

短鎖干渉性RNAを用いた新規抗ヘルペスウイルス薬の開発

藤室 雅弘 [北海道大学大学院薬学研究科／助手]

背景・目的

カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス(KSHV)は健常者に感染しても腫瘍や深刻な病態を引き起こさずに潜伏感染する。KSHV感染者のエイズを発症や、臓器移植のための免疫抑制剤の使用時に、このウイルスはカポジ肉腫やB細胞性リンパ腫を引き起す。他のヘルペスウイルスとは異なり、有効な治療薬が存在しないKSHVは医療現場において深刻な問題である。本申請プロジェクトは、短鎖干渉性RNAを用いた新規抗ヘルペス薬の開発であり、エイズの蔓延している第三国地域医療支援と、先進国における臓器移植のKSHV感染の新規治療法を目指している。

内容・方法

短鎖干渉性RNA(Short Interfering RNAs・siRNA)とは、細胞に導入された64塩基の二本鎖RNAが、それと同じ配列を持つ細胞内mRNAの分解を引き起こし、標的遺伝子の発現を抑制する手法である。我々は、KSHVが発現するLANAが癌の原因ファクターである β -カテニンの異常な蓄積を誘導し、感染細胞をがん化に導くことを既に明らかにしてきた。ウイルス蛋白LANAは宿主細胞内でウイルス自身のDNAの保持と複製を行なうため、抗LANA-siRNAにより感染がん化細胞からウイルスDNAの除去や増殖阻害活性の可能性と比活性の高いsiRNAの構築について検討した。以下に本助成により行なわれた研究の内容を記す。

- ①効果的なLANAノックダウンのためのsiRNAのデザイン
- ②効率的抗LANA-siRNAの発現方法の確立
- ③抗LANA-siRNAによるウイルスDNA除去活性と感染細胞増殖阻害活性の測定

結果・成果

①効果的なLANAノックダウンのためのsiRNAのデザイン

LANA遺伝子発現の抑制のため、pSuperを発現ベクターとして用いLANA遺伝子の200から218の塩基をターゲットとしたsiRNA anti-LANA-1と、LANA遺伝子の3090-3108をターゲットとしたsiRNA anti-LANA-2を構築した。LANA発現ベクターと共にHeLa細胞に共発現を行い、抗LANA抗体を用いたウエスタンプロテイングによりLANA蛋白質の発現阻害を解析した。siRNA anti-LANA-1、LANA-2共にLANAの発現を抑制したが、siRNA anti-LANA-1の方が抑制活性が強いことが明らかとなった。

②効率的抗LANA-siRNAの発現方法の確立

現在のsiRNA発現法として、64塩基の二本鎖RNAを直接細胞にトランスフェクションする方法と、64塩基の二本鎖RNAを発現するプラスミドDNAを細胞にトランスフェクション

する方法がある。我々の標的とするKSHV感染がん化B細胞(PEL: Primary Effusion Lymphoma)において、どちらの発現方法が効率的にLANAの発現を抑制するか解析を行なった。また、プラスミド系発現ベクターについてはマーカー遺伝子GFPの有無、U6プロモーターとH1プロモーターの比較を行なうためにpSuper、pRNAT-U6.1、pRNAT-H1.1の三者について比較検討した。その結果、2本鎖RNAよりもプラスミドsiRNA発現系の方が、高いLANA発現抑制効果を示した。また同一のプラスミドがGFPを発現してもsiRNA抑制効果には影響を与えないことが明らかとなった。

③抗LANA-siRNAによるウイルスDNA除去活性と感染細胞増殖阻害活性の測定

我々は既に、KSHV感染がん化B細胞においてLANAは β -カテニンの不の制御因子であるGSK-3 β を阻害し、 β -カテニンの異常な蓄積を誘導していることを明らかにしてきた。 β -カテニンは発がん誘導の直接の原因蛋白質であり、乳がん、大腸がん等の様々ながんにおいて、過剰な発現や蓄積が観察されている。新規に構築したsiRNA-anti-LANAが効果的にLANAの発現を抑制したので、 β -カテニンについても解析した。その結果、我々のsiRNAシステムがKSHV感染がん化B細胞においてLANAの発現だけでなく、 β -カテニンの蓄積も効率的に抑制した。

次に、pRNAT-H1.1-siRNA-anti-LANA-1、LANA-2をPEL細胞にトランスフェクションした。ハイグロマイシン耐性遺伝子を利用して、siRNA恒常的発現細胞を確立し、siRNA-anti-LANA恒常的発現細胞の増殖活性を測定した。同時に、ウイルスDNAをPCRによって測定した。siRNA-anti-LANA-1、LANA-2発現細胞は非発現株に比べ有意に細胞増殖能を低下させた。これは、KSHV感染がん化B細胞がLANAをsiRNAにより喪失した結果、細胞内 β -カテニン量が低下し、Wntシグナルの活性が弱くなったことに起因すると考えられる。また、LANAはKSHVウイルスエピゾームの複製や安定化も行なうため、がん化B細胞がKSHV遺伝子を失ったことも原因の一つとして考えられる。しかし、PCRにてウイルスDNAを測定した結果においては有意な差は見られなかった。この結果については技術的要因により差を測定できていないことも考えられ、真にウイルスDNAの量比に差がないのか否かリアルタイムPCR等、他の検出法において再検討中である。

今後の展望

現在、テトラサイクリンの培地添加によりsiRNAの発現のON/OFFが可能で、抗生素によりプラスミド保持細胞のクローニングが可能なプラスミドを構築中である。このシステムを用いて、LANAのノックダウンを行うことにより、さらに有意な抗ウイルス活性の差が得られると考えられる。また、LANAのノックダウン後のPEL細胞の遺伝子発現変動をDNAアレイにより解析予定である。この研究結果により、さらに詳細なLANAによる感染細胞のがん化メカニズムが明らかとされることが期待される。最終的な目標として、この抗LANA-siRNAシステムをウイルスベクターや細胞透過性オリゴRNAとして確立し、臨床的効果を目指した応用開発についても検討したい。