

亜急性硬化性全脳炎(SSPE)に対する siRNAによる治療を目指した基礎的研究

福島県立医科大学 医学部 小児科学講座
橋本浩一 川崎幸彦 細矢光亮

(はじめに)

亜急性硬化性全脳炎(subacute sclerosing panencephalitis; SSPE)は麻疹罹患後およそ2~10年の潜伏期間の後に中枢神経症状を呈し、一旦発症後は進行性に増悪し、高度の認知障害、植物状態となり死に至るスローウイルス感染症である。現在までSSPEに対しAmantadine、inosiplex、IFN、cimetidineなどが試みられてきたが、有効性が証明されているのはinosiplexとIFNである。最近、ribavirinの脳室内投与が試みられ、SSPE発症初期の患者において臨床症状の改善がみられている。しかし、ribavirin投与中止後、6ヶ月以内に髄液中の抗麻疹ウイルス抗体上昇、SSPE症状の再燃がみられ、強化療法としての継続的なribavirin投与を余儀なくされている。従って、最終的にはSSPEウイルスの神経組織からの排除を目標に、単独、あるいは既存の薬剤との併用可能な薬剤治療法の確立が切望されている。

二本鎖RNA(dsRNA)によってその配列特異的にmRNAが分解され、その結果遺伝子の発現が抑制される現象をRNAi(RNA interference)という。近年、ウイルス性疾患や癌、遺伝性疾患などの疾患遺伝子を標的とし、RNAi活性を有するsiRNA(short interfering RNA)を核酸医薬として応用する研究が進んでいる。

我々はsiRNA単独での麻疹ウイルス、SSPEウイルスへの増殖抑制効果を検討し、さらにsiRNAとIFN、あるいはribavirinとの併用効果についても検討した。

(材料と方法)

①ウイルス、細胞、培地

麻疹ウイルスは新鮮臨床分離株(FP-1)を用い、SSPEウイルスはSSPE臨床分離株(SSPE-YH-1)を用いた。細胞はVERO/SLAM細胞(九州大学 柳雄介教授より分与)を用い、増殖培地として8%NBS、G418(0.4mg/ml)加DMEM培地、維持培地として2%NBS、G418加DMEM培地を用いた。

②siRNA

NCBIに登録されているSSPEウイルス株のゲノム情報を基に、東京大学西郷教授、稚松教授等が開発したsiRNA設計法に基づいた設計プログラム(RNAi社Tokyo, Japan, <http://design.rnai.jp/sidirect/index.php>)を用い、麻疹ウイルスN、F、L、P遺伝子それぞれにsiRNA (si-N、si-F、si-L、si-P)を作成した。また、陰性コントロールはsiRNA (si-NC) (RNAi社)を用いた。

③遺伝子導入およびsiRNAの評価

96-wellsプレートにVERO/SLAM細胞を 1×10^4 /wellの懸濁液、2日後に遺伝子導入試薬(Lipofectamin 2000 (P-1, Invitrogen)を用い、VERO/SLAM細胞にsiRNAを導入し、24時間後に麻疹ウイルス(FP-1)をmoi:0.1で1時間吸着させ、洗浄後再び培養した。24および48時間後に凍結し、融解後の上清のウイルス量をブランク法で定量化した。また、細胞中の麻疹ウイルス各遺伝子(N、F、L、P)の発現をリアルタイムPCR法で定量化した。SSPEウイルスでの検討はSSPE-YH-1をmoi:0.04で1時間吸着させ、洗浄後再び培養し、24時間後に細胞中の麻疹ウイルス各遺伝子(N、F、L、P)の発現をリアルタイムPCR法で定量化した。

④siRNAとribavirin、IFN α -2bとの併用効果

VERO/SLAM細胞にsi-N (5nM)を導入し、24時間後にribavirinあるいはIFN α -2b存在下で麻疹ウイルス(FP-1)を感染させ、感染24時間後に凍結し、融解後の上清のウイルス量をブランク法で定量化し併用効果を検討した。

⑤ブランク法

培養後、凍結融解した細胞浮遊液を2000rpmで5分間遠心し、上清を12-wellsプレートに100%単層形成されたVERO/SLAM細胞に1時間室温で吸着させ、洗浄後、細胞に0.75%メチセルロース含維持培地を重層した。48時間培養後、ホルマリンで固定後ヘマトキシリンエオジン染色し、その後ブランクを数えた。

⑥リアルタイムPCR法

96-wellsプレートの1 wellからIsogen(NipponGen)を用いRNAを精製し、ExScript RT reagent Kit(TaKaRa, Tokyo)を用い逆転写反応(RT)を行い、そのRT反応物をSYBR-Green法、あるいはTaqMan法でABI 7000(Applied Bio Systems)を用い遺伝子の発現を定量化した。L遺伝子、インターナルコントロールとして用いた18S ribosomal RNAの発現はSYBR-Green法で定量化し、各N、F、P遺伝子の発現はTaqMan法で定量化した。

N、F遺伝子のためのプライマーとプローブはUhlmannらの塩基配列(Mol Pathol. 55(2):84-90, 2002)を参考にし、L、18S遺伝子のためのプライマーはPlumetらの塩基配列(Virol Methods. 128(1-2):79-87, 2005)を参考にした。また、P遺伝子のためのプライマーとプローブはSSPEウイルスTakeuchi株(NC001498)塩基配列より、PrimerExpress (Applied Bio Systems)を用いて設計した。

(結果)

1)各siRNAの麻疹ウイルス(FP-1)への増殖抑制効果

感染24時間後の各siRNAのウイルス増殖への影響は、陰性コントロールsiRNA (si-NC)でのブランク数を100%とした場合、50%抑制濃度(EC50)は、それぞれsi-N (0.49nM)、si-F (0.58nM)、si-L (3.03nM)、si-P (1.16nM)であった(図1)。

2)各siRNA、20nMでのFP-1感染後24、48時間における麻疹ウイルス増殖抑制効果

感染24時間後のブランク数は、コントロール(si-NC)に対して、si-N (3.8%)、si-F (15.4%)、si-L (10.0%)、si-P (3.8%)であった。感染48時間後では、si-N (21%)、si-F (88%)、si-L (333%)、si-P (196%)であった(図2)。

従って、以降のFP-1での感染実験はsi-Nについて検討した。

3)N遺伝子に対するsiRNAの各遺伝子発現への影響

N遺伝子に対するsiRNA (si-N)は、N遺伝子の発現を濃度依存的に抑制した。他のP遺伝子、F遺伝子、L遺伝子の発現もsi-Nにより発現が濃度依存的に減少した(図3)。同サンプルで行った、ブランク法でもN遺伝子発現に伴いブランク数が減少した(図4)。

4)N遺伝子に対するsiRNAとribavirin、IFN α -2bとの併用効果

①遺伝子導入試薬のみでの前処理、si-NCで前処理したVERO/SLAM細胞での麻疹ウイルス(FP-1)の増殖は、ribavirin、IFN α -2bにより濃度依存的に抑制された。(図5)
②si-Nを導入したVERO/SLAM細胞の麻疹ウイルス(FP-1)の増殖は、ribavirin、IFN α -2bの濃度依存的に抑制され、si-Nとの併用効果が認められた(図6)。

5)各siRNA、20nMでのSSPEウイルス各遺伝子発現への影響

si-N、si-Pはそれぞれの標的遺伝子の他の遺伝子の発現も10-20%位までに抑制した。(図7)

(結論)

麻疹ウイルスのN、F、L、P遺伝子それぞれを標的に作製したsiRNAは、麻疹ウイルス臨床分離株の増殖を抑制した。特に、N遺伝子に対するsiRNAが最も有効であり、Ribavirin、IFN α -2bとの併用効果も認められた。

図1. 各siRNAの麻疹ウイルス(臨床分離株)増殖抑制効果 (ブランク法によるvirus yield assay)

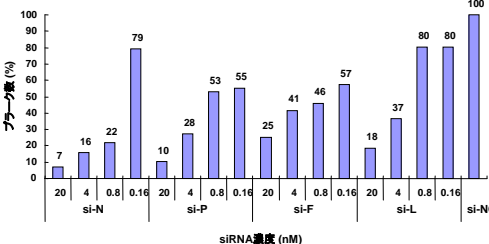


図2. 各siRNA (20nM) の感染後24、48時間におけるウイルス増殖抑制効果

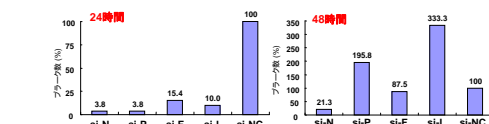


図3. N遺伝子に対するsiRNAの各遺伝子発現への影響

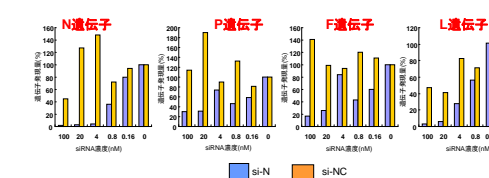


図4. N遺伝子に対するsiRNAのN遺伝子発現および麻疹ウイルス増殖への影響

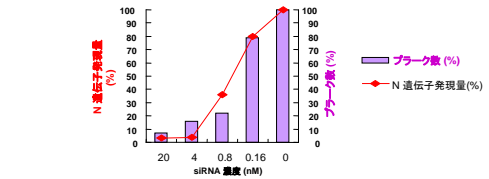


図5. N遺伝子に対するsiRNA (si-N: 5nM) とRibavirinとの併用効果

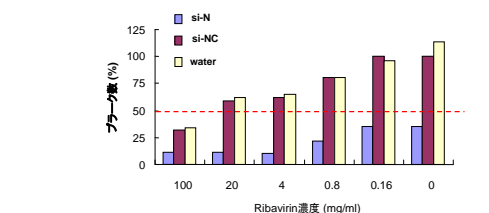


図6. N遺伝子に対するsiRNA (si-N: 5nM) とIFN α -2bとの併用効果

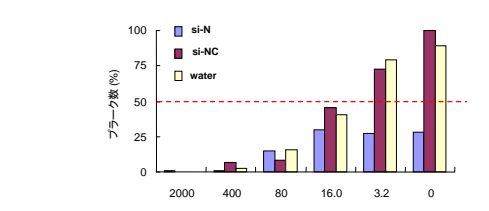


図7. 各 siRNA (20nM) のSSPEウイルス各遺伝子発現への影響

