

siRNA ターゲットサイトの選択

Quasispecies の問題から、もし siRNA にその配列上ターゲットサイトとのミスマッチ変異が生じた場合とくにその変異部位が 19 nt のうち 5' から 9~13 塩基目付近であると、たとえ 1 塩基でも大きく切断効率を下げる場合があることが知られ¹²⁾、実際に HIV で siRNA の効果が HIV に生じた点変異で著しく減弱すること報告された¹³⁾。そこで、著者らは HCV の遺伝子型にかかわらず 92~98% 配列が保存されている 5'UTR IRES に siRNA のターゲットを絞ってデザインした。

培養細胞による HCV 増殖モデル

HCV は通常の培養細胞には感染せず、感染培養細胞がないことが、HCV 研究の大きな妨げとなっていたが、1999 年に Bartenschlagar らによりヒト肝細胞癌株 Huh-7 細胞を用いて HCV の自己増殖を可能にした HCV レプリコンが報告された¹⁴⁾。HCV ゲノムの構造蛋白をコードする部分をネオマイシン耐性遺伝子に置換した構造で、ヒト肝細胞癌株 Huh-7 細胞に導入して、HCV の複製機構を介して獲得したネオマイシン耐性によって安定増殖クローンが選択され、さらにレポーター遺伝子としてネオマイシン耐性遺伝子にルシフェラーゼ遺伝子を融合させて、HCV 遺伝子複製効率をルシフェラーゼ活性によって簡便に評価できるようになった(図 2-A)。これによって抗 HCV 薬の培養細胞での評価が可能となった。

HCV に対する siRNA の効果

図 2-B に著者らの 5'UTR IRES に対してデザインした siRNA の効果を示す。HCV レプリコン (Rep-Feo) システムにおいて siRNA331 がもっとも有効に発現を抑制した。コントロールに比較して 125 nM の siRNA 濃度では 97% のルシフェラーゼ活性の抑制が達せられ、2.5 nM の非常に低濃度の siRNA でも約 80% の抑制がみられた。この結果は HCV レプリコン RNA の Northern blot や非構造蛋白の Western blot でも確かめられた(図 3)。この HCV 5'UTR を標的としたこの siRNA の効果は従来の機能性核酸試薬であるアンチセンスオリゴ DNA¹⁵⁾、リボザイム¹⁶⁾と効果の比較しても

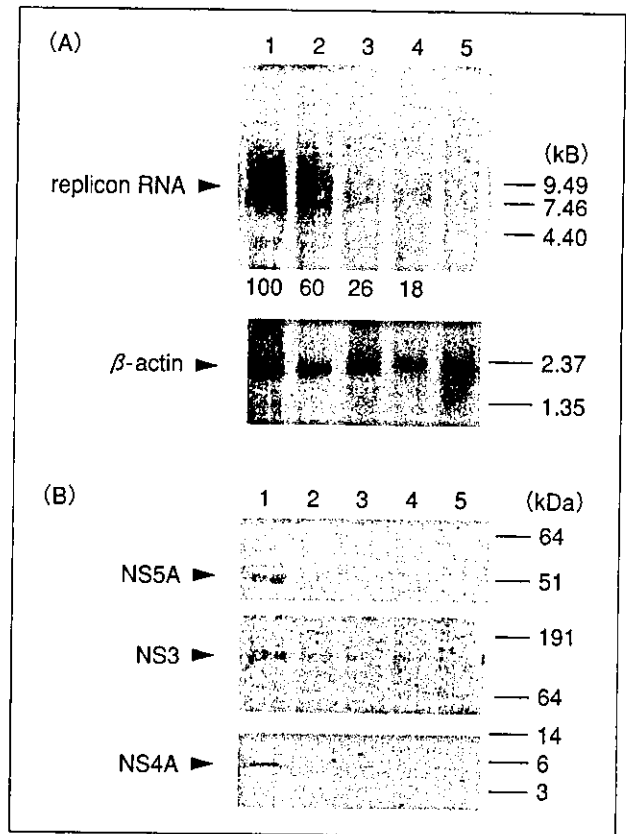


図 3 siRNA331 の HCV レプリコン RNA, 非構造蛋白への発現抑制効果⁷⁾

A: レプリコン配列全長に対するプローブを用いた Northern blot.

B: NS5B に対するプローブや抗体を用いた Western blot.

lane 1: mock, lane 2: siRNA331 2.5 nM, lane 3: siRNA331 25 nM, lane 4: siRNA331 125 nM, lane 5: no transfection.

圧倒的に低濃度でより高い抑制活性であった。5'IRES ベクターより HCV レプリコンでの抑制率が高かったのはこの siRNA が複製の template を減らすということだけでなく、5'IRES を切断することが RNA の転写活性そのものを低下させ、さらに複製に必要な RNA ポリメラーゼなど非構造蛋白の翻訳を抑えることにより相乗的に HCV RNA の増殖を抑制したものと考えている。

HCV に対する siRNA 発現ベクターの効果

siRNA をウイルスペクターで細胞内に発現するためには siRNA 発現 DNA ベクターの作製が必要である。著者らは、PolIII系のプロモーターであるヒト U6 プロモーターの下流にタンデムタイプ¹⁷⁾とステムループタイプ¹⁸⁾の 2 つ siRNA 発現ベクター配列を挿入して(図 4)その効果を検索した。

siRNA の *in vivo* へのデリバリー

McCaffrey¹⁹⁾らは、マウスの尾静脈から 40 μ g の NS5B に対する合成 siRNA や siRNA 発現ベクターを体重の 5~10% の大量の PBS 溶液で 5~7 秒の短時間で注入するヒドロダイナミックス導入法で、*in vivo* の肝細胞に siRNA の導入に成功した。さらに、最近このヒドロダイナミックス導入法で導入された Fas に対する合成 siRNA (2'-ACE で化学的に修飾した siRNA でその安定性の上昇をはかっている)で、マウスに誘発された劇症肝炎による死亡率を低下させたことが報告された²⁰⁾。このヒドロダイナミックス導入法はそのまま臨床応用することは難しいが、siRNA が *in vivo* の肝細胞で有効に作用することを示した重要な報告である。また、この報告で Fas の発現レベルが 20 日後には、正常に戻っている点は長期の siRNA による副作用が不明である現在ではかえって臨床応用によいかもしれない。

一方、もうすこし長期の抑制効果にはウイルスベクターが必要となる。siRNA 発現ベクターコンストラクトをアデノウイルス²¹⁾やレンチウイルス²²⁾、レトロウイルス²³⁾などのウイルスベクターに組み込んで作製した siRNA 発現ウイルスベクターを用いて、*in vivo* 細胞への siRNA 導入の報告がつつぎとされている。

ウイルス性疾患での siRNA の新しい標的遺伝子

また、ウイルス遺伝子そのものを標的とするのではなく、ウイルス増殖に必要な宿主側の内在性遺伝子を標的にする方法も考えられている。HIV 感染における TSG101²⁴⁾や NF- κ B p65²⁵⁾サブユニットなどを siRNA で発現を抑制し、HIV ウイルス増殖を抑制したとの報告もある。

さらに、CD4 や CCR5 などの HIV-1 感染におけるリンパ球側に内在するウイルス受容体を標的としてその発現を抑制する方法も成果があり注目されている。CD34⁺造血幹細胞に CCR5 に対する siRNA をレンチウイルスで安定発現させたところ、正常に分化して *in vitro* でマクロファージに *in vivo* で T リンパ球になり、その両者ともに HIV ウイルスに抵抗性になったとの報告がされ、今後

の臨床応用に期待が持たれている²⁶⁾。

おわりに

siRNA による臨床応用には siRNA のデリバリーとその効果の持続が大きな問題点であろう。肝は siRNA のデリバリーの面ではもっともよい臓器のひとつと考えられ、とくにウイルス性肝炎は siRNA のターゲットの疾患として今後の発展におおいに期待がもたれる。

謝辞：ここに示した HCV 研究は、東京医科歯科大学消化器内科・坂本直哉先生、榎本信幸先生、東京大学工学部化学生命工学・宮岸 真先生、多比良和誠先生との共同研究であり、深謝する。また、図表の一部は坂本直哉先生の協力を得た。

文献

- 1) Carmicheal, G. G. : *Nature*, **418** : 379-380, 2002.
- 2) Kitabwalla, M. N. : *New Engl. J. Med.*, **347** : 1364-1367, 2002.
- 3) Li, M.-J. et al. : *Mol. Ther.*, **8** : 196-206, 2003.
- 4) Yokota, T. et al. : *EMBO*, **4** : 602-608, 2003.
- 5) Randel, G. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100** : 235-340, 2003.
- 6) Kapadia, S. B. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100** : 2014-2018, 2003.
- 7) Wilson, J. A. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100** : 2783-2788, 2003.
- 8) Shlomai, A. et al. : *Hepatology*, **37** : 764-770, 2003.
- 9) Giladi, H. et al. : *Mol. Ther.*, **8** : 769-776, 2003.
- 10) Zhang, R. et al. : *Chin. Med. J.*, **116** : 1262-1264, 2003.
- 11) Martell, M. et al. : *J. Virol.*, **66** : 3225-3229, 1992.
- 12) Amarzguoui, M. et al. : *Nucleic Acids Res.*, **31** : 589-595, 2003.
- 13) Boden, D. et al. : *J. Virol.*, **77** : 11531-11535, 2003.
- 14) Lohmann, V. et al. : *Nature*, **418** : 38-39, 2002.
- 15) Wakita, T. et al. : *J. Biol. Chem.*, **269** : 14205-14210, 1994.
- 16) Sakamoto, N. et al. : *J. Clin. Invest.*, **98** : 2720-2728, 1996.
- 17) Miyagishi, M. et al. : *Nat. Biotechnol.*, **19** : 497-500, 2002.
- 18) Brummelkamp, T. R. et al. : *Science*, **296** : 550-553, 2002.
- 19) McCaffrey, A. P. et al. : *Nature*, **418** : 38-39, 2002.
- 20) Song, E. et al. : *Nat. Med.*, **9** : 347-351, 2003.
- 21) Xia, H. et al. : *Nat. Biotechnol.*, **20** : 1006-1010, 2002.
- 22) Qin, X. F. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100** : 183-188, 2003.
- 23) Barton, G. M. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99** : 14943-14945, 2002.
- 24) Garris, J. E., et al. : *Cell*, **107** : 55-65, 2001.
- 25) Surabhi, R. M., et al. : *J. Virol.*, **76** : 12963-12973, 2002.
- 26) Qin, X. F., et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100** : 183-188, 2003.

RNAiの医療への応用

横田隆徳

Short interfering RNA (siRNA) はすでに治験段階に入っているアンチセンス核酸より、有効性、配列特異性いずれもはるかに優れており、核酸医薬としてウイルス性疾患、癌、遺伝性疾患などの疾患遺伝子を標的とした基礎研究が進行している。off-target効果やデリバリー方法などまだまだ解決すべき問題点も多いが、siRNAの高い可能性から種々の方面において医療分野への応用が急速に進展していくことは間違いないものと思われる。

キーワード 肝炎ウイルス, HIV, siRNA, RNAi, ウイルスベクター

はじめに

RNAiはいかなる遺伝子に対してもデザインもできて、その標的遺伝子の発現抑制効果はアンチセンス核酸の $10^{3\sim7}$ 倍¹⁾、リボザイムの $10^{2\sim5}$ (自験) 倍高いといわれている。しかもその配列特異性も高く1塩基の違いの認識も可能で、医療分野における臨床応用については発見当初から大きく期待されていた。それは、RNAiライブラリーをはじめとする創薬におけるツールといった側面と、short interfering RNA (siRNA) を直接核酸医薬として疾患に適応するという2つの方面から行われている。ここでは、すでにウイルス性疾患、悪性腫瘍、遺伝性疾患などで急速に進んでいるsiRNAの核酸医薬開発についてその研究現状と問題点について概説したい。

siRNAの特異性

① 変異遺伝子特異的な siRNA

癌遺伝子や遺伝性疾患をsiRNAで治療しようとし

た場合、変異遺伝子のみを選択的に発現抑制して、野生型には作用しないことが望ましい。siRNAと基質RNAとの特異性については、一般に4塩基以上ミスマッチがあった場合でsiRNAの切断活性はおおむね消失する²⁾が、1~2塩基のミスマッチによる切断効率の低下は完全ではなく、ミスマッチの位置によってその効果は異なる。当初は5'末端から9, 10, 11塩基目の中央部位の変異が失活化に最も有効とされた³⁾。5'側は基質との結合よりRISCとのかわりから基質を切断するルーラー(物差し)効果があるといわれ⁴⁾、3'側よりのミスマッチほうがより失活効果が強いとの報告がされ⁵⁾、現在のところsiRNAの5'末端から9~16塩基目にミスマッチをデザインすると変異遺伝子の識別が最もよいと考えられている。

われわれも変異G93A SOD1RNAにおいて野生型のSOD1を切断しないsiRNAを作製する際、ミスマッチの位置を検討した結果、同様の傾向を経験したが(図1)、標的遺伝子によっては9~16塩基目以外のミスマッチがよい場合もあるようである。

Clinical application of RNAi

Takanori Yokota: Department of Neurology and Neurological Science, Tokyo Medical and Dental University [東京医科歯科大学脳神経機能病態(神経内科)]

A

5th 5- GAUGCUGUGGCCGAUGGU G TT -3
 7th 5- AAGAUGCUGUGGCCGAUGU TT -3
 9th 5- CAAAGAUGCUGUGGCCGAU TT -3
 10th 5- ACAAGAUGCUGUGGCCGA TT -3
 13th 5- CTGACAAAGAUGCUGUGGC TT -3
 16th 5- TGACTGACAAAGAUGCUGU TT -3

G93ASOD1に対するsiRNA

B

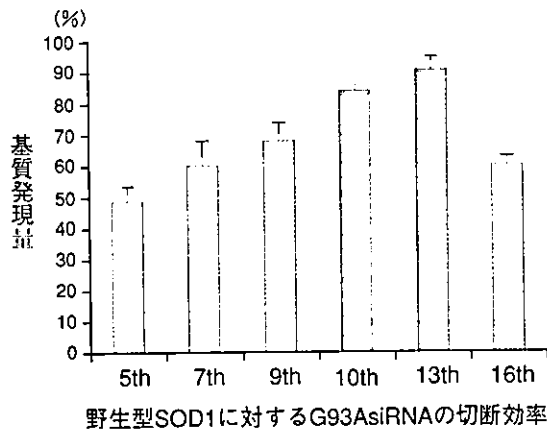


図1 siRNAへの標的遺伝子とのミスマッチ変異挿入位置によるsiRNA効果への影響
 家族性筋萎縮性側索硬化症の遺伝子変異であるG93ASOD1(点変異G→C, 赤で示した)を標的としたG93AsiRNAのデザイン(A). G93AsiRNAの5'側から10~13番目の塩基に変異部位を置いた場合が最も野生型SOD1の切断効率が低下する(基質発現量に変化が少ない)(B)

② off-target効果などの副反応

siRNAを臨床応用する際にも、ライブラリーを用いた遺伝子探索をする際にも、off-target効果、すなわち、ターゲットとした遺伝子以外に、用いた19塩基のsiRNAに部分的にホモロジーのある別の遺伝子の発現を抑えてしまう、いわゆる交叉反応が報告されている^{6)~8)}。全般にその特異性はアンチセンスなどに比較してかなり少ないが^{7) 8)}、それでも多くの遺伝子の発現が影響を受ける可能性がある。Jacksonらの検討で⁶⁾、通常19塩基中15塩基以上で、最低では11塩基のホモロジーのある遺伝子において影響があったと報告された。その場合は前述のようにホモロジーのあ

るsiRNAの部位はセンス配列の中央部や3'側にある場合が多い。さらに稀ではあるが、アンチセンス配列でもその影響が出る場合もありうるという。今後このoff-target効果の予測とその回避は重要な問題である。

また、通常の19塩基長のshort-hairpin型のsiRNA発現ベクターの発現によって、動物細胞でPKRの活性化などのインターフェロン反応が実は起こっていて、非特異的なタンパク質合成と停止とRNA変性が起こり得るという報告がされ、その程度によっては今後問題になるかもしれない^{9) 10)} (宮岸らの稿、参照)。

③ 疾患別各論

① ウイルス性疾患

RNAiの本来の生理学的役割の1つとして、細胞に感染したウイルスのタンパク質合成を阻害する作用が考えられ、siRNAの発見以来、ウイルスゲノム遺伝子やウイルスmRNAを標的とした研究が急速に進んでいる。現在まで、エイズウイルス(HIV)¹¹⁾、C型^{12) 13)}・B型¹⁴⁾肝炎ウイルス、ポリオウイルス¹⁵⁾、SARSウイルス¹⁶⁾、インフルエンザウイルス^{17) 18)}、ウエストナイルウイルス¹⁸⁾で培養細胞レベルではあるが各ウイルスのレプリコンを用いるなど有効なsiRNAが報告されている。ここでは、われわれが作製したC型肝炎ウイルス(HCV)に対するsiRNAについて¹³⁾紹介する。

HCV遺伝子は9,600塩基からなるプラス一本鎖RNAで、5'と3'非翻訳領域(UTR)に挟まれた翻訳領域(ORF)からなる。5'側の341塩基のUTRは複雑なRNA構造のIRES(internal ribosome entry site)(一部コアタンパク質コード領域に及ぶ)を含み、HCV RNAはキャップ非依存的にこの5' IRESにより翻訳される(図2 A)。

HCVは一本鎖RNAウイルスであるがゆえ、ブルーフリーディング機能がなく、ウイルス複製時に特に翻訳領域においてRNAポリメラーゼの読み違いによる変異を起こしやすい(一般にRNAポリメラーゼのエラーの頻度は $\sim 10^{-4}$ base/site/replicationと予想されている)。同一個体内においても遺伝子配列の異なったウイルス集団が存在してquasispeciesとよばれている。

後述のようにquasispeciesはウイルス疾患のsiRNA

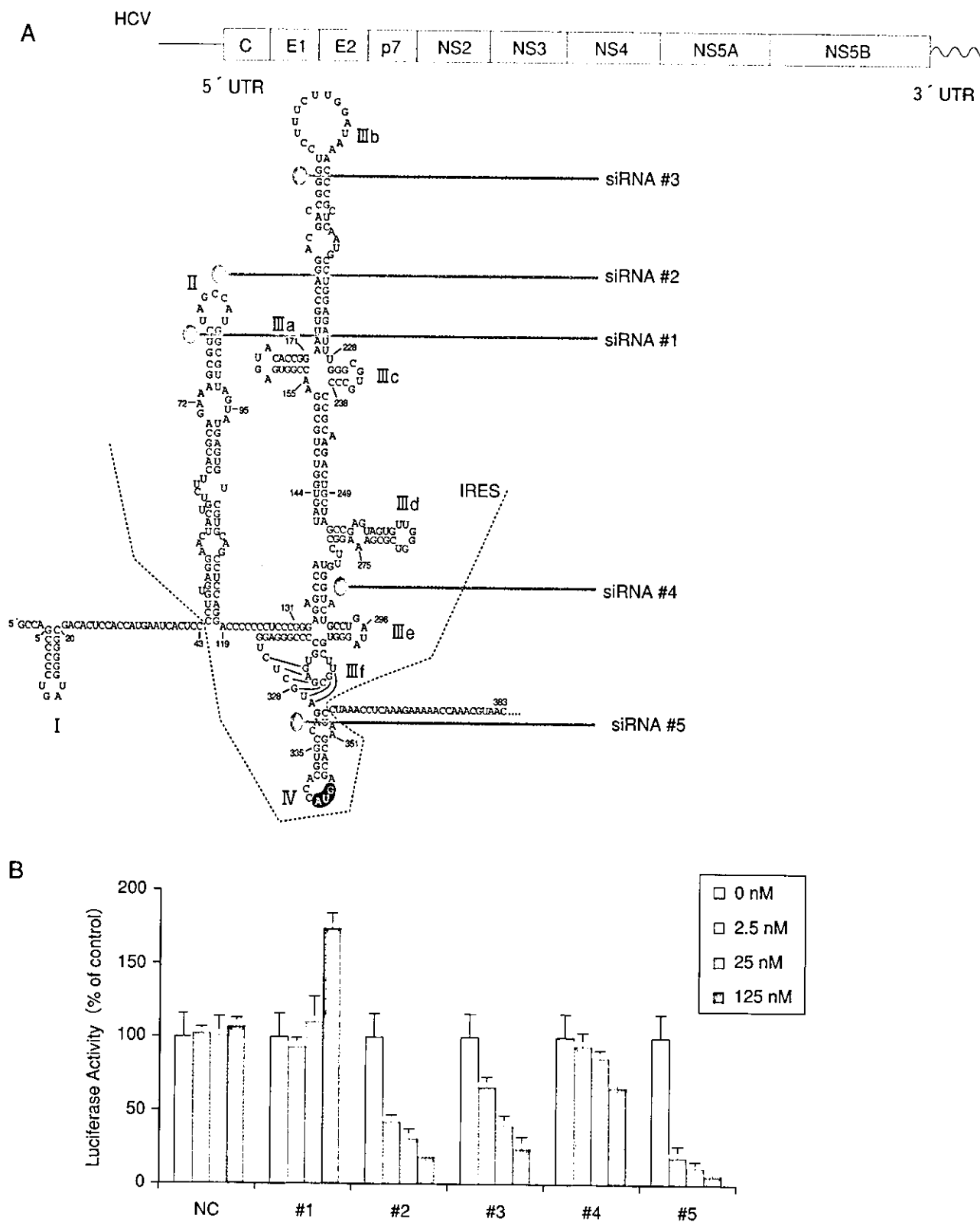


図2 HCVの遺伝子構造と siRNAのHCV遺伝子増殖抑制効果

A) HCVの遺伝子構造(上)とHCV 5' UTR領域(IRES)のRNAの二次構造と siRNAのターゲット部位(下). B) siRNAのHCVレプリコン(B)へのHCV遺伝子増殖抑制効果. siRNA#5がコントロールに比較して125 nMの siRNA濃度では97%のルシフェラーゼ活性の抑制が達せられ、2.5 nMの非常に低濃度 siRNAでも約80%の抑制がみられた(文献13より改変, 引用)

治療の大きな問題で、HCV 遺伝子に変異が生じた場合、siRNA の切断効率が下がる可能性があるため、われわれはHCV の遺伝子型にかかわらず92~98%配列が保存されている5' UTR IRESにsiRNA のターゲットを絞ってデザインした。

図2Bにわれわれの5' UTR IRESに対してデザインしたsiRNA の効果を示す。ヒト肝細胞癌株Huh-7細胞に導入したHCV 遺伝子が自己複製するHCV レプリコンシステムにおいて、siRNA #5が著明にHCV 遺伝子増殖を抑制した。これはsiRNA が複製のテンプレートを減らすということだけでなく、5' IRESを切断することがRNA の転写活性そのものを低下させ、さらに複製に必要なRNA ポリメラーゼなど非構造タンパク質の翻訳を抑えることにより、相乗的にHCV RNA の増殖を抑制したものと考えている。

慢性のウイルス感染においては、siRNA による治療をする際、ウイルス遺伝子の変異、quasispeciesが高頻度に生じ、siRNA の効果からすり抜け現象が予想される。ポリオウイルスを標的とした際にsiRNA の効果からすり抜けたウイルスが増殖したという¹⁵⁾。このウイルス遺伝子の変異に対して、前述のように変異のない保存されたウイルス遺伝子領域を使うことや、複数のsiRNA を使用する解決方法が考えられる¹⁹⁾。

また、ウイルス遺伝子そのものを標的とするのではなく、ウイルス増殖に必要な宿主側の内在性遺伝子を標的にする方法も考えられている。HIV 感染におけるTSG101²⁰⁾ やNF κ B p65²¹⁾ サブユニットなどをsiRNA で発現を抑制し、HIV ウイルス増殖を抑制したとの報告もある。

さらに、CD4やCCR5などのHIV-1感染におけるリンパ球側に内在するウイルス受容体を標的としてその発現を抑制する方法も成果があり注目されている²²⁾。CD34+造血幹細胞にCCR5に対するsiRNA をレンチウイルスベクターを用いて安定発現させたところ、正常に分化して*in vitro*でマクロファージに、*in vivo*でTリンパ球になり、その両者ともにHIV ウイルス感染に抵抗性になったとの報告がされ、今後の臨床応用に期待がもたれている²³⁾。

一方、細菌感染については細菌が細胞外で増殖するため、細菌遺伝子自身はsiRNA の標的にはなりにく

いが、IL-1やTNF α などの炎症性サイトカインの発現を抑制することにより敗血症などの重症感染症の初期治療や抗生物質治療の補助としての可能性が報告されている²⁴⁾。

② 癌

癌の発症および増殖の分子機構は癌遺伝子や癌抑制遺伝子を中心としてかなり解明され、それらの遺伝子や遺伝子産物を標的としてその発現や機能を制御する分子標的療法が精力的に研究されている。さらに、従来の抗癌剤に対する薬剤耐性の獲得の機序とその克服も重要な問題である。従来、主に癌遺伝子を中心にデコイ、リボザイムを含むアンチセンス医薬が次々と開発され、20種類以上のアンチセンス医薬がすでに臨床試験の段階に入っている。アンチセンスより発現抑制効率も特異性も高いsiRNA は急速に研究が進んでいる。

多くの癌では癌遺伝子と癌抑制遺伝子の両方に変異が起こることにより癌化が生じると考えられている。したがって活性化した癌遺伝子はsiRNA による癌治療の最もわかりやすい標的分子である。RASはGタンパク質で細胞膜に内在して増殖、分化などのシグナル伝達にかかわり、変異RASタンパク質は正常細胞を癌化することが知られている。ヒトの多くの癌で、*ras* 遺伝子は高頻度に変異しており、特に膵臓癌では85%の患者で*k-ras*に変異を認める。その病的変異は多くは1塩基の違いによるG12Vの点変異で、従来のアンチセンス法では野生型と区別して発現抑制ができなかったが、siRNA を用いることにより点変異特異的に発現を抑制し、*in vivo*で腫瘍の増殖を抑制できる²⁵⁾。同様の報告が大腸癌(*k-ras*)²⁶⁾、癌抑制遺伝子*p53*²⁷⁾でも報告されている。

しかし、多くの癌遺伝子は多数の異なる変異が繰り返し変異して癌化することから、この戦略ではそれぞれの変異に対してsiRNA が必要なことになる。そこで変異によって進展する癌化のシグナル伝達の下流の遺伝子をターゲットにする方がよいのかもしれない。この点で慢性骨髄性白血病の原因遺伝子変異である*bcr-abl*融合遺伝子はよいターゲットとなる。この場合染色体相互転座によって異常キメラ遺伝子が生じ、そのタンパク質(*p210^{BCR-ABL}*)のチロシンキナーゼ活性によって癌化が引き起こされる²⁸⁾。

さらに、癌の転移性に関与する遺伝子として同定された前立腺癌の *ezh2*²⁹⁾ やメラノーマの *ATF2*³⁰⁾ は siRNA による癌治療の非常に重要な標的遺伝子となる。また、子宮頸癌の発症に強く関与するパピローマウイルス (HPV) を標的にした siRNA³¹⁾ が報告されるなど、癌治療における siRNA の標的は急速に進展している。

④ 遺伝性疾患

遺伝性疾患でゲノム遺伝子変異が原因で発症する場合、多くの場合、遺伝子変異に起因する発症機序には変異のある遺伝子の遺伝子産物であるタンパク質の本来のもつ機能の消失または低下する場合 (loss of function) と変異遺伝子や変異タンパク質が新たに病的機能を獲得する場合 (gain of function) の2つがあることが知られている。常染色体劣性遺伝形式の疾患の多くは loss of function をその機序とする一方、常染色体優性遺伝の場合は野生型のアレルからは原則として正常個体の半分の量の正常のタンパク質は発現しているため、本来のタンパク質の機能の影響は少ないか全くなく、変異アレルから発現した変異タンパク質が何らかの正常と異なった機能 (gain of adverse function) や毒性 (gain of toxic function) を新たに獲得することにより疾患が発症することが想定されている。常染色体優性遺伝の疾患の治療を考えた場合、siRNA により正常のアレルのタンパク質の発現に影響せずに、変異したタンパク質の発現を抑制できれば、その機序の如何にかかわらず発症、疾患の少なくとも進行を防止することが期待できるわけである。

前述のように、変異が1塩基の違いである点変異でも正常アレルと変異アレルの配列の差を認識して変異アレルのみを切断できる siRNA の作製は可能である。図3に家族性筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子である SOD1 の点変異 G93A を選択的に切断して正常配列にはほとんど影響しない siRNA の例を示す³²⁾。同様の報告は3塩基欠失を示す優性遺伝性捻転 dystonia の *DYT1* 遺伝子³³⁾ や tau 遺伝子に点変異を示す frontotemporal dementia³⁴⁾ で報告されている。ポリグルタミン病のように、繰り返し配列の長さが変わることが変異である場合は、この伸長した繰り返し配列そのものに対する siRNA のデザインをすることは難しい

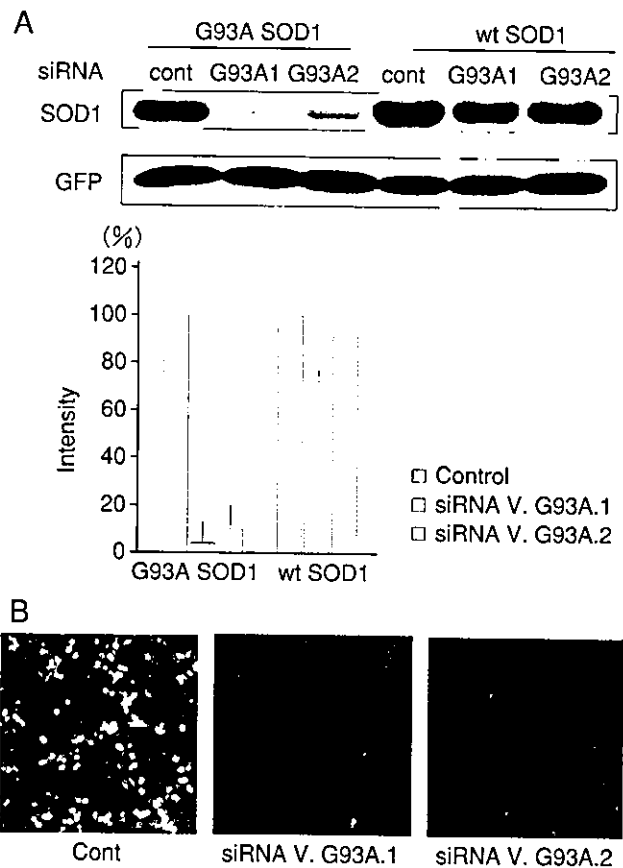


図3 変異 SOD1 に特異的に作用する siRNA

A) 293T 細胞に G93A または野生型 SOD1 発現ベクターと siRNAG93A1, 2 を共発現させ、野生型および変異 SOD1 の発現をウエスタンブロットした。siRNAG93A1, 2 はともに G93ASOD1 の発現を著明に抑制して、野生型 SOD1 の発現はほとんど抑制しなかった。B) GFP をタグに SOD1 の発現を蛍光顕微鏡にて撮影 (文献 32 より改変、引用)

が、繰り返し配列の長さに関連した polymorphism³⁴⁾ を標的としたり、繰り返し配列の長さの変化に伴う RNA の二次構造の変化などを利用した配列非依存的な識別方法も検討されはじめた (図4)。

⑤ siRNA の *in vivo* へのデリバリー

McCaffrey³⁵⁾ らは、マウスの尾静脈から 40 μ g の NS5B に対する合成 siRNA や siRNA 発現ベクターを、体重の 5 ~ 10% の大量の PBS 溶液で 5 ~ 7 秒の短時間で注入するハイドロダイナミックス導入法で、*in vivo* の肝細胞に siRNA の導入に成功した。さらに最

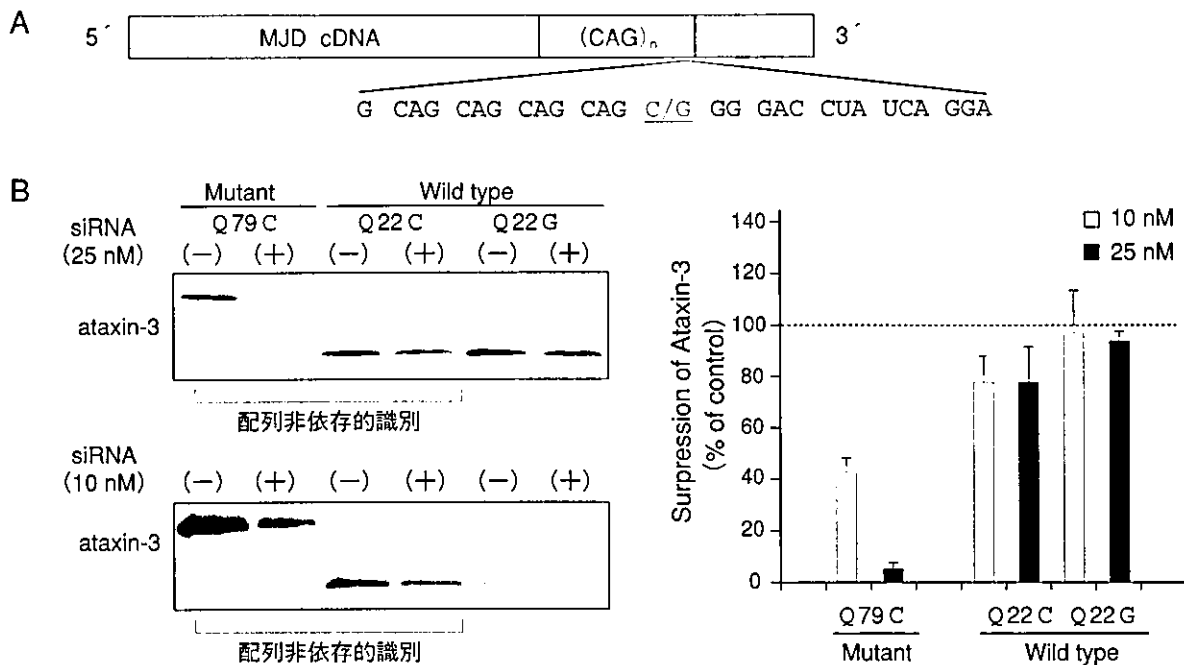


図4 配列非依存的な siRNA の切断活性の変化

Machado-Joseph (MJD) 病遺伝子は MJD 遺伝子内の CAG repeat の伸長によって発症する。CAG repeat の後には G/C polymorphism があり、伸長した CAG repeat をもつ変異アリルはすべて G で、正常アリルでは G/C が同頻度で見られる。われわれのデザインした MJD siRNA はこの 1 塩基の差を認識して変異アリル (Q79C) を切断し、正常アリル (Q22G) は切断しなかった。加えて、驚いたことにこの MJD siRNA は Q79C と標的配列の全く同じのもう一つの正常アリル (Q22C) もわずかにしか切断しなかった。この原因として MJD mRNA の二次構造の変化や RNA 結合タンパク質の存在がその活性に影響したことが考えられた

近このハイドロダイナミックス導入法で導入された Fas³⁶⁾ や caspase 8³⁷⁾ に対する合成 siRNA (2'-ACE で化学的に修飾した siRNA でその安定性の上昇を図っている) で、マウスに誘発された劇症肝炎による死亡率を低下させたことが報告された。このハイドロダイナミックス導入法をそのまま臨床応用することは難しいが、siRNA が *in vivo* の肝細胞で有効に作用することを示した重要な報告である。また、Fas の発現レベルが 20 日後には正常に戻っている点は、長期の siRNA による副作用が不明である現在ではかえって臨床応用によいかもかもしれない。

長期の抑制効果にはウイルスベクターが必要となる。siRNA 発現ベクターコンストラクトをアデノウイルス³⁷⁾ やレンチウイルス³⁸⁾、レトロウイルス³⁹⁾、アデノ随伴ウイルス⁴⁰⁾ などのウイルスベクターに組込んで作製した siRNA 発現ウイルスベクターを用いて、*in vivo* 細胞への siRNA 導入の報告が次々とされている。

おわりに

siRNA の核酸医薬としての臨床応用の研究には、off-target effect など安全性の問題や効果の持続、デリバリー方法など解決すべき課題はまだ多くある。しかし、siRNA の効果は従来のアンチセンスやリボザイム、DNA エンザイムよりはるかに優り、その応用はさまざまな側面で適応が可能であることから、研究は爆発的に進んでいる。したがって、非常に近い将来に、難治性疾患での新しい治療法の開発に siRNA の利用が突破口になることに大いに期待したい。

文献

- 1) Bertrand, J. R., Pottier, M., Vekris, A., Opolon, P., Maksimenko, A. & Malvy, C.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 296: 1000-1004, 2002
- 2) Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. & Tuschl, T.: *EMBO J.*, 20: 6877-6888, 2001
- 3) Brummelkamp, T. R., Bernards, R. & Agami, R.: *Science*,

- 29 : 550-553, 2002
- 4) Holen, T., Amarzguioui, M., Wüger, M. T., Babaie, E. & Prydz, H. : *Nucleic Acids Res.*, 30 : 1757-1766, 2002
 - 5) Amarzguioui, M., Holen, T., Babaie, E. & Prydz, H. : *Nucleic Acids Res.*, 31 : 589-595, 2003
 - 6) Jackson, A. L., Bartz, S. R., Schelter, J., Kobayashi, S. V., Burchard, J., Mao, M., Li, B., Cavet, G. & Linsley, P. S. : *Nature Biotechnol.*, 21 : 635-637, 2003
 - 7) Semizarov, D., Frost, L., Sarthy, A., Kroeger, P., Halbert, D. N. & Fesik, S. W. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100 : 6347-6352, 2003
 - 8) Chi, J. T., Chang, H. Y., Wang, N. N., Chang, D. S., Dunphy, N. & Brown, P. O. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100 : 6343-6346, 2003
 - 9) Bridge, A. J., Pebernard, S., Ducraux, A., Nicoulaz, A. L. & Iggo, R. : *Nature Genet.*, 34 : 263-264, 2003
 - 10) Sledz, C. A., Holko, M., de Veer, M. J., Silverman, R. H. & Williams, B. R. G. : *Nature Cell Biol.*, 5 : 834-839, 2003
 - 11) Nelson, R. : *Lancet*, 361 : 2214, 2003
 - 12) Zamore, P. A. & Aronin, N. : *Nature Med.*, 9 : 266-267, 2003
 - 13) Yokota, T., Sakamoto, N., Enomoto, N., Tanabe, Y., Miyagishi, M., Maekawa, S., Li, Y., Kurosaki, M., Taira, K., Watanabe, M. & Mizusawa, H. : *EMBO Rep.*, 4 : 602-608, 2003
 - 14) Giladi, H., Ketzinel-Gilad, M., Rivkin, L., Felig, Y. & Nussbaum, O. : *Mol. Ther.*, 8 : 769-776, 2003
 - 15) Gitlin, L., Karelsky, S. & Andino, R. : *Nature*, 418 : 430-434, 2002
 - 16) Zhang, R., Guo, Z., Lu, J., Meng, J., Zhou, C., Zhan, X., Huang, B., Yu, X., Huang, M., Pan, X., Ling, W., Chen, X., Wan, Z., Zheng, H., Yan, X., Wang, Y., Ran, Y., Liu, X., Wang, C. & Zhang, B. : *Chin. Med. J.*, 116 : 1262-1264, 2003
 - 17) Ge, Q., McManus, M. T., Nguyen, T., Shen, C. H., Sharp, P. A., Eisen, H. N. & Chen, J. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100 : 2718-2723, 2003
 - 18) McCown, M., Diamond, M. S. & Pekosz, A. : *Virology*, 313 : 514-524, 2003
 - 19) Song, E., Lee, S. K., Dykxhoorn, D. M., Novina, C., Zhang, D., Crawford, K., Cerny, J., Sharp, P. A., Lieberman, J., Manjunath, N. & Shankar, P. : *J. Virol.*, 77 : 7174-7181, 2003
 - 20) Garrus, J. E., von Schwedler, U. K., Pornillos, O. W., Morham, S. G., Zavitz, K. H., Wang, H. E., Wettstein, D. A., Stray, K. M., Cote, M., Rich, R. L., Myszka, D. G. & Sundquist, W. I. : *Cell*, 107 : 55-65, 2001
 - 21) Surabhi, R. M. & Gaynor, R. B. : *J. Virol.*, 76 : 12963-12973, 2002
 - 22) Arteaga, H. J., Hinkula, J., van Dijk-Hard, L., Dilber, M. S., Wahren, B., Christensson, B., Mohamed, A. J. & Smith, C. I. : *Nature Biotechnol.*, 21 : 230-231, 2003
 - 23) Qin, X. F., An, D. S., Chen, I. S. & Baltimore, D. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100 : 183-188, 2003
 - 24) Sorensen, D. R., Leirdal, M. & Sioud, M. : *J. Mol. Biol.*, 327 : 761-766, 2003
 - 25) Brummelkamp, T., Bernards, R. & Agami, R. : *Cancer Cell*, 2 : 243-247, 2002
 - 26) Kawasaki, H. & Taira, K. : *Nucleic Acids Res.*, 31 : 700-707, 2003
 - 27) Martinez, L. A., Naguibneva, I., Lehrmann, H., Vervisch, A., Tchénio, T., Lozano, G. & Harel-Bellan, A. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99 : 14849-14854, 2002
 - 28) Wilda, W., Fuchs, U., Wossmann, W. & Borkhardt, A. : *Oncogene*, 21 : 5716-5724, 2002
 - 29) Varambally, S., Dhanasekaran, S. M., Zhou, M., Barrette, T. R., Kumar-Sinha, C., Sanda, M. G., Ghosh, D., Pienta, K. J., Sewalt, R. G., Otte, A. P., Rubin, M. A. & Chinnaiyan, A. M. : *Nature*, 419 : 624-629, 2002
 - 30) Bhoumik, A., Huang, T.-G., Ivanov, V., Gangi, L., Qiao, R. F., Woo, S. L. C., Chen, S.-H. & Ronai, Z. : *J. Clin. Invest.*, 110 : 643-650, 2002
 - 31) Jiang, M. & Milner, J. : *Oncogene*, 21 : 6041-6048, 2002
 - 32) Yokota, T., Miyagishi, M., Hino, T., Matsumura, R., Andria, T., Urushidani, M., Rao, R. V., Takahashi, R., Bredesen, D. E., Taira, K. & Mizusawa, H. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 314 : 283-291, 2004
 - 33) Gonzalez-Alegre, P., Miller, V. M., Davidson, B. L. & Paulson, H. L. : *Ann. Neurol.*, 53 : 781-787, 2003
 - 34) Miller, V. M., Xia, H., Marrs, G. L., Gouvion, C. M., Lee, G., Davidson, B. L. & Paulson, H. L. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100 : 7195-7200, 2003
 - 35) McCaffrey, A. P., Meuse, L., Pham, T. T., Conklin, D. S., Hannon, G. J. & Kay, M. A. : *Nature*, 418 : 38-39, 2002
 - 36) Song, E., Lee, S.-K., Wang, J., Ince, N., Ouyang, N., Min, J., Chen, J., Shankar, P. & Lieberman, J. : *Nature Med.*, 9 : 347-351, 2003
 - 37) Zender, L., Hutker, S., Liedtke, C., Tillmann, H. L., Zender, S., Mundt, B., Waltemathe, M., Gosling, T., Flemming, P., Malek, N. P., Trautwein, C., Manns, M. P., Kuhnel, F. & Kubicka, S. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100 : 7797-7802, 2003
 - 37) Xia, H., Mao, Q., Paulson, H. L. & Davidson, B. L. : *Nature Biotechnol.*, 20 : 1006-1010, 2002
 - 38) Qin, X. F., An, D. S., Chen, I. S. & Baltimore, D. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100 : 183-188, 2003
 - 39) Barton, G. M. & Medzhitov, R. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99 : 14943-14945, 2002
 - 40) Hommel, J. D., Sears, R. M., Georgescu, D., Simmons, D. L. & DiLeone, R. J. : *Nature Med.*, 9 : 1539-1544, 2003

Profile

横田隆徳：1991年東京医科歯科大学医学部大学院卒業。'98～2000年米国バック加齢、神経変性疾患研究所に留学。帰国後東京医科歯科大学医学部神経内科講師。現在、臨床業務の傍ら、siRNAの臨床応用をはじめとする神経変性疾患を中心とした分子レベルでの治療法の開発に腐心している。

E-mail : tak-yokota.nuro@tmd.ac.jp

トピックス

神経変性疾患への RNAi の臨床応用の展望

横田 隆徳*

はじめに

RNAi はいかなる遺伝子に対してもデザインできて、その高い特異性と発現抑制効果から、Alzheimer 病をはじめとする難病の多い神経変性疾患にその臨床応用が期待されている。それは、RNAi ライブラリーをはじめとする創薬におけるツールといった側面と、small interfering RNA (siRNA) を直接治療に適応するという2つの方面から行われている。ここでは、主に遺伝性神経変性疾患において変異遺伝子からの変異タンパク質の発現を抑制する遺伝子治療としての臨床応用を中心に、核酸医薬としての siRNA の研究現状と問題点について概説したい。

RNAi の分子機構

1998年 Fire らによって、線虫において2本鎖 RNA によって配列特異的に遺伝子の発現抑制される現象が RNA 干渉として報告された。この現象は植物から線虫、哺乳動物に至るまで広く保存して観察され、元来真核細胞に備わった抗ウイルス機構として知られていた。長鎖2本鎖 RNA は、細胞内で Dicer と呼ばれる RNase III 活性を有した RNA 切断酵素によって20~25塩基の small interfering RNA (siRNA) へと切断される。この2本鎖 RNA は3'末端が2塩基突出しているのが特徴である。siRNA は RNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれるタンパク質複合体に取り込まれ、ATP 依存的に1本鎖 RNA にときほぐされる。

そしてこの1本鎖 RNA がガイド分子となって RISC を配列特異的に標的 RNA へと導き、標的 RNA の siRNA と対合する領域の中央部分で切断して、最終的に標的 RNA は分解される。しかし、哺乳動物における2本鎖 RNA の導入は、protein kinase R (PKR, interferon-induced double strand RNA-activated protein kinase) や 2', 5' oligosynthetase の活性化による非特異的な翻訳抑制や RNA の分解が生じ、ホストの細胞も死んでしまうため、分子生物学的手法としても遺伝子治療の方法としても RNAi の利用の大きな妨げになっていた。しかし2000年 Tuschl らにより、RNAi 機構の中間産物である合成 siRNA を導入することによってこれらの副反応が回避され、siRNA の配列に特異的な遺伝子発現抑制が可能となった。さらに、pol III系のプロモーターを用いることにより、細胞内で siRNA を発現する DNA ベクターの開発もされ、その応用範囲はさらに広まった。

RNAi を用いた遺伝性神経変性疾患の遺伝子治療の基本的考え方

遺伝性疾患でゲノム遺伝子変異が原因で発症する場合、遺伝子変異に起因する発症機序には、変異のある遺伝子の遺伝子産物であるタンパク質の本来持つ機能の消失または低下する場合 (loss of function) と、変異遺伝子や変異タンパク質が新たに病的機能を獲得する場合 (gain of function) の2つがあることが知られている。遺伝子変異が常染色体上にある場合、対立する2つのアレルの双方に遺伝子変異があつて初めて発症する常染色体劣性遺伝形式の疾患の多くは loss of function をその機序とし、一方のアレルのみで発症する常染色体優性遺伝形式の疾

* 東京医科歯科大学大学院 脳神経機能病態 (神経内科) 講師

患の多くの場合は gain of function と考えられている。常染色体劣性遺伝形式は、遺伝子産物であるタンパク質自体が全く発現しないか (null 変異)、発現しても発現タンパク質すべてが変異体であるためその機能が低下または消失していることが多い。一方常染色体劣性遺伝の場合は、野生型のアリルからは原則として正常個体の半分の量の正常のタンパク質は発現しているため、本来のタンパク質の機能の影響は少ないか全くなく、変異アリルから発現した変異タンパク質が何らかの正常と異なった機能 (gain of adverse function) や毒性 (gain of toxic function) を新たに獲得することにより疾患が発症することが想定されている。

神経変性疾患で gain of toxic function が強く想定されている疾患の1つとして、Cu/Zn スーパーオキシドジスムターゼ (SOD1) 遺伝子変異による筋萎縮性側索硬化症 (ALS) が知られている。常染色体優性遺伝形式をとる家族性 ALS の一部の原因遺伝子が SOD1 であることが判明した当初は、SOD1 が代表的なラジカルスカベンジャーの1つであることから、SOD1 酵素活性低下 (loss of function) が ALS 発症機序と疑われたが、現在では変異 SOD1 が何らかの毒性を獲得する (gain of toxic function) ことがその機序と考えられている。APP, PS1 遺伝子変異による Alzheimer 病、各種ポリグルタミン病、 α -synuclein 変異による Parkinson 病など、常染色体優性遺伝形式を示す主要な神経変性疾患の多くがこのような gain of toxic function と考えられている。それぞれの疾患においてその gain of toxic function の内容について必ずしも明らかになっていないが、このような疾患の治療を考えた場合、変異したタンパク質の発現を抑制する方法があれば、その機序の如何にかかわらず発症、進行を防止することが期待できるわけである。

さらにこれらの優性遺伝疾患の治療は、正常アリルの発現を損わずに変異アリルの発現のみを抑制することが望ましい。例えば脊髄小脳失

調症 6 型 (SCA6) の原因遺伝子であるカルシウム 1A チャンネルであるが、このチャンネルのホモのノックアウトマウスは胎生死亡となることが知られており、正常アリルの発現抑制は望ましくない影響を与える場合があるからである。

変異遺伝子特異的な siRNA

癌遺伝子や遺伝性疾患を siRNA で治療しようとした場合、変異遺伝子のみを選択的に発現抑制して、野生型には作用しないことが望ましい。siRNA と基質 RNA との特異性については、一般に 4 塩基以上ミスマッチがあった場合で siRNA の切断活性はおおむね消失する¹⁾が、1~2 塩基のミスマッチによる切断効率の低下は完全ではなく、ミスマッチの位置によってその効果は異なる。当初は 5' 端から 9, 10, 11 塩基目の中央部位のミスマッチが失活に最も有効とされた²⁾。5' 側は基質との結合より RISC とのかかわりから基質を切断するルーラー (物差し) 効果があると言われ³⁾、3' 側寄りのミスマッチのほうがより失活効果が強いとの報告がなされ⁴⁾、現在のところ siRNA の 5' 端から 9~16 塩基目にミスマッチをデザインすると変異遺伝子の識別が最も良いと考えられている。我々も変異 G93A SOD1 RNA において野生型の SOD1 を切断しない siRNA を作製する際、ミスマッチの位置を検討した結果、同様の傾向を経験した (図 1)。

Off-target 効果などの副反応

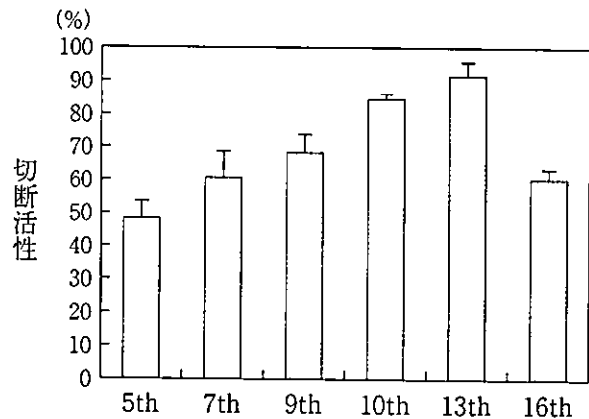
siRNA を臨床応用する際にも、ライブラリーを用いた遺伝子探索をする際にも、off-target 効果、すなわち、ターゲットとした遺伝子以外に、用いた 19 塩基の siRNA に部分的に相同性のある別の遺伝子の発現を抑えてしまういわゆる交差反応が報告されている⁵⁻⁷⁾。全般にその特異性はアンチセンスなどに比較してかなり少ないが^{6,7)}、それでも多くの遺伝子の発現が影響を受ける可能性がある。Jackson らの検討で⁸⁾、通常 19 塩基中 15 塩基以上で、最

図1 siRNA への標的遺伝子とのミスマッチ変異挿入位置による siRNA 効果への影響

A G93A SOD1 に対する siRNA

5th 5-GAUGCUGUGGCCGAUGGU G TT-3
 7th 5-AAGAUGCUGUGGCCGAUGU TT-3
 9th 5-CAAAGAUGCUGUGGCCGAU TT-3
 10th 5-ACAAAGAUGCUGUGGCCGA TT-3
 13th 5-CTGACAAAGAUGCUGUGGC TT-3
 16th 5-TGACTGACAAAGAUGCUGU TT-3

B 野生型 SOD1 に対する G93A siRNA の切断効率



家族性筋萎縮性側索硬化症の遺伝子変異である G93A SOD1 (点変異 G → C, 太字で示した) を標的とした G93A siRNA のデザイン (A). G93A siRNA の 5' 側から 10 から 13 番目の塩基に変異部位を置いた場合が最も野生型 SOD1 の切断効率が低下する (B).

略語: 巻末の「今月の略語」参照

低では 11 塩基の相同性のある遺伝子において影響があったと報告された。その場合は、上述のように相同性のある siRNA の部位はセンス配列の中央部や 3' 側にあることが多い。さらにまれではあるが、アンチセンス配列でもその影響が出る場合もありうるという。今後、この off-target 効果の予測とその回避は重要な問題である。

また、通常の 19 塩基長の short-hairpin 型の siRNA 発現ベクターの発現によって、動物細胞で PKR の活性化などの IFN 反応が実は起こっていて、非特異的なタンパク質合成の停止と RNA 変性が起こりうるという報告がなされ、siRNA 適応後の結果の解釈には留意する必要がある⁸⁹⁾。

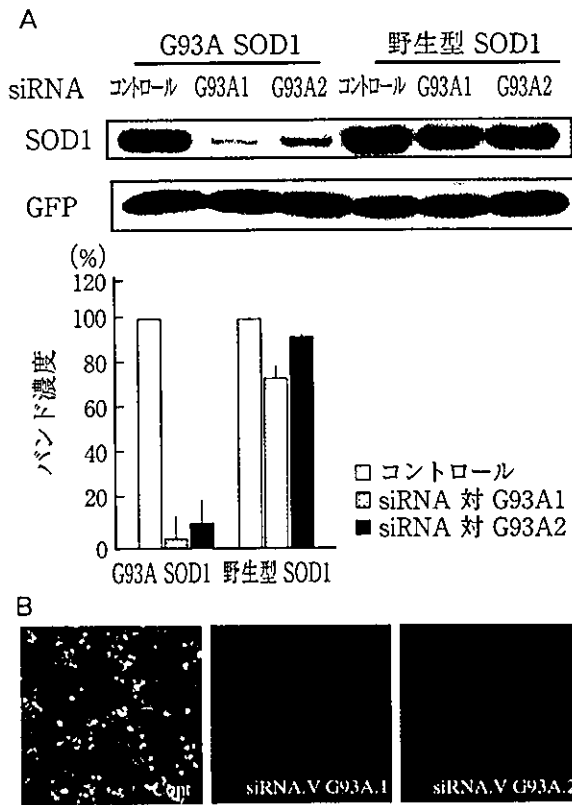
変異アリル特異的な siRNA

上述のように、変異が 1 塩基の違いである点変異でも、正常アリルと変異アリルの配列の差を認識して変異アリルのみを切断できる siRNA の作製は可能である。図 2 に、家族性 ALS の原因遺伝子である SOD1 の点変異 G93A を選択的に切断して、正常配列にはほとんど影響しない siRNA の例を示す¹⁰⁾。RNA のレベルで遺

伝子の発現を抑制させる方法としては、アンチセンス DNA/RNA が繁用されその効果が実証されている。しかしアンチセンスは、ターゲットの RNA に多少の塩基の違いがあってもハイブリダイズしてしまうため、変異アリルだけでなく正常アリルにもハイブリダイズしてしまって双方の発現を抑制してしまう。siRNA と同様に RNA レベルで標的 RNA を切断してその発現を抑制する機能核酸であるリボザイムや DNA エンザイムとの比較では、その特異性はリボザイムや DNA エンザイムが勝るが、発現抑制効率は核酸濃度で 10^{3-9} 倍低濃度でも有効で、発現抑制率も高い (図 3)

同様に、点変異を標的にした変異アリル特異的な siRNA が、3 塩基欠損を示す優性遺伝性捻転 dystonia DYT1¹¹⁾ や、tau 遺伝子の点変異を示す前頭側頭型痴呆¹²⁾ で報告されている。一方、ポリグルタミン病のように繰り返し配列の長さが変わることが変異である場合は、この伸長した繰り返し配列そのものに対する siRNA のデザインをすることは難しい。しかし、繰り返し配列の長さに関連した遺伝子多型¹³⁾ を標的としたり、繰り返し配列の長さの違いに伴う RNA の 2 次構造の変化などの配列非依存的な

図2 変異 SOD1 に特異的に作用する siRNA



A : 293T 細胞に G93A または野生型 SOD1 発現ベクターと siRNA G93A1, 2 を共発現させ、野生型および変異 SOD1 の発現をウエスタンブロットした。siRNA G93A1, 2 ともに G93A SOD1 の発現を著明に抑制し、野生型 SOD1 の発現はほとんど抑制しなかった。

B : GFP をタグに SOD1 の発現を蛍光顕微鏡にて撮影。(文献¹⁰⁾より引用)

略語：巻末の「今月の略語」参照

標的 RNA の変化を利用した識別方法も検討され始めた (図 4)。

孤発性神経変性疾患の RNAi を用いた遺伝子治療

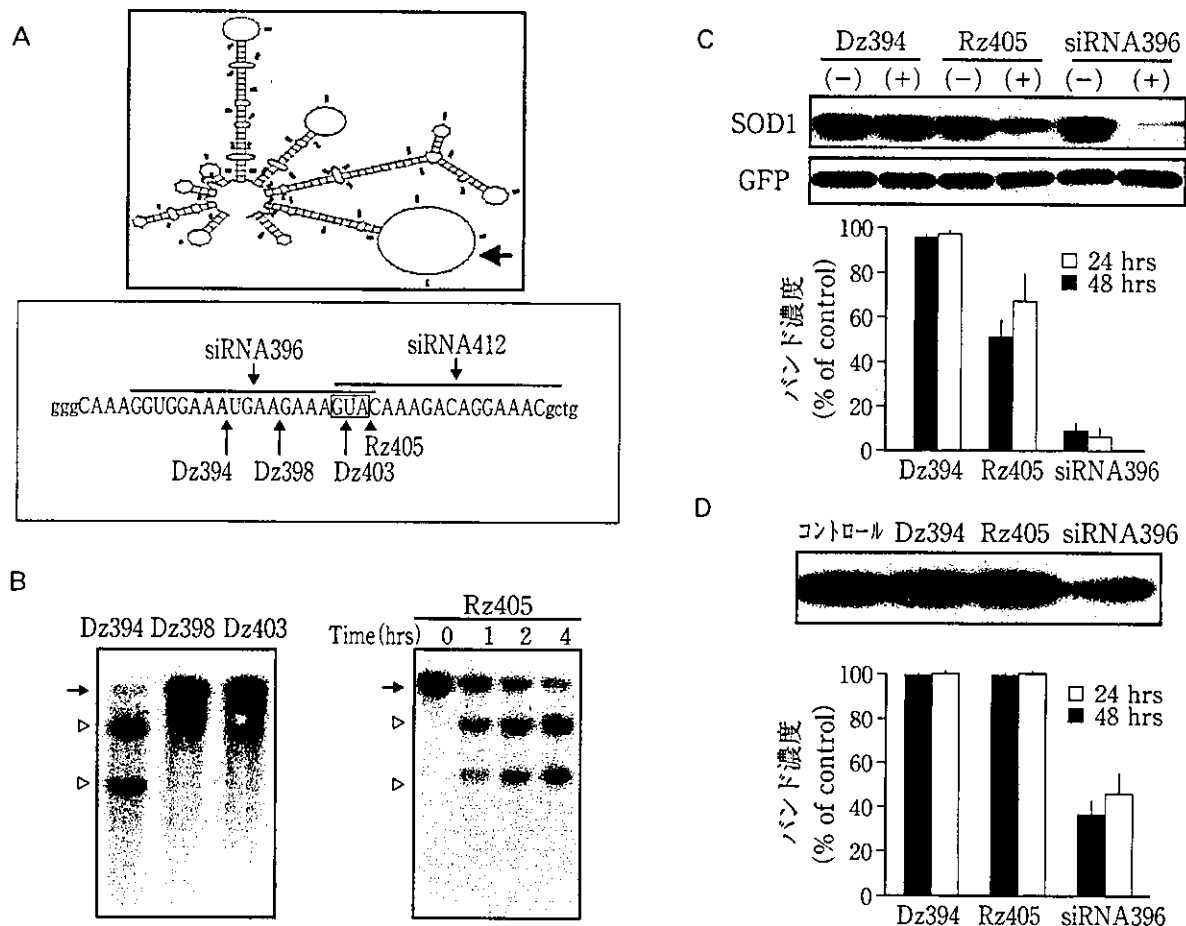
一方、ほとんどの Alzheimer 病, Parkinson 病, ALS は家族歴のない孤発性で、遺伝子異常は明らかでない。これらの疾患の RNAi を用いた遺伝子治療は、それぞれの疾患の発症機序のキーとなる分子が分かれば、その発現を抑制することで治療が可能かもしれない。例えば、Alzheimer 病の β セクレターゼは良い標的遺

伝子である。Alzheimer 病のモデル動物で、 $A\beta$ ペプチドに対するワクチン治療やその抗体の受動免疫により、老人斑の生成を抑制し症状を軽減し得たとの報告がなされている。米国で進められている最近のワクチン治療の臨床試験の結果も良さそうである。これは Alzheimer 病の発症機序として従来から言われてきた $A\beta$ 仮説を大きく支持するもので、 $A\beta$ の産生を抑制することが治療となる。 $A\beta$ はアミロイド前駆体タンパク質から病的に β と γ セクレターゼによって切り出されて生成される。PS1, Nicastrin, Pen2, Aph1 などからなる γ セクレターゼは Notch などの多数の他の重要な分子も基質としているため問題があるが、 β セクレターゼの本体と言われる BACE1 のノックアウトマウスは特別の異常を示さない。我々も BACE1 に対する siRNA を作製し、培養細胞系で $A\beta$ 産生を抑制することを示した (未発表データ)。今後、広範な神経細胞に siRNA を持続的に導入することが可能となれば、有望な方法になるかもしれない。

siRNA の *in vivo* へのデリバリー

McCaffrey ら¹³⁾ は、マウスの尾静脈から 40 μ g の NS5B に対する合成 siRNA や siRNA 発現ベクターを、体重の 5~10% の大量の PBS 溶液で 5~7 秒の短時間で注入するハイドロダイナミックス導入法で、*in vivo* の肝細胞への siRNA の導入に成功した。さらに最近、このハイドロダイナミックス導入法で導入された Fas¹⁴⁾ やカスパーゼ 8¹⁵⁾ に対する合成 siRNA (2'-ACE で化学的に修飾した siRNA でその安定性の上昇を図っている) で、マウスに誘発された劇症肝炎による死亡率を低下させたことが報告された。このハイドロダイナミックス導入法をそのまま臨床応用することは難しいが、siRNA が *in vivo* の細胞で有効に作用することを示した重要な報告である。

神経系の場合は、siRNA の血液脳関門の通過と非分裂細胞である神経細胞への導入といっ

図3 SOD1 mRNA に対するリボザイム、DNA エンザイム、RNAi の切断効率の比較 (文献¹⁰⁾ より引用)

in vitro の変異 SOD1 mRNA 特異的な DNA エンザイム (B), リボザイム (C) による切断。

A: SOD1 mRNA の 2 次構造 (上) とヘアーピンの 1 本鎖の部分 (矢印) でデザインされた siRNA, リボザイム, DNA エンザイム。

B: *in vitro* 転写された野生型 SOD1 mRNA を, 10mM Mg²⁺ の存在下で DNA エンザイム Dz394 が有効に 4 時間で切断した (左), リボザイム Rz405 もほぼ同様の高い切断効率を示した (右)。

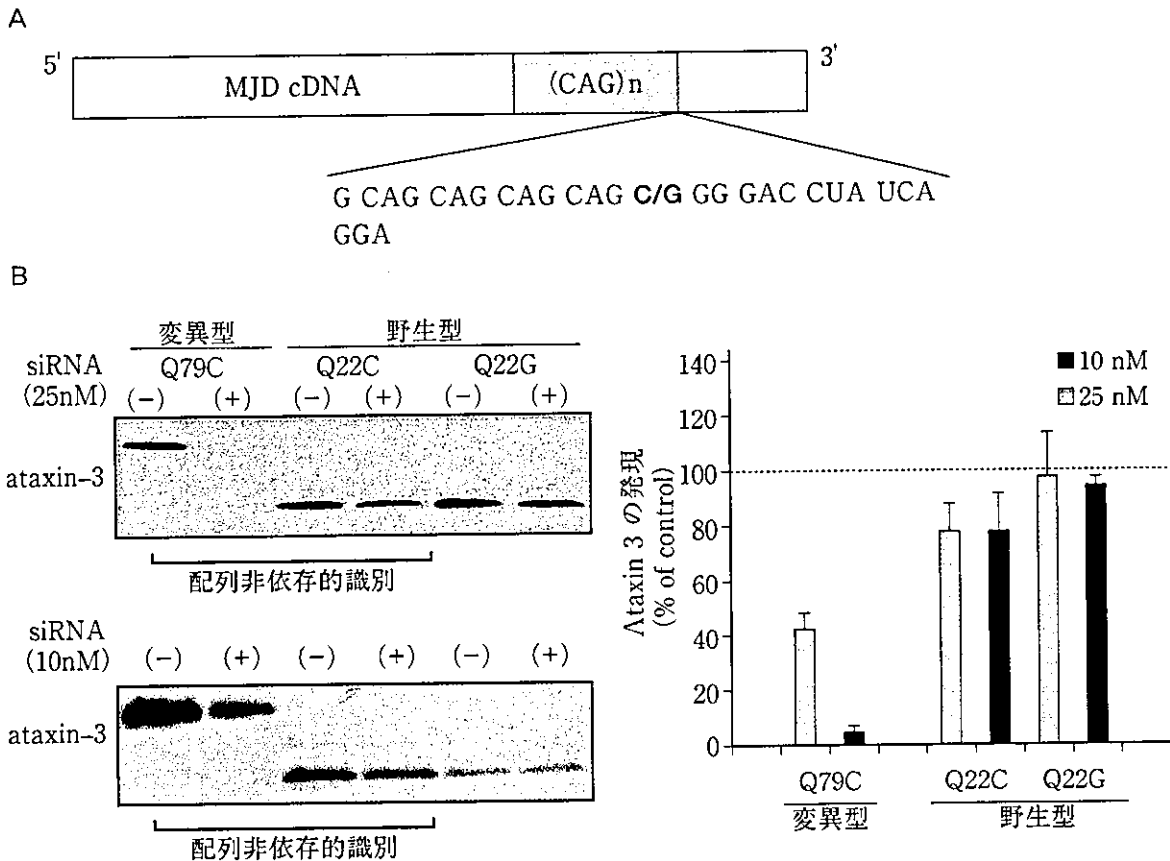
C・D: 293T 細胞に SOD1 発現ベクターと siRNA, DNA エンザイムまたはリボザイム発現ベクターを共発現させ, リコンビナント SOD1 (C) と, 内因性 SOD1 (D) をウエスタンブロットした。siRNA が最も有効に SOD1 発現を抑制した。GFP は発現効率のコントロール。

略語: 巻末の「今月の略語」参照

た 2 つの大きな問題がある。核酸やプラスミドベクターの血液脳関門の通過は, siRNA にウイルスの誘導配列である TAT をつけるなど模索されているが, いまだ成功していない。神経細胞への導入は, アンチセンスの経験から siRNA も神経実質内や脳室内投与¹⁶⁾ によって多少はできる可能性もあるが, その効率には限界がありそうである。ウイルスベクターは神経系へはるかに有効な導入効率と長期の発現が可能であ

る。siRNA 発現ベクターコンストラクトをアデノウイルス¹⁷⁾ やレンチウイルス¹⁸⁾, レトロウイルス¹⁹⁾, アデノ随伴ウイルス²⁰⁾ などのウイルスベクターに組み込んで作製した siRNA 発現ウイルスベクターを用いて, *in vivo* 細胞への siRNA 導入の報告が次々となされている。しかし, 中枢神経系でのウイルスベクターによる免疫反応の問題²¹⁾ や, 実際に起こったアデノウイルスベクター投与による死亡事例やレトロウ

図4 配列非依存的な siRNA の切断活性の変化



Machado-Joseph 病 (MJD) 遺伝子は MJD 遺伝子内の CAG リピートの伸長によって発症する。CAG リピートの後には G/C 遺伝子多型があり、伸長した CAG リピートを持つ変異アリルはすべて G で、正常アリルでは G/C が同頻度で見られる。我々のデザインした MJD siRNA はこの 1 塩基の差を認識して変異アリル (Q79C) を切断し、正常アリル (Q22G) は切断しなかった。加えて、驚いたことにこの MJD siRNA は Q79C と標的配列の全く同じもう 1 つの正常アリル (Q22C) もわずかにしか切断しなかった。この原因として、MJD mRNA の 2 次構造の変化や RNA 結合タンパク質の存在がその活性に影響したことが考えられた。

略語：巻末の「今月の略語」参照

イルスペクターによる白血病発症など、その安全面で解決されるべき問題は多い。

疾患でも新しい治療法の開発に siRNA の利用が突破口となることを大いに期待したい。

おわりに

文 献

siRNA を核酸医薬として神経変性疾患に臨床応用するには、デリバリー方法が最も大きな問題であろう。しかし、siRNA の効果は従来のアンチセンスやリボザイム、DNA エンザイムよりはるかに勝り、その応用はさまざまな側面で適応が可能であることから、ウイルス疾患や癌ではその臨床応用の研究は爆発的に進んでいる。したがって非常に近い将来に、神経変性

- 1) Elbashir SM, et al: Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. EMBO J 20: 6877-6888, 2001.
- 2) Brummelkamp TR, et al: A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. Science 296: 550-553, 2002.
- 3) Holen T, et al: Positional effects of short inter-

- fering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res* 30: 1757-1766, 2002.
- 4) Amarzguioui M, et al: Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. *Nucleic Acids Res* 31: 589-595, 2003.
 - 5) Jackson A L, et al: Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 21: 635-637, 2003.
 - 6) Semizarov D, et al: Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 6347-6352, 2003.
 - 7) Chi J T, et al: Genomewide view of gene silencing by small interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 6343-6346, 2003.
 - 8) Bridge A J, et al: Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* 34: 263-264, 2003.
 - 9) Sledz C A, et al: Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* 5: 834-839, 2003.
 - 10) Yokota T, et al: siRNA-based inhibition of superoxide dismutase expression; potential use in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 314: 283-291, 2004.
 - 11) Gonzalez-Alegre P, et al: Toward therapy for DYT1 dystonia: allele-specific silencing of mutant Torsin A. *Ann Neurol* 53: 781-787, 2003.
 - 12) Miller V M, et al: Allele-specific silencing of dominant disease genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 7195-7200, 2003.
 - 13) McCaffrey A P, et al: RNA interference in adult mice. *Nature* 418: 38-39, 2002.
 - 14) Song E, et al: RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med* 9: 347-351, 2003.
 - 15) Zender L, et al: Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 7797-7802, 2003.
 - 16) Makimura H, et al: Reducing hypothalamic AGRP by RNA interference increases metabolic rate and decreases body weight without influencing food intake. *BMC Neurosci* 3: 18, 2002.
 - 17) Xia H, et al: siRNA-mediated gene silencing *in vitro* and *in vivo*. *Nat Biotechnol* 20: 1006-1010, 2002.
 - 18) Qin X F, et al: Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 183-188, 2003.
 - 19) Barton G M, et al: Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 14943-14945, 2002.
 - 20) Hommel J D, et al: Local gene knockdown in the brain using viral-mediated RNA interference. *Nat Med* 9: 1539-1544, 2003.
 - 21) Kajiwara K, et al: Immune responses to adenoviral vectors during gene transfer in the brain. *Hum Gene Ther* 8 (3): 253-265, 1997.

Clinical Application of siRNA to Neurodegenerative Diseases

Takanori Yokota

Department of Neurology and Neurological Science,
Tokyo Medical and Dental University

神経変性疾患研究における siRNA を用いた 遺伝子発現制御

Application of siRNA to Research for Neurodegenerative Diseases

横田隆徳*

RNAi はいかなる遺伝子に対してもデザインできて、その高い特異性と発現抑制効果から、アルツハイマー病を始めとする神経変性疾患の基礎的研究においても早速応用され成果をあげている。さらに難病の多い神経変性疾患への治療戦略としても期待されている。それは、RNAi ライブラリーをはじめとする創薬におけるツールといった側面と、short interfering RNA (siRNA) を直接疾患に適応するという2つの方面から行われている。本稿では、主に遺伝性神経変性疾患において変異遺伝子の変異蛋白の発現を抑制する遺伝子治療としての臨床応用を含め、神経変性疾患研究における siRNA の研究の現状と問題点について概説する。

1. RNAi の分子機構

1998年、Fire らによって線虫において2本鎖 RNA によって配列特異的に遺伝子の発現抑制される現象が RNA 干渉として報告された¹⁾。この現象は植物から線虫、哺乳動物にいたるまで広く保存して観察され、元来真核細胞に備わった抗ウイルス機構として知られていた。

長鎖2本鎖 RNA は細胞内で Dicer と呼ばれる RNase III 活性を有した RNA 切断酵素によって20~25塩基の small interfering RNA (siRNA) へと切断される。この2本鎖 RNA は3'末端が2塩基突出しているのが特徴である。siRNA は RISC (RNA-induced silencing complex) と呼

ばれるタンパク複合体に取り込まれ、ATP 依存的に1本鎖 RNA にときほぐされる。そしてこの1本鎖 RNA がガイド分子となって RISC を配列特異的に標的 RNA へと導き、標的 RNA の siRNA と対合する領域の中央部分で切断して、最終的に標的 RNA は分解される (図1)。

しかし、哺乳動物における2本鎖 RNA の導入は PKR (protein kinase R, interferon-induced double strand RNA-activated protein kinase) や 2'5'oligoadenylate synthetase の活性化による非特異的な翻訳抑制や RNA の分解が生じ、ホストの細胞が死んでしまうため、分子生物学的手法としても遺伝子治療の方法としても RNAi の利用の大きな妨げになっていた。しかし、2000年、Tuschl ら

*Takanori Yokota 東京医科歯科大学 神経内科 講師. 連絡先: Tel. 03-5803-5234 (E-mail) tak-yokota.nuro@tmd.ac.jp

RNA interference

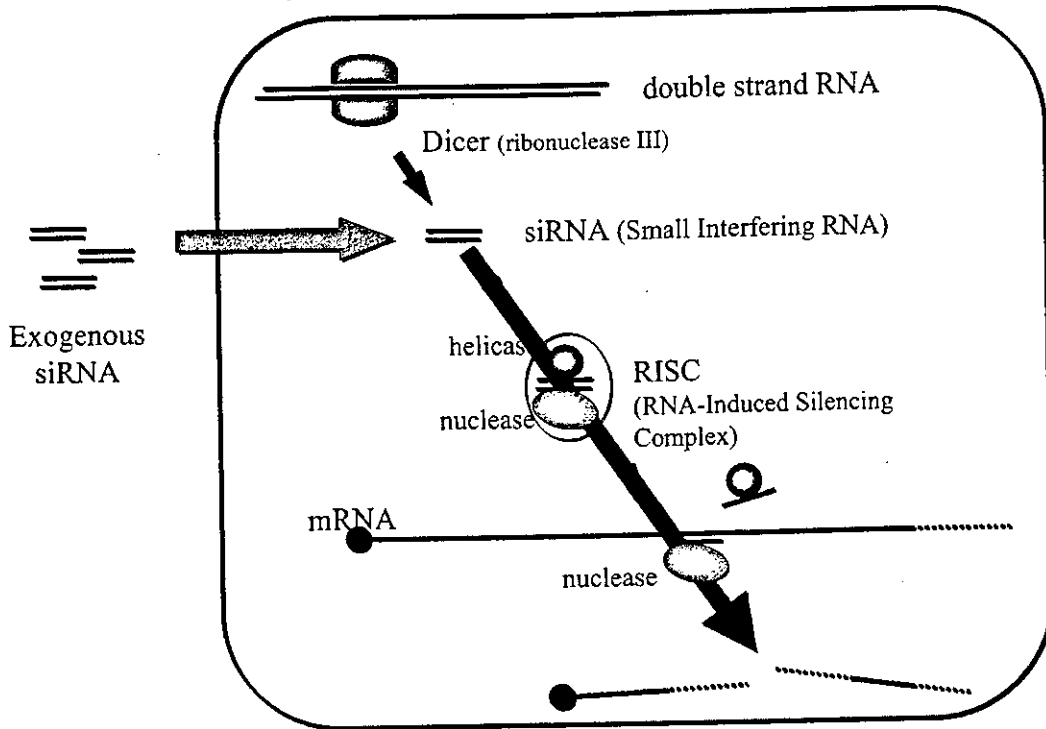


図1 RNAiの機序

により RNAi 機構の中間産物である合成 siRNA を導入することによってこれらの副反応が回避され、siRNA の配列に特異的な遺伝子発現抑制が可能となった²⁾。さらに、pol III系のプロモーターを用いることにより細胞内で siRNA を発現する DNA ベクターの開発もされ³⁾、その応用範囲はさらに広まった。

2. RNAi の発現抑制効率

RNA のレベルで遺伝子の発現を抑制させる方法としては、RNAi の発見以前よりアンチセンス DNA/RNA がすでに利用されているが、標的遺伝子の発現抑制効率が不十分なことが多く、特異性にも問題がある。他に RNA レベルで変異部位を認識して選択的に切断してその発現を抑制することのできるものとして、リボザイムと DNA エンザイムの機能性核酸が知られていた。

リボザイムは 1 本鎖 RNA のなかで切断、ライゲーション、スプライシングなどの酵素活性をもつ機能 RNA 分子で、特にハンマーヘッド型リボザイムはその大きさが 30~40 塩基で小型である

ためエンジニアが比較的容易であることから分子生物学の方法としても利用されている。ハンマーヘッド型リボザイムは基質の RNA に相補的にハイブリダイズする 2 本の結合アームと活性中心からなっている。アームの部分で基質 RNA と塩基対を形成することによって基質を認識し、基質 RNA 鎖を切断する。リボザイムの切断可能な配列には一定の法則 NUX (N は任意, X は A, U, C) があり²⁾、これに合わない配列には全く作用しない。

DNA エンザイム (DNA enzyme), カタリチック DNA (catalytic DNA) と呼ばれ、約 30 塩基の 1 本鎖 DNA からなり、リボザイムと同様にアームの部分で基質 RNA と塩基対を形成して基質を認識し、ループ領域でマグネシウムイオンを保持して触媒作用をさせて、目的の RNA を切断する。基質 RNA のプリン (A, G) とピリミジン (U, C) の間のみを切断できる。

細胞内での siRNA とリボザイムと DNA エンザイムの発現抑制の効率を SOD1 mRNA を基質として比較をした実験例を示す⁴⁾。リボザイムと

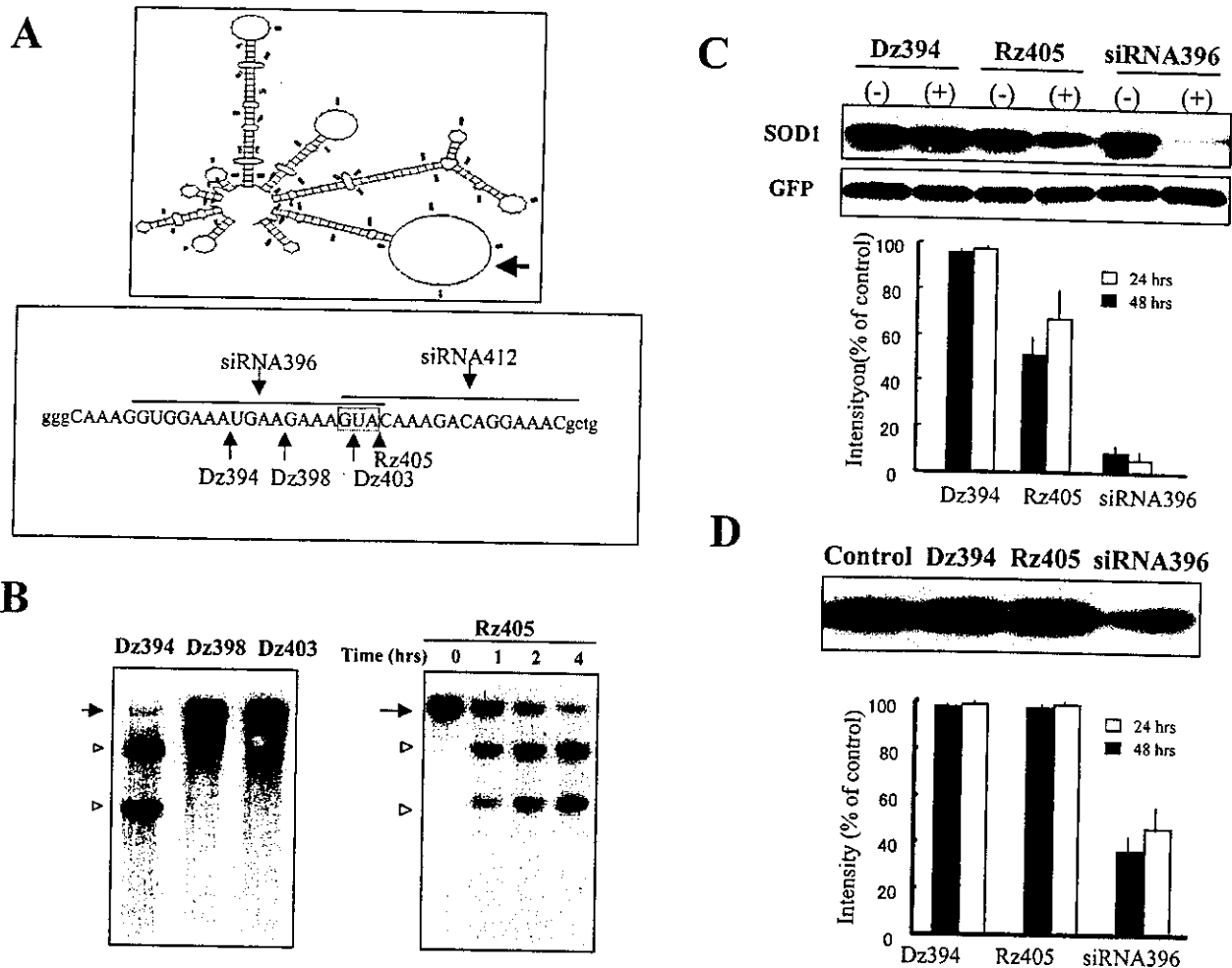


図2 SOD1 RNA に対するリボザイム、DNA エンザイム、RNAi の切断効率の比較

in vitro の変異 SOD1 mRNA 特異的な DNA エンザイム(B), リボザイム(C)による切断 (文献 4 より転載)。(A)SOD1 mRNA の 2 次構造 (上) とヘアーピンの 1 本鎖の部分 (矢印) でデザインされた siRNA, リボザイム, DNA エンザイム。(B)*in vitro* 転写された野生型 SOD1 RNA を 10mM Mg²⁺ の存在下で DNA エンザイム Dz394 が有効に 4 時間で切断した (B 左), リボザイム Rz405 もほぼ同様の高い切断効率を示した (B 右)。(C)(D)293T 細胞に SOD1 発現ベクターと siRNA, DNA エンザイムまたはリボザイム発現ベクターを共発現させ, リコンビナント SOD1 と(C), 内因性 SOD1 をエウスタンプロットした(D)。siRNA が最も有効に SOD1 発現を抑制した。GFP は発現効率のコントロール。

DNA エンザイムの切断効率は基質 RNA の 2 次構造に大きく影響されることが知られているため, SOD1 mRNA の翻訳領域で最も大きい 1 本鎖のループを形成する部分でリボザイム, DNA エンザイムと RNAi を複数デザインしてその有効性を比較した (図 2 A)。*in vitro* で転写した SOD1 RNA を基質として用いた切断実験で 4 時間以内にはほぼ完全に SOD1 RNA を切断できる高効率のリボザイムと DNA エンザイムを作製した (図 2 B)。ほぼ同部位でデザインした siRNA と培養細胞内での SOD1 の発現抑制効果を比較すると,

SOD 発現ベクターとの共発現実験 (図 2 C), 内因性 SOD (図 2 D) 共に, siRNA の方がリボザイムと DNA エンザイムよりはるかに効率良く抑制することが可能であった。さらに, C 型肝炎遺伝子の発現抑制効率をリボザイムと DNA エンザイムとその有効濃度で比較すると図 3 のようになり, siRNA の方がはるかに効率よく標的遺伝子の発現を抑制できることがわかる⁵⁾。

3. siRNA の標的遺伝子特異性

siRNA と基質 RNA との特異性については, 一