

200500802A

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17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 水澤 英洋

平成18(2006)年4月

## 目 次

### I. 総括研究報告

発現型 RNAi を用いた神経・筋疾患の画期的遺伝子治療法の開発  
水澤英洋

### II. 分担研究報告

1. 発現型 RNAi を用いた神経・筋疾患の画期的遺伝子治療法の開発  
：神経変性疾患の治療、RNAi のデザイン  
横田隆徳

2. 発現型 RNAi を用いた神経・筋疾患の画期的遺伝子治療法の開発  
：RNA 工学的研究の遂行  
宮岸 真

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

### IV. 研究成果の刊行物・別刷

# I . 総括研究報告

---

厚生労働科学研究費補助金(こころの健康科学研究事業)  
総括研究報告書

発現型 RNAi を用いた神経・筋疾患の画期的遺伝子治療法の開発に関する研究

主任研究者 水澤 英洋 東京医科歯科大学大学院教授

研究要旨：家族性筋萎縮性側索硬化症や Machado-Joseph 病の変異遺伝子、脳血管障害に関係する白血球接着分子 E-セレクトリン、C 型肝炎ウイルスに特異的な siRNA の作製に成功し、パーキンソン病 (Park7) の原因遺伝子 DJ-1 の機能を siRNA を用いて明らかにした。siRNA 発現型アデノウイルス・アデノ随伴ウイルスベクターの作製、siRNA 過剰発現トランスジェニックマウスの作製に成功した。siRNA 効果の高いターゲットサイトを選択する高機能アルゴリズムを開発し、他の遺伝子に影響を与えないことを確認するシステムや、神経・筋疾患関連遺伝子の探索を可能とする siRNA ライブラリー作製システムを構築した。これらの成果は、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) などに紹介され、高い評価を受けており、さらなる発展が期待される。

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 助教授  
宮岸 真 東京大学大学院医学系研究科  
特任助教授

A. 研究目的

未だ根本的治療のない難病である神経変性疾患や治療はできても神経細胞の再生能力の問題から機能回復がきわめて悪い脳血管障害など、多くの神経疾患では革新的治療法や効果的予防法の開発が焦眉の課題である。近年、常染色体優性遺伝性疾患の原因遺伝子を含めその過剰発現が発症に係わる分子が次々と判明しており、これらの分子の発現を抑制する治療法が期待できる。本研究の目的は、RNA 干渉によるノックダウン技術である siRNA (short interfering RNA) を用いた各種神経筋疾患の画期的治療法の開発とその基礎研究を行うことである。今年度は、点変異、伸長 CAG リピートなどを来した疾患遺伝子、血管障害関連遺伝子、ウイルスゲノムなどに対する siRNA を作製、有効なウイルスベクターや siRNA トランスジェニックマウスを開発する。また、基礎的には RNAi ベクターのターゲットサイトの効率的な選択法および特異性検索システムを開発するとともに、神経・筋疾患関連遺伝子の探索を可能とする siRNA ライブラリー作製システムを構築する。

B. 研究方法

目的とする遺伝子の標的部位に対して様々なデザインした合成 siRNA、siRNA 発現ベクター、疾患遺伝子の発現ベクターを作製し、培養細胞や ES 細胞に導入して siRNA の効果を Western blot 法、蛍光顕微鏡、細胞死、接着能力などのアッセイで評価し、最適な siRNA やベクターを選択した。動物培養細胞にレポーター遺伝子を発現するベクターとレポーター遺伝子をターゲットとした RNAi ベクターを共導入し、RNAi ベクターの遺伝子発現抑制活性を調べた。今回は、2つのレポーター遺伝子に対して約 1,000 個の siRNA を作製しそのデータの解析を行った。また、NCBI の遺伝子データベースを検索し、ターゲットサイトの特性を調べるプログラムの開発を行った。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、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。

(倫理面への配慮)

siRNA は化学合成し変異 cDNA は mutagenesis によって作製しており倫理的問題はない。また、動物実験は各施設の動物実験センター等の規定に従って動物愛護の精神に沿って行っている。

### C. 研究結果

家族性筋萎縮性側索硬化症の原因である SOD1 遺伝子の点変異の位置を siRNA 配列の 5'末端から 10-13 塩基目にデザインすることによって変異アレル特異的に作用する siRNA の作製に成功、Machado-Joseph 病の原因である伸長 CAG リピートに関連した G/C polymorphism およびターゲット RNA の 2 次構造の変化を利用した配列依存的および非依存的な 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。脳血管障害関連分子である 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-セレクトイン発現が著明に抑制され白血球の接着障害を確認した。このときその他の接着分子 (ICAM-1) の発現には影響がなく、観察された接着抑制が E-セレクトイン発現の抑制によるものであることが示唆された。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 の作製に成功した。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。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・アデノ随伴ウイルスベクターの作製に成功した。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。

ルシフェラーゼ遺伝子の約 300 サイト、GFP 遺伝子の約 700 サイトの siRNA 活性を取得し、それをもとに非線形多変量解析により約 50 の相関するパラメーターを抽出し、このパラメーターを用いてターゲットサイトを予測するアルゴリズムの作成を行った。また、siRNA の特異性を考慮したサーチプログラムを作成しターゲットサイトの特異性を調べるシステムを構築した。今回開発したバルク法を用いて一ヶ月で 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この大量作製系の効率の確認を行っている。

### D. 考察

点変異のみならず CAG リピートという特殊な遺伝子変異に対しても変異特異的な siRNA の作製に成功した。

非常に変異しやすい C 型肝炎ウイルスに対しても非常に効率的な siRNA を作製するとともに、脳血管障害に対しては白血球接着因子 E-セレクトインを選択し、その siRNA による発現抑制が白血球の接着阻害ももたらすことを確認し高い siRNA 技術が裏付けられた。その次に問題となるデリバリーについてもアデノウイルス・アデノ随伴ウイルスベクターの開発に成功し、siRNA トランスジェニックマウスの作製とあわせ今後の動物モデルを用いた研究への基盤ができた。なお、血管病変に対してはむしろ局所投与が望ましい場合がありデリバリーの問題は対象疾患に応じてケースバイケースで解決すべきものと考えられる。

基礎研究でもアルゴリズムに使用するデータ量が飛躍的に増えたため、非常に高い精度で効果の大きいターゲットサイトを予測することが可能となった。また、常に問題になる特異性に関しても、今回新たに作製した siRNA Search Program を用いて検索することができるようになった。さらに、遺伝子の迅速探索を可能にする siRNA ライブラリーの大量作製が可能となった。これらの成果は、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) などに紹介され、高い評価を受けており、さらなる発展が期待される。

### E. 結論

これらの成果は siRNA は遺伝性・非遺伝性神経変性疾患、生活習慣病でもある脳血管障害、ウイルス性疾患などのさまざまな疾患の病態解明や遺伝子治療の方法として有望であることを示している。また、対象疾患のターゲット遺伝子のターゲットサイトをその特異性も考慮し効率的に選択することができるようになった。さらに、今回開発した siRNA ライブラリーを用いたスクリーニングによって神経・筋疾患に関連する新規機能遺伝子の発見が期待される。

### F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- Saito Y, Yokota T, Mitani T, Anzai M, Miyagishi M, Taira K, Mizusawa H. Transgenic siRNA halted amyotrophic lateral sclerosis in a mouse model. *J Biol Chem*. 280 : 42826-42830 (2005)
- Hori S, Ohtsuki S, Ichinowatari M, Yokota T, Ohtsuki M, Terasaki T. Selective genesilencing of rat ATP-binding cassette G2 transporter in an in vitro blood-brain barrier model by short interfering RNA. *Biochem Biophys Res Commun* 93 : 63-71 (2005)
- Kubodera T, Yokota T, Ishikawa K, Mizusawa H. New RNAi strategy for selective suppression of mutant allele in polyglutamine disease. *Ann Neurol* 15:298-302(2005)
- Akashi H, Miyagishi M, Yokota T, Watanabe T, Hino T, Nishina K, Kohara M, Taira K. Escape from the interferon response associated with RNA interference using vectors that encode long modified hairpin-RNA. *Mol Cell Biol* 1:382-390(2005)
- Mitani T, Yokota T. RNA interference as a tool for producing knockdown mice. *J Mamm Ova Res* 22:139-151(2005)
- Hino T, Yokota T, Ito S, Nishina K, Kang Y-S, Mori S, Hori S, Kanda T, Terasaki T, Mizusawa H. In vivo delivery of small interfering RNA targeting brain capillary endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 34:263-267(2006)
- Miyagishi M, Taira K. siRNA becomes smart and intelligent. *Nature Biotech* 23:946-947(2005)
- Saitoh T, Miyagishi M et al. A20 is a negative regulator of IFN regulatory factor 3 signaling. *J Immunol* 174:1507-1512(2005)
- Matsumoto S, Miyagishi M et al. Analysis of double-stranded RNA-induced apoptosis pathways using interferon-response noninducible small interfering RNA expression vector library. *J. Biol. Chem* 280:25687-25696(2005)
- Ito M, Miyagishi M et al. Genome-wide application of RNAi to the discovery of potential drug targets. *FEBS Lett* 579:5988-5995(2005)
- Sumimoto H, Miyagishi M et al. Gene therapy for human small-cell lung carcinoma by inactivation of Skp-2 with virally mediated RNA interference. *Gene Ther* 12:95-100 (2005)
- Tsuji A, Miyagishi M et al. A fast, simple method for screening radiation susceptibility genes by RNA interference. *Biochem Biophys Res Commun* 333:1370-1377(2005)
- Jazag A, Miyagishi M et al. Smad4 silencing in pancreatic cancer cell lines using stable RNA interference and gene expression profiles induced by transforming growth factor-beta. *Oncogene* 24:662-671(2005)
- Guleng B, Miyagishi M et al. Blockade of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis attenuates in vivo tumor growth by inhibiting angiogenesis in a vascular endothelial growth factor-independent manner. *Cancer Res* 65:5864-5871(2005)
- Ohta M, Miyagishi M et al. p53-Independent negative regulation of p21/cyclin-dependent kinase-interacting protein 1 by the sonic hedgehog-glioma-associated oncogene 1 pathway in gastric carcinoma cells. *Cancer Res*. 65:10822-10899(2005)

### 2. 学会発表

横田隆徳：RNA干渉と神経疾患、神経変性疾患の最新の原因・病態解析、第45回日本神経学会総会、2005.5.28、鹿児島

横田隆徳：トランスレーショナルニューロサイエンスー難病ALSへの神経科学の挑戦ー siRNAによるALSの遺伝子治療、第28回日本神経科学会 2005.7.28、東京

横田隆徳：神経変性疾患のsiRNAによる遺伝子治療。第2回六甲カンファレンス、2005.10.1、淡路

横田隆徳：Transgenic siRNA halts ALS in a model mouse. 第15回アンチセンスシンポジウム、2005.11.25、桐生

宮岸真:siRNA 発現ライブラリーを用いた機能遺伝子の探索. 第16回フォーラム・イン・ドージン

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

## II. 分担研究報告

siRNA を用いた神経疾患に対する遺伝子治療

分担研究者 横田隆徳 東京医科歯科大学 助教授

研究要旨 1) 家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) の原因である SOD1 遺伝子に対する siRNA 過剰発現トランスジェニックマウス (TgM) を作製し、家族性 ALS のモデル動物である G93A SOD1 TgM と掛け合わせることにより、ALS 発症と症状進行の著明な遅延に成功した。2) あらゆる変異に対応可能な変異アリル特異的な新しい RNAi を用いた遺伝子発現抑制方法を開発した。3) siRNA の高圧静脈内投与による in vivo における脳血管内皮への導入に成功した。

A. siRNA を用いて遺伝性の神経変性疾患、免疫性神経疾患、脳血管障害の発症機序の解明や遺伝子治療を行う。

B. 研究方法

1) 培養細胞実験：さまざまにデザインした合成 siRNA、siRNA 発現ベクター、疾患遺伝子の発現ベクター、培養細胞や ES 細胞に導入して siRNA の効果を Western blot 法、Northern blot 法、細胞死のアッセイで評価した。

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

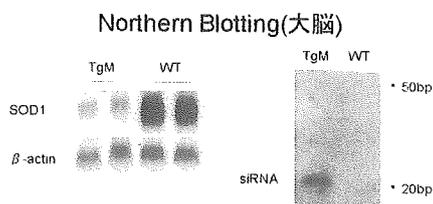
3) マウスを用いて、血管内皮細胞の内因性蛋白 (SOD1) に対する siRNA を作製し、尾静脈からの投与 1 日後に血管内皮分画における SOD1 の発現を Western blot 法で評価した。次に血管内皮細胞の機能として、輸送系蛋白の 1 つである organic anion transporter3 (OAT3) に対する siRNA を作製し、尾静脈からの投与 36 時間後に OAT3 基質薬物の排出に対する効果を Brain Efflux Index 法で評価した。

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

C. 研究結果、D. 考察

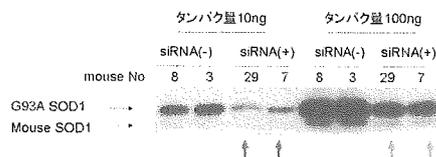
1) SOD1-siRNA TgM の作製：高率に SOD1 タンパクの発現を抑制した ES 細胞のクローンが得られた。このクローンをマイクロイン

ジェクションして作製したキメラマウスから生まれた F1 マウスの大脳において、SOD1-siRNA トランスジーンを組み込みが確認され、Northern blot 法では大脳における siRNA の発現(下図右)と SOD1 mRNA の発現抑制(下図左)が確認された。



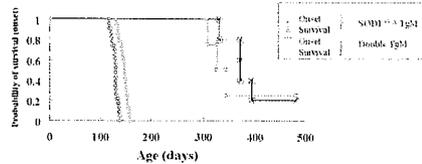
さらに SOD1-siRNA TgM と G93A SOD1 TgM の掛け合わせ、SOD1-siRNA トランスジーンと G93A SOD1 トランスジーンを有するダブル TgM が得られた。このダブル TgM では G93A SOD1 タンパクおよびマウス内因性 SOD1 タンパクの発現抑制が認められた<sup>1)</sup> (下図赤矢印)。

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

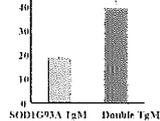


G93A SOD1 TgM は 136 日齢までに 23 匹全例発症、157 日齢までに全例死亡しているのに対し、ダブル TgM では 300 日齢以降に発症して 500 日齢たった今でも 1 匹は未発症で、症状進行も遅い(次頁図)。

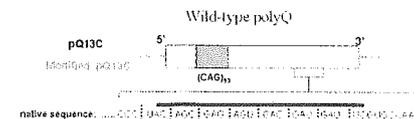
### Kaplan-Meier analysis



### Disease Duration

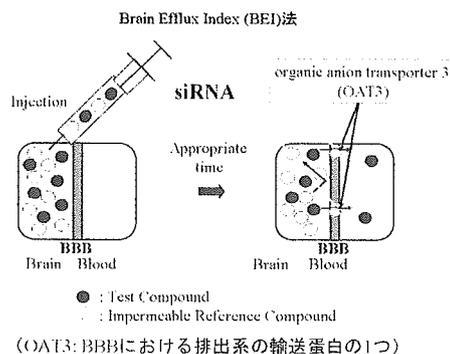


2) あらゆる変異に対応可能な変異アレル特異的な新しいRNAiを用いた遺伝子発現抑制方法の開発: まずsiRNAで変異型と野生型、両者のRNAの発現を抑制し、そのsiRNAで切断されないようにエンジニアしたcDNA(下図)によって野生型タンパクを戻す。そのためにアミノ酸配列は変わらないがこれをコードするRNA配列を変異させて作製したsiRNAが効かないようにデザインし、その有効性を培養細胞で示した<sup>2)</sup>。

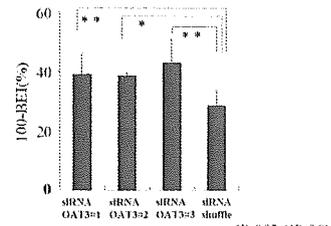


いかなる変異に対しても変異アレル特異的なRNAi法

3) siRNA の高圧静脈内投与により脳血管内皮細胞の内因性タンパク (SOD1) の発現が抑制され、同様の方法で導入された脳血管内皮細胞に発現する輸送系蛋白 OAT3 に対する siRNA により、OAT3 基質薬物の排出に対する効果を Brain Efflux Index 法(下図)で評価した結果、その機能が阻害され、BBBにおける基質排出能が低下した<sup>3)</sup>(右段上図)。



### マウス脳におけるOAT3基質の残存率



in vivoにおけるOAT3排出能が抑制された

### E. 結論

siRNA の変性疾患での有効性を理論的に示し、脳血管内皮へもデリバリーが可能であることから、siRNA が脳疾患の病態解明、遺伝子治療の方法として有望であることが示された。

### F.健康危険情報

健康を損なう実験系は使用していない。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Saito Y, Yokota T, Mitani T, Ito K, Anzai M, Miyagishi M, Taira K, Mizusawa H: Transgenic siRNA halted amyotrophic lateral sclerosis in a mouse model. *J Biol Chem.*280: 42826-42830, 2005.
- 2) Kubodera T., Yokota T, Ishikawa K, Mizusawa H :New RNAi Strategy for Selective Suppression of Mutant Allele in Polyglutamine Disease. *Oligonucleotides* 15: 298-302, 2005.
- 3) Hino T, Yokota T, Ito S, Nishina K, Kang Y-S, Mori S, Hori S, Kanda T, Terasaki T, Mizusawa H.: In vivo delivery of small interfering RNA targeting brain capillary endothelial cells *Biochem Biophys Res Com.* 340 : 263-267, 2006.

#### 2. 学会発表 (シンポジウムのみ)

- 1) 横田隆徳: RNA 干渉と神経疾患、神経変性疾患の最新の原因・病態解析、第45回日本神経学会総会、2005. 5. 28、鹿児島
- 2) 横田隆徳: トランスレーショナルニューロサイエンスー難病 ALS への神経科学の挑戦ー siRNA による ALS の遺伝子治療、第28回日本神経学会 2005. 7. 28、東京
- 3) 横田隆徳: 神経変性疾患の siRNA による遺伝子治療。第2回六甲カンファレンス、2005. 10. 1、淡路
- 4) 横田隆徳、斎藤友紀、水澤英洋: Transgenic siRNA halts ALS in a model mouse. 第15回アンチセンスシンポジウム、2005. 11. 25、桐生

### H.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願中: なし
2. 実用新案登録: なし

厚生労働科学研究費補助金（心の健康科学研究事業）  
（分担）研究報告書

発現型 RNAi を用いた神経・筋疾患の画期的遺伝子治療法の開発

分担研究者 宮岸 真 東京大学大学院医学系研究科 特任助教授

研究要旨

本研究事業の目的は、この方法を用いて神経・筋疾患の遺伝子治療の基礎的な研究を行うことである。今年度、分担者は、神経・筋疾患関連遺伝子の探索を可能とする siRNA ライブラリーの構築を行い、このライブラリーを用いて、二本鎖RNAによって引き起こされるアポトシスの解析を行った。その結果、2つの新規パスウェイを同定し、siRNA ライブラリーを用いた解析がシグナル解析に非常に有効であることが明らかになった。

A.研究目的

RNA 干渉を用いたノックダウン技術である RNAi ベクターを用いて、神経・筋疾患の遺伝子治療を目指した基礎研究を行う。その中で、分担者は siRNA ライブラリーを用いた神経・筋疾患関連遺伝子の探索ツールの開発を行い、それを用いたシグナル解析を行う。

B.研究方法

申請者らがこれまで開発してきた遺伝子ノックダウン法である siRNA ベクターを用いて、多くの遺伝子をターゲットとする siRNA ライブラリーを構築する方法を確立する。また、そのライブラリーを用いたスクリーニング系の検討を行う。

（倫理面への配慮）

培養細胞を使った実験であるため倫理面の問題は無い。

C.結果

ヒトキナーゼ・フォスファターゼ、転写因子、シグナルトランスダクションに関わる因子に関する siRNA ライブラリーを用いて、二本鎖RNAに対するアポトシスに対して、スクリーニングを行い、新規パスウェイとして、JNK/ミトコンドリアのパスウェイおよび、MST3/ERKのパスウェイを同定した。

D.考察

今回の研究で、siRNA ライブラリーを用いて、シグナルトランスダクションの解析、新規関連遺伝子の同定が非常に効率よくできることが判明した。他の分担者が行っている検討課題と組み合わせて、多くの遺伝子に対して、スクリーニングを進めていき

たいと考えている。

E.結論

今回開発した siRNA ライブラリーを用いたスクリーニングによって、神経・筋疾患に関連する新規機能遺伝子の発見が期待される。今後、siRNA ライブラリーの作製を行うと共に、神経・筋疾患遺伝子に関わる遺伝子の探索を行っていきたい。

F.健康危険情報

健康を損なう実験系は使用していない。

G.研究発表

1. 論文発表

Matsumoto, S., Miyagishi, M., et al. Analysis of double-stranded RNA-induced apoptosis pathways using interferon-response noninducible small interfering RNA expression vector library. **J. Biol. Chem.**, 280 : 25687-25696, 2005

Miyagishi, M., and Taira, K. siRNA becomes smart and intelligent. **Nature Biotech.** 23 : 946-947, 2005

2. 学会発表

宮岸 真「siRNA 発現ライブラリーを用いた機能遺伝子の探索」  
第16回フォーラム・イン・ドージン

H.知的財産権の出願・登録状況

特になし

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

## 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     |
|----------|---|-------------------------------------|--|---------------------|-------|------|---------|
| 横田隆徳     | RNAi の神経疾患への応用  | 中村義一、<br>大内将司                       | RNA 工学の最<br>前線   | シーエ<br>ムシー<br>出版    | 東京    | 2005 | 77-87   |
| Yokota T | RNAi-Based Inhibition<br>Specific for Mutant Alleles in<br>Autosomal Dominant Diseases:<br>Sequence- Dependent and<br>-Independent Discrimination of<br>Mutant and Wild-Type Alleles<br>by siRNA. | Taira K,<br>Kataoka K,<br>Niidome T | Non-viral Gene<br>Therapy: Gene<br>Design and<br>Delivery. | Springer-<br>Verlag | Tokyo | 2005 | 398-404 |

## 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  |
|--|---|--------------------------------|-----------|-----------------|------|
| 水澤英洋   | RNA 干渉 神経疾患治療の新しいテク<br>ノロジー   | 神経研究の進歩                        | 49<br>(6) | 915-920         | 2005 |
| Saito Y, Yokota T, Mitani<br>T, Anzai M, Miyagishi<br>M, Taira K, Mizusawa H                           | Transgenic siRNA halted amyotrophic<br>lateral sclerosis in a mouse model.  | J Bio l chem                   | 280       | 42826-<br>42830 | 2005 |
| Hori S, Ohtsuki S,<br>Ichinowatari M, Yokota<br>T, Kanda T, Terasaki T                                 | Selective gene silencing of rat<br>ATP-binding cassette G2 transporter in an<br>in vitro blood-brain barrier model by short<br>interfering RNA. | J Neurochem                    | 93        | 63-71           | 2005 |
| Kubodera T, Yokota T,<br>Ishikawa K, Mizusawa H  | New RNAi strategy for selective<br>suppression of mutant allele in<br>polyglutamine disease.  | Oligonucleotides               | 15        | 298-302         | 2005 |
| Akashi H, Miyagishi M,<br>Yokota T, Watanabe T,<br>Hino T, Nishina K,<br>Kohara M, Taira K             | Escape from the interferon response<br>associated with RNA interference using<br>vectors that encode long modified<br>hairpin-RNA.              | Mol Bio Sys                    | 1         | 382-390         | 2005 |
| Hino T, Yokota T, Ito S,<br>Nishina K, Kang Y-S,<br>Mori S, Hori S, Kanda T,<br>Terasaki T, Mizusawa H | In vivo delivery of small interfering RNA<br>targeting brain capillary endothelial cells.   | Biochem<br>Biophys Res<br>Com. | 340       | 263-267         | 2006 |
| Mitani T, Yokota T   | RNA interference as a tool for producing<br>knockdown mice.   | J Mamm Ova<br>Res              | 22        | 139-151         | 2005 |
| 横田隆徳   | RNAi の神経変性疾患治療への応用  | 細胞工学                           | 24<br>(4) | 378-382         | 2005 |
| 横田隆徳   | RNA 干渉を用いた神経疾患の遺伝子治<br>療  | 脳神経外科速報                        | 15<br>(8) | 765-770         | 2005 |
| 横田隆徳   | RNA 干渉による神経変性疾患の遺伝子<br>治療の現状  | Curr Insight<br>Neurol Sci     | 13<br>(3) | 8-9             | 2005 |
| 横田隆徳   | RNAi を用いたウイルス複製抑制   | ウイルス                           | 55<br>(1) | 1-8             | 2005 |

| 発表者氏名   | 論文タイトル名   | 発表誌名                          | 巻号  | ページ         | 出版年  |
|---|---|-------------------------------|-----|-------------|------|
| Miyagishi M, Taira K  | siRNA becomes smart and intelligent.  | Nature Biotech.               | 23  | 946-947     | 2005 |
| Saitoh T, Miyagishi M, et al.   | A20 is a negative regulator of IFN regulatory factor 3 signaling.   | J Immunol.                    | 174 | 1507-1512   | 2005 |
| Matsumoto S, Miyagishi M, et al.  | Analysis of double-stranded RNA-induced apoptosis pathways using interferon-response noninducible small interfering RNA expression vector library.                              | J. Biol. Chem                 | 280 | 25687-25696 | 2005 |
| Ito M, Miyagishi M, et al.  | Genome-wide application of RNAi to the discovery of potential drug targets.   | FEBS Lett.                    | 579 | 5988-5995   | 2005 |
| Sumimoto H, Miyagishi M, et al.   | Gene therapy for human small-cell lung carcinoma by inactivation of Skp-2 with virally mediated RNA interference.   | Gene Ther                     | 12  | 95-100      | 2005 |
| Tsuji A.B., Miyagishi M, et al.   | A fast, simple method for screening radiation susceptibility genes by RNA interference.   | Biochem Biophys Res Commun.   | 333 | 1370-1377   | 2005 |
| Jazag A, Miyagishi M, et al.  | Smad4 silencing in pancreatic cancer cell lines using stable RNA interference and gene expression profiles induced by transforming growth factor-beta.                          | Oncogene                      | 24  | 662-671     | 2005 |
| Guleng B, Miyagishi M, et al.   | Blockade of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis attenuates in vivo tumor growth by inhibiting angiogenesis in a vascular endothelial growth factor-independent manner. | Cancer Res.                   | 65  | 5864-5871   | 2005 |
| Ohta M, Miyagishi M, et al.   | p53-Independent negative regulation of p21/cyclin-dependent kinase-interacting protein 1 by the sonic hedgehog-glioma-associated oncogene 1 pathway in gastric carcinoma cells. | Cancer Res.                   | 65  | 10822-10829 | 2005 |
| Amino T, Orimo S, Itoh Y, Takahashi A, Uchiyama T, Mizusawa H   | Profound cardiac sympathetic denervation occurs in Parkinson disease  | Brain Pathol                  | 15  | 29-34       | 2005 |
| Ishida K, Wada Y, Tsunemi T, Kanda T, Mizusawa H  | Marked hypertrophy of the cauda equina in a patient with chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy presenting as lumbar stenosis                                | J Neurol                      | 252 | 239-240     | 2005 |
| Toru S, Yokota T, Tomimitsu H, Kanouchi T, Yamada M, Mizusawa H   | Somatosensory-evoked cortical potential during attacks of paroxysmal dysesthesia in multiple sclerosis  | European Journal of Neurology | 12  | 233-234     | 2005 |
| Tsuchiya K, Murayama S, Mitani K, Oda T, Arima K, Mimura M, Nagura H, Haga C, Akiyama H, Yamanouchi H, Mizusawa H | Constant and severe involvement of Betz cells in corticobasal degenerarion is not consistent with pyramidal signs: a clinicopathological study of ten autopsy cases             | Acta Neuropathol              | 109 | 353-366     | 2005 |

| 発表者氏名   | 論文タイトル名   | 発表誌名                    | 巻号  | ページ     | 出版年  |
|---|---|-------------------------|-----|---------|------|
| Ishikawa K, Toru S, Tsunemi T, Li M, Kobayashi K, Yokota T, Amino T, Owada K, Fujigasaki H, Sakamoto M, Tomimitsu H, Takashima M, Kumagai J, Noguchi Y, Kawashima Y, Ohkoshi N, Ishida G, Gomyoda M, Yoshida M, Hashizume Y, Saito Y, Murayama S, Yamanouchi H, Mizutani T, Kondo I, Toda T, Mizusawa H | An autosomal dominant cerebellar ataxia linked to chromosome 16q22.1 is associated with a single-nucleotide substitution in the 5' untranslated region of the gene encoding a protein with spectrin repeat and rho guanine-nucleotide exchange-factor domains | Am J Hum Genet          | 77  | 280-296 | 2005 |
| Owada K, Ishikawa K, Toru S, Ishida G, Gomyoda M, Tao O, Noguchi Y, Kitamura K, Kondo I, Noguchi E, Arinami T, Mizusawa H   | A clinical, genetic, and neuropathologic study in a family with 16q-linked ADCA type III  | Neurology               | 65  | 629-632 | 2005 |
| Sakamoto M, Uchihara T, Nakamura A, Mizutani T, Mizusawa H  | Progressive accumulation of ubiquitin and disappearance of $\alpha$ -synuclein epitope in multiple system atrophy-associated glial cytoplasmic inclusions: triple fluorescence study combined with Gallyas-Braak method                                       | Acta Neuropathol        | 110 | 417-425 | 2005 |
| Hachiya N S, Ohkubo T, Kozuka Y, Yamazaki M, Mori O, Mizusawa H, Sakasegawa Y, Kaneko K   | More than a 100-fold increase in immunoblot signals of laser-microdissected inclusion bodies with an excessive aggregation property by oligomeric actin interacting protein 2/D-lactate dehydrogenase protein 2   | Analytical Biochemistry | 347 | 106-111 | 2005 |

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

## 5 RNAiの神経疾患への応用

横田隆徳\*<sup>1</sup>, 仁科一隆\*<sup>2</sup>

### 5.1 はじめに

RNA干渉 (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  $10^{2 \sim 5}$  (自験) 高いとされている。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 ライブラリーをはじめとする創薬におけるツールといった側面と、short interfering RNA (siRNA) を直接核酸医薬として疾患に適応するという2つの方面から行われている。siRNAを用いた遺伝子治療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。ここでは、siRNAの核酸医薬としての開発の研究現状と問題点について概説するとともに、神経疾患を中心について概説したい。

### 5.2 siRNAの特異性: 変異遺伝子特異的な siRNA

遺伝性疾患やがん遺伝子を 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

#### siRNA 1塩基変異による抑制効率の変化

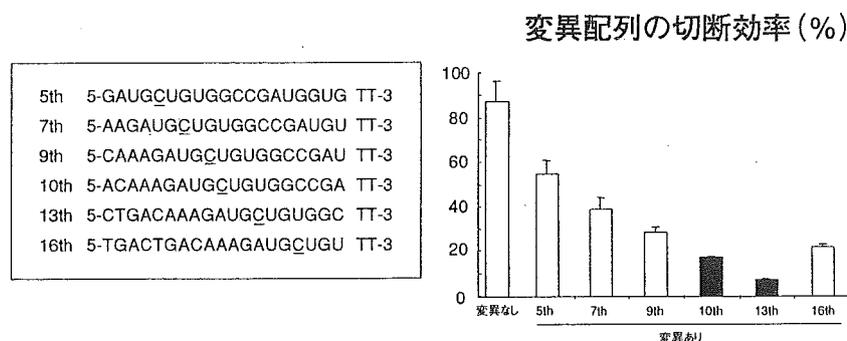


図1 siRNAへの標的遺伝子とのミスマッチ変異挿入位置による siRNA 効果への影響

家族性筋萎縮性側索硬化症の遺伝子変異である G93ASOD1 (点変異 G → C, 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。

\*1 Takanori Yokota 東京医科歯科大学 医歯学総合研究科 脳神経病態学(神経内科)  
助教授

\*2 Kazutaka Nishina 東京医科歯科大学 医歯学総合研究科 脳神経病態学(神経内科)  
大学院生

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'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）と働き、基質の認識としては3'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<sup>1)</sup>。我々の経験でも中央から3'側よりの配列により基質認識特異性があるようである（図1）。

### 5.3 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、ターゲット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叉反応が報告されている<sup>2)</sup>。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<sup>2)</sup>、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。最近 off-target 効果を配列上から推定するシステムが次々に開発されており、10 遺伝子以内に絞り込めそうだが、これとてあくまで目安であり、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、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<sup>3)</sup>。

### 5.4 神経疾患への応用：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）、C 型・B 型肝炎ウイルス、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。我々も C 型肝炎で有効な siRNA を開発し<sup>4)</sup>、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 TSG101<sup>5)</sup> や NF $\kappa$ B p65<sup>6)</sup> 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<sup>7)</sup>。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 vitro* で T リンパ球になり、その両者ともに HIV ウイルスに抵抗性になったとの報告がされ、今後の臨床応用に期待が持たれている。

一方、IL-1 や TNF  $\alpha$  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<sup>8)</sup>。

### 5.5 神経疾患への応用：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。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はじ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。SOD1 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、APP や PS1 遺伝子変異による Alzheimer 病、 $\alpha$ -synuclein 変異による Parkinson 病などの

#### SOD1-siRNA TgM と SOD1<sup>G93A</sup>TgM の掛け合わせ

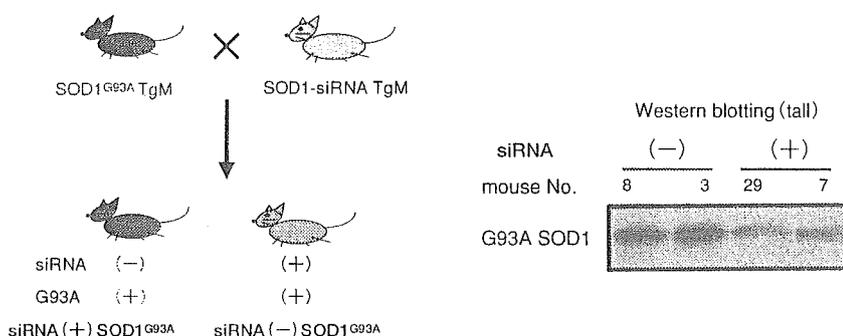


図2 SOD1<sup>G93A</sup> トランスジェニックマウスの遺伝子治療

SOD1 に対する siRNA を過剰発現させたトランスジェニックマウスを ALS のモデルマウスである G93A 変異 SOD1 トランスジェニックマウスと掛け合わせるにより (左)、変異 SOD1 タンパクの発現を 80% 以上抑制することに成功した (右)。6 月齢の時点で ALS 症状の発症は完全に抑制されている。

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、変異したタンパクの発現を抑制する方法があれば、その機序の如何にかかわらず発症、進行を防止することが期待できるわけである。最近、SCA1 のトランスジェニックマウスの小脳に 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<sup>9)</sup>。我々は SOD1 に対する siRNA を過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製して、これを ALS のモデルマウスである G93A 変異 SOD1 トランスジェニックマウスと掛け合わせ、全身の変異 SOD1 タンパクの発現を 80% 以上抑制することに成功した (図2)。この効果により、6 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瞭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 チャンネル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、正常アレルの発現抑制は新たな症状をきたす可能性が高い。したがって、優性遺伝疾患の治療には、正常アレルの発現を損わずに、変異アレル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レルと変異アレルの配列の差を認識して変異アレルのみを切断できる siRNA の作製は可能である。図 3 に家族性 ALS の原因遺伝

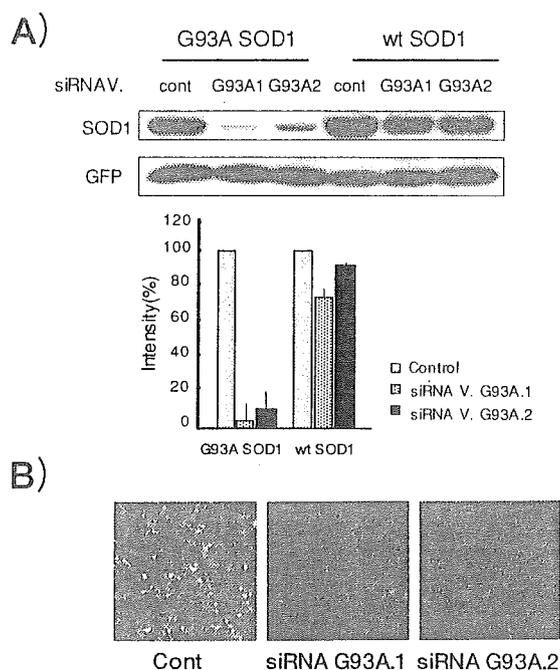


図3 変異 SOD1 に特異的に作用する siRNA

- A) 293T 細胞に G93A または野生型 SOD1 発現ベクターと siRNAG93A1, 2 を共発現させ、野生型及び変異 SOD1 の発現をウエスタンブロットした。siRNAG93A1, 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 より改変転載)