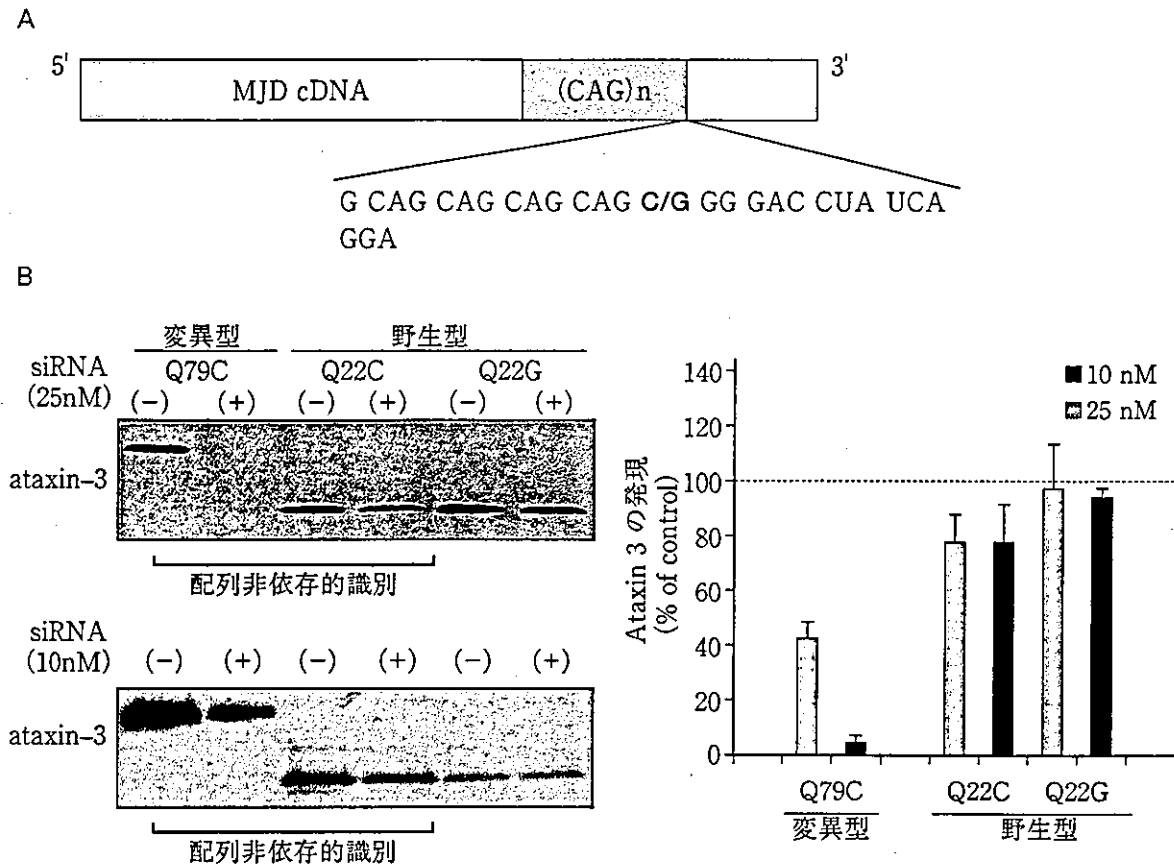


図4 配列非依存的な siRNA の切断活性の変化



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

イルスベ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) Kajiwarra 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' 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

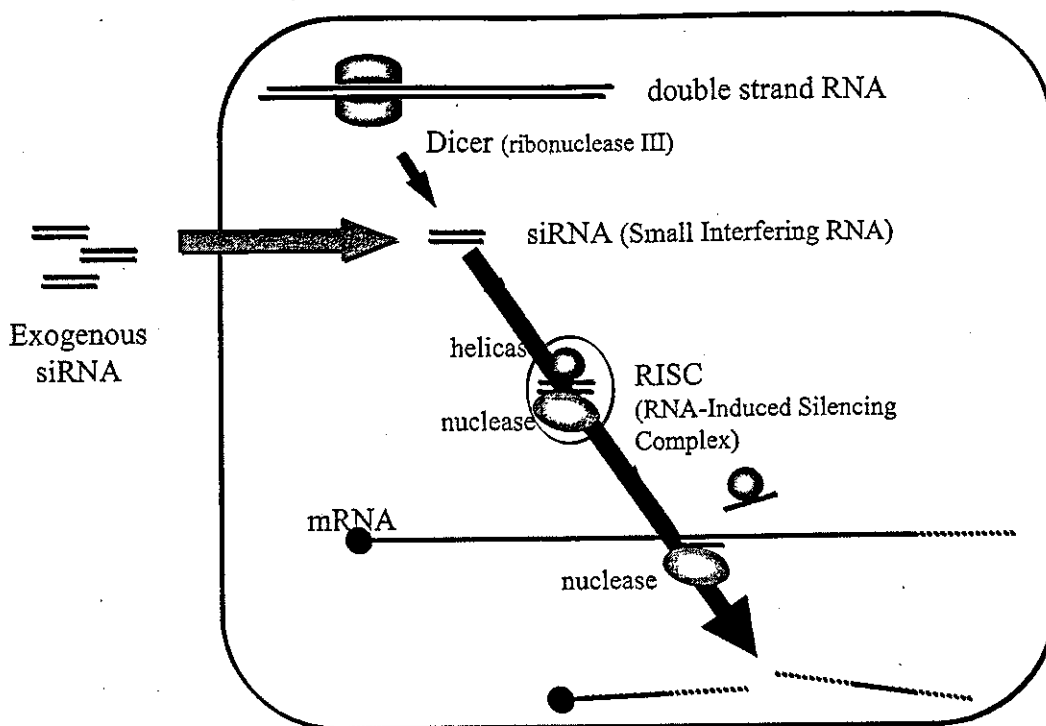


図1 RNAiの機序

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

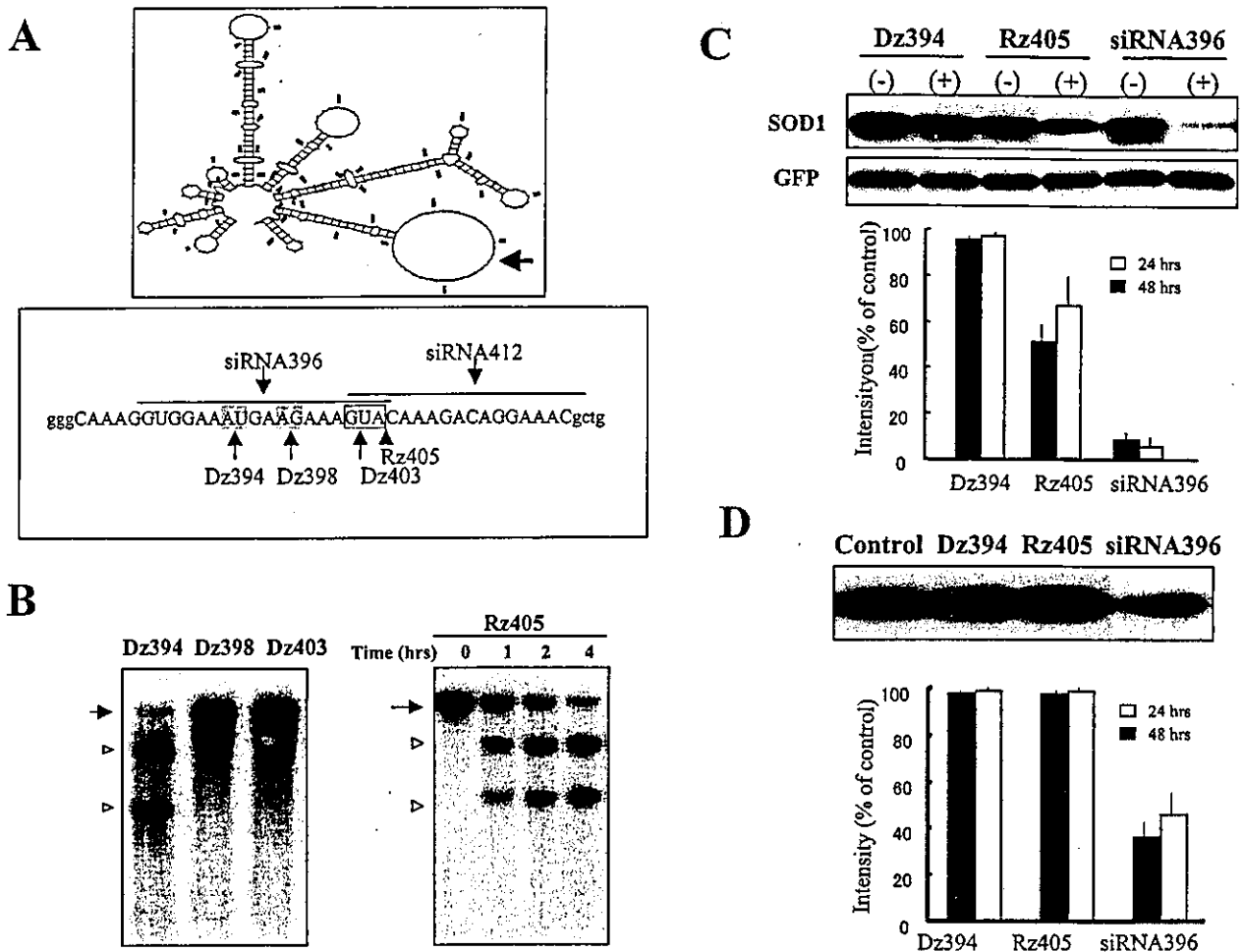


図2 SOD1 RNA に対するリボザイム, DNA エンザイム, RNAi の切断効率の比較

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

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⁶⁾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変異が失活に最も有効とされた⁷⁾。5'側は基質との結合より RISC との関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⁸⁾、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る⁹⁾。現在のところ siRNA の5'端から9~16塩基に1塩基でもミスマッチがある場合は配列特異性がよい(図4)。逆にこのことは、siRNA 配列の9~16塩基部位以外の部位がミスマッチである異なる遺伝子の発現も抑えてしまういわゆる交

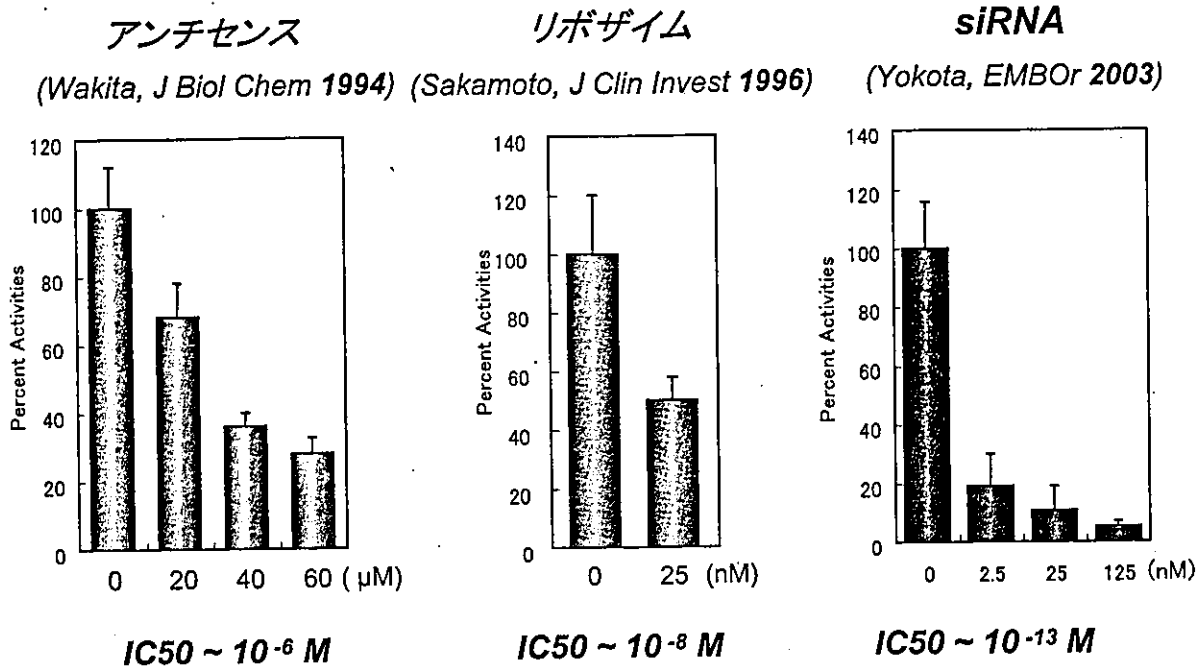
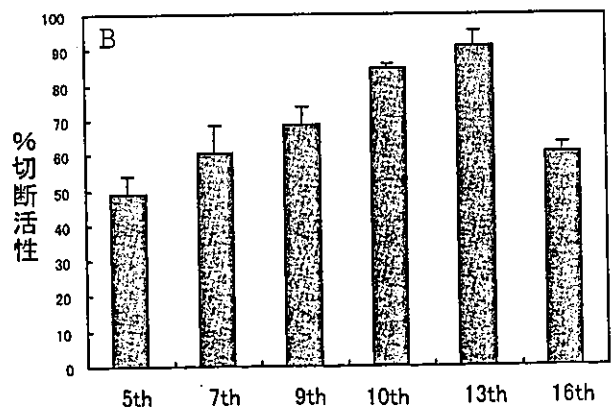


図3 C型肝炎遺伝子5'UTRを標的としたアンチセンスDNA、リボザイム、およびsiRNAの細胞内での効果の比較

A

5th 5- GAUGCUGUGGCCGAUGGUG 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

G93ASOD1に対するsiRNA

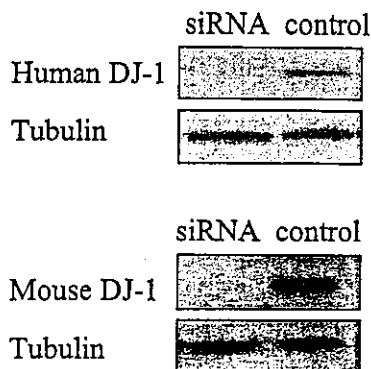


野生型SOD1に対するG93AsiRNAの切断効率

図4 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, 下線で示した)を標的としたG93AsiRNAのデザイン(A)。G93AsiRNA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。

A



B

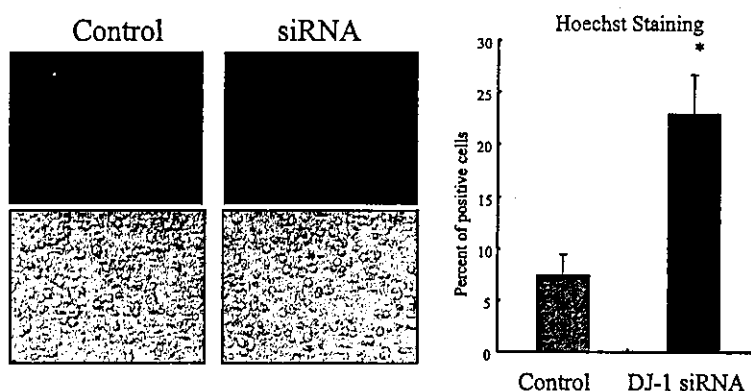


図5 家族性パーキンソン病 (Park7) の原因遺伝子 DJ-1 の siRNA による発現抑制による酸化ストレスによって誘発される神経系培養細胞 (Neuro2a) の細胞死の感受性増加 (文献 16 より転載)

(A) siRNA の発現後 48~72 時間後に内因性 DJ-1 は 90% 以上その発現が抑制された。

(B) 過酸化水素によって誘導された神経系培養細胞 (Neuro2a) の細胞死は内因性 DJ-1 の発現抑制により増強した (ヘキストによる核の濃縮化の像と定量)。

又反応, off-target 効果があることを意味する^{10~12)}。Jackson らの検討では¹⁰⁾, 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。さらに稀ではあるが, アンチセンス配列でもその影響がで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合成と停止と RNA 変性がおこり得るという報告がされ, 結果の解釈には留意する必要がある^{13, 14)}。

しかし上記の点を考慮してもその特異性はアンチセンスなどに比較して優れており, 何よりその高い遺伝子発現抑制効果から分子生物学の手法として神経変性疾患の病態機序の解明にすでに多くの研究で重要な役割を果たしている^{15, 16)} (図 5)。

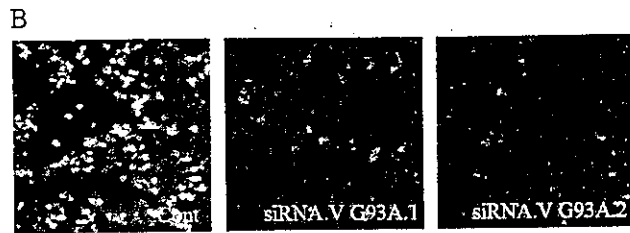
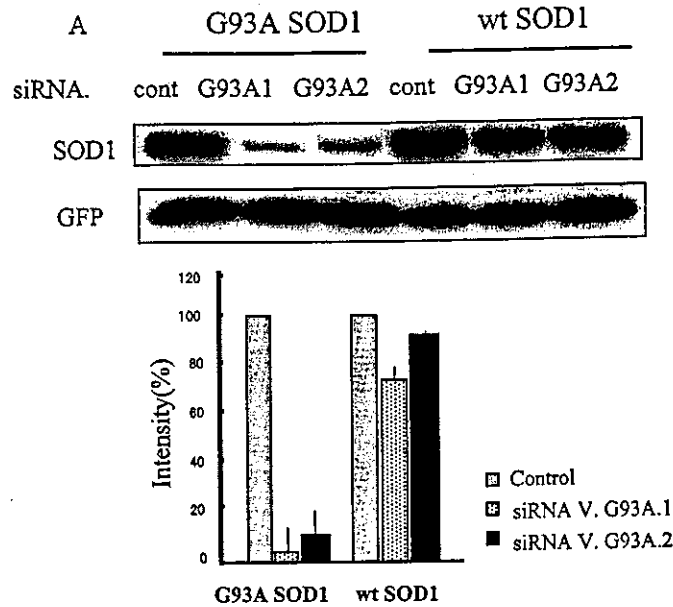


図6 変異 SOD1 に特異的に作用する siRNA (文献 4 より転載)

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 の発現をウェスタンブロットした。siRNA G93A1, 2 を共に 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 10 より転載)

4. 遺伝子治療の核酸医薬としての応用

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は発現しているので、本来のタンパクの機能の影響は少ないか全くなく、変異アレ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。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の発現に影響せず、変異したタンパク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。

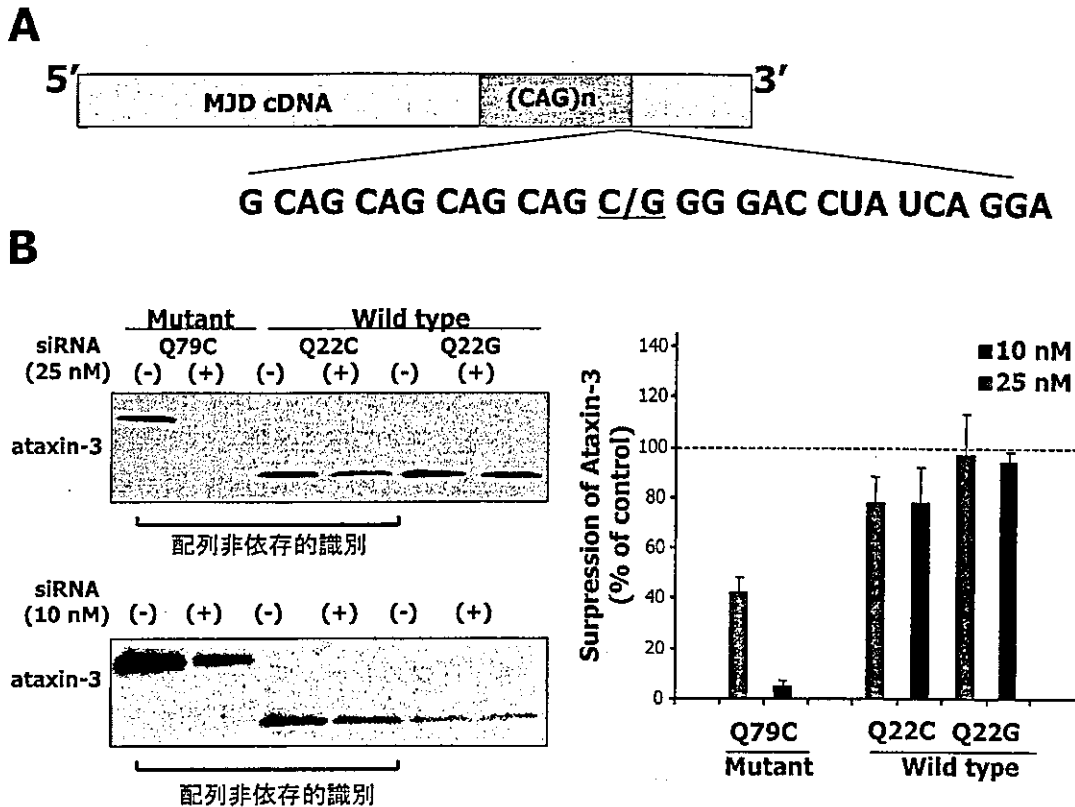


図7. 配列非依存的な siRNA の切断活性の変化

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。筆者らのデザインした 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 結合タンパクの存在がその活性に影響したことが考えられた。

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 の作製が可能である。図 6 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 をもつ RNA 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⁴⁾。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 DYT1¹⁷⁾ や tau 遺伝子の点変異を示す frontotemporal dementia¹⁸⁾ で報告されている。

一方、ポリグルタミン病の様に、繰り返し配列の長さがかか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、これに繰

り返し配列の長さに関連した polymorphism¹⁸⁾ 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標的 RNA の変化を利用した識別方法も検討され始めた¹⁹⁾ (図 7)。

5. siRNA の神経細胞へのデリバリー

神経系培養細胞への siRNA の導入は、通常のリポフェクションでプラスミド DNA 以上の効率でトランスフェクション可能である。1 次培養の細胞でも血管内皮などには同様の効率で導入可能だが²⁰⁾、大脳皮質神経細胞などの 1 次培養の細胞では導入効率は低下して²¹⁾、ウイルスベクターが必要になる場合が多い。

in vivo 組織へのデリバリーとしては、

McCaffrey²²⁾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、このハイドロダイナミクス導入法で導入されたFas²³⁾やcaspase 8²⁴⁾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急性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、siRNAの血液脳血管関門(blood-brain barrier; BBB)の通過と非分裂細胞である神経細胞への導入といった2つの大きな問題がある。核酸試薬やプラスミドベクターの血液脳血管関門の通過は、siRNAにウイルスの誘導配列であるTATをつけるなど模索がされているが、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²⁵⁾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²⁶⁾やレンチウイルス²⁷⁾、レトロウイルス²⁸⁾、アデノ随伴ウイルス²⁹⁾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*の神経細胞へのsiRNA導入の報告が次々とされている。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³⁰⁾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イルスベクターの白血病発症などウイルスベクターの安全面における解決されるべき問題は多い。

6. RNAi 過剰発現によるノックダウンマウスの作成

GFP 過剰発現させたトランスジェニックマウ

スの受精卵にGFP遺伝子に対するsiRNAを過剰発現させて、GFPの発現を減弱させたノックダウンマウスが報告された³¹⁾。しかし、受精卵にトランスジーンプラスミドをマイクロインジェクションする通常のトランスジェニックマウスの作製方法では、内因性の遺伝子の発現抑制はなかなか十分にできないという問題点があった。

この問題に対して、ノックアウトマウスと同様にES細胞を用いて、ES細胞のレベルでターゲット遺伝子の発現を抑制して、数多くのクローンから選択して最も効率の良いものを拾い、これからsiRNAトランスジェニックマウスをつくるという方法が最近発表³²⁾された。この方法は1度に100個以上のクローンを検索することが可能となる。従来のトランスジェニックマウスの作製ではトランスジーンに乗った個体は5~30匹程度しか得られなかったが、多くのクローンを検索することにより、より抑制効率の良いクローンを選択できるといった点で、確実性のある優れた方法となりうる。

Kunathら³³⁾は、目的の遺伝子の発現を抑制したESラインを作成してテトラプロイドとアグレゲーションさせることで遺伝子の発現のまったくないノックアウトマウスが作成できたと報告している。さらに最近、Ishiiら³⁴⁾は、発現した標的遺伝子配列が500塩基の長いヘアピン型2本鎖RNAが核内に留まる工夫をして、核内で多くのsiRNAが産生されて、核外に輸送されてsiRNA効果を発揮するという全く新しいsiRNA発現ベクターを開発し、これによりノックダウンマウスを作成した。この方法は最適なsiRNA配列を選択する必要がないという利点を有する。

7. おわりに

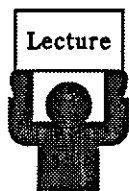
siRNAはその高い効果と汎用性から分子生物学のツールとしてすでに当たり前の方法になりつつある。今後はsiRNAライブラリーの確立とが核酸医薬として*in vivo*へのデリバリー方法が次の課題であろう。siRNA研究は爆発的に進んでおり、非常に近い将来に、神経変性疾患でも新し

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) A. Fire *et al.*, *Nature*, 391, 806-811 (1998)
- 2) S. M. Elbashir *et al.*, *Nature*, 411, 494-498 (2001)
- 3) T. R. Brummelkamp *et al.*, *Science*, 296, 550-553 (2002)
- 4) T. Yokota *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 314, 283-291 (2004)
- 5) T. Yokota *et al.*, *EMBO Rep.*, 4, 602-8 (2003)
- 6) S. M. Elbashir *et al.*, *EMBO J.*, 20, 6877-6888 (2001)
- 7) T. R. Brummelkamp *et al.*, *Science*, 29, 550-553 (2002)
- 8) T. Holen *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 30, 1757-1766 (2002)
- 9) M. Amarzguioui *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 31, 589-595 (2003)
- 10) A. L. Jackson *et al.*, *Nature Biotechnol.*, 21, 635-637 (2003)
- 11) D. Semizarov *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 100, 6347-6352 (2003)
- 12) J. T. Chi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 6343-6346 (2003)
- 13) A. J. Bridge *et al.*, *Nature Genet.*, 34, 263-264 (2003)
- 14) C. A. Sledz *et al.*, *Nature Cell Biol.*, 5, 834-839 (2003)
- 15) N. Takasugi *et al.*, *Nature*, 442, 438-441 (2003)
- 16) T. Yokota *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 310, 1062-1066 (2003)
- 17) P. Gonzalez-Alegre *et al.*, *Ann. Neurol.*, 53, 781-787 (2003)
- 18) V. M. Miller *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 7195-200 (2003)
- 19) Y. Li *et al.*, *Ann. Neurol.* (in revision)
- 20) Y. Nishiwaki *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 310, 1063-1066 (2003)
- 21) A. M. Krichevsky *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 11926-11929 (2002)
- 22) Y. McCaffrey *et al.*, RNA interference in adult mice, *Nature*, 418, 38-9 (2002)
- 23) E. Song *et al.*, *Nature Med.*, 9, 347-351, 2003 (2003)
- 24) L. Zender *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 7797-7802 (2003)
- 25) H. Mikimura *et al.*, *BMC Neurosci.*, 3, 18 (2002)
- 26) H. Xia *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 20, 1006-1010 (2002)
- 27) X. F. Qin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 183-188 (2003)
- 28) G. M. Barton *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 14943-14945 (2002)
- 29) J. D. Hommel *et al.*, *Nature Medicine*, 9, 1539-1544 (2003)
- 30) K. Kajiwara *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 8 (3), 253-65 (1997)
- 31) H. Hasuwa *et al.*, *FEBS lett.*, 532, 227-230 (2002)
- 32) M. A. Cambell *et al.*, *Nat. Struct. Biol.*, 10, 91-92 (2003)
- 33) T. Kunath *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 21, 559-561 (2003)
- 34) T. Shinagawa *et al.*, *Gene Dev.*, 17, 1340-1345 (2003)





解説

RNAiを用いた遺伝子治療の可能性*

横田 隆徳**

Key Words : hepatitis virus, HIV, siRNA, RNAi, virus vector

はじめに

RNAiはいかなる遺伝子に対してデザインできて、その標的遺伝子の発現抑制効果はアンチセンス核酸の $10^3\sim 7$ 倍、リボザイムの $10^2\sim 5$ (自験)高いといわれている。しかもその配列特異性も高く、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る。ここでは、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ウイルス性疾患を中心に概説したい。

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、siRNAの発見当初は5'端から9, 10, 11塩基目の中央部位の変異が失活化にもっとも有効とされた¹⁾。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²⁾、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³⁾、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もっともよいと考えられている(図1)。

Off-Target効果などの副反応

siRNAを臨床応用する際に、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⁴⁾。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、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らの検討では⁴⁾、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。今後このoff-target効果の評価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、非特異的な蛋白合成と停止とRNA変性が起こり得るとい報告がされ、その程度によっては今後問題になるかもしれない⁵⁾。

ウイルス性疾患への応用

RNAiの本来の生理学的役割のひとつとして細胞に感染したウイルスの蛋白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)⁶⁾、C型⁷⁾⁸⁾・B型⁹⁾肝炎ウイルス、ポリオウイルス¹⁰⁾、SARSウイルス、インフルエンザウイルス、ウエストナイルウイルスで培養細胞レベルではあるが有効なsiRNAが報告されている。

* Is gene therapy with RNAi promising?

** Takanori YOKOTA, M.D.: 東京医科歯科大学大学院脳神経病態(〒113-8519 東京都文京区湯島1-5-45); Department of Neurology and Neurological Science, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo 113-8519, JAPAN

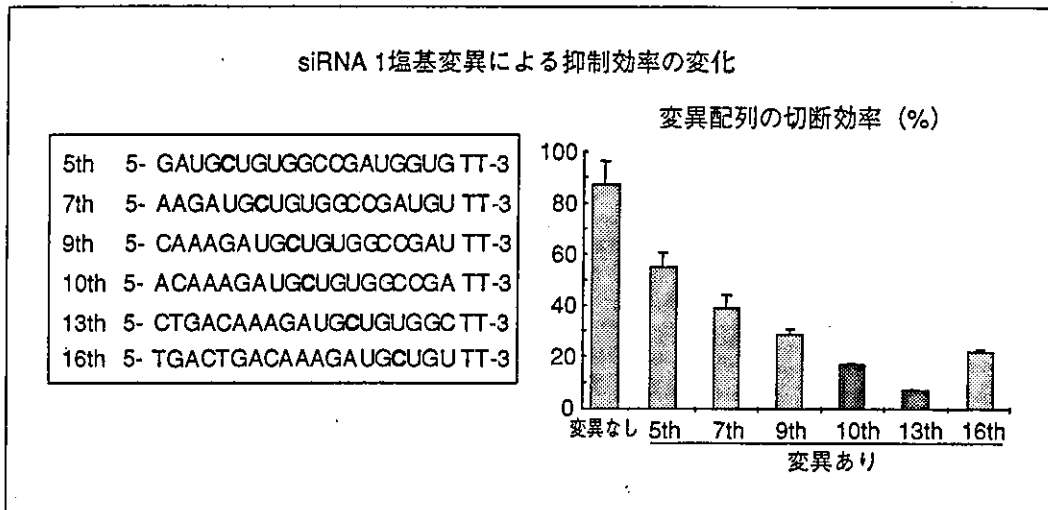


図1 siRNAへの標的遺伝子とのミスマッチ変異挿入位置によるsiRNA効果への影響
siRNAのセンス配列の5'末端から10から13番目のミスマッチの変異でもっともsiRNA活性は消失するが、5'側の変異ではsiRNA活性は残る。

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⁸⁾紹介する。

HCV遺伝子は9,600塩基からなるプラス1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UTRは複雑なRNA構造のIRES(internal ribosome entry site)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2A)。

HCVは1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ORFに変異を起こしやすくquasispeciesと呼ばれている。このため、慢性のウイルス感染においては、siRNAによる治療をする際、siRNAの効果からすり抜け現象が予想される¹⁰⁾。そこで、われわれはHCVの遺伝子型にかかわらず保存されている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。

このウイルス遺伝子の変異に対して、上記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¹¹⁾。

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TSG101¹²⁾やNF- κ B p65¹³⁾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¹⁴⁾。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もたれている¹⁵⁾。

一方、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免疫性疾患の治療としての可能性や感染症の初期治療としての試みが報告されている¹⁶⁾。

siRNAの*in vivo*へのデリバリー

siRNAの*in vivo*へのデリバリーは、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という方法にて肝細胞などの多くの胸腹部臓器に導入が可能となった¹⁷⁾。最近このハイドロダイナミックス導入法で導入されたFas¹⁸⁾やcaspase 8¹⁹⁾に対する合成siRNAで、ConAやFas抗体を用いてマウスに

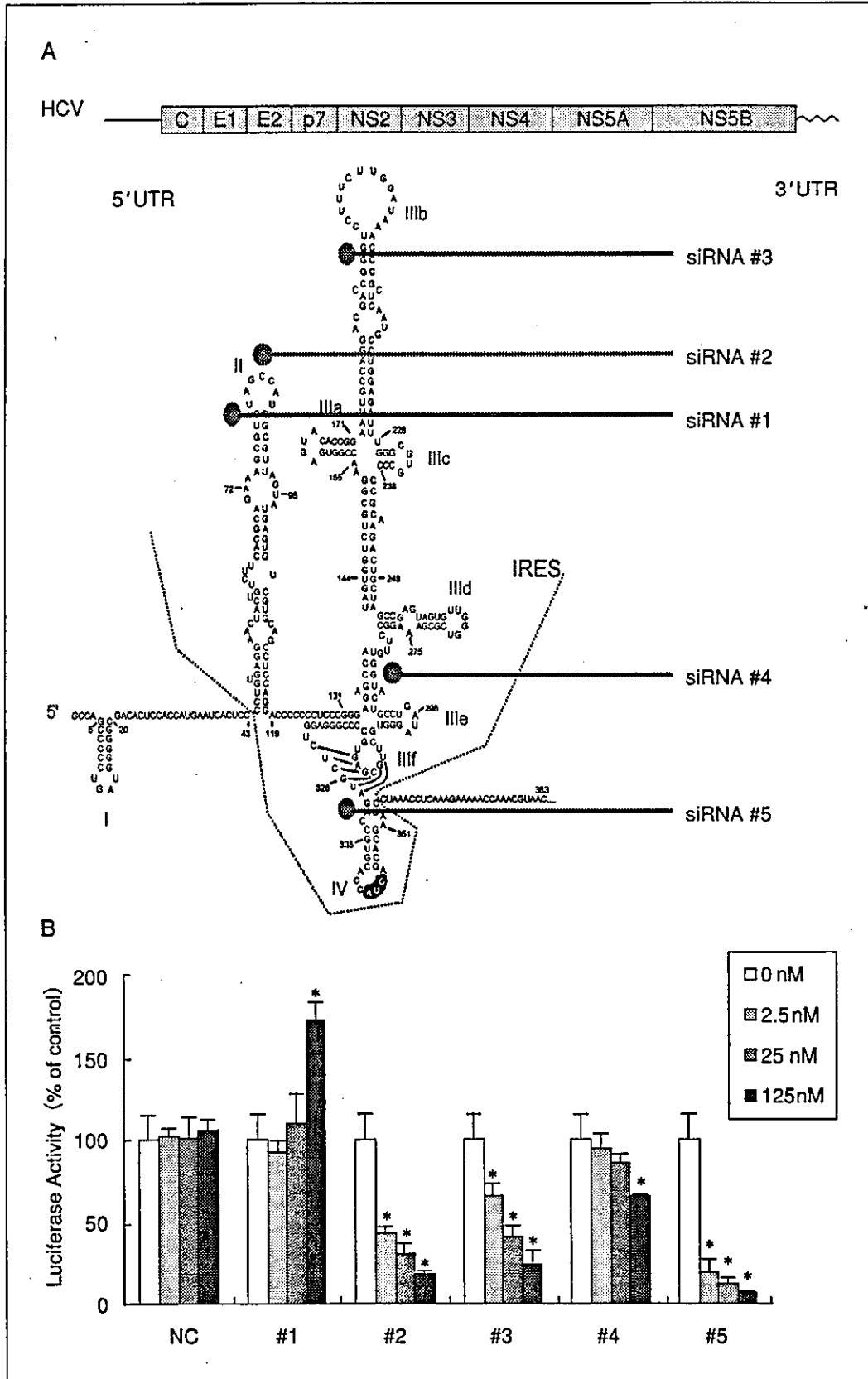


図2 HCV RNAに対するsiRNA

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125nM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、2.5nMの非常に低濃度siRNAでも約80%の抑制がみられた。* $p < 0.05$ (文献¹³⁾より転載)

起こした激症肝炎による死亡率を低下させたことが報告された。しかし、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²⁰⁾やレンチウイルス²¹⁾、レトロウイルス²²⁾アデノ随伴ウイルス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の遺伝子発現抑制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、基礎バイオ研究でのツールとしてはおおむね確立した感もある。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期待したい。

文 献

- 1) Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002 ; 29 : 550.
- 2) Holen T, Amarzguioui M, Wiiger MT, et al. Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res* 2002 ; 30 : 1757.
- 3) Amarzguioui M, Holen T, Babaie E, et al. Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. *Nucleic Acids Res* 2003 ; 31 : 589.
- 4) Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, et al. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 2003 ; 21 : 635.
- 5) Bridge AJ, Pebernard S, Ducraux A, et al. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nature Genet* 2003 ; 34 : 263.
- 6) Sledz CA, Holko M, de Veer MJ, et al. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* 2003 ; 5 : 834.
- 7) Zamore PA, Aronin N. siRNA knpck down hepatitis. *Nat Med* 2003 ; 9 : 266.
- 8) Yokota T, Sakamoto N, Enomoto N, et al. Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO Rep* 2003 ; 4 : 602.
- 9) Giladi H, Ketzinel-Gilad M, Rivkin L, et al. Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus replication in mice. *Mol Ther* 2003 ; 8 : 769.
- 10) Gitlin L, Karelsky S, Andino R. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature* 2002 ; 418 : 430.
- 11) Song E, Lee SK, Dykxhoorn DM, et al. Sustained small interfering RNA-mediated human immunodeficiency virus type 1 inhibition in primary macrophages. *J Virol* 2003 ; 77 : 7174.
- 12) Garrus JE, von Schwedler UK, Pornillos OW, et al. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* 2001 ; 107 : 55.
- 13) Surabhi RM, Gaynor RB. RNA interference directed against viral and cellular targets inhibits human immunodeficiency Virus Type 1 replication. *J Virol* 2002 ; 76 : 12963.
- 14) Arteaga HJ, Hinkula J, van Dijk-Hard I, et al. Choosing CCR5 or Rev siRNA in HIV-1. *Nat Biotechnol* 2003 ; 21 : 230.
- 15) Qin XF, An DS, Chen IS, 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* 2003 ; 100 : 183.
- 16) Sorensen DR, Leirdal M, Sioud M. Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs. 2003 ; 327 : 761.
- 17) McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, et al. RNA interference in adult mice. *Nature* 2002 ; 418 : 38.
- 18) Song E, Lee SK, Wang J, et al. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med* 2003 ; 9 : 347.
- 19) Zender L, Hutker S, Liedtke C, et al. Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 ; 100 : 7797.
- 20) Xia H, Mao Q, Paulson HL, et al. siRNA-mediated

- gene silencing in vitro and in vivo. *Nat Biotechnol* 2002 ; 20 : 1006.
- 21) Qin XF, An DS, Chen IS, 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* 2003 ; 100 : 183.
- 22) Barton GM, Medzhitov R. Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 ; 99 : 14943.
- 23) Hommel JD, Sears RM, Georgescu D, et al. Local gene knockdown in the brain using viral-mediated RNA interference. *Nat Med* 2003 ; 9 : 1539.

* * *

特集 現実化するRNAi創薬

RNAiの神経変性疾患治療への応用

Gene Therapy with RNAi to Neurodegenerative Diseases

横田隆徳

Takanori Yokota

遺伝性神経変性疾患においてその変異遺伝子自体をsiRNAで治療するといった究極の遺伝子治療を目指した基礎研究が進行している。さらに孤発性神経変性疾患においてもその機序の解明に伴い、判明したキーとなる分子を標的としたsiRNAによる治療戦略も始まった。ウイルス性神経変性疾患、脳血管障害、多発性硬化症への応用も可能である。デリバリーの方法やoff-target効果など、まだまだ解決すべき問題点も多いが、siRNAの高い抑制効果からその神経変性疾患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。

key words

siRNA, off-target効果, アルツハイマー病, ポリグルタミン病, SOD1, 遺伝子治療

□ 横田隆徳 東京医科歯科大学大学院歯学総合研究科 脳神経機能病態(神経内科) E-mail: tak-yokota.nuro@tmd.ac.jp
1990年東京医科歯科大学大学院医学研究科修了, 2004年より現所属。助教授。一般臨床の傍ら、神経変性疾患の根本的な治療の実現に熱心している。

はじめに

RNAi (RNA interference, RNA 干渉) はいかなる遺伝子に対してもデザインでき、その標的遺伝子の発現抑制効果は他の核酸医薬であるアンチセンス核酸の $10^3\sim 7$ 倍、リボザイムの $10^2\sim 5$ (筆者; 私信) 高いと言われている。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あり、医療分野におけるその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ライブラリーを始めとする創薬におけるツールといった側面と、siRNA (small interfering RNA) を直接核酸医薬として疾患に適用するという2つの側面から行われている。ここでは、すでにウイルス性疾患、遺伝性疾患、悪性腫瘍などで急速に進んでいるsiRNAの核酸医薬としての開発の研究現状と問題点に神経変性疾患を中心に概説したい。

I. siRNAの特異性: 変異遺伝子特異的なsiRNA

遺伝性疾患や癌遺伝子を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。5'末端側は基質との結合よりRISC (RNAi-induced silencing complex) との関わりから基質を切断するルーラー(物差し)として働き、基質の認識としては3'末端側のほうが重要で、したがってミスマッチ

による失活効果が強いと考えられている¹⁾。

II. siRNAの特異性: 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、標的とした遺伝子以外に、用いた19塩基のsiRNAの配列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差反応が報告されている²⁾。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高いが、それでも多くの遺伝子の発現が少なからず影響を受ける可能性がある。Jacksonらの検討で²⁾、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も影響があったと報告された。今後このoff-target効果の評価とその回避は重要な問題である。

また、通常の19塩基長のshRNA (short hairpin RNA) 発現ベクターの発現によって、動物細胞でPKR (double strand RNA activated protein kinase) 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変性が起こりうるという報告がされ、これもその程度によっては今後問題になるかもしれない³⁾。

III. 神経変性疾患への応用: ウイルス性、免疫性疾患

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、HIV (human immunodeficiency virus), C型・B型肝炎ウ

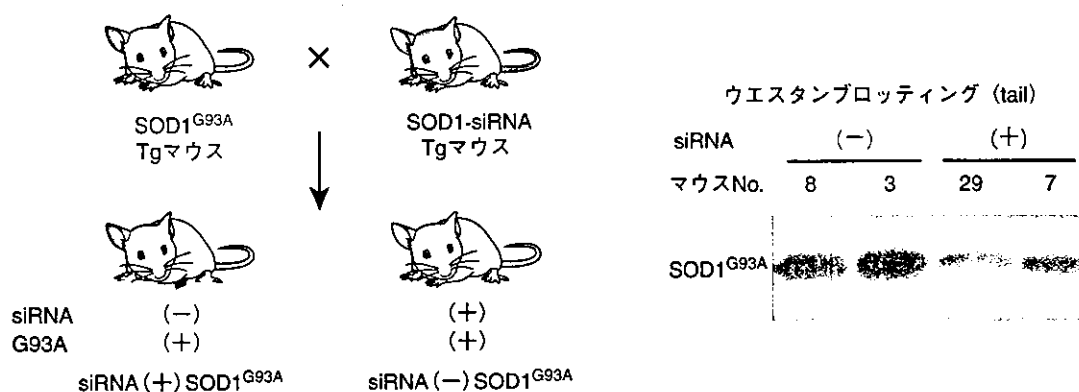


図1. SOD1^{G93A} トランスジェニックマウスの遺伝子治療

SOD1 (superoxide dismutase 1) に対する siRNA を過剰発現させたトランスジェニック (Tg) マウスを筋萎縮性側索硬化症 (ALS) のモデルマウスである G93A 変異 SOD1 (SOD1^{G93A}) Tg マウスと掛け合わせるにより (左), 変異 SOD1 タンパク質の発現を 80% 以上抑制することに成功した (右)。6 カ月齢の時点で ALS 症状の発症は完全に抑制されている。

イルス, ポリオウイルス, インフルエンザウイルス, ウエストナイルウイルス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で有効な siRNA が報告されている。筆者らも C 型肝炎で有効な siRNA を開発し⁴⁾, 現在サルモデルを用いた検討をしている。

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 TSG101⁵⁾ や NF- κ B p65⁶⁾ サブユニット⁶⁾ などの発現を siRNA で抑制し, HIV 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⁷⁾。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 細胞になり, その両者ともに HIV に抵抗性になったとの報告がなされ, 今後の臨床応用に期待が持たれている。

一方, IL-1 (interleukin-1) や TNF- α (tumor necrosis factor- 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, 免疫性疾患の治療としての可能性や感染症の初期治療としての試みが報告されている⁸⁾。

IV. 神経変性疾患への応用: 遺伝性神経変性疾患

遺伝性疾患でゲノム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タンパク質の本来の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 であることが多い。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まったくなく, 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。SOD1 (superoxide dismutase 1) 変異による筋萎縮性側索硬化症 (ALS), 各種ポリグルタミン病, アミロイド前駆体タンパク質 (APP) や PS1 (presenilin1) 遺伝子変異によるアルツハイマー病, α -シヌクレイン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 gain of toxic function をその発症機序と考えている。このような疾患の治療を考える場合, 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。最近, SCA1 のトランスジェニック (Tg) マウスの小脳に siRNA 発現型アデノ随伴ウイルスを注入して, 運動障害と神経変性を改善したとの報告がなされた⁹⁾。筆者らは SOD1 に対する siRNA を過剰発現させた Tg マウスを作製して, これを ALS のモデルマウスである G93A 変異 SOD1 Tg マウスと掛け合わせ, 全身の変異 SOD1 タンパク質の発現を 80% 以上抑制することに成功した (図 1)。この効果により, 6 カ月齢の時点で ALS 症状の発症は完全に抑制されている。野生型 SOD1 はノックアウトしても明

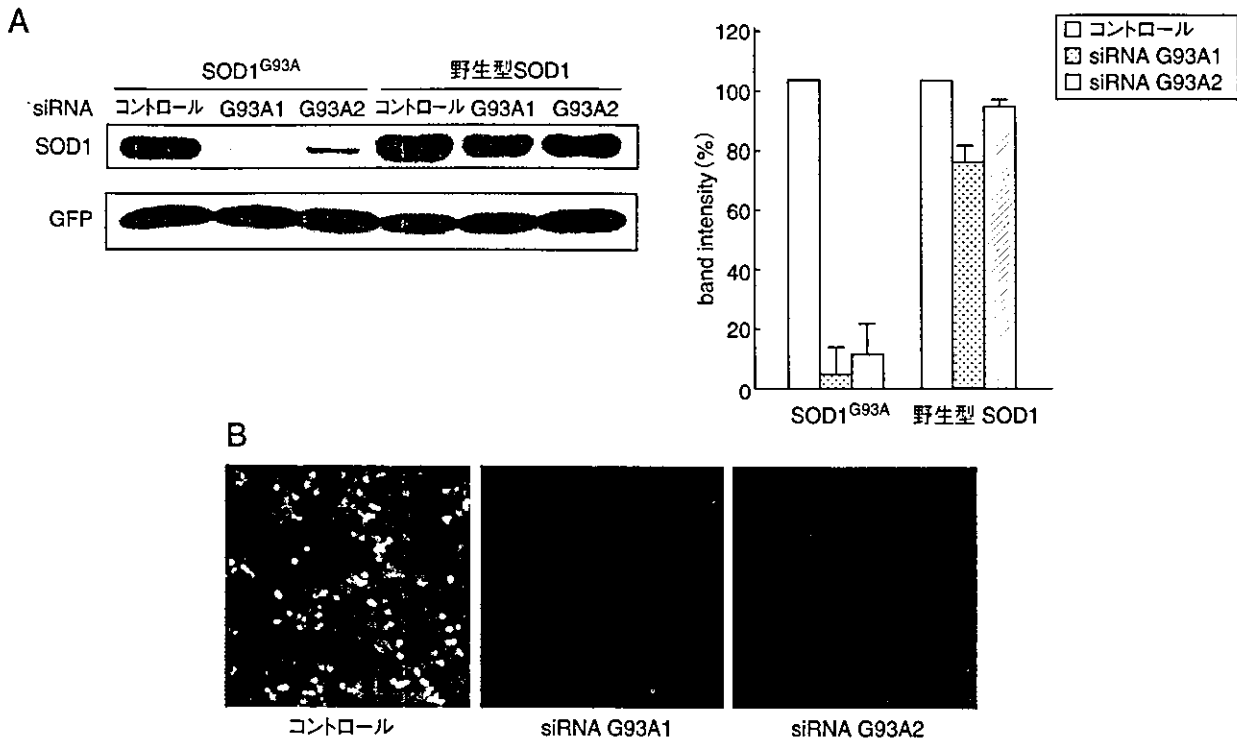


図2. 変異SOD1に特異的に作用するsiRNA

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とともにSOD1^{G93A}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。

Yokota T, et al: Biochem Biophys Res Commun (2004) 314: 283-291より改変。

際な神経症状は示さないで副作用はない可能性が高いが、例えばSCA6の場合、その原因遺伝子カルシウム1Aチャネルのノックアウトマウスは生後1~2週で死亡することが知られており、正常アリの発現抑制は新たな症状を来す可能性が高い。したがって、優性遺伝疾患の治療には、正常アリの発現を損わずに、変異アリの発現のみを抑制することが望ましい。

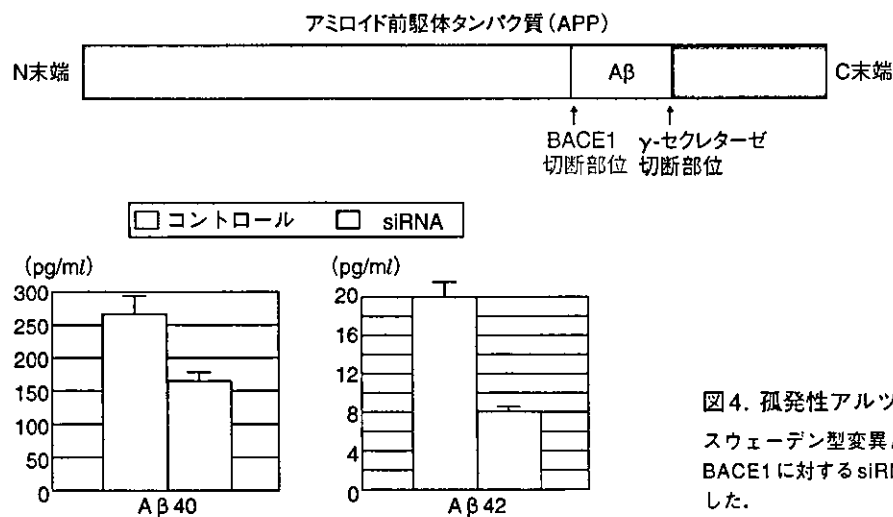
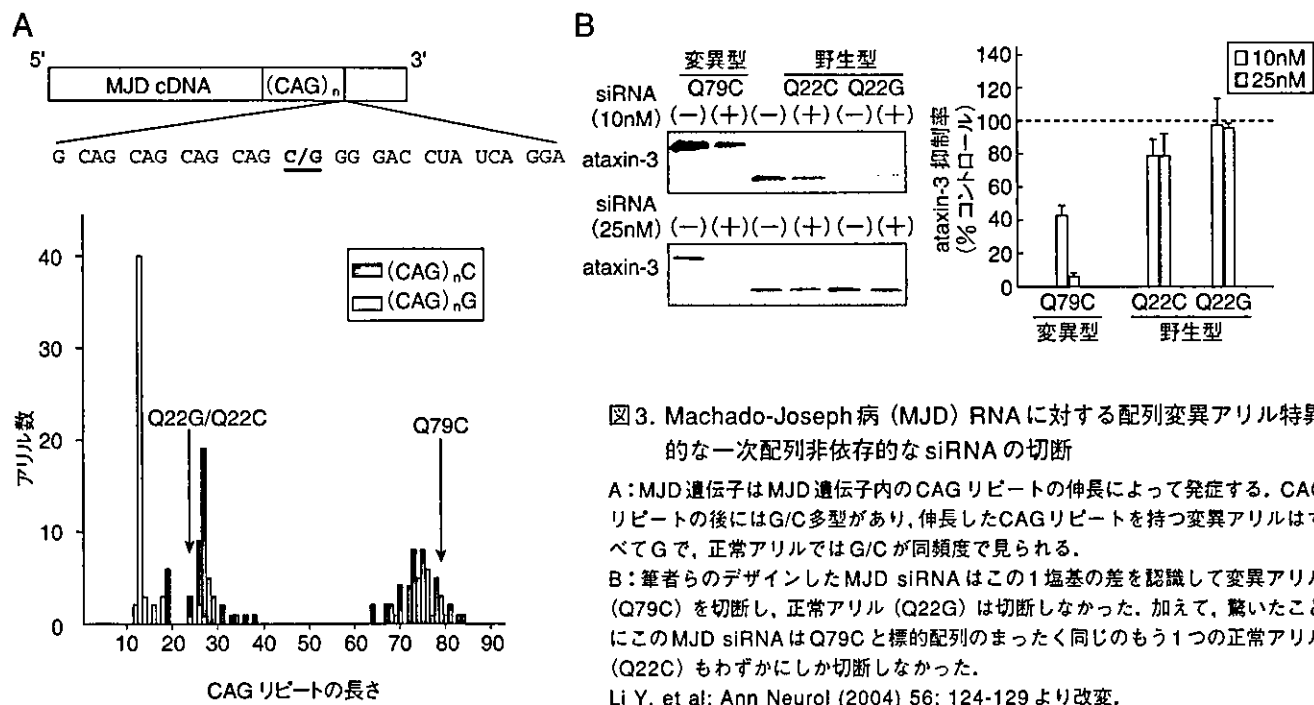
上述のように、変異が1塩基の違いである点変異でも正常アリと変異アリの配列の差を認識して変異アリのみを切断できるsiRNAの作製は可能である。図2に家族性ALSの原因遺伝子であるSOD1の点変異G93Aを選択的に切断して正常配列にはほとんど影響しないsiRNAの例を示す¹⁰⁾。同様の報告は捻転ジストニア¹¹⁾やfrontotemporal dementia¹²⁾で報告されている。しかし、SOD1やPS1の点変異は100種類以上知られており、そのすべてに特異的で効率的なsiRNAがデザインできるわけではない。筆者らはいかなる遺伝子変異に対しても特異的で有効な新しいRNAi法を考案して(投稿中)、現在その*in vivo*での有効性を検証中である。

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。MJD (Machado-Joseph病 (SCA3)) の場合、CAGリピートの直下の下流にC/Gの多型があり、これはCAGリピートの繰り返し配列の長さに関連している。長い繰り返しを持つ病的アリルはすべてCだが、短い繰り返しを持つ正常アリルでは約半数の例でGである^{12), 13)}(図3A)。そこで筆者らはこのC/Gの多型の標的としてsiRNAを設計して、病的アリルに特異的なsiRNAを作製した。ところが驚いたことにこのsiRNAは多型が変異アリルと同じCである短いCAGリピートの正常アリルもあまり切断しなかった(図3B)¹³⁾。この機序は不明だが、CAGリピート長の変化に伴うRNAの二次構造の変化やMJD RNAの多型付近に結合するRNA結合タンパク質の結合度の変化によって、siRNAの標的配列へのアクセスに差異が生じるためかもしれない。

V. 神経変性疾患への応用: 孤発性神経変性疾患

ほとんどのアルツハイマー病、パーキンソン病やALSは家族歴のない孤発性で遺伝子異常は明らかでないが、それぞれ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。例えば、アルツハ



イマー病の β セクレターゼは有望な標的分子である¹⁴⁾。アルツハイマー病のモデル動物は Aβ (amyloid β) 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、認知障害も軽減したと報告されている。最近の欧米で進められている臨床試験の結果も副作用はあるが効果はありそうである。これはアルツハイマー病の発症機序に従来から言われてきた Aβ 仮説を大きく支持するもので、Aβ の産生を抑制することが治療のターゲットとなる。Aβ は APP

から 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 などから成る γ セクレターゼは Notch などの他の重要な分子も基質としているためその機能を抑制すると問題が出るが、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。筆者らも BACE1 に対する siRNA を作製して、培養細胞系で Aβ 産生を抑制できることを示した (図4)。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、画期的な治療方法