

200400744B

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14～16年度 総合・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. 総合研究報告書

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

東京医科歯科大学大学院 水澤 英洋

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

III. 研究成果の刊行物・別冊

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：筋萎縮性側索硬化症[変異 *SOD1*] (BBRC, 2004)、Machado-Joseph 病 [変異 *ataxin3*] (Ann Neurol, 2004)、パーキンソン病[変異 *synuclein*]、アルツハイマー病[*BACE1*, *PS1*]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。脳血管障害では動脈硬化促進分子 E-セレクチンの siRNA で培養血管内皮細胞での治療効果を確認し (BBRC, 2003)、頻繁に変異を起こす C 型肝炎ウイルスの非変異領域を標的に、非常に効率よい siRNA とアデノウイルスベクターの開発に成功し(EMBO Report, 2003)、複数の特許を出願した。デリバリーでは中枢神経系への直接注入の他、Hydrodynamic injection 法で末梢血管から肝臓への導入に成功するとともに、ES 細胞法で内因性 *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、筋萎縮性側索硬化症モデルマウスと掛合わせて有効性を確認した。病態研究として、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、DJ-1 の酸化ストレス抑制機能を証明した (BBRC, 2003)。また、世界に先駆けて発現型 siRNA ベクター系を開発し (Nat Biotechnol, 2002)、より高活性で安定なステムループ型発現系を開発・改良した。さらに、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、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専攻
宮岸 真 東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻

A. 研究目的

1) 研究の背景：疾病の発症機序が明らかになるに従い発症に係わる分子が次々と判明している。そこで、それらの分子の発現を遺伝子レベルで抑制することにより疾病治療の効果が期待できる。特に神経細胞変性をきたす常染色体優性遺伝性の疾患については、一般に変異遺伝子産物が毒性を獲得 (gain of toxic function) して発症すると考えられ、その変異遺伝子の発現を抑制することは疾患の根本治療に成りうる。このようなある特定の遺伝子の

発現を選択的に抑制する (silencing) ことにより、疾患を治療しようとする試みは従来もなされてきた。mRNA の翻訳を抑制するアンチセンス DNA/RNA オリゴはすでに一部は臨床治療までできているが、多くの場合その効率には限界があり、また変異遺伝子に対する特異性にも乏しい。mRNA を配列特異的に切断する酵素活性をもった核酸であるリボザイムや DNA 酵素は基質 RNA の 1 塩基の違いをも認識でき特異性に優れているが、in vivo での切断効率は不十分であることが多い。

RNAi (RNA interference) は 2 本鎖 RNA による

転写後遺伝子発現抑制 (post-transcriptional gene silencing) 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依存的タンパク質キナーゼ (PKR) とオリゴアデニル酸合成酵素 (2-5AS) 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)。

2) 研究の目的: まず、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、アルツハイマー病、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 を作成する。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 (HVJ-E) 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

家族性筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病、脊髄小脳変性症、脳血管障害

などにおいて標的遺伝子を確定する。その標的遺伝子の cDNA から RNA の2次構造、配列の特徴を検討して数個の発現型 siRNA を作成し培養細胞に導入し、同時に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、infusion pump (Alzet) 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、まず 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

筋萎縮性側索硬化症の原因である変異 SOD1 遺伝子について点変異の位置を、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野生型 mRNA にはほとんど影響せず、変異 mRNA を特異的に発現抑制する siRNA を作製した。また、その効率は同様の基質部位でデザインしたリボザイム や DNA 酵素より特に内因性の SOD1 の発現抑制においてはるかに有効であった (BBRC, 2003)。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性の 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 (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。

脳血管障害については関連分子である 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-セレクトイン発現の著明な抑制と白血球の接着障害を確認した (BBRC, 2003)。また、脳血管障害の原疾患である動脈硬化症に重要な

apoB48 受容体についても siRNA を作製し、単球マクロファージの泡沫化抑制に有効であることを証明した。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、アデノウイルスベクターの開発に成功した (EMBO Report, 2003)。

また、病態解明への応用として、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。

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有効性を確認しつつある。

また、我々は世界に先駆けて Pol III プロモーターと siRNA ベクター系を用いて動物細胞内で特定の内在性遺伝子をノックダウンする技術を開発したが (Nat Biotech, 2002)、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クエ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 法で肝臓に導入することに成功した。

また、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、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、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。それにより 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。

D. 考察

1) 達成度について

これまでに、神経変性疾患、脳血管障害などの多くの神経難病に対して非常に効率的に特異的 siRNA を作製し、それを細胞内で機能するように発現型 RNAi としてベクターを作製することに成功しており、当初の目的は十分に達成されたと思われる。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。基礎研究でも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。

2) 研究成果の学術的、国際的、社会的意義について

多くの神経変性疾患の原因遺伝子、外来性

のウイルス遺伝子、さらには脳卒中などの一般的な疾患の関連遺伝子について、その発現をほとんど完全に抑制する siRNA の開発に成功しており、研究論文に見られるように学術的意義はきわめて大きい。また、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、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。

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。

3) 今後の展望について

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。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シチン性カチオニック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起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。

4) その他特記すべき事項

これら研究は、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)、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、また第15回つくば賞(多比良和誠、宮岸 真)や第11回化学・バイオつくば賞(宮岸 真)を受賞するなど、きわめて高い評価を受けている。

E. 結論

以上述べてきたように、我々は筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、アルツハイマー病、脳血管障害など多くの神経難病において変異遺伝子や標的遺伝子に特異的な発現型RNAiの作製に成功している。変異の多い1本鎖RNAウイルスであるC型肝炎ウイルスに対しても、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。ベクターに関しては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およびアデノ随伴ウイルスベクターの作製に成功し、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. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yokota T, Sakamoto N, Enomoto N, Tanabe, Maekawa, Miyagishi M, Taira K, Watanabe M, Mizusawa H. Inhibition of intracellular hepatitis C Virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. EMBO report 4 : 602-608, 2003
- 2) Yokota T, Nishiwaki Y, 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 cell death by oxidative stress, ER stress, and proteasome inhibition. Biochem Biophys Res Com 312: 1342-1348, 2004
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 横田隆徳. 変異遺伝子に選択的な遺伝子治療の戦略. *神経内科* 56: 7-13, 2002
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 横田隆徳. RNAiの医療への応用. *実験医学* 22: 485-491, 2004
- 13) 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
- 14) 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
- 14) 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
- 15) 横田隆徳. RNAiの神経疾患への応用. *細胞工学* 24: 378-382, 2005
- 16) 横田隆徳. RNAiによるウイルス複製制御ウイルス in press, 2005
- 17) Kawakami A, Tanaka A, Nakajima K, Yasukochi Y, Shimokado K, Yoshida M. Atorvastatin attenuates remnant lipoprotein-induced monocyte adhesion to vascular endothelium under physiological flow conditions. *Circ Res* 91: 263-271, 2002
- 18) Jibiki M, Yoshida M, Inoue Y, Chien LJ, Iwai T, Yasukochi Y. Hypoxia-induced upregulation of CD11b in granulocytes. *Int J Angiol* 11: 102-106, 2002
- 19) 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 Hypertension Biochem Biophys Res Com* 23: 783-788, 2003
- 20) 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
- 21) 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
- 22) 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 adhesionkinase. *FEBS Letters* 553: 419-422, 2003
- 23) Kawakami A, Tanaka A, Nakajima K, Shimokado K, Yoshida M. Remnant lipoprotein-induced smooth muscle cell proliferation involves EGF receptor transactivation. *Circulation* 108: 2679-2688, 2003
- 24) Fujiyama S, Amano K, Uehara 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-independent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells. *Circ Res* 93: 980-989, 2003

25) Onai Y, Suzuki J, Nishiwaki Y, Gotoh R, Berens K, Dixon R, Yoshida M, Isobe M. Blockade of cell adhesion by a small molecule selectin antagonist attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol* 481: 217-25, 2003

26) 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

27) 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

28) 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

29) Kuwabara T, Taira K, et al. A small modulatory dsRNA specifies the fate of adult neural stem cells. *Cell* 116: 779-793, 2004

30) Kawasaki H, Taira K. Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells. *Nature* 431: 211-217, 2004

31) Kawasaki H, Taira K, et al. World of small RNAs: from ribozymes to siRNA and miRNA.

Differentiation 72: 58-64, 2004

32) 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

33) 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

34) 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

35) 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

36) 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

37) 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

38) 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

39) Kawasaki H, Taira K. Short hairpin type of dsRNAs that are controlled by tRNAVal promoter significantly induce RNAi-mediated gene silencing in the cytoplasm of human cells. *Nucleic Acids Res* 31: 700-707, 2003

40) 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
- 41) 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. *Nucleic Acids Res* 31: 981-987, 2003
- 42) Wadhwa R, Taira K, et al. Targeting mortalin using conventional and RNA-helicase-coupled hammerhead ribozymes. *EMBO Rep* 4: 595-601, 2003
- 43) Miyagishi M, Taira K. U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nature Biotechnol* 20: 497-500, 2002
- 44) 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
- 45) 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
- 46) Kasim V, Miyagishi M, et al. Control of siRNA expression using the Cre-loxP recombination system. *Nucleic Acids Res* 32: E66, 2004
- 47) 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
- 48) Miyagishi M, et al. Generation of an shRNAi expression library against the whole human transcripts. *Virus Res* 102:117-124, 2004
- 49) 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
- 50) 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
- 51) 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
- 52) Miyagishi M, Taira K. Strategies for generation of a stable siRNA-expression library directed against the human genome. *Oligonucleotides* 13: 325-333, 2003
- 53) Yamauchi T, Miyagishi M, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423: 762-769, 2003
- 54) Futami T, Miyagishi M, Taira K. Stimulatory effect of an indirectly attached RNA helicase-recruiting sequence on the suppression of gene expression by antisense oligonucleotides. *Antisense Nucl Acid Drug Develop* 13: 9-17, 2003
- 55) Miyagishi M, Hayashi M, Taira K. 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
- 56) Hamada M, et al. Effects on RNA interference in gene expression (RNAi) in cultured mammalian cells of mismatches and the introduction of chemical modifications at the 3' ends of siRNAs. *Antisense Nucl Acid Drug Develop* 12(5) 301-309, 2002
- 57) 横田隆徳. 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
- 58) 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

59) 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

60) 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

61) 川崎 広明, 多比良和誠. tRNA プロモーターを用いた siRNA 発現システム. 多比良和誠ら編, RNAi 実験プロトコール, 羊土社, 東京, 2003 pp104-110

62) 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

63) 宮岸 真, 多比良和誠. siRNA 発現ベクターの作製とトランジェント RNAi. 多比良和誠ら編, RNAi 実験プロトコール, 羊土社, 東京, 2003, pp95-103

64) 宮岸 真, 多比良和誠. ON/OFF 制御系 RNAi ベクター. 多比良和誠ら編, RNAi 実験プロコール, 羊土社, 東京, 2003 pp111-115

2. 学会発表

1) Yokota T, et al. Inhibition of intracellular hepatitis C Virus replication International Congress of RNA, Kyoto, 2003.11.25.

2) 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

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

5) 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.

6) 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.

7) 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.

8) 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.

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

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

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

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）

4) E-セレクチン標的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

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 Alleles 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, Sakamoto N, Enomoto N, Tanabe, Maekawa, Miyagishi M, Taira K, Watanabe M, Mizusawa H.	Inhibition of intracellular hepatitis C Virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs.	EMBO report	4	602-608	2003
Yokota T, Nishiwaki Y, 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, 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 specific for 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	変異遺伝子に選択的な遺伝子治療の戦略。	神経内科	56	7-13	2002
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	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 の神経疾患への応用	細胞工学	24	378-382	2005
横田隆徳	RNAi によるウイルス複製制御	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
Kawakami A, Tanaka A, Nakajima K, Yasukochi Y, Shimokado K, Yoshida M.	Atorvastatin attenuates remnant lipoprotein-induced monocyte adhesion to vascular endothelium under physiological flow conditions.	Circ.Res.	91	263-271	2002
Jibiki M, Yoshida M, Inoue Y, Chien LJ, Iwai T, Yasukochi Y.	Hypoxia-induced upregulation of CD11b in granulocytes.	Int.J.Angiol.	11	102-106	2002
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
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.R es. Com.	310	1062-1066	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 A, Nakajima K, Shimokado K, Yoshida M.	Remnant lipoprotein-induced smooth muscle cell proliferation involves EGF receptor transactivation.	Circulation	108	2679-2688	2003

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
Fujiyama S, Amano K, Uehara 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-independent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells.	Circ Res.	93	980-989	2003
Onai Y, Suzuki J, Nishiwaki Y, Gotoh R, Berens K, Dixon R, Yoshida M, Isobe M.	Blockade of cell adhesion by a small molecule selectin antagonist attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury.	Eur J Pharmacol.	481	217-25	2003
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 14
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 15
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 16

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
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
川崎 広 明 多比良和 誠	t RNA プロモータ ーを用いた siRNA 発現システム	多比良和誠 ら	RNAi 実験プ ロトコール	羊土社	東京	2003	104-110

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.	Differentiatio n	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	38083-3808 6	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	15504-1551 1	2004
Takagi, Y., Taira, K. et al.	Analysis on a cooperative pathway involving multiple cations in hammerhead reactions.	J Am Chem Soc.	126	12856-1286 4	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
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
Miyagishi, M, Taira, K.	U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells.	Nature Biotechnol.	20	497-500	2002

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
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
宮岸 真、 多比良和誠	siRNA 発現ベクターの作製とトランジェント RNAi	多比良和誠ら	RNAi 実験プロトコール	羊土社	東京	2003	95-103
宮岸 真、 多比良和誠	ON/OFF 制御系 RNAi ベクター	多比良和誠ら	RNAi 実験プロトコール	羊土社	東京	2003	111-115

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
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
Miyagishi, M. and Taira, K.	Strategies for generation of a stable siRNA-expression library directed against the human genome.	Oligonucleotides	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, Taira, K	Stimulatory effect of an indirectly attached RNA helicase-recruiting sequence on the suppression of gene expression by antisense oligonucleotides.	Antisense Nucl. Acid Drug Develop.	13	9-17	2003
Miyagishi, M, Hayashi, M, Taira, K	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
Hamada, M, et al.	Effects on RNA interference in gene expression (RNAi) in cultured mammalian cells of mismatches and the introduction of chemical modifications at the 3' ends of siRNAs.	Antisense Nucl. Acid Drug Develop.	12, 5	301-309	2002