

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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者：水澤 英洋

平成17(2005)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：神経変性疾患の治療、RNAi のデザイン
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

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、Machado-Joseph 病等に対する特異的 siRNA を完成し培養細胞レベルでの治療に成功した。脳血管障害については、白血球接着分子 E-セレクトインの siRNA により培養血管内皮細胞において炎症時の白血球接着を抑制した。C 型肝炎ウイルスの治療推進のため霊長類の肝炎類似モデルにて研究を進めた。デリバリーでは中枢神経系への直接注入の他、Hydrodynamic injection 法で末梢血管から脳血管内皮細胞や肝臓への導入に成功するとともに、内因性 SOD1 遺伝子発現を 90%抑制する siRNA 過剰発現トランスジェニックマウスの作製に成功し、家族性筋萎縮性側索硬化症モデルマウスと掛合わせてその治療に成功した。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ことにより、高いターゲットサイト予測確率を得るアルゴリズムを開発した。アポトーシス関連遺伝子を中心に 1,000 以上の遺伝子をターゲットとする siRNA ライブラリーを構築し、それを用いて小胞体ストレスによる新規アポトーシス関連分子を同定した。

分担研究者

横田隆徳 東京医科歯科大学大学院医歯学
総合研究科脳神経病態学
吉田雅幸 東京医科歯科大学大学院医歯学
総合研究科病態代謝解析学・血流
制御内科学
多比良和誠 東京大学大学院工学系研究科化学
生命工学
宮岸 真 東京大学大学院医学系研究科化

A.研究目的

RNAi(RNA interference)は2本鎖RNAによる転写後遺伝子発現抑制機構の1つで、線虫やショウジョウバエなどいくつかの生物種では効果的な遺伝子発現ノックダウン法として用いられてきた。一方、哺乳動物細胞では2本鎖RNAを導入すると、インターフェロン応答としてよく知られている2本鎖RNA依存のタンパク質キナーゼとオリゴアデニル酸合成酵素の活性化によって翻訳阻害やmRNAの分解が

起きてしまいこれまで応用できなかった。しかし、2000年にTuschlらにより3'側に2塩基突出した21-22塩基の短い2本鎖RNAを用いることによって哺乳動物細胞においても発現抑制に有効で、かつ上記毒性を回避できるsiRNA (short interfering RNA)が開発された。

このsiRNAを神経・筋疾患の遺伝子治療に応用しようとした場合RNAの核酸としての不安定性と神経・筋へのデリバリーが大きな問題となる。そこで我々は2本のsiRNAの配列を発現ベクターに組み込み細胞内で発現させて両者

を細胞内でハイブリダイズさせる発現型 siRNA システムを開発し、siRNA をオリゴ核酸として導入した場合とほぼ同様の効率で遺伝子発現を抑制することに成功した (Nature Biotechnology, 2001)。

まず、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、脳血管障害（とくに脳動脈硬化症）などで標的遺伝子の発現を効率よく抑制する siRNA を工夫する。哺乳動物の培養細胞にてアデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、カチオニックリポソームベクターなどに組み込み哺乳動物細胞の神経細胞に *in vivo* で効率良く長期間発現する発現型 RNAi システムを開発する。最終的には、動物モデルを用いてその有用性の実証を目指す。

B. 研究方法

1) 発現型 RNAi の作製

これまでのものに加えて脊髄小脳変性症でも CAG リピート病に対する siRNA 治療を工夫する。導入した標的分子の recombinant 蛋白や内因性蛋白をウエスタンブロットすることにより最も有効な発現型 siRNA を選択する。また、条件を整えば本来より特異性が高く効率的に siRNA を作製しやすいウイルス性疾患についても検討を行う。

2) 標的細胞・組織への発現型 RNAi 導入法の確立

神経細胞への発現型 RNAi 導入は、一過性発現については組み換え型アデノウイルスや HVJ-E カチオニックリポソームを用い、長期間の発現にはアデノ随伴ウイルスを用いて行う。必要に応じて HIV を含むレトロウイルスベクターの開発も行う。デリバリーには脳脊髄内への直接注入、注入ポンプを用いた脊髄液中への持続注入を検討するとともに、単純な静脈投与と血液脳関門の通過を工夫する方法も検討する。

3) siRNA トランスジェニックマウスの作製

生体内で発現した siRNA が本当に標的遺伝子の発現を抑制して治療効果を発現するかどうか確認するために、SOD1 に対する siRNA を発現したトランスジェニックマウスを作製し、家族性筋萎縮性側索硬化症動物モデルである G93A 変異 SOD1 トランスジェニックマウスとの掛け合わせによりその効果を検証する。

4) より効果的な siRNA 発現ベクターの開発

より効果的な siRNA 発現ベクターの開発としてステムループ型発現系に着目し、その欠点の克服をめざす。

5) 効果的ターゲットサイトの予測とそれを用いた RNAi ライブラリーの構築

RNAi ベクターの効果はターゲットサイトに大きく左右される。従来は、約 25~40%位の確率でしか効果の高いサイトがみつからない状況である。これまでの約 200 以上のサイトに対する siRNA の実験結果のデータから、抑制活性と相関する条件を抽出し、この予測確立をより高くするアルゴリズムを開発する。

倫理面への配慮について、siRNA は化学合成により作製し、変異 cDNA は mutagenesis によって作製しており倫理的な問題は全くない。また、動物実験は当該研究施設の動物実験委員会等の承認を得ており、倫理面や動物愛護には十分に配慮して実施されている。

C. 研究結果

優性遺伝性脊髄小脳失調症で最も多い Machado-Joseph 病の原因である伸長 CAG リピートに関連した G/C 多型、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、変異アシル特異的に作用する siRNA の作製にも成功した (Ann Neurol, 2004)。同様にパーキンソン病の原因遺伝子である A30P 変異シヌクレインを選択的に発現抑制する siRNA を作製した。アルツハイマー病に対して β セクレターゼである BACE1、 γ セクレターゼである PS1、nicastatin

など関連分子の発現抑制をするsiRNAを完成した。また、CAGリピート病に対する治療開発から理論的には全ての遺伝子変異に対応可能なRNAiテクニックを開発し培養細胞レベルでは脊髄小脳失調症6型の治療に成功した。

脳血管障害については、昨年度作成したE-セレクトリンRNAiに加えてICAM-1のsiRNAを作製し、特異的な蛋白発現抑制効果を確認した。さらにこの二つの重要な接着分子のsiRNAによる発現抑制の効果を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白血球の接着のパターンを観察した。E-セレクトリンのRNAiではローリング、強固な接着のいずれもが抑制を受けたのに対し、ICAM-1のRNAiでは強固な接着のほうにより強く抑制を受け、これらの接着分子の白血球接着における役割が異なることを証明した。1本鎖RNAウイルスであるC型肝炎ウイルスはヒトにしか感染しないため、よく似た肝障害を来すウイルスとその霊長類モデルを用いて研究を進めた。

さらに、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%抑制する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。siRNA過剰発現トランスジェニックマウスとターゲットとなる疾患のモデルマウスとの掛け合わせを開始し治療に成功した。

より活性が高く安定な発現系としてステムループ型を見出し、その問題点であるシーケンスが読めないことや大腸菌中で高率に変異が入るため取り扱いが困難であることなどを改良し、非常に安定で高い効果を有するsiRNA発現型アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスベクターの作製に成功した。

デリバリーについては、中枢神経系への直接注入の他、Hydrodynamic injection法を用いて末梢血管からオリゴヌクレオチドあるいはHVJ-E

やカチオニックベクターにより直接in vivoに導入する方法などを比較検討した。実際、SOD1遺伝子に関するアデノ随伴ウイルスベクターを開発、Hydrodynamic injection法で脳の血管内皮細胞と肝臓に導入することに成功した。

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、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成を行った。また、約300個のsiRNAベクターを作製し、siRNAと比較することにより、ベクター用の予測プログラムを作成した。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。

前年度までに開発したバルク法により1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を中心に1,000以上の遺伝子をターゲットとするsiRNAライブラリーを構築し活用を開始した。実際に、スクリーニングを行い、小胞体ストレスアポトーシスの経路に関わる因子としてMAPK8、ERK2を同定した。

D. 考察

今年度は、これまでのものに加えて、神経変性疾患の中で特異な位置を占めるCAGリピート病の治療についての工夫から、理論的にはあらゆる遺伝子変異に対応できるsiRNAテクニックを開発するなど当初の目的は十分に達成されたと思われる。また、個体内で機能するかについてはhydrodynamic法やsiRNAトランスジェニックマウスの作製に成功して、変異SOD1をもつ家族性筋萎縮性側索硬化症モデルマウスとの掛け合わせによりその有効性を確認した。デリバリーシステムについてはリポソーム法を改良してウイルスを使わない方法の開発にも成功しており、全身投与なら単純な静注でも有効と思われる。基礎研究ではレトロウイルスベクターの開発、siRNAライブラリーの構築

などに成功した。このように臨床研究、基礎研究ともに予想以上の成果が達成できた。海外でもようやく同レベルの研究が公表されつつあり激しい競争の中にあるが、我々の研究は基礎研究者と臨床医学研究者が密接な連携の下に推進しており、技術革新の影響の大きいRNAiの領域においては非常に有利である。これは、例えば siRNA 発現ライブラリー作製でも我々のものはターゲットサイトノックダウン効率、およびベクターの安定性の点で優れている。まだまだすぐに臨床応用できるわけではないが、これらの成果は難病治療の研究に画期的な進歩をもたらしたことになり、後述のごとく多くのメディアにも高い評価を受けており社会的意義も大きい。

今後は、いよいよ個体レベルでの有効性の検証と副作用のチェックを進める段階である。ようやく完成した siRNA トランスジェニックマウスを用いて siRNA の有用性の検証を行うとともに、従来のウイルスベクターの改良と新規レンチン性カチオンリポソームによる全く新しい静注可能なデリバリーシステムの開発を推進する。

また、中枢神経内へのデリバリーには不可欠の血液脳関門の通過については本来の高分子輸送機構を活用した新しい通過方法を確立し、これらを用いてアルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、脳血管障害などの各動物モデルにて有用性を実証する。さらに、脳血管障害や多発性硬化症については脳血管内皮細胞への siRNA 導入による新規治療法も開発する。

我々の siRNA 発現システムはインターフェロン反応を引き難くする工夫などがなされているが、off-target effect を含め個体レベルでの安全性の研究を開始する。RNAi の研究は急速に進歩しており、基礎的な RNA の工学的研究も新規発現ベクターの開発や標的遺伝子探索

のためのライブラリーの構築をさらに推進する。

これら研究は、昨年に引き続き Medical Tribune 感染症版 (2004 年 3 月 11 日)、日経産業新聞 (2004 年 8 月 18 日)、朝日新聞 (2004 年 9 月 1 日)、Nature432:nature jobs & events “小さな RNA 断片に秘められた大きな可能性” (2004 年 12 月 23/30 日) などに紹介され高い評価を受けている。

E. 結論

従来の変異遺伝子や標的遺伝子に特異的な発現型RNAiのみならず、リピート病を含む全ての変異に対応可能なRNAiテクニックの開発に成功している。C型肝炎ウイルスに対しては、類縁疾患の動物モデルを用いた研究が進んだ。siRNA発現型アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスベクターはさらに改良を加えてよい効率の良いものが得られており、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(日本分子生物学会、2004)。また、バルク法を開発し1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活用を開始した。

このように予定の研究は着実に進展しており目的も達成されている。すでに、さらなる発展の萌芽となるべき成果も上がりつつあり、今後の飛躍が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yokota T, Sugawara K, Ito K, Takahashi R, Ariga H, Mizusawa H. Down regulation of DJ-1

- enhances cell death by oxidative stress, ER stress, and proteasome inhibition. *BiochemBiophys Res Com* 312: 1342-1348, 2004
- 2) Yokota T, Miyagishi M, Hino T, Matsumura R, Andria T, 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* 291: 283-291, 2004
- 3) Li Y, Yokota T, Taira K, Mizusawa H. siRNA-based Inhibition of Mutant ataxin 3 Gene Expression; Potential Use for Gene Therapy of Machado-Joseph disease. *Ann Neurol* 56:124-129, 2004
- 4) Ohshima S, Nakamura T, Namiki S, Okada E, Tsuchiya K, Okamoto R, Yamazaki M, Yokota T, Kanai T, Watanabe M. IRF-1 and IRF-2 distinctively up-regulate gene expression and production of IL-7 in human intestinal epithelial cells. *Mol Cell Biol* 24: 6298-6310, 2004
- 5) Hori S, Sumio Ohtsuki S, Ichinowatari M, Yokota T, Kanda T, Terasaki T. Selective gene silencing of rat ATP-binding cassette G2 transporter in an in vitro blood-brain barrier model by short interfering RNA. *J Neurochem* in press, 2005
- 6) 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: 36-43, 2004
- 7) 横田隆徳. RNAi を用いたウイルス性肝炎の遺伝子治療. *医学のあゆみ* 208: 669-673, 2004
- 8) 横田隆徳. RNAi の医療への応用. *実験医学* 22: 485-491, 2004
- 9) 横田隆徳. 神経変性疾患への RNAi の臨床応用の展望. *最新医学* 59:138-144, 2004
- 10) 横田隆徳. 神経変性疾患研究における RNAi を用いた遺伝子発現制御. *バイオインダストリー* 21: 43-51, 2004
- 11) 横田隆徳. RNAi を用いた遺伝子治療の可能性. *臨床免疫* 42: 494-498, 2004
- 12) 横田隆徳. RNAi の神経疾患への応用. *細胞工学* 24: 378-382, 2005
- 13) 横田隆徳. RNAi によるウイルス複製制御ウイルス in press, 2005
- 14) Hiraoka M, Nitta N, Nagai M, Shimokado K and Yoshida M. MCP-1-induced enhancement of THP-1 adhesion to vascular endothelium was modulated by HMG-CoA reductase inhibitor through RhoA GTPase-, but not ERK1/2-dependent pathway. *Life Sci* 75: 1333-1341, 2004
- 15) Gotoh R, Suzuki J, Kosuge H, Kakuta T, Sakamoto S, Yoshida M, Isobe M. E-selectin blockade decreases adventitial inflammation and attenuates intimal hyperplasia in rat carotid arteries after balloon injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1-7, 2004
- 16) Kawakami A, Tani M, Chiba T, Yui K, Shinozaki S, Nakajima K, Tanaka K, Shimokado K, Yoshida M. Pitavastatin inhibits remnant lipoprotein-induced macrophage foam cell formation via apoB48 receptor-dependent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 1-6, 2005
- 17) Kuwabara T, Taira K. et al. A small modulatory dsRNA specifies the fate of adult neural stem cells. *Cell* 116: 779-793, 2004
- 18) Kawasaki H, Taira K. Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells. *Nature* 431: 211-217, 2004
- 19) Kawasaki H, Taira K. et al. World of small RNAs: from ribozymes to siRNA and miRNA. *Differentiation* 72: 58-64, 2004
- 20) Inoue A, Taira K, et al. Importance in catalysis of a magnesium ion with very low affinity for a hammerhead ribozyme. *Nucleic Acids Res* 32:

4217-4223, 2004

- 21) Suyama E, Taira K, et al. Identification of metastasis-related genes in a mouse model using a library of randomized ribozymes. *J Biol Chem* 279: 38083-38086, 2004
- 22) Suzumura K, Taira K, et al. NMR-Based Reappraisal of the Coordination of a Metal Ion at the Pro-Rp Oxygen of the A9/G10.1 Site in a Hammerhead Ribozyme. *J Am Chem Soc* 126: 15504-15511, 2004
- 23) Takagi Y, Taira K, et al. Analysis on a cooperative pathway involving multiple cations in hammerhead reactions. *J Am Chem Soc* 126: 12856-12864, 2004
- 24) Uddin M, Taira K, et al. Phosphorylation at 5' end of guanine stretches inhibits dimerization of G-quadruplexes and formation of a G-quadruplex interferes with the enzymatic activities of DNA enzymes. *Nucleic Acids Res* 32: 4618-4629, 2004
- 25) 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
- 26) Futami T, Miyagishi M, et al. Identification of a network involved in thapsigargin-induced apoptosis using a library of siRNA-expression vectors. *J Biol Chem* 280: 826-831, 2005
- 27) Yoneyama M, Miyagishi M, et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 5: 730-737, 2004
- 28) Kasim V, Miyagishi M, et al. Control of siRNA expression using the Cre-loxP recombination system. *Nucleic Acids Res* 32: E66, 2004
- 29) Miyagishi M, et al. Optimization of an siRNA-expression system with an improved hairpin and its significant suppressive effects in

mammalian cells. *J Gene Med* 6: 715-723, 2004

- 30) Miyagishi M, et al. Generation of an shRNAi expression library against the whole human transcripts. *Virus Res* 102:117-124, 2004
- 31) Sumimoto H, Miyagishi M, et al. Inhibition of growth and invasive ability of melanoma by inactivation of mutated BRAF with lentivirus-mediated RNA interference. *Oncogene* 23: 6031-6039, 2004
- 32) Uchida H, Miyagishi M, et al. Adenovirus-mediated transfer of siRNA against survivin induced apoptosis and attenuated tumor cell growth in vitro and in vivo. *Mol Ther* 10: 162-171, 2004
- 33) Yoshinari K, Miyagishi M, et al. Effects on RNAi of the tight structure, sequence and position of the targeted region. *Nucleic Acids Res* 31: 691-699, 2004
- 34) 横田隆徳、水澤英洋. siRNA の神経疾患への応用. 金澤一郎、柴崎浩、東儀英夫編, 神経内科の最新医療, 先端医療技術研究所, 東京, 2004 pp43-48
- 35) Yokota T. siRNA-Based Inhibition Specific for Mutant Alleles in Autosomal Dominant Diseases: Sequence-Dependent and -Independent Discrimination of Mutant and Wild-Type Alleles by siRNA. Taira K, Kataoka K, Niidome T eds. *Non-viral Gene Therapy: Gene Design Delivery*, Tokyo, 2004 in press
- 36) 吉田雅幸, 森尾友宏, アンドリューW.シメル, ポールR.ラドン編, 日英対話で学ぶ米国の臨床医学(Language and Philosophy of Western Medicine), 南山堂, 東京, 2004
- 37) 明石英雄, 多比良和誠ら. RNAi のメカニズム. 多比良和誠ら編, RNAi 実験プロトコール, 羊土社, 東京, 2004 pp16-34
- 38) 松本佐保姫, 宮岸 真ら. siRNA ライブラリーの利用. 多比良和誠ら編, RNAi 実験プロ

トコール, 羊土社, 東京, 2004, pp219-223

2. 学会発表

- 1) 伊藤薫, 横田隆徳, 他. siRNA 過剰発現によるノックダウンマウスの作製法の検討, 第27回日本分子生物学会, 2004
- 2) 横田隆徳. RNAi の基本原理とその医療への応用. Amersham Biosciences Symposium, 2004
- 3) 横田隆徳, 他. 変異アリル特異的な siRNA を用いた変性疾患の遺伝子治療, 第45回日本神経学会総会, 2004
- 4) Deushi M, Yoshida M. Endothelial Gene Silencing of ICAM-1 Revealed its Contribution in Leukocyte Adhesion and Signalling. 日本循環器学会 2005.3.
- 5) Takano Y, Yoshida M. CD4 and CXCR4 Independently Enhances T Cells Recruitment to Activated Endothelium via MAP Kinase Signaling. 日本循環器学会 2005.3.
- 6) Takahashi K, Yoshida M. SDF-1-triggered Adhesion of Human Monocytes to Vascular Endothelium is Modulated by Azelnidipine via Inhibition of Protein Kinase C Alpha. 日本循環器学会 2005.3.
- 7) Nakamura N, Yoshida M. Primal Role of TLR2, but not TLR4 through eNOS Downregulation In Porphyromonas-gingivalis-induced Adhesive Interaction of Monocytes. 日本循環器学 2005.3.
- 8) Taira K. Rapid Identification of Functional Genes by Ribozyme and Sirna Libraries that would not

Induce Interferon Responses. Keystone symposia meeting, 2005

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

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 横田隆徳, 他. 変異 MJD 遺伝子の発現を特異的に抑制する siRNA。(特許出願番号 2004-122375)
- 2) 横田隆徳, 他. 変異 MJD 遺伝子の発現を特異的に抑制する siRNA。(特許出願番号 2004-122375)
- 3) 横田隆徳, 他. siRNA を用いたあらゆる遺伝子変異に対して変異アリル特異的な新規遺伝子発現抑制方法。(特許申請手続中)
- 4) E-セレクトイン標的 2 重鎖 RNA 配列 (仮称) (出願予定)
- 5) 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)
- 6) 多比良和誠、宮岸 真 「干渉用二重鎖 RNA」 (特許出願番号 2003-417524)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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）横田隆徳 東京医科歯科大学 助教授

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) あらゆる変異に対応可能な変異アリル特異的な新しい RNAi を用いた遺伝子発現抑
制方法を開発した。5) siRNA 過剰発現トランスジェニックマウス (TgM) の作製し、家族性 ALS
のモデル動物である G93A SOD1 TgM と掛け合わせすることにより、ALS 発症の予防に成功した。

A siRNA を用いて遺伝性の神経変性疾患、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

1) 培養細胞実験：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、Northern
blot 法、細胞死のアッセイで評価した。

2) siRNA トランスジェニックマウス (TgM)
作製：マウス ES 細胞に SOD1-siRNA 発現断片
を導入し、クローンを選択した。高率に SOD1
タンパクの発現を抑制したクローンからキメ
ラマウスを作製し F1 マウスを得た。さらに作
製した SOD1-siRNA TgM と家族性 ALS のモデル
動物である G93A SOD1 TgM を体外受精させダ
ブルヘテロマウスを得た。

siRNA は化学合成し、変異 cDNA は
mutagenesis によって作製し、人権擁護上問
題ない。すべての動物実験は東京医科歯科大
学動物実験倫理委員会の審査と許可を得て行
ない、動物の苦痛を除く最大限の努力をした。

C. 研究結果 D 考察

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 塩基の違いの
みの点変異をも認識して作用する siRNA のデ
ザインに成功した¹⁾。

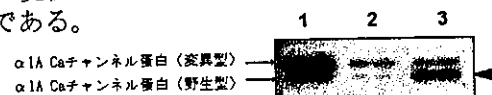
2) Machado-Joseph 病の原因である伸長 CAG
repeat に関連した G/C polymorphism および
ターゲット RNA の 2 次構造の変化を利用し

配列依存のおよび非依存的な siRNA の識別方
法で変異アリル特異的に作用する siRNA を作
製した。RNA の 1 次配列に非依存的にターゲ
ット RNA を認識して作用する siRNA の初めて
成功例となった²⁾。

3) 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³⁾。同時期に発表された類似の報告
に比較して抑制効率ももっとも良かった。

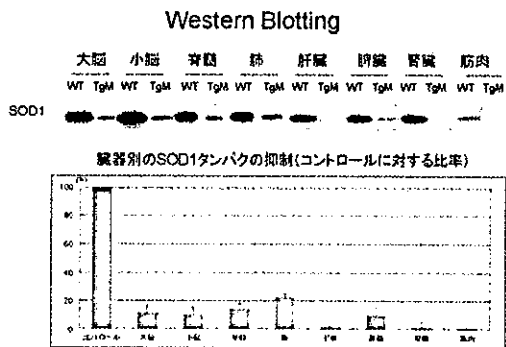
4) 劣性遺伝性 Parkinson 病の原因遺伝子で
ある DJ-1 の発現を siRNA を用いて抑制する
ことにより酸化ストレスによる細胞死や小胞体
ストレスやプロテアソーム抑制による細胞死が
増強した。さらに野生型 DJ-1 の過剰発現によ
り劇的に救済され、変異型 (L166P) DJ-1 で
は変化しなかった。培養細胞系で変異 DJ-1 が
神経変性を起こす機序を示した⁴⁾。

5) あらゆる変異に対応可能な変異アリル特
異的な新しい RNAi を用いた遺伝子発現抑制方
法の開発：まず siRNA で変異型と野生型、両
者の RNA の発現を抑制し(下図レーン 2)、その
siRNA で切断されないようにエンジニアした
cDNA によって野生型タンパクを戻す(下図レ
ーン 3)。そのためにアミノ酸配列は変わらな
いがこれをコードする RNA 配列を変異させて
作製した siRNA が効かないようにデザインし
た。現在 vivo での効果を確認中で、特許出願
中である。

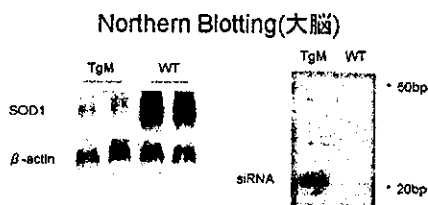


あらゆる変異に対応可能な変異アリル特異的な新しい RNAi

6) SOD1-siRNA TgM の作製: 高率に SOD1 タンパクの発現を抑制した ES 細胞のクローンが得られた。このクローンをマイクロインジェクションして作製したキメラマウスから生まれた F1 マウスにおいて、SOD1-siRNA トランスジーンを組み込みが確認され、全身性に SOD1 タンパクの発現が抑制されており、脊髄や大脳では 85-90%の抑制率であった(下図)。



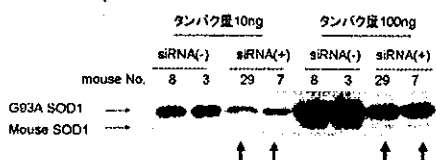
さらにノーザンブロット法では大脳における siRNA の発現(下図右)と SOD1 mRNA の発現抑制(下図左)が確認された。



7) SOD1-siRNA TgM と G93A SOD1 TgM の掛け合わせ

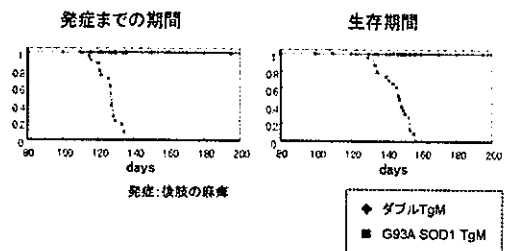
SOD1-siRNA トランスジーンと G93A SOD1 トランスジーンを有するダブル TgM が得られた。このダブル TgM では G93A SOD1 タンパクおよびマウス内因性 SOD1 タンパクの発現抑制が認められた(下図)。

G93A SOD1 TgMとダブルTgMのwestern blotting(尾)



G93A SOD1 TgM は 136 日齢までに 23 匹全例発症、157 日齢までに全例死亡しているのに対し、ダブル TgM では 195 日齢たった今でも発症していない(右上図)。

発症までの期間および生存期間の比較



本研究の結果、SOD1-siRNA の過剰発現により変異 SOD1 タンパクの発現量を減らすことに成功し、これによって遺伝病である FALS の発症を予防できることが明瞭に示された。この結果は Nature に投稿予定である。

E. 結論

変異遺伝子特異的な siRNA の作製方法を開発して、その有効性をマウスモデルで明瞭に示した。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 super-oxide 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* 2004, 56, 124-129
- 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. Inhibition of intracellular hepatitis C Virus replication *International Congress of RNA*, in Kyoto, Nov 25, 2003
- 2) 伊藤藤、横田隆徳、他: siRNA 過剰発現によるノックダウンマウスの作製法の検討、第 27 回日本分子生物学会、2004
- 3) 横田隆徳: RNAi の基本原理とその医療への応用:

Amersham Biosciences Symposium、2004

4) 横田隆徳、他：変異アリル特異的な siRNA を用いた変性疾患の遺伝子治療、第 45 回日本神経学会総会、2004

H. 知的財産権の出願・登録状況

1) 横田隆徳、他。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)

2) 横田隆徳、他。変異 MJD 遺伝子の発現を特異的に抑制する siRNA。(特許出願番号 2004-122375)

3) 横田隆徳、他。siRNA を用いたあらゆる遺伝子変異に対して変異アリル特異的な新規遺伝子発現抑制方法。特許申請手続き中

2. 実用新案登録：なし

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ことが分かった。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）の制圧はこれからの高齢者医療における重要な柱の一つである。脳血管障害の発症に重要な動脈硬化症および血栓症の制御のため、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遺伝子として白血球接着分子 E-セレクトインに対する二重鎖 RNAi を作成し、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。さらにもう一つの重要な接着分子である ICAM-1 に対しても二重鎖 RNAi を作成し、白血球の接着に対する影響を E-セレクトインと比較検討した。

（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

昨年度作成した E-セレクトイン RNAi に加えて ICAM-1 の RNAi を作成し、特異的な蛋白発現抑制効果を確認した。さらにこの二つの重要な接着分子の RNAi による発現抑制の効果を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白血球の接着のパターンを観察した。E-セレクトインの RNAi ではローリング、強固な接着のいずれもが抑制を受けたのに対し、ICAM-1 の RNAi では強固な接着のほうにより強く抑制を受け、これらの接着分子の白血球接着における役割が異なることを証明した。

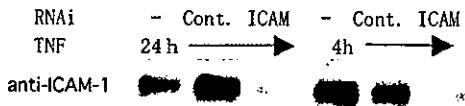


図 1 培養内皮細胞において ICAM-1 RNAi (ICAM) は非導入群 (-) やコントロール導入群 (Cont) に比べて、ICAM-1 の発現を著明に抑えた。

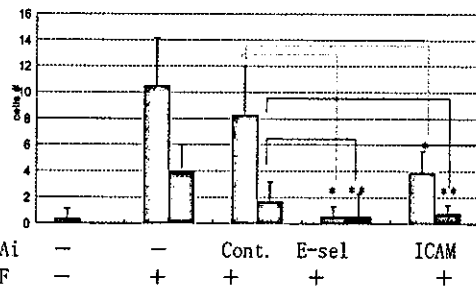


図 2 培養内皮細胞において、E-セレクトイン RNAi (E-sel) は白血球のローリング接着の両者を ICAM-1 RNAi (ICAM) を導入した血管内皮細胞は白血球の接着を著明に減弱させた。

D. 考察

21 塩基の 2 重鎖 E-セレクトインおよび ICAM-1 の RNAi によってそれぞれの接着分子の発現を抑制することによって血管内皮細胞に対する白血球の接着を制御できることが分かった。

E. 結論

2 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 (2004~2005 年度のみ)

- M Hiraoka, N Nitta, M Nagai, K Shimokado and **M Yoshida** MCP-1-induced enhancement of THP-1 adhesion to vascular endothelium was modulated by HMG-CoA reductase inhibitor through RhoA GTPase-, but not ERK1/2-dependent pathway *Life Sci* 75: 1333-1341 (2004)
- R. Gotoh, J. Suzuki, H. Kosuge, T. Kakuta, S. Sakamoto, **M. Yoshida**, M. Isobe E-Selectin Blockade Decreases Adventitial Inflammation and Attenuates Intimal Hyperplasia in Rat Carotid Arteries After Balloon Injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24: 1-7 (2004)
- A. Kawakami, M. Tani, A. T. Chiba, K. Yui, S. Shinozaki, K. Nakajima, Tanaka, K. Shimokado, **M. Yoshida**. Pitavastatin inhibits remnant lipoprotein-induced macrophage foam cell formation via apoB48 receptor-dependent mechanism *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25: 424-429 (2005)

2. 学会発表

出牛	三千代、吉田 雅幸	平成 17 年 3 月	日本循環器学会
高野	仁男、吉田 雅幸	平成 17 年 3 月	日本循環器学会
高橋	恵子、吉田 雅幸	平成 17 年 3 月	日本循環器学会
中村	直和、吉田 雅幸	平成 17 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。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。本研究により、神経・筋疾患に関連する遺伝子を効果的且つ、安全に抑制することが可能となった。

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 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。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、siRNA 発現ベクターも同じターゲットサイトで作製し、siRNA ベクター用のアルゴリズムの作製も行った。同時に、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

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、約 300 個の siRNA ベクターを作製し、siRNA と比較することにより、ベクター用の予測プログラムを作成した。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

siRNA、siRNA ベクター共に、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

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

Taira, K. "Rapid Identification of Functional Genes by Ribozyme and Sirna Libraries that would not Induce Interferon Responses" Keystone symposia meeting, 2005

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 「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 東京大学大学院医学系研究科 特任助教授

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。また、このライブラリーを用いて、小胞体ストレスに対するアポトシスのシグナル解析を行い、いくつかの興味深い因子を同定した。

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 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い、それを用いたシグナル解析を行う。

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。また、そのライブラリーを用いたスクリーニング系の検討を行う。

（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。さらに、アポトシス関連遺伝子に対して、実際にライブラリーを作製し、スクリーニングを行い、小胞体ストレスアポトシスの経路に関わる因子として、MAPK8、ERK2 を同定した。

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、多くの遺伝子に対して、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、神経・筋疾患遺伝子に関わる遺伝子の探索を行っていきたい。

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

Futami, T., Miyagishi, M. and Taira, K. Identification of a network involved in thapsigargin-induced apoptosis using a library of siRNA-expression vectors., **J Bio Chem.**, 280, 826-831, 2005

Miyagishi, M., Sumimoto, 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.**, 6, 715-723, 2004

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
横田隆徳、水澤英洋	siRNA の神経疾患への応用	金澤一郎、柴崎浩、東儀英夫	神経内科の最新医療	先端医療技術研究所	東京	2004	43-48
Yokota T	siRNA-Based Inhibition Specific for Mutant Allele in Autosomal Dominant Diseases: Sequence- Dependent and - Independent Discrimination of Mutant and Wild-Type Alleles by siRNA.	Taira K, Kataoka K, Niidome T	Non-viral Gene Therapy: Gene Design and Delivery.	Springer-Verlag	Tokyo	2004	in press

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, Sugawara K, Ito K, Takahashi R, Ariga H, Mizusawa H.	Down regulation of DJ-1 enhances cell death by oxidative stress, ER stress, and proteasome inhibition.	Biochem Biophys Res Com	312	1342-1348.	2004
Yokota T, Miyagishi M, Hino T, Matsumura R, Andria T, Urushidani M, Rao RV, Takahashi R, Bredesen DE, Taira K, Mizusawa H.	siRNA-based inhibition specific for mutant SOD1 with single nucleotide alternation in familial ALS, compared with ribozyme and DNA enzyme	Biochem Biophys Res Com	314	283-291	2004
Li Y, Yokota T, Taira K, Mizusawa H.	Sequence-dependent and independent inhibition of mutant ataxin 3 by small interfering RNA	Ann Neurol	56	124-129	2004
Ohshima S, Nakamura T, Namiki S, Okada E, Tsuchiya K, Okamoto R, Yamazaki M, Yokota T, Kanai T, Watanabe M.	Interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2 distinctively up-regulate gene expression and production of interleukin-7 in human intestinal epithelial cells.	Mol Cell Biol	24	6298-6310	2004
Hori S, Sumio Ohtsuki S, Ichinowatari M, Yokota T, Kanda T, Terasaki T.	Selective gene silencing of rat ATP-binding cassette G2 transporter in an in vitro blood-brain barrier model by short interfering RNA.	J Neurochem	93	63-71	2005
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	36-43	2004

横田隆徳	RNAi を用いたウイルス性肝炎の遺伝子治療	医学のあゆみ	208	669-673	2004
横田隆徳	RNAi の医療への応用	実験医学	22	485-491	2004
横田隆徳	神経変性疾患への RNAi の臨床応用の展望	最新医学	59	138-144	2004
横田隆徳	神経変性疾患研究における RNAi を用いた遺伝子発現制御	バイオインダストリー	21	43-51	2004
横田隆徳	RNAi を用いた遺伝子治療の可能性	臨床免疫	42	494-498	2004
横田隆徳	RNAi の神経変性疾患への応用応用	細胞工学	24	378-382	2005
横田隆徳	RNAi によるウイルス複製抑制制御	ウイルス	24	in press	2005

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		森尾 友宏 アンドリュー.W. シメル、ポ ールR. ラドン	日英対話で学ぶ米国の臨床医学(Language and Philosophy of Western Medicine)	南山堂	日本	2004年	

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
Hiraoka M, Nitta N, Nagai M, Shimokado K, and Yoshida M.	MCP-1-induced enhancement of THP-1 adhesion to vascular endothelium was modulated by HMG-CoA reductase inhibitor through RhoA GTPase-, but not ERK1/2-dependent pathway .	Life Sci.	75	1333-1341	2004
Gotoh R, Suzuki J, Kosuge H, Kakuta T, Sakamoto S, Yoshida M, Isobe M.	E-selectin blockade decreases adventitial inflammation and attenuates intimal hyperplasia in rat carotid arteries after balloon injury.	Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.	24	1-7	2004
Kawakami A, Tani M, Chiba T, Yui K, Shinozaki S, Nakajima K, Tanaka K, Shimokado K, Yoshida M.	Pitavastatin inhibits remnant lipoprotein-induced macrophage foam cell formation via apoB48 receptor-dependent mechanism	Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.	25	1-6	2005

別紙4

書籍

著者氏名	論文タイトル名	編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
明石英雄、 多比良和誠 ら	RNAiのメカニズム	多比良和誠 ら	RNAi 実験プロ トコール	羊土社	東京	2004	16-34

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
Kuwabara, T. Taira, K. et al.	A small modulatory dsRNA specifies the fate of adult neural stem cells.	Cell	116	779-793	2004
Kawasaki, H. Taira, K.	Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells.	Nature	431	211-217	2004
Kawasaki, H. Taira, K. et al.	World of small RNAs: from ribozymes to siRNA and miRNA.	Differentiation	72	58-64	2004
Inoue, A., Taira, K. et al.	Importance in catalysis of a magnesium ion with very low affinity for a hammerhead ribozyme.	Nucleic Acids Res.	32	4217-4223	2004
Suyama, E., Taira, K. et al.	Identification of metastasis-related genes in a mouse model using a library of randomized ribozymes.	J Biol Chem.	279	38083-38086	2004
Suzumura, K. Taira, K. et al.	NMR-Based Reappraisal of the Coordination of a Metal Ion at the Pro-Rp Oxygen of the A9/G10.1 Site in a Hammerhead Ribozyme.	J Am Chem Soc.	126	15504-15511	2004
Takagi, Y., Taira, K. et al.	Analysis on a cooperative pathway involving multiple cations in hammerhead reactions.	J Am Chem Soc.	126	12856-12864	2004
Uddin, M. Taira, K. et al.	Phosphorylation at 5' end of guanosine stretches inhibits dimerization of G-quadruplexes and formation of a G-quadruplex interferes with the enzymatic activities of DNA enzymes.	Nucleic Acids Res.	32	4618-4629	2004

別紙 4

書籍

著者氏名	論文タイトル名	編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
松本佐保姫、 宮岸 真ら	siRNA ライブラリー の利用	多比良和誠 ら	RNAi 実験プロ トコール	羊土社	東京	2004	219-223

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
Futami, T., Miyagishi, M. et al.	Identification of a network involved in thapsigargin-induced apoptosis using a library of siRNA-expression vectors.	J Biol Chem	280	826-831	2005
Yoneyama, M. Miyagishi, M. et al.	The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses.	Nat Immunol.	5	730-737	2004
Kasim, V., Miyagishi, M. et al.	Control of siRNA expression using the Cre-loxP recombination system.	Nucleic Acids Res.	32	E66	2004
Miyagishi, M. et al.	Optimization of an siRNA-expression system with an improved hairpin and its significant suppressive effects in mammalian cells.	J Gene Med.	6	715-723	2004
Miyagishi, M. et al.	Generation of an shRNAi expression library against the whole human transcripts.	Virus Res.	102	117-124	2004
Sumimoto, H., Miyagishi, M. et al.	Inhibition of growth and invasive ability of melanoma by inactivation of mutated BRAF with lentivirus-mediated RNA interference.	Oncogene	23	6031-6039	2004
Uchida, H. Miyagishi, M. et al.	Adenovirus-mediated transfer of siRNA against survivin induced apoptosis and attenuated tumor cell growth in vitro and in vivo.	Mol Ther.	10	162-171	2004