gapmer が効果的に標的領域に結合する可能性が予測された。Stem-loop 標的 LNA gapmer の塩基長ならびに LNA/DNA 組成比は、修飾核酸が標的 JEV RNA への結合親和性および分解効率にどの程度影響を与えるか調べるために調

節された。4種類のコントロール LNA gapmer は理論的に JEV およびヒト RNA の相補配列を避けることでそれらに結合しないように設計され、疑陽性の可能性を排除するために使用された。

2.3.2 スクリーニング試験

JEV の増殖抑制に効果的な LNA gapmer の標的領域および配列を見つけるため、GIII型に属し JEV の研究において確立された標準株である JaGAR 01 株¹³⁶を 0.1 MOI で感染させた Vero 細胞を用いて LNA gapmer のスクリーニングを行った (図 2-2)。プラークアッセイの結果から JEV RNA 標的 LNA gapmer が JEV の増殖を抑制できることが明らかとなった (図 2-3)。特に、3'UTR stem-loop 領域を標的とする LNA gapmer 4、5、6、7、8 および 9 がコントロール LNA gapmer と比べて有意に JEV 力価を減少させることが明らかとなった。これらのうち、LNA gapmer 8 は JEV の増殖抑制に最も効果的であり、LNA gapmer 8 と同じ JEV RNA 配列を標的とするが一塩基短い LNA gapmer 9 は次に効果的であった。興味深いことに 2つの異なる領域を標的とする LNA gapmer 1 は JEV RNA に結合する機会がより多いはずであるにもかかわらず効果的な JEV 増殖抑制を誘導しなかった。3'UTR CS I 領域を標的とする LNA gapmer 2 および 3 はコントロール LNA gapmer と比べて有意なウイルス力価の減少を誘導しなかった。この結果は同じく JEV CS I 領域を標的とする PMO および PNA を用いた steric block ASO の

既報⁹⁷⁻⁹⁹と一致しなかった。

2.3.3 濃度依存性試験

スクリーニング試験で効果の高かった3つの3'UTR stem-loop 標的 LNA gapmer の JEV 増殖抑制による抗ウイルス効果を濃度依存性試験によりさらに確認した (図 2-4)。Vero 細胞に JEV JaGAr 01 株を 0.05 MOI で感染させ、LNA gapmer 7、8 および 9 を 0.05 から 5 μ M の異なる濃度でトランスフェクションした。これらの LNA gapmer は濃度依存的に強力な JEV 増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。すべての LNA gapmer は、5 μ M の濃度のコントロール LNA gapmer (平均: 1.8×10^6 PFU/mL) と比べて、0.5 μ M の濃度で有意に JEV 力価を減少させた (平均: 0.7×10^6 から 1.2×10^6 PFU/mL)。各 LNA gapmer を 0.05 μ M および 5 μ M の濃度間で、または 0.5 μ M および 5 μ M の濃度間で比較したところ、JEV の増殖に対する抗ウイルス活性の有意な増加が観察された (5 μ M における平均: 2.7×10^5 から 6.2×10^5 PFU/mL)。これらの結果によって、3'UTR stem-loop が LNA gapmer の抗ウイルス活性を誘導するために重要な領域であることが示された。

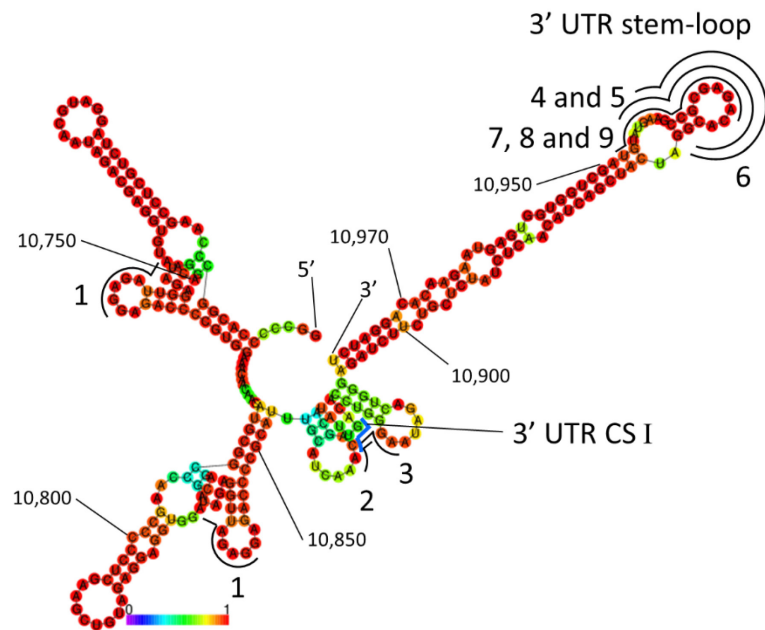


図 2-1 JEV ゲノム RNA の 3'UTR の二次構造予測および LNA gapmer の標的領域

JEV JaGAr 01 株 (accession no. AF069076.1) の部分的な 3'UTR (10,700-10,977 nt) における RNA 二次構造は RNAfold プログラムを用いて予測した。3'UTR conserved sequence (CS) I 領域は青い線で示されている。LNA gapmer 標的領域は番号と黒線で示されている。小さいフォントで示されている数字はゲノムにおける塩基位置を示している。二次構造の下部にあるヒートマップの色は塩基ペアを形成する確率を表しており、赤に近い程示された二次構造を形成している可能性が高い。

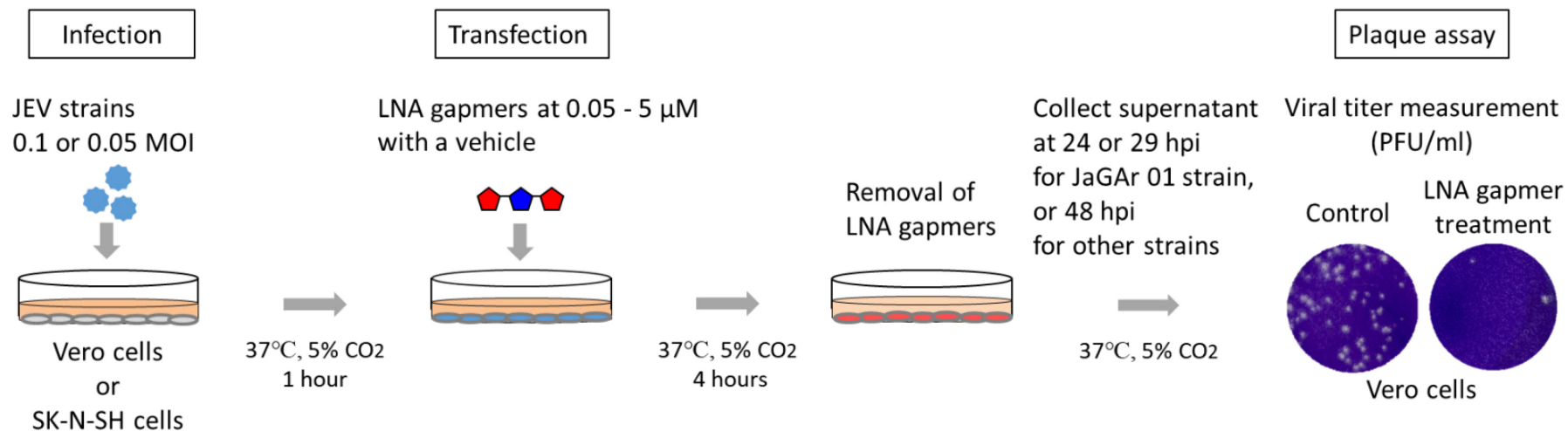


図 2-2 JEV 感染細胞における LNA gapmer のトランスフェクションの模式図

Vero細胞またはSK-N-SH細胞(第4章)を0.1または0.05MOIでJEVを感染させた後、LNA gapmerをLipofectamine RNAiMAXを用いてトランスフェクションした。JaGAR 01株では感染から24または29時間後(hpi)に上清を回収した。回収した上清を用いて、Vero細胞によるプラークアッセイでウイルス力価を測定した。JEV野外株に感染したSK-N-SH細胞の上清は感染から48時間後に回収した(第4章)。

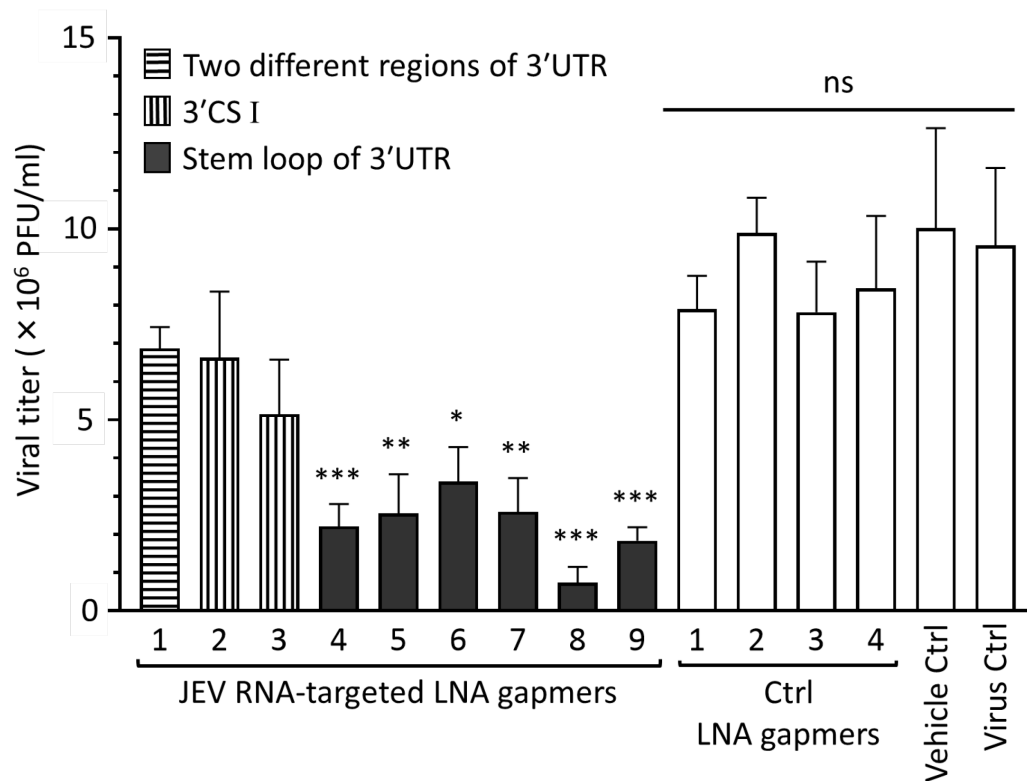


図 2-3 プラークアッセイによる JEV RNA の 3'UTR を標的とする LNA gapmer の in vitro スクリーニング

JEV JaGAR 01 株を 0.1 MOI で感染させた Vero 細胞に、LNA gapmer を Lipofectamine RNAiMAX (Vehicle) を用いて 5 μ M の濃度でトランスフェクションした。データは 3 回の独立した実験の平均値および標準偏差を示している。対数値を用いた統計解析は一元配置分散分析に続く post hoc Tukey-Kramer multiple comparison test により行われた (4 種類のコントロール LNA gapmer に対して * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、ns 有意差なし)。

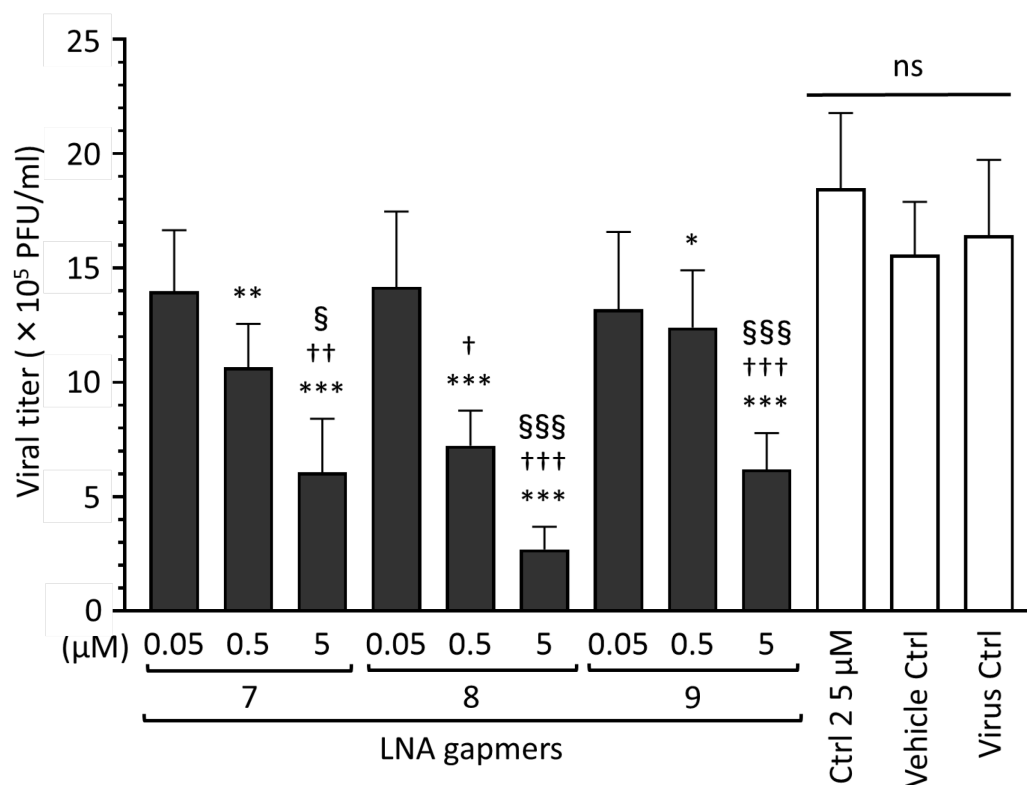


図 2-4 プラークアッセイで測定した 3'UTR stem-loop 領域を標的とした LNA gapmer の濃度依存的効果

JEV JaGAr 01 株を 0.05 MOI で感染させた Vero 細胞に、LNA gapmer 7、8 および 9 を Lipofectamine RNAiMAX を用いて、示されている濃度でトランスフェクションした。データは 6 回の独立した実験の平均値および標準偏差を示している。対数値を用いた統計解析は一元配置分散分析に続く post hoc Tukey-Kramer multiple comparison test により行われた(コントロール LNA gapmer 2.5 μM に対して * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、0.05 μM の同一の LNA gapmer に対して † $p < 0.05$ 、†† $p < 0.01$ 、††† $p < 0.001$ 、0.5 μM の同一の LNA gapmer に対して § $p < 0.05$ 、§§§ $p < 0.001$ 、ns 有意差なし)

2.4 考察

In vitro スクリーニング試験では 3'UTR stem-loop 領域に対して設計した 6 種類全ての LNA gapmer が有意に JEV の増殖を抑制することが明らかとなった。対照的に JEV RNA の複製に重要とされる CS I モチーフを標的とした LNA gapmer は steric block ASO の以前の報告⁹⁷⁻⁹⁹とは異なり有意な増殖抑制効果を示さなかった。本章で標的とした 3'UTR stem-loop 領域の抗ウイルス効果はペプチド抱合型 PNA を用いた steric block ASO を用いた既報によっても観察されている⁹⁹。また、ペプチド抱合型 PMO を用いた研究では、フラビウイルス科ウイルスの 1 種である DENV の増殖が、本章で試験した JEV とほぼ同一の 3'UTR stem-loop 領域を標的とすることで抑制できることが報告されている¹³⁷。フラビウイルス科と同様に一本鎖プラス鎖 RNA をゲノムに持つコロナウイルス科ウイルスにおける最近の研究では、3'UTR stem-loop モチーフを標的とする LNA gapmer が SARS-CoV-2 の増殖を効果的に抑制することが報告されている⁷⁰。加えて ORF および 5'UTR において形成された stem-loop を標的とした LNA gapmer が SARS-CoV-2 および IAV に対して抗ウイルス活性を誘導することが示されている^{70, 72, 129}。二次構造予測において示されているように JEV の 3'UTR stem-loop 領域は LNA gapmer が結合しやすいと考えられる一本鎖構造を形成している。一方、3'UTR CS I 領域は本解析では入り組んだ構造に折りたたまれていることが

予測された。この予測二次構造における違いは stem-loop 標的 LNA gapmer が CS I 標的 LNA gapmer より効果的であった理由の一つである可能性がある。Steric block または gapmer といった ASO の作用様式、化学修飾および機能や配列保存性といったウイルス RNA の性質を考慮する必要があるが、ウイルス RNA の stem-loop 構造は抗ウイルス ASO 設計のための基準の一つとなる可能性がある。また、より効果的な JEV 増殖抑制効果を得るためには LNA gapmer の塩基長や修飾核酸の比率の最適化による抗ウイルス活性の強化が必要と考えられる。さらに、本研究で標的とした 3'UTR 以外の構造および非構造タンパク質コード領域のみならず、マイナス鎖ウイルス RNA も含めた LNA gapmer 標的領域の包括的な探索が必要である。

2.5 小括

これまでに SARS-CoV-2 や IAV といった病原性の高いウイルスに対する LNA gapmer の増殖抑制効果が報告されている。しかし、全世界で公衆衛生学的な問題となっているフラビウイルス科オルソフラビウイルス属に対する LNA gapmer の有効性は不明である。本章ではフラビウイルス科オルソフラビウイルス属ウイルスのモデルである JEV に対する LNA gapmer の増殖抑制効果を実証するため、JEV 3'UTR を標的とする LNA gapmer を複数設計し、スクリーニング試験を行った。さらにスクリーニング試験および濃度依存性試験により効果的な抗 JEV LNA gapmer を選定した。

JEV の複製に重要な領域である 3'UTR に対して、JaGAr 01 株の部分的な 3'UTR の予測二次構造および他の JEV 株の配列を基に 9 種類の LNA gapmer を設計した。LNA gapmer 1 は 3'UTR 内の同配列二か所を標的とした。LNA gapmer 2 および 3 は JEV の RNA の複製に必要な過程であるゲノムの環状化を引き起こす 3'UTR CS I モチーフを標的とした。LNA gapmer 4、5、6、7、8 および 9 は宿主の GAPDH と相互作用することで JEV ゲノムの複製を促進し、PNA を用いた steric block ASO による増殖抑制効果が報告されている 3'UTR stem-loop 領域を標的とした。

スクリーニング試験では 3'UTR 内の同配列二か所を標的とする LNA gapmer 1 ならびに 3'UTR CS I モチーフを標的とする LNA gapmer 2 およ

び 3 は効果的な JEV 増殖抑制効果を示さなかったが、3'UTR stem-loop 領域を標的とする LNA gapmer 4、5、6、7、8 および 9 はいずれも有意な JEV 増殖抑制効果を示した。

濃度依存性試験ではスクリーニング試験において最も効果が高かった LNA gapmer 8 に加えて、その塩基長ならびに LNA/DNA 組成を調節した LNA gapmer 7 および 9 を試験した。その結果 3 種類全ての LNA gapmer は濃度依存的に 0.5 μ M の濃度から有意な JEV 増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。

以上の結果より、LNA gapmer が JEV 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。

第 3 章

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

3.1 はじめに

宿主細胞の mRNA を標的とした LNA gapmer の有効性は多く報告されており、LNA gapmer による宿主 mRNA の分解メカニズムについても多くの知見が報告されている⁵⁷。しかしウイルスゲノムを標的とした LNA gapmer の報告は限られており、表 1-3 において示したように HBV、HCV、SARS-CoV-2、IAV、HIV-1 および PRRSV に対してのみであり、蚊媒介性フラビウイルスに対する有効性は不明であった。このような背景において第 2 章では LNA gapmer によるオルソフラビウイルス属ウイルスのモデルである JEV に対する増殖抑制効果を初めて実証した。しかし、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く残されている。これまでに合成 HCV RNA¹⁰⁸、HCV サブゲノミックレプリコン RNA¹⁰⁷ および合成新型コロナウイルス RNA⁷¹ に対して LNA gapmer による RNase H を介した分解が報告されているが、分解効果における塩基配列および修飾核酸の特異性は明らかになっていない。すなわち、変異を起こしやすい RNA ウイルスを標的とする LNA gapmer の有効性に対して、標的 RNA への結合を支持する LNA 鎖および RNase H により認識される DNA 鎖における変異が与える影響は不明である。加えて LNA gapmer によるウイルス RNA 分解効果における LNA 鎖の特異性も不明である。さらに LNA gapmer により誘導される RNase H 依存的なウイルス RNA 分解メカニズムおよび

効率の評価法もこれまでに報告がない。そこで本章では塩基配列および修飾核酸の特異性の観点から LNA gapmer の RNA 分解メカニズムの解明を目的とし、以下の実験を行った。はじめに第 2 章において最も効果が高かった LNA gapmer 8 を基に 1 または 2 塩基のミスマッチ変異を導入したミスマッチ LNA gapmer および LNA を持たない ASO である all DNA を設計した。設計したミスマッチ LNA gapmer および all DNA を用いて、プラークアッセイおよび本章で構築した LNA gapmer によるウイルス RNA 分解効果を定量する新規評価法である生化学的 RNA 分解アッセイを行った。

3.2 材料および方法

3.2.1 ミスマッチ LNA gapmer の設計および合成

ミスマッチ LNA gapmer は第 2 章において最も JEV 増殖抑制効果が高かった LNA gapmer 8 を基に設計された (図 3-1)。ミスマッチ LNA gapmer において置換した塩基とその位置はピリミジン塩基およびプリン塩基間の転移ならびに機能的領域を考慮して決定した。修飾核酸の特異性を確かめるため LNA を持たない全て DNA で構成された ASO (all DNA) を設計した。全てのミスマッチ LNA gapmer は PS 修飾を付加して、HPLC グレードで合成した (Ajinomoto Bio-Pharma Services GeneDesign, Inc., Osaka, Japan)。

3.2.2 トランスフェクション

増殖培地で調整した Vero 細胞を細胞培養用 24 well plate に 1.0×10^5 個/well で播種した。その後、95% confluency の細胞を得るため、24 well plate を $37^\circ\text{C} \cdot 5\% \text{CO}_2$ 条件下で 24 時間培養した。培養した Vero 細胞に 0.05 MOI で JEV を感染させた。JEV 希釈液には維持培地（2%FBS 添加 EMEM、抗生物質なし）を用いた。ミスマッチ LNA gapmer のトランスフェクションは Lipofectamine RNAiMAX を用いたリポフェクション法により行った。0.05 MOI に調整した JEV 液をそれぞれ 100 μL /well 接種し、15 分毎に tiltingしながら $37^\circ\text{C} \cdot 5\% \text{CO}_2$ 条件下で 1 時間インキュベートした。インキュベートの間、Opti-MEM を溶媒として 15 μM のミスマッチ LNA gapmer および 3 μL の Lipofectamine RNAiMAX を含む 80 μL の混合溶液を調整した。その後ミスマッチ LNA gapmer を終濃度である 5 μM に調整するために抗生物質を含まない 5%FBS 添加 EMEM 培地で 240 μL の容量に 3 倍希釈した。JEV を Vero 細胞に 1 時間接種した後、各 well に 800 μL の抗生物質を含まない 5%FBS 添加 EMEM 培地を加えた。ウイルス液をアスピレーターで除去後、上記で用意した LNA 溶液 230 μL を Vero 細胞に添加し 4 時間処置することでミスマッチ LNA gapmer を Vero 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションに続いて Vero 細胞を、800 μL の抗生物質を含まない 5%FBS 添加 EMEM 培地を用いて洗浄し、維持培地で培養した。培養した上清を感染から 24 時間後 (hpi) に回収しプラークアッセイに用いた。

3.2.3 プラークアッセイ

Vero 細胞を細胞培養用 12 well plate に 2.0×10^5 個/well で播種し、増殖培地中で培養した。増殖培地を除去後、95%以上の confluency の Vero 細胞に維持培地で希釈した 10 倍階段希釈ウイルス培養上清 100 μ L を接種した。15 分毎に tilting しながら $37^\circ\text{C} \cdot 5\% \text{CO}_2$ 条件下で 1 時間感染させた。感染後、細胞を維持培地で洗浄し、1 mL の半流動培地（1%メチルセルロース、2%FBS および 0.5%抗生物質溶液を含む EMEM 培地）を重層した。72 時間の培養後、細胞を固定するために 500 μ L の 10%中性緩衝ホルマリンを各 well に加え、12 well plate を UV 下で 30 分間静置した。細胞の固定後、細胞を超純水で 3 回洗浄し 0.5%クリスタルバイオレットで染色した。 10^{-3} 倍および 10^{-4} 倍希釈のウイルス培養上清を接種した well のプラーク数を数え、ウイルス力価を PFU/mL として算出し、その平均値を統計解析に用いた。

3.2.4 生化学的 RNA 分解アッセイ

3'UTR stem-loop 領域標的 LNA gapmer に相補的な 17 塩基の標的 JEV RNA 配列は HPLC グレードで合成した (Ajinomoto Bio-Pharma Services GeneDesign, Inc.)。LNA gapmer または mismatch LNA gapmer 1.5 μ M、合成 JEV RNA 6 μ M および大腸菌由来 RNase H 50 units/mL (New England Biolabs, MA, USA) を全量 100 μ L の 1 \times RNase H reaction buffer に調整し、 37°C で 120 分間インキュベートした。20 μ L の反応溶液を反応後 0、5、10、

30、60 および 120 分に回収した。回収した反応溶液は直ちに 1 μ L の 0.5 M EDTA (pH 8.0, NIPPON GENE, Tokyo, Japan) を加えることで反応を停止し、21 μ L の等量のホルムアミド (Wako) で変性した。サンプルは直ちに次の過程で使用または使用するまで -80°C で保存した。サンプルを等量の Novex™ TBE-Urea sample buffer (Thermo Fisher Scientific) と混合し、70°C、4 分の熱処理を行った後、直ちに氷上で冷やした。20 μ L のサンプルおよび 12 μ L の microRNA marker (New England Biolabs) を 10 well の Mini-PROTEAN 15%TBE-urea gel (Bio-Rad, CA, USA) にアプライして、200 V、30 分間電気泳動した。ゲルを SYBR®Green II (Thermo Fisher Scientific) により染色し、Blue tray (Bio-Rad) をセットした Gel Doc™ EZ system (Bio-Rad) を用いて撮影した。バンド輝度を ImageJ ソフトウェア (version 1.53k; NIH) を用いて定量した。

3.2.5 統計解析

ブランクアッセイにおける統計解析では PFU/mL を正規分布に従うデータにするため対数に変換し、GraphPad Prism 8 を用いて、一元配置分散分析に続き post hoc Tukey-Kramer multiple comparison test により解析した。

生化学的 RNA 分解アッセイでのバンド輝度の定量解析における検定では Statcel-the Useful Addin Forms on Excel-4th ed (OMS Ltd., Saitama, Japan) を用いて Shirley-Williams test を行った。

3.3 成績

3.3.1 ミスマッチ LNA gapmer の設計および合成

標的 JEV RNA および LNA gapmer の二量体複合体に対する RNase H の反応を介したウイルス RNA 分解メカニズムを解明するためにミスマッチ LNA gapmer を設計した (図 3-1)。ミスマッチ LNA gapmer は第 2 章において最も JEV 増殖抑制効果が高かった LNA gapmer 8 の塩基配列を基準に 1~2 塩基のミスマッチ変異を導入して設計した。ミスマッチ LNA gapmer において置換した塩基とその位置はピリミジン塩基およびプリン塩基間の転移ならびに機能的領域を考慮して決定した。すなわち、シトシンおよびグアニン結合はアデニンおよびチミン結合より結合力が強く LNA gapmer の標的 RNA に対する結合力への影響が大きいと考えられるため、シトシンまたはグアニンをそれぞれグアニンまたはシトシンにトランスバージョンした。また、ミスマッチ LNA gapmer 1、2 および 3 は標的 RNA への結合力に関わる LNA 鎖に 1 または 2 ミスマッチ塩基を、LNA gapmer 4 は RNase H が認識する領域である DNA 鎖に 2 ミスマッチ塩基を導入した。さらに抗ウイルス gapmer ASO における LNA 修飾の重要性を確かめるために全て DNA で構成される all DNA を設計した。

3.3.2 プラークアッセイによる LNA gapmer の塩基配列および修飾核酸特異的な JEV 増殖抑制効果の解析

LNA gapmer による JEV 増殖抑制効果の塩基配列および修飾核酸特異性を解析するために、ミスマッチ LNA gapmer を 5 μ M で Vero 細胞にトランスフェクションし、その JEV 増殖抑制効果をプラークアッセイにて評価した (図 3-2)。その結果、ミスマッチ LNA gapmer および all DNA で有意に減弱された抗ウイルス活性が観察された。ウイルスコントロールと比べて、一塩基のミスマッチを持つ LNA gapmer 2 を除く全てのミスマッチ LNA gapmer および all DNA は、オリジナルの LNA gapmer 8 と異なり、JEV 力価の有意な減少を誘導しなかった。LNA 鎖および DNA 鎖にそれぞれ 2 ミスマッチ塩基を持つミスマッチ LNA gapmer 1 および 4 は、1 ミスマッチ塩基を持つミスマッチ LNA gapmer 2 および 3 に比べてより大きい抗ウイルス活性の減少を示した。また、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 の JEV 増殖抑制効果の有意な減少が観察された。

3.3.3 生化学的 RNA 分解アッセイによる LNA gapmer の RNase H 依存的な JEV RNA 分解効果の解析

細胞内における LNA gapmer の JEV RNA に対する分解反応を再現するために、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細胞を用いない RNA 分解アッセイを構築した。本 RNA 分解アッセイにおいて、本 LNA gapmer が RNase H 依存かつ経時的に JEV RNA 配列を分解できることが証明された（図 3-3、図 3-4、図 3-5）。LNA gapmer 7、8 および 9 では、RNase H 添加 5 分後に RNA および LNA gapmer のハイブリダイゼーションに起因するヘテロ二量体の複合体のバンド輝度が 50%以下まで減少し、標的 JEV RNA 配列の有意な分解を誘導した。これらの RNA および LNA gapmer の複合体のバンドは RNase H 添加 30 分後には、ほぼ完全に消失した。また RNase H 存在下または非存在下において 120 分後のサンプルまで試験した RNA 分解アッセイでは、RNase H は LNA gapmer による標的 JEV RNA の分解に必須であることが確認された（図 3-6）。なお、RNase H による JEV RNA の非特異的な分解は観察されなかった。

3.3.4 生化学的 RNA 分解アッセイによる LNA gapmer の塩基配列および修飾核酸特異的な JEV RNA 分解効果の解析

LNA gapmer による JEV RNA 分解効果の塩基配列および修飾核酸特異性を解析するために mismatch LNA gapmer を用いて生化学的 RNA 分解アッセイを行ったところ、LNA gapmer の合成 JEV RNA への結合力および分解活性は mismatch 塩基または LNA の除去により顕著に減少することが明らかとなった。LNA 鎖または RNase H 結合 DNA 領域にそれぞれ 2 mismat

チ塩基を含むミスマッチ LNA gapmer 1、4 および all DNA は、合成 JEV RNA と複合体を形成しなかった (図 3-7)。一方、LNA 鎖に 1 ミスマッチ塩基を含むミスマッチ LNA gapmer 2 および 3 は合成 JEV RNA と複合体を形成したが、減弱した RNA 分解活性を示した (図 3-8)。すなわち、ミスマッチ LNA gapmer 2 またはミスマッチ LNA gapmer 3 および標的 JEV RNA の複合体バンドの 50%減少率はそれぞれ 10 分後および 30 分後に観察された。これらの分解時間はオリジナルの LNA gapmer 8 の 50%分解時間である 5 分より長かった。この生化学的 RNA 分解アッセイの結果は前述のプラークアッセイと一致しており、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、抗ウイルス活性を発揮することが示された。

	LNA wing				DNA region (RNase H binding site)								LNA wing					
	5'																	-3'
LNA gapmer 8	A	C	A	T	A	C	T	T	C	G	G	C	G	C	T	C	T	
MM1 (2 LNA)		G														G		
MM2 (1 LNA)		G																
MM3 (1 LNA)																G		
MM4 (2 DNA)						G					C							
All DNA																		

■ DNA ■ LNA

図 3-1 本研究で使用したミスマッチ LNA gapmer (MM) の配列。
 オリジナルの LNA gapmer 8 と比較してミスマッチ塩基は白文字で表されている。赤および青の四角はそれぞれ LNA および DNA を示している。MM1、MM2 および MM3 は 2 または 1 ミスマッチ塩基を LNA 鎖に含んでいる。MM4 は 2 ミスマッチ塩基を RNase H 結合 DNA 領域に有している。All DNA は LNA gapmer 8 と同じ配列を持つが LNA を有さない。

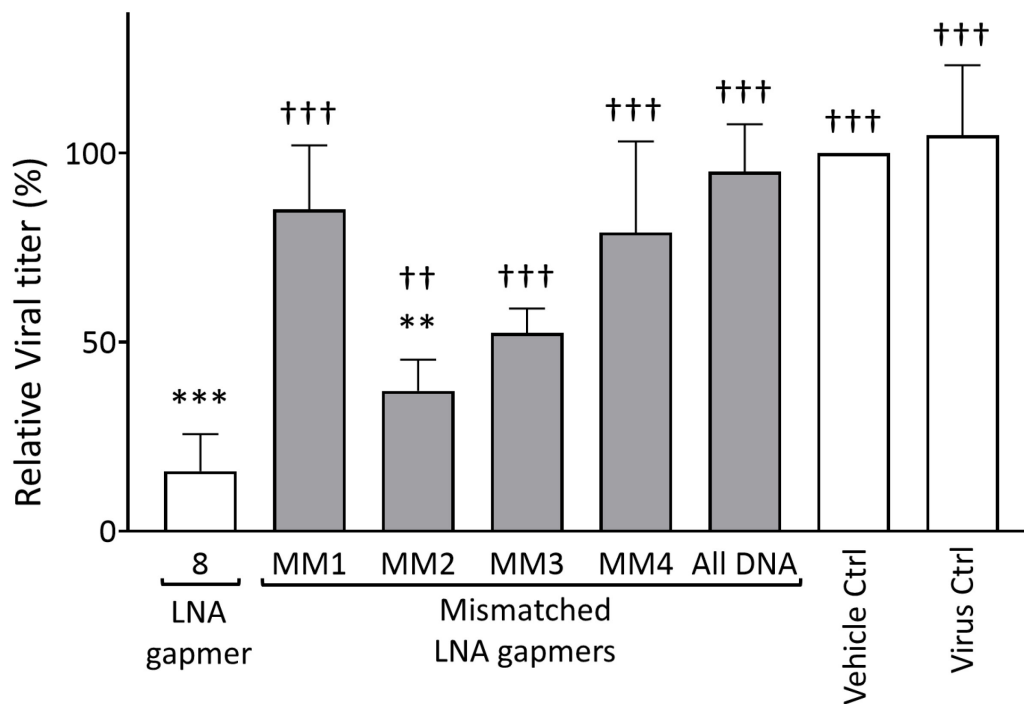


図 3-2 プラークアッセイにより明らかとなったミスマッチ LNA gapmer の減弱した JEV 増殖抑制効果

JEV JaGAr 01 株を 0.05 MOI で Vero 細胞に感染させた後、LNA gapmer を 5 μ M の濃度でトランスフェクションした。ウイルス力価 (PFU/mL) は Vero 細胞を用いたプラークアッセイにより測定した。データは 4 回の独立したトランスフェクション実験の平均値および標準偏差を示している。結果はトランスフェクション試薬 RNAiMAX (Vehicle) のみのコントロールを 100%としたパーセンテージ相対比で示されている。対数値を用いた統計解析は一元配置分散分析に続く post hoc Tukey-Kramer multiple comparison test により行われた(ウイルスコントロールに対して ** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、LNA gapmer 8 に対して ++ $p < 0.01$ 、+++ $p < 0.001$)。

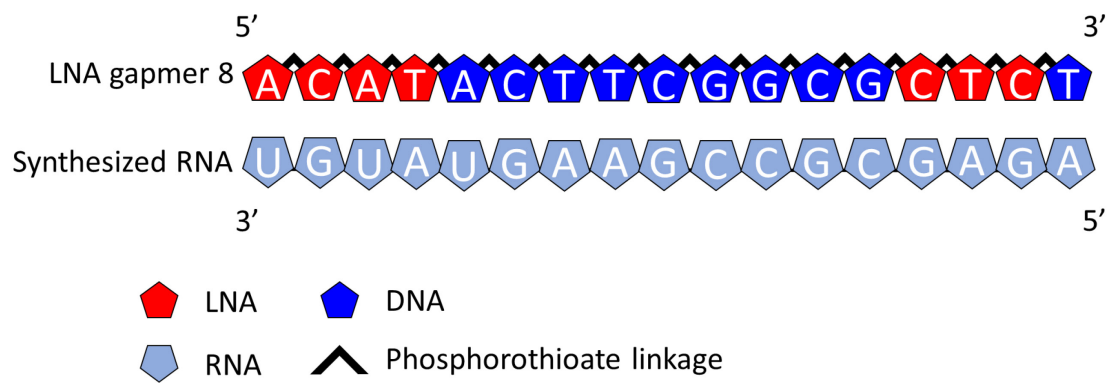


図 3-3 LNA gapmer 8 と合成 JEV RNA のハイブリダイゼーションの模式図

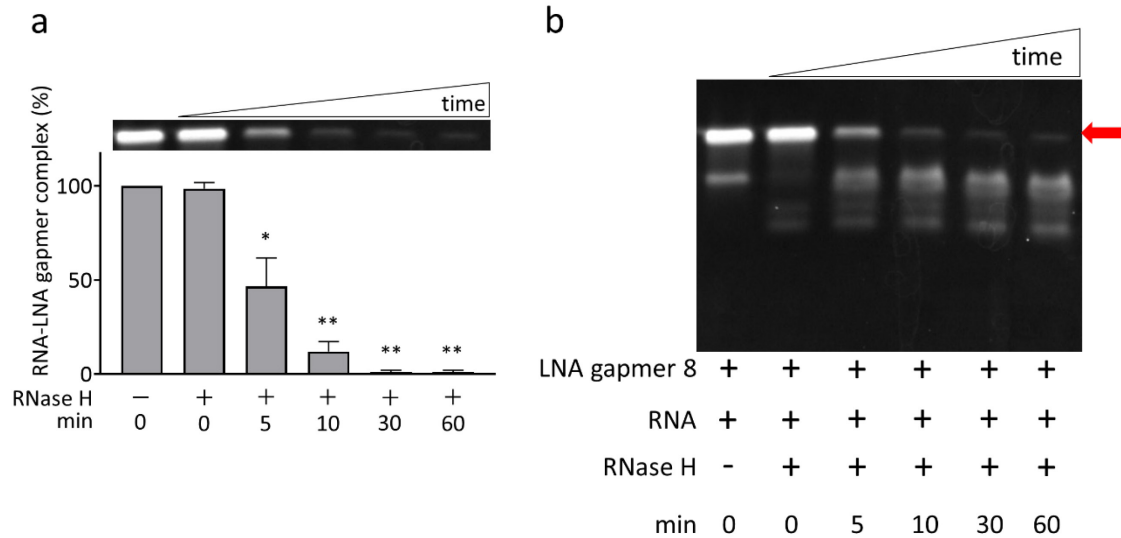


図 3-4 RNA 分解アッセイにより明らかとなった LNA gapmer 8 の RNaseH を介した経時的な合成 JEV RNA の分解

(a) 合成 JEV RNA および LNA gapmer の二量体形成に起因する複合体のバンド画像およびバンド輝度を数値化したグラフ。グラフは RNase H を添加していない (-) の陰性対照を 100%として、3 回の独立した実験の平均および標準偏差で表している。統計解析では Shirley-Williams test を実施した (RNase H 添加後 0 分に対して * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。 (b) 図 3-3 (a) の元の写真。LNA gapmer 8 による経時的な RNA 分解を示している。赤い矢印：RNA および LNA gapmer の複合体。

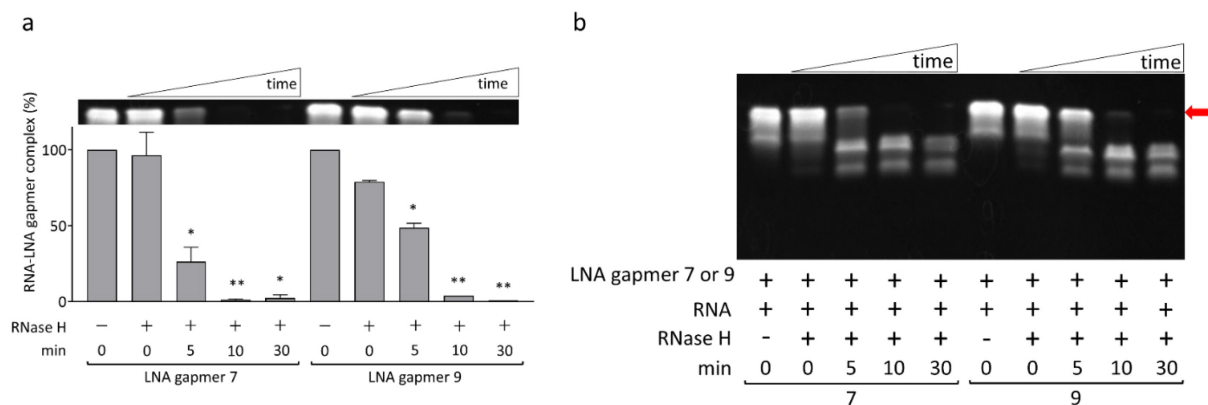


図 3-5 RNA 分解アッセイにより明らかとなった LNA gapmer 7 および 9 の RNase H を介した経時的な合成 JEV RNA の分解

(a) 合成 JEV RNA および LNA gapmer の二量体形成に起因する複合体のバンド画像およびバンド輝度を数値化したグラフ。グラフは RNase H を添加していない (-) の陰性対照を 100%として、3 回の独立した実験の平均および標準偏差を表している。統計解析では Shirley-Williams test を実施した (RNase H 添加後 0 分に対して * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。 (b) 図 3-4 (a) の元の写真。LNA gapmer 7 および 9 による経時的な RNA 分解を示している。赤い矢印: RNA および LNA gapmer の複合体。

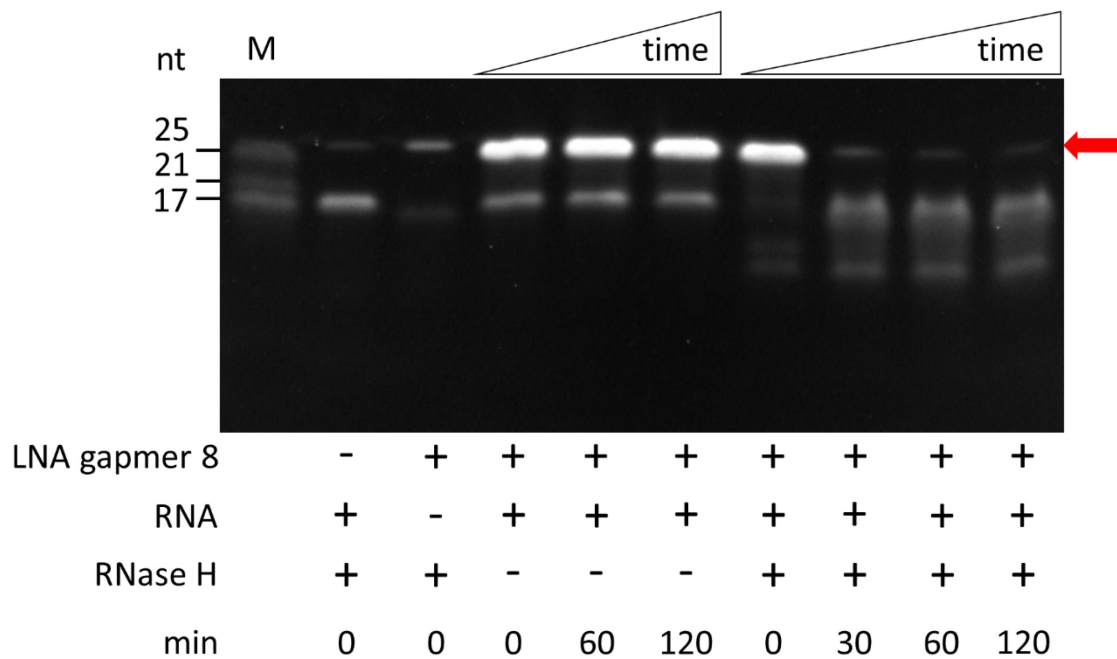


図 3-6 RNase H 存在下または非存在下における LNA gapmer 8 の合成 JEV RNA の分解。

M : RNA マーカー。赤い矢印 : RNA および LNA gapmer の複合体。

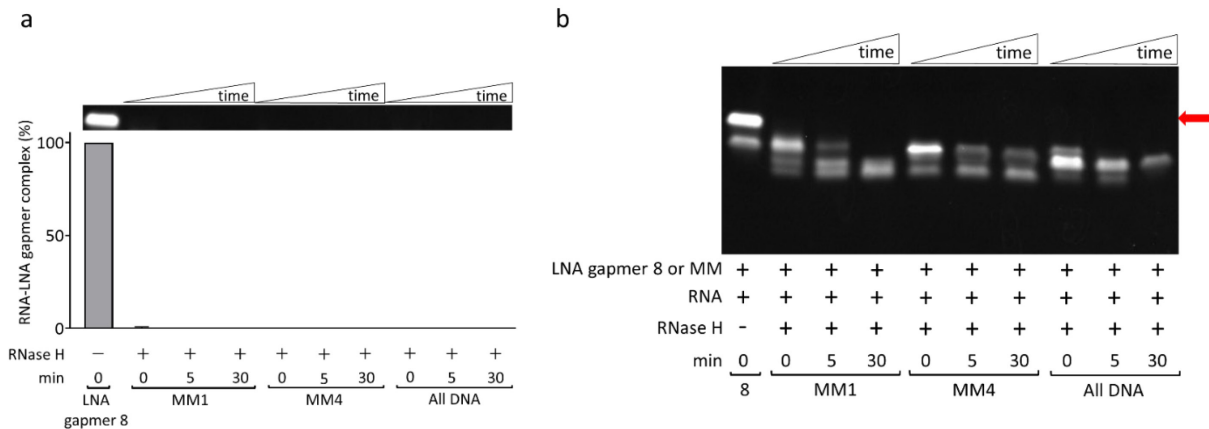


図 3-7 RNA 分解アッセイにより明らかとなった 2 塩基ミスマッチを持つ LNA gapmer (MM) および全て DNA からなる ASO (all DNA) の合成 JEV RNA への結合力の消失

(a) LNA 鎖または DNA 領域に 2 塩基ミスマッチを持つ MM1 および MM4、LNA が除去された all DNA では標的 RNA への結合能が消失した。バンド輝度のグラフは RNase H 非存在下の 0 分を 100% としたパーセンテージで表した (平均、標準偏差、n=3)。統計解析のために Shirley-Williams test を実施した (RNase H 添加後 0 分に対して * p < 0.05, ** p < 0.01)。(b) 図 3-7 (a) の元の写真。ミスマッチ LNA gapmer および DNA のみで構成される ASO を用いた RNA 分解アッセイを示している。赤い矢印: RNA および LNA gapmer の複合体。

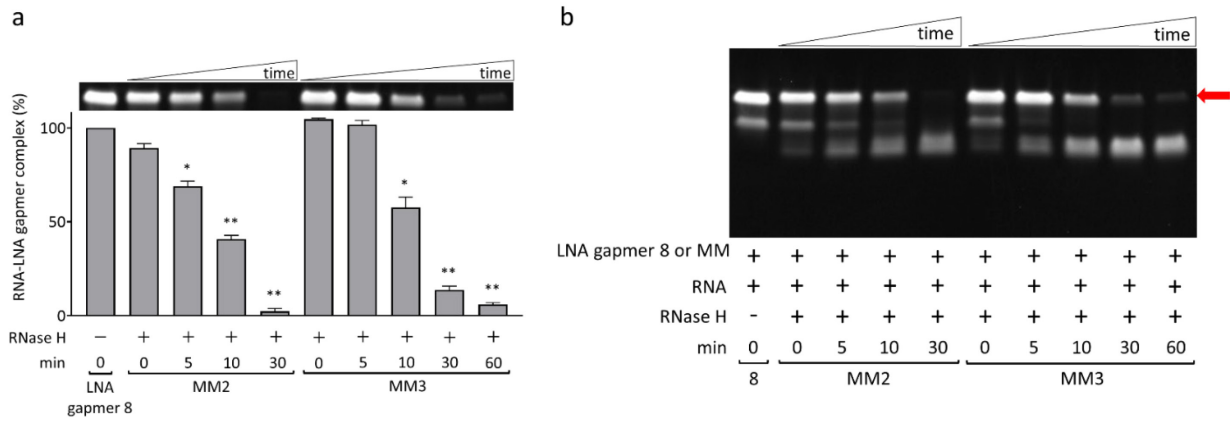


図 3-8 RNA 分解アッセイにより明らかとなった 1 塩基ミスマッチを持つ LNA gapmer (MM) の合成 JEV RNA に対する分解効率の低下

(a) LNA 鎖に 1 塩基ミスマッチを持つ MM2 および MM3 では標的 JEV RNA 配列の分解能が減弱した。バンド輝度のグラフは RNase H 非存在下の 0 分を 100%としたパーセンテージで表した (平均、標準偏差、n=3)。統計解析のために Shirley-Williams test を実施した (RNase H 添加後 0 分に対して * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。 (b) 図 3-8 (a) の元の写真。ミスマッチ LNA gapmer RNA 分解アッセイを示している。赤い矢印: RNA および LNA gapmer の複合体。

3.4 考察

本章では、ウイルス RNA 標的 LNA gapmer が RNase H を介して JEV RNA を分解し、抗 JEV 活性を誘導するという作用メカニズムを実証した。ミスマッチ塩基を有する LNA gapmer を用いたプラークアッセイでは、抗ウイルス活性の有意な減少が示された。LNA 鎖または RNase H 結合 DNA 領域に 2 ミスマッチを含む LNA gapmer および all DNA ASO では、JEV 増殖抑制作用が有意に減弱することが明らかとなった。一方、LNA gapmer 配列における 1 ミスマッチの導入は、LNA gapmer の抗 JEV 活性に中程度の障害をもたらすことが示された。本プラークアッセイの結果は、同じミスマッチ LNA gapmer を使用した生化学的 RNA 分解アッセイの結果と一致しており、LNA gapmer の標的ウイルス RNA への作用がミスマッチ塩基の数に応じて、異なるメカニズムで障害されることが明らかとなった。すなわち、生化学的 RNA 分解アッセイにおいて示されているように、LNA gapmer における 2 ミスマッチまたは LNA の欠如が標的 JEV RNA 配列に対する結合親和性を消失させ、LNA gapmer の抗ウイルス効果の不活性化に寄与していることが示された。一方、1 ミスマッチを含む LNA gapmer の抗ウイルス活性の減弱は、RNA 分解アッセイで示されているように標的 RNA の減弱した分解効率が原因であることが明らかとなった。このウイルス RNA 標的 LNA gapmer の作用メカニズムは、オリジナル LNA gapmer が標的 JEV RNA 配列を RNase

H 存在下で経時的に分解することからも支持された。ミスマッチ LNA gapmer を用いた本研究は、LNA gapmer の抗ウイルス活性がウイルス RNA 配列の分解能と関連していることを初めて報告したものである。

これまでに LNA gapmer による合成 HCV RNA¹⁰⁸、HCV サブゲノミック レプリコン RNA¹⁰⁷ および合成 SARS-CoV-2 RNA⁷¹ において、LNA gapmer の RNase H を介したウイルス RNA の分解が報告されている。これらの報告では本章の結果と類似した結果が示されている。すなわち、LNA gapmer の HCV レプリコン RNA 産生抑制能は 1 ミスマッチ塩基により減弱し、2 または 3 ミスマッチ塩基により消失することが報告されている。しかし、LNA gapmer の感染性ウイルス粒子の産生に対する抑制効果の塩基配列特異性はこれまで報告がない。すなわち、LNA gapmer の RNA 分解を介した感染性ウイルス粒子に対する増殖抑制効果の塩基配列および修飾核酸特異性は明らかになっていない。本研究では細胞内でのウイルス増殖を評価するブランクアッセイと無細胞系の生化学的 RNA 分解アッセイを組み合わせることで LNA gapmer が感染性 JEV 粒子の産生を配列および修飾核酸特異的に抑制することを明らかにした。また本結果は LNA 鎖および RNase H 結合 DNA 領域の配列特異性が抗ウイルス活性の発現に等しく重要であるという LNA gapmer の設計において重要な見解を示唆している。

3.5 小括

塩基配列および修飾核酸特異性の観点から LNA gapmer による JEV 増殖抑制メカニズムを明らかにするために、第 2 章において最も JEV 増殖抑制効果が高かった LNA gapmer 8 を基準に複数のミスマッチ LNA gapmer を設計しプラークアッセイおよび生化学的 RNA 分解アッセイを行った。

ミスマッチ LNA gapmer は LNA gapmer 8 にピリミジン塩基およびプリン塩基間のトランスバージョンならびに機能的領域を考慮して 1 または 2 塩基のミスマッチ変異を導入することで設計した。また、修飾核酸の特異性を確かめるため、LNA 鎖のヌクレオチドを全て DNA に置換した ASO を設計した。ミスマッチ LNA gapmer を用いたプラークアッセイではミスマッチ変異の導入および LNA の除去により LNA gapmer による JEV 増殖抑制効果が有意に減弱することが明らかとなった。

本研究で構築したウイルス RNA 配列に対する RNA 分解アッセイでは、LNA gapmer が RNase H 依存的かつ経時的に JEV RNA 配列を分解することが明らかとなった。さらに、ミスマッチ LNA gapmer を用いた RNA 分解アッセイではミスマッチ塩基の導入および LNA の除去により LNA gapmer の標的 JEV RNA 配列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。

本研究ではウイルス増殖を評価するプラークアッセイおよび無細胞系の

生化学的 RNA 分解アッセイの結果が一致していたことから、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。

第 4 章

ヒト神経芽細胞腫由来細胞株を用いた 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

4.1 はじめに

第2章において JEV 標準株である GIII 型 JaGAr 01 株を用いて感染させた Vero 細胞における LNA gapmer のウイルス増殖抑制効果の有効性が実証された。また、第3章において JEV RNA 標的 LNA gapmer が塩基配列および修飾核酸特異的に RNase H 介在性 RNA 分解を誘導することで抗 JEV 活性を発揮することが明らかとなった。しかし、主に脳の神経細胞に感染する JEV の治療薬の開発のためには LNA gapmer の有効性及び安全性を病態発現の場となるヒト神経細胞において評価する必要がある。また、JEV はアジアにおいて主に GI 型および GIII 型が流行していることから、抗ウイルス LNA gapmer には異なる RNA ゲノム配列を持つ JEV 遺伝子型および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。そこで本章では、最初に JEV 感染モデルの一つであるヒト神経芽細胞腫由来細胞株を用いて、JaGAr 01 株に対する LNA gapmer の有効性をプラークアッセイにより評価した。また、LNA gapmer 標的領域を増幅する RT-qPCR により、プラークアッセイで使用された同一の細胞サンプルを用いて、LNA gapmer がヒト神経芽細胞腫由来細胞株において JEV RNA 発現レベルを低下させるかを調べた。次に、細胞生存率を指標とした細胞毒性試験および GGGenome を用いた BLAST 解析により、ヒト神経芽細胞腫由来細胞株に対する LNA gapmer の配列非依存的および依存的細胞毒性を調べた。さらに、JEV ゲノムデータ

ベース解析および各遺伝子型代表株を用いた RNA 二次構造予測により本 LNA gapmer の標的配列および二次構造の保存性を調べることにより、異なる遺伝子型の JEV 野外株に対する LNA gapmer の有効性を予測した。最後にアジアにおいて中心的に流行している GI 型および III 型に属する JEV 野外株に対する LNA gapmer の実際の有効性をプラークアッセイにより評価した。

4.2 材料および方法

4.2.1 培養細胞

Vero 細胞およびヒト神経芽細胞腫由来細胞株 (SK-N-SH 細胞: RCB0426) は、理化学研究所バイオリソース研究センター (RIKEN BRC) より得られた。Vero 細胞は 10% 非働化 FBS および 0.5% 抗生物質溶液添加 EMEM 培地を増殖培地として用いて 37°C、5%CO₂ 条件下で培養した。SK-N-SH 細胞は抗生物質を含まない 10% 非働化 FBS 添加 Minimum Essential Medium α (MEM α) 培地 (Wako、製品番号: 137-17215) を増殖培地として用いて 37°C、5%CO₂ 条件下で培養した。細胞の凍結保存には Cell Bunker 2 を用いて -80°C で 8 時間以上冷却した。その後、液体窒素中において凍結細胞を保存した。

4.2.2 日本脳炎ウイルス株

本研究で使用した 5 種類の JEV 株：JaGAr 01 株（GIII 型、accession no. AF069076.1）、J-8-170-B 株（GI 型、accession no. LC777833）、J-8-194-S 株（GI 型、accession no. LC777834）、Mie44-1 株（GIII 型、accession no. LC777831）および AS6 株（GIII 型、accession no. LC777832）は Vero 細胞において 3 回継代した。Vero 細胞を T75 フラスコに播種し、95% confluency 以上になるまで増殖させた。その後 JEV 液を室温で解凍し、2%FBS および 0.5×抗生物質溶液を含む EMEM 培地で 10^{-2} 倍に希釈した。T75 フラスコから培養上清を除去し、1.5 ml の 10^{-2} 倍希釈 JEV 液を接種した。15 分毎に tilting しながら、37°C・5%CO₂ 条件下で 60 分間インキュベートした。T75 フラスコから JEV 液を除去し、2%FBS および 0.5% 抗生物質溶液添加 EMEM 培地を 15 ml 加え、細胞変性効果（Cytopathic effect：CPE）が観察されるまでインキュベートした。CPE が観察された後、培養上清を回収し、2000×g、15 分、室温で遠心した。遠心後、上清を 0.3 ml ずつクライオチューブに分注し、-80°C で保存した。ウイルスストックの力価は MOI を決定するために Vero 細胞を用いたプラークアッセイにより定量した。

4.2.3 JEV RNA 二次構造の予測

SH 53 株（GI 型、accession no. JN381850.1）、FU 株（GII 型、accession no. AF217620.1）、JaGAr 01 株、GP78 株（GIII 型、accession no. AF075723.1）、

JKT6468 株 (GIV 型、accession no. AY184212.1) および Muar 株 (GV 型、accession no. HM596272.1) の完全長ゲノム配列は NCBI GenBank から得られた。得られた JEV 配列の 3'UTR の一部である、10,700 塩基以降において、RNAfold program を用いて 3'UTR のゲノム二次構造を予測した (アクセス日: 2022 年 11 月 29 日)。

4.2.4 トランスフェクション

SK-N-SH 細胞を細胞培養用 24 well plate に 1.4×10^5 個/well で播種した。その後、24 well plate にて 95% confluency になるまで $37^\circ\text{C} \cdot 5\% \text{CO}_2$ 条件下で 72 時間培養した。培養した SK-N-SH 細胞に 0.05 MOI で JEV を感染させた。JEV 希釈液には抗生物質を含まない 2%FBS 添加 MEM α 培地 (維持培地) を用いた。LNA gapmer のトランスフェクションは Lipofectamine RNAiMAX を用いたリポフェクション法により行った。0.05 MOI に調整した JEV 液をそれぞれ 100 μL /well 接種し、15 分毎に tilting しながら $37^\circ\text{C} \cdot 5\% \text{CO}_2$ 条件下で 1 時間インキュベートした。インキュベートの間、Opti-MEM を溶媒として 0.15 から 1.5 μM の LNA gapmer および 3 μL の Lipofectamine RNAiMAX を含む 80 μL の混合溶液を調整した。その後 LNA gapmer を終濃度である 0.05 から 0.5 μM に調整するために抗生物質を含まない 5%FBS 添加 MEM α 培地で 240 μL の容量に 3 倍希釈した。JEV を SK-N-SH 細胞に 1 時間接種した後、各 well に 800 μL の抗生物質を含まない

5%FBS 添加 MEM α 培地を加えた。ウイルス液をアスピレーターで除去後、上記で用意した LNA 溶液 230 μ L を SK-N-SH 細胞に添加し 4 時間処置することで LNA gapmer をトランスフェクションした。トランスフェクション溶液を除去した後、SK-N-SH 細胞を、800 μ L の抗生物質を含まない 5%FBS 添加 MEM α 培地を用いて洗浄し、維持培地で培養した。JaGAr 01 株を培養した上清は感染から 24 時間後 (hpi) に、他の JEV 野外株を培養した上清は感染から 48 hpi に回収しプラークアッセイに用いた。

4.2.5 プラークアッセイ

Vero 細胞を細胞培養用 12 well plate に 2.0×10^5 個/well で播種し、増殖培地中で培養した。増殖培地を除去後、95%以上の confluency の Vero 細胞に維持培地で希釈した 10 倍階段希釈ウイルス培養上清 100 μ L を接種した。15 分毎に tilting しながら $37^\circ\text{C} \cdot 5\% \text{CO}_2$ 条件下で 1 時間感染させた。感染後、細胞を維持培地で洗浄し、1 mL の半流動培地 (1%メチルセルロース、2%FBS および 0.5%抗生物質溶液を含む EMEM 培地) を重層した。72 時間の培養後、細胞を固定するために 500 μ L の 10%中性緩衝ホルマリンを各 well に加え、12 well plate を UV 下で 30 分間静置した。細胞の固定後、細胞を超純水で 3 回洗浄し 0.5%クリスタルバイオレットで染色した。 10^{-3} 倍および 10^{-4} 倍希釈のウイルス培養上清を接種した well のプラーク数を数え、ウイルス力価を PFU/mL として算出し、その平均の値を統計解析に用いた。

4.2.6 遺伝子型別および LNA gapmer 標的領域の確認のためのシーケンス解析

JEV RNA を 4.2.2 で用意した上清から Isogen-LS (NIPPON GENE) および RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出した。抽出した JEV RNA から LNA gapmer 標的、またはエンベロープタンパク質をコードする JEV RNA 配列を PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2 (Takara, Gunma, Japan) を用いて取り扱い説明書に従い増幅した。塩基配列は Azenta Life Sciences (Tokyo, Japan) により決定された。使用したプライマー¹³⁸ は表 4-1 に示す。

4.2.7 リアルタイム RT-qPCR

JEV RNA の相対的発現量は比較 Ct 法を用いて解析した。JaGAr 01 株ゲノム RNA の LNA gapmer 標的領域を増幅するプライマーは Primer3Plus¹³⁹ を用いて LNA gapmer の標的 RNA 配列を挟み込むように設計した (図 4-1)。設計したプライマーセットのうちテンプレート非添加コントロールにおいてヘアピン構造およびダイマー形成などの非特異反応が検出されづらいプライマーセット JaGAr 01_3F および JaGAr 01_3R を本研究に用いた (表 4-1、図 4-2)。宿主細胞におけるリファレンス遺伝子を決定するため、予備的検討として human *GAPDH*、human *HUEL* および human *HPRT* に対して新たに設計したプライマーセットならびに既報において報告されている

human *GAPDH* に対して設計されたプライマーセット¹⁴⁰を用いて、SK-N-SH 細胞におけるこれら遺伝子の mRNA 発現レベルの変動を解析した。その結果、human *HUEL* に対して設計したプライマーセット (HUEL_F および HUEL_R) および既報において報告されている human *GAPDH* を標的としたプライマーセット (GAPDH_2F および GAPDH_2R) が JEV 感染または非感染 SK-N-SH 細胞における Ct 値の変動が少なかったため (図 4-3)、これら 2 組のプライマーセットを候補とした。次にこれらリファレンス遺伝子のプライマーセットおよび JEV RNA 標的プライマーセットが比較 Ct 法に使用できるかを既報の方法に従い確かめた¹⁴¹。すなわち、これらリファレンスおよび JEV RNA に対するプライマーセットの増幅効率がほぼ同一であることを確認した。具体的には、対数変換した階段希釈 RNA 溶液濃度および各プライマーセットの Δ Ct 値をそれぞれ x 軸および y 軸としてグラフを作成し、その対数近似曲線の傾きが 0.1 以下となることで確認した (図 4-4、図 4-5)。最終的に LNA gapmer で処置した細胞における LNA gapmer の条件による Ct 値の変動が比較的小さかったプライマーセット GAPDH_2F および GAPDH_2R を本研究で用いるリファレンスプライマーセットとした (表 4-1)。

細胞は感染から 24 時間後に 24 well plate 1 well あたり 1 mL の TRIzolTM Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いて回収し、使用するまで -80°C で保存した。RNA は RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出した。RNA 濃

度は NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific) を用いて定量し、20 ng/ μ L に標準化した。リアルタイム RT-qPCR は One Step TB Green[®] PrimeScript[™] PLUS RT-PCR Kit (Takara)を用いて duplicate で行われた。反応液量は 2×One Step TB Green RT-PCR Buffer を 12.5 μ L、PrimeScript PLUS RTase Mix を 0.5 μ L、フォワードまたはリバースプライマーを 0.4 μ M、TaKaRa Ex Taq HS Mix を 1.5 μ L および RNA を 2 μ L を含む 25 μ L とした。RT-qPCR は Thermal Cycler Dice[®] Real Time System III (Takara) を用いて 42°C、5 分の逆転写反応および 95°C、10 秒の熱変性に続き、95°C、5 秒および 60°C、30 秒を 40 サイクル行った。

4.2.8 細胞毒性試験

SK-N-SH 細胞は増殖培地を用いて細胞培養用 96 well plate に 0.4×10^5 個/well で播種し、4.2.4 トランスフェクションと同様に 72 時間培養した。次に、上述した 4.2.4 と同じ手順で終濃度 0.05 から 1 μ M の LNA gapmer および 3 μ L の Lipofectamine RNAiMAX の混合溶液を 240 μ L 調整した。SK-N-SH 細胞は 1 well あたり 40 μ L のトランスフェクション混合溶液を用いて 4 時間トランスフェクションされた。トランスフェクション後、細胞を抗生物質を含まない 5%FBS 添加 MEM α 培地で洗浄し、100 μ L の抗生物質を含まない 2%FBS 添加 MEM α 培地で 18 時間培養した。培養後、Cell Counting Kit-8 アッセイ (CCK-8 : Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) を取り

扱い説明書に従い行った。10 μ L の CCK-8 溶液を 96 well plate の各 well に加え、2 時間インキュベートした。吸光度をマイクロプレートリーダーである Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific) を用いて波長 450 nm で測定した。LNA gapmer で処置した細胞の生存率は、LNA gapmer および Lipofectamine RNAiMAX のいずれでも処置していない陰性対照を 100% とした比率で表した。なお、各条件は全て duplicate で実施された。

4.2.9 JEV RNA 標的 LNA gapmer のヒト DNA および RNA に対するオフターゲット効果の解析

ヒトゲノム (Human genome, GRCh38/hg38 (Dec 2013)) およびヒト RNA (RefSeq human RNA release 210 (Jan 2022)) における LNA gapmer 7、8 および 9 ならびにコントロール LNA gapmer 配列に完全に相補的な領域および mismatches またはギャップを含んで相補的な領域の数を GCGenome¹⁴² を用いて解析した (アクセス日: 2022 年 11 月 29 日)。

4.2.10 JEV 野外株における LNA gapmer 標的領域の保存性解析

LNA gapmer 7、8 および 9 が標的とする JEV RNA 配列の野外分離株における保存性を調べるため、Virus Pathogen Resource (ViPR: NIH/NIAID)¹⁴³ および本研究で塩基配列を決定した 4 つの分離株 (J-8-170-B、J-8-194-S、Mie44-1 および AS6 株) を含む JEV 292 株のゲノム RNA 配列を収集し

た。これらの株は G I 型から V 型がそれぞれ 136、3、146、4 および 3 株で構成されていた。LNA gapmer に相補的な JEV RNA 配列の保存性は Clustal Omega プログラム¹⁴⁴を用いて解析した（アクセス日：2022 年 5 月 2 日）。

4.2.11 統計解析

少なくとも 3 回の独立したトランスフェクション実験から得られたデータを平均値およびその標準偏差または標準誤差で表した。統計解析では PFU/mL を正規分布に従うデータにするため対数に変換し、GraphPad Prism 8 を用いて、一元配置分散分析に続き post hoc Tukey-Kramer multiple comparison test を実施した。

リアルタイム RT-qPCR では GraphPad Prism 8 を用いて Student's t-test および一元配置分散分析に続く post hoc Tukey-Kramer multiple comparison test により Δ Ct 値を比較した。

細胞毒性試験では Statcel-the Useful Addin Forms on Excel-4th ed を用いて Shirley-Williams test を行った。

表 4-1 本研究で使用したプライマーの配列と適用

Primer Name	Sequence (5'→3')	Position	Purpose
JE955f	TGYTGGTCGCTCCGGCYTA	955-973	Envelope protein
JE2536r	AAGATGCCACTTCCACAYCTC	2,516-2,536	
JE_LNA_1F	TCCAGGAAGACAGGGTCATC	10,372-10,391	LNA gapmer target region
JE_LNA_1R	CCTGTGTTCTTACTCACCACCAG	10,951-10,973	
JaGAr 01_1F	AGCTGTAGAGGAGGTGGAAGG	10,807-10,827	RT-qPCR
JaGAr 01_1R	TCCAGTCTATCCAGGTG	10,875-10894	
JaGAr 01_2F	TTGACACCTGGGAATAGACTG	10,871-10,891	RT-qPCR
JaGAr 01_2R	ACTCACCACCAGCTACATACTTC	10,940-10,962	
JaGAr 01_3F	CCTGGGAATAGACTGGGAGAT	10,877-10,897	RT-qPCR
JaGAr 01_3R	GTTCTTACTCACCACCAGCTACA	10,946-10,968	
GAPDH_1F	AGGGCTGCTTTTAACTCTGG	NA	RT-qPCR
GAPDH_1R	CATGGGTGGAATCATATTGG	NA	
GAPDH_2F	GCCAGCCGAGCCACAT	NA	RT-qPCR
GAPDH_2R	CTTTACCAGAGTTAAAAGCAGCCC	NA	
HUEL_F	CCTGGAGAATGACCCATCAG	NA	RT-qPCR
HUEL_R	ACAACCTCGCCATCAAATC	NA	
HPRT_F	AGACTTTGCTTTCCTTGGTCAG	NA	RT-qPCR
HPRT_R	TTCGTGGGGTCCTTTTCAC	NA	

塩基位置は JEV JaGAr 01 株のゲノムに基づいている。Y=C または T。NA, Not applicable.

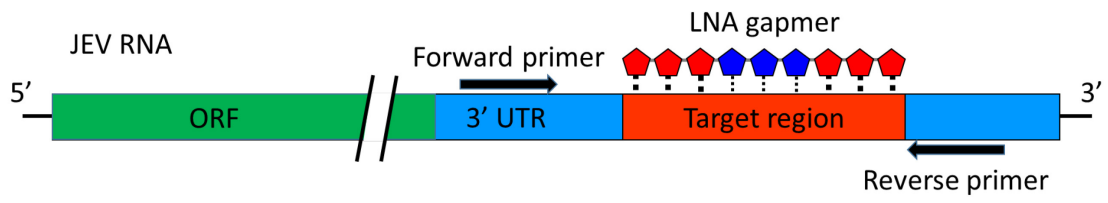


図 4-1 LNA gapmer 標的 JEV RNA 領域の発現レベルを試験するプライマーセットを用いた RT-qPCR の模式図

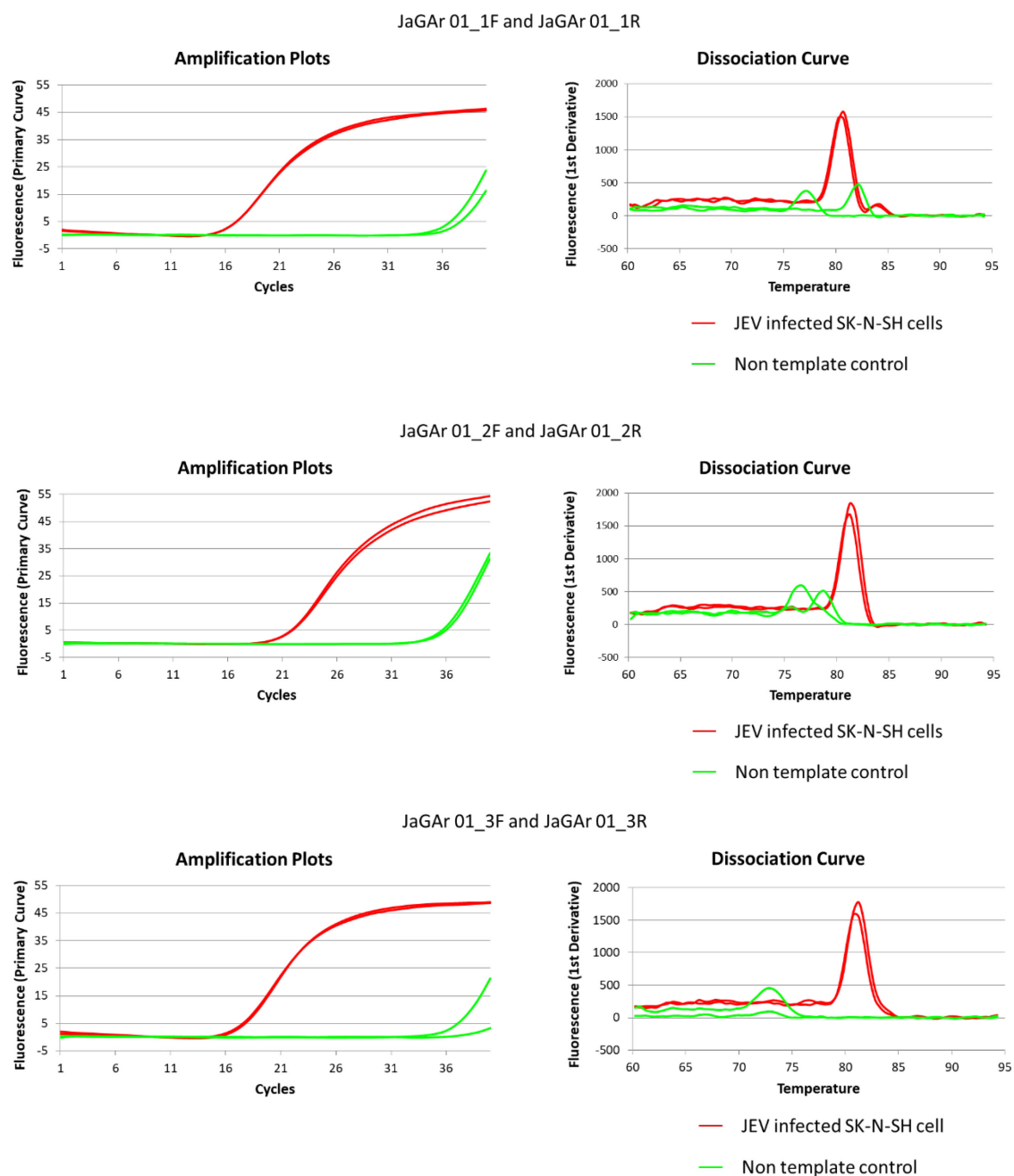
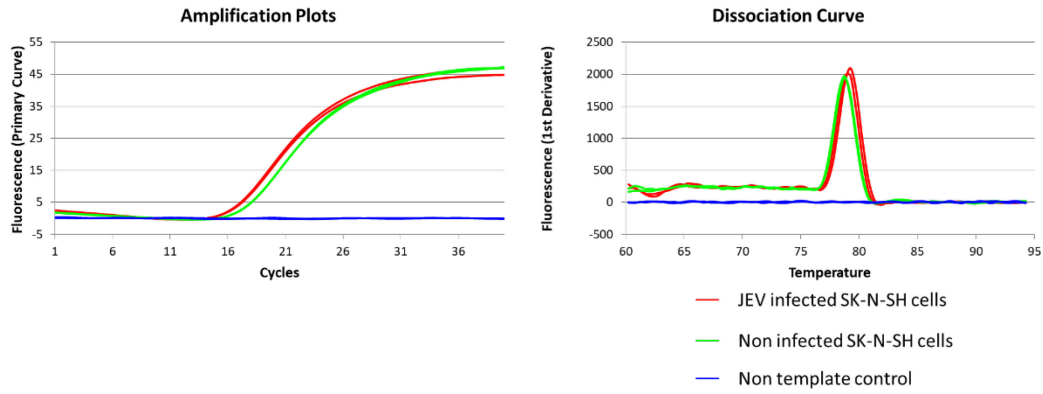


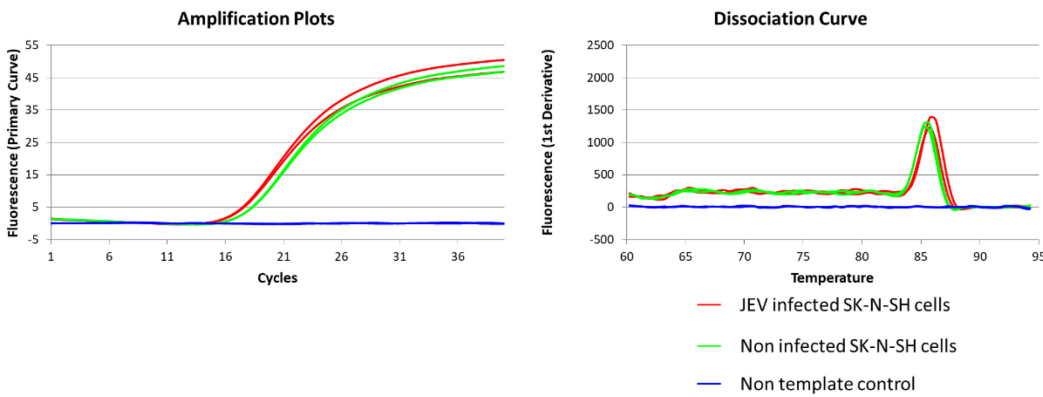
図 4-2 JEV ゲノム標的プライマーセットの増幅曲線および融解曲線

表 4-1 に示した JEV を標的とするプライマーセットである JaGAR 01_1F および JaGAR 01_1R、JaGAR 01_2F および JaGAR 01_2R ならびに JaGAR 01_3F および JaGAR 01_3R を用いて RT-qPCR を行った。鋳型として JEV 感染 SK-N-SH 細胞から抽出した total RNA を用いた。テンプレート非添加コントロールにおいて非特異反応が起こりづらいプライマーセットである JaGAR 01_3F および JaGAR 01_3R を以降の実験で用いた。

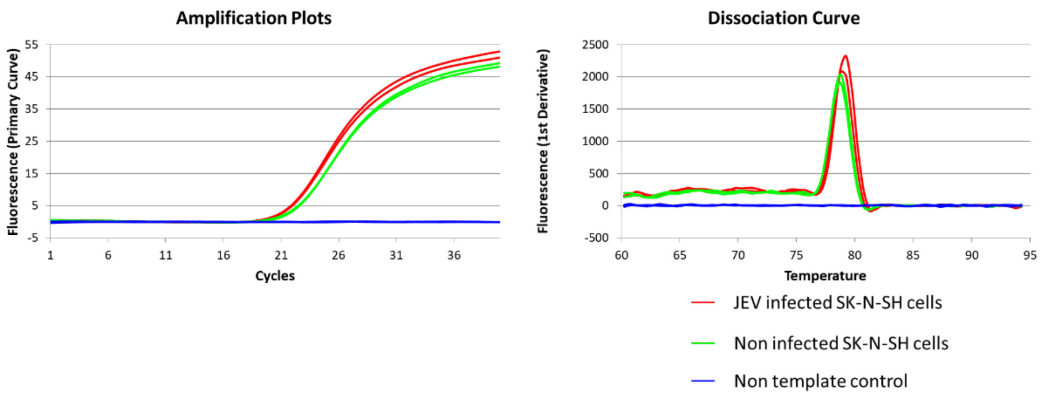
GAPDH_1F and GAPDH_1R



GAPDH_2F and GAPDH_2R



HUEL_F and HUEL_R



HPRT_F and HPRT_R

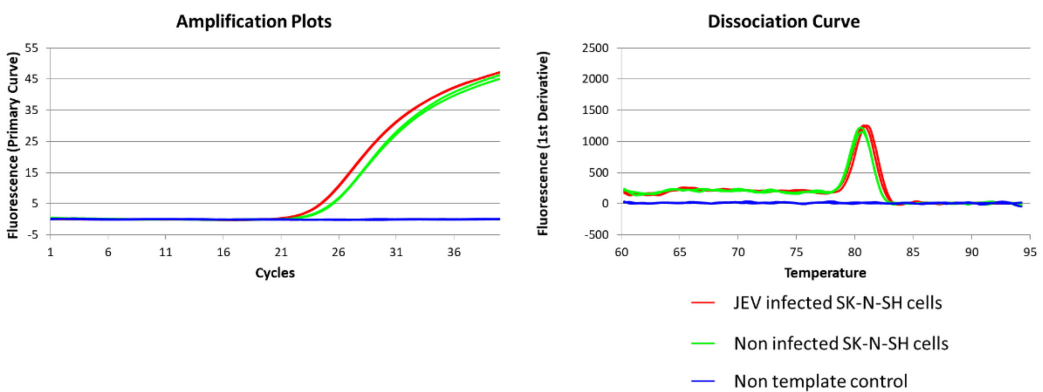


図 4-3 リファレンス mRNA 標的プライマーセットの増幅曲線および融解曲線

表 4-1 に示した、それぞれヒト *GAPDH*、ヒト *HUEL* およびヒト *HPRT* を標的とするプライマーセットである *GAPDH_1F* および *GAPDH_1R*、*GAPDH_2F* および *GAPDH_2R*、*HUEL_F* および *HUEL_R* ならびに *HPRT_F* および *HPRT_R* を用いて RT-qPCR を行った。JEV 感染および JEV 非感染 SK-N-SH 細胞から抽出した total RNA において Ct 値の変動が少なかったプライマーセットである *GAPDH_2F* および *GAPDH_2R* ならびに *HUEL_F* および *HUEL_R* を本研究で用いるリファレンスプライマーセットの候補とした。

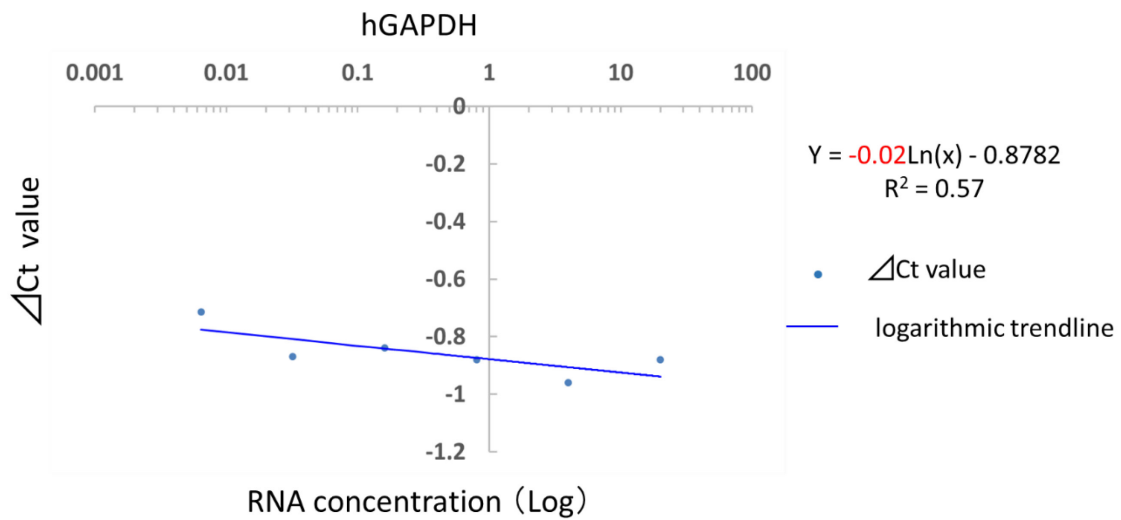


図 4-4 JEV 標的プライマーセットおよびヒト *GAPDH* 標的プライマーセットの増幅効率の確認

JEV 感染 SK-N-SH 細胞由来の RNA 溶液 (20 ng/ μ L) の 5 倍 5 段階希釈系列を鋳型として RT-qPCR を行った。LNA gapmer 切断領域を増幅する JEV 標的プライマーセットおよびリファレンス遺伝子であるヒト *GAPDH* の mRNA を増幅するヒト *GAPDH* 標的プライマーセットによる Ct 値を算出した。 Δ Ct 値は、以下の式で算出した; Δ Ct 値 = JEV RNA 標的プライマーの Ct 値 - ヒト *GAPDH* 標的プライマーの Ct 値。各 RNA 濃度および Δ Ct 値を対数変換し、それぞれ x および y 軸としてグラフを作成した。各 RNA 濃度および Δ Ct 値の対数近似直線の傾きの絶対値が 0.1 以下であることを確認し、 $\Delta\Delta$ Ct 法に使用できるプライマーセットとした。

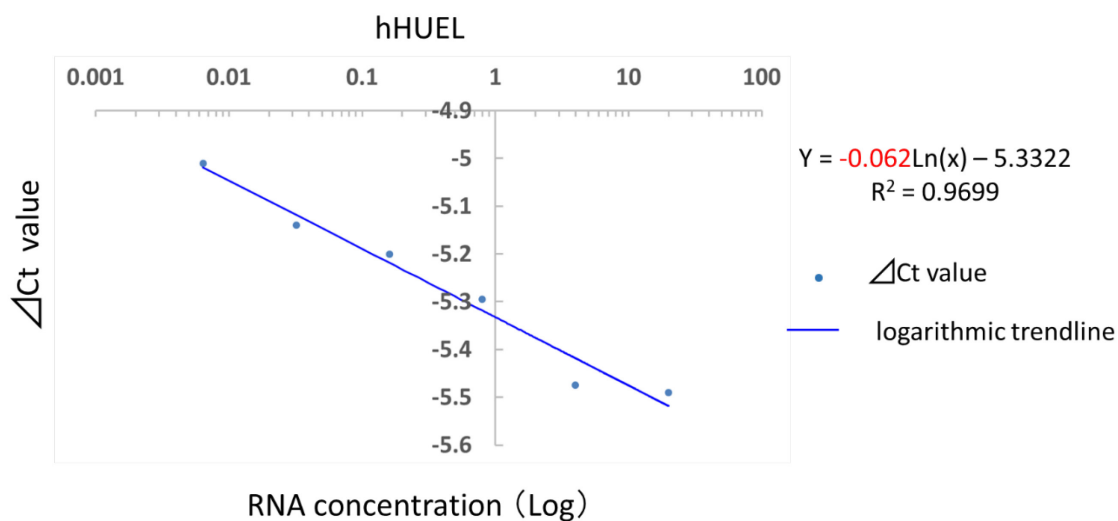


図 4-5 JEV 標的プライマーセットおよびヒト *HUEL* 標的プライマーセットの増幅効率の確認

JEV 感染 SK-N-SH 細胞由来の RNA 溶液 (20 ng/ μ L) の 5 倍 5 段階希釈系列を鋳型として RT-qPCR を行った。LNA gapmer 切断領域を増幅する JEV 標的プライマーセットおよびリファレンス遺伝子であるヒト *HUEL* の mRNA を増幅するヒト *HUEL* 標的プライマーセットによる Ct 値を算出した。 Δ Ct 値は、以下の式で算出した; Δ Ct 値 = JEV RNA 標的プライマーの Ct 値 - ヒト *HUEL* 標的プライマーの Ct 値。各 RNA 濃度および Δ Ct 値を対数変換し、それぞれ x および y 軸としてグラフを作成した。各 RNA 濃度および Δ Ct 値の対数近似直線の傾きの絶対値が 0.1 以下であることを確認し、 $\Delta\Delta$ Ct 法に使用できるプライマーセットとした。

4.3 成績

4.3.1 JEV RNA 標的 LNA gapmer のヒト神経芽細胞腫由来細胞株における抗ウイルス効果

JEV は中枢神経系において主に神経細胞に感染する¹⁴⁵。そこで本研究では、JEV 感染モデルの一つであるヒト神経芽細胞腫株 (SK-N-SH 細胞) を用いて、JEV JaGAr 01 株の増殖に対する LNA gapmer の抗ウイルス効果を試験した。JEV RNA 標的 LNA gapmer は、SK-N-SH 細胞においてコントロール LNA gapmer と比べて効果的に JAGAr 01 株の増殖を抑制した (図 4-6)。LNA gapmer 7 および 8 は最も低い 0.05 μM の濃度で同濃度のコントロール LNA gapmer (平均: 1.3×10^6 PFU/mL) と比べて有意な JEV の増殖抑制を示した (平均: 6.9×10^5 および 5.5×10^5 PFU/mL)。LNA gapmer 7、8 および 9 は JaGAr 01 株感染 SK-N-SH 細胞に対して濃度依存的な抗ウイルス効果を示した。LNA gapmer 濃度を 0.05 μM から 0.5 μM に増加させることでヒト細胞における JEV 増殖に対する抑制効果が有意に増強されることが確認された (平均: $5.5-8.7 \times 10^5$ から $0.8-1.3 \times 10^5$ PFU/mL)。LNA gapmer 7 では、0.25 μM と比べて 0.5 μM で活性が有意に増加していることから、JEV 抑制に対する濃度反応性は他の LNA gapmer と比べて高いことが明らかとなった。興味深いことに、ヒト神経芽細胞腫由来細胞株は第 2 章で示したサルの腎臓から分離された Vero 細胞より LNA gapmer 処置に対して敏感

な反応を示した。すなわち SK-N-SH 細胞と同じ方法で試験した Vero 細胞では 10 倍高い 5 μ M の濃度で同様の効果が観察された (図 2-3)。

次に LNA gapmer が SK-N-SH 細胞において JEV RNA の複製阻害効果を発揮するかを調べるために、LNA gapmer 標的領域を増幅する特異的なプライマーセット (表 4-1) を用いた RT-qPCR により JEV RNA 発現レベルを解析した。解析に使用した RNA は、プラークアッセイ (図 4-6) で用いた JaGAr 01 株感染 SK-N-SH 細胞から抽出された。図 4-7 に示されるように、LNA gapmer 7、8 または 9 による処置は JEV RNA の発現レベルを、同濃度のコントロール LNA gapmer と比べて、0.25 μ M および 0.5 μ M においてそれぞれ 82-94%、88-95% と有意に減少させた。LNA gapmer 8 は JEV RNA 複製において最も高い抑制効果を示した。0.25 μ M で高い効果を示した LNA gapmer 7 および 8 では濃度依存的な効果が観察されなかったが、LNA gapmer 9 では濃度増加に伴う JEV RNA に対する効果の増強が観察された。本章で観察された JEV の RNA 発現レベルの低下がプラークアッセイにより示されたウイルス粒子産生に対する抑制効果と一致していたことは特筆すべきことである (図 4-6)。これらの結果はウイルス RNA 分解を介した LNA gapmer の抗ウイルスメカニズムを支持している。

4.3.2 LNA gapmer の細胞毒性効果

ヒト神経芽細胞腫由来細胞株である SK-N-SH 細胞における LNA gapmer

の細胞毒性を評価するために LNA gapmer のトランスフェクション後の細胞生存率を測定した (図 4-8)。SK-N-SH 細胞は図 4-6 に対して行った方法と同じ方法で LNA gapmer を処置した。Lipofectamine RNAiMAX コントロールと比べて、試験した全ての濃度における 3 種類の LNA gapmer は、1 μ M の LNA gapmer 8 (約 70%) を除いて、細胞生存率を有意に減少しなかった。図 4-6 において示されるように、SK-N-SH 細胞において有意な JEV 増殖抑制効果を示した LNA gapmer 0.05 から 0.5 μ M の範囲では、CCK-8 アッセイにおいて明らかな細胞毒性は検出されなかった。本章で観察された CCK-8 アッセイの結果は LNA gapmer 処置によるウイルス力価の減少が LNA gapmer の細胞毒性による細胞の減少が原因ではないことを支持している。

4.3.3 ヒト RNA に対する LNA gapmer の配列依存的なオフターゲット効果の *in silico* 解析

ヒト DNA および RNA 配列において、特定の配列に相補的な配列を検索するプログラムである GGGenome を用いて JEV RNA 標的 LNA gapmer 配列のヒトゲノム DNA および RNA に結合するオフターゲット効果の可能性を評価した (表 4-2)。本解析では設計した LNA gapmer 配列に完全に相補的なヒト DNA および RNA 配列は存在しないことが明らかとなった。ヒトゲノム DNA において 17 および 16 塩基の LNA gapmer に 1 塩基のミスマッチまたはギャップを含んで相補的な配列はそれぞれ 1 および 4 か所存在

し、これらの配列は *ACBD6*、*HECW1* および非コード DNA 領域に割り当てられていた。一方、ヒト RNA に対する解析では、JEV RNA 標的 LNA gapmer 配列に対して、1 塩基のミスマッチまたはギャップを含んだ相補的なヒト RNA 配列は検出されず、ヒト RNA 配列に相補的にならないように設計したコントロール LNA gapmer と同様の結果が得られた。17 塩基で構成される LNA gapmer (LNA gapmer 7 および 8) ならびに 16 塩基で構成される LNA gapmer (LNA gapmer 9) に対しては、ヒト RNA において 2 ミスマッチまたはギャップを含んで相補的な配列がそれぞれ 10 および 81 か所検出された。これらの検出配列は mRNA、ノンコーディング RNA および miscellaneous RNA を含んでいた。以上の結果より、より長い 17 塩基の LNA gapmer 7 および 8 が 16 塩基の LNA gapmer 9 と比べてヒト RNA に対して副反応として結合する可能性が少ないことが確認された。

4.3.4 抗ウイルス LNA gapmer の JEV 遺伝子 I から V 型に対する有効性の *in silico* 解析による予測

JEV の野外ウイルス株はエンベロープタンパク質コード遺伝子の塩基配列により 5 種類 (I から V 型) の遺伝子型のいずれかに分類される¹⁴⁶。これら 5 種類の遺伝子型はいずれもアジアに分布しており、様々な JEV 野外株に適用できる薬剤の開発が求められている。本 LNA gapmer が有する異なる JEV 野外株に対する有効性を推定するために、ViPR から得られた 288

株および本研究で決定した 4 株の野外株を含む合計 292 株の JEV RNA 配列を収集し、LNA gapmer が標的とする 3'UTR stem-loop 領域の保存性を包括的に解析した (図 4-9)。本解析では、登録済 JEV 株の 98.9% (292 株中 289 株) を占める JEV G I、III、IV および V 型において LNA gapmer 標的 RNA 配列が高度に保存されていることが明らかとなった。LNA gapmer 7 および 8 の標的 JEV RNA 配列は G I、III および IV 型において 97% 以上で完全に保存されていた。また、G I、III、IV および V 型において、LNA gapmer 9 の標的配列の高い保存性 (97% 以上) も確認された。一方、G II 型においては、ViPR から収集可能な検体数が 3 株と少ない中ではあるが、標的配列が完全に保存されている JEV 株はなかった。RNAfold プログラム¹⁴⁷を用いた二次構造予測では、G I から GV それぞれの遺伝子型における代表株において保存された 3'UTR stem-loop 構造が予測された (図 4-10)。本章で観察された保存された塩基配列および二次構造は、本 LNA gapmer の異なる JEV 株に対する幅広い適用性を示唆している。

4.3.5 遺伝子 I 型および III 型に属する異なる JEV 野外株に対する LNA gapmer の抗ウイルス効果

現在 JEV G I 型および III 型はアジアにおいて流行している主要な遺伝子型である。前節で予測された本 LNA gapmer が異なる JEV 野外株に対して適用できる可能性を検証するため、2 株の G I 型 JEV 株 (J-8-170-B 株およ

び J-8-194-S 株)ならびに 2 株の GIII 型 JEV 株 (Mie44-1 株および AS6 株) に対する LNA gapmer の増殖抑制効果を実際に試験した。最初に、シーケンス解析により、これら 4 株のエンベロープタンパク質コード遺伝子に基づいた遺伝子型および LNA gapmer 標的領域の配列保存性を確認した (図 4-11)。本試験では、4.3.2 にて低い細胞毒性を示した LNA gapmer 7 および 9 (図 4-8) の GI 型および GIII 型 JEV 野外株に対する抗ウイルス効果をヒト神経芽細胞腫由来細胞株において解析した (図 4-12)。その結果、コントロール LNA gapmer (平均: 9.4×10^5 - 1.9×10^6 PFU/mL) と比べて、LNA gapmer 7 および 9 は $0.5 \mu\text{M}$ の濃度において、遺伝子型の違いに関わらず、4 株全ての野外株の増殖を有意に抑制した (平均: 4.5×10^4 - 1.2×10^5 PFU/mL)。

表 4-2 GGenome を用いたヒトゲノム DNA または RNA 配列に対する JEV RNA 標的 LNA gapmer の配列依存的なオフターゲット効果の解析

	Number of Regions Complementary to LNA Gapmers			
	0 MM or Gap	1 MM or Gap	2 MMs or Gaps	3 MMs or Gaps
Human genome				
LNA gapmer 7 and 8	0	1	77	4,491
LNA gapmer 9	0	4	287	15,069
Ctrl LNA gapmer 1	0	31	1,626	44,191
Ctrl LNA gapmer 2	0	1	315	15,601
Human RNA				
LNA gapmer 7 and 8	0	0	10	1,673
LNA gapmer 9	0	0	81	5,081
Ctrl LNA gapmer 1	0	0	178	8,291
Ctrl LNA gapmer 2	0	0	59	3,585

数字は LNA gapmer と完全に相補的、または 1、2、3 ミスマッチまたはギャップを含んで相補的な、ヒトゲノム DNA または RNA 配列の数を示している。

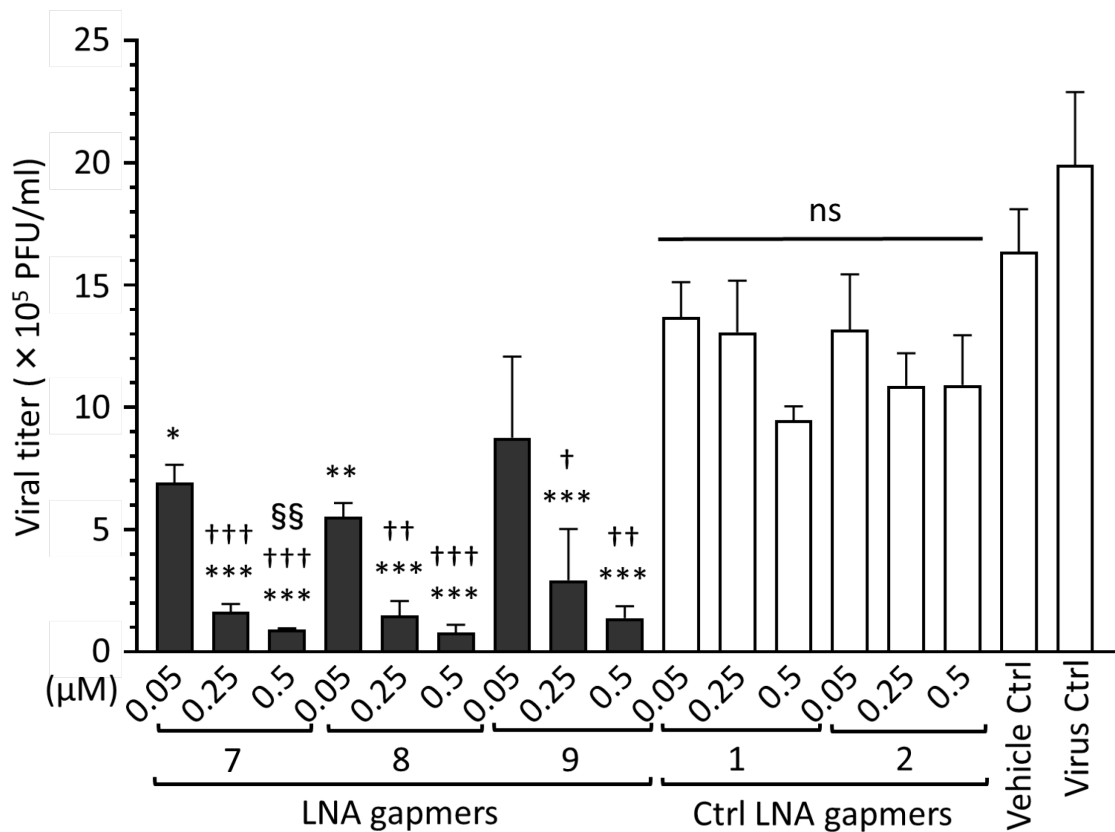


図 4-6 ヒト神経芽細胞腫由来細胞株 (SK-N-SH 細胞) における感染性 JEV 粒子の産生に対する LNA gaper の抗ウイルス活性

0.05 MOI で JEV JaGAR 01 株を 1 時間感染させた後、JEV RNA 標的 LNA gaper (7、8 および 9) またはコントロール LNA gaper (コントロール 1 および 2) をリポフェクションにより処置した。データは少なくとも 3 回の独立した実験から得られた PFU/mL の平均および標準偏差を表している。対数値を用いた統計解析は一元配置分散分析に続く post hoc Tukey-Kramer multiple comparison test により行われた(同濃度のコントロール LNA gaper に対して * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、0.05 μM の同一の LNA gaper に対して † $p < 0.05$ 、†† $p < 0.01$ 、††† $p < 0.001$ 、0.25 μM の同一の LNA gaper に対して §§ $p < 0.01$ 、ns 有意差なし)。

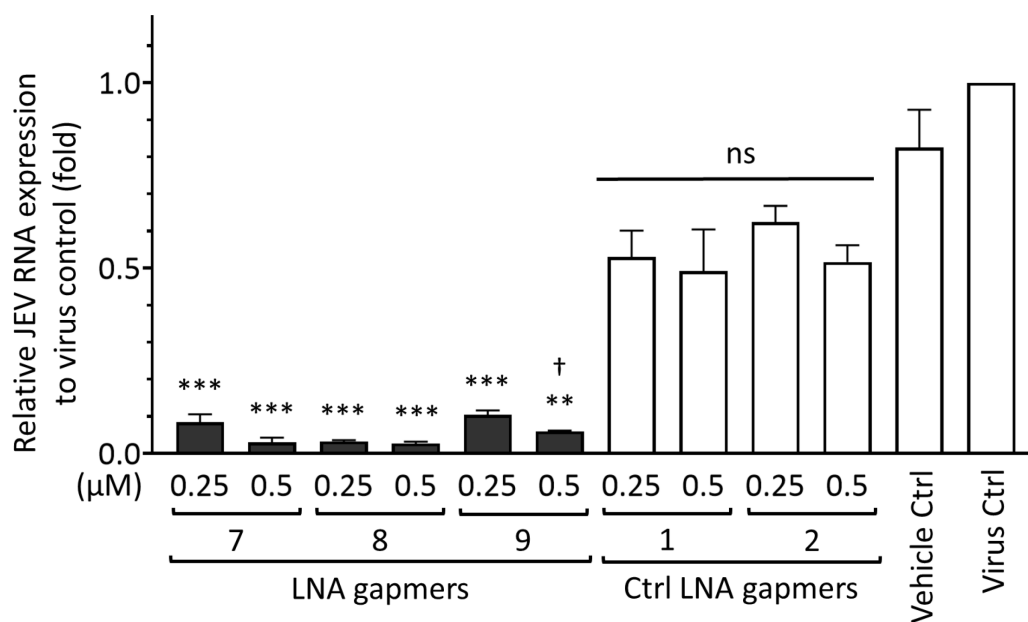


図 4-7 RT-qPCR による LNA gapmer の JEV RNA 複製阻害効果の解析

LNA gapmer の SK-N-SH 細胞における JEV RNA の相対発現レベルは比較 Ct 法を用いた RT-qPCR により測定した。RNA 抽出に供する細胞サンプルはプラークアッセイ (図 4-1) において用いたものと同一のものを使用した。データはウイルスコントロールを基準として算出した RNA 発現レベルの平均および標準誤差 (n=3) で示されている。異なる濃度の LNA gapmer による JEV RNA 発現レベルの抑制効果を比較するために Student's t test を実施した。同濃度の LNA gapmer 間の JEV RNA 発現レベルの抑制効果を比較するために一元配置分散分析に続く post hoc Tukey-Kramer multiple comparison test を実施した (同濃度のコントロール LNA gapmer に対して ** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、0.25 μM の同一の LNA gapmer に対して † $p < 0.05$)。

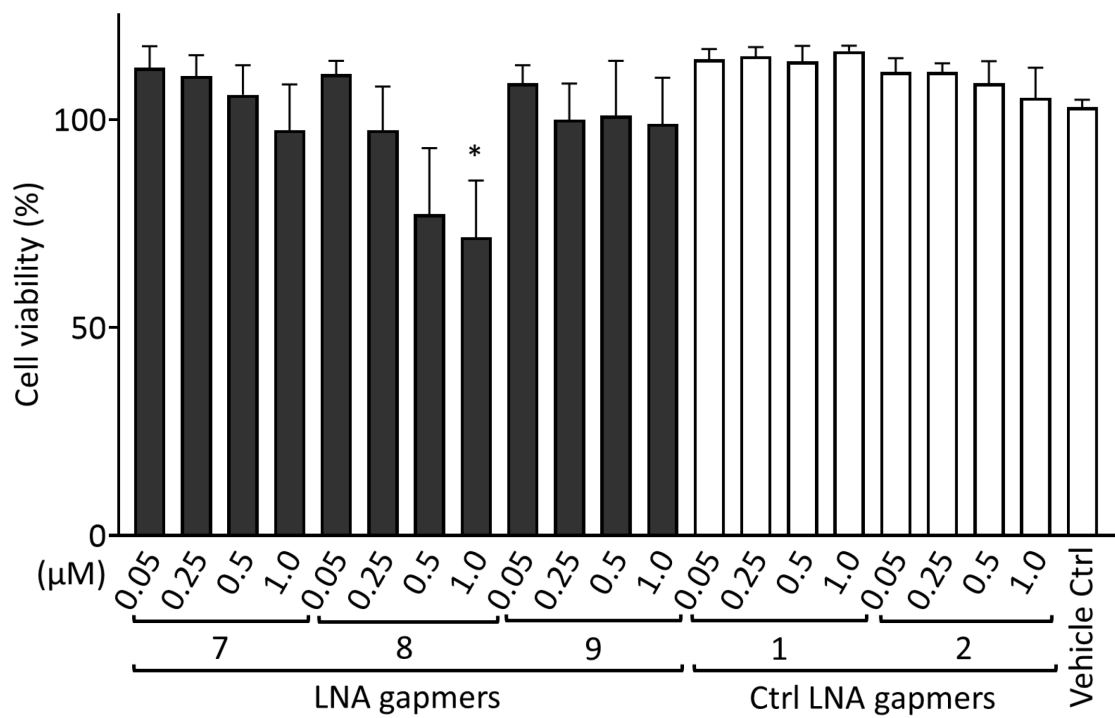


図 4-8 ヒト神経芽細胞腫由来細胞株 SK-N-SH 細胞における LNA gapmer の細胞毒性評価

細胞に 0.05 から 1 μM の異なる濃度の LNA gapmer をトランスフェクションした。JEV 感染を除いた図 4-6 と同じ処置を行った後、CCK-8 アッセイを用いて細胞生存率を測定した。データは 4 回の独立した実験の平均および標準偏差で表されている。統計解析のために Shirley-Williams test が行われた。Lipofectamine RNAiMAX コントロールに対して * $p < 0.05$ 。

	3'-LNA wing	DNA region (RNase H binding site)	LNA wing-5'	% of strains with the perfect match to LNA gapmer sequences		No. of strains
LNA gapmer 7	T C T C	G C G G C T T C A T	A C A	LNA 7 and 8	LNA 9	
LNA gapmer 8	T C T C	G C G G C T T C A T	A C A			
LNA gapmer 9	C T C	G C G G C T T C A T	A C A			
JEV target (5'-3')	A G A G C G	C C G A A G T A T G T				
Genotype I	-T -T -T -	-A -C - - -A - (A) - - -	-A -	97%	97%	136
Genotype II	- - - - -	- - - - - -A -C - - -	- - - -	0%	0%	3
Genotype III	- - - -A - - - -	- - - - -C - - - - -	- - - -	98%	98%	146
Genotype IV	- - - - -	- - - - - - - - - - -	- - - -	100%	100%	4
Genotype V	-C - - - - -	- - - - - - - - - - -	- - - -	33%	100%	3

図 4-9 Virus pathogen resource (ViPR) から得た JEV288 株および本研究で決定した JEV4 株の RNA 配列を用いた LNA gapmer 標的 JEV 3'UTR stem-loop の配列保存性の包括的解析

5 種類の遺伝子型で構成される 292 の JEV 株のゲノム RNA 配列データに対して、LNA gapmer 標的配列の保存性を解析した。JEV target は LNA gapmer が標的とする JEV JaGAr 01 株の 10,932 から 10,948 塩基の RNA ゲノム配列を示している。ダッシュ (-) は JEV target と同じ塩基を示している。スラッシュの次の塩基は複数の JEV 株で認められた置換塩基を示している。括弧内の塩基は挿入塩基である。赤いダッシュと塩基は置換塩基の位置を表している。

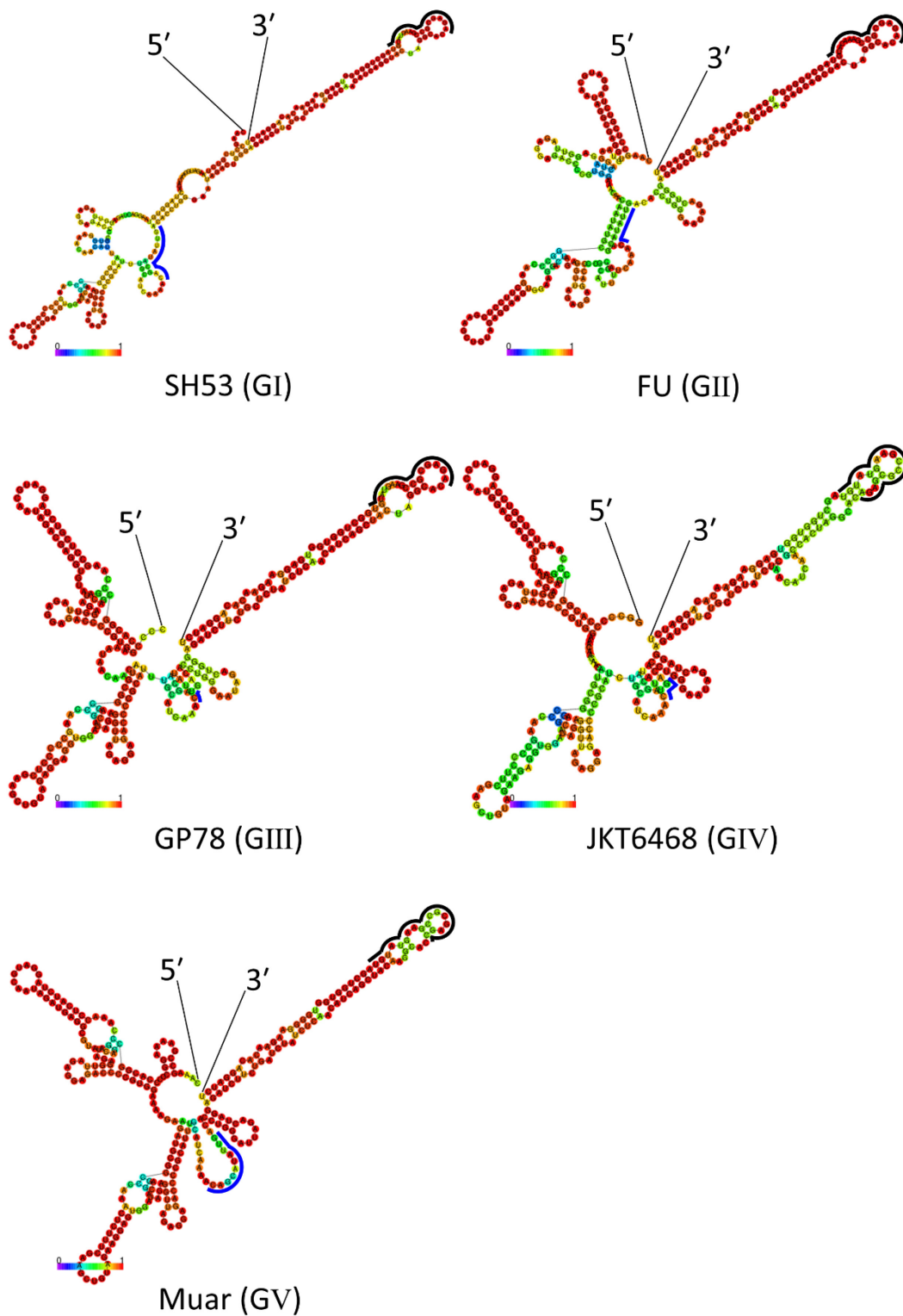


図 4-10 遺伝子 I から V 型 JEV 株の 3'UTR stem-loop 予測構造

JEV各遺伝子型の代表株としてSH 53株(GI型、accession no. JN381850.1)、FU株(GII型、accession no. AF217620.1)、GP78株(GIII型、accession no. AF075723.1)、JKT6468株(GIV型、accession no. AY184212.1)およびMuar株(GV型、accession no. HM596272.1)の部分的な3'UTR(10,700-10,977塩基)のRNA二次構造を、RNAfoldプログラムを用いて予測した。黒線は本研究で設計したLNA gapmerが標的とする3'UTR stem-loop領域を示している。青線は3'UTR CSI領域を示している。二次構造の下部にあるヒートマップの色は塩基ペア形成の確率を表しており、赤に近い程示された二次構造を形成している可能性が高い。

	3'-	LNA wing			DNA region (RNase H binding site)										LNA wing			-5'	
LNA gapmer 7		T	C	T	C	G	C	G	G	C	T	T	C	A	T	A	C	A	
LNA gapmer 9		C	T	C	G	C	G	G	C	T	T	C	A	T	A	C	A		
GI	J-8-170-B	A	G	A	G	C	G	C	C	G	A	A	G	T	A	T	G	T	
	J-8-194-S	A	G	A	G	C	G	C	C	G	A	A	G	T	A	T	G	T	
GIII	JaGAr 01	A	G	A	G	C	G	C	C	G	A	A	G	T	A	T	G	T	
	Mie44-1	A	G	A	G	C	G	C	C	G	A	A	G	T	A	T	G	T	
	AS6	A	G	A	G	C	G	C	C	G	A	A	G	T	A	T	G	T	

図 4-11 本研究で用いた JEV 野外株における LNA gapmer 標的領域の完全な相補性

赤および青の文字は、それぞれ LNA 鎖および DNA 領域に相補的な塩基を示している。

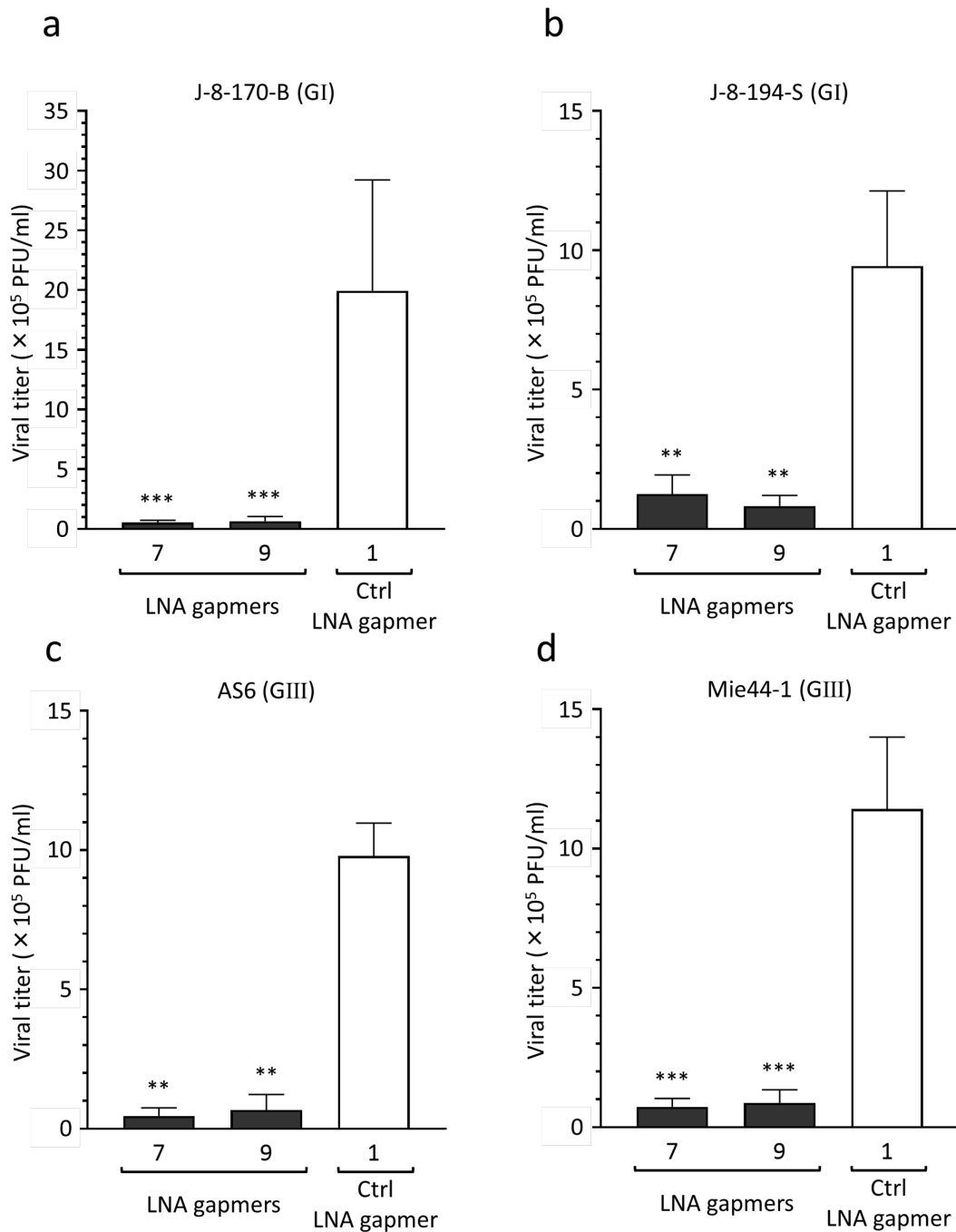


図 4-12 SK-N-SH 細胞における遺伝子 I および III 型 JEV 株の増殖に対する LNA gapmer の抑制効果

SK-N-SH 細胞に感染させた JEV 野外株 (0.05 MOI) に対する LNA gapmer (0.5 μ M) の抗ウイルス効果を Vero 細胞におけるプラークアッセイにより測定し、ウイルス力価を PFU/mL で表した。(a) J-8-170-B (GI 型)、(b) J-8-194-S (GI 型)、(c) Mie44-1 (GIII 型)、(d) AS6 (GIII 型)。データは 3 回の独立した実験の平均および標準偏差で表されている。対数値を用いた統計解析では一元配置分散分析に続く post hoc Tukey-Kramer multiple comparison test を実施した (コントロール LNA gapmer 1 に対して ** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$)。

4.4 考察

主に脳組織において子孫粒子を産生することで病態を発現する JEV に対しては、候補薬物の抗ウイルス活性をヒト神経細胞において試験することは必須である。JEV RNA 標的 ASO の潜在的な抗ウイルス効果は様々な動物細胞で試験されてきているが⁹⁷⁻⁹⁹、ヒト細胞における報告はない。本研究では LNA gapmer が JEV 感染モデルの一つであるヒト神経芽細胞腫由来細胞株である SK-N-SH 細胞において効果的に JEV の増殖を抑制することを実証した。Vero 細胞における試験と同様に、LNA gapmer はヒト SK-N-SH 細胞において濃度依存的に抗ウイルス効果を示した。

一方、Vero 細胞または SK-N-SH 細胞における試験結果の顕著な違いとして、SK-N-SH 細胞における有意な JEV 増殖抑制効果は Vero 細胞において有意な効果を示した 0.5 μM より 10 倍低い 0.05 μM で誘導されたことが挙げられる。この要因の一つとして SK-N-SH 細胞および Vero 細胞における LNA gapmer の細胞取り込み効率が異なることが有意な JEV 増殖抑制効果を示す LNA gapmer 濃度の違いの原因となった可能性が考えられる。生体においては神経系組織に LNA gapmer を送達させるためには血液脳関門を通過させる必要があり、神経系組織への効果的なドラッグデリバリーシステムの開発は本 LNA gapmer の実用化に向けた大きな課題の一つである。LNA gapmer のウイルス感染神経細胞への効果的な送達の理解および改善のため

にはさらなる研究が必要である。

SK-N-SH 細胞における LNA gapmer の JEV 増殖抑制効果は、0.25 μM 以上では顕著な増大は見られず、最大濃度の 0.5 μM においても完全に JEV 粒子の産生を抑制することはできなかった。本実験では、JEV 粒子および 0.5 μM LNA gapmer の分子の数は理論上それぞれ 7.0×10^3 個および 6.9×10^{13} 個であり、LNA gapmer は JEV 粒子数よりはるかに多く細胞へ投与されている。しかし、LNA gapmer の細胞への取り込み効率や細胞内局在、JEV の増殖率を考慮すると、投与された LNA gapmer が全ての JEV RNA に結合し作用したわけではない可能性が考えられる。抗ウイルス LNA gapmer のより高い有効性の追求のために抗ウイルス LNA gapmer の細胞内動態を明らかにする必要がある。一方、これまでに IAV において標的領域の変異による ASO への耐性が報告されているため¹⁴⁸、本 LNA gapmer の処置により耐性 JEV 株が出現する可能性についても検証する必要がある。

核酸医薬の毒性は大きく配列依存的な毒性および配列非依存的な毒性に大別される¹⁴⁹。配列依存的な毒性はさらにオンターゲット効果とオフターゲット効果に分類される。オンターゲット効果は核酸医薬が標的配列を過剰に抑制してしまうことに起因する。オフターゲット効果は非標的配列に対する核酸医薬の作用である。配列非依存的な毒性には、自然免疫系の刺激やタンパク質への結合など核酸以外への作用が含まれる。安全性に関して、本 LNA gapmer は SK-N-SH 細胞において細胞生存率により検出される明らか

な細胞毒性を示さない濃度で JEV の増殖を抑制することが可能であった。本研究において設計した LNA gapmer 8 は最も高い 1 μ M で処置した場合、SK-N-SH 細胞の細胞生存率を有意に減少させたが、SK-N-SH 細胞における LNA gapmer の JEV 増殖抑制は 4 倍低い 0.25 μ M でプラトーに達していた。他の JEV RNA 標的およびコントロール LNA gapmer は、試験したいずれの濃度でも SK-N-SH 細胞において毒性を示さなかった。細胞毒性を示した LNA gapmer 8 および毒性を示さなかった LNA gapmer 7 の違いとして、LNA の組成比と位置が挙げられる。LNA gapmer 8 は LNA gapmer 7 と同一の 17 塩基で構成されているが、5'側の LNA 鎖において LNA を 1 塩基多く含んでおり、3'側の LNA 鎖において 3 塩基の LNA が 1 塩基分 5'側に移動している。マウス生体を用いた研究では、同じ塩基長の LNA gapmer における LNA の組成比の変更が血液生化学検査で異なる程度の肝毒性をもたらすという本結果と類似した副反応が報告されている^{150, 151}。すなわち、本研究における LNA gapmer 7、8 および 9 の細胞毒性の違いは LNA 組成の違いによるオフターゲット効果に起因すると考えられる。LNA および PS 修飾を含む ASO の副反応は肝毒性、腎毒性、神経毒性および血液凝固阻害と関連している¹⁴⁹。上述のように LNA gapmer を含む ASO のこれらの毒性は主に配列依存的な毒性または非依存的な毒性に分類される¹⁴⁹。表 4-2 で示したように、本章のデータベース解析では JEV RNA 標的 LNA gapmer 配列と完全に相補的な、または 1 ミスマッチを含んで相補的なヒト RNA は検出され

なかった。この結果は、本研究の抗ウイルス LNA gapmer は配列依存的なオフターゲット効果を起こす可能性が低いことを示している。一方、結合/配列非依存的な毒性は ASO の化学骨格およびその高暴露臓器への集積に起因するため¹⁴⁹、本 LNA gapmer の結合/配列非依存的な毒性は動物モデルにおいて試験する必要がある。一方、Cell Counting Kit-8 アッセイでは一部の LNA gapmer および全濃度のコントロール LNA gapmer において細胞生存率の増加が認められた。この原因として LNA gapmer の処置により SK-N-SH 細胞の増殖を促進する遺伝子の発現が増加したことなどが考えられる。これまでに、上記で述べられているような LNA gapmer の潜在的な毒性や副反応を防ぐために、複数の設計アルゴリズムおよび安全性評価が提唱されてきている^{149, 152-155}。ウイルスの複製機序や病原性を考慮するとより複雑であるが、細胞由来 RNA を標的とする LNA gapmer に対して開発されたこれらの毒性低減の方法は、本章において GGGenome を用いて示されたようにウイルス RNA 標的 LNA gapmer の設計に適用できる可能性がある。

ASO の安全性に関する問題の一つとして、Toll-like receptor (TLR) を介した ASO の免疫反応の惹起が挙げられる。特に TLR9 は修飾が施されていない連続したシトシンおよびグアニンの配列 (CpG モチーフ) を認識することで免疫反応を引き起こすことが報告されている¹⁵⁶。本研究で開発した LNA gapmer 7、8 および 9 はシトシンおよびグアニンが交互に 4 塩基連続した配列が一か所存在するが、PS 修飾または LNA 修飾が施されているため

TLR9 を介した免疫反応が惹起される可能性は低いと考えられる。加えて ASO における LNA 修飾は TLR9 依存的な免疫反応を減少させることが報告されている¹⁵⁷。ウイルス RNA を標的とする LNA gapmer が免疫反応を惹起する可能性については、種々のサイトカインの測定など詳細な解析が今後必要である。

単一の原因 mRNA により引き起こされるヒトの遺伝病と異なり、ウイルス RNA 標的 LNA gapmer は変異として異なる RNA ゲノム配列が存在する様々な JEV 遺伝子型および野外分離株に対して広域スペクトラム活性を有する必要がある。本研究では当初は JaGAr 01 株および複数のワクチン株の 3'UTR 配列を参考に LNA gapmer を設計した。しかし、その後のウイルスゲノムデータベースおよび本研究で決定した JEV 野外株 RNA 配列を用いた包括的な解析では、stem-loop 領域を標的とする LNA gapmer が登録されているほぼ全ての JEV 株（292 株中 96%）に対して理論的に適用可能であることが明らかとなった。さらに、5 種類の遺伝子型全てにおいて LNA gapmer 標的配列により形成される stem-loop 立体構造は高度に保存されていることが明らかとなった。異なる JEV 遺伝子型および株に対してウイルス RNA 標的療法が広域スペクトラム活性を示す可能性は以前に siRNA¹⁵⁸ およびレンチウイルス small hairpin RNA^{159, 160} において報告されている。しかし、JEV RNA 標的 ASO が広域スペクトラム活性を示す可能性は不明であった。本研究では JEV ゲノム RNA の保存領域を標的とする単一の ASO がアジア

において優勢な G I および III 型の異なる JEV 株に対して適用できることが実証された。一方、G II、IV および V 型の症例は近年増加してきている^{83, 161, 162}。そのような希少な遺伝子型ウイルス株を用いた実証試験は必要であるが、本 LNA gapmer は標的配列の保存性に基づいて、様々な JEV 遺伝子型および株に適用できる治療戦略になることが期待される。いくつかの JEV 株においては標的とする 3'UTR stem-loop 領域は本 LNA gapmer に完全に相補的ではないが、化学的に合成される LNA gapmer 配列はそのような例外株の異なる JEV RNA 配列に柔軟に適応させることができる。LNA gapmer の柔軟性を考慮すると、本研究で試験した 3'UTR stem-loop 領域はフラビウイルス科の異なるウイルス種間で高度に保存されているため^{99, 163}、本 LNA gapmer は YFV、WNV および DENV のようなフラビウイルス科の他の病原性ウイルスに対しても抗ウイルス活性を発揮する可能性がある。

LNA gapmer 療法の JEV 感染症に対する臨床応用に関しては、生体における薬剤の有効性および安全性試験、特に JEV が主に感染する中枢神経系に対する効果的なドラッグデリバリーシステムを確立する必要がある。LNA gapmer を含む ASO 療法開発の主要な課題は血液脳関門を通過して標的である脳に薬剤を送達する効果的な方法を開発することである。LNA gapmer は様々な組織に送達することができるが、脳への送達能が限られていることが課題である¹⁶⁴。脊髄性筋萎縮症に対する ASO 製剤の nusinersen が髄腔内投与を介して臨床応用されているように、髄腔内投与は血液脳関門の課題

を克服するための一つの選択肢となり得る¹⁶⁵。より有望な解決策として、LNA gapmer に脂質リガンドおよび DNA/RNA ヘテロ二本鎖核酸 (Heteroduplex oligonucleotide : HDO) の形態を付与することで、LNA gapmer が血液脳関門を通過し、効果的に脳の神経細胞に到達することを可能にする先進技術が報告されている¹⁶⁶。この中枢神経系へ送達するための手法は日本脳炎患者における臨床用途のために合理的であると考えられる。また、本疾患の感染過程の観点から、JEV の感染の進行により血液脳関門が破壊され、その透過性が増加するため¹⁶⁷、LNA gapmer の静脈投与は特定の臨床段階においては患者の JEV 感染脳に到達し治療効果を示す可能性がある。ヒト細胞における LNA gapmer の最適化と共に、臨床応用への可能性は適切な病態を反映する動物モデルと JEV 株を用いてさらに検討を重ねる必要がある。

4.5 小括

JEV は主に中枢神経系における神経細胞に感染する。本研究では、JEV 感染モデルの一つであるヒト神経芽細胞腫由来細胞株に標準株である JaGAr 01 株を感染させ、LNA gapmer の抗 JEV 効果をプラークアッセイおよびリアルタイム RT-qPCR により解析した。次に LNA gapmer の安全性を確かめるためヒト神経芽細胞腫由来細胞株における LNA gapmer の細胞毒性を、細胞生存率を指標に定量した。また、GGGenome を用いた BLAST 解析により LNA gapmer が意図しないヒト RNA に結合するオフターゲット効果の可能性を調べた。最後にデータベース解析および標準株以外の JEV 野外株を用いた感染実験により、様々な JEV 株に対する LNA gapmer の広域スペクトラム活性を調べた。すなわち、ウイルスゲノムデータベースおよび本研究で決定した JEV 野外株の配列を用いて、292 株の JEV ゲノム RNA 配列に対し、本研究で設計した LNA gapmer 標的領域のアライメント解析を行った。また RNAfold プログラムを用いた RNA 二次構造の予測により各遺伝子型代表株の 3'UTR における stem-loop 領域の RNA 二次構造が保存されていることを確認した。さらにアジアにおいて優勢な GI 型および III 型に属する JEV 野外分離株に対する LNA gapmer の増殖抑制効果を試験した。

JEV JaGAr 01 株を用いたプラークアッセイおよびリアルタイム RT-qPCR により、本 LNA gapmer がヒト神経芽細胞腫由来細胞株に感染した JEV 感

染粒子の増殖および RNA 複製を有意に抑制することが明らかとなった。すなわち、LNA gapmer が JEV RNA を分解することで JEV 増殖抑制効果を発揮していることが示唆された。細胞毒性試験では 1 μ M の LNA gapmer 8 を除き、全ての LNA gapmer は有意な細胞毒性を示さなかった。全ての LNA gapmer はヒト神経芽細胞腫由来細胞株へトランスフェクションした濃度では明らかな細胞毒性が観察されなかったことから、本 LNA gapmer は細胞毒性を示すことなく JEV の増殖を抑制できることが明らかとなった。BLAST 解析では、ヒト RNA 配列中に本 LNA gapmer と完全に相補的な領域および 1 ミスマッチまたはギャップを含んで相補的な領域は見られなかったため、ヒト RNA への配列依存的なオフターゲット効果が生じる可能性が低いことが示された。細胞毒性試験および BLAST 解析の結果はヒト細胞における本 LNA gapmer の安全性を支持している。アライメント解析においては、本 LNA gapmer が標的とする 3'UTR stem-loop 領域は JEV G I、III、IV および V 型において高度 (>97%) に保存されていた。さらに各遺伝子型代表株の 3'UTR の RNA 二次構造を予測したところ、3'UTR stem-loop 構造はいずれの遺伝子型においても保存されていた。アライメント解析および RNA 二次構造予測の結果から、本 LNA gapmer が様々な JEV 株に対して有効性を発揮する可能性が示された。実際に JEV 野外株で本 LNA gapmer の有効性を試験したところ、本 LNA gapmer は G I 型に属する J-8-170-B 株および J-8-194-S 株ならびに G III 型に属する Mie44-1 株および AS6 株の増

殖をヒト神経芽細胞腫由来細胞株において有意に抑制した。

以上の結果より、本 LNA gapmer のヒト神経芽細胞腫由来細胞株における有効性および安全性が明らかとなった。また、本 LNA gapmer が異なる遺伝子型に属する JEV 株および野外 JEV 株に対して広域スペクトラム活性を有する可能性が明らかとなった。

第五章

総括

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。特に本邦で開発された修飾核酸である Locked nucleic acid 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細胞株を用いた感染実験および *in silico* 解析により検証した。

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 (G III 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 (CSI) 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ス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。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 mismatch LNA gapmer および LNA を持たない ASO (all DNA) を設計し、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 mismatch 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、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。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 mismatch 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、プラークアッセイおよび 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。

3. ヒト神経芽細胞腫由来細胞株を用いた 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細胞株 (SK-N-SH 細胞) における JEV 野外株 (GI・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。

プラークアッセイにより、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 から有意に抑制した。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した。細胞毒性試験では、プラー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見込まれた。

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。

謝辞

本研究の遂行に当たり、終始ご指導を賜った日本大学大学院獣医学研究科の伊藤琢也 教授に感謝すると共に、ご助言および本論文のご校閲を賜った同研究科の遠矢幸伸 教授ならびに小川健司 教授に謹んで感謝致します。また、本研究の計画立案から研究手技構築、ならびに実験データの解釈に至るまで多大なるご指導を下さいました日本大学生物資源科学部実験動物学研究室の越後谷裕介 准教授に深謝致します。研究に関する多くのご助言を頂いた岩手大学農学部共同獣医学科獣医寄生虫学研究室の佐藤雪太 教授（元日本大学大学院獣医学研究科 教授）、日本大学生物資源科学部獣医衛生学研究室の瀬川太雄 助教および諸氏、同学部実験動物学研究室の田見彩佳 氏をはじめ諸氏に深く感謝致します。また日本大学生物資源科学部獣医衛生学研究室の故 鈴木由紀 准教授には本研究課題に取り組むきっかけとなるウイルス学への興味を導いて下さいましたことを深く感謝申し上げます。

最後に、四年間にも及ぶ大学院生活を支えてくれた家族に感謝致します。

引用文献

1. Bost, JP, Barriga, H, Holme, MN, Gallud, A, Maugeri, M, Gupta, D, *et al.* (2021). Delivery of Oligonucleotide Therapeutics: Chemical Modifications, Lipid Nanoparticles, and Extracellular Vesicles. *ACS Nano* **15**: 13993-14021.
2. Goverdhan, S, Puntel, M, Xiong, W, Zirger, JM, Barcia, C, Curtin, JF, *et al.* (2005). Regulatable gene expression systems for gene therapy applications: progress and future challenges. *Mol Ther* **12**: 189-211.
3. Yin, W, and Rogge, M (2019). Targeting RNA: A Transformative Therapeutic Strategy. *Clin Transl Sci* **12**: 98-112.
4. Smith, CIE, and Zain, R (2019). Therapeutic Oligonucleotides: State of the Art. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **59**: 605-630.
5. Coutinho, MF, Matos, L, Santos, JI, and Alves, S (2019). RNA Therapeutics: How Far Have We Gone? *Adv Exp Med Biol* **1157**: 133-177.
6. 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子医薬部 (2023). 日米欧のいずれかで承認された核酸医薬品 <https://www.nihs.go.jp/mtgt/pdf/section2-1.pdf>.
7. Moumné, L, Marie, AC, and Crouvezier, N (2022). Oligonucleotide Therapeutics: From Discovery and Development to Patentability. *Pharmaceutics* **14**: 260.
8. Jo, SJ, Chae, SU, Lee, CB, and Bae, SK (2023). Clinical Pharmacokinetics

- of Approved RNA Therapeutics. *Int J Mol Sci* **24**: 746.
9. Tarn, W-Y, Cheng, Y, Ko, S-H, and Huang, L-M (2021). Antisense oligonucleotide-based therapy of viral infections. *Pharmaceutics* **13**: 2015.
 10. Henry, SP, Miner, RC, Drew, WL, Fitchett, J, York-Defalco, C, Rapp, LM, *et al.* (2001). Antiviral activity and ocular kinetics of antisense oligonucleotides designed to inhibit CMV replication. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**: 2646-2651.
 11. Kwoh, TJ (2007). Antisense drug technology: principles, strategies, and applications. In: Crooke, ST (ed). *13 CHAPTER An Overview of the Clinical Safety Experience of First-and Second-Generation Antisense Oligonucleotides*. p 365.
 12. Bennett, CF, Dean, NM, and Monia, BP (1998). Antisense Oligonucleotide. *Advances in Drug Discovery Techniques*. p 173.
 13. Scholz, M, Doerr, HW, and Cinatl, J (2001). Inhibition of cytomegalovirus immediate early gene expression: a therapeutic option? *Antiviral Res* **49**: 129-145.
 14. Beigel, JH, Voell, J, Muñoz, P, Kumar, P, Brooks, KM, Zhang, J, *et al.* (2018). Safety, tolerability, and pharmacokinetics of radavirsen (AVI-7100), an antisense oligonucleotide targeting influenza A M1/M2 translation. *Br J Clin Pharmacol* **84**: 25-34.

15. Heald, AE, Iversen, PL, Saoud, JB, Sazani, P, Charleston, JS, Axtelle, T, *et al.* (2014). Safety and pharmacokinetic profiles of phosphorodiamidate morpholino oligomers with activity against ebola virus and marburg virus: results of two single-ascending-dose studies. *Antimicrob Agents Chemother* **58**: 6639-6647.
16. Yuen, MF, Heo, J, Jang, JW, Yoon, JH, Kweon, YO, Park, SJ, *et al.* (2021). Safety, tolerability and antiviral activity of the antisense oligonucleotide bepirovirsen in patients with chronic hepatitis B: a phase 2 randomized controlled trial. *Nat Med* **27**: 1725-1734.
17. Han, K, Ito, H, Elston, R, Cremer, J, Hood, S, Paff, M, *et al.* (2023). Comparison of Pharmacokinetics of the GalNAc-Conjugated Antisense Oligonucleotide GSK3389404 in Participants with Chronic Hepatitis B Infection across the Asia-Pacific Region. *Antimicrob Agents Chemother* **67**: e0090022.
18. Cheung, TT, Luk, AOY, Zhang, Y, Pavlovic, V, Wat, C, Das, S, *et al.* (2023). A single ascending dose study of single-stranded oligodeoxyribonucleotide RO7062931 in Chinese healthy volunteers. *Clin Transl Sci* **16**: 1272-1282.
19. Vaillant, A (2022). Targeting Subviral Particles: A Critical Step in Achieving HBV Functional Cure but Where Are We with Current Agents in Clinical Development? *Viruses* **14**: 1193.

20. McHutchison, JG, Patel, K, Pockros, P, Nyberg, L, Pianko, S, Yu, RZ, *et al.* (2006). A phase I trial of an antisense inhibitor of hepatitis C virus (ISIS 14803), administered to chronic hepatitis C patients. *J Hepatol* **44**: 88-96.
21. Borgia, G, Maraolo, AE, Buonomo, AR, Scotto, R, and Gentile, I (2016). The therapeutic potential of new investigational hepatitis C virus translation inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs* **25**: 1209-1214.
22. Ryder, NS (2009). Discontinued drugs in 2007: Anti-infectives. *Expert Opin Investig Drugs* **18**: 1-11.
23. Ronca, SE, Ruff, JC, and Murray, KO (2021). A 20-year historical review of West Nile virus since its initial emergence in North America: Has West Nile virus become a neglected tropical disease? *PLoS neglected tropical diseases* **15**: e0009190.
24. Le, B-MJ (2012). West Nile Virus: lessons from outbreaks.
25. Ivanova, G, Arzumanov, AA, Turner, JJ, Reigadas, S, Toulmé, JJ, Brown, DE, *et al.* (2006). Anti-HIV activity of steric block oligonucleotides. *Ann N Y Acad Sci* **1082**: 103-115.
26. Ibrahim, A (2021). Modified comb-shaped antisense oligonucleotides may secure us against many important viral diseases including AIDS.
27. Roberts, TC, Langer, R, and Wood, MJA (2020). Advances in oligonucleotide drug delivery. *Nat Rev Drug Discov* **19**: 673-694.

28. Egli, M, and Manoharan, M (2023). Chemistry, structure and function of approved oligonucleotide therapeutics. *Nucleic Acids Res* **51**: 2529-2573.
29. Liang, XH, Sun, H, Nichols, JG, and Crooke, ST (2017). RNase H1-Dependent Antisense Oligonucleotides Are Robustly Active in Directing RNA Cleavage in Both the Cytoplasm and the Nucleus. *Mol Ther* **25**: 2075-2092.
30. Quemener, AM, Centomo, ML, Sax, SL, and Panella, R (2022). Small drugs, huge impact: The extraordinary impact of antisense oligonucleotides in research and drug development. *Molecules* **27**: 536.
31. Brentari, I, Zadorozhna, M, Denti, MA, and Giorgio, E (2023). RNA therapeutics for neurological diseases. *Br Med Bull* **147**: 50-61.
32. Raal, FJ, Santos, RD, Blom, DJ, Marais, AD, Charng, MJ, Cromwell, WC, *et al.* (2010). Mipomersen, an apolipoprotein B synthesis inhibitor, for lowering of LDL cholesterol concentrations in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* **375**: 998-1006.
33. Mahfouz, M, Maruyama, R, and Yokota, T (2020). Inotersen for the Treatment of Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *Methods Mol Biol* **2176**: 87-98.
34. Esan, O, and Wierzbicki, AS (2020). Volanesorsen in the Treatment of

- Familial Chylomicronemia Syndrome or Hypertriglyceridaemia: Design, Development and Place in Therapy. *Drug Des Devel Ther* **14**: 2623-2636.
35. Witztum, JL, Gaudet, D, Freedman, SD, Alexander, VJ, Digenio, A, Williams, KR, *et al.* (2019). Volanesorsen and Triglyceride Levels in Familial Chylomicronemia Syndrome. *N Engl J Med* **381**: 531-542.
36. Miller, TM, Cudkowicz, ME, Genge, A, Shaw, PJ, Sobue, G, Bucelli, RC, *et al.* (2022). Trial of Antisense Oligonucleotide Tofersen for SOD1 ALS. *N Engl J Med* **387**: 1099-1110.
37. Bege, M, and Borbás, A (2022). Rise and fall of fomivirsen, the first approved gene silencing medicine—A historical review. *Acta Pharmaceutica Hungarica* **92**: 38-44.
38. Pawlotsky, JM, Chevaliez, S, and McHutchison, JG (2007). The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. *Gastroenterology* **132**: 1979-1998.
39. Shen, X, and Corey, DR (2018). Chemistry, mechanism and clinical status of antisense oligonucleotides and duplex RNAs. *Nucleic Acids Res* **46**: 1584-1600.
40. Falzarano, MS, Scotton, C, Passarelli, C, and Ferlini, A (2015). Duchenne muscular dystrophy: from diagnosis to therapy. *Molecules* **20**: 18168-18184.
41. Khvorova, A, and Watts, JK (2017). The chemical evolution of

- oligonucleotide therapies of clinical utility. *Nat Biotechnol* **35**: 238-248.
42. Overby, SJ, Cerro-Herreros, E, Llamusi, B, and Artero, R (2018). RNA-mediated therapies in myotonic dystrophy. *Drug discovery today* **23**: 2013-2022.
43. Bennett, CF, Baker, BF, Pham, N, Swayze, E, and Geary, RS (2017). Pharmacology of Antisense Drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **57**: 81-105.
44. Martín-Pintado, N, Yahyaee-Anzahae, M, Campos-Olivas, R, Noronha, AM, Wilds, CJ, Damha, MJ, *et al.* (2012). The solution structure of double helical arabino nucleic acids (ANA and 2'F-ANA): effect of arabinoses in duplex-hairpin interconversion. *Nucleic Acids Res* **40**: 9329-9339.
45. Min, KL, Viazovkina, E, Galarneau, A, Parniak, MA, and Damha, MJ (2002). Oligonucleotides comprised of alternating 2'-deoxy-2'-fluoro-beta-D-arabinonucleosides and D-2'-deoxyribonucleosides (2'F-ANA/DNA 'altimers') induce efficient RNA cleavage mediated by RNase H. *Bioorg Med Chem Lett* **12**: 2651-2654.
46. Chorzalska, A, Morgan, J, Ahsan, N, Treaba, DO, Olszewski, AJ, Petersen, M, *et al.* (2018). Bone marrow-specific loss of ABI1 induces myeloproliferative neoplasm with features resembling human myelofibrosis. *Blood* **132**: 2053-2066.
47. Takahashi, M, Li, H, Zhou, J, Chomchan, P, Aishwarya, V, Damha, MJ, *et*

- al.* (2019). Dual Mechanisms of Action of Self-Delivering, Anti-HIV-1 FANA Oligonucleotides as a Potential New Approach to HIV Therapy. *Mol Ther Nucleic Acids* **17**: 615-625.
48. Salinas, JC, Migawa, MT, Merner, BL, and Hanessian, S (2014). Alternative syntheses of (S)-cEt-BNA: a key constrained nucleoside component of bioactive antisense gapmer sequences. *J Org Chem* **79**: 11651-11660.
49. Xu, H, Tong, X, Mugundu, G, Scott, ML, Cook, C, Arfvidsson, C, *et al.* (2019). Population pharmacokinetic analysis of danvatirsen supporting flat dosing switch. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* **46**: 65-74.
50. Qiao, Y, Wotring, JW, Zhang, CJ, Jiang, X, Xiao, L, Watt, A, *et al.* (2023). Antisense oligonucleotides to therapeutically target SARS-CoV-2 infection. *PLoS One* **18**: e0281281.
51. Moulton, JD (2017). Using Morpholinos to Control Gene Expression. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem* **68**: 4.30.31-34.30.29.
52. Nan, Y, and Zhang, YJ (2018). Antisense Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers as Novel Antiviral Compounds. *Front Microbiol* **9**: 750.
53. Siddiquee, S, Rovina, K, and Azriah, A (2015). A review of peptide nucleic acid. *Adv Tech Biol Med* **3**: 1-10.
54. Singh, KR, Sridevi, P, and Singh, RP (2020). Potential applications of peptide nucleic acid in biomedical domain. *Eng Rep* **2**: e12238.

55. Wang, F, Li, P, Chu, HC, and Lo, PK (2022). Nucleic Acids and Their Analogues for Biomedical Applications. *Biosensors (Basel)* **12**.
56. Obika, S, Nanbu, D, Hari, Y, Morio, K-i, In, Y, Ishida, T, *et al.* (1997). Synthesis of 2' -O, 4' -C-methyleneuridine and-cytidine. Novel bicyclic nucleosides having a fixed C3,-endo sugar pucker. *Tetrahedron Letters* **38**: 8735-8738.
57. Hagedorn, PH, Persson, R, Funder, ED, Albæk, N, Diemer, SL, Hansen, DJ, *et al.* (2018). Locked nucleic acid: modality, diversity, and drug discovery. *Drug Discov Today* **23**: 101-114.
58. Touznik, A, Maruyama, R, Hosoki, K, Echigoya, Y, and Yokota, T (2017). LNA/DNA mixmer-based antisense oligonucleotides correct alternative splicing of the SMN2 gene and restore SMN protein expression in type 1 SMA fibroblasts. *Sci Rep* **7**: 3672.
59. Gallo Cantafio, ME, Nielsen, BS, Mignogna, C, Arbitrio, M, Botta, C, Frandsen, NM, *et al.* (2016). Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of a 13-mer LNA-inhibitor-miR-221 in Mice and Non-human Primates. *Mol Ther Nucleic Acids* **5**.
60. Wang, F, Li, P, Chu, HC, and Lo, PK (2022). Nucleic acids and their analogues for biomedical applications. *Biosensors* **12**: 93.
61. Janssen, HL, Reesink, HW, Lawitz, EJ, Zeuzem, S, Rodriguez-Torres, M,

- Patel, K, *et al.* (2013). Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med* **368**: 1685-1694.
62. Witten, L, and Slack, FJ (2020). miR-155 as a novel clinical target for hematological malignancies. *Carcinogenesis* **41**: 2-7.
63. ALIGOS THERAPEUTICS (2023). Aligos Discontinues Development of its Antisense Oligonucleotide Drug Candidate ALG-020572 in Subjects with Chronic Hepatitis B and Pivots Internal Strategic Emphasis to its Small Molecule Portfolio <https://investor.aligos.com/news-releases/news-release-details/aligos-discontinues-development-its-antisense-oligonucleotide>.
64. Pfeiffer, N, Voykov, B, Renieri, G, Bell, K, Richter, P, Weigel, M, *et al.* (2017). First-in-human phase I study of ISTH0036, an antisense oligonucleotide selectively targeting transforming growth factor beta 2 (TGF- β 2), in subjects with open-angle glaucoma undergoing glaucoma filtration surgery. *PLoS One* **12**: e0188899.
65. Bianchini, D, Omlin, A, Pezaro, C, Lorente, D, Ferraldeschi, R, Mukherji, D, *et al.* (2013). First-in-human Phase I study of EZN-4176, a locked nucleic acid antisense oligonucleotide to exon 4 of the androgen receptor mRNA in patients with castration-resistant prostate cancer. *Br J Cancer* **109**: 2579-2586.

66. Louten, J (2016). Virus replication. *Essential human virology*: 49.
67. Hegde, S, Tang, Z, Zhao, J, and Wang, J (2021). Inhibition of SARS-CoV-2 by Targeting Conserved Viral RNA Structures and Sequences. *Front Chem* **9**: 802766.
68. Le, TK, Paris, C, Khan, KS, Robson, F, Ng, W-L, and Rocchi, P (2021). Nucleic acid-based technologies targeting coronaviruses. *Trends in Biochemical Sciences* **46**: 351-365.
69. Zhu, C, Lee, JY, Woo, JZ, Xu, L, Nguyenla, X, Yamashiro, LH, *et al.* (2022). An intranasal ASO therapeutic targeting SARS-CoV-2. *Nat Commun* **13**: 4503.
70. Hagey, RJ, Elazar, M, Pham, EA, Tian, S, Ben-Avi, L, Bernardin-Souibgui, C, *et al.* (2022). Programmable antivirals targeting critical conserved viral RNA secondary structures from influenza A virus and SARS-CoV-2. *Nat Med* **28**: 1944-1955.
71. Lulla, V, Wandel, MP, Bandyra, KJ, Ulferts, R, Wu, M, Dendooven, T, *et al.* (2021). Targeting the conserved stem loop 2 motif in the SARS-CoV-2 genome. *J Virol* **95**: e00663-00621.
72. Dhorne-Pollet, S, Fitzpatrick, C, Da Costa, B, Bourgon, C, Eléouët, JF, Meunier, N, *et al.* (2022). Antisense oligonucleotides targeting ORF1b block replication of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-

- CoV-2). *Front Microbiol* **13**: 915202.
73. Szczesniak, I, Baliga-Gil, A, Jarmolowicz, A, Soszynska-Jozwiak, M, and Kierzek, E (2023). Structural and Functional RNA Motifs of SARS-CoV-2 and Influenza A Virus as a Target of Viral Inhibitors. *Int J Mol Sci* **24**: 1232.
74. Veedu, RN, and Wengel, J (2009). Locked nucleic acid as a novel class of therapeutic agents. *RNA Biol* **6**: 321-323.
75. Lim, KRQ, Maruyama, R, Echigoya, Y, Nguyen, Q, Zhang, A, Khawaja, H, *et al.* (2020). Inhibition of DUX4 expression with antisense LNA gapmers as a therapy for facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**: 16509-16515.
76. Maruyama, R, Nguyen, Q, Roshmi, RR, Touznic, A, and Yokota, T (2022). Allele-Selective LNA Gapmers for the Treatment of Fibrodysplasia Ossificans Progressiva Knock Down the Pathogenic ACVR1R206H Transcript and Inhibit Osteogenic Differentiation. *Nucleic Acid Ther* **32**: 185-193.
77. Stepniak-Konieczna, E, Konieczny, P, Cywoniuk, P, Dluzewska, J, and Sobczak, K (2020). AON-induced splice-switching and DMPK pre-mRNA degradation as potential therapeutic approaches for Myotonic Dystrophy type 1. *Nucleic Acids Res* **48**: 2531-2543.
78. Vora, SM, Fontana, P, Mao, T, Leger, V, Zhang, Y, Fu, TM, *et al.* (2022).

- Targeting stem-loop 1 of the SARS-CoV-2 5' UTR to suppress viral translation and Nsp1 evasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **119**: e2117198119.
79. Zhu, L, Bi, J, Zheng, L, Zhao, Q, Shu, X, Guo, G, *et al.* (2018). In vitro inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication by short antisense oligonucleotides with locked nucleic acid modification. *BMC veterinary research* **14**: 1-10.
80. Turtle, L, and Solomon, T (2018). Japanese encephalitis - the prospects for new treatments. *Nat Rev Neurol* **14**: 298-313.
81. Wu, B, Qi, Z, and Qian, X (2023). Recent Advancements in Mosquito-Borne Flavivirus Vaccine Development. *Viruses* **15**: 813.
82. Howard-Jones, AR, Pham, D, Jeoffreys, N, Eden, JS, Hueston, L, Kesson, AM, *et al.* (2022). Emerging Genotype IV Japanese Encephalitis Virus Outbreak in New South Wales, Australia. *Viruses* **14**.
83. Gao, X, Liu, H, Li, X, Fu, S, Cao, L, Shao, N, *et al.* (2019). Changing Geographic Distribution of Japanese Encephalitis Virus Genotypes, 1935-2017. *Vector Borne Zoonotic Dis* **19**: 35-44.
84. Hasegawa, H, Yoshida, M, Fujita, S, and Kobayashi, Y (1994). Comparison of structural proteins among antigenically different Japanese encephalitis virus strains. *Vaccine* **12**: 841-844.
85. Li, MH, Fu, SH, Chen, WX, Wang, HY, Cao, YX, and Liang, GD (2014).

- Molecular characterization of full-length genome of Japanese encephalitis virus genotype V isolated from Tibet, China. *Biomed Environ Sci* **27**: 231-239.
86. Li, MH, Fu, SH, Chen, WX, Wang, HY, Guo, YH, Liu, QY, *et al.* (2011). Genotype v Japanese encephalitis virus is emerging. *PLoS Negl Trop Dis* **5**: e1231.
87. Lee, AR, Song, JM, and Seo, SU (2022). Emerging Japanese Encephalitis Virus Genotype V in Republic of Korea. *J Microbiol Biotechnol* **32**: 955-959.
88. Kim, H, Cha, G-W, Jeong, YE, Lee, W-G, Chang, KS, Roh, JY, *et al.* (2015). Detection of Japanese encephalitis virus genotype V in *Culex orientalis* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in Korea. *PLoS One* **10**: e0116547.
89. 感染症流行予測調査グラフ (2023). 感染症流行予測調査グラフ - 厚生労働省-戸山研究庁舎 <https://www.niid.go.jp/niid/ja/y-graphs/667-yosoku-graph.html>.
90. Srivastava, KS, Jeswani, V, Pal, N, Bohra, B, Vishwakarma, V, Bapat, AA, *et al.* (2023). Japanese Encephalitis Virus: An Update on the Potential Antivirals and Vaccines. *Vaccines (Basel)* **11**: 742.
91. Maeki, T, Tajima, S, Kyaw, AK, Matsumoto, F, Miura, K, Yamashita, A, *et al.* (2018). Comparison of Neutralizing Antibody Titers against Japanese Encephalitis Virus Genotype V Strain with Those against Genotype I and III

- Strains in the Sera of Japanese Encephalitis Patients in Japan in 2016. *Jpn J Infect Dis* **71**: 360-364.
92. IDWR 速報データ (2023). 国立感染症研究所 IDWR 速報データ 2022 年第 52 週 <https://www.niid.go.jp/niid/ja/data/11740-idwr-sokuho-data-j-2252.html>.
 93. 発生動向調査年別一覧, 国 (2023). 国立感染症研究所 発生動向調査年別一覧 (全数把握) <https://www.niid.go.jp/niid/ja/ydata/11529-report-ja2021-20.html>.
 94. 感染症発生動向調査 (IDWR) , 国 (2023). 国立感染症研究所 感染症発生動向調査 (IDWR) <https://www.niid.go.jp/niid/ja/diseases/na/je.html>.
 95. Qian, X, and Qi, Z (2022). Mosquito-Borne Flaviviruses and Current Therapeutic Advances. *Viruses* **14**: 1226.
 96. Liu, H, Zhang, J, Niu, Y, and Liang, G (2021). The 5' and 3' Untranslated Regions of the Japanese Encephalitis Virus (JEV): Molecular Genetics and Higher Order Structures. *Front Microbiol* **12**: 730045.
 97. Anantpadma, M, Stein, DA, and Vрати, S (2010). Inhibition of Japanese encephalitis virus replication in cultured cells and mice by a peptide-conjugated morpholino oligomer. *J Antimicrob Chemother* **65**: 953-961.
 98. Nazmi, A, Dutta, K, and Basu, A (2010). Antiviral and neuroprotective role of octaguanidinium dendrimer-conjugated morpholino oligomers in

- Japanese encephalitis. *PLoS Negl Trop Dis* **4**: e892.
99. Yoo, JS, Kim, CM, Kim, JH, Kim, JY, and Oh, JW (2009). Inhibition of Japanese encephalitis virus replication by peptide nucleic acids targeting cis-acting elements on the plus- and minus-strands of viral RNA. *Antiviral Res* **82**: 122-133.
100. Hui, RW, Mak, LY, Seto, WK, and Yuen, MF (2022). RNA interference as a novel treatment strategy for chronic hepatitis B infection. *Clin Mol Hepatol* **28**: 408-424.
101. Cholongitas, E, and Papatheodoridis, GV (2008). Review article: novel therapeutic options for chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther* **27**: 866-884.
102. SAREPTA THERAPEUTICS (2006). AVI BioPharma Announces Positive Clinical Trial Results Delivering NEUGENE Antisense Drugs to the Central Nervous System <https://investorrelations.sarepta.com/news-releases/news-release-details/avi-biopharma-announces-positive-clinical-trial-results>.
103. Arora, V, Devi, GR, and Iversen, PL (2004). Neutrally charged phosphorodiamidate morpholino antisense oligomers: uptake, efficacy and pharmacokinetics. *Curr Pharm Biotechnol* **5**: 431-439.
104. Javanbakht, H, Mueller, H, Walther, J, Zhou, X, Lopez, A, Pattupara, T, et

- al.* (2018). Liver-Targeted Anti-HBV Single-Stranded Oligonucleotides with Locked Nucleic Acid Potently Reduce HBV Gene Expression In Vivo. *Mol Ther Nucleic Acids* **11**: 441-454.
105. Yu, Y, Schneider, WM, Kass, MA, Michailidis, E, Acevedo, A, Pamplona Mosimann, AL, *et al.* (2023). An RNA-based system to study hepatitis B virus replication and evaluate antivirals. *Sci Adv* **9**: eadg6265.
106. Martínez-Montero, S, Rajwanshi, VK, Pandey, RK, De Costa, NTS, Hong, J, Beigelman, L, *et al.* (2023). New Oligonucleotide 2'-O-Alkyl N3'→P5' (Thio)-Phosphoramidates as Potent Antisense Agents: Physicochemical Properties and Biological Activity. *Nucleic Acid Ther* **33**: 319-328.
107. Laxton, C, Brady, K, Moschos, S, Turnpenny, P, Rawal, J, Pryde, DC, *et al.* (2011). Selection, optimization, and pharmacokinetic properties of a novel, potent antiviral locked nucleic acid-based antisense oligomer targeting hepatitis C virus internal ribosome entry site. *Antimicrob Agents Chemother* **55**: 3105-3114.
108. Mutso, M, Nikonov, A, Pihlak, A, Žusinaite, E, Viru, L, Selyutina, A, *et al.* (2015). RNA Interference-Guided Targeting of Hepatitis C Virus Replication with Antisense Locked Nucleic Acid-Based Oligonucleotides Containing 8-oxo-dG Modifications. *PLoS One* **10**: e0128686.
109. Dauksaite, V, Tas, A, Wachowius, F, Spruit, A, van Hemert, MJ, Snijder, EJ,

- et al.* (2023). Highly Potent Antisense Oligonucleotides Locked Nucleic Acid Gappers Targeting the SARS-CoV-2 RNA Genome. *Nucleic Acid Ther.*
110. Jayasinghe, MK, Gao, C, Yap, G, Yeo, BZJ, Vu, LT, Tay, DJW, *et al.* (2023). Red Blood Cell-Derived Extracellular Vesicles Display Endogenous Antiviral Effects and Enhance the Efficacy of Antiviral Oligonucleotide Therapy. *ACS Nano* **17**: 21639-21661.
111. Knizhnik, E, Chumakov, S, Svetlova, J, Pavlova, I, Khodarovich, Y, Brylev, V, *et al.* (2023). Unwinding the SARS-CoV-2 Ribosomal Frameshifting Pseudoknot with LNA and G-Clamp-Modified Phosphorothioate Oligonucleotides Inhibits Viral Replication. *Biomolecules* **13**.
112. Jakobsen, MR, Haasnoot, J, Wengel, J, Berkhout, B, and Kjems, J (2007). Efficient inhibition of HIV-1 expression by LNA modified antisense oligonucleotides and DNazymes targeted to functionally selected binding sites. *Retrovirology* **4**: 29.
113. Kinney, RM, Huang, CY, Rose, BC, Kroeker, AD, Dreher, TW, Iversen, PL, *et al.* (2005). Inhibition of dengue virus serotypes 1 to 4 in vero cell cultures with morpholino oligomers. *J Virol* **79**: 5116-5128.
114. Holden, KL, Stein, DA, Pierson, TC, Ahmed, AA, Clyde, K, Iversen, PL, *et al.* (2006). Inhibition of dengue virus translation and RNA synthesis by a morpholino oligomer targeted to the top of the terminal 3' stem-loop

- structure. *Virology* **344**: 439-452.
115. Stein, DA, Huang, CY, Silengo, S, Amantana, A, Crumley, S, Blouch, RE, *et al.* (2008). Treatment of AG129 mice with antisense morpholino oligomers increases survival time following challenge with dengue 2 virus. *J Antimicrob Chemother* **62**: 555-565.
116. Phumesin, P, Junking, M, Panya, A, Yongpitakwattana, P, Noisakran, S, Limjindaporn, T, *et al.* (2019). Inhibition of dengue virus replication in monocyte-derived dendritic cells by vivo-morpholino oligomers. *Virus Res* **260**: 123-128.
117. Alt, M, Renz, R, Hofschneider, PH, and Caselmann, WH (1997). Core specific antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides as potent and specific inhibitors of hepatitis C viral translation. *Arch Virol* **142**: 589-599.
118. Alt, M, Eisenhardt, S, Serwe, M, Renz, R, Engels, JW, and Caselmann, WH (1999). Comparative inhibitory potential of differently modified antisense oligodeoxynucleotides on hepatitis C virus translation. *Eur J Clin Invest* **29**: 868-876.
119. McCaffrey, AP, Meuse, L, Karimi, M, Contag, CH, and Kay, MA (2003). A potent and specific morpholino antisense inhibitor of hepatitis C translation in mice. *Hepatology* **38**: 503-508.
120. Nulf, CJ, and Corey, D (2004). Intracellular inhibition of hepatitis C virus

- (HCV) internal ribosomal entry site (IRES)-dependent translation by peptide nucleic acids (PNAs) and locked nucleic acids (LNAs). *Nucleic Acids Res* **32**: 3792-3798.
121. Alotte, C, Martin, A, Caldarelli, SA, Di Giorgio, A, Condom, R, Zoulim, F, *et al.* (2008). Short peptide nucleic acids (PNA) inhibit hepatitis C virus internal ribosome entry site (IRES) dependent translation in vitro. *Antiviral Res* **80**: 280-287.
122. Tuplin, A, Struthers, M, Cook, J, Bentley, K, and Evans, DJ (2015). Inhibition of HCV translation by disrupting the structure and interactions of the viral CRE and 3' X-tail. *Nucleic Acids Res* **43**: 2914-2926.
123. Deas, TS, Binduga-Gajewska, I, Tilgner, M, Ren, P, Stein, DA, Moulton, HM, *et al.* (2005). Inhibition of flavivirus infections by antisense oligomers specifically suppressing viral translation and RNA replication. *J Virol* **79**: 4599-4609.
124. Torrence, PF, Gupta, N, Whitney, C, and Morrey, JD (2006). Evaluation of synthetic oligonucleotides as inhibitors of West Nile virus replication. *Antiviral Res* **70**: 60-65.
125. Deas, TS, Bennett, CJ, Jones, SA, Tilgner, M, Ren, P, Behr, MJ, *et al.* (2007). In vitro resistance selection and in vivo efficacy of morpholino oligomers against West Nile virus. *Antimicrob Agents Chemother* **51**: 2470-2482.

126. Zhang, B, Dong, H, Stein, DA, Iversen, PL, and Shi, PY (2008). West Nile virus genome cyclization and RNA replication require two pairs of long-distance RNA interactions. *Virology* **373**: 1-13.
127. Zhang, B, Dong, H, Stein, DA, and Shi, PY (2008). Co-selection of West Nile virus nucleotides that confer resistance to an antisense oligomer while maintaining long-distance RNA/RNA base pairings. *Virology* **382**: 98-106.
128. WHO (2023). Japanese encephalitis <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/japanese-encephalitis>.
129. Stincarelli, MA, Rocca, A, Antonelli, A, Rossolini, GM, and Giannecchini, S (2022). Antiviral Activity of Oligonucleotides Targeting the SARS-CoV-2 Genomic RNA Stem-Loop Sequences within the 3' -End of the ORF1b. *Pathogens* **11**: 1286.
130. Dauksaite, V, Tas, A, Wachowius, F, Spruit, A, van Hemert, M, Snijder, E, *et al.* (2022). Highly potent antisense oligonucleotides (ASOs) targeting the SARS-CoV-2 RNA genome. *bioRxiv*: 2022.2011. 2028.518195.
131. Khromykh, AA, Meka, H, Guyatt, KJ, and Westaway, EG (2001). Essential role of cyclization sequences in flavivirus RNA replication. *J Virol* **75**: 6719-6728.
132. Yang, SH, Liu, ML, Tien, CF, Chou, SJ, and Chang, RY (2009). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) interaction with 3'

- ends of Japanese encephalitis virus RNA and colocalization with the viral NS5 protein. *J Biomed Sci* **16**: 40.
133. RNAfoldWebServer (2023). RNAfoldWebServer <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>.
134. Chery, J, Petri, A, Wagschal, A, Lim, SY, Cunningham, J, Vasudevan, S, *et al.* (2018). Development of Locked Nucleic Acid Antisense Oligonucleotides Targeting Ebola Viral Proteins and Host Factor Niemann-Pick C1. *Nucleic Acid Ther* **28**: 273-284.
135. Anantpadma, M, Stein, DA, and Vрати, S (2010). Inhibition of Japanese encephalitis virus replication in cultured cells and mice by a peptide-conjugated morpholino oligomer. *J Antimicrob Chemother* **65**: 953-961.
136. Bharucha, T, Cleary, B, Farmiloe, A, Sutton, E, Hayati, H, Kirkwood, P, *et al.* (2022). Mouse models of Japanese encephalitis virus infection: A systematic review and meta-analysis using a meta-regression approach. *PLoS Negl Trop Dis* **16**: e0010116.
137. Holden, KL, Stein, DA, Pierson, TC, Ahmed, AA, Clyde, K, Iversen, PL, *et al.* (2006). Inhibition of dengue virus translation and RNA synthesis by a morpholino oligomer targeted to the top of the terminal 3' stem-loop structure. *Virology* **344**: 439-452.
138. Nerome, R, Tajima, S, Takasaki, T, Yoshida, T, Kotaki, A, Lim, CK, *et al.*

- (2007). Molecular epidemiological analyses of Japanese encephalitis virus isolates from swine in Japan from 2002 to 2004. *J Gen Virol* **88**: 2762-2768.
139. Code (2023). Primer3Plus <https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>.
140. Yang, CC, Lin, CC, Chien, PT, Hsiao, LD, and Yang, CM (2016). Thrombin/Matrix Metalloproteinase-9-Dependent SK-N-SH Cell Migration is Mediated Through a PLC/PKC/MAPKs/NF- κ B Cascade. *Mol Neurobiol* **53**: 5833-5846.
141. Livak, KJ, and Schmittgen, TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* **25**: 402-408.
142. Naito, Y (2023). 高速塩基配列検索 GGenome <https://gggenome.dbcls.jp/ja/>.
143. ViPR (2023). Virus Pathogen Resource (ViPR) <https://bio.tools/vipr#/>
144. EMBL, EBI (2023). Clustal Omega <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>.
145. Filgueira, L, and Lannes, N (2019). Review of Emerging Japanese Encephalitis Virus: New Aspects and Concepts about Entry into the Brain and Inter-Cellular Spreading. *Pathogens* **8**: 111.
146. Schuh, AJ, Ward, MJ, Brown, AJ, and Barrett, AD (2013). Phylogeography

- of Japanese encephalitis virus: genotype is associated with climate. *PLoS Negl Trop Dis* **7**: e2411.
147. Gruber, AR, Lorenz, R, Bernhart, SH, Neuböck, R, and Hofacker, IL (2008). The vienna RNA websuite. *Nucleic Acids Res* **36**: W70-W74.
148. Giannecchini, S, Wise, HM, Digard, P, Clausi, V, Del Poggetto, E, Vesco, L, *et al.* (2011). Packaging signals in the 5'-ends of influenza virus PA, PB1, and PB2 genes as potential targets to develop nucleic-acid based antiviral molecules. *Antiviral Res* **92**: 64-72.
149. Goyenvalle, A, Jimenez-Mallebrera, C, van Roon, W, Sewing, S, Krieg, AM, Arechavala-Gomez, V, *et al.* (2023). Considerations in the preclinical assessment of the safety of antisense oligonucleotides. *Nucleic Acid Ther* **33**: 1-16.
150. Hagedorn, PH, Pontoppidan, M, Bisgaard, TS, Berrera, M, Dieckmann, A, Ebeling, M, *et al.* (2018). Identifying and avoiding off-target effects of RNase H-dependent antisense oligonucleotides in mice. *Nucleic Acids Res* **46**: 5366-5380.
151. Kuespert, S, Heydn, R, Peters, S, Wirkert, E, Meyer, AL, Siebörger, M, *et al.* (2020). Antisense Oligonucleotide in LNA-Gapmer Design Targeting TGFBR2-A Key Single Gene Target for Safe and Effective Inhibition of TGF β Signaling. *Int J Mol Sci* **21**: 1952.

152. Yasuhara, H, Yoshida, T, Sasaki, K, Obika, S, and Inoue, T (2022). Reduction of off-target effects of gapmer antisense oligonucleotides by oligonucleotide extension. *Mol Diagn Ther* **26**: 117-127.
153. Hagedorn, PH, Brown, JM, Easton, A, Pierdomenico, M, Jones, K, Olson, RE, *et al.* (2022). Acute Neurotoxicity of Antisense Oligonucleotides After Intracerebroventricular Injection Into Mouse Brain Can Be Predicted from Sequence Features. *Nucleic Acid Ther* **32**: 151-162.
154. Yoshida, T, Naito, Y, Yasuhara, H, Sasaki, K, Kawaji, H, Kawai, J, *et al.* (2019). Evaluation of off-target effects of gapmer antisense oligonucleotides using human cells. *Genes Cells* **24**: 827-835.
155. Burdick, AD, Sciabola, S, Mantena, SR, Hollingshead, BD, Stanton, R, Warneke, JA, *et al.* (2014). Sequence motifs associated with hepatotoxicity of locked nucleic acid—modified antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* **42**: 4882-4891.
156. Krieg, AM, Yi, AK, Matson, S, Waldschmidt, TJ, Bishop, GA, Teasdale, R, *et al.* (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* **374**: 546-549.
157. Vollmer, J, Jepsen, JS, Uhlmann, E, Schetter, C, Jurk, M, Wader, T, *et al.* (2004). Modulation of CpG oligodeoxynucleotide-mediated immune stimulation by locked nucleic acid (LNA). *Oligonucleotides* **14**: 23-31.

158. Wu, Z, Xue, Y, Wang, B, Du, J, and Jin, Q (2011). Broad-spectrum antiviral activity of RNA interference against four genotypes of Japanese encephalitis virus based on single microRNA polycistrons. *PLoS One* **6**: e26304.
159. Yuan, L, Feng, X, Gao, X, Luo, Y, Liu, C, Liu, P, *et al.* (2018). Effective inhibition of different Japanese encephalitis virus genotypes by RNA interference targeting two conserved viral gene sequences in vitro and in vivo. *Virus Genes* **54**: 746-755.
160. Shen, T, Liu, K, Miao, D, Cao, R, Zhou, B, and Chen, P (2014). Lentivirus-mediated RNA interference against Japanese encephalitis virus infection in vitro and in vivo. *Antiviral Res* **108**: 56-64.
161. Pyke, AT, Choong, K, Moore, F, Schlebusch, S, Taylor, C, Hewitson, G, *et al.* (2020). A Case of Japanese Encephalitis with a Fatal Outcome in an Australian Who Traveled from Bali in 2019. *Trop Med Infect Dis* **5**: 133.
162. Waller, C, Tiemensma, M, Currie, BJ, Williams, DT, Baird, RW, and Krause, VL (2022). Japanese Encephalitis in Australia - A Sentinel Case. *N Engl J Med* **387**: 661-662.
163. Zeng, M, Duan, Y, Zhang, W, Wang, M, Jia, R, Zhu, D, *et al.* (2020). Universal RNA Secondary Structure Insight Into Mosquito-Borne Flavivirus (MBFV) cis-Acting RNA Biology. *Front Microbiol* **11**: 473.
164. Sasaki, T, Hirakawa, Y, Yamairi, F, Kurita, T, Murahashi, K, Nishimura, H,

- et al.* (2022). Altered Biodistribution and Hepatic Safety Profile of a Gapmer Antisense Oligonucleotide Bearing Guanidine-Bridged Nucleic Acids. *Nucleic Acid Ther* **32**: 177-184.
165. Corey, DR (2017). Nusinersen, an antisense oligonucleotide drug for spinal muscular atrophy. *Nat Neurosci* **20**: 497-499.
166. Nagata, T, Dwyer, CA, Yoshida-Tanaka, K, Ihara, K, Ohyagi, M, Kaburagi, H, *et al.* (2021). Cholesterol-functionalized DNA/RNA heteroduplexes cross the blood-brain barrier and knock down genes in the rodent CNS. *Nat Biotechnol* **39**: 1529-1536.
167. Li, F, Wang, Y, Yu, L, Cao, S, Wang, K, Yuan, J, *et al.* (2015). Viral Infection of the Central Nervous System and Neuroinflammation Precede Blood-Brain Barrier Disruption during Japanese Encephalitis Virus Infection. *J Virol* **89**: 5602-5614.