

# 博士論文

Interferon- $\alpha$ 1 の内在性アンチセンス RNA による  
interferon- $\alpha$ 1 mRNA 発現制御効果のモルモット  
システムを用いた概念実証研究  
(Proof-of-concept study for natural interferon- $\alpha$ 1  
antisense RNA-dependent modulatory effect of  
interferon- $\alpha$ 1 mRNA expression in a guinea pig system)

2019 年 9 月

立命館大学大学院薬学研究科

薬学専攻博士課程

坂本 凌

立命館大学審査博士論文

Interferon- $\alpha$ 1 の内在性アンチセンス RNA による

interferon- $\alpha$ 1 mRNA 発現制御効果のモルモット

システムを用いた概念実証研究

(Proof-of-concept study for natural interferon- $\alpha$ 1 antisense

RNA-dependent modulatory effect of interferon- $\alpha$ 1 mRNA

expression in a guinea pig system)

2019 年 9 月

September 2019

立命館大学大学院薬学研究科

薬学専攻博士課程

Doctoral Program in Pharmacy

Graduate School of Pharmacy

Ritsumeikan University

坂本 凌

SAKAMOTO Ryou

研究指導教員: 木村 富紀 教授

Supervisor: Professor KIMURA Tominori

# 目次

緒言	1
略語	3
第1章 モルモット (guinea pig, gp) <i>IFNA1</i> 遺伝子の同定	
1-1 背景	5
1-2 実験方法	7
1-3 結果	11
1-4 考察	13
第2章 gpIFN- $\alpha$ 1 AS の抗ウイルス活性の検証	
2-1 背景	15
2-2 実験方法	18
2-3 結果	22
2-4 考察	32
結語	38
参考文献	40
謝辞	44
図表	45

## 緒言

哺乳動物の抗ウイルス性免疫応答には自然免疫と獲得免疫があり、その中でも自然免疫は I 型インターフェロン (IFN) とそれに続く IFN 誘導性遺伝子によって規定される。それ故に、I 型 IFN である IFN- $\alpha$  タンパク質は慢性ウイルス感染症の治療に広く用いられてきた。IFN 機能と発現の制御に関しこれまで実施されてきた研究の多くは I 型 IFN 遺伝子の転写活性化、IFN- $\alpha$  タンパク質の作用並びに下流のシグナル経路を対象とするが、転写後性の発現制御に関わる研究は立命館大学薬学部病原微生物学研究室 (以後当研究室) の研究以外には報告がない<sup>1</sup>。

当研究室ではヒト *IFNA1* mRNA の核外輸送を研究する過程で、その二次構造のステムループ領域が mRNA の安定性に関与することを見出し<sup>2</sup>、本遺伝子の逆鎖から転写される antisense RNA (IFN- $\alpha 1$  AS) が *IFNA1* mRNA の安定性に関与する可能性を考え研究を進めた。その結果、IFN- $\alpha 1$  AS は、*IFNA1* mRNA 上の標的部位で局所的に二本鎖形成を形成することによって、また IFN- $\alpha 1$  AS と *IFNA1* mRNA 両者を共通標的としその発現を抑制する miR-1270 を吸着することにより、転写後性に本 mRNA を安定化することを明らかにした<sup>1,3</sup>。さらには、IFN- $\alpha 1$  AS が *IFNA1* mRNA を認識する機能ドメイン配列から成る antisense oligoribonucleotide (asORN) がウイルス感染早期から *IFNA1* mRNA の発現を増大することを明らかにし、この asORN は *IFNA1* mRNA の発現を増大することにより抗ウイルス性自然免疫応答の制御を可能とする新規の核酸医薬のシーズになると考えに至った。そこで本 asORN が *in vivo* において *IFNA1* mRNA 並びに IFN 下流遺伝子群の発現増大を介し抗ウイルス効果を示すことを検証する Proof-of-Concept (POC) 実験を行った。

asORN による *IFNA1* mRNA 並びに IFN 下流遺伝子群の発現増大による抗ウイルス活性を *in vivo* で検証するにあたり、抗ウイルス性免疫応答が定量可能なモデル動物を選定した。マウスは A 型インフルエンザウイルスの病因に関する研究で汎用されるが、BALB/c や C57BL/6 といった標準的な実験用マウスでは I 型 IFN 下流遺伝子の *Mx1* が変異しており、抗ウイルス性防御免疫が不全となる<sup>4,5</sup>。この Mx GTPase をコードしている *Mx1* の発現は I 型 IFN によって厳密に制御されており、本 GTPase は生体において A 型インフルエンザウイルス感染を制御する上で必須の抗ウイルス性因子となる<sup>6</sup>。また、マウスは気道粘液中にウイルスを分泌しないことから、安楽死させた個体から得られる気道組織を検討する以外にウイルスの増殖動態を検証することができない問題点が存在する<sup>7</sup>。これらの点を考えあわせ、asORN による *IFNA1* mRNA の発現を通じた抗ウイルス活性の検証にマウスモデルは不適であると結論し、機能的な *Mx1* をもち気道粘液中にウイルスの分泌することが知られるモルモット (*Cavia porcellus*) を代替モデル動物とした<sup>7</sup>。これまでに、モルモット 104C1 細胞を用い RT-qPCR 解析を行って、A 型インフルエンザウイルス感染はヒト細胞の場合と同様に IFN- $\alpha$ 1 AS と mRNA の発現を同調、増大させることを確認しているが、全長の *Cavia porcellus* *IFNA1* (*cpIFNA1*) 遺伝子の同定とその生物活性の確認は未だ未検討であった<sup>1</sup>。

そこで、本研究においては、*cpIFNA1* 遺伝子を同定し、これを用いて guinea pig (gp) IFN- $\alpha$ 1 AS がヒト細胞の場合と同様に *IFNA1* mRNA を安定化すること、並びにその機能ドメイン配列からなる asORN が *IFNA1* mRNA の発現を増大させることを *in vitro* で検証した。続いて、この asORN が *IFNA1* mRNA 発現の増大を介し、生体中で抗ウイルス活性を示すことを確認した。

## 略語

IFN	インターフェロン
AS	Antisense RNA
asORN	Antisense oligoribonucleotide
POC	Proof-of-Concept、概念実証
<i>Cavia porcellus</i> , guinea pig	モルモット
<i>cpIFNA1</i>	<i>Cavia porcellus IFNA1</i>
gpIFN- $\alpha$ 1 AS	Guinea pig IFN- $\alpha$ 1 AS
ORF	Open Reading Frame
PR/8 ウイルス	Influenza virus A/PR/8/34
EMCV	Endomyocarditis virus
FCS	ウシ胎児血清
MOI	Multiplicity of infection
RT-qPCR	Reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction
NAT	Natural antisense transcript
lncRNA	Long non-coding RNA
pRNA	Promoter-associated RNA
eRNA	Enhancer-associated RNA
gsRNA	Gene body-associated RNA
lincRNA	Long intergenic or intervening non-coding RNA
NORAD	Noncoding RNA activated by DNA damage
ceRNA	Competing endogenous RNA
miR	microRNA
PLGA	Poly (D,L-lactide-co- glycolide)
PVA	Polyvinyl alcohol
seODN	Sense oligodeoxynucleotide
TLR	Toll like receptor
pfu	Plaque forming units
RIG-I	レチノイン酸誘導遺伝子-1
ncRNA	Non-coding RNA
BSL	Bulged Stem Loop
MRE	miR response element
ISG	IFN 刺激応答遺伝子
IFITM	IFN-induced transmembrane

ASO	Antisense oligonucleotide
siRNA	Silencing RNA
RISC	RNA-induced silencing complex
VEGF	Vascular endothelial growth factor

## 第1章 モルモット (guinea pig, gp) *IFNA1* 遺伝子の同定

### 1-1 背景

緒言に述べたように、*IFNA1* mRNA 発現レベルの増大とこれに引き続く IFN- $\alpha$ 1 タンパク質の発現増加が生体中で再現され、その結果抗ウイルス活性が誘導されるか、否かを検証する目的で *in vivo* における Proof-of-Concept 実験を計画した。

この実験の実施にあたり、BALB/c や C57BL/6 といった一般的な実験用マウスは I 型 IFN の下流遺伝子である *Mx1* が変異しており抗ウイルス免疫応答が不全であることから、機能的な *Mx1* をコードしウイルス感染に対する I 型 IFN の影響を定量的に評価可能なモルモット (*Cavia Porcellus*) をモデル動物に採用した<sup>4,5,7</sup>。

モルモットの全ゲノム解析は終了しているが、各遺伝子の同定は未だなされていなかったため、まず *Cavia porcellus IFNA1* (*cpIFNA1*) を同定した。*cpIFNA1* の同定にあたっては、他種の *IFNA1* との相同性解析を行い、その結果得た *cpIFNA1* 候補遺伝子産物の抗ウイルス活性を生物学的に検討した。この相同性解析より *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Marmota himalayana* の各 *IFNA1* の Open Reading Frame (ORF) と高い相同性を持つ 15 種の *cpIFNA1* 候補の存在が明らかになった。この中でも相同性が特に高い 3 種の *cpIFNA1* 候補を選択し、これらを過剰発現させた 104C1 モルモット胎児線維芽細胞に Influenza virus A/PR/8/34 (PR/8 ウイルス) あるいは Endomyocarditis virus (EMCV) を感染させ、各ウイルス感染に由来する細胞変性効果に対する *cpIFNA1* 候補タンパク質の抗ウイルス活性を測定した。これらの結果を合わせ、*Homo sapiens*, *Mus musculus*,



*Marmota himalayana* の各 *IFNA1* 遺伝子と最も高い相同性を有し、最大の抗ウイルス活性を示した

*cpIFNA1* 候補 1 を *cpIFNA1* と決定した。

## 1-2 実験方法

### 細胞培養とウイルスの増殖

モルモット胎児線維芽細胞由来の 104C1 細胞 (ATCC CRL-1405)は 10%熱不活化ウシ胎児血清 (FCS)を添加した RPMI-1640 培地中で培養した。イヌ腎臓尿細管上皮細胞由来の MDCK 細胞 (ATCC CCL-34)は 10%FCS を含む Eagle's minimum essential medium 中で培養した。マウス皮下結合組織由来の L 細胞 (ATCC CCL-1)は 10%FCS を含む Dulbecco's minimum essential medium 中で培養した。

Endomyocarditis virus (EMCV; ATCC VR-1762)は L 細胞に multiplicity of infection (MOI) 0.01 で 37°C、1 時間感染させ、90%の細胞に細胞変性効果が見られるまで反応した。げっ歯類に適合した influenza virus A/PR/8/34 (PR/8 ウイルス, H1N1)は 10 日齢の孵化鶏卵の尿膜腔内で複製した<sup>8</sup>。

ウイルス力価は測定プラークアッセイにより行い、EMCV は L 細胞、PR/8 ウイルスは MDCK 細胞を用いて行った。

### *cpIFNA1* の同定

モルモットゲノム (<http://www.broadinstitute.org/science/projects/mammals-models/guinea-pig/guinea-pig-genome-project; released in February 2008>)における *IFNA* ファミリーのオルソログは、UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>)が運営している BLAT プログラムを使用して、*Homo sapiens*、*Mus musculus* と *Marmota himalayana* の既存の *IFNA* ファミリー遺伝子と比

較した<sup>9</sup>。該当した候補は遺伝情報処理ソフトウェア GENETYX-MAC (version 15; GENETYX Co. Tokyo, Japan)を用いオープンリーディングフレームにおける相同性を評価した。*cpIFNA1* ファミリー遺伝子のサブタイプは DNA Data Bank of Japan (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp>)が運営している ClustalW<sup>10</sup> により同定した。

### **CpIFNA1 候補遺伝子発現プラスミドの作製**

*cpIFNA1* 候補遺伝子 1-3 は Hartley guinea pig の肺組織由来のゲノム DNA を polymerase chain reaction (PCR)により増幅した。PCR に用いたプライマーペアは Table 1 に示す。各増幅産物を *HindIII/XbaI* により制限酵素処理し、pSI ベクター<sup>2</sup>の *HindIII/XbaI* 部位に挿入した。

### **トランスフェクション並びに Viral protection assay**

pSI-*cpIFNA1* 候補 1、2、3 と pSV-Beta-galactosidase control vector (Promega, Madison, WI, USA)は magnet-assisted transfection (MATra; IBA, Goettingen, Germany)を用い、104C1 細胞に導入した。具体的には pSI-*cpIFNA1* 候補 1、2、3 と pSV-Beta-galactosidase control vector を MATra A と混合し室温で 20 分間静置した後、磁気プレート上で 104C1 細胞に導入し 15 分間静置し CO<sub>2</sub> インキュベーターに戻した。

培養上清と細胞溶解物は感染の 48 時間後に回収した。各 *cpIFNA1* 発現プラスミドの導入効率を標準化するため溶解物中の β-ガラクトシダーゼ活性を Beta-Glo assay system (Promega)の製造元説明書に従い測定した。培養上清は Viral protection assay を行うまで -80℃

で保管した。Viral protection assay は 104C1 細胞を上記の培養上清とともに 24 時間プレインキュベートした後、MOI 0.005 の EMCV または MOI 25.5 の PR/8 ウイルスを感染させた。感染後 24 時間 (EMCV) または 48 時間後 (PR/8 ウイルス) に培養上清が、ウイルス誘導性の細胞変性効果を阻害した程度を WST-1 アッセイによる生細胞数の計測により検証した。これは感染細胞に等量の 6 mM WST-1 (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt) および 1-Methoxy PMS (1-Methoxy-5-methylphenazinium methylsulfate) (同仁化学) を加え反応させた。その後、1 N 硫酸を添加し更なる反応を止め、マイクロプレートリーダーにより 450 nm および 655 nm の吸光度を測定した。各ウェルにおける  $OD_{450\text{ nm}-650\text{ nm}}$  は (サンプルウェルの  $OD_{450\text{ nm}-650\text{ nm}}$ ) - (ウイルス感染のみの  $OD_{450\text{ nm}-650\text{ nm}}$ ) で計算した。

## 統計分析

Fig. に示す結果は、同様の処理をした 3 組のサンプルを用い、少なくとも 3 つの独立した実験の代表である。有意差検定はスチューデントの t 検定を用いて行った。

#### アクセッション番号

この研究で使用した遺伝子は以下の登録番号を有する:AB671739 (*Cavia porcellus IFNA1*), AB578886 (*Homo sapiens IFNA1*), NM\_010502.2. (*Mus musculus Ifna1*), AY962656 (*Marmota himalayana IFNA1*)。

## 1-3 結果

### バイオインフォマティクスによる *cpIFNA1* の同定

バイオインフォマティクス解析の結果、*cpIFNA1* の候補を 15 種得た。この 15 種の *cpIFNA1* 候補は全てモルモットゲノム上 Scaffold2 に局在しており、そのコード領域は 546-564 bp にわたり、予測されるアミノ酸数は 181-187 であった (Table 2、Fig.1A)。これら 15 種の *cpIFNA1* 候補の中から、*Homo sapiens*、*Mus musculus* 並びに *Marmota himalayana* の各 *IFNA1* の塩基配列並びにアミノ酸配列と特に高い相同性を有する 3 つの *cpIFNA1* 候補を選択した。この中では候補 1 が最も高い相同性を示していた (Table 3)。

これらの *cpIFNA1* 候補の推定アミノ酸配列には、全て C 末端領域に IFN タンパク質に特有な IFN- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  ファミリーシグネチャー<sup>9,11</sup> が存在することから、これら *cpIFNA1* 候補は IFN- $\alpha$  タンパク質をコードすることが示唆された (*cpIFNA1* 候補 1 のアミノ酸配列の相同性情報と IFN ファミリーシグネチャーを Fig.1B に示す)。さらに、候補 1 のアミノ酸配列は調べた 3 つの種の IFN- $\alpha 1$  タンパク質のアミノ酸配列並びに IFN シグネチャー配列の双方に対し最も高い相同性を示した (Table 3)。興味深いことに、IFN- $\alpha 1$  候補タンパク質は 3 つ共に、*Cavia porcellus* と分類上最も近い存在である *Marmota himalayana* の IFN- $\alpha 1$  タンパク質とシグネチャー配列に最大の相同性を示していた。

### gpIFN- $\alpha 1$ 候補タンパク質の抗ウイルス活性の検討

PR/8 ウイルスまたは EMCV 感染モルモット 104C1 細胞が示す細胞変性効果を指標に、gpIFN- $\alpha 1$  候補タンパク質の抗ウイルス活性を検討した。Fig.2 に示すように、*cpIFNA1* 候補を導入

した 104C1 細胞培養上清を加え培養した 104C1 細胞は、候補 3 導入細胞培養上清に対する EMCV 感染例を除き、全ての感染例で細胞変性効果を有意に低減させた。PR/8 ウイルス感染細胞において、相対生存率は未処理対照細胞の 65%に対し 88% (候補 3)から 105% (候補 1)にまで回復した。EMCV 感染細胞では 83% (候補 3)から 104% (候補 1)の相対的細胞生存率を示し、未処理対照細胞が示す 74%の細胞生存率に比較し、有意に改善していた。以上の抗ウイルス活性検討実験及びバイオインフォマティクス分析の結果において *cpIFNA1* 候補 1 は PR/8 及び EMCV 感染に対して最大の抗ウイルス効果を示し、IFN- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  ファミリーシグネチャー並びに *IFNA1* の核酸/アミノ酸配列の双方に対し最も高い相同性を有することから *cpIFNA1* と決定した。

## 1-4 考察

当研究室ではこれまでに、ヒト *IFNA1* mRNA の転写後性発現制御に機能し、それに続く IFN- $\alpha$ 1 タンパク質の産生に重要な役割を果たす遺伝子の逆鎖からの転写産物 (Natural antisense transcript, NAT)である IFN- $\alpha$ 1 AS を同定した<sup>1</sup>。この IFN- $\alpha$ 1 AS は長鎖の非コード性 RNA (Long non-coding RNA, lncRNA)であり、*IFNA1* mRNA と一過性に二本鎖を形成することで同 mRNA を安定化することを明らかにした。二本鎖形成による mRNA の安定化効果は、IFN- $\alpha$ 1 AS の機能ドメインである mRNA 認識部位の配列から作成した asORN の単独導入によっても再現され、IFN- $\alpha$ 1 AS と同様に *IFNA1* mRNA 発現レベルを増加させたが、IFN- $\alpha$ 1 AS の発現に影響は及ぼさなかった<sup>1</sup>。

これらの知見を *in vivo* 条件下で検証するには、モデル動物由来の IFN- $\alpha$ 1 AS において *IFNA1* mRNA を認識する機能ドメインを決定し、その配列からなる asORN が同 mRNA の発現を増大し、結果として抗ウイルス活性を誘導する POC 実験を行う必要があった。しかしながら、BALB/c、C57BL/6 といった標準的な実験用マウスは、IFN 刺激応答遺伝子であり、主たる抗ウイルスエフェクターをコードする *Mx1* 遺伝子<sup>7,12</sup>に変異を有するため<sup>5,13</sup>使用せず、代えて正常な *Mx1* 遺伝子を有し I 型 IFN 応答の定量的な解析を可能とするモルモットをモデル動物とした。

本章において、筆者は *cpIFNA1* を同定し、PR/8 ウイルスあるいは EMCV を用いてその感染に対する抗ウイルス活性が本遺伝子産物に由来することを確認した。第 2 章では、A 型インフルエンザウイルス感染モルモットモデルを用いて、*cpIFNA1* 本遺伝子逆鎖から転写される gpIFN- $\alpha$ 1AS の機



能ドメイン配列に由来する asORN が、生体中で抗ウイルス活性を示すことを検証したので、その詳細を報告する。

## 第2章 gpIFN- $\alpha$ 1 AS の抗ウイルス活性の検証

### 2-1 背景

近年の研究からゲノムの大部分から転写が行われていることが明らかになり、タンパク質をコードしない長鎖の non-coding RNA (lncRNA) の存在が明らかになった<sup>14</sup>。この lncRNA は 200 塩基を超えるタンパク質をコードしない RNA であり、pRNA (promoter-associated RNA)、eRNA (enhancer-associated RNA)、gsRNA (gene body-associated RNA)、lincRNA (long intergenic or intervening non-coding RNA) および NAT (Natural Antisense Transcripts) がある。

大半の lncRNA は遺伝子の転写開始点を含む 2 kb の領域に由来しており、全体の 65% がプロモーター領域と重複する pRNA、19% がエンハンサー領域に存在する eRNA であり、5% が遺伝子の逆鎖から転写される NAT となる。残りの 11% を占める lncRNA は転写開始点より 2 kb 以上遠位の非コード領域に分布する lincRNA である<sup>15-18</sup>。

エンハンサーやプロモーター等の転写制御因子は両方向性に転写を開始することが多いため、lncRNA の大部分はこれら制御因子領域に由来する。また多くの lncRNA は核内に局在しており<sup>19</sup>、エピジェネティックな発現制御に関わることが多いとされる。しかしながら、これまで考えられてきた lncRNA による転写制御効果は、本 RNA 自体によるというよりも近接する遺伝子の転写制御ユニットによるものであるという報告が最近多く認められている<sup>20</sup>。従って lncRNA が転写のエピジェネティック制御に果たす役割は、上記制御ユニットを転写の場に導くガイド (シャペロン) 的作用が主になると考えられる<sup>21</sup>。一方、lncRNA は、転写後性の遺伝子発現制御においても重要な機能を持つこ

とが知られる<sup>22,23</sup>。このタイプの発現制御では、lncRNA は認識するタンパク質や他の RNA の活性及び発現レベルを調節することにより機能する。例えば、lncRNA, NORAD (noncoding RNA activated by DNA damage)は RNA 結合タンパク質の PUMILIO1 と PUMILIO2 と結合し、これら分子が標的 mRNA と作用するのを阻害する<sup>20,24,25</sup>。また、lncRNA には他の RNA と塩基対を形成することにより標的 RNA の発現量や活性を制御するものがあり、competing endogenous RNA (ceRNA)と称する ceRNA には microRNA (miR)に結合しその働きを阻害するものが含まれる。<sup>26</sup>。このような lncRNA が制御効果を発揮するためには標的分子と 1:1 で相互作用する必要がある。そのため、ceRNA については、ceRNA 対標的 microRNA 間の分子比を 1:1 に近づけるため ceRNA 作用を有する他の lncRNA と共同して標的 microRNA にあたる事が知られる<sup>3</sup>。

当研究室では、lncRNA の中でも *IFNA1* 遺伝子の逆鎖から転写される NAT (IFN- $\alpha$ 1 AS)による *IFNA1* mRNA の転写後性発現制御について研究を進めており、これまでに IFN- $\alpha$ 1 AS が *IFNA1* mRNA と二本鎖を形成することによりこれを安定化すること、また ceRNA として miR-1270 を吸着、阻害することで本 mRNA の発現レベルを増大することを報告してきた<sup>1,3</sup>。この過程で、*IFNA1* mRNA を認識する IFN- $\alpha$ 1 AS の機能ドメイン配列からなる asORN が AS と同様に *IFNA1* mRNA の発現レベルを増大させることを見出している<sup>1</sup>。そこで、この asORN を投与し、*IFNA1* mRNA の発現を制御することにより、生体中で抗ウイルス効果を確認する POC 実験を計画した。これまでの研究<sup>1</sup>と第 1 章の実験からモルモット *cpIFNA1* を同定し、gpIFN- $\alpha$ 1 AS はヒト IFN- $\alpha$ 1 AS で確認したように gp*IFNA1* mRNA と同一の発現パターンを示すことを確認している。

そこで、本章ではモルモットを用いた POC 実験を行うため、gp*IFNA1* mRNA を認識する gpIFN- $\alpha$ 1 AS の機能ドメインを同定するとともに、このドメイン配列からなる asORN がヒトの場合と同様に gp*IFNA1* mRNA の発現を増大させることを確認した。続いて、モルモット気道にこの asORN を投与するため Drug Delivery System として poly(D,L-lactide-co- glycolide) (PLGA)<sup>27,28</sup> を採用し、モルモット胎児線維芽細胞を用いて gp*IFNA1* mRNA 発現を最大化する asORN の封入条件を決定した。以上を合わせ用い、ヒト A 型インフルエンザウイルス感染モルモット気道にモルモット asORN を投与したところ、*in vitro* 実験結果と同様に、*IFNA1* mRNA の発現を増大させる結果、感染ウイルス力価を低下させることに成功したので、以下にその詳細を報告する。

## 2-2 実験方法

### Drug Delivery 試薬

PLGA (lactide:glycolide = 75:25, MW = 20,000)と polyvinyl alcohol (PVA; Gohsenol EG05)はそれぞれ和光純薬と日本合成化学工業から購入した。Chitosan (GH-400EF) は日油から購入した。

### 細胞培養とウイルスの増殖

モルモット胎児線維芽細胞由来の 104C1 細胞 (ATCC CRL-1405)は 10%熱不活化ウシ胎児血清 (FCS)を添加した RPMI-1640 培地中で培養した。イヌ腎臓尿細管上皮細胞由来の MDCK 細胞 (ATCC CCL-34)は 10%FCS を含む Eagle's minimum essential medium 中で培養した。

PR/8 ウイルスは 10 日齢の孵化鶏卵の尿膜腔内で増殖させた。PR/8 ウイルス力価は MDCK 細胞を用いたプラークアッセイにより決定した。

### トランスフェクション並びに Viral protection assay

sense oligodeoxynucleotide (seODN) (Eurofins genomics)を用いた 104C1 細胞における gpIFN- $\alpha$ 1 AS の発現抑制は、2.9  $\mu$ g を magnet-assisted transfection (MATra; IBA, Goettingen, Germany)により導入した。導入効率を標準化するために pSV-Beta-galactosidase control vector を 0.1  $\mu$ g 加えた。具体的には seODN と pSV-Beta-galactosidase control vector を MATra A と混合し室温で 20 分間静置した後、磁気プレート上で 104C1 細胞に導入し 15 分間静置し CO<sub>2</sub> インキュベーターに戻した。

37°Cで6時間インキュベートした後、PR/8 ウイルスを MOI 25.5 で感染させた。37°Cで0-48時間インキュベートした後、感染細胞を採取し gpIFN- $\alpha$ 1 AS/mRNA の発現レベルを調べるとともに  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を Beta-Glo assay system (Promega)の製造元説明書に従い測定した。

seODN は gpIFN $\alpha$ 1 mRNA 二次構造中のループ構造で、AS のループ構造とハイブリダイズするものを含む配列で設計した。seODN の名称と塩基配列は Table 5 に示した。

asORN (Gene design)は上記の gpIFN- $\alpha$ 1 AS 機能ドメインから設計した。また、asORN は Toll like receptor (TLR)7/8 による影響を回避するため GU に富む配列<sup>29</sup>は回避して設計し、2'-O-メチル化修飾をした。

#### **Total cellular RNA の抽出と strand-specific reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)**

Total RNA を TRIzol (Invitrogen)により抽出し、TURBO DNA-free DNase I キット (Applied Biosystems) により精製した。

DNaseI 処理したサンプルを鎖特異的プライマーでアニーリングし、100 U の ReverTraAce (東洋紡)の存在下で、50°C30 分間反応させ、cDNA を合成した。次に、以下プログラムを使用して、DNA Engine PTC-0200G (Bio-Rad) での PCR により cDNA を増幅した。95°Cで1 分間のプレインキュベーションとそれに続く 22~38 サイクル [95°Cで 15 秒間、72°Cで 1

分間（アニーリング温度を1サイクルあたり0.3℃下げる）、72℃で30秒間]反応させた。

gp $IFN\alpha 1$  mRNA および AS の検出のために、それぞれ RT 用の gpR1 および gpF1 プライマー、並びに PCR 用の gpF1B / gpR1 プライマーを使用した。Gp  $\beta$ -アクチン mRNA については、RT 用の nona-deoxyribonucleotide random primer mixture (タカラバイオ)および、PCR 用の gp  $\beta$ -アクチン F/R プライマーを使用した。RNA 発現量は SYBR Green I (Roche)を用い、Chromo4 real-time PCR analysis system apparatus (Bio-Rad)により解析した。

#### **asORN 含有 PLGA ナノ粒子 (PLGA-asORN)の調製と PLGA-asORN の導入**

PLGA-Antisense oligoribonucleotide (PLGA-asORN)は水中でのエマルジョン溶媒拡散法により調製した。PLGA をアセトン/エタノール混合物に溶解した後、asORN 溶液を PLGA 溶液に添加し、これをキトサン含有 PVA 水溶液に加え減圧化で有機溶媒を蒸発させた。得られた、PLGA-asORN に asORN を加え、PLGA-asORN を作製した。PLGA-asORN の導入条件至適化のために、PLGA 濃度 1.46-2.26% (w/w)、asORN 3, 6  $\mu$ g の条件で複数種類の PLGA-asORN を作製し、RNase free の水に再懸濁した後、ボルテックスし、4℃で超音波処理した。

#### **動物と PR/8 ウイルス感染**

Hartley guinea pig (雌、4 週齢)は清水実験材料から購入した。研究期間中動物は、施設内使用委員会承認のプロトコルに従い、滋賀医科大学動物生命科学研究センターの動物施設に収容された。4 匹からなるモルモットの群を pentobarbital sodium salt (30 mg/kg body weight)

(共立製薬)の腹腔内注射により麻酔した。続いて、非致死量 ( $10^6$  plaque forming units (pfu)) の希釈ウイルス 100  $\mu$ l を一つの鼻腔内に接種した。PR/8 ウイルス増殖に対する PLGA-asORN の効果を評価するために、ウイルス感染 6 時間前に 100  $\mu$ l の PLGA-asORN を鼻腔内に接種した。一部の群ではウイルス感染の 18 時間後に PLGA-asORN を再接種した。上下気道における PR/8 ウイルスの増殖に及ぼす PLGA-asORN の効果を評価するため、ウイルス感染後の様々な間隔で、麻酔処理した動物から鼻腔洗浄液と気道洗浄液を回収した。PLGA による毒性評価のためモルモットの体重と直腸温度を測定した。PLGA-asORN が *gpIFNA1* AS/mRNA 発現に及ぼす効果を評価するためモルモットをペントバルビタールナトリウム (200 mg/kg body weight) (共立製薬)の腹腔内注射により人道的に安楽死させ、咽頭及び気管組織を鎖特異的 RT-qPCR により解析した。

#### アクセッション番号

本研究に用いられた遺伝子は以下の登録番号である。AB671739 (*Cavia porcellus IFNA1*), AF508792 (*Cavia porcellus ACTB*)。



## 2-3 結果

### 内因性 gpIFN- $\alpha$ 1 AS 発現抑制が gpIFNA1 mRNA 発現に示す効果

POC 実験実施にあたり、まず gpIFNA1 mRNA の安定化に関わる gpIFN- $\alpha$ 1 AS の機能ドメインを決定する必要があった。そこで、gpIFN- $\alpha$ 1 AS 発現レベルの変動を指標に scODN マッピング実験を行った。この実験では、mRNA 上の塩基配列から作成した scODN が gpIFN- $\alpha$ 1 AS に結合すると、内在性 RNaseH の作用により AS RNA が分解される現象を利用した。この実験は、gpIFN- $\alpha$ 1 AS の特異的な発現抑制を可能にし、AS 発現レベルの低下が gpIFNA1 mRNA 発現に及ぼす影響の解析を可能にする。この解析を通じ、gpIFNA1 mRNA を認識し、安定化するために必要な gpIFN- $\alpha$ 1 AS の責任領域即ち機能ドメインが明らかになる<sup>1</sup>。

そこでまず最近接エネルギーパラメータを用いた最小自由エネルギーによる RNA folding プログラム<sup>30</sup>を用い、gpIFNA1 mRNA の二次構造を予測した(データは示さず)ところ、理論的に安定とみなされる候補構造 10 個は全て共通する局所ドメイン構造を有することが示された(Fig.3A)。そこで、共通構造の一本鎖領域にある「バブル」または「ループ」部分の塩基配列からなる scODN の S2～S6 を作成し(Fig.3A)、これらの scODN による内因性 gpIFN- $\alpha$ 1 AS 発現への影響を検討した。本実験には陰性対照の scODN はあえて含めなかった。これは、これまで実施した同種の実験経路から一本鎖領域の塩基配列からなる scODN は全て gpIFN- $\alpha$ 1 AS を認識するわけではなく<sup>1</sup>、AS に結合しない scODN を以降の実験の陰性対照とすることが可能と考えたからである。

Fig.3B に示すように、S2、S4 および S6 の scODN は 104C1 細胞における gpIFN- $\alpha$ 1 AS の内因性発現を抑制したが、S3 および S5 の導入は AS RNA の発現に影響しなかった(Fig.3B、S3 およ

び S5 を mock と比較)。S2, 4, 6 の導入は、同一細胞において gp  $\beta$ -アクチン mRNA の発現に影響しなかったため、得られた発現抑制効果は gpIFN- $\alpha$ 1 AS に特異的とみなした。以上の結果より、以降の実験には S4 を選択し、gpIFN- $\alpha$ 1 AS の発現抑制が gp*IFNA1* mRNA 発現に及ぼす効果を検討した。また、S3 を陰性対照として用いることにした。

続いて、S4 あるいは S3 を導入した 104C1 細胞に PR/8 ウイルスを感染した。Fig.3 と同じく、S4 は、感染 0 時間において gpIFN- $\alpha$ 1 AS の内因性発現レベルを低下させた (Fig.4A 感染 0 時間における S4 と mock または S3 の gpIFN- $\alpha$ 1 AS 分子数を比較)。一方、S3 導入細胞や mock 細胞においてはこの効果は認められなかった。PR / 8 ウイルス感染後、S4 細胞において gpIFN- $\alpha$ 1 AS の発現は回復し、感染後 36 時間でその発現は最大に達し、S3 細胞あるいは mock 細胞よりも約 4 倍高い発現レベルを示した。mock 細胞における gpIFN- $\alpha$ 1 AS 発現レベルは 36 時間以降ほぼ同レベルであったが、S4 細胞において AS 分子数は急減し、感染後 48 時間には 36 時間ピーク値から 76% の減少を示した。この結果は、seODN により IFN- $\alpha$ 1 AS の内因性発現を抑制したヒト Namalwa B リンパ球において、ウイルス感染により AS のレベルが急増後低下した発現プロファイル<sup>1</sup>に類似していた。seODN3 に関しては、内因性の gpIFN- $\alpha$ 1 AS の発現に影響せず、感染後 36 時間までは mock 細胞と同様な発現プロファイルを示したが、その後 48 時間まで gpIFN- $\alpha$ 1 AS の発現レベルを増大させた (Fig.4A 上)。

上述の S4、S3 導入細胞および mock 細胞における gp*IFNA1* mRNA 発現の経時変化は、AS RNA の発現プロファイルと同様であった (Fig.4A、下)。mock 細胞の gp*IFNA1* mRNA は、ウイルス

感染後 36 時間で最大レベルに達した後もほぼ同等量の発現を維持したが、S4 細胞は gpIFN- $\alpha$ 1 AS と同じく、感染後 36 時間に発現のピークを示した後感染後 48 時間にかけて *IFNA1* mRNA の発現を 64%減少させた。これに反し、gpIFN- $\alpha$ 1 AS の発現プロファイルで観察されたように、S3 は、感染 36 時間の時点で mock 細胞と同等の発現レベルにあった gp*IFNA1* mRNA をその後 12 時間で 20%増加させていた。

S4もS3のseODNも、Toll like receptor (TLR) 9によって認識されるリガンドである非メチル化 CpG モチーフを含まず<sup>29,31</sup>、導入後 6 時間が経過した感染 0 時間の時点で mock 細胞と比較し gp*IFNA1* mRNA 発現の増加を認めなかった (Fig.3A 下、感染 0 時間で S4 または S3 と mock を比較)。これらの結果は、S4/S3 導入細胞において観察された gpIFN- $\alpha$ 1 AS/gp*IFNA1* mRNA 発現の変動は、seODN が TLR9 を刺激したことによる IFN 応答ではなく、PR/8 ウイルス感染に対し誘導された自然免疫応答によるものであることを強く示唆する。

#### gp*IFNA1* mRNA レベルに対する seODN 相補的 asORN の導入効果

上記の結果より、ヒト IFN- $\alpha$ 1AS の発現抑制の場合と同様<sup>1</sup>に、S4 seODN は gpIFN- $\alpha$ 1 AS による gp*IFNA1* mRNA の認識部位を含む可能性が強く示唆された。そこで、gp*IFNA1* mRNA 発現に対する gpIFN- $\alpha$ 1 AS の作用を調べる目的で、gpIFN- $\alpha$ 1 AS の mRNA 認識部位から成る asORN を過剰発現させることにした。この実験にあたって、S4 seODN の塩基配列と相補的な配列に 2'-O-メチル基とホスホロチオエート結合を挿入し、asORN4 を作成した。また、S3 は発現抑制実験の後期段

階で *gpIFNA1* mRNA 発現を増大させる効果を示したことから、同様に asORN3 も作成し、過剰発現実験に用いた。

本過剰発現実験の陰性対照として、S3 seODN の塩基配列 (*gpIFNA1*、ヌクレオチド 252~270) を 3' 端から逆方向に読んだ *ncasORN* (*gpIFNA1* ヌクレオチド 270-250) を作製した (Fig.3A 参照)。同配列を BLAT (<http://smithlabdb.usc.edu/cgi-bin/hgBlat?command>) により検索し、本 *ncasORN* に対応するオフターゲットはモルモットゲノム上に存在しないことを確認した (データは示さず)。

AsORN4/3、*ncasORN* 並びに seODN (S2-S6) は、TLR7/8 による認識の結果誘導される IFN- $\alpha$  および TNF- $\alpha$  産生を避けるため、その塩基配列には GU に富むモチーフを含めないように設計した<sup>29</sup>。

続いて、104C1 細胞に asORN または *ncasORN* を導入し、導入 6 時間後に PR / 8 ウイルスを感染させ、鎖特異的 RT-qPCR による IFN 分子の発現解析を行った。AsORN4 導入細胞では、*gpIFNA1* mRNA 発現レベルは PR/8 ウイルス感染 24 時間後に、*ncasORN* 導入細胞と比べ 4.7 倍高い値を示した (Fig.4B、下)。ヒト *IFNA1* mRNA レベルに対する asORN の影響を検討した Namalwa B リンパ球の実験で観察したように<sup>1</sup>、asORN4 の導入は *gpIFN- $\alpha$ 1 AS* の発現レベルに影響せず、*ncasORN* の場合と同様な値を示した (Fig.4B、上)。asORN も *ncasORN* も *gp  $\beta$ -アクチン mRNA* の発現に影響は及ぼさなかった (データは示さず)。

一方 asORN4 とは異なり、asORN3 は *gpIFNA1* mRNA に加え、*gpIFN- $\alpha$ 1 AS* の発現にも制御効果を示した。asORN3 の導入は *gpIFN- $\alpha$ 1 AS* の発現を増大させ、その増加は感染後 24 時間に認

められたのち 36 時間で最大値に達し、asORN4 または ncasORN と比較し約 1.7 倍高い発現レベルを示した (Fig.4B、上)。

gp $IFN\alpha 1$  mRNA に関しては、asORN3 と asORN4 はウイルス感染 24 時間までは同様の発現レベルを誘導したが、asORN3 はその後 gp $IFN\alpha 1$  mRNA 発現レベルをさらに増大させ、gp $IFN\alpha 1$  AS の場合と同様に感染 36 時間後に最大値に引き上げた。AsORN3 導入細胞における gp $IFN\alpha 1$  mRNA の最大発現レベルは、asORN4 細胞に比較し約 65% 高値であった (Fig.4B、下)。

asORN4/3 導入細胞で観察された gp $IFN\alpha 1$  mRNA 発現の増大は、RIG-I (レチノイン酸誘導遺伝子-I) による asORN4/3 の直接認識や、これら asORN が gp $IFN\alpha 1$  mRNA に結合し形成する 2 本鎖 RNA の認識により誘導された結果とは考えなかった。これは、RIG-I による RNA 認識には 5' 端の三リン酸構造が必須であり<sup>1,32,33</sup>、化学合成された asORN4/3 にはこのリン酸基が付与されていないためである。

gp $IFN\alpha 1$  AS および gp $IFN\alpha 1$  mRNA の発現レベルは、asORN3 導入細胞が asORN4 導入細胞を上回っていたことから、モルモット感染モデルによる以下の POC 実験には asORN3 を用いることにした。

#### 104C1 細胞への導入による asORN3 の PLGA ナノ粒子への封入条件の至適化

gp $IFN\alpha 1$  AS/mRNA の発現を制御する asORN3 の *in vitro* での効果が、*in vivo* においても AS および mRNA の発現レベルを同様に制御し、その結果 PR/8 ウイルスの複製を阻害する可能性をモルモット感染モデルを用いて検証する目的で、asORN の気道投与のためのキャリアとして PLGA

ナノ粒子を選択した。PLGA は生分解性ポリマーナノ粒子<sup>34</sup>であり、A549 細胞における PLGA 粒子 (直径 400 nm を使用)の取り込み実験では、Vmax は細胞タンパク質 1 mg あたり 39.84  $\mu$ g であり、Km は 44  $\mu$ g/ml を示した<sup>28</sup>。

これまで PLGA は、*in vivo* 条件下にブタの動脈にプラスミド DNA を導入する実験<sup>35</sup>や、生体材料のインプラントモデルにおいて miR mimic を投与する実験<sup>36</sup>に使用報告があり、PLGA 単体投与によっては炎症性サイトカイン並びに IFN は発現しないとされる<sup>37</sup>。

本実験にあたって、PR/8 ウイルス感染 104C1 細胞に asORN3 を封入した PLGA ナノ粒子 (PLGA-asORN3)を導入し、gpIFN- $\alpha$ 1 AS と gpIFNA1 mRNA の発現量を指標に PLGA 粒子への asORN3 封入条件を至適化する予備実験を行った。この予備実験では、表面電荷 (ゼータ電位により測定)と粒子径 (直径)を変えた一連の PLGA ナノ粒子を作成し、これを用いて asORN3 量を至適化した。実際には、上記細胞に発現する gpIFN- $\alpha$ 1 AS/gpIFNA1 mRNA 量を最大にする asORN 含量とその発現に要する時間を検討した。

従来の実験<sup>38,39</sup>より、PLGA 粒子径を 1  $\mu$ m 以下に保持し、かつ粒子を構成するアミノ基をキトサンを用いてプロトン化することにより表面電荷を正に荷電させることが、本粒子の細胞取り込み効率を増加させることが既知であったので、本予備実験は、まず平均直径 157 nm、ゼータ電位+ 41 mV の PLGA 粒子を用いて asORN 3 を封入し、上記 RNA の発現条件を検討した。

104C1 細胞に PLGA-asORN3 (1.3 w/w%) または MATra 法のいずれかを用いて 3  $\mu$ g の asORN3 を導入し、gpIFNA1 mRNA の発現レベルを指標に asORN3 の導入効率を比較した。Fig.4B の結

果と同様に、PLGA-asORN3 は、導入後の経過時間に依存して *gpIFN $\alpha$ 1* mRNA 発現レベルを増大させた (Fig.5)。PLGA-asORN3 導入細胞における mRNA レベルは、PR / 8 ウイルス感染後 36 時間の時点で、ウイルス感染単独または PLGA 粒子のみを導入後ウイルスを感染させた対照細胞と比較して約 4 倍高値を示した (Fig.5、36 時間で PR / 8 ウイルスと vehicle を asORN3 と比較)。

一方、同一時点において PLGA-ncasORN 導入細胞は、対照細胞と比較して約 70% 高い *gpIFN $\alpha$ 1* mRNA 発現を示したが、それでも PLGA-asORN3 導入細胞の値と比較すると 40% 程度に過ぎなかった。しかしながら、本 PLGA-asORN3 による *gpIFN $\alpha$ 1* の発現効率は、MATra 法には及ばない結果であった (Fig.5、36 時間における PLGA と MATra を比較)。

以上の結果を受け、PLGA 粒子による asORN3 導入効率を改善するため、続いて以下の 2 ロットの PLGA-asORN3 を作成した。ロット A: 粒子径 78 nm、ゼータ電位 +30 mV および asORN3 封入率 1.46 w/w%; ロット B: 108 nm、+38 mV、2.10 w/w% であった。対応する PLGA-ncasORN は、それぞれ粒子径は 87nm または 85 nm、ゼータ電位はそれぞれ +28 mV、並びに封入率はそれぞれ 1.48 または 2.26 w/w% であった。

Fig.6 に示すように、ロット A の PLGA 粒子を用いて 3  $\mu$ g の asORN3 を導入した場合、MATra 法と比較し、*gpIFN- $\alpha$ 1* AS および mRNA 発現レベルはそれぞれ 150% および 163% 高い結果が得られた。一方、対応する PLGA-ncasORN が示す非特異的 *gpIFN- $\alpha$ 1* AS/*gpIFN $\alpha$ 1* mRNA の発現は PLGA-asORN3 に比較し各々およそ 46% 低い値を示した。ロット A の 6  $\mu$ g を投与した場合、並びにロット B の 3 および 6  $\mu$ g を投与した場合は共に、MATra 法による *gpIFN- $\alpha$ 1* AS および mRNA

の発現レベルを上回ることにはなかった。以上の結果に基づき PLGA-asORN3 は粒子径 78 nm、ゼータ電位+30 mV、asORN 封入率 1.46 w/w %を、又 PLGA-ncasORN はそれぞれ 87 nm、+28 mV、1.48 w/w%を至適条件として以降のモルモットを用いた POC 実験に使用した。

### PLGA-asORN 3 投与量に依存したモルモット気道中の PR/8 ウイルス力価の低下

asORN3 がインフルエンザウイルス感染モルモットの喉頭および気管組織において gpIFN- $\alpha$ 1 AS および mRNA 発現レベルを引き上げ、その結果ウイルス増殖阻害をもたらす可能性を検証するため、モルモットに 3  $\mu$ g の PLGA-asORN3 を単回投与した (Fig.7A, PLGA-asORN3/1)。その 6 時間後、モルモット気道に非致死量相当の PR/8 ウイルス( $10^6$  pfu/匹)を接種した。この asORN3 投与モルモットの半数には、ウイルス感染 18 時間後にさらに 3  $\mu$ g の asORN3 を追加投与した (Fig.7A、PLGA-asORN3 / 1 + 1)。

Fig.4B に示す *in vitro* 実験のデータ (Fig.4B) から予想されたように、経鼻投与した asORN3 は上気道並びに下気道において内在性の gpIFN- $\alpha$ 1 AS 発現レベルを増大させた。続く PR/8 ウイルス接種は、asORN3 および ncasORN 投与モルモット共に gpIFN- $\alpha$ 1 AS の発現を増加させたが、asORN3 投与モルモットにおける AS 発現は、投与 24 時間と 48 時間の観察期間において陰性対照の ncasORN 投与群に比べ 2.0 倍～4.9 倍高値を示した (Fig.7A 上、PLGA-asORN3/1 と PLGA-ncasORN を比較)。感染後 18 時間での asORN3 の追加投与により、感染後 24-48 時間の



時間帯における AS 発現レベルは ncasORN 投与群と比較し、3.6 倍から 6.1 倍の増加を示した

(Fig.7A、PLGA-asORN3/1+1 と PLGA-ncasORN を比較)。

asORN3 投与モルモットにおける gp $IFNA1$  mRNA 発現の時間経過は、gpIFN- $\alpha$ 1 AS のそれと同様であった。ウイルス感染に先立つ初回 asORN3 投与は、感染後 24～48 時間の時間帯で陰性対照と比較し gp $IFNA1$  mRNA のレベルを 4.9 倍から 4.0 倍に上昇させた (Fig.7A 下、

PLGA-asORN3/1 と PLGA-ncasORN を比較)。asORN3 の追加投与は、ncasORN 投与群と比較し

同一時間帯における gp $IFNA1$  mRNA の発現を 8.3 倍～4.8 倍に増加させた (Fig.7A 下段、

PLGA-asORN3/1+1 と PLGA-ncasORN を比較)。以上の結果は、asORN3 を導入した 104C1 細胞

の場合と同様に、PLGA-asORN3 の鼻腔投与により PR / 8 ウイルス感染モルモットの気道において

asORN3 による gpIFN- $\alpha$ 1 AS / mRNA 発現増大効果が再現可能であることを示した。

続いて、増大した gp $IFNA1$  mRNA レベルが asORN3 投与モルモットにおいて PR / 8 ウイルス力価の低下をもたらすか否かについて検討した。PR / 8 ウイルス接種は PLGA-ncasORN 投与モルモットにおいてウイルス感染に伴う gp $IFNA1$  mRNA の発現を誘導したが、この程度の自然免疫応答は接種した PR/8 ウイルスの上気道における複製を抑制するには十分ではなく、結果としてウイルス接種、感染後 36 時間に至るまで気道洗浄液中のウイルス力価は増加し続けた (Fig.7B)。一方、PLGA-asORN3 の単回投与は、PR/8 ウイルス接種、感染後 24 時間の 12%から 48 時間には 53% ( $p<0.01$ )のウイルス感染力価の低下をもたらした。

感染後 18 時間における asORN3 の追加投与はさらに有効で、感染後 24 時間で 23% ( $p<0.05$ )、36 時間で 40% ( $p<0.01$ )、および 48 時間で 67% ( $p<0.01$ ) の有意なウイルス力価の低下をもたらした (Fig.7B、PLGA-asORN3 / 1 + 1 を参照)。PR/8 ウイルスの単独感染も PLGA ナノ粒子の単体投与も、感染の臨床経過に影響を及ぼさず、PLGA-asORN3 あるいは PLGA-ncasORN 投与モルモットの直腸温並びに体重は実験経過中ほぼ一定の値を維持した (Fig.8)。

## 2-4 考察

gpIFN- $\alpha$ 1 AS の mRNA 認識部位からなる asORN が *in vivo* において gpIFN $\alpha$ 1 mRNA の発現を増大させ、抗ウイルス効果を示すことを実証するため、筆者は asORN を PR/8 ウイルス感染モルモット気道に投与し、gpIFN- $\alpha$ 1 AS 並びに同 mRNA 発現レベルに及ぼす影響を検討した。

この POC 実験には、I 型 IFN の下流遺伝子で重要な抗ウイルス性分子をコードする *Mx1* 遺伝子に変異しており、その機能が不全である BALB/c 並びに C57BL/6 といった汎用される実験用マウスは不適切と考えられた<sup>5,13</sup>。そこで、筆者は正常な *Mx1* 遺伝子をコードするモルモット<sup>7,12</sup>をモデル動物に採用することにした。

これまでに発表した研究<sup>1</sup>と第 1 章に述べた実験より、gpIFN $\alpha$ 1 を同定しその抗ウイルス活性の確認に成功した。続いて、モルモット 104C1 細胞に PR/8 ウイルスを感染させた場合、ヒト Namalwa B リンパ球細胞にセンダイウイルスを感染させた際と同様<sup>1</sup>に、gpIFN $\alpha$ 1 mRNA の発現動態に一致した発現パターンを示すことに着目し、gpIFN- $\alpha$ 1 AS が gpIFN $\alpha$ 1 mRNA の発現制御に関与する可能性を想定した。この仮説を検証すべく、gpIFN $\alpha$ 1 mRNA 配列から作成した seODN を用いて gpIFN $\alpha$ 1 mRNA と相互作用する AS RNA の機能ドメインを決定した。この gpIFN- $\alpha$ 1 AS 上の機能ドメイン配列からなる asORN3/4 を 104C1 細胞に導入したところ、gpIFN $\alpha$ 1 mRNA/AS の発現を増大させる効果が確認できたので(Fig.4B)、この asORN のモルモット気道への投与を可能にする Drug Delivery System として PLGA ナノ粒子を選択し、本粒子への asORN の封入条件を検討した。得られた至適条件下に asORN3 を封入した PLGA-asORN3 を作成し、この気道への投与が *in vitro*

実験結果と同様に gp*IFNA1* mRNA/AS の発現に影響を及ぼすか否かを検討したところ、gpIFN- $\alpha$ 1 AS の機能ドメインからなる asORN3 は PR/8 ウイルス感染モルモット気道において gp*IFNA1* mRNA の発現を増大し、その結果 PR/8 ウイルスの増殖を抑制することを証明した。この実験結果は、当研究室がこれまで報告してきた内在性の AS RNA-mRNA の発現制御ネットワーク<sup>1,3</sup>が、*in vivo*においても自然免疫を制御し、ウイルス感染を阻害することを示した。

タンパク質をコードしない non-coding RNA (ncRNA) の存在は 1965 年に初めて予想されたが<sup>40</sup>、今日においては全転写産物を網羅的に解析できる方法の開発により、全トランスクリプトームに ncRNA が占める割合は増加の一途にある<sup>20</sup>。LncRNA はこの ncRNA の一種であり、これをコードする RNA 遺伝子はヒトゲノムにおいて 120,353 種が明らかになっている (LNCipedia.org v 5.0.; <https://lncipedia.org>)<sup>41</sup>。しかしながら、lncRNA の大部分はバイオインフォマティクスに基づく解析により予測されたものにすぎず、その大部分の機能は明らかにされていない。したがって、lncRNA はその存在を確認するだけでは不十分であり、その機能を *in vitro* 並びに *in vivo* 実験により検証する必要がある<sup>42</sup>。

当研究室ではこれまでに *IFNA1* 遺伝子の逆鎖より転写される NAT であり、lncRNA である IFN- $\alpha$ 1 AS を同定し、本 NAT が *IFNA1* mRNA の発現を転写後性に制御する結果、IFN- $\alpha$ 1 タンパク質の産生を調節することを明らかにした<sup>1</sup>。IFN- $\alpha$ 1 AS は約 4 kb 長のスプライシングにより産生される lncRNA であり、*IFNA1* mRNA 二次構造上に存在する Bulged Stem Loop (BSL) と呼ぶ一本鎖領域を認識する結果、mRNA と二本鎖構造を形成することにより *IFNA1* mRNA を安定化する。この安定

化効果は、*IFNA1* mRNA の BSL 領域を認識する IFN- $\alpha$ 1 AS の配列からなる asORN を 104C1 細胞に導入する実験により検証した。すなわち、導入した asORN4 は、ncasORN を導入した細胞と比較し *IFNA1* mRNA の発現を数倍増大した (Fig.4B 下)。一方本 asORN は、ncasORN と同様に IFN- $\alpha$ 1 AS の発現レベルには影響を及ぼさないことが示された (Fig.4B 上)<sup>1</sup>。

IFN- $\alpha$ 1 AS には上述した sense-antisense 間の相互作用による安定化以外にも今一つ別の作用メカニズムが存在することをこれまでに報告している<sup>3</sup>。これは、IFN- $\alpha$ 1 AS が *IFNA1* mRNA と共有する miR response element (MRE)-1270 を介し miR-1270 を吸着し、mRNA への作用を阻害する ceRNA 効果に由来する。ヒト細胞においては、MRE-1270 配列からなる asORN が miR-1270 を吸着し、本 microRNA により生じる IFN- $\alpha$ 1 AS 並びに *IFNA1* mRNA の発現抑制を解除することが示されている<sup>3</sup>。

この結果は、gpIFN- $\alpha$ 1 AS レベルに影響しない asORN4 とは異なり、モルモット asORN3 はヒトと同様に MRE 配列を有し、miR による gpIFN- $\alpha$ 1 AS/mRNA の発現抑制を解除することで gp*IFNA1* mRNA の発現を増大する可能性を示唆した。そこで、asORN3 がモルモットの miR スポンジとして作用し、gpIFN- $\alpha$ 1 AS/mRNA の発現を増大する可能性を検討しようとしたが、現在 *Cavia porcellus* ゲノムに由来する miR のデータベースは存在しないことから、代えて *Cavia porcellus* の近縁種である *Cricetulus griseus*, *Mus musculus* 並びに *Rattus norvegicus* の miR データベース (miRbase: <http://www.mirbase.org/>)を利用し、asORN3 塩基配列を標的とする microRNA の有無を RegRNA2.0<sup>43</sup>(<http://regrna2.mbe.nctu.edu.tw/>)と RNAhybrid<sup>44</sup>

(<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/mahybrid/>)を用いて検索した。その結果、  
mmu-miR-5617-3p が asORN3 塩基配列を標的とすることが予測された(Table 6)ので、BLAST  
(<https://www.ensembl.org/index.html>)を用い、mmu-miR-5617-3p シード配列をモルモットゲノム上  
に検索した。その結果、scaffold\_99: 2408710-2408695 と scaffold\_25: 9297802-92978171 が  
mmu-miR-5617-3p の seed 配列と同一の塩基配列を有することから、これら Scaffold にコードされる  
モルモット microRNA が gpIFN- $\alpha$ 1 AS (Table 7), mRNA (Table 8)を標的とすることが予想された。  
Table 7 に示す asORN3 の配列には 6-mer MRE サイトが含まれているので<sup>45</sup> (Table 7 参照)、  
asORN3 導入細胞に観察された gpIFN- $\alpha$ 1 AS/mRNA 発現レベルの増大は、asORN3 がこの予想さ  
れた miR に拮抗することで gpIFN- $\alpha$ 1 AS/mRNA の発現抑制を解除したものであることを強く示唆し  
た。

さらに、asORN4 が gp*IFNA1* mRNA に特異的にその発現を増大させたことは、ヒトと同様に  
gpIFN- $\alpha$ 1 AS が mRNA を認識する機能ドメインを用いて mRNA 上の標的配列に対し一過性に二  
本鎖を形成することにより gp*IFNA1* mRNA を安定化し、その発現を増大することを示唆した。

以上の結果は、ヒト、モルモットの IFN- $\alpha$ 1 AS による mRNA 安定化の分子作用メカニズムを明ら  
かにするもので、これらの asORN が *IFNA1* mRNA レベルを制御し、ウイルス感染に対する I 型 IFN  
応答を誘導することによりウイルス感染症の予防、治療を可能にすると考えられる。実際、Cochらに  
よる近年の報告<sup>46</sup>では、インフルエンザウイルス感染には I 型 IFN による治療が有効かつ十分であ  
ることが示されている。

IFN は、感染細胞内における dsRNA 等感染ウイルスに特異的な産物の検出に応じて発現され、細胞外に分泌される。隣接細胞表面上の IFN 受容体への結合は、抗ウイルス性遺伝子すなわち IFN 刺激応答遺伝子 (ISG) の発現を増大させる。中でも、ウイルスヌクレオカプシドの核内移行およびその複製を阻害する Mx ファミリー GTPase およびウイルスエンベロープとエンドソーム膜間の融合を阻害する IFN-induced transmembrane (IFITM) ファミリー (特に IFITM3) が ISG としてよく知られる<sup>47</sup>。これらの知見は、IFN がインフルエンザウイルスの複製と感染を分子レベルで有効に抑制することを示す。I 型 IFN によるウイルス複製の阻害は、感染細胞のみならず周囲の非感染細胞への感染波及を阻害することによっても成立することから、asORN により IFN 誘導性に抗ウイルス活性を発現させることは、ウイルスの侵入と複製の両者の阻害を通じ、感染予防のみならず感染後の治療にも応用可能となる。

実際、PR/8 ウイルス感染前のモルモットへの asORN3 投与は、咽頭及び気管組織における IFN- $\alpha$ 1 AS/mRNA の発現を対照細胞よりも高いレベルに引き上げ、感染後 48 時間まで気道内のウイルスの低下をもたらしていた (Fig.7)。加えて、ウイルス感染後に追加投与した場合にも、IFN- $\alpha$ 1 AS/mRNA を有意に増大させ、PR/8 ウイルス力価を有意に低下させていた (Fig.7)。これらの結果は I 型 IFN の発現制御がインフルエンザウイルス感染の予防のみならず感染治療にも有用である可能性を強く示唆する。

結論として、筆者は NAT-mRNA 制御系が *IFNA1* mRNA の発現と、引き続く IFN- $\alpha$  タンパク質の産生を制御し、生体中で A 型インフルエンザウイルスの複製阻害を可能にすることを実験的に証

明した。今後、asORN の塩基配列と投与プロトコルの至適化によりヒトインフルエンザウイルス感染

に対する予防と治療に応用可能な新規核酸医薬の開発が加速すると思われる。



## 結語

近年、ヒトゲノム解析などを含む遺伝子に関する研究の進展とともに、遺伝子の発現を制御する核酸医薬に注目が集まっている。この核酸医薬は、用いる DNA/RNA の特徴から標的遺伝子の逆鎖配列に由来する DNA オリゴである Antisense oligonucleotide (ASO)、silencing RNA (siRNA)、microRNA、microRNA に拮抗する antagomiR、アプタマー、プラスミドなどに分類できる<sup>48</sup>。ASO は遺伝子の逆鎖配列からなる DNA オリゴであり、ASO と mRNA が形成する DNA-RNA ハイブリッド二本鎖を内因性の RNaseH が認識し、mRNA を特異的に分解するものである。この方法を用いた医薬品にサイトメガロウイルス網膜炎治療薬の Fomivirsen があり、1998 年に上市されている<sup>48</sup>。

SiRNA や microRNA はこれらが標的 mRNA と結合し RNA-induced

silencing complex (RISC)形成を介し、標的 mRNA の発現を抑制するもので、vascular endothelial growth factor (VEGF)を標的とする Bevasiranib などが臨床試験段階にある。この他、microRNA の逆鎖からなる配列を有する antagomiR がある<sup>48</sup>。この方法には、C 型肝炎ウイルス感染に対する治療薬候補である Miravirsen があり、現在臨床試験段階である。アプタマーは対象タンパク質に結合することで対象タンパク質が他のタンパク質に結合できなくするもので、VEGF165 を標的にし加齢黄斑変性症治療に用いる Pegaptanib がある<sup>48</sup>。プラスミドを用いたものはデング熱のワクチンとして使用されることを想定した TVDV が臨床試験段階である<sup>48</sup>。

当研究室が採用した asORN による方法は、lncRNA である NAT の mRNA 認識配列からなる RNA オリゴを用い、転写後性に *IFNA1* mRNA の発現を増大させるものである。この方法は内在性

の NAT を利用することにより標的 mRNA への親和性を改善しており、また RNA オリゴを利用することにより従来法では不可能であった遺伝子の発現増大を可能にしていることから<sup>49</sup>、従来の核酸医薬候補と比較しより有効な遺伝子の発現制御が期待できる。

本学位論文の結果より、これまでヒト Namalwa 細胞で報告した IFN- $\alpha$ 1 AS による同 mRNA の安定化効果を、その機能ドメイン塩基配列から作成した asORN を用いて生体中に再現するとともに、*IFNA1* mRNA 発現の増大が感染ウイルス力価の低下をもたらすことを示した。これらの結果は、ヒトインフルエンザウイルス感染に対する予防と治療の両方に応用が可能な新規核酸医薬の開発を可能にすると考ええる。

## 参考文献

- 1 Kimura, T. *et al.* Stabilization of human interferon-alpha1 mRNA by its antisense RNA. *Cell Mol Life Sci* **70**, 1451-1467, doi:10.1007/s00018-012-1216-x (2013).
- 2 Kimura, T., Hashimoto, I., Nagase, T. & Fujisawa, J. CRM1-dependent, but not ARE-mediated, nuclear export of IFN-alpha1 mRNA. *J Cell Sci* **117**, 2259-2270, doi:10.1242/jcs.01076 (2004).
- 3 Kimura, T., Jiang, S., Yoshida, N., Sakamoto, R. & Nishizawa, M. Interferon-alpha competing endogenous RNA network antagonizes microRNA-1270. *Cell Mol Life Sci* **72**, 2749-2761, doi:10.1007/s00018-015-1875-5 (2015).
- 4 Tumpey, T. M. *et al.* The Mx1 gene protects mice against the pandemic 1918 and highly lethal human H5N1 influenza viruses. *J Virol* **81**, 10818-10821, doi:10.1128/JVI.01116-07 (2007).
- 5 Staeheli, P., Grob, R., Meier, E., Sutcliffe, J. G. & Haller, O. Influenza virus-susceptible mice carry Mx genes with a large deletion or a nonsense mutation. *Mol Cell Biol* **8**, 4518-4523 (1988).
- 6 Haller, O., Frese, M. & Kochs, G. Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses. *Rev Sci Tech* **17**, 220-230 (1998).
- 7 Van Hoeven, N. *et al.* Pathogenesis of 1918 pandemic and H5N1 influenza virus infections in a guinea pig model: antiviral potential of exogenous alpha interferon to reduce virus shedding. *J Virol* **83**, 2851-2861, doi:10.1128/JVI.02174-08 (2009).
- 8 Haller, O. Inborn resistance of mice to orthomyxoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **92**, 25-52 (1981).
- 9 Lu, Y. *et al.* The interferon-alpha gene family of Marmota himalayana, a Chinese marmot species with susceptibility to woodchuck hepatitis virus infection. *Dev Comp Immunol* **32**, 445-457, doi:10.1016/j.dci.2007.08.003 (2008).
- 10 Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-4680 (1994).
- 11 Doreswamy, R. *et al.* Interferon Alpha Characterization and Its Comparative Expression in PBM Cells of Capra hircus and Antelope cervicapra Cultured in the Presence of TLR9 Agonist. *Mol Biol Int* **2010**, 573426, doi:10.4061/2010/573426 (2010).
- 12 Horisberger, M. A. & Gunst, M. C. Interferon-induced proteins: identification of Mx proteins in various mammalian species. *Virology* **180**, 185-190 (1991).
- 13 Grimm, D. *et al.* Replication fitness determines high virulence of influenza A virus in mice carrying functional Mx1 resistance gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 6806-6811,

- doi:10.1073/pnas.0701849104 (2007).
- 14 Mercer, T. R., Dinger, M. E. & Mattick, J. S. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet* **10**, 155-159, doi:10.1038/nrg2521 (2009).
  - 15 Bonasio, R. & Shiekhattar, R. Regulation of transcription by long noncoding RNAs. *Annu Rev Genet* **48**, 433-455, doi:10.1146/annurev-genet-120213-092323 (2014).
  - 16 Sigova, A. A. *et al.* Divergent transcription of long noncoding RNA/mRNA gene pairs in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 2876-2881, doi:10.1073/pnas.1221904110 (2013).
  - 17 Guttman, M. *et al.* Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature* **458**, 223-227, doi:10.1038/nature07672 (2009).
  - 18 Ulitsky, I., Shkumatava, A., Jan, C. H., Sive, H. & Bartel, D. P. Conserved function of lincRNAs in vertebrate embryonic development despite rapid sequence evolution. *Cell* **147**, 1537-1550, doi:10.1016/j.cell.2011.11.055 (2011).
  - 19 Djebali, S. *et al.* Landscape of transcription in human cells. *Nature* **489**, 101-108, doi:10.1038/nature11233 (2012).
  - 20 Kopp, F. & Mendell, J. T. Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs. *Cell* **172**, 393-407, doi:10.1016/j.cell.2018.01.011 (2018).
  - 21 Varilh, J., Bonini, J. & Taulan-Cadars, M. Role of Non-coding RNAs in Cystic Fibrosis. doi:10.5772/60449 (2015).
  - 22 Nishizawa, M., Ikeya, Y., Okumura, T. & Kimura, T. Post-transcriptional inducible gene regulation by natural antisense RNA. *Front Biosci (Landmark Ed)* **20**, 1-36 (2015).
  - 23 Nishizawa, M., Okumura, T., Ikeya, Y. & Kimura, T. Regulation of inducible gene expression by natural antisense transcripts. *Front Biosci (Landmark Ed)* **17**, 938-958 (2012).
  - 24 Lee, S. *et al.* Noncoding RNA NORAD Regulates Genomic Stability by Sequestering PUMILIO Proteins. *Cell* **164**, 69-80, doi:10.1016/j.cell.2015.12.017 (2016).
  - 25 Tichon, A. *et al.* A conserved abundant cytoplasmic long noncoding RNA modulates repression by Pumilio proteins in human cells. *Nat Commun* **7**, 12209, doi:10.1038/ncomms12209 (2016).
  - 26 Tay, Y., Rinn, J. & Pandolfi, P. P. The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition. *Nature* **505**, 344-352, doi:10.1038/nature12986 (2014).
  - 27 Tahara, K. *et al.* Improved cellular uptake of chitosan-modified PLGA nanospheres by A549 cells. *Int J Pharm* **382**, 198-204, doi:10.1016/j.ijpharm.2009.07.023 (2009).
  - 28 Yamamoto, H., Kuno, Y., Sugimoto, S., Takeuchi, H. & Kawashima, Y. Surface-modified PLGA nanosphere with chitosan improved pulmonary delivery of calcitonin by mucoadhesion and opening of the intercellular tight junctions. *J Control Release* **102**, 373-381, doi:10.1016/j.jconrel.2004.10.010 (2005).

- 29 Forsbach, A. *et al.* Identification of RNA sequence motifs stimulating sequence-specific TLR8-dependent immune responses. *J Immunol* **180**, 3729-3738 (2008).
- 30 Zuker, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* **31**, 3406-3415 (2003).
- 31 Bauer, S. *et al.* Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9237-9242, doi:10.1073/pnas.161293498 (2001).
- 32 Takahasi, K. *et al.* Nonself RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses. *Mol Cell* **29**, 428-440, doi:10.1016/j.molcel.2007.11.028 (2008).
- 33 Zheng, C. & Wu, H. RIG-I "sees" the 5'-triphosphate. *Structure* **18**, 894-896, doi:10.1016/j.str.2010.07.002 (2010).
- 34 Tahara, K., Tadokoro, S., Yamamoto, H., Kawashima, Y. & Hirashima, N. The suppression of IgE-mediated histamine release from mast cells following exocytic exclusion of biodegradable polymeric nanoparticles. *Biomaterials* **33**, 343-351, doi:10.1016/j.biomaterials.2011.09.043 (2012).
- 35 Klugherz, B. D. *et al.* Gene delivery from a DNA controlled-release stent in porcine coronary arteries. *Nat Biotechnol* **18**, 1181-1184, doi:10.1038/81176 (2000).
- 36 Moore, L. B., Sawyer, A. J., Saucier-Sawyer, J., Saltzman, W. M. & Kyriakides, T. R. Nanoparticle delivery of miR-223 to attenuate macrophage fusion. *Biomaterials* **89**, 127-135, doi:10.1016/j.biomaterials.2016.02.036 (2016).
- 37 Koenig, O. *et al.* RNA-Eluting Surfaces for the Modulation of Gene Expression as A Novel Stent Concept. *Pharmaceuticals (Basel)* **10**, doi:10.3390/ph10010023 (2017).
- 38 Lowen, A. C., Mubareka, S., Steel, J. & Palese, P. Influenza virus transmission is dependent on relative humidity and temperature. *PLoS Pathog* **3**, 1470-1476, doi:10.1371/journal.ppat.0030151 (2007).
- 39 Tluk, S. *et al.* Sequences derived from self-RNA containing certain natural modifications act as suppressors of RNA-mediated inflammatory immune responses. *Int Immunol* **21**, 607-619, doi:10.1093/intimm/dxp030 (2009).
- 40 Harris, H. History: Non-coding RNA foreseen 48 years ago. *Nature* **497**, 188, doi:10.1038/497188d (2013). .
- 41 Volders, P. J. *et al.* An update on LNCipedia: a database for annotated human lncRNA sequences. *Nucleic Acids Res* **43**, D174-180, doi:10.1093/nar/gku1060 (2015).
- 42 Polovic, M. *et al.* Identification of a novel lncRNA induced by the nephrotoxin ochratoxin A and expressed in human renal tumor tissue. *Cell Mol Life Sci* **75**, 2241-2256, doi:10.1007/s00018-017-2731-6 (2018).

- 43 Chang, T. H. *et al.* An enhanced computational platform for investigating the roles of regulatory RNA and for identifying functional RNA motifs. *BMC Bioinformatics* **14 Suppl 2**, S4, doi:10.1186/1471-2105-14-S2-S4 (2013).
- 44 Rehmsmeier, M., Steffen, P., Hochsmann, M. & Giegerich, R. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA* **10**, 1507-1517, doi:10.1261/rna.5248604 (2004).
- 45 Bartel, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**, 215-233, doi:10.1016/j.cell.2009.01.002 (2009).
- 46 Coch, C. *et al.* RIG-I Activation Protects and Rescues from Lethal Influenza Virus Infection and Bacterial Superinfection. *Mol Ther* **25**, 2093-2103, doi:10.1016/j.ymthe.2017.07.003 (2017).
- 47 Killip, M. J., Fodor, E. & Randall, R. E. Influenza virus activation of the interferon system. *Virus Res* **209**, 11-22, doi:10.1016/j.virusres.2015.02.003 (2015).
- 48 Chen, C., Yang, Z. & Tang, X. Chemical modifications of nucleic acid drugs and their delivery systems for gene-based therapy. *Med Res Rev* **38**, 829-869, doi:10.1002/med.21479 (2018).
- 49 Hagedorn, P. H., Hansen, B. R., Koch, T. & Lindow, M. Managing the sequence-specificity of antisense oligonucleotides in drug discovery. *Nucleic Acids Res* **45**, 2262-2282, doi:10.1093/nar/gkx056 (2017).

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導ご鞭撻賜りました指導教員の木村 富紀教授、大高 時文研究員並びに共同研究いただきましたホソカワミクロン株式会社の塚田 雄亮氏と辻本 広行氏に深謝します。どうもありがとうございました。

また、お世話になりました多くの方々にこの場を借りて深く感謝申し上げます。

# 図表

Table 1. Primers used for PCR cloning of *cpIFNA1* candidate genes

Chromosome 2 - <i>C. porcellus IFNA1</i> candidate 1 gene cloning <sup>1</sup>		
Primer	Strand	5' – 3'
FlankF	Reverse strand 77584 - 77558	AGCCCAGCAGCATCAGCAGGATTACCC
FlankR	Reverse strand 76694 - 76739	CACAACATGTTTTATTAAAGTAACAGCATGCAGATGTTTAATGTAA
F	Reverse strand 77557 - 77533	cccaagcttATGGCCTGGCCATTGTCTGGACTGG
R	Reverse strand 76994 - 77029	gctctagaTTAGTCTTGCATCTTTCTTGCCAGTTTTTCTGATGC
Chromosome 2 - <i>C. porcellus IFNA1</i> candidate 2 gene cloning <sup>1</sup>		
FlankF	Plus strand 180600 - 180637	CATTIAGGAAATCATAATCTACAAAAGTGCCTGTGGCA
FlankR	Plus strand 182152 - 182125	CGTCCTCTGCTCCCCCTCTGCAATCAAAT
F	Plus strand 180878 - 180904	cccaagcttATGGCCTGGCCATTGACTGGATTGGTG
R	Plus strand 181441 - 181407	gctctagaTTAGTCCCGCATCTTTCTCAACAGTTTTTCTGATG
Chromosome 2 - <i>C. porcellus IFNA1</i> candidate 3 gene cloning <sup>1</sup>		
FlankF	Reverse strand 114638 - 114611	AAGTGCATATGGCCTGTGGAGTGAAGGA
FlankR	Reverse strand 113508 - 113543	GAGCAAATGTAAAGAACATGTTTTATTAAGTGAAT
F	Reverse strand 114383 - 114357	cccaagcttATGGCCTGGCCATTGACTGGATTGGTG
R	Reverse strand 113820 - 113846	gctctagaTTAGTGCTGCATCTTTCTCAACAGTTC

<sup>1</sup>The flanking restriction sites are in lower case type



Table 2. List of *Cavia porcellus* IFNA family genes

SCAFFOLD	STRAND	START	END	Nucleotide length	Amino acid length
2	+	141469	142032	564	187
2	+	173473	174036	564	187
2	+	180878	181441	564	187
2	+	229967	230530	564	187
2	+	514857	515408	552	183
2	+	518755	519300	546	181
2	+	542518	543081	564	187
2	-	373323	372760	564	187
2	-	320314	319751	564	187
2	-	243481	242918	564	187
2	-	131817	131254	564	187
2	-	114383	113820	564	187
2	-	77557	76994	564	187
2	-	30926	30363	564	187
2	-	21092	20532	561	186

Table 3. Homology search results of the three *cpIFNA1* candidates with the highest homology against *Homo sapiens*, *Mus musculus* and *Marmota himalayana* IFNA1 genes

<i>CpIFNA1</i> candidates	Location	Percent homology of <i>cpIFNA1</i> against each IFNA1 listed below					
		<i>Homo sapiens IFNA1</i>		<i>Mus musculus IFNA1</i>		<i>Marmota himalayana IFNA1</i>	
		Nucleotides	Amino acids	Nucleotides	Amino acids	Nucleotides	Amino acids
1	Scaffold 2 (77557-76994)	74.8.%	55.9.%	72.0.%	56.1.%	68.0.%	47.7.%
2	Scaffold 2 (180878-181441)	70.9.%	49.5.%	69.8.%	49.4.%	65.1.%	44.6.%
3	Scaffold 2 (114324-113820)	74.3.%	57.2.%	71.9.%	59.4.%	67.8.%	46.6.%
		Percent homology of <i>cpIFNA1</i> IFN signature against each IFNA1 listed below					
		<i>Homo sapiens IFNA1</i>		<i>Mus musculus IFNA1</i>		<i>Marmota himalayana IFNA1</i>	
		Nucleotides	Amino acids	Nucleotides	Amino acids	Nucleotides	Amino acids
1	Scaffold 2 (77557-76994)	82.5.%	79.0.%	86.0.%	84.2.%	87.7.%	89.5.%
2	Scaffold 2 (180878-181441)	82.5.%	68.4.%	82.5.%	68.4.%	84.2.%	73.7.%
3	Scaffold 2 (114324-113820)	80.7.%	79.0.%	84.2.%	73.7.%	87.7.%	84.2.%

Table 4. Antisense oligoribonucleotides employed to over-express the functional domain of gpIFN-Alpha1 AS

Name	Location	Sequence <sup>1</sup>
asORN3	<i>cpIFNA1</i> nt 270-252	G(M*)A(M*)G(M*)G(M*)U(M*)U(M*)G(M*)A(M*)A(M*)G(M*)G(M*) U(M)C(M*)U(M*)G(M*)C(M*)C(M*)U(M*)G(M*)-
asORN4	<i>cpIFNA1</i> nt 288-270	U(M*)G(M*)A(M*)G(M*)U(M*)C(M*)C(M*)U(M*)C(M*)U(M*)G(M*) A(M*)U(M*)C(M*)U(M*)G(M*)A(M*)A(M*)G(M*)-
ncasORN	negative control	C(M*)U(M*)C(M*)C(M*)A(M*)A(M*)C(M*)U(M*)U(M*)C(M*)C(M*) A(M*)G(M*)A(M*)C(M*) G(M*)G(M*)A(M*)C(M*)-

<sup>1</sup>An M indicates 2' -O-methylation and an asterisk indicates a phosphorothioate bond.

Table 5. Primers used for silencing guinea pig IFN-Alpha1 AS1

Name	Sequence <sup>1</sup>	Nucleotide number of <i>IFNA1</i> of <i>C. porcellus</i>
seODN2	C*T*T*CCATGAGATGACCA*G*G*C	237-256
seODN3	C*A*G*GCAGACCTTCAAC*C*T*C	252-270
seODN4	C*T*T*CAGATCAGAGGAC*T*C*A	270-288
seODN5	G*A*G*GACTCATCTGCTG*C*C*T	280-298
seODN6	C*T*G*CCTGGAACCAGAG*T*C*T	293-311

<sup>1</sup>An asterisk indicates a phosphorothioate bond.

Table 6. gpasORN3 includes a MRE for mmu-miR-5617-3p

Name	Target sequence <sup>1</sup>
gpasORN3	<div style="text-align: center;">A      U</div> <div style="text-align: center;">5' - GAG GUUG AGG <b>CUGCCUG</b>-3'</div> <div style="text-align: center;">CUC CGAC UCC <b>GGCGGAC</b>-5'</div> <div style="text-align: center;">3' -UCA      U</div>
mmu-miR-5617-3p	

<sup>1</sup>The predicted mmu-miR-5617p seed region and the 6-mer MRE site in gpasORN3 are bolded

Table 7. Sequences and locations of target sites matching *Cavia porcellus* homologues of mmu-miR-5617-3p in the guinea pig genome that overlaps *IFNA1* in a reverse orientation

Guinea pig scaffolds	Target sites <sup>1</sup>	Target sequences	Characterization <sup>2</sup>
Scaffold_99: 2408710-2408695			
Scaffold_25: 9297802-9297817			
Target		5' -A      A      U      G-3'	Mfe: -27.0 kcal/mol
miRNA		GGUUG AGG <b>CUGCCUG</b> UCGAC UCC <b>GGCGGAC</b> -5'	Nt: 296-313 (asORN3) 6-mer site
		3' -C	
Target		5' -UCU      AC      C-3'	Mfe: -16.2 kcal/mol
miRNA		CUGG <b>CUGCUUG</b> GACU <b>GGCGGAC</b> -5'	Nt: 346-361 6-mer site
		3' -CUC      CC	
Scaffold_1086: 8283-8269			
Scaffold_414: 153840-153826			
Scaffold_257: 149027-149013			
Scaffold_96: 965907-965921			
Scaffold_96: 2849003-2849017			
Scaffold_58: 969065-969079			
Scaffold_43: 7544061-7544075			
Scaffold_14: 25052975-25052989			
Scaffold_1: 3700321-3700335			
Target		5' - A      A      U      G-3'	Mfe: -27.0 kcal/mol
miRNA		GGUUG AGG <b>CUGCCUG</b> 3' - UCGAC UCC <b>GGCGGAC</b> -5'	Nt: 297-313 6-mer site
Target		5' -CU      AC      C-3'	Mfe: -16.2 kcal/mol
miRNA		CUGG <b>CUGCUUG</b> GACU <b>GGCGGAC</b> -5'	Nt: 347-361 6-mer site
		3' -UC      CC	
Scaffold_28: 15050517-15050535			
Target		5' -A      UU A      U      G-3'	Mfe: -29.7 kcal/mol
miRNA		GAG G      G AGG <b>CUGCCUG</b> CUC C      C UCC <b>GGCGGAC</b> -5'	Nt: 294-313 6-mer site
		3' -A      U GG	

<sup>1</sup>Target: predicted target site including MRE (bolded); miRNA: *Cavia porcellus* homologues of mmu-miR-5617-3p, in which Seed regions are bolded.; <sup>2</sup>Mfe: minimum free energy; Nt: nucleotide

number of the target site in gpIFN-Alpha1 AS (nt 564 of *Cavia porcellus IFNA1* was numbered as 1); 6mer-site: type of MRE originally classified by Bartel (45).

Table 8. Sequences and locations of target sites in the guinea pig *IFNA1* matching *Cavia porcellus* homologues of mmu-miR-5617-3p

Guinea pig scaffolds	Target sites <sup>1</sup>	Target sequences	Characterization <sup>2</sup>
Scaffold_99: 2408710-2408695 Scaffold_25: 9297802-9297817			Mfe: -20.7 kcal/mol Nt: 275-299
Target  miRNA	5' -GAUCA  GAG  CUC  3' -CUCGA	GACUCAUCU  G-3'  GCUGCCUG  CGGCGGAC -5'	Mfe: -20.7 kcal/mol Nt: 275-299 7mer-m8 site
Target  miRNA	5' -CACUUUCUC  CUGCCUG  GGCGGAC  3' -CUCGACUCC	A-3'  -5'	Mfe: -16.2 kcal/mol Nt: 144-159 6-mer site
Scaffold_1086: 8283-8269 Scaffold_414: 153840-153826 Scaffold_257: 149027-149013 Scaffold_96: 965907-965921 Scaffold_96: 2849003-2849017 Scaffold_58: 969065-969079 Scaffold_43: 7544061-7544075 Scaffold_14: 25052975-25052989 Scaffold_1: 3700321-3700335			Mfe: -20.7 kcal/mol Nt: 276-299 7mer-m8 site
Target  miRNA	5' -GAUCA  GAG  CUC  3' -CUCGA	GACUCAUCU  G-3'  GCUGCCUG  CGGCGGAC -5'	Mfe: -20.7 kcal/mol Nt: 276-299 7mer-m8 site

Target	5' -CACUUUCUC A-3'	Mfe: -16.2 kcal/mol
miRNA	<p style="text-align: center;"><b>CUGCCUG</b></p> <p style="text-align: center;"><b>GGCGGAC</b> -5'</p> <p>3' -CUCGACUCC</p>	<p>Nt: 145-159</p> <p>6-mer site</p>
<b>Scaffold_28: 15050517-15050535</b>		
Target	5' -A A CAUCU G-3'	Mfe: -24.4 kcal/mol
miRNA	<p style="text-align: center;">GAGG CU <b>GCUGCCUG</b></p> <p style="text-align: center;">CUCU GG <b>GGCGGAC</b> -5'</p> <p>3' - A C CUC</p>	<p>Nt: 279-299</p> <p>7mer-m8 site</p>
Target	5' -A AUUU ACUUUCUC A-3'	Mfe: -20.3 kcal/mol
miRNA	<p style="text-align: center;">GAGA CC <b>CUGCCUG</b></p> <p style="text-align: center;">CUCU GG <b>GGCGGAC</b> -5'</p> <p>3' -A C CUCC</p>	<p>Nt: 134-159</p> <p>6-mer site</p>
Target	5' -C CU U G AAUACUCCACA AUCA A-3'	Mfe: -15.2 kcal/mol
miRNA	<p style="text-align: center;">UGA G GC GA GG <b>CUGUCU</b></p> <p>3' - ACU C CG CU CC <b>GGCGGA</b></p> <p style="text-align: center;">U C-5'</p>	<p>Nt: 422-458</p> <p>6-mer site</p>

<sup>1</sup>Target: predicted target site including MRE (bolded); miRNA: *Cavia porcellus* homologues of mmu-miR-5617-3p, in which Seed regions are bolded.;<sup>2</sup>Mfe: minimum free energy; Nt: nucleotide number of the target site in *Cavia porcellus IFNA1*; 7mer-m8 site: type of MRE originally classified by Bartel (45).

+1 60  
 atggcctggccattgtctggactgggtggccctgctggtgctcaccatcatggcatcaggc  
 M A W P L S G L V A L L V L T I M A S G  
 120  
 tctctggcgtgcaccctgccacagaccacagccagaggaatgcaagggccctgcttctc  
 S L A C T L P Q T H S Q R N A R A L L L  
 180  
 ctggaacaaatgaagagaatttccactttctcctgcctgaagcacagacaggactttgga  
 L E Q M K R I S T F S C L K H R Q D F G  
 240  
 ttggcccagctgaactttgatggcaagcaggtccagaaggctcaggtcctctctctcttc  
 L A Q L N F D G K Q V Q K A Q V L S L F  
 300  
 catgagatgaccaggcagaccttcaacctcttcagatcagaggactcatctgctgcctgg  
 H E M T R Q T F N L F R S E D S S A A W  
 360  
 aaccagagtctccttgacaccttctgcaatggcctccatcaacagctgagtgcctgcag  
 N Q S L L D T F C N G L H Q Q L S D L Q  
 420  
 gcctgcctgaccaggaggtggggctggaagagcctctcgtgatgcatgaggactccaga  
 A C L T Q E V G L E E P L V M H E D S R  
 480  
 ctgactgtgcggaaatacttccacaggatcactgtctacctgaaggagaagagctatagc  
 L T V R K Y F H R I T V Y L K E K S Y S  
 540  
 ccttgctgcctgggaggtgggtcagagcagaaattgtcagatccttctctgcatcagaaaaa  
 P C A W E V V R A E I V R S F S A S E K  
 600  
 ctggcaagaaagatgcaagactaaagaatgagtctgggtttaacacggaatggttgtca  
 L A R K M Q D \*  
 660  
 ttaaccttatcacactttcacagttctaccatttgaagactctcatttaatttctctcca

**A**

710  
 taacatgctttattttgtccaaagttttcaggagtactgggcaacactgtg

<i>CpIFNA1</i> candidate1 protein	MAWPLSGLVALLVLTIMASGSLACTLPQTHSQ-----RNARALLLLEQ 43
<i>Homo sapiens</i> IFN-alpha1	MASPFALLMVLVLSCKSSCSLGCPLPETHSL-----DNRRTLMLLAQ 43
<i>Mus musculus</i> IFN-alpha1	MARLCAFLMVLAVLSYWPCTSLGCDLPQTHNL-----RNKRALTLLVQ 43
<i>Marmota himalayana</i> IFN-alpha1	MALPLAFLALVVLSCKNTCSLGCPLPQIHNLGLETSEENEEGALTCLEK 50
	** : *:* * *: : **.* *: * : : * * :
<i>CpIFNA1</i> candidate1 protein	MKRISTFSLKHRQDFGLAQLNFDGKQVQKAQVLSLFHEMTRQTFNLF 93
<i>Homo sapiens</i> IFN-alpha1	MSRISPSSCLMDRHDFGFPQEEFDGNQFQKAPAI SVLHELIIQQIFNLFTT 93
<i>Mus musculus</i> IFN-alpha1	MRRLSPLSCLKDRKDFGFPQEKVDAQKKAQIPVLSLTQQILNIFTS 93
<i>Marmota himalayana</i> IFN-alpha1	MRRIPIFSLNRYKDFAFPQEQLEGEQVQKTQAVAVLHQMTQQILNLFST 100
	* * : . *** * : * : . * : : : : : : : : : : : : : : : :
<i>CpIFNA1</i> candidate1 protein	EDSSAAWNQSLLDTFCNGLHQQLSDLQACLTQEVGLEEPLVMHEDSRLTV 143
<i>Homo sapiens</i> IFN-alpha1	KDSSAAWDEDLDFKCTELYQQLNDLEACVMQEERVGETPLMNADSI LAV 143
<i>Mus musculus</i> IFN-alpha1	KDSSAAWNTLLDSCNDLHQQLNDLQGCLMQQVGVEFPLTQEDALLAV 143
<i>Marmota himalayana</i> IFN-alpha1	QKAFVWDKTLTDLFSLGLYQLLDDLKACGSKQVGVE-----VV 140
	: : * : * : ***.* . * : * * : * : * : : : * . *
	IFN-alpha, beta, delta signature (candidate1 146-164)
<i>CpIFNA1</i> candidate1 protein	RKYFHRITVYLKEKSYSPCAWEVVR AEIVRSFSASEKLARKMQD----- 187
<i>Homo sapiens</i> IFN-alpha1	KKYFRRITLYLTEKKYSPCAWEVVR AEIMRSLSLSTNLQERLRRKE---- 189
<i>Mus musculus</i> IFN-alpha1	RKYFHRITVYLREKHSYSPCAWEVVR AEVWRALSSANVLGRLREEK---- 189
<i>Marmota himalayana</i> IFN-alpha1	RKYFHRITVYLKEKYLPCAEVVRTEIMKSFSLSVNLYERLRSMEGDLV 190
	: *** : *** : * * : : ***** : * : : : * * : : : :
<i>CpIFNA1</i> candidate1 protein	-----
<i>Homo sapiens</i> IFN-alpha1	-----
<i>Mus musculus</i> IFN-alpha1	-----
<i>Marmota himalayana</i> IFN-alpha1	QQGNASH 197

## B

Figure 1

Characterization of the *Cavia porcellus* *IFNA1* candidate 1 nucleotide and deduced amino acid sequences. (A) The nucleotide sequence of *IFNA1* candidate 1 from *Cavia porcellus* is shown. The deduced amino acid sequence is indicated below the nucleotide sequence. Nucleotide residues in the coding sequence are numbered with respect to the initiation codon. \* denotes stop codon. (B) Comparison of amino acid sequences for the IFN-Alpha1 proteins. Amino acid sequences of the potential IFN-Alpha1 protein encoded by *cpIFNA1* candidate 1 are aligned to *IFNA1* sequences from *Homo sapiens*, *Mus musculus* and *Marmota himalayana*. Amino acid residues are numbered with respect to the initiation methionine of *cpIFNA1* candidate 1 protein. The IFN-Alpha/Beta/Delta family signature is boxed. Gaps are shown by hyphens. “\*” denotes perfect alignment. “:” and “.”

denote sites belonging to groups exhibiting strong and weak similarities, respectively. Strong similarity corresponds to a PAM250 MATRIX score between amino acids of greater than 0.5., whereas weak similarity corresponds to a score of 0.5. or less. The multiple amino acid sequence alignment was examined by ClustalW (9), DNA Data Bank of Japan (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp>).



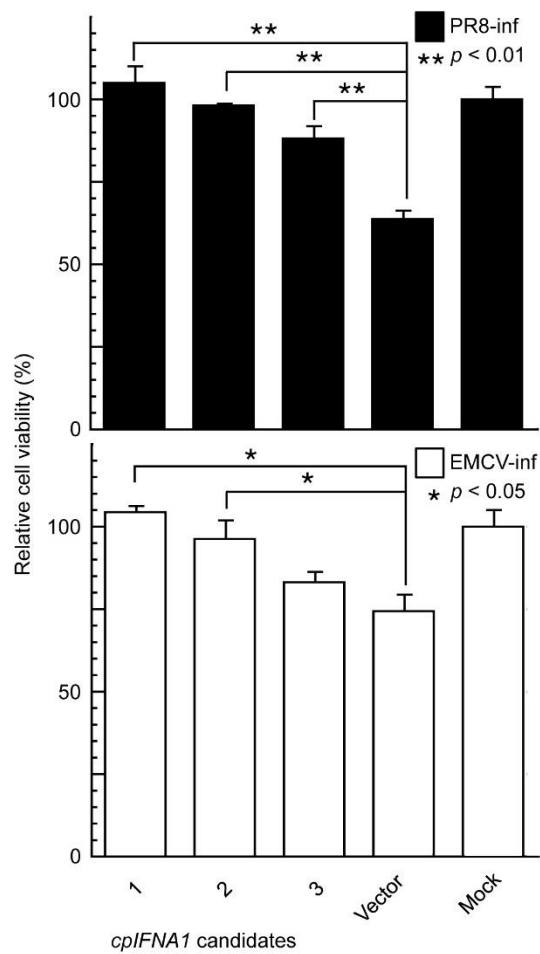
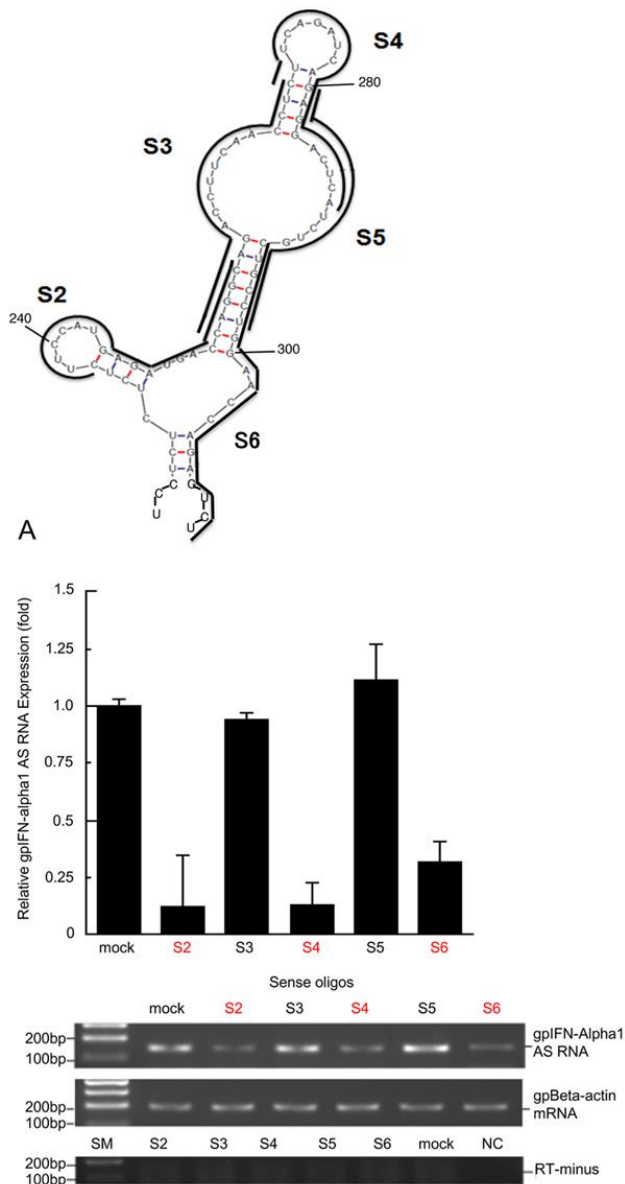


Figure 2

Antiviral assay with *cpIFNA1* candidates. 104C1 cells were transfected with pSI-*cpIFNA1* candidate 1, 2 or 3. The culture supernatants were collected and added individually to 104C1 cells. The cells were then infected with either PR/8 virus (top, solid bars) or EMCV (bottom, empty bars). The net changes in OD450nm-655nm were measured and used to calculate cell viability. The average net change of mock-treated and mock-infected 104C1 cells (Mock) are presented as 100% relative cell viability. Values of three independent experiments are presented as the mean  $\pm$  s.e.m. of four or five samples. Vector: pSI vector-transfected and virally infected 104C1 cells.



**Figure 3**

Silencing of gpIFN-Alpha1 AS by seODNs. (A) Location of seODNs S2-6 (black bold lines) are depicted along the common stemloop structure present in the ten most predicted secondary structures of the gpIFN $\alpha$ 1 mRNA. (B) The effects of S2-6 on the constitutive expression levels of gpIFN-Alpha1 AS RNA were examined by strand-specific RT-PCR (top) and agarose gel electrophoresis (bottom). gpBeta-actin mRNA indicates an internal RNA standard. Values of three independent experiments are presented as the mean  $\pm$  s.e.m. of three or four samples. Mock denotes mock-transfected. RT-minus shows no contamination of genomic DNA in the total cellular RNA samples examined.

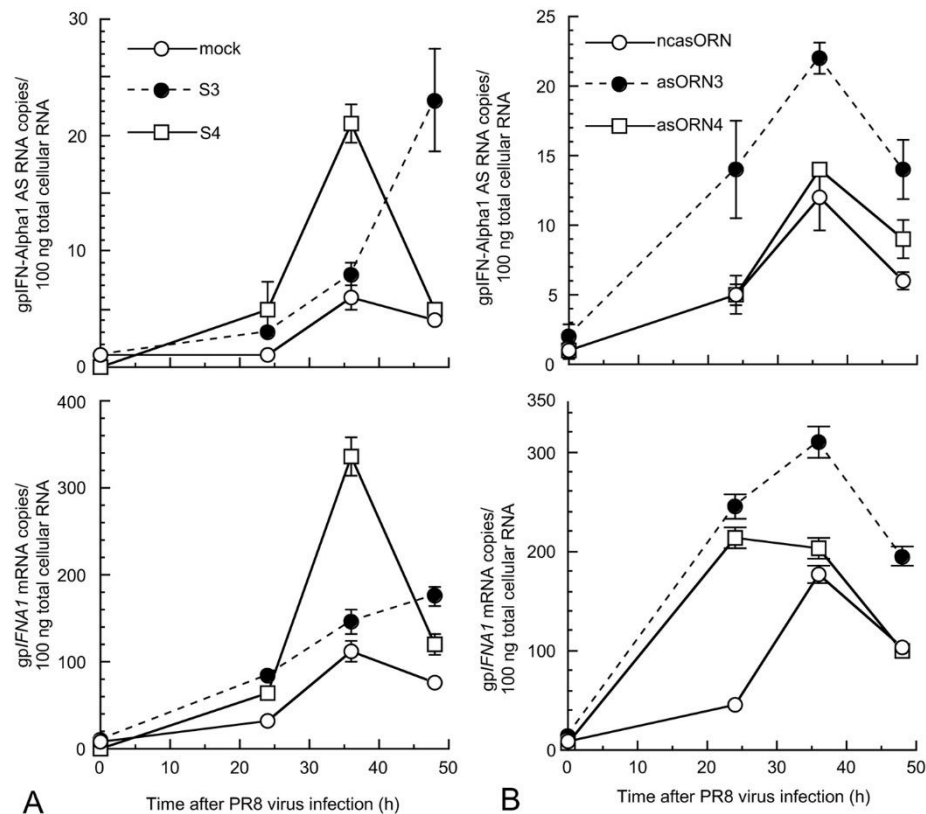


Figure 4

(A) Effect of silencing gpIFN-Alpha1 AS RNA on gpIFN-Alpha1 mRNA expression. S3 (filled circle with broken line), S4 (open box with bold line) seODNs- or mock (open circle with bold line)-transfected 104C1 cells were subjected to PR/8 virus infection as described in the Materials and methods (S3, S4 and mock, respectively). RNA samples were collected at the indicated time points after viral infection and the copy numbers of gpIFN-Alpha1 AS RNA (top) and gpIFN-Alpha1 mRNA (bottom) were determined. The results are presented as “Number of gpIFN-Alpha1 AS RNA or mRNA copies/100 ng of total cellular RNA”  $\pm$  s.e.m. of three or four samples. Representative values of three independent experiments are presented. Error bars cannot be seen if they are smaller than the graph symbols. (B) Effect of asORNs on gpIFN-Alpha1 AS RNA and gpIFN-Alpha1 mRNA expression levels. asORN3 (filled circle with broken line), asORN4 (open box with bold line)- or ncasORN (open circle with bold line)-transfected 104C1 cells were subjected to PR/8 virus infection as described in the legend to (A) (asORN3, 4 and ncasORN, respectively). RNA samples were collected at the indicated time points after viral infection and the copy numbers of gpIFN-Alpha1 AS RNA (top) and gpIFN-Alpha1 mRNA (bottom) were determined as described in the legend to (A). The results are presented as “Number of gpIFN-Alpha1 AS RNA or mRNA copies/100 ng of total cellular RNA”  $\pm$  s.e.m. of three or four samples. Representative values of three independent experiments are presented. Error bars cannot be seen if they are smaller than the graph symbols.

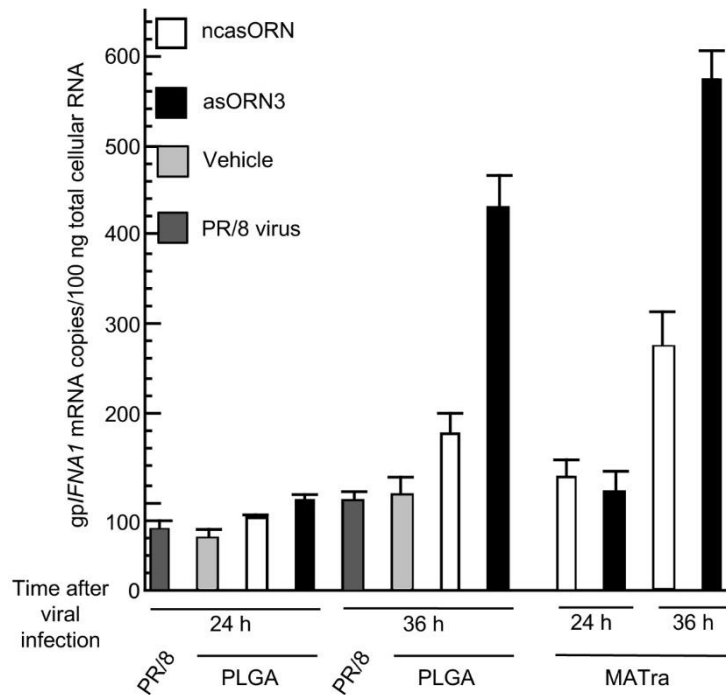


Figure 5

Preparatory experiments to optimize PLGA-dependent transfection efficiency in 104C1 cells. 104C1 cells were transfected with asORN3 (filled bar), ncasORN (open bar) or vehicle control (PLGA alone; light grey bar) by the PLGA or MATra methods, and the transfected cells were subjected to PR/8 virus infection, as described in the Materials and methods. Cells receiving the virus infection alone are indicated by dark grey bars. Transfections with 2.9  $\mu$ g asORN3 or ncasORN as well as 0.1  $\mu$ g pSV-Beta-galactosidase control vector were performed. RNA samples were collected at 24 or 36 h after viral infection and the copy numbers of gpIFNA1 mRNA were determined as described in the Materials and methods. The results are presented as “gpIFNA1 mRNA copies/100 ng of total cellular RNA”  $\pm$  s.e.m. of three or four samples. Representative values of three independent experiments are presented.

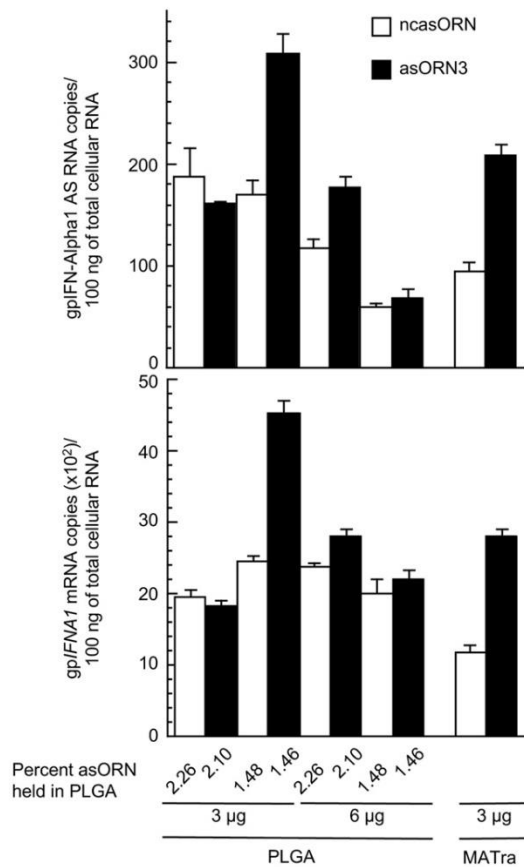


Figure 6

Optimization of PLGA-dependent transfection efficiencies of asORN3 to maximize gpIFN-Alpha1 AS RNA/mRNA expression levels in 104C1 cells. 104C1 cells were transfected with asORN3 (filled bar) or ncasORN (open bar) by the PLGA or MATra method, and the transfected cells were subjected to PR/8 virus infection, as described in the legend to Figure 4A. For PLGA-dependent transfection, 3 or 6 μg asORN3 or ncasORN, contained at various percentages (w/w) in PLGA nanoparticles (as described below the x axis of the figure) were employed, whereas 3 μg was used for MATra-associated transfection. RNA samples were collected at 36 h after viral infection and the copy numbers of gpIFN-Alpha1 AS RNA (top) and gpIFN1 mRNA (bottom) were determined as described in the legend to Figure 4A. The results are presented as “Number of gpIFN-Alpha1 AS RNA or mRNA copies/100 ng of total cellular RNA” ± s.e.m. of three or four samples.

Representative values of three independent experiments are presented. According to the manufacturer’s instructions, the amount of nucleotides for MATra-transfection was limited to 3 μg.

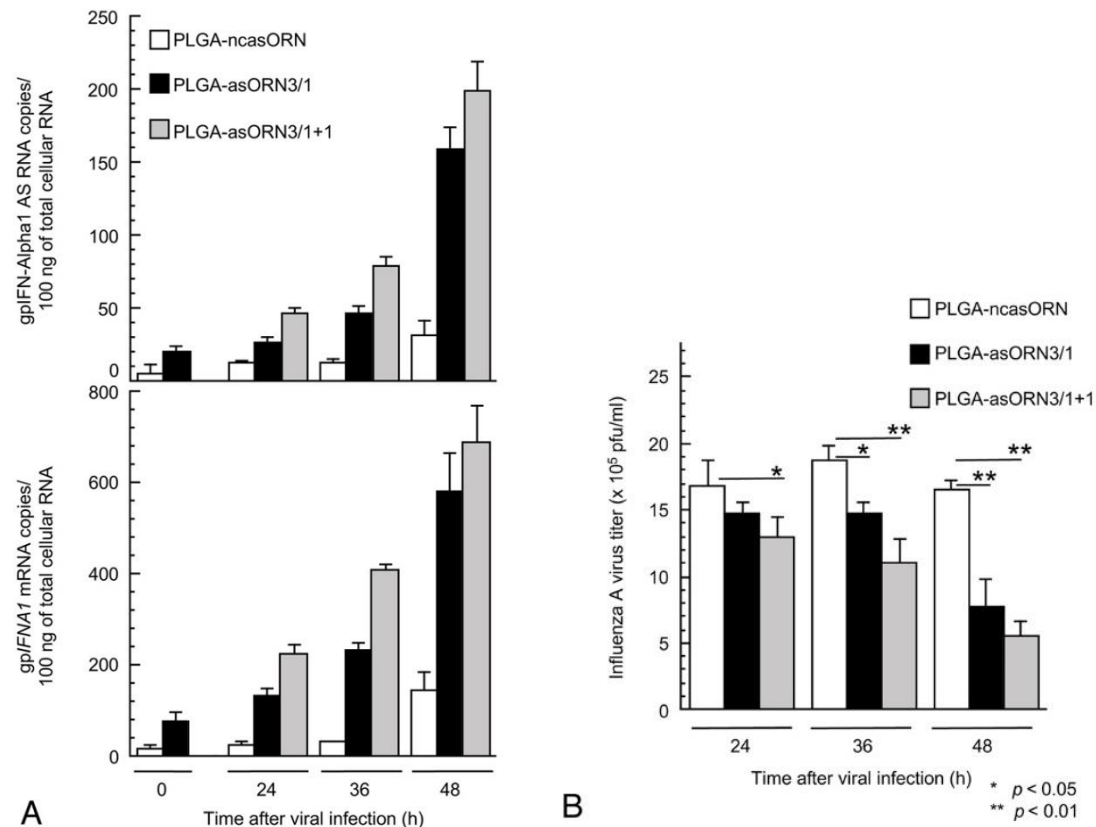


Figure 7

*In vivo* evaluation of asORN3 against respiratory PR/8 virus infection. (A) Effect of nasally administered asORN3 on gpIFN-Alpha1 AS RNA and gpIFNA1 mRNA expression levels. PLGA-asORN3/1 (closed bar) or -ncasORN (open bar) was nasally administered to groups of guinea pigs (four animals per group) at -6 hours prior to PR/8 virus infection. Half of the guinea pigs that received PLGA-asORN3 was further administered PLGA-asORN3/1+1 (grey bar) at 18 hours after virus infection. The larynx and trachea tissues were collected at various time points ranging from 0 h to 48 h after virus infection. The tissue samples were subsequently subjected to strand-specific RT-qPCR analyses for gpIFN-Alpha1 AS RNA (top) and gpIFNA1 mRNA (bottom) expression levels. The results are presented as “Mean copy number of gpIFN-Alpha1 AS RNA or mRNA/100 ng of total cellular RNA”  $\pm$  s.e.m. of four samples. Representative values of three independent experiments are presented. Error bars cannot be seen if they are smaller than the graph symbols. (B) Effect of nasally administered asORN3 on PR/8 virus proliferation profile. PLGA-asORN3 (closed bar or grey bar) or PLGA-ncasORN (open bar) was nasally administered, as described in the Materials and methods. The nasal and tracheal washes were collected at various time points as described in the legend to (A) and were subjected to PR/8 virus titration to monitor the viral proliferation profile in the upper and lower respiratory pathways. The results are presented as “Mean titers ( $\times 10^5$  pfu/ml)”  $\pm$  s.e.m. of four samples. Representative values of three independent

experiments are presented.

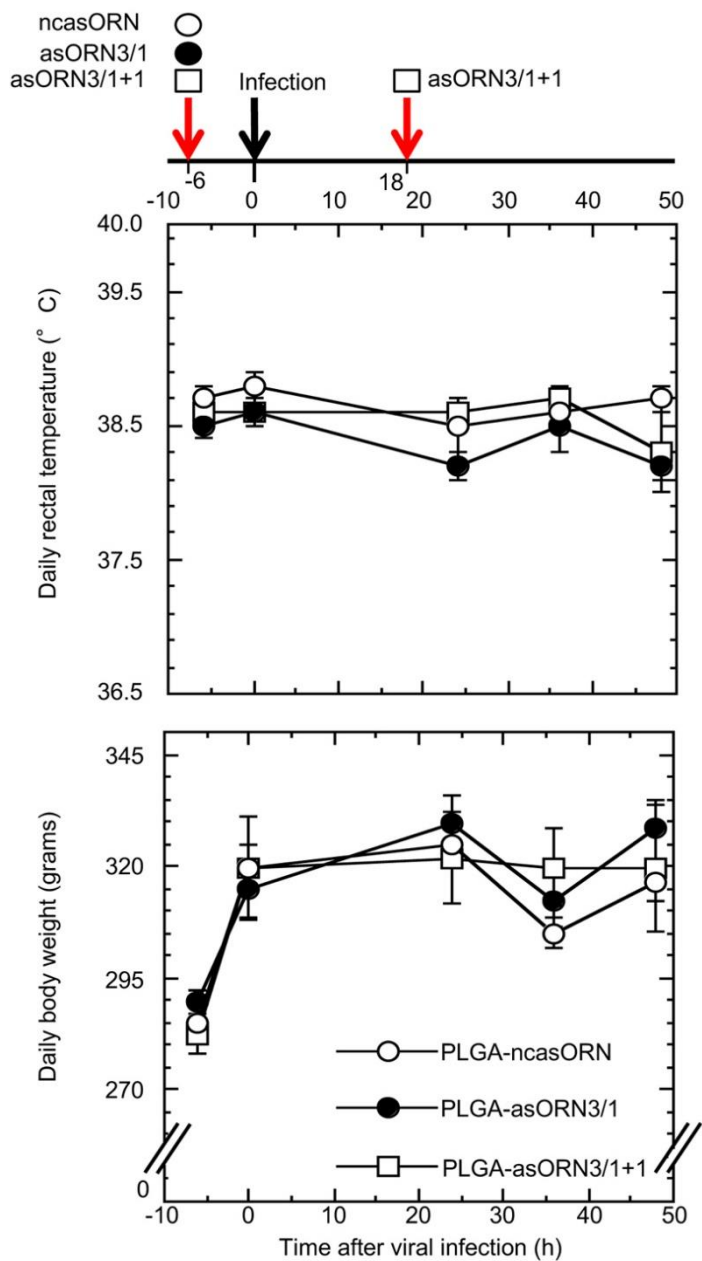


Figure 8

The nasal inoculation of PLGA nanoparticles produced no differences in rectal temperature or body weight between guinea pigs administered asORN3 (closed circle) or ncasORN (open circle) once and guinea pigs administered asORN3 twice (open box). The rectal temperature (top) and body weight (bottom) were monitored at -6 h prior to PR8 virus infection and at 0, 24, 36 and 48 h after the viral infection.