

# アデノウイルス由来小分子 RNA による ウイルス増殖促進機構の解明と遺伝子組換えウイルスへの応用



技術解説

若林 圭作\*, 櫻井 文教\*\*, 水口 裕之\*\*\*

The molecular mechanisms underlying small RNA-mediated enhancement of adenovirus infection and application for virus therapy

Key Words : oncolytic adenovirus, virus-associated RNA, microRNA, CUL4A

## 1. はじめに

近年の分子生物学の進歩に伴い、遺伝子操作によって有益な特性を有した遺伝子組換えウイルスを創出するウイルス工学がめざましい発展を遂げている。その中でも、いわゆる「風邪症候群」の主要病原ウイルスとして知られているアデノウイルス (Adenovirus; Ad) は、低病原性であることや、ウイルスゲノムが二本鎖 DNA であるため遺伝子組換えが比較的容易であることなどから、ウイルス工学

の分野で最も研究が進んでいるウイルスの一つである。これまでに Ad を基本骨格として、細胞に外来遺伝子を導入する非増殖型 Ad ベクターや、がん細胞特異的に感染増殖し死滅させる腫瘍溶解性 Ad が開発されてきた。これらの遺伝子組換え Ad は、がんや各種難治性疾患の新たな治療薬となることが期待されている一方で、臨床応用に向けては克服すべき課題も残されており、さらなる技術開発の進展に向けた基礎研究が必要不可欠である。

近年、タンパク質をコードしないノンコーディング RNA の研究が盛んに行われており、それに伴ってウイルスが発現するノンコーディング RNA にも注目が集まっている。Ad のゲノムにも、Virus-associated RNA (VA-RNA) と呼ばれる約 160 塩基の小分子ノンコーディング RNA がコードされており、Ad の感染に伴い、大量の VA-RNA が転写され、細胞内に蓄積することが知られている。Ad はこれまでに 90 種類の型が同定されているが、そのうち約 80% の Ad は 2 種類の VA-RNA (VA-RNA I, II) をコードしている。現在汎用されている遺伝子組換え Ad のベースである 5 型 Ad も 2 種類の VA-RNA をコードしており、著者らは非増殖型 Ad ベクターからも 2 種類の VA-RNA が発現することを見出している<sup>1</sup>。

VA-RNA の生理機能としては、VA-RNA I が抗ウイルス応答に重要な Double-stranded RNA-dependent protein kinase (protein kinase R; PKR) の活性化を阻害することで Ad の増殖を促進することが知られている<sup>2</sup>。PKR は、二本鎖 RNA を認識し活性化することで細胞のタンパク質合成を抑制する分子である。VA-RNA I は分子内での塩基対形成により、複数のステムループ構造を含む特徴的な二次構造をとることで、PKR に対するデコイとして機能するものと考えられている。実際に、VA-RNA I を欠損させた Ad では、子孫ウイルスタイターが十倍程度抑制さ



\* Keisaku WAKABAYASHI

1991年11月生まれ  
大阪大学大学院 薬学研究科 創成薬学専攻 (2019年)  
現在、塩野義製薬株式会社 医薬研究本部 創薬化学研究所 核酸医薬2グループ 博士(薬科学) 分子生物学  
TEL : 06-6331-6495  
FAX : 06-6332-6385  
E-mail : keisaku.wakabayashi@shionogi.co.jp



\*\* Fuminori SAKURAI

1972年10月生まれ  
京都大学大学院薬学研究科博士後期課程修了 (2001年)  
現在、大阪大学 大学院薬学研究科 分子生物学分野 准教授 博士(薬学)  
遺伝子治療学、薬物動態学  
TEL : 06-6879-8188  
FAX : 06-6879-8187  
E-mail : sakurai@phs.osaka-u.ac.jp



\*\*\* Hiroyuki MIZUGUCHI

1968年6月生まれ  
大阪大学大学院薬学研究科博士後期課程修了 (1996年)  
現在、大阪大学 大学院薬学研究科 分子生物学分野 教授 博士(薬学)  
分子生物学、遺伝子治療学  
TEL : 06-6879-8185  
FAX : 06-6879-8187  
E-mail : mizuguch@phs.osaka-u.ac.jp

れる<sup>3</sup>。それに対してVA-RNAIIは、VA-RNAIと約60%相同な配列を有し、VA-RNAIと同様に複雑な二次構造をとるものの、VA-RNAIと比較してPKRに対する阻害能が低く<sup>4</sup>、VA-RNAIIを単独で欠損させてもAdの増殖はほとんど変わらないなど、その生理機能はほとんど明らかとなっていない。しかしながら、VA-RNAIとVA-RNAIIの両者を欠損させ

ると、VA-RNAIのみを欠損させた場合と比較しAdの増殖がさらに十倍程度抑制されることから、VA-RNAIIも何らかの形でAdの増殖に寄与しているものと思われる<sup>5</sup>。本稿では、近年我々が解析したVA-RNAIIのAd感染増殖促進メカニズムと、遺伝子組換えAdへの応用の可能性について解説する。

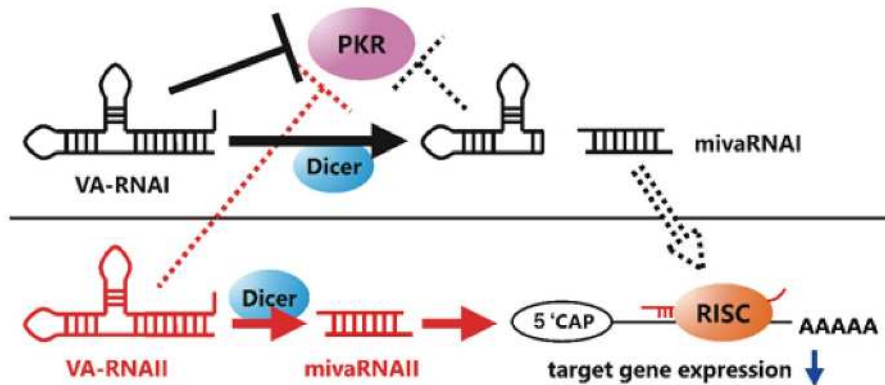


図1. VA-RNAI, IIの作用メカニズムの違い  
VA-RNAIはPKRを阻害することでAdの増殖を促進するが、DicerによってmivaRNAIへとプロセシングされるとPKR阻害能を失う。一方でVA-RNAIIは、Dicerによるプロセシング産物であるmivaRNAIIがAdの増殖を促進する。

## 2. VA-RNA由来マイクロRNA (mivaRNA)

VA-RNAIIの生理機能を解明するにあたり着目したのが、VA-RNA由来マイクロRNA (mivaRNA)<sup>6</sup>である。mivaRNAとは、VA-RNAを前駆体とするマイクロRNA (miRNA) 様の分子であり、宿主細胞のmiRNAと同様のプロセシング機構によって産生される。miRNAは、RNA-induced silencing complex (RISC)を形成し、標的遺伝子mRNAの3'非翻訳領域 (3' untranslated region; 3'UTR) に結合することでその発現を抑制する。mivaRNAもRISCに取り込まれることから、mivaRNAが何らかの標的遺伝子の発現を抑制することでAdの増殖に寄与すると考えられた。しかし我々の研究では、化学合成したmivaRNAI (VA-RNAIのプロセシングにより産生されたmivaRNA)を細胞に導入してもPKR阻害およびAdの増殖促進は観察されなかった。従って、VA-RNAIはmivaRNAIにプロセシングされることでPKR阻害能およびAd増殖促進能を失うことが明らかとなった<sup>7</sup>。

一方で、mivaRNAII (VA-RNAIIのプロセシングにより産生されたmivaRNA)がAd増殖に関与する

か否かについては不明であった。そこで、化学合成したmivaRNAIIを導入した細胞におけるAdの増殖を評価したところ、mivaRNAIIの導入によりAdの増殖が2倍以上促進されたことから、VA-RNAIIはmivaRNAIIへとプロセシングされることで機能を発揮することが示唆された。また、mivaRNAIIに該当する部位の塩基配列に変異を挿入したVA-RNAIIではAdの増殖促進効果が観察されなかった。さらに、mivaRNAIIは、VA-RNAIIの切断箇所の違いによって塩基配列がわずかに異なる数種類のmivaRNAIIアイソフォームが産生される。そこで、各アイソフォームを化学合成し細胞に導入したところ、一つのアイソフォームのみがAd増殖促進効果を示した。興味深いことに、Ad増殖促進効果を示したアイソフォームは、RISC中に最も多く取り込まれるアイソフォームであった<sup>8</sup>。以上の結果より、mivaRNAIIの塩基配列がその機能において重要であることが示された<sup>9</sup>。上記に加えて、VA-RNAIIのプロセシング効率およびRISC取り込み量はVA-RNAIよりも高いということが報告されている<sup>8,10</sup>。従って、VA-RNAIIより産生されたmivaRNAIIがmiRNAと同様の機構

により、何らかの標的遺伝子の発現を抑制することでAdの増殖を促進することが強く示唆された。これはつまり、VA-RNAIIがVA-RNAIとは全く異なるメカニズムによってAdの増殖を促進していることを示しており、ウイルス学的な観点で大変興味深い(図1)。

### 3. mivaRNAII 標的遺伝子の同定、およびその下流のメカニズム解析

mivaRNAIIがmiRNAと同様に何らかの標的遺伝子の発現を抑制することでAdの増殖を促進すると考えられたことから、我々はその標的遺伝子を同定することを試みた。まずマイクロアレイ解析により、mivaRNAII導入時に発現量が半分以下に低下する遺伝子を網羅的に探索し、そこからin silico解析<sup>11</sup>によってmRNAの3'UTRにmivaRNAII標的配列をもつ遺伝子を抽出した。さらにAd感染時の遺伝子発現量などを指標にスクリーニングを行い、標的遺伝子候補を5つまで絞り込んだ。これら5つの遺伝子をsiRNAを用いてノックダウンしたところ、Cullin 4A (CUL4A)のノックダウンによってAdの増殖が顕著に促進されたことから、CUL4AをmivaRNAII標的遺伝子として同定した。

CUL4Aは、他のタンパク質と会合してE3ユビキチンリガーゼとして機能し、標的タンパク質のプロテアソーム依存的な分解を誘導することが知られている<sup>12</sup>。従って、mivaRNAIIによるCUL4Aの発現抑制によって分解を免れたタンパク質が、Adの感染に寄与しているものと考えられた。そこで、CUL4Aによる分解の標的であることが報告されているいく

つかの遺伝子をsiRNAを用いてノックダウンしたところ、c-JunのノックダウンによってAdの増殖が抑制された。c-Junは、c-Jun N-terminal Kinase (JNK)を中心としたMitogen-activated Protein (MAP) キナーゼカスケードの下流に位置する転写因子AP-1の構成分子であり、JNKの阻害剤であるSP600125を作用させるとCytomegarovirusの増殖が阻害されることが報告されている<sup>13</sup>。我々の検討においても、SP600125によってAdの増殖が抑制された。また、クロマチン免疫沈降法を用いた解析により、c-JunがAdゲノムに結合することが示唆されている。以上より、VA-RNAIIのプロセッシング産物であるmivaRNAIIが標的遺伝子であるCUL4Aの発現を抑制することで、c-Junの分解が阻害され、その結果、Adの増殖が促進されることが明らかとなった(図2)<sup>9</sup>。

### 4. 腫瘍溶解性Adへの応用

VA-RNAの作用メカニズムを利用することで、Adの増殖を人為的に促進、または抑制することが可能になると考えられる。我々は、本研究成果を応用した新規腫瘍溶解性Adの開発を試みている。正常細胞では感染増殖せず、がん細胞特異的に感染増殖することでがん細胞の細胞死を誘導する腫瘍溶解性ウイルスは、次世代のがん治療法として大きな注目を集めている。これまでに10種類以上のウイルスを基盤とした腫瘍溶解性ウイルスが開発されているが<sup>14</sup>、腫瘍溶解性Adは最も臨床開発が進められている腫瘍溶解性ウイルスの一つである。一方で、十分な治療効果が得られない症例がみられることから、さらに高い抗腫瘍効果を示す腫瘍溶解性Adの開発

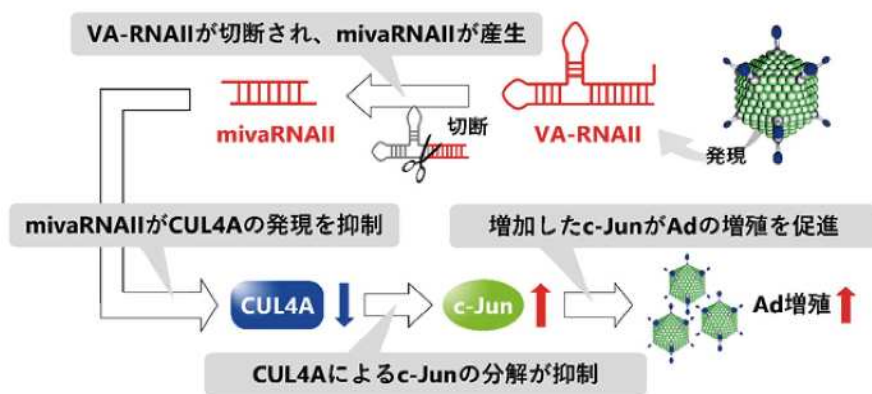


図2. mivaRNAIIのAd感染増殖促進メカニズム

が期待されている。その改良のアプローチとしては、抗腫瘍効果を示す遺伝子を搭載するアプローチと、腫瘍内でのウイルスの増殖効率を向上させるアプローチの2つが考えられる。このうち前者に関しては、既に種々の試みが報告されており、抗腫瘍免疫の増強を目的とした Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor (GM-CSF) 発現カセット<sup>15</sup>や、がん細胞のアポトーシス誘導を目的とした p53 発現カセット<sup>16</sup>などを搭載した腫瘍溶解性 Ad が開発されている。一方で後者については、ウイルスの増殖過程に関する知見の不足から、ほとんど行われていないのが現状である。

我々は、CUL4A の発現抑制により Ad の増殖が促進されることを応用し、腫瘍溶解性 Ad の一種である Telomerase-specific Replication-competent Adenovirus (TRAD) に、CUL4A に対する short-hairpin RNA (shCUL4A) 発現カセットを搭載した TRAD-shCUL4A を開発した (投稿準備中)。これにより、がん細胞におけるウイルス増殖効率を促進し、治療効果を高めることに成功した。一部のがん細胞においては CUL4A の発現が亢進しており、CUL4A ががんの増悪化に寄与することも示唆されていることから、CUL4A の発現抑制自体も抗腫瘍効果を示すものと期待できる。さらに shRNA 発現カセットには、サイズが小さいというメリットもある。Ad がウイルス粒子にパッケージングできるゲノムのサイズには限度があり、TRAD に搭載可能な治療遺伝子のサイズは最大約 4kbp (個々の TRAD の構造によって異なってくる) であるが、shRNA 発現カセットのサイズは約 400bp であるため、将来的には shRNA 発現カセットに加えて、他の治療遺伝子も同時に搭載可能である。上記以外にも、たとえば Ad ベクター作製のパッケージング細胞において CUL4A の発現を抑制し Ad ベクターの作製効率を高めることで、製造コストの削減や、高タイトーのウイルスが回収困難な改変型 Ad ベクターの大量調製が可能になるものと期待される。

以上我々は、ウイルスの感染増殖機構を詳細に解析することで、従来とは異なるアプローチによる遺伝子組換えウイルスの改良に応用可能な新しい知見を得ることができた。このような基礎研究に立脚した新規の遺伝子組換え Ad が、今後の創薬研究に貢献することを期待したい。

## 引用文献

1. **Wakabayashi K, et al.**, 2015. Quantitative Analysis of Virus-associated RNAI Expression following Transduction with a Replication-incompetent Adenovirus Vector In Vitro and In Vivo. *J Mol Genet Med.* **9**: 169.
2. **O'Malley RP, et al.**, 1986. A mechanism for the control of protein synthesis by adenovirus VA RNA I. *Cell* **44**: 391-400.
3. **Bhat RA, et al.**, 1983. Two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus can functionally substitute for the virus-associated RNAs in the lytic growth of adenovirus 5. *PNAS* **80**: 4789-4793.
4. **Ma Y, et al.**, 1993. Comparative analysis of the structure and function of adenovirus virus-associated RNAs. *J Virol.* **67**: 6605-6617.
5. **Bhat RA, et al.**, 1984. Adenovirus mutants with DNA sequence perturbations in the intragenic promoter of VAI RNA gene allow the enhanced transcription of VAII RNA gene in HeLa cells. *Nucleic Acids Res* **12**: 7377-7388.
6. **Aparicio O, et al.**, 2006. Adenovirus Virus-Associated RNA Is Processed to Functional Interfering RNAs Involved in Virus Production. *J Virol.* **80**: 1376-1384.
7. **Machitani M, et al.**, 2016. Dicer functions as an antiviral system against human adenoviruses via cleavage of adenovirus-encoded noncoding RNA. *Sci Rep.* **6**: 27598.
8. **Bellutti F, et al.**, 2015. Identification of RISC-Associated Adenoviral MicroRNAs, a Subset of Their Direct Targets, and Global Changes in the Targetome upon Lytic Adenovirus 5 Infection. *J Virol.* **89**: 1608-27.
9. **Wakabayashi K, et al.**, 2019. A MicroRNA Derived from Adenovirus Virus-Associated RNAII Promotes Virus Infection via Posttranscriptional Gene Silencing. *J Virol.* **93**: e01265-18.
10. **Xu N, et al.**, 2007. Adenovirus Virus-Associated RNAII-Derived Small RNAs Are Efficiently

- Incorporated into the RNA-Induced Silencing Complex and Associate with Polyribosomes. *J Virol.* **81**: 10540-10549.
11. **Wong N, et al.**, 2015. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Res* **43**: 52.
  12. **Sharma P, et al.**, 2014. CUL4A ubiquitin ligase: a promising drug target for cancer and other human diseases. *Open biology* **4**: 130217.
  13. **Zhang H, et al.**, 2015. The c-Jun N-terminal kinase inhibitor SP600125 inhibits human cytomegalovirus replication. *J Med Virol* **87**: 2135-2144.
  14. **Lawler SE, et al.**, 2017. Oncolytic Viruses in Cancer Treatment: A Review. *JAMA Oncol.* **3**: 841-849.
  15. **Cerullo V, et al.**, 2010. Oncolytic Adenovirus Coding for Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor Induces Antitumoral Immunity in Cancer Patients. *Cancer Res.* **70**: 4297-4309.
  16. **van Beusechem VW, et al.**, 2002. Conditionally Replicative Adenovirus Expressing p53 Exhibits Enhanced Oncolytic Potency. *Cancer Res.* **62**: 6165-6171.

