

## 博士論文要旨

# 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

立命館大学大学院薬学研究科

薬学専攻博士課程

サカモト リョウ

坂本 凌

インターフェロン- $\alpha$ 1 アンチセンス RNA (IFN- $\alpha$ 1 AS) は、ヒトインターフェロン  $\alpha$ 1 遺伝子 (*IFNA1*) の mRNA 発現量を調節する重要な因子であることが報告されている。この内在性 AS は、一過性の mRNA 二本鎖形成およびマイクロ RNA-1270 (miR-1270) 依存性 mRNA 分解の阻害によって、*IFNA1* 遺伝子 mRNA の安定化を引き起こす。そこで、モルモット {一般名 guinea pig (gp) および学名 *Cavia porcellus* (cp)} の *IFNA1* 遺伝子を同定し、生体内の IFN- $\alpha$ 1 AS-mRNA 調節経路による自然免疫応答制御効果の概念実証 (proof-of-concept, POC) 研究を行った。

本研究において、私は正常機能を発現する *Mx1* 遺伝子を有し、I 型インターフェロン経路による抗ウイルス効果を示すモルモットをインフルエンザ感染モデル動物として用いた。バイオインフォマティクス解析結果より、ヒト、マウスおよびヒマラヤマーモットの *IFNA1* 遺伝子に高い相同性を示す 3 つの候補遺伝子を絞り込んだ。さらに、これらの候補遺伝子を導入したモルモット線維芽細胞に A 型インフルエンザウイルス (A/PR/8/34) を感染させ、誘導される抗ウイルス作用を指標に、モルモット *IFNA1* 遺伝子 (*cpIFNA1*) を決定した。

次に、モルモット IFN- $\alpha$ 1 の内在性アンチセンス RNA (gpIFN- $\alpha$ 1 AS) 上の mRNA 認識配列からなる antisense oligoribonucleotide (asORN) が、ウイルス感染モルモットの気道において、gpIFN- $\alpha$ 1 mRNA 発現およびインフルエンザウイルス増殖に示す効果を解析した。asORN の *in vivo* 経肺投与によって gpIFN- $\alpha$ 1 AS/mRNA 発現量は増加し、インフルエンザウイルス力価は低下した。

以上のことから、モルモットを用いた概念実証研究によって、内在性アンチセンス RNA は生体においても *IFNA1* 遺伝子の mRNA 発現量を調節し、IFN- $\alpha$ 1 タンパク質の産生量を増加させ、A 型インフルエンザウイルスの増殖を制限することが明らかとなった。さらに、asORN の核酸配列および投与方法を最適化することによって、ヒトインフルエンザウイルスの罹患予防

および治療に有効な新規の核酸医薬品の開発に期待される。

## Abstract of Doctoral Dissertation

# 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

Doctoral Program in Pharmacy  
Graduate School of Pharmacy  
Ritsumeikan University

サカモト リョウ  
SAKAMOTO Ryou

The interferon- $\alpha$ 1 antisense RNA (IFN- $\alpha$ 1 AS) was reported to be an important modulator of human interferon- $\alpha$ 1 (*IFNA1*) mRNA levels. The natural AS promotes *IFNA1* mRNA stability by transient duplex formation and inhibition of miR-1270-induced mRNA decay. In this study, the guinea pig (gp or *Cavia porcellus*) *IFNA1* gene was identified to enable a proof-of-concept (POC) experiment to confirm that the AS-mRNA regulatory axis exerts *in vivo* control over innate immunity. I selected a guinea pig model system for influenza virus infection because guinea pigs encode a functional *Mx1* gene, an important anti-viral effector in the type I interferon pathway. I identified *cpIFNA1* gene candidates upon bioinformatic analysis and selected the three candidates with the highest sequence homology to *Homo sapiens*, *Mus musculus* and *Marmota himalayana IFNA1*. The anti-viral activity of gpIFN- $\alpha$ 1 protein against influenza virus A/PR/8/34 infection was then determined for the three gene candidates. I identified *cpIFNA1* as the candidate with the highest sequence homologies and best anti-viral effects. This system allowed me to investigate the effects of antisense oligoribonucleotides (asORNs) representing functional domains of gpIFN- $\alpha$ 1 AS on gp*IFNA1* mRNA levels and on viral proliferation in the respiratory tract of the influenza virus-infected animals. I demonstrated that pulmonary-administered asORNs raised the *in vivo* expression levels of both gpIFN- $\alpha$ 1 AS/mRNA, which inhibited the influenza virus proliferation in the animals. These results indicate that, in light of the proposed actions, the asORNs may modulate the level of IFN- $\alpha$ 1 mRNA expression *in vivo*. In conclusion, I performed a POC experiment to provide evidence that the natural antisense RNA-mRNA regulatory circuitry controls *IFNA1* mRNA expression, and subsequently IFN- $\alpha$ 1 production, thereby restricting influenza A virus proliferation *in vivo*. Optimizing asORN sequences and administration protocols will help the development of new nucleic acid therapeutics for prevention and treatment of human influenza virus infection.