

transport properties towards various compounds (Terasaki *et al.* 2003). The efficiency of a DNA vector-based transfection using cationic liposomes was less than 5% in TR-BBB13 cells (unpublished data). The present study suggests that oligonucleotide (siRNA)-based transfection is far more effective than DNA vector-based transfection in the case of TR-BBB13 cells. ABCG2 confers multidrug resistance upon cancer cells, so ABCG2 siRNA-induced RNA interference may also be useful for overcoming drug resistance.

The luminal localization of ABCG2 at the BBB has been clearly demonstrated in humans (Cooray *et al.* 2002) and rats (Hori *et al.* 2004). However, the functional contribution of ABCG2 at the BBB *in vivo* remains unclear (Allen and Schinkel 2002). Following rABCG2 siRNA-03 transfection into TR-BBB13 cells, the mRNA level of ABCG1, which has sequence homology with ABCG2, was unchanged (Fig. 4d), and those of ABCB1 and ABCC1, which can transport some ABCG2 substrates, were unaffected for at least 48 h after the siRNA transfection (Figs 4b,c). These data suggest that the silencing effect of the siRNA is specific for the ABCG2 gene in this *in vitro* BBB model. Because the rABCG2 siRNA selectively suppressed rABCG2 mRNA and protein, the siRNA study should allow us to clarify the contribution of the transporter to the BBB efflux transport. Indeed, it has recently been reported that siRNA designed to distinguish thiamine transporter subtypes induced subtype-specific gene silencing in Caco-2 cells, and that the functional contribution of the subtypes to thiamine uptake in the cells was clearly demonstrated by using the siRNA (Said *et al.* 2004). Such a sequence-specific silencing by siRNA may be a promising way to achieve a deeper understanding of the physiological and pharmacological roles of rABCG2 at the BBB. Regarding transporter gene knockdown at the BBB, the siRNA transfection into BCECs should be more specific than suppression by inhibitors, and easier to carry out as compared with the development of knockout mice. Moreover, the siRNA technique would be useful for silencing plural transporter genes because mixtures of siRNAs can be delivered.

In conclusion, the present study has demonstrated that delivery of siRNA into this *in vitro* BBB model specifically reduced endogenous rABCG2 protein level as well as its mRNA level. Application of the siRNA technique to BBB research should increase our understanding of ABCG2 role at the BBB.

Acknowledgements

We wish to thank Prof. M. Watanabe, Mr M. Tachikawa for helpful discussion and establishment of anti-ABCG2 antibody, and Messrs M. Fujiyoshi, N. Kimura for technical assistance. We would also like to thank Ms N. Funayama for secretarial assistance. This study was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research from

Japan Society for the Promotion of Science, and a 21st Century COE Program Special Research Grant from the Ministry of Education Science, Sports and Culture. It was also supported in part by the Industrial Technology Research Grant Program from the New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO) of Japan.

References

- Allen J. D. and Schinkel A. H. (2002) Multidrug resistance and pharmacological protection mediated by the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Mol. Cancer Ther.* **1**, 427–434.
- Allen J. D., van Loevezijn A., Lakhai J. M., van der Valk M., van Tellingen O., Reid G., Schellens J. H., Koomen G. J. and Schinkel A. H. (2002) Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter *in vitro* and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremogin C. *Mol. Cancer Ther.* **1**, 417–425.
- Asaba H., Hosoya K., Takahashi H., Ohtsuki S., Tamura E., Takizawa T. and Terasaki T. (2000) Blood–brain barrier is involved in the efflux transport of a neuroactive steroid, dehydroepiandrosterone sulfate, via organic anion transporting polypeptide 2. *J. Neurochem.* **75**, 1907–1916.
- de Bruin M., Miyake K., Litman T., Robey R. and Bates S. E. (1999) Reversal of resistance by GF120918 in cell lines expressing the ABC half-transporter, MXR. *Cancer Lett.* **146**, 117–126.
- Clarke R., Leonessa F., Welch J. N. and Skaar T. C. (2001) Cellular and molecular pharmacology of antiestrogen action and resistance. *Pharmacol. Rev.* **53**, 25–71.
- Cooray H. C., Blackmore C. G., Maskell L. and Barrand M. A. (2002) Localisation of breast cancer resistance protein in microvessel endothelium of human brain. *Neuroreport* **13**, 2059–2063.
- Ee P. L., Kamalakaran S., Tonetti D., He X., Ross D. D. and Beck W. T. (2004) Identification of a novel estrogen response element in the breast cancer resistance protein (ABCG2) gene. *Cancer Res.* **64**, 1247–1251.
- Elbashir S. M., Harborth J., Weber K. and Tuschl T. (2002) Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* **26**, 199–213.
- Gao B., Stieger B., Noe B., Fritschy J. M. and Meier P. J. (1999) Localization of the organic anion transporting polypeptide 2 (Oatp2) in capillary endothelium and choroid plexus epithelium of rat brain. *J. Histochem. Cytochem.* **47**, 1255–1264.
- Hannon G. J. (2002) RNA interference. *Nature* **418**, 244–251.
- Hori S., Ohtsuki S., Tachikawa M., Kimura N., Kondo T., Watanabe M., Nakashima E. and Terasaki T. (2004) Functional expression of rat ABCG2 on the luminal side of brain capillaries and its enhancement by astrocyte-derived soluble factor(s). *J. Neurochem.* **90**, 526–536.
- Hosoya K., Takashima T., Tetsuka K. *et al.* (2000a) mRNA expression and transport characterization of conditionally immortalized rat brain capillary endothelial cell lines; a new *in vitro* BBB model for drug targeting. *J. Drug Target.* **8**, 357–370.
- Hosoya K., Tetsuka K., Nagase K. *et al.* (2000b) Conditionally immortalized brain capillary endothelial cell lines established from a transgenic mouse harboring temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen gene. *AAPS Pharmsci.* **2**, article 27. doi: 10.128/ps020327 Available: <http://www.aapspharmsci.org>
- Hosoya K., Ohtsuki S. and Terasaki T. (2002) Recent advances in the brain-to-blood efflux transport across the blood–brain barrier. *Int. J. Pharm.* **248**, 15–29.
- Hyafil F., Vergely C., Du Vignaud P. and Grand-Perret T. (1993) *In vitro* and *in vivo* reversal of multidrug resistance by GF120918, an acridonecarboxamide derivative. *Cancer Res.* **53**, 4595–4602.

- Mori S., Takanaga H., Ohtsuki S., Deguchi T., Kang Y. S., Hosoya K. and Terasaki T. (2003) Rat organic anion transporter 3 (rOAT3) is responsible for brain-to-blood efflux of homovanillic acid at the abluminal membrane of brain capillary endothelial cells. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **23**, 432–440.
- Nabokina S. M., Ma T. Y. and Said H. M. (2004) Mechanism and regulation of folate uptake by the human pancreatic epithelial MIA PaCa-2 cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **287**, C142–C148.
- Rabindran S. K., Ross D. D., Doyle L. A., Yang W. and Greenberger L. M. (2000) Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. *Cancer Res.* **60**, 47–50.
- Reynolds A., Leake D., Boese Q., Scaringe S., Marshall W. S. and Khvorova A. (2004) Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol.* **22**, 326–330.
- Said H. M., Balamurugan K., Subramanian V. S. and Marchant J. S. (2004) Expression and functional contribution of hTHTR-2 in thiamine absorption in human intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **286**, G491–G498.
- Stirone C., Duckles S. P. and Krause D. N. (2003) Multiple forms of estrogen receptor- α in cerebral blood vessels: regulation by estrogen. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **284**, E184–E192.
- Suzuki M., Suzuki H., Sugimoto Y. and Sugiyama Y. (2003) ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics. *J. Biol. Chem.* **278**, 22 644–22 649.
- Terasaki T. and Hosoya K. (1999) The blood–brain barrier efflux transporters as a detoxifying system for the brain. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **36**, 195–209.
- Terasaki T., Ohtsuki S., Hori S., Takanaga H., Nakashima E. and Hosoya K. (2003) New approaches to *in vitro* models of blood–brain barrier drug transport. *Drug Discov. Today* **8**, 944–954.
- Virgintino D., Robertson D., Errede M., Benagiano V., Girolamo F., Maiorano E., Roncali L. and Bertossi M. (2002) Expression of P-glycoprotein in human cerebral cortex microvessels. *J. Histochem. Cytochem.* **50**, 1671–1676.
- Wu H., Hait W. N. and Yang J. M. (2003) Small interfering RNA-induced suppression of MDR1 (P-glycoprotein) restores sensitivity to multidrug-resistant cancer cells. *Cancer Res.* **63**, 1515–1519.
- Yoshinari K., Miyagishi M. and Taira K. (2004) Effects on RNAi of the tight structure, sequence and position of the targeted region. *Nucl. Acids Res.* **32**, 691–699.
- Zelcer N., Reid G., Wielinga P., Kuil A., van der Heijden I., Schuetz J. D. and Borst P. (2003) Steroid and bile acid conjugates are substrates of human multidrug-resistance protein (MRP)4 (ATP-binding cassette C4). *Biochem. J.* **371**, 361–367.
- Zhang Y., Boado R. J. and Pardridge W. M. (2003) *In vivo* knockdown of gene expression in brain cancer with intravenous RNAi in adult rats. *J. Gene Med.* **5**, 1039–1045.

特 集 神経疾患遺伝子治療の幕開け

変異遺伝子に選択的な 遺伝子治療の戦略*

● 横田隆徳**

Key Words : gene therapy, gain of function, ribozyme, catalytic DNA, DNA enzyme

変異遺伝子に選択的な 遺伝子治療の考えかた

神経変性疾患が遺伝子の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蛋白の本来のもつ機能の消失または低下する場合 (loss of function) と変異蛋白が新たに病的機能を獲得する場合 (gain of function) の二つがあることが知られている。遺伝子変異が常染色体にある場合、対立する二つのアレルの双方に遺伝子変異があっ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、遺伝子産物である蛋白自体がまったく発現しないか (null 変異)、発現しても発現蛋白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レルからは原則として正常個体の半分の量の正常の蛋白は発現しているので、本来の蛋白の機能の影響は少ないかまったくなく、変異アレルから発現した変異蛋白がなん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。

Gain of toxic function が強く想定されている疾患の一つとして Cu/Zn superoxide dismutase (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 radical scavenger の一つであることから、SOD1 酵素活性低下 (loss of function) が ALS 発症機序と疑われたが、SOD1 をノックアウトしても前角細胞障害が起こらず、患者遺伝子変異のほとんどが 1 塩基置換により一つのアミノ酸の置換が生じる missense 変異で、null 変異がみつからない、患者の赤血球中 SOD1 活性低下の程度と症状の重症度が相関しない、変異 SOD1 を過剰発現したトランスジェニックマウスの SOD1 活性自体は正常以上にある (G93A など) にもかかわらず運動神経が細胞変性を示すなどのいくつかの根拠の蓄積により、現在は変異 SOD1 がなん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、ポリグルタミン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 の内容について明らかになったものはないが、このような疾患の治療を考えた場合、変

* Strategy for gene therapy specific to the mutation.

** Takanori YOKOTA, M.D.: 東京医科歯科大学大学院脳神経機能病態 (神経内科) [〒113-8519 東京都文京区湯島1-5-45]; Department of Neurology, Faculty of Medicine, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, JAPAN.

異した蛋白の発現を選択的に抑制する方法があれば、その機序のいかんにかかわらず発症、進行を防止することが期待できるわけである。

変異蛋白発現抑制の方法とリボザイムとDNAエンザイムの利点

変異蛋白を低下させる方法としては、セントラルドグマに基づいて大別して三つのレベルが考えられる。変異遺伝子を、①DNA、②RNAのレベルで切断、正常の遺伝子と置換、または転写(翻訳)を障害して変異蛋白の発現を抑制する方法と、③発現した変異蛋白を蛋白レベルで変性崩壊させる方法である。

DNAのレベルで変異遺伝子を正常ものと置換する方法としてchimeric RNA/DNA oligonucleotideが知られている¹⁾。この方法は、変異DNAそのものを相同組み換えによって正常に置換する方法である。神経筋疾患ではすでにdystrophin遺伝子で報告されている²⁾が、その組み換え効率には限界があり、loss of functionによる疾患をターゲットに欠乏した蛋白を部分的に発現させるのが妥当と考えらる。

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、後述のようにその遺伝子変異に対する選択性が不十分で変異アリの発現のみを抑制するには限界ある。最近哺乳動物培養細胞レベルで応用が可能となったRNA干渉も同様に変異遺伝子特異性の点で限界がある。

近年Alzheimer病のモデル動物である変異APPトランスジェニックマウスを用いて、変異APPから異常亢進したプロセッシングにより生成されるあるAβペプチドに対して、その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たとの報告があった。多くの優性遺伝の神経変性疾患は異常蛋白がそのコンフォメーションに変化を生じ凝集体を作って沈着するため、同様のアプローチが有効である可能性がある。しかし、Alzheimer病以外のほとんどの神経変性疾患はその変異蛋白やその凝集体の存在場所が細胞内であり、抗体のアクセスという点におそらく大きな問題があろう。現在のところ原理的に

変異蛋白を選択的に低下させる方法としては、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機能性核酸であるリボザイムとDNAエンザイムが以下の理由で有望と思われる。

一般に優性遺伝疾患の治療は、正常アリの発現は損わずに、変異アリの発現のみを抑制することが望ましい。たとえば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、正常アリの発現は妨げたくない。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、変異アリだけでなく正常アリにもハイブリダイズしてしまう。特に遺伝子変異が点変異である場合、アンチセンスによる野生型と変異体の区別はきわめて難しい。遺伝子発現抑制の目的で最近応用の始まったRNA干渉も同様の問題がある。この点でリボザイムとDNAエンザイムは一つの塩基の差も明瞭に認識できるので、点変異のRNAでも選択的に切断が可能である。さらに遺伝子発現抑制の機序はアンチセンスの場合、ターゲットRNA 1分子にアンチセンス 1分子ハイブリダイズして翻訳を抑制するのであるが、リボザイムやDNAエンザイムはその名称のように触媒として働き、リボザイムやDNAエンザイム 1分子が繰り返し複数のRNAを切断できるため、効率が良いという利点がある。

リボザイムとは

生体内の酵素は蛋白質であるというのが常識であったが、1980年代にテトラヒメナrrRNAでのセルフプライミング³⁾やリボヌクレアーゼPの解析⁴⁾によりRNAも触媒機能をもつことが判明した。この発見以降、情報伝達の媒体と考えられていたRNAのなかで切断、ライゲーション、セルフプライミングなどの酵素活性をもつ機能RNA分子(catalytic RNA)はリボザイム(ribozyme: ribonucleic acid+enzyme)と呼ばれるようになった。現在まで自然界に存在する主要なリボザイムにはハンマーヘッド型、ヘアピン型、グループIイ

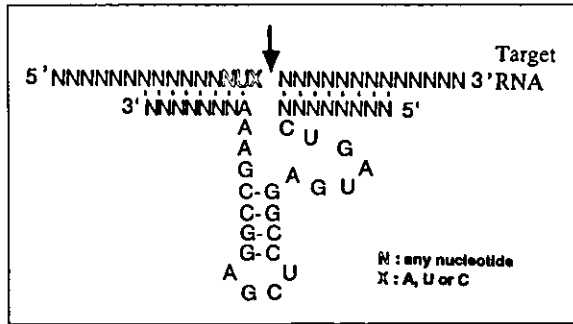


図1 ハンマーヘッド型リボザイムの二次構造

ントロン、リボヌクレアーゼP、そして、デルタ型肝炎ウイルスの5種類がある。特に、同一分子内で(シスに)働いている天然のハンマーヘッド型リボザイムは適当に分割することにより分子間にも働く(トランス化)ことに成功、すなわち目的のRNAを部位特異的に切断できるリボザイムが作成されて「RNA制限酵素」としてがぜん注目を浴びるようになった。しかも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、抑制したい遺伝子のmRNAの配列に合わせてオーダーメイドのリボザイムを設計・作成が可能となったからである⁵⁾⁶⁾。さらに近年、テトラヒメナのグループIイントロンリボザイムのトランススプライシング作用を利用して目的の変異RNAを切り出して任意の配列をライゲートする究極のRNA遺伝子改変が開発され、その可能性が注目されている⁷⁾がいまだ効率に限界があり、詳細は他稿に譲りたい。

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、活性中心、ループ(stem loop II)からなっている(図1)。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、活性中心に取り込まれた二価のマグネシウムイオンが基質RNA鎖の2'-5'リン酸ジエステル結合を切断する。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)があるが⁸⁾⁹⁾、その中での切断効率には差があり、GUCが最適とされている。さらに最近原則的にも切断可能な他の配列も次々に報告されている¹⁰⁾¹¹⁾。

細胞内でリボザイムの切断効率を決定しているのはトリプレット配列だけではない。特にターゲットとした基質RNAの二次構造はきわめて重

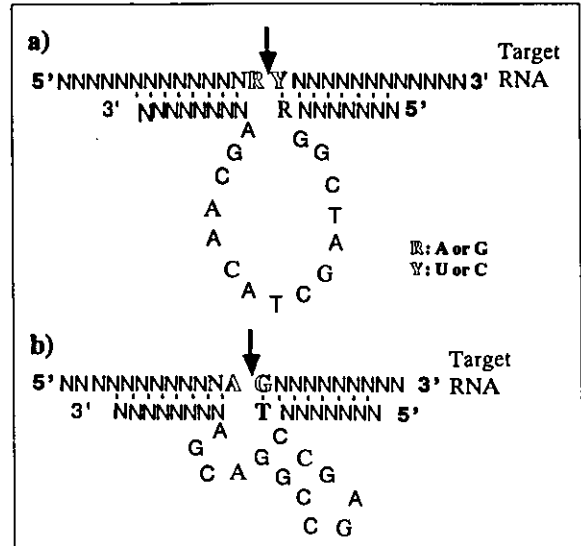


図2 DNAエンザイムの二次構造
a: 10-23type, b: 8-17type.

要で、トリプレットの部位がRNAの二次構造上リボザイムのアクセス可能な部位か否かは決定的な要素である。一般にRNAの二次構造上、切断可能部位はヘヤーピン構造となる1本鎖の部分で、すでにRNA同士がハイブリダイズしている部分は切断できないといわれる。図3はコンピュータプログラムにより予想したSOD1mRNAの二次構造上であるが、細胞内での基質RNAの二次構造を確実に予想する方法は現在のところない。変異部位特異的リボザイムの場合は切断部位は変異部位かその周辺に決まっていれば選択の余地はあまりないが、アームの長さを変えたり、RNAの二次構造を解くhelicaseを結合させるなどの工夫が試みられている。最近、より小型化したリボザイムをヘテロ二量体として用いて、片方を特異的基質の認識、もう片方を基質切断に使うことにより、基質特異性の幅を広げるなどの工夫(マキシザイム)がされている¹²⁾。

また、細胞内、組織内には多くのリボヌクレアーゼがあってリボザイムの安定性も重要な問題である。そのためにハンマーヘッド型リボザイムをDNA-RNAキメラで合成したり¹³⁾、2'-OHを2'-O-methylに置換する¹⁴⁾などの修飾により細胞内でのリボザイムの安定性の改善が報告されている。それ以外にもリボザイム側のアームの長さ、リボザイムの転写量、細胞内局在など影響する因子があってリボザイムの設計にはいまだ経験

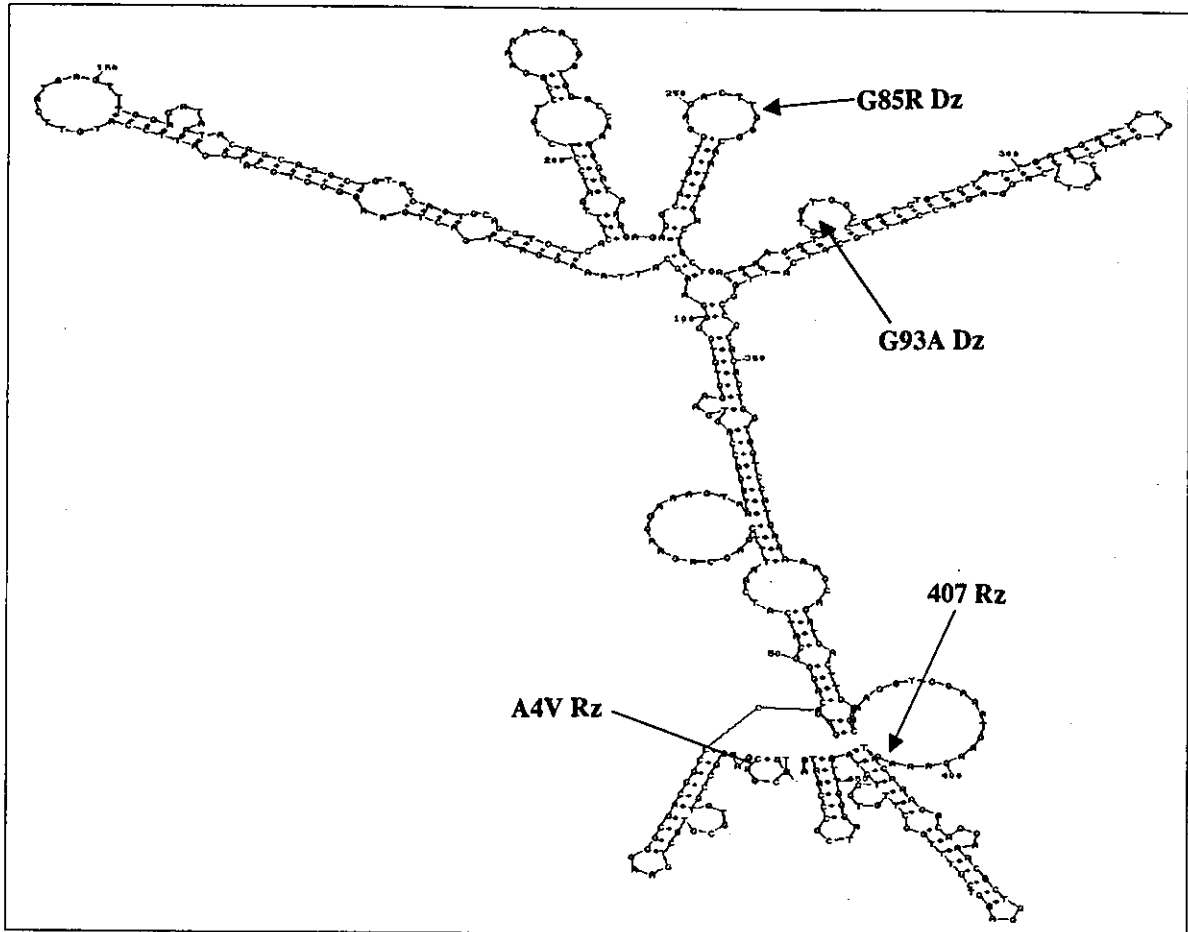


図3 SOD1 mRNAの二次構造
ヘアープインの1本鎖の部分でリボザイム(Rz), DNAエンザイム(Dz)をデザインする。

的な側面がある。

DNAエンザイムとは

リボザイムは触媒として実際に働く金属イオンの足場を提供していることがその役割との考え方から, RNA分子のかわりにDNA分子を用いて同様のことができないかとの多くの研究がされてきた。最近, Joyceらが*in vitro* selection法を用いて, RNA切断活性を持つDNAを開発し¹⁵⁾¹⁶⁾, DNAエンザイム(DNA enzyme), カタリチックDNA (catalytic DNA), またはdeoxyribozymeと呼ばれている¹⁷⁾。DNAエンザイムは約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。DNAエンザイムは活性中心の構造の違いにより 8-17(type 1)と10-23(type 2)がある

(図2-a, b)。8-17typeはハンマーヘッド型リボザイムと形の似た13塩基のstem-loop領域からなる活性中心を持ち, 基質RNAのアデニン(A)とグアニン(G)の間のリン酸ジエステル結合を切断する。一方, 10-23typeは活性領域としてよくは解明されていないが, 15塩基のループになっている領域を持って, 同様にマグネシウム依存性で, 基質RNAのプリン(A, G)とピリミジン(U, C)の間を切断できる。この両者のDNAエンザイムをあわせて, 16種類の2塩基の組み合わせのうち5種類が切断可能であり, リボザイムに比べてターゲットの塩基配列のしぼりが軽く, より多くの変異への適応が可能といえよう。

われわれの作成したSOD1を切断するハンマーヘッド型リボザイム, DNAエンザイムの例を示す¹⁸⁾。図4は野生型SODを切断するリボザイムの例で, *in vitro*転写された全長765ntの野生型SOD1 mRNAが407番目の塩基のGUAのAの3'末

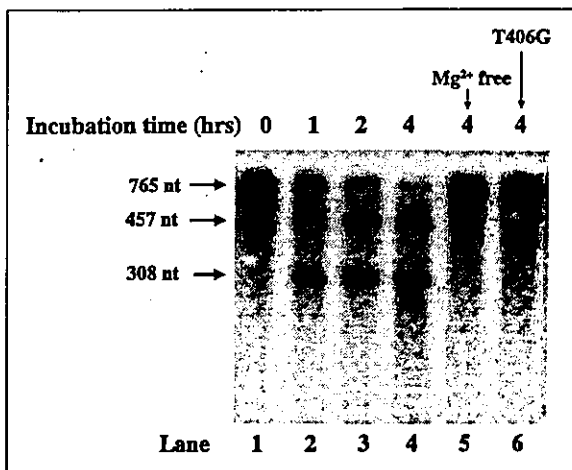


図4 SOD1 mRNAのリボザイムRz407による切断
*In vitro*転写された50pmol野生型SOD1 mRNA 50pmolを10mM Mg²⁺の存在下で250pmol Rz407と反応させた。時間とともに配列特異的(GUA)に二つの断片に切断した(Lane 1 ~ 4)。Mg²⁺フリーの反応液中や(Lane 5)、SOD1 mRNAをリボザイムが切断できない配列(T406G; GUA(GGA))に対しては、まったく切断しなかった(Lane 6)。

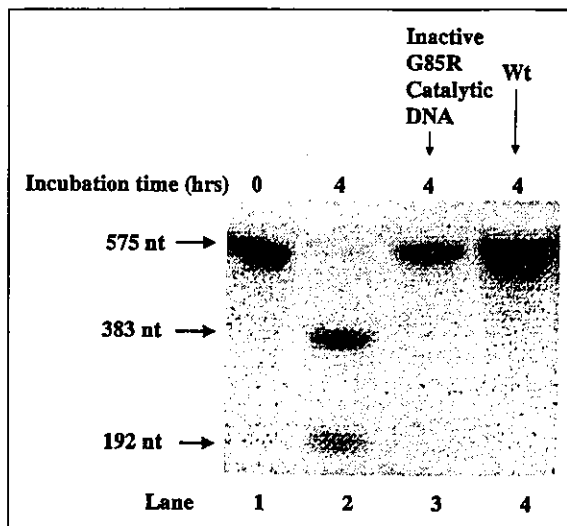


図6 DNAエンザイムによる変異SOD1 mRNA特異的な切断

図3と同様の反応条件でG85RDNAエンザイムはG85R SOD1 mRNAを4時間で95%以上切断するが、活性中心に変異を導入した非活性型A4VリボザイムはA4VSOD1 mRNAを切断せず(Lane 3)、A4Vリボザイムは野生型SOD1 mRNAをまったく切断しない(Lane 4)。

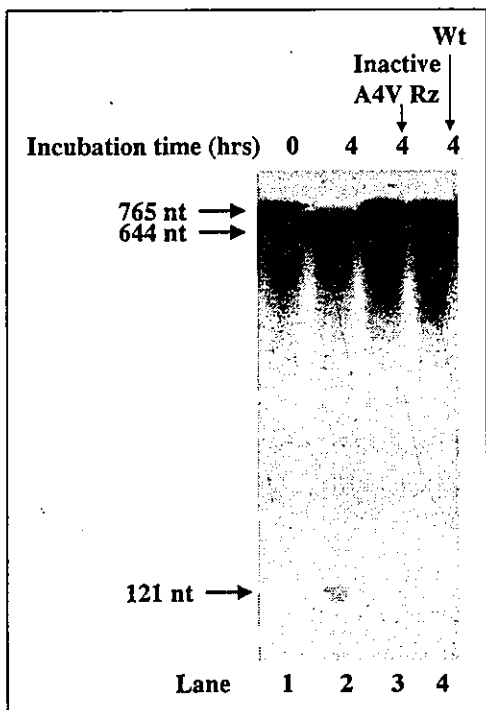


図5 リボザイムによる変異SOD1 mRNA特異的な切断

図3と同様の反応条件でA4VリボザイムはA4V SOD1 mRNAを4時間でほぼ100%切断するが、活性中心に変異を導入した非活性型A4VリボザイムはA4VSOD1 mRNAを切断せず(Lane 3)、A4Vリボザイムは野生型SOD1 mRNAをまったく切断しない(Lane 4)。

端の部位で切断されて、457ntと308ntの二つの断片になる。切断は時間とともに進み4時間後には95%以上のSOD mRNAが切断されるが、バッファーからMg²⁺を抜いた場合(Lane 5)や、基質のSOD1 mRNAの406番目の塩基をUからGに変異させてNUXの法則に合わなくしたSOD1 mRNA(Lane 6)は切断しない。

次に変異SOD1mRNAを特異的に切断するリボザイムの例を示す¹⁸⁾。84種類を越えるSOD1の異なる変異の中で、塩基配列上は14種類が切断可能で、もっとも患者数の多い変異であるA4V変異に対するリボザイムの例を図5に示す。A4VはGCC→GTCの変異なので、NUXの法則より野生型のGCCはリボザイムで切断されないが、GTCはもっともよいターゲットとなる。実際、A4VリボザイムはA4V SOD1 mRNAのみを選択的に切断して野生型SOD1は切断しない(Lane 4)。また、リボザイムの活性中心に変異を導入して酵素活性を消失させたものはまったく切断をしない(Lane 3)。

一方、DNAエンザイムは塩基配列上は19種類が切断可能である。トランスジェニックマウスのあるG85R変異を対象にDNAエンザイムをデザ

インした。変異がG GGC→G CGCなので、最初の2塩基が野生型ではプリン-プリンでカDNAエンザイムで切断されないが、G85Rではプリン-ピリミジンで切断可能である。図6示すようにDNAエンザイムはG85R SOD1 mRNAのみを選択的に切断し、野生型は切断しなかった。また、DNAエンザイムの活性中心に変異を導入して酵素活性を消失させたものはまったく切断をしなかった。

リボザイム、DNAエンザイムを用いた遺伝子治療

リボザイムが*in vivo*で効果があるかについては、 β_2 ミクログロブリンのリボザイムを過剰発現したトランスジェニックマウスで肺で90%以上の発現を抑制したとの報告¹⁹⁾や、ウシ α ラクトアルブミンとそのリボザイムを過剰発現したダブルトランスジェニックマウスで α ラクトアルブミンの発現を50%抑制したとの報告²⁰⁾がある。細胞外からリボザイムを導入しようとする場合は、上述のように変性されにくく、化学的に修飾したリボザイムを非ウイルスベクターを用いて直接細胞内に導入する方法と、ウイルスベクターなどの発現ベクターを用いて細胞内で発現する方法の二つが考えられている。前者ではカチオニックリボソームがよい導入効率を示し、ガンの血管新生²¹⁾や冠血管狭窄¹³⁾、肝炎ウイルス²²⁾の治療などに研究が進んでいる。発現ベクターを用いる方法では最近UCSFのグループから素晴らしい報告がなされた。彼らは常染色体優性遺伝の網膜色素変性症の原因であるロドプシン遺伝子の点変異を認識して選択的に切断するハンマーヘッド型リボザイムとヘアピン型リボザイムをデザインした²³⁾。それをアデノ随伴ウイルス(AAV)に組み込んで、その変異ロドプシン遺伝子を過剰発現させたトランスジェニックマウスの眼窩後部にAAVを注入し、リボザイムを長期間発現させた。このリボザイムは*in vivo*で変異mRNAを10%程度しか切断しなかったが、視神経細胞の変性を遅らすことに成功した²⁴⁾。この報告で重要な点は、変異特異的なリボザイムが*in vivo*で有効に働いたということだけでなく、gain of functionの遺伝子異常の治療は変異遺伝子の発現

を100%抑制しなくても発現抑制がごく一部でも有効である場合があることが示された点である。さらに彼らは、トランスジェニックマウスの視神経変性が始まってからリボザイムを導入しても治療効果があることを示した²⁵⁾。

DNAエンザイムの*in vitro*でのRNA発現抑制は*c-myc*²⁶⁾、*Huntingtin*²⁷⁾などいくつかの例で示されている。また、通常のハンマーヘッド型リボザイムは切断できなかった慢性骨髄性白血病細胞の異常mRNAをDNAエンザイムで切断できることからその有用性が示された²⁸⁾。さらに、動脈壁の損傷後の平滑筋増殖をEgr-1 mRNAをDNAエンザイムでターゲットすることで*in vivo*でもその有効性が示されている²⁹⁾。

おわりに

変異遺伝子に選択的な遺伝子治療戦略は優性遺伝病の治療を正面から取り組んだ本質的かつ普遍的な戦略である。現在のクリアすべき大きな問題はターゲット配列の拡大、細胞内での切断効率の上昇、神経細胞へのデリバリーの方法であろう。いずれも簡単な問題ではないが、最近5年間のbiotechnologyの想像を超える急速な進歩はそれまで考えることすらできなかったことを次々に可能にしている。この遺伝子治療も決して夢物語りでなく、近い将来に現実に成り得るものと信じていたい。

共同研究者のSalk Institute・松村隆介先生(国立療養所西奈良病院)に深謝する。

文 献

- 1) Feldmann, K.A.: The greening of chimeric oligonucleotides. *Nature Biotech.*, 17: 857-858, 1999.
- 2) Baertlett, R.J., Stockinger, S., Denis, M.M., et al.: *In vivo* targeted repair of a point mutation in the canine dystrophin gene by a chimeric RNA/DNA oligonucleotide. *Nature Biotech.*, 17: 615-622, 2000.
- 3) Kruger, K., Grabowski, A., Zaug, A.J., et al.: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell*, 31: 147-157, 1982.
- 4) Cuerrier-Takada, C., Gaydiner, K., Marsh, T., et al.: The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic

- subunit of the enzyme. *Cell*, 35 : 849-857, 1983.
- 5) Birikh, K.R., Heaton, P.A. & Eckstein, F.: the structure, function and application of the hammerhead ribozyme. *Eur. J. Biochem.*, 245 : 1-16, 1997.
 - 6) Catherine, J.R., Wu, H., Ito, Y., et al.: Design and preparation of a multimeric self-cleaving hammerhead ribozyme. *BioTechniques*, 22 : 338-345, 1997.
 - 7) Phylactou, L.A., Darrah, C. & Wood, M.J.: Ribozyme-mediated trans-splicing of a trinucleotide repeat. *Nature Genetics*, 18 : 378-81, 1998.
 - 8) Perriman, R., Breunin, G., Dennis, E.S., et al.: Effective ribozyme delivery in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92 : 6175-6179, 1995.
 - 9) Shimoyama, T., Nishikawa, S. & Taira, K.: Generality of the NUX rule - kinetic analysis of the results of systemic mutations in the trinucleotide at the cleavage site of hammerhead ribozymes. *Biochemistry*, 34 : 3649-3654, 1995.
 - 10) Vaish, N.K., Heaton, P.A., Fedorova, O., et al.: In vitro selection of a purine nucleotide-specific hammerhead-like ribozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95 : 2158-2162, 1998.
 - 11) Kore, A.R., Vaish, N.K., Kutzke, U., et al.: Sequence specificity of the hammerhead ribozyme revisited ; the NHH rule. *Nucleic. Acid. Res.*, 26 : 4116-4120, 1998.
 - 12) Kuwabara, T., Warashina, M., Tanabe, T., et al.: A novel allosterically trans-activated ribozyme, the maxizyme, with exceptional specificity in vitro and in vivo. *Mol. Cell.*, 2 : 617-627, 1998.
 - 13) Frimerman, A., Welch, P.J., Jin, X., Eigler, N., Yei, S., et al.: Chimeric DNA-RNA hammerhead ribozyme to proliferating cell nuclear antigen reduces stent-induced stenosis in a porcine coronary model. *Circulation*, 99 : 697-703, 1999.
 - 14) Nassim, U. & Blatt, L.M.: Nuclease-resistant synthetic ribozymes ; developing a new class therapeutics. *J. Clin. Invest.*, 10 : 1197-1202, 2000.
 - 15) Santoro, S.W. & Joyce, G.F.: A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94 : 4262-4266, 1997.
 - 16) Santoro, S.W. & Joyce, G.F.: Mechanism and utility of an RNA-cleaving DNA enzyme. *Biochemistry*, 37 : 13330-13342, 1998.
 - 17) Breaker, R.R.: Catalytic DNA : in training and seeking employment. *Nature Biotech.*, 17 : 422-423, 1999.
 - 18) Yokota, T., Tasinato, A., Matsumura, R., et al.: Ribozyme-based inhibition of superoxide dismutase expression ; potential use in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* (revised).
 - 19) Larsson, S., Hotchkiss, G., Andang, M., et al.: Reduced β 2-microglobulin mRNA levels in transgenic mice expressing a designed hammerhead ribozyme. *Nucleic. Acid. Res.*, 22 : 2242-2248, 1994.
 - 20) L'Huillier, P.J.S., Stinnakre, M.-G., Lepourry, L., et al.: Efficient and specific ribozyme-mediated reduction in a bovine α -lactalbumin expression in double transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 : 6698-6703, 1996.
 - 21) Pavco, P.A., Bouhana, K.S., Gallegos, A.M., et al.: Antitumor and antimetastatic activity of ribozymes targeting the messenger RNA of vascular endothelial growth factor receptors. *Clin. Cancer Res.*, 6 : 2094-2103, 2000.
 - 22) Macejak, D.G., Jensen, K.L., Jamison, S.L., et al.: Inhibition of hepatitis C virus (HCV)-RNA-dependent translation and replication of a chimeric HCV poliovirus using synthetic stabilized ribozymes. *Hepatology*, 31 : 769-776, 2000.
 - 23) Drenser, K.A., Timmers, A.M., Hauswirth, W.W., et al.: Ribozyme-targeted destruction of RNA associated with autosomal-dominant retinitis pigmentosa. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 39 : 681-689, 1998.
 - 24) Lewin, A.S., Drenser, K.A., Hauswirth, W.W., et al.: Ribozyme rescue of photoreceptor cells in a transgenic rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nature Med.*, 4 : 967-971, 1998.
 - 25) LaVail, M.M., Ysumura, D., Mattes, M.T., et al.: Ribozyme rescue of photoreceptor cells in P23H transgenic rats : long-term survival and late-stage therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97 : 11488-11493, 2000.
 - 26) Sun, L.-Q., Cairns, M.J., Gerlach, W.L., et al.: Suppression of smooth muscle cell proliferation by a c-myc RNA-cleaving deoxyribozyme. *J. Biol. Chem.*, 274 : 17236-17241, 1999.
 - 27) Yen, L., Strittmatter, S.M. & Kalb, R.G.: Sequence-specific cleavage of Huntingtin mRNA by catalytic DNA. *Ann. Neurol.*, 46 : 366-373, 1999.
 - 28) Kuwabara, T., Warashina, M., Tanabe, T., et al.: Comparison of the specificities and catalytic activities of hammerhead ribozymes and DNA enzymes with respect to the cleavage of BCR-ABL chimeric L6 (b2a2) mRNA. *Nucleic. Acids. Res.*, 25 : 3074-3081, 1997.
 - 29) Santiago, F.S., Lowe, H.C., Kavurma, M.M., et al.: New DNA enzyme targeting Egr-1 mRNA inhibits vascular smooth muscle proliferation and regrowth after injury. *Nature Med.*, 5 : 1264-1269, 1999.

RNAiによる神経変性疾患の 遺伝子治療をめざして

横田 隆徳

東京医科歯科大学大学院脳神経機能病態(神経内科)

遺伝子の強力な発現抑制法であるRNAiが開発され、アルツハイマー病をはじめとする難病の多い神経変性疾患の遺伝子治療にその応用が期待されている。特に遺伝性神経変性疾患において、変異遺伝子の発現抑制は本質的な遺伝子治療になりうる。しかし、まだその実現の展望は必ずしも開けてはいない。その最大の問題は神経細胞へのRNAiのデリバリーで、いかに広い範囲の神経細胞にRNAiを導入するか、脳血管関門をいかに越えるかといった問題が立ちだかっている。ここでは、その前段階として、神経変性疾患の遺伝子治療について、特に点変異のターゲットの遺伝子に対するRNAiの有用性について、リボザイムやDNAエンザイムとの比較を含め、われわれのデータを中心に概説する。



アルツハイマー病, パーキンソン病, ポリグルタミン病,
gain of function, リボザイム。

I. 遺伝性神経変性疾患のRNAi を用いた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の本来の機能が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

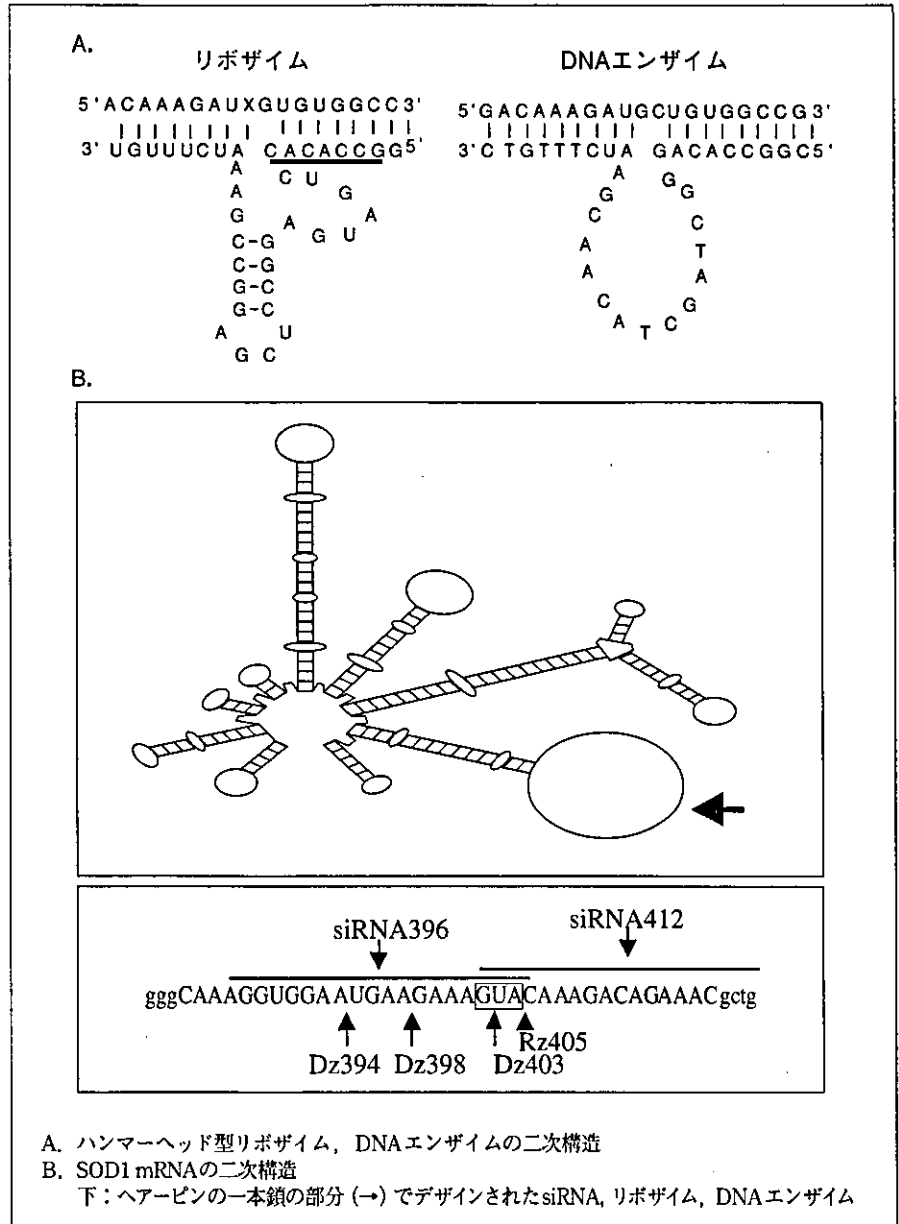
Takanori Yokota

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

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

: Gene therapy of neurodegenerative diseases by
RNAi

図1 リボザイム、DNAエンザイムの二次構造



あるタンパク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量の正常なタンパクは発現しているため, 本来のタンパク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.

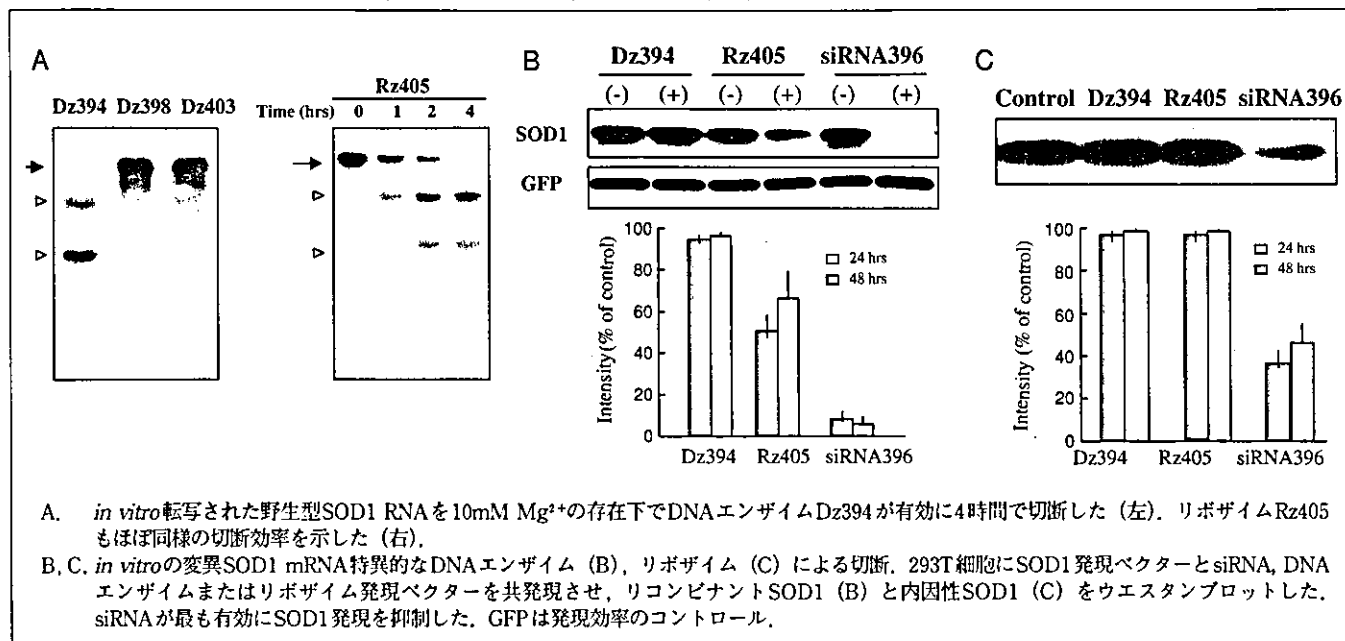
gain of toxic function が強く想定されている疾患の1つとして Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) 遺伝子変異による筋萎縮性側索硬化症 (ALS) が知られている. 常染色体優性遺伝形式をとる家族性ALSの一部の原因遺伝子がSOD1であることが判明した当初は, SOD1が代表的なradical scavengerの1つであることから, SOD1酵素活性低下 (loss of function) がALS発症機序と疑われたが, ①SOD1をノックアウトしても前角細胞障害が起こらず, ②患者遺伝子変異のほとんどが1塩基置換により1つのアミノ酸の置換が生じる missense 変異で, null 変異が見つからない, ③患者の赤血球中SOD1活性低下の程度と症状の重症度が相関しない, ④変異SOD1を過剰発現したトランスジェニックマウスのSOD1活性自体は正常以上にある (G93Aなど) にも関わらず運動神経が細胞変性を示すなどの根拠により, 現在は変異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. また, APP, PS1 遺伝子変異によるアルツハイマー病, 各種ポリグルタミン病, alpha-synuclein 変異によるパーキンソン病などの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 の内容については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, 変異したタンパクの発現を抑制する方法があれば, その機序の如何に関わらず発症・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

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



アリの発現のみを抑制することが望ましい。なぜなら、例えばSCA6の原因遺伝子であるカルシウム1Aチャンネルの場合、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。

II. 変異遺伝子の選択的発現抑制の方法として、RNAiとリボザイムとカタリチックDNAの遺伝子の発現抑制効率の比較

変異遺伝子の発現を抑制させる方法としては、①DNA、②RNAのレベルでの操作が可能である。

DNAのレベルで変異遺伝子を正常なものと置換する方法としてchimeric RNA/DNAオリゴヌクレオチドが知られているが、その組換え効率には限界があり、loss of functionによる疾患をターゲットに欠乏したタンパクを部分的に発現させるのが妥当と考えられる。

RNAのレベルで遺伝子の発現を抑制

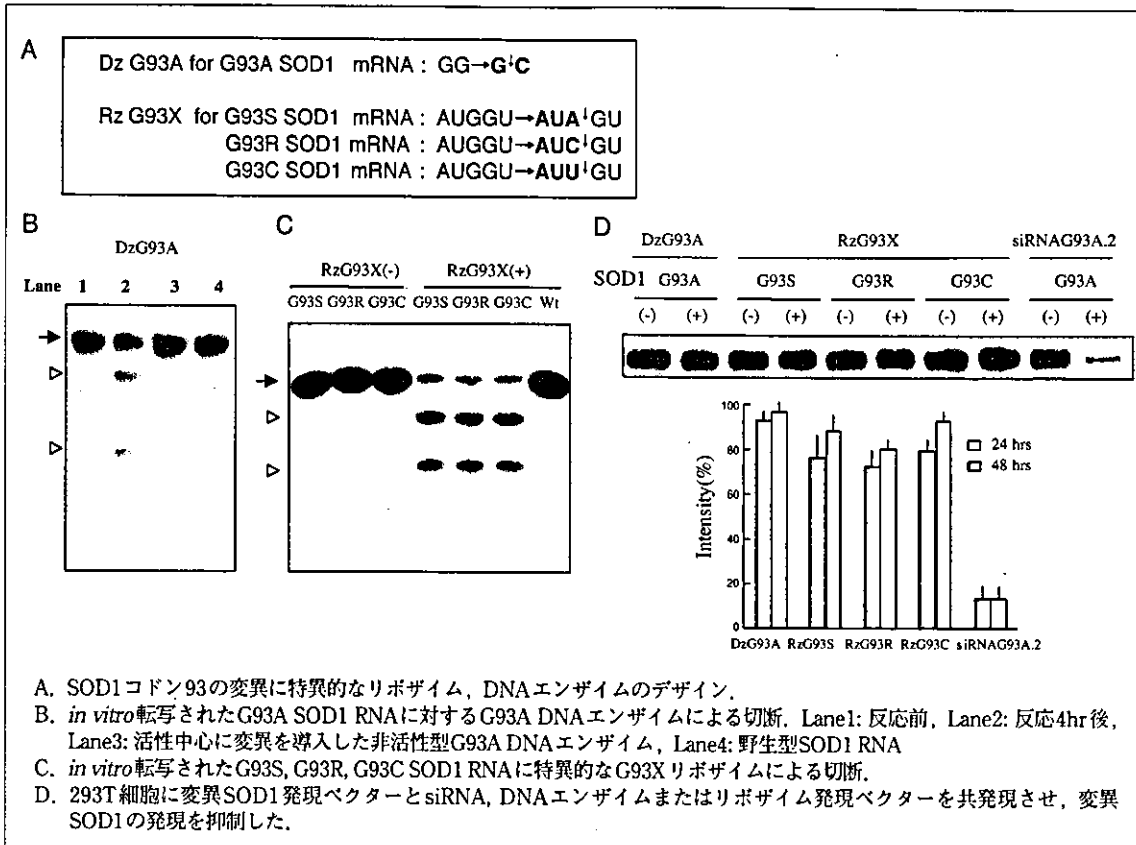
させる方法としては、アンチセンスDNA/RNAが繁用され、その効果が実証されている。しかし、アンチセンスはターゲットのRNAに多少の塩基の違いがあってもハイブリダイズしてしまうため、変異アリルだけでなく正常アリルにもハイブリダイズし双方の発現を抑制してしまう。特に神経変性疾患に多い点変異ではアンチセンスによる野生型と変異体の区別は難しい。他にRNAレベルで変異部位を認識し選択的に切断して、その発現を抑制することのできるものとしてリボザイムとDNAエンザイムの機能性核酸が知られ、近年これにRNAiが加わった。ここで、リボザイム、DNAエンザイム、RNAiの優性遺伝性神経変性の遺伝子治療の方法としての利点や欠点について比較検討する。

RNAiとは、二本鎖RNAによって線虫などに誘導される配列特異的なmRNAの切断分解のことで、近年、合成した21~22塩基の二本鎖RNAであるsiRNA

(small interference RNA)が哺乳動物細胞においても遺伝子の発現を強力に抑制することが発見された。RNAiのメカニズムなどの詳細は本特集の他稿を参照されたい。

リボザイムとは、一本鎖RNAの中で切断、ライゲーション、スプライシングなどの酵素活性を持つ機能RNA分子のことで、特にハンマーヘッド型リボザイムはその大きさが30~40塩基と小型であるため遺伝子操作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¹⁾。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、活性中心、ループ(stem loop II)からなっている(図1A左)。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。

図3 SOD1 コドン93の変異に特異的なリボザイム、DNAエンザイム



DNAエンザイム (DNA enzyme) はカタリチックDNA (catalytic DNA) とも呼ばれ, 約30塩基の一本鎖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。カタリチックDNAは活性中心の構造の違いにより8-17 (type 1) と10-23 (type 2) がある (図1A右)。8-17 typeは基質RNAのアデニン (A) とグアニン (G) の間のリン酸ジエステル結合を切断する。一方, 10-23typeは基質RNAのプリン (A, G) とピリミジン (U, C) の間を切断できる³⁾。

細胞内でのRNAi, リボザイム, DNAエンザイムの発現抑制の効率をSOD1

mRNAを基質として比較した。リボザイムとDNAエンザイムの切断効率は基質RNAの二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一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1B)。*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 (図2A), 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2B), 内因性SOD (図2C) とともに, siRNAのほうがリボザイムや

ロゲン受容体の発現の区別はできていない。

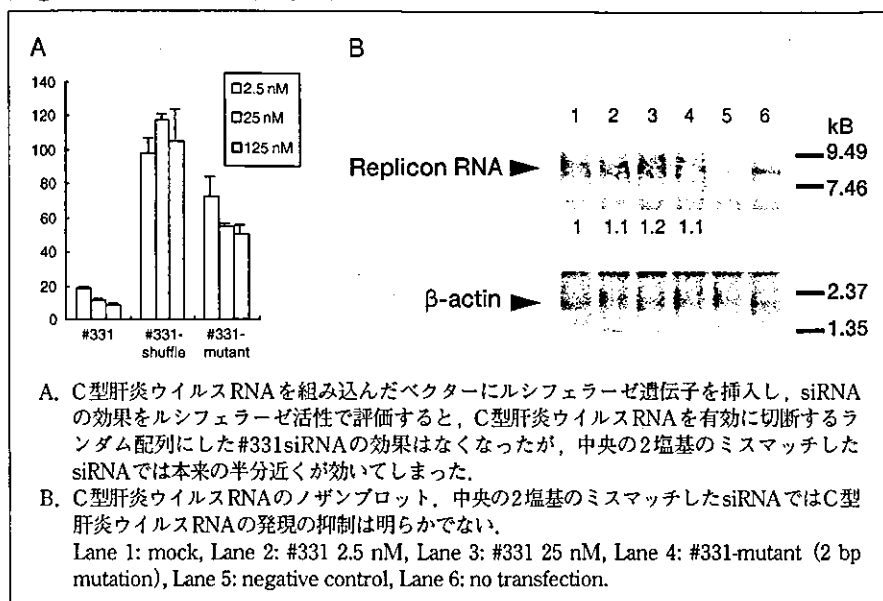
III. 変異遺伝子に対するRNAiとリボザイムとDNAエンザイムの選択性の比較

リボザイムとDNAエンザイムは, 野生型と変異型の配列の差がリボザイムとDNAエンザイムの切断部位の法則に合っていれば, 区別して切断できる。例えば, 家族性ALSで報告されている84種類を超えるSOD1の異なる点変異のなかで, 塩基配列上は変異特異的な切断は, DNAエンザイムでは19種類, リボザイムでは14種類の変異RNA特異的な作用が期待できる。その場合, リボザイムとDNAエンザイムは, 配列の違いが1塩

DNAエンザイムよりはるかに効率よく抑制することが可能であった。

最近, 球脊髄筋萎縮症の原因遺伝子である伸張したCAGリピートを含むアンドロゲン受容体の発現をsiRNAを用いて抑制して, 培養細胞系で細胞毒性を抑えたとの報告がされたり, しかし, これは野生型のアンド

図4 ミスマッチ siRNA の抑制効果



基だけでも完全に野生型と変異型を区別して切断できる。例えば、家族性ALSでトランスジェニックマウスの確立している変異であるG93A変異の場合では、DNAエンザイムはG93Aの変異部位がGGでプリン-プリンとなり切断しないが、野生型はGCでプリン-ピリミジンとなり切断が可能となる(図3A)。リボザイムではコドン93の部位が野生型はAUGでNUXの法則に従わず切断しないが、G93S(AUA)、G93R(AUC)、G93C(AUU)変異ではNUXの法則に従うため切断可能な配列となる(図3A)。事実、*in vitro*転写の切断実験で、G93A DNAエンザイムはG93ASOD1 mRNAのみを選択的に切断して、野生型SOD1は切断しない(図3B)。また、G93XリボザイムはG93S(AUA)、G93R(AUC)、G93C(AUU)変異は切断するが、野生型は全く切断しない(図3C)。

一方、siRNAの点変異を配列特異的に完全に区別することは簡単ではない。

siRNAと基質RNAとの4~7塩基の大幅なミスマッチがあった場合、siRNAの切断活性は完全に効力がなくなるが^{9)~8)}、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い。さらにsiRNA配列上でのミスマッチの位置の効果であるが、当初は5'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いう報告があったが^{9) 10)}、中央の1~2塩基のミスマッチではさほどの失活化にはならない場合がある¹¹⁾。われわれの経験でも¹²⁾中央の2塩基のミスマッチしたsiRNAでは本来の半分近くが効いてしまった(図4A)。このとき、基質のRNA量に明らかな減少がないことや(図4B)、ミスマッチsiRNAの抑制効果は通常のsiRNAの基質切断効果とは異なることから、最近ではミスマッチsiRNAの抑制効果には翻訳抑制のmicro RNA(miRNA)効果がある可能性が示唆されている¹³⁾。また、最近、有効なミスマッチの位置について3'寄りのほうがより失活効果が強いという報告があり¹⁴⁾、われわれも同様の

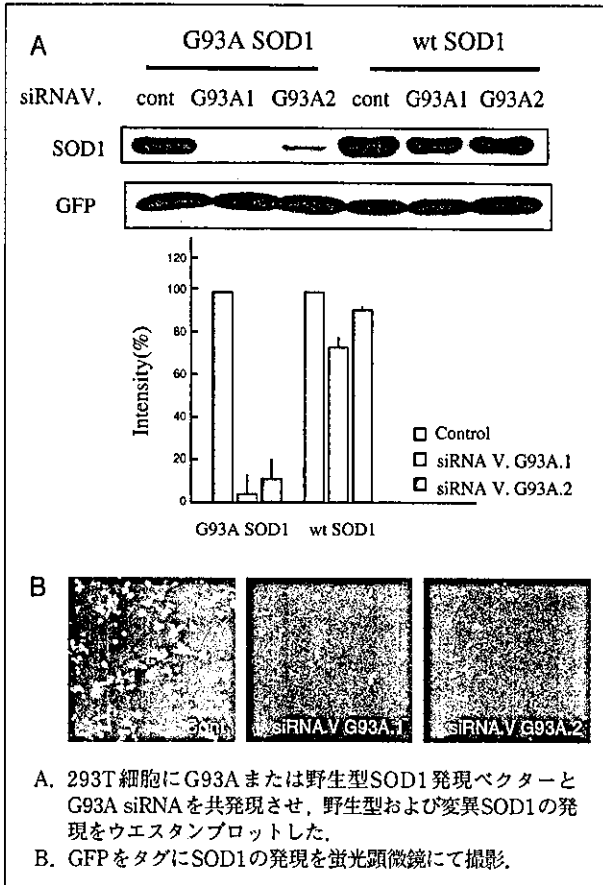
場合があることを経験している。さらに、センス鎖とアンチセンス鎖の別の位置にミスマッチを入れることにより強い失活効果があるとの報告もある^{14) 15)}。

われわれも、比較的G93A SOD1 RNAに特異的に作用して野生型SODの発現にはあまり影響しないsiRNAをデザインした(図5A)。これらの同じコドン93でデザインし*in vitro*転写で有効なDNAエンザイムやリボザイムと細胞内でその発現効果を比較すると、図3Dに示すようにsiRNAのみが有効にG93C SOD1 mRNAの発現を抑制した。現在のところ、われわれの印象では、ターゲットのRNAの1塩基の違いを10nM程度の濃度のsiRNAで工夫により区別が可能と考えているが、これが*in vivo*で有意な濃度か否かの結論は出ていない。

IV. 孤発性神経変性疾患のRNAiを用いた遺伝子治療

一方、多くのアルツハイマー病、パーキンソン病、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わかれば、その発現を抑制することで治療が可能かもしれない。近年、アルツハイマー病のモデル動物である変異APPトランスジェニックマウスを用いて、変異APPから異常亢進したプロセッシングにより生成されるあるAβペプチドに対して、その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認知障害も軽減しえたとの報告がある。最近の欧米で進められている臨床試験の結果

図6 変異SOD1に特異的に作用するsiRNA



も良さそうである。これはアルツハイマー病の発症機序に従来からいわれてきたA β 仮説を大きく支持するもので、A β の産生を抑制することが治療のターゲットとなる。A β はアミロイド前駆タンパクから病的に 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いわれるBACE1のノックアウトマウスは特別な異常を示さず、また、孤発性アルツハイマー病ではBACE1の発現と酵素活性の亢進が示されてお

り、APP以外のBACE1の基質の存在の可能性はまだあるものの、BACE1は孤発性アルツハイマー病の治療のよいターゲット分子と考えられている¹⁶⁾。われわれもBACE1に対するsiRNAを作製して、培養細胞系でA β 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を持続的に導入できることが可能となれば、臨床応用できるようになるかもしれない。

□おわりに

現在のクリアすべき最も大きな問題は神経細胞へのデリバリー方法である。*in vivo*の細胞へのsiRNAの導入は、アデノウイルス¹⁷⁾やレンチウイルス¹⁸⁾をベクターとして用いることで可能となり、中枢神経系への導入の有効性も最近報告された¹⁷⁾。また、siRNAオリゴヌクレオチドやベクタープラスミドの脳組織への直接のインジェクションでもある程度は神経細胞に導入される可能性もありそうである¹⁹⁾。しかし、siRNAの神経変性疾患へのアプローチには、広範囲で持続的なsiRNAの導入が必要であり、簡単な問題ではな

い。しかし、siRNAによる変異遺伝子に選択的な遺伝子治療戦略は多くの常染色体優性遺伝病の治療を正面から取り組んだ本質的なもので、最近のバイオテクノロジーの想像を越える急速な進歩によりsiRNAの応用が近い将来に現実になりうるものと期待したい。

参考文献

- 1) Birikh KR, Heaton PA, et al: Eur J Biochem 245, 1-16, 1997.
- 2) Shimoyama T, Nishikawa S, et al: Biochemistry 34, 3649-3654, 1995.
- 3) Santoro SW, Joyce GF: Proc Natl Acad Sci USA 94, 4262-4266, 1997.
- 4) Caplen NJ, Taylor JP, et al: Hum Mol Genet 11, 175-184, 2002.
- 5) Jacque J-M, Triques K, et al: Nature 418, 435-438, 2002.
- 6) Gitlin L, Karelisky S, et al: Nature 418, 430-434, 2002.
- 7) Klahre U, Crete P, et al: Proc Natl Acad Sci USA 99, 11981-11986, 2002.
- 8) Garrus JE, von Schwedler UK, et al: Cell 10, 55-65, 2001.
- 9) Elbashir SM, Martinez J, et al: EMBO J 20, 6877-6888, 2001.
- 10) Brummelkamp, TR, Bernards R, et al: Science 296, 550-553, 2002.
- 11) Holen T, Amarzguoui M, et al: Nucleic Acids Res 30, 1757-1766, 2002.
- 12) Yokota T, Sakamoto N, et al: EMBO Rep 4, 602-608, 2003.
- 13) Doench JG, Petersen CP, et al: Genes Dev 17, 438-442, 2003.
- 14) Kisielow M, Kleiner S, et al: Biochem J 363, 1-5, 2002.
- 15) Amarzguoui M, Holen T, et al: Nucleic Acids Res 31, 589-595, 2003.
- 16) Citron M: J Neurisci Res 70, 373-379, 2002.
- 17) Xia H, Mao Q, et al: Nat Biotechnol 20, 1006-1010, 2002.
- 18) Qin XF, An DS, et al: Proc Natl Acad Sci USA 100, 183-188, 2003.
- 19) Makimura H, Mizuno TM, et al: BMC Neurosci 3, 18-23, 2002.

RNAi を用いた C 型肝炎の遺伝子治療

横田隆徳, 水澤英洋

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科脳神経機能病態 (神経内科)

C 型肝炎は日本全国で 200 万人が罹患しており, インターフェロンによる治療の有効性は不十分で新たな治療法が必要である. 近年, ターゲット遺伝子の発現を配列特異的に抑制できる siRNA を, 抗ウイルス剤として応用する研究が急速に進んでいる. 5'-UTR IRES や非構造タンパク質領域をターゲットにデザインされた siRNA は高率に HCV RNA 配列を切断して, HCV レプリコンレベルでは HCV ゲノムの増殖を抑制する. その有効性は従来の核酸試薬であるアンチセンスオリゴヌクレオチドをはるかにしのぐ. さらに, これをウイルスベクターに導入することにより臨床応用への可能性が追究されている.

Key words hepatitis C, HCV, siRNA, IRES, adenovirus vector

肝細胞癌による死者は年間 3 万人を超え, この死亡者数は癌のなかで男性では第 3 位, 女性では第 4 位を占め, 年々増加傾向にある. その最大の原因は C 型肝炎ウイルス (HCV) 抗体陽性である. C 型肝炎は日本全国で 200 万人が罹患しており, 年間で約 30 万人がインターフェロン (IFN) による治療を受けているがその効果は遺伝子型により異なり, 20 万人は治癒しない. しかも IFN 治療は発熱, 頭痛の副作用は必発で, 重篤な精神症状, 甲状腺異常などの副作用もあり, 6 か月に及ぶ IFN 治療の身体的, 経済的負担は大きい. 近年開発されたタマリバピリンの併用療法や, 新しいウイルスタンパク質合成阻害薬も大幅な治療効果の改善には至っていない.

RNA レベルで配列特異的にその発現を抑制する

ことのできる short interfering RNA (siRNA) は, 本来細胞のもつウイルスに対する防御機構とも考えられ, ウイルスゲノムは siRNA のよいターゲットとされ¹⁾, 新しい治療薬になる可能性が期待されている. ここでは筆者らのデータを中心に, C 型肝炎に対する siRNA 治療戦略の現状と展望を概説したい.

○ C 型肝炎ウイルス (HCV)

HCV 遺伝子は 9,600 塩基から成るプラス一本鎖 RNA で, 5' と 3' 非翻訳領域 (UTR) には含まれた ORF (open reading frame) から成る. 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. 3'-UTR には

Gene therapy of hepatitis C virus with RNAi

Takanori Yokota Hidehiro Mizusawa

よこた・たかのり 1990 年東京医科歯科大学大学院修了 (医学博士). 98 年米国バーナム研究所, 99 年米国バック神経変性疾患研究所留学を経て, 2000 年より現所属. 専門は分子生物学と遺伝子治療学. 現在の主な研究テーマはアルツハイマー病など神経疾患の病態解明と遺伝子治療. 学問のための研究ではなく, 実際に疾患を分子レベルで治療するつもりで研究を進めたい.

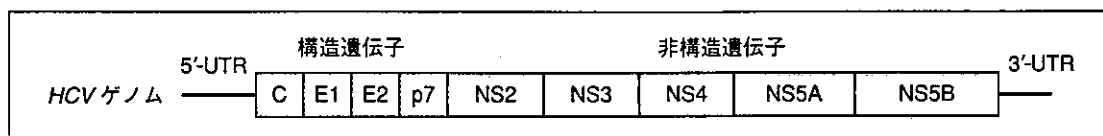


図1 HCVの遺伝子構造

表1 HCVに対するsiRNAの報告

報告者	標的	siRNA	抑制効果(倍)
Seo MY et al ³⁾	5'-UTR	合成 siRNA	6.7
Randal G et al ⁴⁾	NS3, NS5B	合成 siRNA	8.8
Kapadia SB et al ⁵⁾	NA4B	合成 siRNA	50
Wilson JA et al ⁶⁾	NS3, NS5B	合成 siRNA	10.4
		発現 DNA ベクター	4
Yokota T et al ⁷⁾	5'-UTR	合成 siRNA	33.3
		発現 DNA ベクター	5.3
		アデノウイルスベクター	>1,000

poly(U)配列と98塩基から成る3'X領域が存在している。ORFは5'側からC, E1, E2, p7の構造タンパク質, NS2, NS3, NS4, NS5A, NS5Bの非構造タンパク質を含む3,010のアミノ酸から成る1本の大きなポリプロテインをコードしている(図1)。

HCVは一本鎖RNAウイルスであるがゆえ、プルーフリーディング機能がなく、ウイルス複製時に特にORF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)。HCV遺伝子が同定されて以来、さまざまな遺伝子型が報告されてきたが、現在では分子進化学的に遺伝的に距離をもつ6つの遺伝子型に分類・整理されている。また、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 と呼ばれている²⁾。

○siRNA ターゲットサイトの選択

2003年にHCVレプリコンを用いたHCVに有効なsiRNAが相次いで報告された(表1)^{3~7)}。quasi-species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、特にその変異部位が19塩基のうち5'側から9~13塩基目付近であると、たとえ1塩基のミスマッチでも大きく切断効率を下げる場合のあることが知られている^{8,9)}。

そこで筆者らは、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 IRES¹⁰⁾にsiRNAのターゲットを絞ってデザインした(図2)。まず、5'-UTR IRESのRNAの二次構造¹¹⁾から一本鎖のループの部分を選び、(AA/CA/GA)_{N19}の配列で、後のU6プロモーターを用いたベクター化のためにN₁₉がGに始まりCに終わるなど¹²⁾、いくつかの有効なsiRNA選択の配列のルールからターゲットの部位を選んだ。

○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、感染培養細胞モデルがないことがHCV研究の大きな妨げとなっていたが、1999年にBartenschlager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¹³⁾。これはHCVゲノムの構造タンパク質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、レポーター遺伝子として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した安定発現細胞系である(図3)。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。

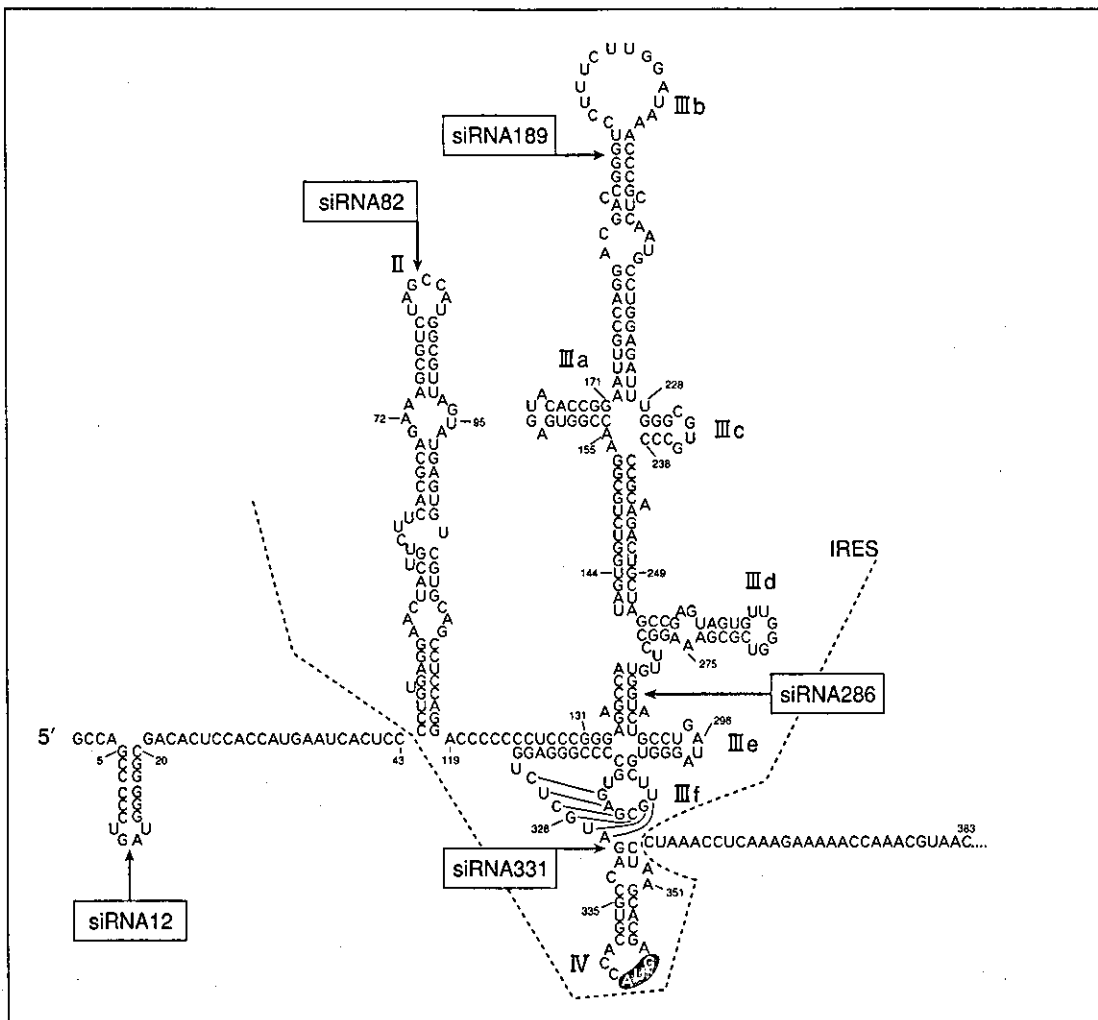


図2 HCV 5'-UTR IRES の RNA の二次構造と siRNA のターゲット部位
 (二次構造: Brown EA, et al: *Nucleic Acids Res* 20, 5041-5, 1992¹¹⁾ より)

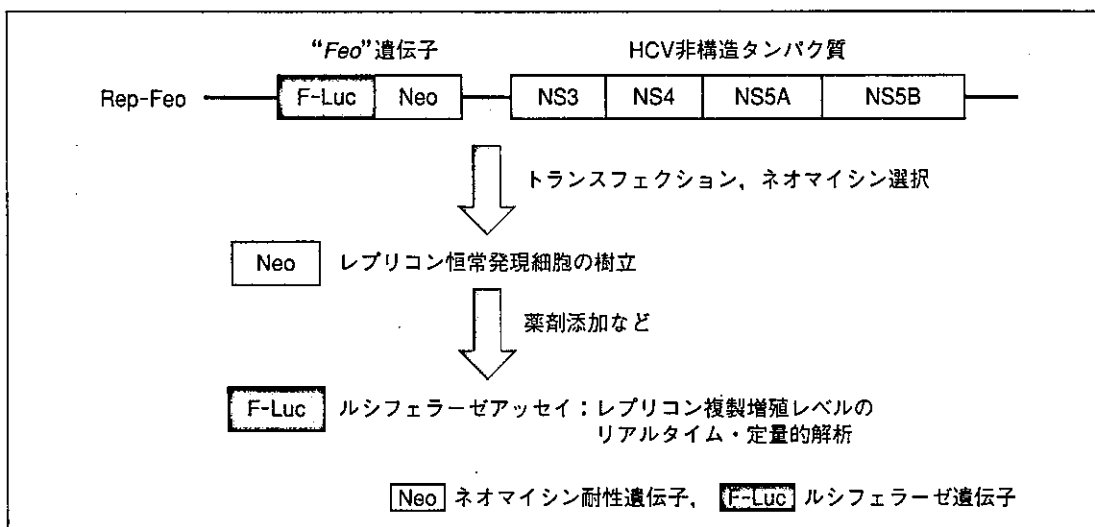


図3 HCV レプリコン (Rep-Feo) の構造

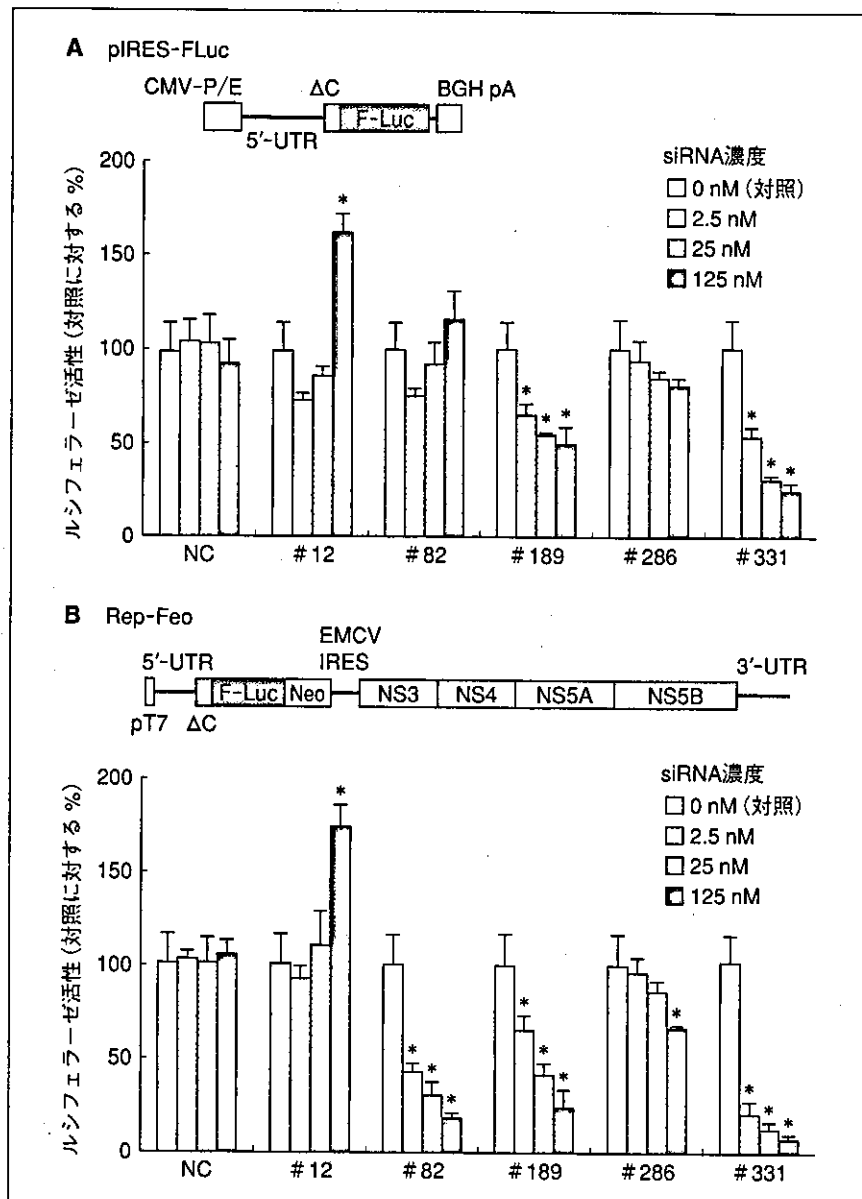


図4 合成 siRNA の 5'-IRES ベクター (pIRES-FLuc) (A) と HCV レプリコン (Rep-Feo) (B) におけるルシフェラーゼ活性抑制効果
*: $p < 0.05$, NC: ネガティブコントロール (Yokota T. et al: *EMBO Rep* 4, 602-8, 2003⁷⁾ より)

○HCV に対する siRNA の効果

図4に筆者らが5'-UTR IRES に対してデザインした siRNA の効果を示す。5'-IRES ベクター (pIRES-FLuc) においても HCV レプリコン (Rep-Feo) においても siRNA331 が最も有効に HCV RNA の増殖発現を抑制した。HCV レプリコンにおいて、対照に比較して 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。この結果は HCV レプリコン RNA のノーザンブロットや非構造タンパク質のウェスタンブロットでも確かめら

れた (図5)。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 が複製の鋳型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。HCV 5'-UTR を標的としたこの siRNA は、従来の機能性核酸試薬であるアンチセンスオリゴ DNA¹⁴⁾、リボザイム¹⁵⁾ の効果と比較しても圧倒的に低濃度でより高い抑制活性を示した (図6)。

一方、siRNA12 では意外な結果が得られた。

siRNA12を作用させた結果、HCVの翻訳や増殖が逆に増加したのである。従来の欠失変異株の実験か

ら5'-UTR IRESのヘリックス1はIRESの翻訳機能に抑制的に働いているとの報告があり¹⁶⁾、それに合致するものであるが、siRNAを非翻訳領域に働かせると翻訳を促進してしまう場合があることは、遺伝子発現抑制を意図した遺伝子治療をデザインする際に注意すべきことと考えられた。

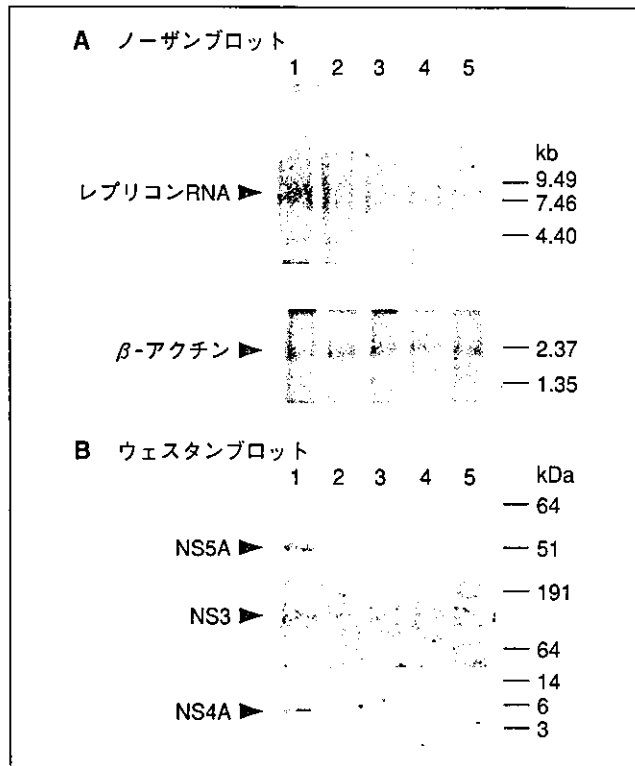


図5 siRNA331によるHCVレプリコンRNA, 非構造タンパク質の発現抑制効果

A: レプリコン配列全長に対するプローブを用いたノーザンブロット。

B: NS5Bに対するプローブや抗体を用いたウェスタンブロット。

1: mock, 2: siRNA331 2.5 nM, 3: siRNA331 25 nM, 4: siRNA331 125 nM, 5: トランスフェクションなし (Yokota T, et al: *EMBO Rep* 4, 602-8, 2003⁷⁾ より)

OHCVに対するsiRNA発現ベクターの効果

siRNAをウイルスベクターで細胞内に発現させるためにはsiRNA発現DNAベクターの作製が必要である。筆者らは、RNAポリメラーゼIII (Pol III) 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¹²⁾とステムループタイプ¹⁷⁾の2つのsiRNA発現ベクター配列を挿入して(図7)その効果を検討した。タンデムタイプでは2つのU6プロモーターからセンス鎖とアンチセンス鎖に相当するRNAが別々に転写され、細胞内でハイブリダイズしてsiRNAを産生する。一方、ステムループタイプでは、センス鎖とアンチセンス鎖がループを介してつながるヘアピンRNAが転写され、細胞質でDicerによってプロセシングされてsiRNAになる。このプロセシングを有効にするため、センス鎖とアンチセンス鎖はsiRNAの19塩基より少し長目で、プロテインキナーゼR (PKR) に認識されない21塩基と27塩基の2種類を作製して効果を比較した。効

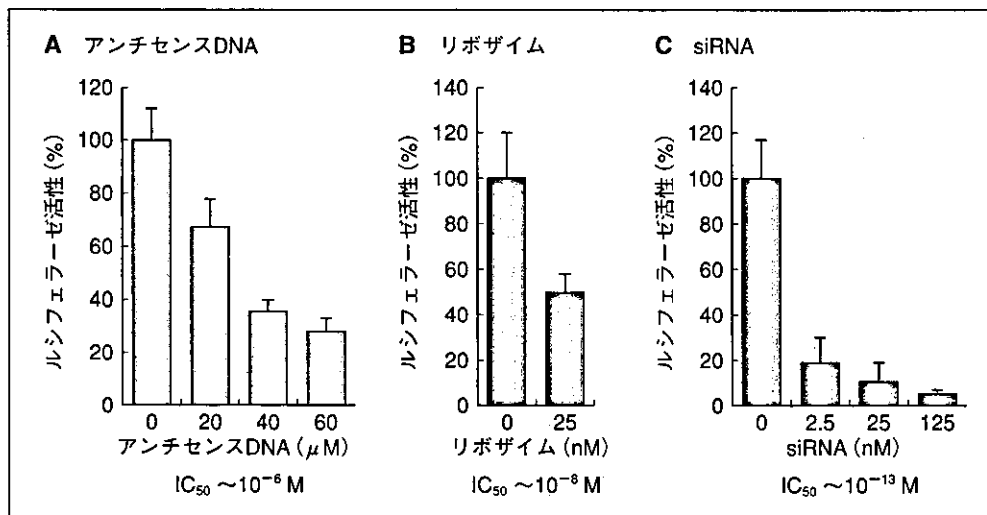


図6 HCV 5'-UTRを標的としたアンチセンスDNA, リボザイム, およびsiRNAの細胞内での効果の比較

(A: Wakita T, et al: *J Biol Chem* 269, 14205-10, 1994¹⁴⁾より; B: Sakamoto N, et al: *J Clin Invest* 98, 2720-8, 1996¹⁵⁾より; C: Yokota T, et al: *EMBO Rep* 4, 602-8, 2003⁷⁾より)