

20030735

厚生労働科学研究費補助金
こころの健康科学研究事業

発現型 RNAi を用いた神経・筋疾患の
画期的遺伝子治療法の開発

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者：水 澤 英 洋

平成 16 (2004) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告

発現型 RNAi を用いた神経・筋疾患の画期的遺伝子治療法の開発
水澤英洋

II. 分担研究報告

1. 発現型 RNAi を用いた神経・筋疾患の画期的遺伝子治療法の開発：siRNA
を用いた神経疾患に対する遺伝子治療
横田隆徳
2. 発現型 RNAi を用いた神経・筋疾患の画期的遺伝子治療法の開発：動脈
硬化・血栓症モデルの作製とその治療
吉田雅幸
3. 発現型 RNAi を用いた神経・筋疾患の画期的遺伝子治療法の開発：RNA
工学的研究の総括と遂行
多比良和誠
4. 発現型 RNAi を用いた神経・筋疾患の画期的遺伝子治療法の開発：RNA
工学的研究の遂行
宮岸 真

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷

厚生労働科学研究費補助金(こころの健康科学研究事業)
総括研究報告書

発現型 RNAi を用いた神経・筋疾患の画期的遺伝子治療法の開発に関する研究

主任研究者 水澤 英洋 東京医科歯科大学大学院教授

研究要旨：家族性筋萎縮性側索硬化症や Machado-Joseph 病の変異遺伝子、脳血管障害に関係する白血球接着分子 E-セレクトリン、C 型肝炎ウイルスに特異的な siRNA の作製に成功し、パーキンソン病 (Park7) の原因遺伝子 DJ-1 の機能を siRNA を用いて明らかにした。siRNA 発現型アデノウイルス・アデノ随伴ウイルスベクターの作製、siRNA 過剰発現トランスジェニックマウスの作製に成功した。siRNA 効果の高いターゲットサイトを選択する高機能アルゴリズムを開発し、他の遺伝子に影響を与えないことを確認するシステムや、神経・筋疾患関連遺伝子の探索を可能とする siRNA ライブラリー作製システムを構築した。これらの成果は、朝日新聞 (2003 年 5 月 15 日)、日経新聞 (2003 年 8 月 4 日)、日経サイエンス (2003 年 11 月号、P39)、Medical Tribune 感染症版 (2004 年 3 月 11 日) などに紹介され、高い評価を受けており、さらなる発展が期待される。

分担研究者

横田 隆徳	東京医科歯科大学医学部講師
吉田 雅幸	東京医科歯科大学大学院助教授
多比良 和誠	東京大学大学院教授、産業技術総合研究所ジーンディスカバリー研究センター副センター長
宮岸 真	東京大学大学院助手

A. 研究目的

未だ根本的治療法のない難病である神経変性疾患や治療はできても神経細胞の再生能力の問題から機能回復がきわめて悪い脳血管障害など、多くの神経疾患では革新的治療法や効果的予防法の開発が焦眉の課題である。近年、常染色体優性遺伝性疾患の原因遺伝子を含めその過剰発現が発症に係わる分子が次々と判明しており、これらの分子の発現を抑制する治療法が期待できる。本研究の目的は、RNA 干渉によるノックダウン技術である siRNA (short interfering RNA) を用いた各種神経筋疾患の画期的治療法の開発とその基礎研究を行うことである。今年度は、点変異、伸長 CAG リピートなどを来した疾患遺伝子、血管障害関連遺伝子、ウイルスゲノムなどに対する siRNA を作製、有効なウイルスベクターや siRNA トランスジェニックマウスを開発する。また、基礎的には RNAi ベクターのターゲットサイトの効率的な選択法および特異性検索システムを開発するとともに、神経・筋疾患関連遺伝子の探索を可能とする siRNA ライブラリー作製システムを構築する。

B. 研究方法

目的とする遺伝子の標的部位に対して様々なデザインした合成 siRNA、siRNA 発現ベクター、疾患遺伝子の発現ベクターを作製し、培養細胞や ES 細胞に導入して siRNA の効果を Western blot 法、蛍光顕微鏡、細胞死、接着能力などのアッセイで評価し、最適な siRNA やベクターを選択した。動物培養細胞にレポーター遺伝子を発現するベクターとレポーター遺伝子をターゲットとした RNAi ベクターを共導入し、RNAi ベクターの遺伝子発現抑制活性を調べた。今回は、2つのレポーター遺伝子に対して約 1,000 個の siRNA を作製しそのデータの解析を行った。また、NCBI の遺伝子データベースを検索し、ターゲットサイトの特性を調べるプログラムの開発を行った。多くの遺伝子をターゲットとする siRNA ライブラリーを構築する方法を確立するため、ベクターの大量作製はインサートをまとめてクローニングし大腸菌に形質転換後それぞれのクローンを選別するバルク法を用いた。

(倫理面への配慮)

siRNA は化学合成し変異 cDNA は mutagenesis によって作製しており倫理的な問題はない。また、動物実験は各施設の動物実験センター等の規定に従って動物愛護の精神に沿って行っている。

C. 研究結果

家族性筋萎縮性側索硬化症の原因である SOD1 遺伝子の点変異の位置を siRNA 配列の 5'末端から 10-13 塩基目にデザインすることによって変異アレル特異的に作用する siRNA の作製に成功、Machado-Joseph 病の原因である伸長 CAG リピートに関連した G/C polymorphism およびターゲット RNA の 2 次構造の変化を利用した配列依存のおよび非依存の siRNA の識別方法で変異アレル特異的に作用する siRNA の作製にも成功した。脳血管障害関連分子である E-セレクトインの siRNA を作製しヒト培養血管内皮細胞に導入しサイトカイン刺激による内因性 E-セレクトイン発現が著明に抑制され白血球の接着障害を確認した。このときその他の接着分子 (ICAM-1) の発現には影響がなく、観察された接着抑制が E-セレクトイン発現の抑制によるものであることが示唆された。1 本鎖 RNA ウイルスである C 型肝炎ウイルスは変異をよく起こし、siRNA の不活性化が懸念されるが、変異を生じない 5' 非翻訳領域 IRES を効率よく切断する siRNA の作製に成功した。常染色体劣性遺伝性パーキンソン病の一つ Park7 の原因遺伝子 DJ-1 に対する siRNA を作製し、内因性 DJ-1 の発現を抑制することにより酸化ストレス、小胞体ストレス、あるいはプロテアソーム抑制による細胞死が増強し、野生型 DJ-1 の過剰発現により劇的に救済されるも、変異型 (L166P) DJ-1 では効果がないことを明らかにした。U6 プロモーター、ミスマッチ変異の導入により効率よく細胞内で siRNA を発現する siRNA 発現型アデノウイルス・アデノ随伴ウイルスベクターの作製に成功した。コンストラクトを工夫した siRNA 発現型 DNA ベクターを ES 細胞に導入することにより内因性 SOD1 遺伝子の発現を 90%抑制した siRNA 過剰発現トランスジェニックマウスの作製にも成功した。

ルシフェラーゼ遺伝子の約 300 サイト、GFP 遺伝子の約 700 サイトの siRNA 活性を取得し、それをもとに非線形多変量解析により約 50 の相関するパラメーターを抽出し、このパラメーターを用いてターゲットサイトを予測するアルゴリズムの作成を行った。また、siRNA の特異性を考慮したサーチプログラムを作成しターゲットサイトの特異性を調べるシステムを構築した。今回開発したバルク法を用いて一ヶ月で 3000-5000 個の siRNA ベクターの作製が可能となり、アポトーシス関連遺伝子やキナーゼ遺伝子に対して実際にライブラリーを作製しこの大量作製系の効率の確認を行っている。

D. 考察

点変異のみならず CAG リピートという特殊な遺伝子変異に対しても変異特異的な siRNA の作製に成功した。

非常に変異しやすい C 型肝炎ウイルスに対しても非常に効率的な siRNA を作製するとともに、脳血管障害に対しては白血球接着因子 E-セレクトインを選択し、その siRNA による発現抑制が白血球の接着阻害ももたらすことを確認し高い siRNA 技術が裏付けられた。その次に問題となるデリバリーについてもアデノウイルス・アデノ随伴ウイルスベクターの開発に成功し、siRNA トランスジェニックマウスの作製とあわせ今後の動物モデルを用いた研究への基盤ができた。なお、血管病変に対してはむしろ局所投与が望ましい場合がありデリバリーの問題は対象疾患に応じてケースバイケースで解決すべきものと考えられる。

基礎研究でもアルゴリズムに使用するデータ量が飛躍的に増えたため、非常に高い精度で効果の大きいターゲットサイトを予測することが可能となった。また、常に問題になる特異性に関しても、今回新たに作製した siRNA Search Program を用いて検索することができるようになった。さらに、遺伝子の迅速探索を可能にする siRNA ライブラリーの大量作製が可能となった。これらの成果は、朝日新聞 (2003 年 5 月 15 日)、日経新聞 (2003 年 8 月 4 日)、日経サイエンス (2003 年 11 月号、P39)、Medical Tribune 感染症版 (2004 年 3 月 11 日) などに紹介され、高い評価を受けており、さらなる発展が期待される。

E. 結論

これらの成果は siRNA は遺伝性・非遺伝性神経変性疾患、生活習慣病でもある脳血管障害、ウイルス性疾患などのさまざまな疾患の病態解明や遺伝子治療の方法として有望であることを示している。また、対象疾患のターゲット遺伝子のターゲットサイトをその特異性も考慮し効率的に選択することができるようになった。さらに、今回開発した siRNA ライブラリーを用いたスクリーニングによって神経・筋疾患に関連する新規機能遺伝子の発見が期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yokota T, et al. siRNA-based inhibition of superoxide dismutase expression; potential use in familial Amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Com* 314:283-291(2004)

Li Y, et al. siRNA-based Inhibition of Mutant ataxin 3 Gene Expression; sequence specific and unspecific discrimination of mutant allele by siRNA. *Ann Neurol* (in press)

Yokota T, et al. siRNA-based Inhibition of Hepatitis C Virus Replication by Targeting 5' Untranslated Region. *EMBO report* 4:602 - 608(2003)

Yokota T, et al. Down regulation of DJ-1 enhances cell death by oxidative stress, ER stress, and proteasome inhibition. *Biochem Biophys Res Com* 312:1342-1348(2003)

Yoshida M, Sasaoka T, Takano Y, Izumi T, Kimura A. E-selectin polymorphism associated with myocardial infarction causes enhanced leukocyte-endothelial interactions under flow conditions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:783-788(2003)

Yu T, Morita I, Shimokado K, Iwai T, Yoshida M. Amlodipine modulates THP-1 cell adhesion to vascular endothelium under flow via inhibition of protein kinase C - dependent signal transduction. *Hypertension* 42:329-334(2003)

Y. Nishiwaki, Yokota T, Hiraoka M, Miyagishi M, Taira K, Isobe M, Mizusawa H, Yoshida M. Introduction of short interfering RNA to silence endogenous E-selectin in vascular endothelium leads to successful inhibition of leukocyte adhesion. *Biochem Biophys Res Com* 310:1070-1074(2003)

Toriumi Y, Hiraoka M, Watanabe M, Yoshida M. Pioglitazone reduces monocyte adhesion to vascular endothelium under physiological flow conditions by modulating RhoA GTPase and focal adhesion kinase. *FEBS Letters* 553:419-422(2003)

Kawakami A, Tanaka K, Nakajima K, Shimokado M, Yoshida M. Remnant lipoprotein-induced smooth muscle cell proliferation involves EGF receptor transactivation. *Circulation* 108:2679-2688(2003)

Fujiyama S, Amano K, Uehira K, Yoshida M, Nishiwaki Y, Nozawa Y, Jin D, Takai S, Miyazaki M, Egashira K, Imada T, Iwasaka T, Matsubara H. Bone marrow monocyte-lineage cells adhere on injured endothelium by MCP-1-dependent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells. *Circ Res* 93:980-989(2003)

Onuki R, Bando Y, Suyama E, Katayama T, Kawasaki H, Baba T, Tohyama M, Taira K. Involvement of an RNA-dependent protein kinase (PKR) in tunicamycin-induced apoptosis and Alzheimer's disease. *EMBO J*, in press (2004)

Yoshinari K, Miyagishi M, Taira K. Effects on RNAi of structure, sequence and position within target RNA and potentially preferable sequence motif for siRNA activities in mammalian cells: Sequence itself rather than its location determines siRNA efficacy. *Nucleic Acids Res* 31:691-699(2004)

Miyagishi M, Taira K. Strategies for generation of a stable siRNA-expression library directed against the human genome. *Oligonucleotides* 13:325-333(2003)

Miyagishi M, Suminoto H, Miyoshi H, Kawakami Y, Taira K. Optimization of an siRNA-expression system with a mutated hairpin and its significant suppressive effects upon HIV vector-mediated transfer into mammalian cells. *J Gene Med*, in press (2004)

2. 学会発表

Yokota T, et al. International Congress of RNA, Kyoto, Nov 25, 2003

西脇泰信、吉田雅幸. 平成 15 年 3 月, 日本循環器学会

平岡慈美、吉田雅幸. 平成 15 年 3 月, 日本循環器学会

田中洋次、吉田雅幸. 平成 15 年 3 月, 日本循環器学会

多比良和誠:小さな RNA がバイオ・医学の世界を変える. 第 26 回分子生物学会・シンポジウム, 京都, 2003

Miyagishi M. Taira K: Development of siRNA expression vector and generation of siRNA expression library. 7 th Gene Therapy Workshop : Tumor vaccine, NIH, 2003

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願中

横田隆徳 : C 型肝炎ウイルスの複製を抑制する siRNA. 特許出願番号 2003-104940

多比良和誠、宮岸真: siRNA の RNAi 効果の予測装置およびその方法. 特許出願番号 2003-348283

多比良和誠、宮岸真: 干渉用二重鎖 RNA. 特許出願番号 2003-417524

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
（分担）研究報告書

siRNA を用いた神経疾患に対する遺伝子治療。

（分担）研究者 横田隆徳
東京医科歯科大学医学部附属病院神経内科

研究要旨 1) 家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) の原因である SOD1 遺伝子の点変異やポリグ
ルタミン病である Machado-Joseph 病の原因である伸長 CAG repeat を有する変異アリルに特異
的に作用する siRNA の作製に成功した。2) C 型肝炎ウイルスにおいて変異を起こさない 5' 非
翻訳領域 IRES を効率よく切断する siRNA の作製に成功した。3) パーキンソン病 (Park7) の
原因遺伝子である DJ-1 が強力な抗酸化作用、小胞体ストレスあるいはプロテアソーム抑制によ
る細胞死を抑制する作用があり、変異 DJ-1 にはこれらの作用が失われていることを siRNA を用
いて明らかにした。4) siRNA 発現型アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスの作製に成功した。
5) siRNA 過剰発現トランスジェニックマウスの作製に成功した。

A. 研究目的

siRNA を用いて神経変性疾患、ウイルス性
疾患の発症機序の解明や遺伝子治療を行う。

B. 研究方法

さまざまにデザインした合成 siRNA、siRNA
発現ベクター、疾患遺伝子の発現ベクター、
培養細胞や ES 細胞に導入して siRNA の効果
を Western blot 法、蛍光顕微鏡観察、細胞
死のアッセイで評価した。

siRNA は化学合成し、変異 cDNA は
mutagenesis によって作製したため、動物愛
護、人権擁護上問題ない。

C. 研究結果 D 考察

1) FALS の原因である SOD1 遺伝子の点変異
の位置を siRNA 配列の 5' 末端から 10-13 塩基
目にデザインすることによって変異アリル特
異的に作用する siRNA の作製に成功した¹⁾。
また、Machado-Joseph 病の原因である伸長
CAG repeat に関連した G/C polymorphism お
よびターゲット RNA の 2 次構造の変化を利用
した配列依存性および非依存性な siRNA の識
別方法で変異アリル特異的に作用する siRNA
の作製に成功した²⁾。2) 1 本鎖 RNA ウィル
スである C 型肝炎ウイルスは変異をよく起こ
し、siRNA の不活性化が懸念されるが、変異
を生じない 5' 非翻訳領域 IRES を効率よく
切断する siRNA の作製に成功した³⁾。3) siRNA
を用いて内因性 DJ-1 発現を抑制すること
により酸化ストレスによる細胞死や小胞体ス
トレスやプロテアソーム抑制による細胞死が
増強した。さらに野生型 DJ-1 の過剰発現によ
り劇的に救済され、変異型 (L166P) DJ-1 では
変化しなかった⁴⁾。4) U6 プロモーター、
mismatch mutation の導入により効率よく細

胞内で siRNA を発現する siRNA 発現型アデノ
ウイルス、アデノ随伴ウイルスの作製に成功
した。5) コンストラクトを工夫した siRNA
発現型 DNA ベクターを ES 細胞に導入するこ
とにより内因性 SOD1 遺伝子の発現を 90% 抑
制した siRNA 過剰発現トランスジェニックマ
ウスの作製に成功した。

E. 結論

siRNA は神経疾患、ウイルス性疾患の病態
解明、遺伝子治療の方法として有望である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yokota T, et al. siRNA-based inhibition of
superoxide dismutase expression; potential use in
familial Amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem
Biophys Res Com* 2004, 314, 283-291.
- 2) Li Y, et al. siRNA-based Inhibition of Mutant
ataxin 3 Gene Expression; sequence specific and
unspecific discrimination of mutant allele by siRNA.
Ann Neurol (in press)
- 3) Yokota T, et al. siRNA-based Inhibition of Hepatitis C
Virus Replication by Targeting 5' Untranslated Region.
EMBO report 2003;4:602-608
- 4) Yokota T, et al. Down regulation of DJ-1 enhances cell death
by oxidative stress, ER stress, and proteasome inhibition.
Biochem Biophys Res Com 312, 1342-1348, 2003.

2. 学会発表

- 1) Yokota T, et al. International Congress of RNA, in Kyoto,
Nov 25, 2003

H. 知的財産権の出願・登録状況

C 型肝炎ウイルスの複製を抑制する siRNA
特許出願番号 2003-104940

- 1) Yokota T, Sakamoto N, Enomoto N, Tanabe, Maekawa, Makoto Miyagishi M, Taira K, Watanabe M, Hidehiro Mizusawa. siRNA-based Inhibition of Hepatitis C Virus Replication by Targeting 5' Untranslated Region. EMBO report 4, 602-608, 2003
- 2) Nishiwaki Y, Yokota T, Hiraoka M, Miyagishi M, Taira K, Isobe M, Mizusawa H, Yoshida M. Introduction of short interfering RNA to silence endogenous E-selectin in vascular endothelium leads to successful inhibition of leukocyte adhesion. Biochem Biophys Res Com 310, 1062-1066, 2003
- 3) Yokota T, Sugawara K, Ito K, Takahashi R, Ariga H, Mizusawa H. Down regulation of DJ-1 enhances the cell death by oxidative stress, ER-stress and proteasome inhibition. Biochem Biophys Res Com 312, 1342-1348, 2003;
- 4) Yokota T, Miyagishi M, Hino T, Matsumura R, Tasinato A, Urushidani M, Rao RV, Takahashi R, Bredesen DE, Taira K, Mizusawa H. siRNA-based inhibition of superoxide dismutase expression; potential use in familial Amyotrophic lateral sclerosis. Biochem Biophys Res Com 314, 283-291, 2004
- 5) Li Y, Yokota T, Kakizuka A, Taira K, Mizusawa H. siRNA-based Inhibition of Mutant atacin 3 Gene Expression; Potential Use for Gene Therapy of Machado-Joseph disease. Ann Neurol (in press)
- 6) 横田隆徳. RNAiによる神経変性疾患の遺伝子治療をめざして。遺伝子医学, 7, 349-354, 2003
- 7) 横田隆徳、水澤英洋。siRNAを用いたC型肝炎の遺伝子治療。Molecular Medicine 41 (1) :36-43, 2003
- 8) 横田隆徳。RNAiによるウイルス性疾患の遺伝子治療。医学のあゆみ 208(7), 669-673, 2004
- 9) 横田隆徳。RNAiを用いた神経疾患の遺伝子治療。最新医学 (印刷中)
- 10) 横田隆徳。RNAiの医療への応用。実験医学 22, 485-491, 2004;
- 11) 横田隆徳。RNAiを用いた神経変性疾患へ応用。バイオインダストリー (印刷中)

研究要旨

脳血管障害（脳梗塞および脳血栓症）の制圧のため、脳血管に発現する接着分子を標的とする新規遺伝子治療として二重鎖 RNA を構築した。培養血管内皮細胞において白血球接着分子 E-セレクトインの二重鎖 RNA により炎症時の白血球接着を抑制しうる事が分かった。今後動物モデルでの検討を経て、臨床応用への検討を続ける。

A. 研究目的

脳血管障害（脳梗塞および脳血栓症）の制圧のため、脳血管をターゲットとした遺伝子治療の開発を試みる。具体的には、血管内皮細胞に特異的な遺伝子と相同な二重鎖 RNA を注入してその遺伝子の発現を遮断する RNAi 法を用いて動脈硬化症発症に重要な遺伝子の発現制御を行う。

B. 研究方法

血管内皮細胞特異的な遺伝子として白血球接着分子 E-セレクトインを候補にその二重鎖 RNAi を作成した。作成した RNAi は初代ヒト培養血管内皮細胞に RNAi 導入し、内因性の E-セレクトイン発現抑制効果を調べた。また、生理的条件下で白血球の接着実験を行うことでその機能面での抑制効果を判定した。

（倫理面への配慮）

今回の研究計画では培養細胞および合成核酸試薬を使ったため、特に倫理的な配慮を必要なかった。

C. 研究結果

E-セレクトイン RNAi の作用をさらに詳細に検討するため、ヒト培養血管内皮細胞に導入し、サイトカイン刺激による内因性 E-セレクトイン発現を検討し、その著明な発現抑制と白血球の接着の減弱を確認した。さらにこのときその他の接着分子（ICAM-1）の発現には影響がなく、観察された接着抑制が E-セレクトイン発現の抑制によるものであることが示唆された。

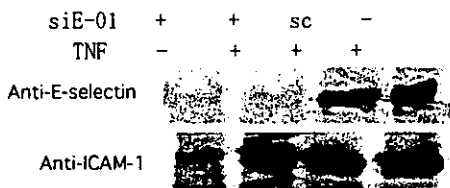


図 1 培養内皮細胞において、E-セレクトイン RNAi (siE-01) は非導入群 (No RNAi) やコントロール導入群 (sc) にくらべて、E-セレクトインの発現を著明に抑え、一方、ICAM-1 には変化がなかった。

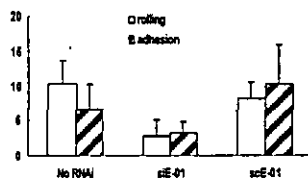


図 2 培養内皮細胞において、E-セレクトイン RNAi (siE-01) は非導入群 (No RNAi) やコントロール導入群 (scE-01) にくらべて白血球の接着を著明に減弱させた。

D. 考察

21 塩基の二重鎖 E-セレクトイン RNAi によって血管内皮細胞の E-セレクトイン発現が抑制され、かつ白血球の接着も現象した。

E. 結論

二重鎖 RNAi を用いた RNA 干渉による遺伝子発現制御は血管内皮細胞でも利用可能であり、今後新しい血管疾患の遺伝子治療戦略に重要なツールであることが確認された。

F. 健康危険情報

特記すべき事なし。

G. 研究発表

1. 論文発表（2003-2004 年度のみ）

M. Yoshida, T. Sasaoka, Y. Takano, T. Izumi, A. Kimura. E-selectin polymorphism associated with myocardial infarction causes enhanced leukocyte-endothelial interactions under flow conditions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23: 783-788 (2003)

T. Yu, I. Morita, K. Shimokado, T. Iwai, M. Yoshida. Amlodipine modulates THP-1 cell adhesion to vascular endothelium under flow via inhibition of protein kinase C-dependent signal transduction. *Hypertension* 42: 329-334 (2003)

Y. Nishiwaki, T. Yokota, M. Hiraoka, M. Miyagishi, K. Taira, M. Isobe, H. Mizusawa, M. Yoshida. Introduction of short interfering RNA to silence endogenous E-selectin in *Biochem. Biophys. Res. Com.* 310: 1070-1074 (2003)

vascular endothelium leads to successful inhibition of leukocyte adhesion. Y. Toriumi, M. Hiraoka, M. Watanabe, M. Yoshida. Pioglitazone reduces monocyte adhesion to vascular endothelium under physiological flow conditions by modulating RhoA GTPase and focal adhesion kinase. *FEBS Letters* 553: 419-422 (2003)

Kawakami, A. Tanaka, K. Nakajima, K. Shimokado, M. Yoshida. Remnant lipoprotein-induced smooth muscle cell proliferation involves EGF receptor transactivation. *Circulation* 108: 2679-2688 (2003)

S. Fujiyama, K. Amano, K. Uehira, M. Yoshida, Y. Nishiwaki, Y. Nozawa, D. Jin, S. Takai, M. Miyazaki, K. Egashira, T. Imada, T. Iwasaka, H. Matsubara. Bone Marrow Monocyte-Lineage Cells Adhere on Injured Endothelium by MCP-1-Dependent Manner and Accelerate Reendothelialization as Endothelial Progenitor Cells. *Circ Res.* 93: 980-989 (2003)

2. 学会発表

西脇 泰信、吉田 雅幸	平成 15 年 3 月	日本循環器学会
平岡 慈美、吉田 雅幸	平成 15 年 3 月	日本循環器学会
田中 洋次、吉田 雅幸	平成 15 年 3 月	日本循環器学会

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

A. 特許取得（出願予定）

E-セレクトイン標的 2 重鎖 RNA 配列（仮称）

B. 実用新案登録

C. その他

厚生労働科学研究費補助金（心の健康科学研究事業）
分担研究報告書

発現型 RNAi を用いた神経・筋疾患の画期的遺伝子治療法の開発
分担研究者 多比良 和誠 東京大学大学院工学研究科 教授

研究要旨

本研究事業の目的は RNAi 法を用いた神経・筋疾患の遺伝子治療の基礎的な研究を行うことである。今年度、分担者は、siRNA の効果の高いターゲットサイトを選択するより、高機能なアルゴリズムの作製を行うと共に、他の遺伝子に影響を与えないことを確認するシステムを構築した。

A.研究目的

RNA 干渉を用いたノックダウン技術である RNAi ベクターを用いて、神経・筋疾患の遺伝子治療を目指した基礎研究を行う。その中で、分担者は RNAi ベクターのターゲットサイトの効率的な選択法および、特異性検索システムを構築する。

B.研究方法

動物培養細胞にレポーター遺伝子を発現するベクターとレポーター遺伝子をターゲットとした RNAi ベクターを共導入し、RNAi ベクターの遺伝子発現抑制活性を調べる。今回の研究では、2つのレポーター遺伝子に対して、約1,000個の siRNA を作製し、そのデータの解析を行った。また、NCBI の遺伝子データベースを検索し、ターゲットサイトの特性を調べるプログラムの作成を行った。

（倫理面への配慮）

培養細胞を使った実験であるため倫理面の問題は無い。

C.結果

昨年度と比較して、はるかに多いデータを取得した。具体的には、ルシフェラーゼ遺伝子の約300サイト、GFP に対して約700サイトの siRNA 活性を取得した。それをもとに非線形多変量解析により、約50の相関のあるパラメーターを抽出し、このパラメーターを用いて、ターゲットサイトを予測するアルゴリズムの作製を行った。また、siRNA の特異性を考慮したサーチプログラムの作製を行い、ターゲットサイトの特異性を調べるシステムを構築した。

D.考察

アルゴリズムに使用するデータ量が飛躍的に増えたため、非常に高い精度で、効果の高いターゲッ

トサイトを予測することが可能となった。また、最近問題になっている特異性に関しても、今回新たに作製した siRNA Search Program を用いて、検索することができるようになった。

E.結論

今回の成果によって、疾患のターゲット遺伝子のターゲットサイトをその特異性も考慮し、効率的に選択することができるようになった。

F.健康危険情報

健康を損なう実験系は使用していない。

G.研究発表

1. 論文発表

Onuki, R., Bando, Y., Suyama, E., Katayama, T., Kawasaki, H., Baba, T., Tohyama, M., and **Taira, K.** *Involvement of an RNA-dependent protein kinase (PKR) in tunicamycin-induced apoptosis and Alzheimer's disease.* *EMBO J.*, 2004, in press.

Yoshinari, K., Miyagishi, M., and **Taira, K.** Effects on RNAi of structure, sequence and position within target RNA and potentially preferable sequence motif for siRNA activities in mammalian cells: Sequence itself rather than its location determines siRNA efficacy. *Nucleic Acids Res.*, 31, 691-699, 2004

2. 学会発表

多比良和誠 「小さな RNA がバイオ・医学の世界を変える」第26回分子生物学会・シンポジウム

H.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願中

多比良 和誠、官岸 真 「siRNA の RNAi 効果の予測装置およびその方法」特願 2003-348283

厚生労働科学研究費補助金（心の健康科学研究事業）
分担研究報告書

発現型 RNAi を用いた神経・筋疾患の画期的遺伝子治療法の開発

分担研究者 宮岸 真 東京大学大学院工学研究科 助手

研究要旨

本研究事業の目的は、この方法を用いて神経・筋疾患の遺伝子治療の基礎的な研究を行うことである。今年度、分担者は、神経・筋疾患関連遺伝子の探索を可能とする siRNA ライブラリー作製システムの構築を行った。

A. 研究目的

RNA 干渉を用いたノックダウン技術である RNAi ベクターを用いて、神経・筋疾患の遺伝子治療を目指した基礎研究を行う。その中で、分担者は siRNA ライブラリーを用いた神経・筋疾患関連遺伝子の探索ツールの開発を行う。

B. 研究方法

申請者らがこれまで開発してきた遺伝子ノックダウン法である siRNA ベクターを用いて、多くの遺伝子をターゲットとする siRNA ライブラリーを構築する方法を確立する。ベクターの大量作製はインサートをまとめて、クローニングし、大腸菌に形質転換後、それぞれのクローンを選別するバルク法を用いた。

（倫理面への配慮）

培養細胞を使った実験であるため倫理面の問題は無い。

C. 結果

今回開発したバルク法を用いて、月 3000-5000 個の siRNA ベクターの作製が可能となった。現在、アポトシス関連遺伝子・キナーゼ遺伝子に対して、実際にライブラリーを作製し、大量作製系の効率の確認を行っている。

D. 考察

今回の研究で、遺伝子の迅速探索を可能にする siRNA ライブラリーの大量作製が可能となった。他の分担者が行っているターゲットサイトの選別法、特異性検索などのほかの検討課題と組み合わせて、実際のライブラリーの作製を行っていく予定である。

E. 結論

今回開発した siRNA ライブラリーを用いたスク

リーニングによって、神経・筋疾患に関連する新規機能遺伝子の発見が期待される。今後、siRNA ライブラリーの作製を行うと共に、スクリーニング系の検討を行いたいと思う。

F. 健康危険情報

健康を損なう実験系は使用していない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Miyagishi, M., and Taira, K. Strategies for generation of a stable siRNA-expression library directed against the human genome. **Oligonucleotides**, 13, 325-333, 2003

Miyagishi, M., Suminoto, H., Miyoshi, H., Kawakami, Y., and Taira, K. Optimization of an siRNA-expression system with a mutated hairpin and its significant suppressive effects upon HIV vector-mediated transfer into mammalian cells. **J. Gene Med.**, 2004, in press

2. 学会発表

Miyagishi, M., and Taira, K. 「Development of siRNA expression vector and generation of siRNA expression library」第7回 Gene Therapy Workshop: Tumor vaccine, NIH

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願中

多比良和誠、宮岸 真「干渉用二重鎖RNA」特願 2003-417524

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出 版 社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yokota T, Sakamoto N, Enomoto N, Tanabe, Maekawa, Makoto Miyagishi M, Taira K, Watanabe M, Hidehiro Mizusawa	siRNA-based Inhibition of Hepatitis C Virus Replication by Targeting 5' Untranslated Region.	EMBO report	4	602-608	2003
Nishiwaki Y, Yokota T, Hiraoka M, Miyagishi M, Taira K, Isobe M, Mizusawa H, Yoshida M	Introduction of short interfering RNA to silence endogenous E-selectin in vascular endothelium leads to successful inhibition of leukocyte adhesion.	Biochem Biophys Res Com	310	1062-1066	2003
Yokota T, Sugawara K, Ito K, Takahashi R, Ariga H, Misusawa H	Down regulation of DJ-1 enhances the cell death by oxidative stress, ER-stress and proteasome inhibition.	Biochem Biophys Res Com	312	1342-1348	2003
Yokota T, Miyagishi M, Hino T, Matsumura R, Tasinato A, Urushidani M, Rao RV, Takahashi R, Bredesen DE, Taira K, Mizusawa H	siRNA-based inhibition of superoxide dismutase expression; potential use in familial Amyotrophic lateral sclerosis.	Biochem Biophys Res Com	314	283-291	2004
Li Y, Yokota T, Kakizuka A, Taira K, Mizusawa H	siRNA-based Inhibition of Mutant atacin 3 Gene Expression; Potential Use for Gene Therapy of Machado-Joseph disease.	Ann Neurol (in press)			

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
横田隆徳	RNAiによる神経変性疾患の遺伝子治療をめざして	遺伝子医学	7	349-354	2003
横田隆徳、水澤英洋	siRNAを用いたC型肝炎の遺伝子治療	Molecular Medicine	41 (1)	36-43	2003
横田隆徳	RNAiによるウイルス性疾患の遺伝子治療	医学のあゆみ	208(7)	669-673	2004
横田隆徳	RNAiを用いた神経疾患の遺伝子治療	最新医学	(印刷中)		
横田隆徳	RNAiの医療への応用	実験医学	22	485-491	2004
横田隆徳	RNAiを用いた神経変性疾患へ応用	バイオインダストリー	(印刷中)		

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト (参考)

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
吉田 雅幸	スタチンによる白血球接着抑制の分子機構		BioClinica	北隆館	東京	2003	66-70
吉田 雅幸	接着分子と動脈硬化	小室 一成	Heart View	メジカルビュー	東京	2003	254 - 257
吉田 雅幸	スタチンの多面的作用のメカニズム		医学のあゆみ	医歯薬出版	東京	2003	447-450

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kawakami A, A. Tanaka, K. Nakajima, Y. Yasukochi, K. Shimokado, M. Yoshida.	Remnant lipoprotein-induced smooth muscle cell proliferation involves EGF receptor transactivation	Circulation	108巻	2679-2688	2003年
M. Yoshida, T. Sasaoka, Y. Takano, T. Izumi, A. Kimura	E-selectin polymorphism associated with myocardial infarction causes enhanced leukocyte-endothelial interactions under flow conditions.	Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.	23巻	783-788	2003年
T. Yu, I. Morita, K. Shimokado, T. Iwai, M. Yoshida	Amlodipine modulates THP-1 cell adhesion to vascular endothelium under flow via inhibition of protein kinase C - dependent signal transduction.	Hypertension	42巻	329-334	2003年
Y Nishiwaki, T Yokota, M Hiraoka, M Miyagishi, K Taira, M Isobe, H Mizusawa, M Yoshida	Introduction of short interfering RNA to silence endogenous E-selectin in vascular endothelium leads to successful inhibition of leukocyte adhesion.	Biochem. Biophys. Res. Com	310巻	1062-1066	2003年
Y. Toriumi, M. Hiraoka, M. Watanabe, M. Yoshida	Pioglitazone reduces monocyte adhesion to vascular endothelium under physiological flow conditions by modulating RhoA GTPase and focal adhesion kinase.	FEBS Letters	553巻	419-422	2003年
S. Fujiyama, K. Amano, K. Uehira, M. Yoshida, Y. Nishiwaki, Y. Nozawa, D. Jin, S. Takai, M. Miyazaki, K. Egashira, T. Imada, T. Iwasaka, H. Matsubara.	Bone Marrow Monocyte-Lineage Cells Adhere on Injured Endothelium by MCP-1-Dependent Manner and Accelerate Reendothelialization as Endothelial Progenitor Cells.	Circ Res.	93巻	980-989	2003年

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Kato, Y., Taira, K.	Functional gene discovery using hybrid ribozyme libraries.	Sioud, M	Catalytic Nucleic Acid Protocols	Humana Press	Totowa, NJ	2004	245-256

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Onuki, R., Taira, K. et al.	An RNA-dependent protein kinase is involved in tunicamycin-induced apoptosis and Alzheimer's disease	EMBO J.	23	959-968	2004
Nelson, L.D., Taira, K. et al.	Use of random ribozyme libraries for the rapid screening of apoptosis or metastasis-related genes.	TARGETS	2	191-200	2003
Kawasaki, H. Taira, K.	Short hairpin type of dsRNAs that are controlled by tRNA ^{Val} promoter significantly induce RNAi-mediated gene silencing in the cytoplasm of human cells.	Nucleic Acids Res.	31	700-707	2003
Suyama, E. Taira, K. et al.	Identification of genes responsible for cell migration by a library of randomized ribozymes.	Cancer Res.	63	119-124	2003
Kawasaki, H. Taira, K. et al.	siRNAs generated by recombinant human Dicer induce specific and significant but target site- independent gene silencing in human cells. , 31, 981-987, 2003	Nucleic Acids Res.	31	981-987	2003
Wadhwa R, Taira, K. et al	Targeting mortalin using conventional and RNA-helicase-coupled hammerhead ribozymes.	EMBO Rep.	4	595-601	2003

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yoshinari, K., Miyagishi, M. et al.	Effects on RNAi of the tight structure, sequence and position of the targeted region.	Nucleic Acids Res.	32	691-699	2004
Kobayashi, N. Miyagishi, M. et al.	Vector-based in vivo RNA interference: dose- and time- dependent suppression of transgene expression.	J Pharmacol Exp Ther.	308	688-693	2004
Miyagishi, M. and Taira, K.	Strategies for generation of a stable siRNA-expression library directed against the human genome.	Oligonucleo tides	13	325-333	2003
Yamauchi T., Miyagishi, M. et al.	Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects.	Nature	423	762-769	2003
Futami, T., Miyagishi, M. et al.	Stimulatory effect of an indirectly attached RNA helicase-recruiting sequence on the suppression of gene expression by antisense oligonucleotides.	Antisense Nucleic Acid Drug Dev.	13	9-17	2003
Miyagishi, M., Taira, K et al.	Comparison of the suppressive effects of antisense oligonucleotides and siRNAs directed against the same targets in mammalian cells.	Antisense Nucl. Acid Drug Develop.	13	1-7	2003

20030735

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。