

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<sup>10)</sup>。同様の報告は捻転 dystonia<sup>11)</sup> や frontotemporal dementia<sup>12)</sup> 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な siRNA がデザインできるわけではない。我々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様に、繰り返し配列の長さがかわることが変異である場合は、この伸長し

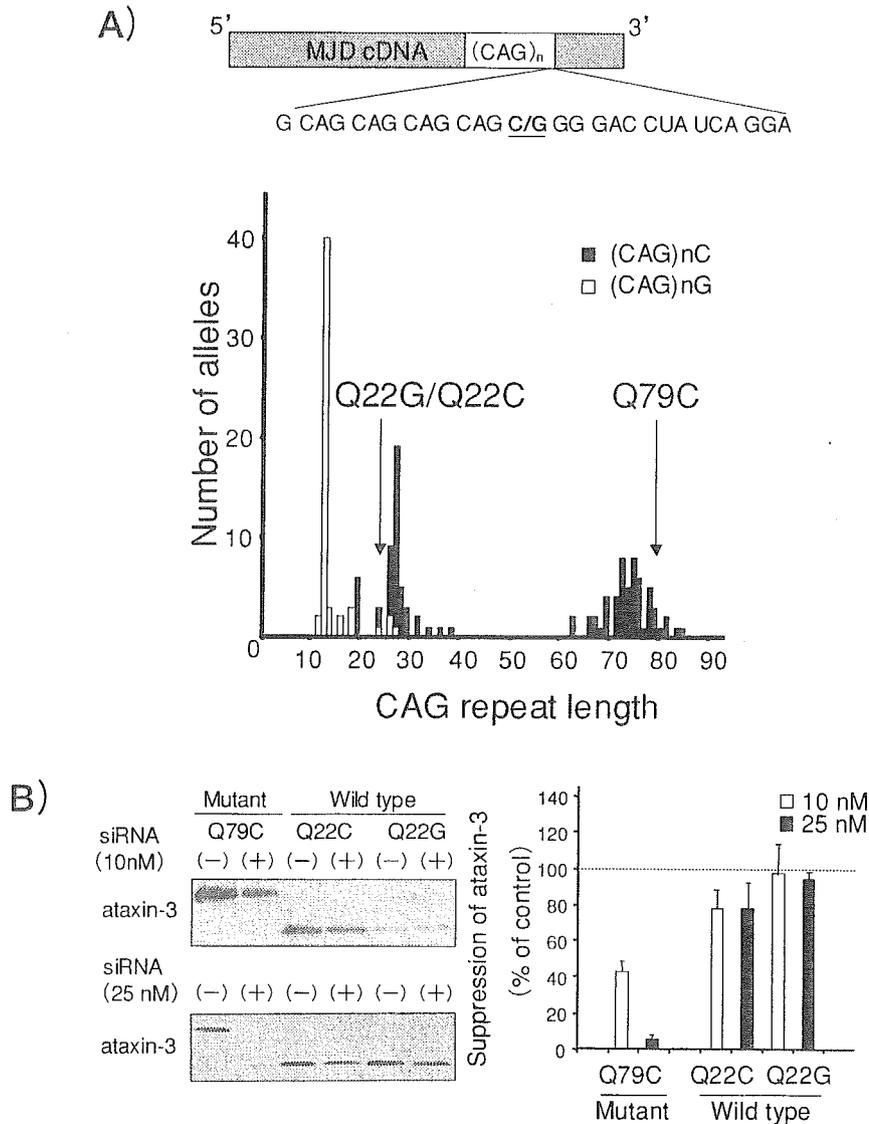


図4 Machado-Joseph (MJD) RNA に対する配列変異アリル特異的な 1 次配列非依存的な siRNA の切断

A) 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 C で、正常アリルでは G/C が同頻度で見られる。

B) 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のもう 1 つの正常アリル (Q22C) もわずかにしか切断しなかった (文献 13 より改変転載)。

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。Machado-Joseph 病 (SCA3) の場合, CAG リピートの直下の下流に C/G の polymorphrism 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レルはすべて C だが, 短い繰り返しを持つ正常アレルでは約半数の例で G である<sup>12, 13)</sup> (図 4A)。そこで我々はこの C/G の polymorphrism の標的として siRNA を設計して, 病的アレルに特異的な siRNA を作製した。ところが驚いたことにこの siRNA は polymorphrism が変異アレルと同じ C である短い CAG リピートの正常アレルもあまり切断しなかった (図 4B)<sup>13)</sup>。この機序は不明だが, CAG リピート長の変化に伴う RNA の 2 次構造の変化や MJD RNA の polymorphrism 付近に結合する RNA 結合タンパク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。

## 5.6 神経疾患への応用：孤発性神経変性疾患

ほとんどの Alzheimer 病, Parkinson 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。たとえば, Alzheimer 病の  $\beta$  セクレターゼは有望な標的分子である<sup>14)</sup>。Alzheimer 病のモデル動物は A $\beta$  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, 認知障害も軽減し得たと報告されている。最近の欧米で進められている臨床治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 Alzheimer 病の発症機序に従来から言われてきた A $\beta$  仮説を大きく支持するもので, A $\beta$  の産生を抑制することが治療のターゲットとなる。A $\beta$  はアミロイド前駆タンパク APP から  $\beta$  と  $\gamma$  セクレターゼによって切り出されて生成される。PS1 など

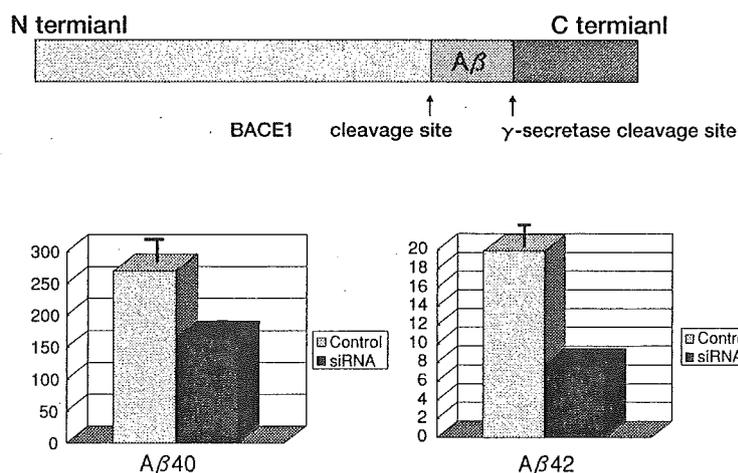


図5 孤発性アルツハイマー病に対する siRNA による治療

APPsw 安定発現培養細胞株において BACE1 に対する siRNA により培養液中に分泌される A $\beta$  産生を抑制した。

からなる  $\gamma$  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、 $\beta$  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の異常を示さない。我々も BACE1 に対する siRNA を作製して、培養細胞系で A $\beta$  産生を抑制できることを示した (図5)。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、画期的な治療方法になるかも知れない。

### 5.7 siRNA の *in vivo* へのデリバリー

siRNA は細胞質で RISC に取り込まれて切断活性を発揮することより、siRNA のデリバリーは細胞膜さえ越えればよく、遺伝子治療によく使われる発現 DNA ベクターのように核にアクセスする必要がない。McCaffrey<sup>15)</sup> らはマウスの尾静脈から 10-50  $\mu$ g の合成 siRNA を体重の 5-10% の大量の PBS 溶液で 5-7 秒の短時間で注入するハイドロダイナミックス導入法で、マウスの肝細胞に siRNA の導入に成功した。さらに最近このハイドロダイナミックス導入法で導入された Fas<sup>16)</sup> や caspase 8 に対する合成 siRNA で、マウスに誘発された激症肝炎による死亡率を低下させたとの報告がされた。このハイドロダイナミックス導入法をそのまま臨床応用することは難しいが、siRNA が *in vivo* で有効に作用することを示した重要な報告である。ハイドロダイナミックス導入法により、siRNA は肝臓以外に腎臓、脾臓、肺、すい臓に導入可能であることが報告されているが<sup>17)</sup>、脳血管関門のために中枢神経系には入らない。しかし、ハイドロダイナミックス導入法はその臓器組織への圧力と循環系への用量負荷のために、ヒトへの応用は難しい。最近、siRNA のセンス鎖の 3' 末端にコレステロールを結合させることにより、通常の方法の静脈注射でも肝臓と腸管への導入が可能であることが示された<sup>18)</sup>。さらに最近、毒性の少なく導入効率の高いカチオン性ベクターが開発され、がん細胞を標的にした場合 *in vivo* で有効な結果がでており<sup>19)</sup>、期待されている。

長期の抑制効果にはウイルスベクターが必要となる。ヘアピン型 siRNA 発現ベクターコンストラクトをアデノウイルスやレンチウイルス、レトロウイルス、アデノ随伴ウイルス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* の細胞への siRNA 導入の報告が次々とされている<sup>20)</sup>。特に最近開発されたアデノ随伴ウイルスの新しい血清型 8 型 (AAV-8) は非常に高い遺伝子導入効率があり、1 部ではあるが中枢神経へのデリバリーも可能との報告もされて期待されている<sup>21)</sup>。

しかし、これらのいずれの方法でも静脈注射などの全身性の投与で siRNA を脳血管関門を越えて中枢神経系にデリバリーすることができず、siRNA による神経疾患治療の大きな問題になっている。最近我々は脳血管内皮細胞への siRNA の導入に成功し、脳血管障害、多発性硬化症への応用をスタートした。

## 5.8 実験プロトコール

### 5.8.1 Hydrodynamics 法を用いたマウスへの siRNA 発現プラスミド DNA の投与

マウス (週齢・体重をできるだけ揃えておく)

2.5ml または 5ml のシリンジ (ロックつきを推奨)

保定器 (なければ 50ml のファルコンチューブの蓋と先端に穴を開けたものでも可)

針 (種によって異なるが 23-29G)

サンプル

ルシフェラーゼを発現する plasmid DNA (ウミシイタケ・ホタルのいずれでも可)

生理食塩水

麻酔 (エーテル, イソフルレンなど)

- ① マウスに軽くジエチルエーテルの蒸気で麻酔をかけ、体重を量り、保定器に入れる。必要に応じて持続時間の長い麻酔を使用する。ただしこの場合は循環動態に影響を及ぼすことがあるため、血圧など循環動態にできるだけ作用しない薬剤を使用したほうがよい (イソフルレンなど)。
- ② シリンジにサンプルを用意する。その際、目的とするサンプル以外にマーカーとしてルシフェラーゼ (Luciferase) を発現する plasmid DNA を  $5\mu\text{g}$  程度混入しておく。サンプルとルシフェラーゼを混入した時点で生理食塩水を加えて、体重の 5~10% 量を目安に PBS で希釈する。
- ③ 尾の両側にある静脈を確認 (やや紫色) し、アルコール綿で数回こすった後、よく圧迫して静脈を怒張させる。この際、両側の静脈のみ圧迫して、動脈はできるだけ圧迫しない。怒張が弱ければ温めてできるだけ怒張させるようにする。
- ④ 針を刺入し、針穴が見えなくなったあたりでとめて、5~7秒で注射する。この際、圧が高くなり、針とシリンジの接続が弱いと漏れてしまうため、ロック式のシリンジを使用する。また 2~3秒で注射するなど速すぎると肝臓などで内出血を生じることがある。また体重の 10% 程度の容量負荷でも心負荷が強くなり、死亡することもある。
- ⑤ 静注後は早めに保定器から外に出す。1分ほどマウスを観察して、ケージに戻す。

### 5.8.2 臓器の採取と RNAi 効果の評価

静注後のマウス

23G の翼状針

生理食塩水

4% パラホルム溶液

ハサミ

ピンセット

麻酔 (ジエチルエーテル, ネンブタールなど)

10-30ml のシリンジ2本

マウス固定用の台

- ① 静注後 siRNA が発現するまで待ち，ジエチルエーテルの蒸気で麻酔をかけて，ネンプタールを腹腔内注射する（30g のマウスで 30-50  $\mu$ l 程度）。
- ② 昏睡状態となったことを確認して，腹腔内臓器を傷つけないように注意しながら開腹する。
- ③ 胸部臓器を傷つけないようにしながら横隔膜を切開後，両側肋骨を切除する。
- ④ 10～20ml のシリンジに生理食塩水を入れて翼状針を接続して，心尖部から左心室に翼状針を刺入する。
- ⑤ 右心耳を切開後，シリンジを押し込む。右心耳から流出する血液が生理食塩水に置換するまで生理食塩水を注入する。
- ⑥ 翼状針を抜き，必要な臓器を採取する。この際肝臓は必ず採取するようにする。
- ⑦ 肝臓の一部を切り取り，ホモジネイトして，ルシフェラーゼアッセイを行う。ルシフェラーゼが発現していれば，Hydrodynamics 法が成功したという指標になる。
- ⑧ それぞれの臓器でウエスタンブロッティングなどの解析を行う。

〈実験例1〉

我々は ICR マウスに対して hydrodynamics 法を用いて外来遺伝子を導入した。まず，ウミシイタケルシフェラーゼ (*renilla* Luciferase) を発現する plasmid DNA (pHRG-TK Vector: PROMEGA) を，ICR マウスの尾静脈から体重の 10% 量の生理食塩水とともに静注した。48 時間後肝臓を取り出し，ウミシイタケルシフェラーゼとホタルルシフェラーゼ (*firefly* Luciferase) の活性を測定した。Control として体重の 10% 量の PBS のみを静注したマウスの肝臓で同様に両ルシ

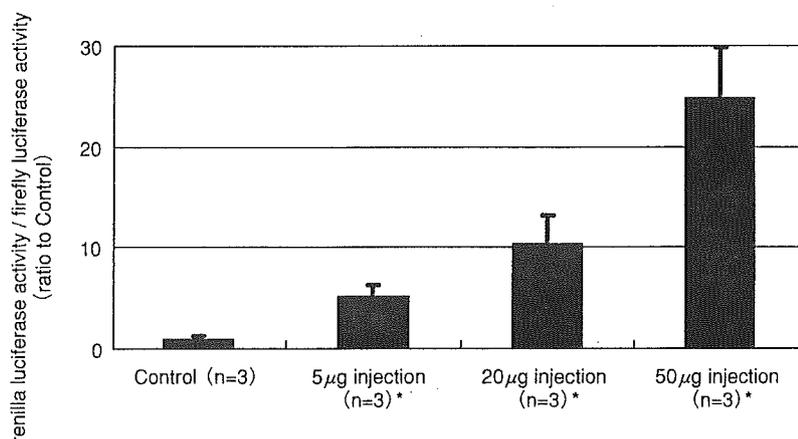


図6 plasmid DNA をいずれも大量の PBS 溶液とともに全身投与したところ，用量依存性に肝臓内でのウミシイタケルシフェラーゼ活性の上昇が認められた。（\* $p < 0.01$ ）

フェラーゼ活性の測定を行い、両者を比較した。結果を図6に示した。

次に、ICRマウスに対して外来遺伝子と同時に外来遺伝子を抑制する siRNA を導入するため、以下の4種を用意した。

- |  |            |
|--|------------|
| ①ウミシイタケルシフェラーゼを発現する plasmid DNA (phRG-TK Vector)   | 2 $\mu$ g  |
| ②ホタルルシフェラーゼを発現する plasmid DNA (pGL3-Control Vector) | 10 $\mu$ g |
| ③ホタルルシフェラーゼ発現を抑制する siRNA                           | 40 $\mu$ g |
| ④ホタルルシフェラーゼ以外の遺伝子に対する siRNA                        | 40 $\mu$ g |

このうち①+②+③をICRマウスの尾静脈から体重の10%量のPBSとともに静注して48時間後肝臓を取り出し、ウミシイタケルシフェラーゼとホタルルシフェラーゼの活性を測定した。Controlとして①+②+④を静注したマウスの肝臓で同様に両ルシフェラーゼ活性の測定を行い、両者を比較した。結果を図7に示した。

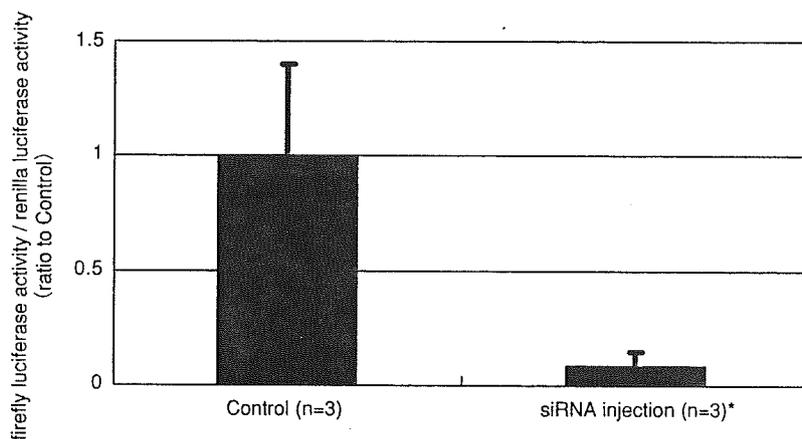


図7 plasmid DNAと siRNA をいずれも大量のPBS溶液とともに静注したところ、肝臓内での著明なホタルルシフェラーゼ活性の抑制効果が認められた。投与した siRNA が肝細胞内 (*in vivo*) で極めて有効に作用したものと考えられる。(\*p<0.05)

## 5.9 おわりに

siRNA は遺伝性神経変性疾患においてその変異遺伝子自体を治療するといった究極の遺伝子治療を旨と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、キーとなる分子は判明して siRNA による治療戦略は立ち始めた。ウイルス性神経疾患、脳血管障害、多発性硬化症への応用も可能である。問題点として off-target effect などの安全性の問題やデリバリーの方法などがあげられている。特に神経疾患を対象とした場合は、さらに血液脳関門と神経細胞ヘデリバリーという2つの障害がある。しかし、siRNA の遺伝子抑制効果は顕著

で、その機序は急速に解明され、基礎研究は爆発的に進んでいる。したがって、非常に近い将来に、難治性疾患での新しい治療法の開発にsiRNAの利用が突破口になることに十分に期待したい。

文 献

- 1) Amarzguiou M, *et al.*, *Nucleic. Acids. Res.*, **31**, 589-595 (2003)
- 2) Jackson A L, *et al.*, *Nature Biotechnol.*, **21**, 635-637 (2003)
- 3) Bridge A J, *et al.*, *Nature Genet.*, **34**, 263-264 (2003)
- 4) Yokota T, *et al.*, *EMBO Rep.*, **4**, 602-8 (2003)
- 5) Garrus JE, *et al.*, *Cell*, **107**, 55-65 (2001)
- 6) Surabhi RM, *et al.*, *J. Virol.*, **76**, 12963-12973 (2002)
- 7) Arteaga HJ, *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, **21**, 230-231 (2003)
- 8) Sorensen DR, *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **327**, 761-766 (2003)
- 9) Xia H, Mao Q, *et al.*, *Nat. Med.*, **10**, 816-820 (2004)
- 10) Yokota T, *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **314**, 283-291 (2004)
- 11) Gonzalez-Alegre P, *et al.*, *Ann. Neurol.*, **53**, 781-787 (2003)
- 12) Miller VM, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **100**, 7195-200 (2003)
- 13) Li Y, *et al.*, *Ann. Neurol.*, **56**, 124-129 (2004)
- 14) Kao SC, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **279**, 1942-1949 (2004)
- 15) McCaffrey AP. *et al.*, *Nature*, **418**, 38-39 (2002)
- 16) Song E, *et al.*, *Nature Med.*, **9**, 347-351 (2003)
- 17) Lewis DL, *et al.*, *Nat. Genet.*, **32**, 107-108 (2002)
- 18) Soutschek J, Akinc A, *et al.*, *Nature*, **432**, 173-178 (2004)
- 19) Yano J, *et al.*, *Clin Cancer Res*, **10**, 7721-7726 (2004)
- 20) Davidson B, *et al.*, *Lancet Neurol.*, **3**, 145-149 (2004)
- 21) Nakai H, *et al.*, *J. Virol.*, **79**, 214-224 (2005)

# RNAi-Based Inhibition Specific for Mutant Alleles in Autosomal Dominant Diseases: Sequence-Dependent and -Independent Discrimination of Mutant and Wild-Type Alleles by siRNA

TAKANORI YOKOTA

## 1 Introduction

In autosomal recessive diseases, the protein products of the mutant genes are either not expressed (null mutation) or lose their function. In contrast, in autosomal dominant diseases the protein encoded by the mutant gene usually induces disease due to its toxic property. This “gain of toxic function” of a mutant protein is predicted to cause cell death in autosomal-dominant neurodegenerative diseases characterized by a missense point mutation, such as occurs in familial amyotrophic lateral sclerosis, familial Alzheimer disease, prion-induced disease, familial Parkinson’s disease, and familial amyloid neuropathy. For all these familial diseases, a rational approach to therapy is to develop a method to specifically eliminate the aberrant protein by RNA interference (RNAi), even if the various mechanisms of cell death are unknown.

RNA interference is the process of sequence-specific, post-transcriptional gene silencing, initiated by double-stranded RNA (dsRNA). This is a multi-step process that involves the generation of 21- to 23-nt small interfering RNA (siRNA) and results in the degradation of the homologous RNA (Elbashir et al. 2001a). The siRNA is long enough to mediate gene-specific suppression, but short enough to evade the adverse fates of long dsRNA in mammalian cells (Elbashir et al. 2001a), and is expected to be a powerful tool for gene therapy of human diseases. In autosomal dominant disease, a most effective therapeutic approach requires effective reduction or elimination of the aberrant mutant protein while leaving the wild-type protein intact. In this chapter, we describe a method to identify the point mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and the expanded CAG repeat in Machado-Joseph disease.

## 2 Optimal Location of a Mutation for Discriminating Among Point Mutations in Familial ALS

In order to search for the best position for discriminating a point mutation, we examined the suppression effects of several siRNAs targeted to G93A SOD1, the mutation

---

Department of Neurology and Neurological Science, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Tokyo

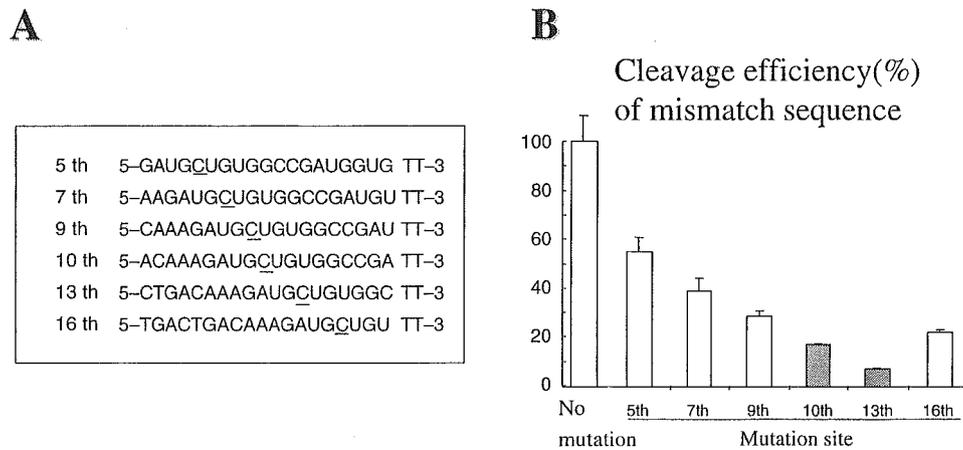


FIG. 1. Effect of a mutation caused by single-nucleotide mismatch in the sense strand on cleavage activity of siRNA. *Underlined C* is the mismatched RNA

causing familial ALS, on the expression of wild-type SOD1 (Fig. 1A). SOD1 expression was monitored by subcloning the coding sequence of wild-type SOD1 cDNA into the 5' end of the luciferase gene (pGL3-control, Pronega). By changing the mismatch within the region between the fifth and the sixteenth nucleotides from the 5' end, the mismatch in siRNA at the thirteenth position was found to cause the greatest decrease in the cleavage activity of the siRNA (Fig. 1B).

### 3 siRNA Specific for G93A SOD1 with Point Mutation in Familial ALS

The siRNAs were demonstrated to cleave the G93A SOD1 mutant, leaving the wild-type intact. The results of two siRNAs targeting G93A SOD1 and corresponding to regions 277–297 (siRNA G93A.1) and 275–294 (siRNA G93A.2) are shown in Fig. 2. Western blot analysis revealed that the siRNA G93A.2 reduced the expression of G93A SOD1 protein by about 90% when expression efficiency was adjusted to that of co-transfected GFP (Fig. 2A). The suppression of G93A SOD1 protein by siRNA G93A.2 increased in a dose-dependent manner when the amount of siRNA was increased from 2.5 to 125 nM (data not shown). The siRNA was able to recognize an alteration of only one nucleotide, because it wild-type SOD1 protein was suppressed to a much lesser extent than G93A SOD1. This was especially the case for siRNAG93A.2, which reduced expression of the wild-type by only 1.8% (Fig. 2A, B). The suppression effect was confirmed by the reduction in GFP fluorescence when siRNA was co-transfected with a GFP-fused SOD1-expressing plasmid (Fig. 2C), using DsRed fluorescence as a control for transfection efficiency (data not shown).

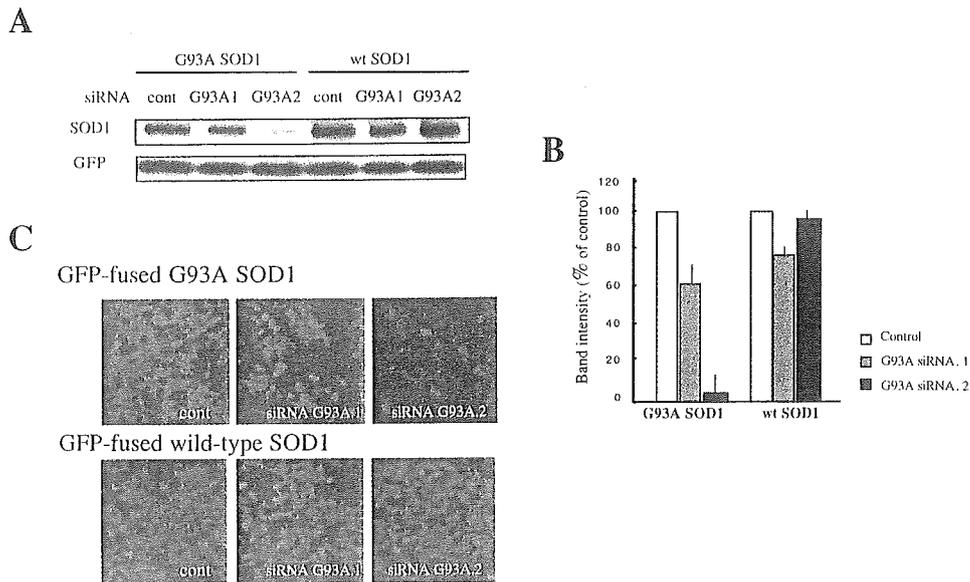


FIG. 2. Effect of siRNA G93A.1 and .2 on G93A and wild-type SOD1 proteins expressed in 293T cells as detected by Western blotting (A), and GFP fluorescence (C). B Percentages of band intensity with siRNA G93A.1 compared to that with each mock transfection. siRNA G93A.2 is more specific for cleaving G93A SOD1 RNA. Values are the mean and SEM. GFP cDNA was fused with G93A SOD1 gene in the expression plasmids (C). The expression level of the target protein was adjusted according to the expression level of co-transfected GFP (B) and DsRed fluorescence (data not shown). Data obtained at 48h after transfections

#### 4 siRNA Specific for the Mutant Allele in Machado-Joseph Disease Using a Polymorphism Related to CAG Repeat Length

There is a C/G polymorphism just after the CAG repeat tract in the Machado-Joseph (MJD)1 gene. Mutant alleles are always (CAG)<sub>n</sub>C, whereas normal alleles have both (CAG)<sub>n</sub>G and (CAG)<sub>n</sub>C at similar frequencies (Fig. 3). Several siRNAs were designed to target the MJD1 RNA sequence, including this C/G polymorphism (data not shown). The siRNA with a mismatch at the eleventh nucleotide from the 5' end of the sense sequence was best able to discriminate between mutant and wild-type MJD1 RNAs.

The mutant MJD1 gene product (ataxin-3), Q79C, was most effectively suppressed by 25 nM of the MJD siRNA MJD. Western blotting showed a 96% decrease in signal intensity compared with the control (Fig. 4). In contrast, expression of the wild-type ataxin-3, Q22G, was hardly suppressed by the siRNA.

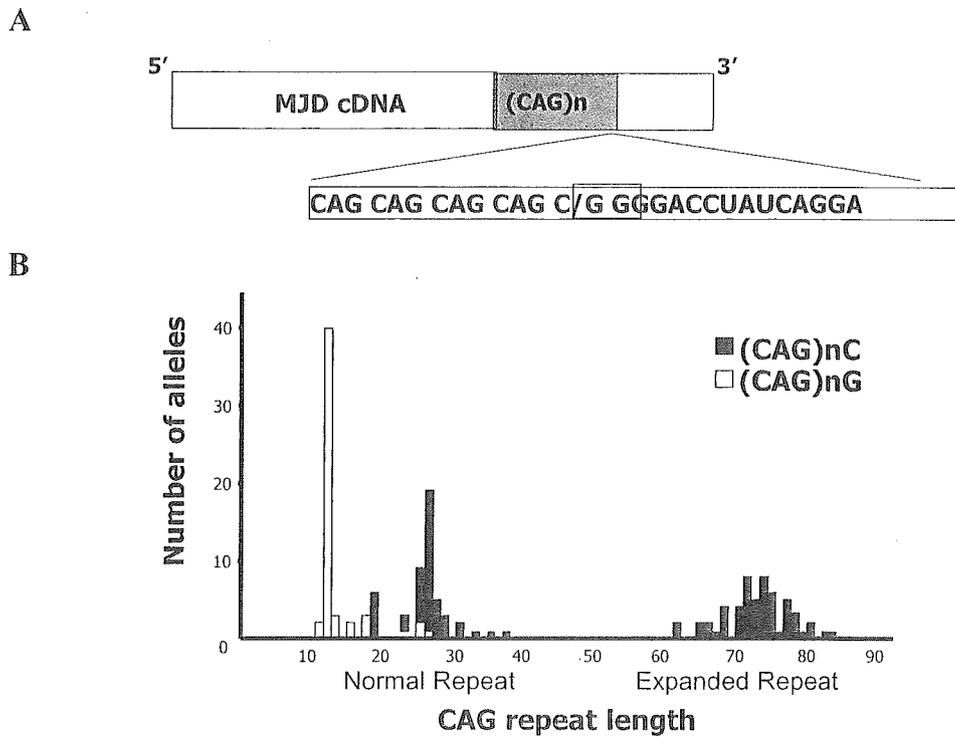


FIG. 3. C/G polymorphism following the CAG repeat of the MJD1 gene (A) and its bias in frequency in mutant and wild-type alleles in 56 Japanese MJD patients (B)

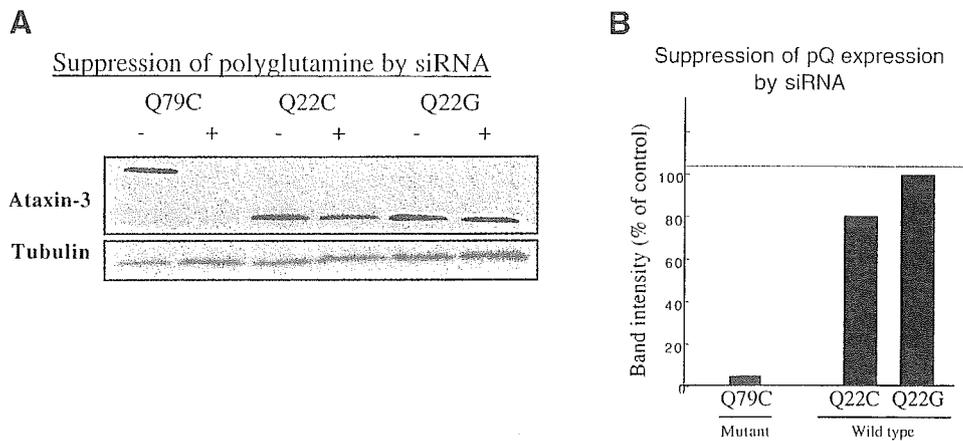


FIG. 4A,B. Specific effect of siRNA on the expression of mutant MJD1. A Comparison of the effect of siRNA MJD3 on Q79C, Q22G, and Q22C expression. Western blot analysis of the effect of siRNA MJD3 at 25 nM on Q79C, Q22G, and Q22C expression. The results of siRNA(-) were obtained with siRNAs with randomized sequences. B Quantitation of signal intensities. Percentage suppression was determined by comparison with the band intensity of the control. Values are the mean and SEM. Almost no suppression of Q22G expression (5.9%), and mild suppression of Q22C expression (22.5%) were noted using siRNAMJD at 25 nM siRNA, in contrast to robust suppression of Q79C expression (96.0%)

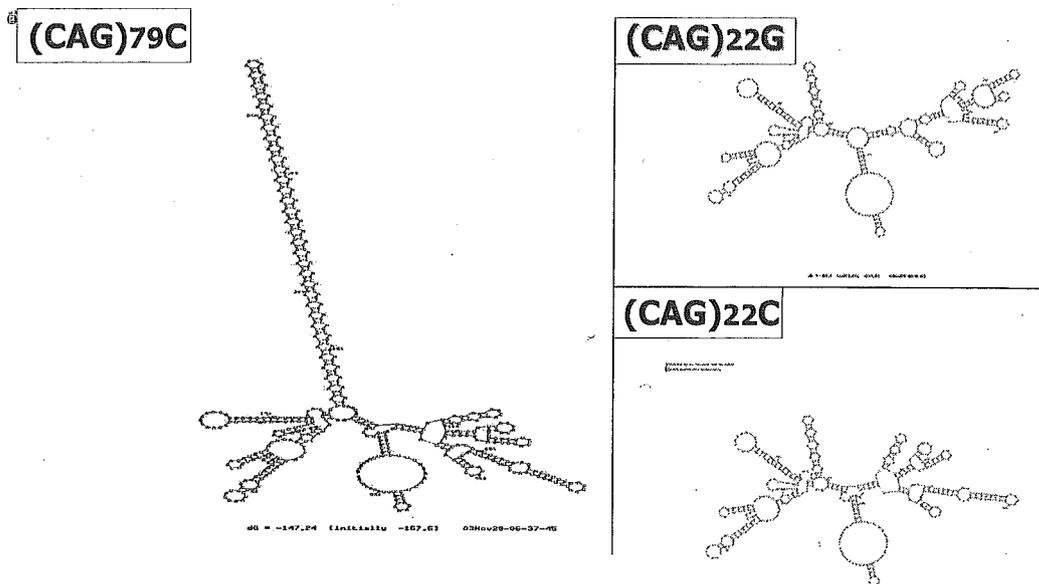


FIG. 5. Secondary structures of (CAG)79C, (CAG)79G, and (CAG)79C mRNA

## 5 Sequence-Independent Discriminations of Mutant and Wild-Type Alleles by siRNA

Unexpectedly, MJD siRNA decreased the expression of another wild-type allele, Q22C, only slightly, although the target sequence in (CAG)79C and (CAG)22C was the same (Fig. 4, arrowhead). Figure 5 shows the secondary structure of (CAG)79C (CAG)22G and (CAG)22C RNAs. The difference in cleavage activity by the MJD siRNA between (CAG)79C and (CAG)22C might have been due to a difference in the secondary structures of the target RNAs.

## 6 Discussion

Amyotrophic lateral sclerosis is characterized by the degeneration of lower motor neurons in the spinal cord and brainstem, and degeneration of the descending motor pathway in the corticospinal tracts. Although most cases of ALS are sporadic and have an unknown etiology, 5–10% of ALS cases are familial; of these, approximately 20% are due to mutations in the gene encoding Cu,Zn superoxide dismutase (SOD1) (Rosen et al. 1993). Most of the changes in the SOD1 gene in patients with familial ALS involve a single nucleotide alternation (Radunivic et al. 1996). Recent studies with transgenic mice and cell-culture models of ALS with SOD1 mutations indicated that the mutations induce the disease by the toxic properties of the mutant proteins, and not by a loss of SOD1 activity (Cleveland et al. 1999). Since SOD1 is an important radical scavenger, discrimination of a single nucleotide mismatch is necessary to suppress expression of the mutant allele only, leaving the wild-type protein intact.

Machado-Joseph disease is an autosomal dominant neurodegenerative disorder characterized clinically by cerebellar ataxia, pyramidal and extrapyramidal signs,

peripheral neuropathy, and ophthalmoplegia. The number of CAG repeats in the normal MJD1 gene is between 13 and 36, whereas in the defective gene this range is between 62 and 84 (Kawaguchi et al. 1994). The pathogenesis of MJD is also considered to be due to a "gain of toxic function" (Ross 1995; Ikeda et al. 1996). Therefore, an effective and simple gene therapeutic approach for MJD requires reducing the amount of the aberrant mutant protein. Furthermore, it might be necessary to reduce mutant ataxin-3 selectively, leaving the wild-type protein intact, because the wild type MJD1 gene product has an important role in cell survival, such as quality control of processes in the endoplasmic reticulum (Kobayashi et al. 2002) and DNA repair (Wang et al. 2000). We found that the CAG repeat tract in the MJD1 gene is followed by a C or G, and there is extreme bias for this C/G polymorphism between mutant and normal MJD1 alleles; mutant alleles have exclusively (CAG)<sub>n</sub>C, whereas normal alleles have both (CAG)<sub>n</sub>G and (CAG)<sub>n</sub>C at similar frequencies (Matsumura et al. 1996; Gaspar et al. 2001) (Fig. 3). We engineered siRNAs to selectively cleave mutant MJD RNA by targeting the sequence including this C/G polymorphism.

Diverse effects of mismatches between siRNA and target sequences have been reported. A central single mutation, namely, a mismatch in siRNA at the tenth and eleventh positions, produces a marked decrease in siRNA cleavage activity (Elbashir et al. 2001b). Mismatches in the 5' end have a more negligible effect on siRNA cleavage activity than those more centrally located. This bias might be linked to the proposed existence of a "ruler" region in the siRNA that is used by the RISC complex to "measure" the target RNA for cleavage (Holen et al. 2002). Of the six siRNAs examined in our study, those with mismatches at positions 10 and 13 from the 5' end of the sense sequence were better able to discriminate mutations than those with outside mismatches, especially at the 5' end. Our results are consistent with those previously reported. siRNAs designed for familial ALS and MJD suppressed mutant allele expression by recognizing the point mutation in SOD1 mRNA and the C/G polymorphism in MJD1 mRNA.

Surprisingly, there were significant differences in siRNA effects on Q22C and Q79C, although the target sequences of their siRNAs were identical. This is the first report of sequence-independent discrimination of mutant and wild-type alleles by siRNA. One possible reason for this difference is that not all RNA sequences are equally accessible to siRNAs: some sequences might be buried within the secondary structure of target RNAs, especially when they are highly folded (Yoshinari et al. 2004). We also observed that the best target site of siRNA for highly folded RNA is almost the same as that for ribozyme, whose cleavage efficiency is greatly influenced by the secondary structure of the target RNA (Yokota et al. 2003). The target site of the C/G polymorphism is just downstream of the CAG repeat, the secondary structure of which, according to computer prediction, is a tight stem form. Although we have no data indicating siRNA MJD3 is more accessible to (CAG)<sub>79</sub>C than (CAG)<sub>22</sub>C, a change in the secondary structure of the MJD RNA due to a large difference of the CAG repeat length might affect the efficiency of siRNA MJD3 (Fig. 5). Another possible explanation is that there is a RNA-binding protein which preferentially binds (CAG)<sub>22</sub>C over (CAG)<sub>79</sub>C and thus interferes with the access of siRNA MJD3 to (CAG)<sub>22</sub>C RNA.

As demonstrated above, design of an siRNA specific for the mutant allele responsible for autosomal dominant disease is possible even for single-nucleotide alterna-

tions and change in the secondary structure of the mRNA. However, since these specificities are not complete, the selection of a highly effective siRNA sequence is necessary for effective discrimination between mutant and wild-type alleles. When the efficient and safe delivery of siRNA in vivo and the long-term expression of siRNA are achieved, gene therapy for autosomal dominant diseases will no longer be a dream.

## References

- Cleveland DW (1999) From Charcot to SOD1: mechanisms of selective motor neuron death in ALS. *Neuron* 24:515–520
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001a) Duplexes of 21 nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411:494–498
- Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T (2001b) Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J* 20:6877–6888
- Gaspar C, Lopes-Cendes I, Hayes S (2001) Ancestral origins of the Machado-Joseph disease mutation: a worldwide haplotype study. *Am J Hum Genet* 68:523–528
- Holen T, Amarzguioui M, Wiiger MT, Babaie E, Prydz H (2002) Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger tissue factor. *Nucleic Acids Res* 30:1757–1766
- Ikeda H, Yamaguchi M, Satoshi S, Aze Y, Narumiya S, Kakizuka A (1996) Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induced cell death in vitro and in vivo. *Nat Genet* 13:196–202
- Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M (1994) CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet* 8:221–228
- Kobayashi T, Tanaka K, Inoue K, Kakizuka A (2002) Functional ATPase activity of p97/valosin-containing protein (VCP) is required for the quality control of endoplasmic reticulum in neuronally differentiated mammalian PC12 cells. *J Biol Chem* 277:47358–47365
- Matsumura R, Takayanagi T, Murata K, Futamura N, Hirano M, Ueno S (1996) Relationship of (CAG)<sub>n</sub>C configuration to repeat instability of the Machado-Joseph disease gene. *Hum Genet* 98:643–645
- Radunovic T, Leigh PN (1996) Cu/Zn superoxide dismutase gene mutations in amyotrophic lateral sclerosis; correlation between genotype and clinical features. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 61:565–572
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP and Deng H (1993) Mutations in Cu, Zn superoxide dismutase are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362:59–62
- Ross CA (1995) When more is less: pathogenesis of glutamine repeat neurodegenerative diseases. *Neuron* 15:493–496
- Wang G, Sawai N, Kotliarova S, Kanazawa I, Nukina N (2000) Ataxin-3, the MJD1 gene product, interacts with the two human homologs of yeast DNA repair protein RAD23, HHR23A and HHR23B. *Hum Mol Genet* 9:1795–1803
- Yokota T, Sakamoto N, Enomoto Y, Tanabe Y, Maekawa, Makoto Miyagishi M, Taira K, Watanabe M, Mizusawa H (2003) Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO Rep* 4:602–608
- Yoshinari K, Miyagishi M, Taira K (2004) Effect on RNAi of the tight structure, sequence and position of the targeted region. *Nucleic Acids Res* 32:691–699

# 特集 第40回脳のシンポジウム

## ● 神経疾患治療の新しいテクノロジー

### RNA干渉\*

水澤英洋\*\*

---

キーワード：RNA interference (RNAi), small interfering RNA (siRNA), Machado-Joseph disease, SOD1, siRNA transgenic mouse

---

#### I. RNAi とは

RNAi とは、二本鎖 RNA (dsRNA) が dicer と呼ばれる rebonucleaseIII により約 21 mer の小さな RNA (small interfering RNA : siRNA) に切断され、さらに RNA-induced silencing complex : RISC) により一本鎖 RNA となり、それが標的 mRNA を切断してその発現を阻害することである<sup>1-3)</sup>(図1)。この siRNA や microRNA と呼ばれる比較的小さな RNA が、mRNA の分解以外にも translational repression, transcriptional silencing, heterochromatin formation などの様々な生理的な機能を担っていることが知られつつある。しかしながら、RISC そのものの実態がまだ十分解明されていないなど、わからないことも多い。この mRNA の発現抑制の過程は非常に特異的であり、病的な遺伝子発現に対して用いることができれば、まさに根本的な治療となることが期待される。筆者らは、まず常染色体優性遺伝性神経変性疾患やウイルス感染症に対して、siRNA を用いた遺伝子治療を開発すべく研究を行っている。このような発想に立つ治療としてはすでにアンチセンス DNA, リボザイムなどが知られており、それぞれ利点と欠点があるが、総合的には siRNA が最も有用と思われる。

#### II. 標的疾患や標的遺伝子に特異的な siRNA の作製

標的分子としては、変異遺伝子が悪い機能を獲得すると考えられる常染色体優性遺伝性疾患の原因遺伝子があげられるが、ウイルス感染を中心とする感染症も、外界からの異常分子(遺伝子)が侵入増殖していると考ええると、やはり非常によい適応である。その他、例えば生活習慣病や悪性腫瘍などでも発症機序において、何か増加している分子をみつけられれば、それを抑えるという RNAi 治療は有用と思われる。まず標的 mRNA の塩基配列から、特異性が高く効率のよい siRNA をデザインする必要がある。これにはすでにある程度のルールが存在するが、実際には必ずしも理論通りには行かないので、複数個作製して最も目的に合ったものを用いることになる。

#### III. Machado-Joseph 病 (MJD)

MJD (脊髄小脳失調症 3 型 : SCA3) は、本邦の遺伝性脊髄小脳変性症の中で最も頻度の多い病型で、主に失調性歩行障害、構音障害で発症して、錐体路徴候、ジストニアなどの不随意運動、眼球運動制限、びくくり眼などを呈し、緩徐に進行し、車椅子状態から最終的には寝たきりになる<sup>4-6)</sup>。神経病理学的には小脳歯状

---

2005年10月27日受稿

\* New technologies for treatment of neurological diseases : RNA interference.

\*\* 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学 (〒113-8519 東京都文京区湯島 1-5-45) Hidehiro MIZUSAWA : Department of Neurology and Neurological Science, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan.

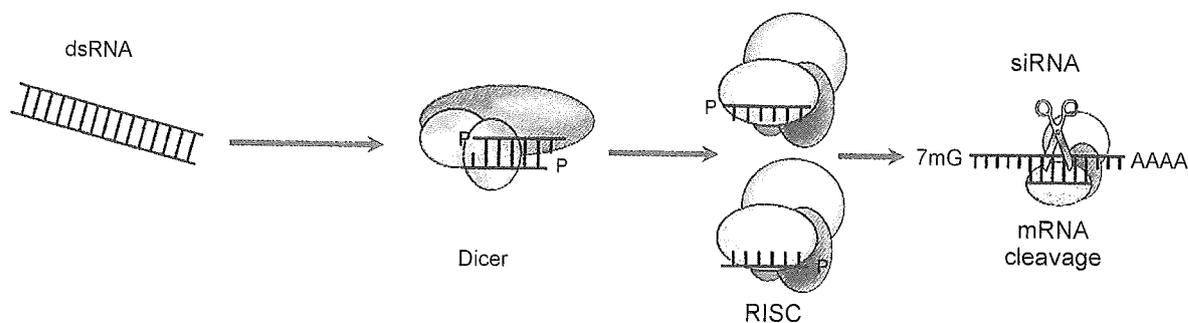


図 1 RNAi の作用機構  
説明は本文参照 (文献 3 より引用改変)。

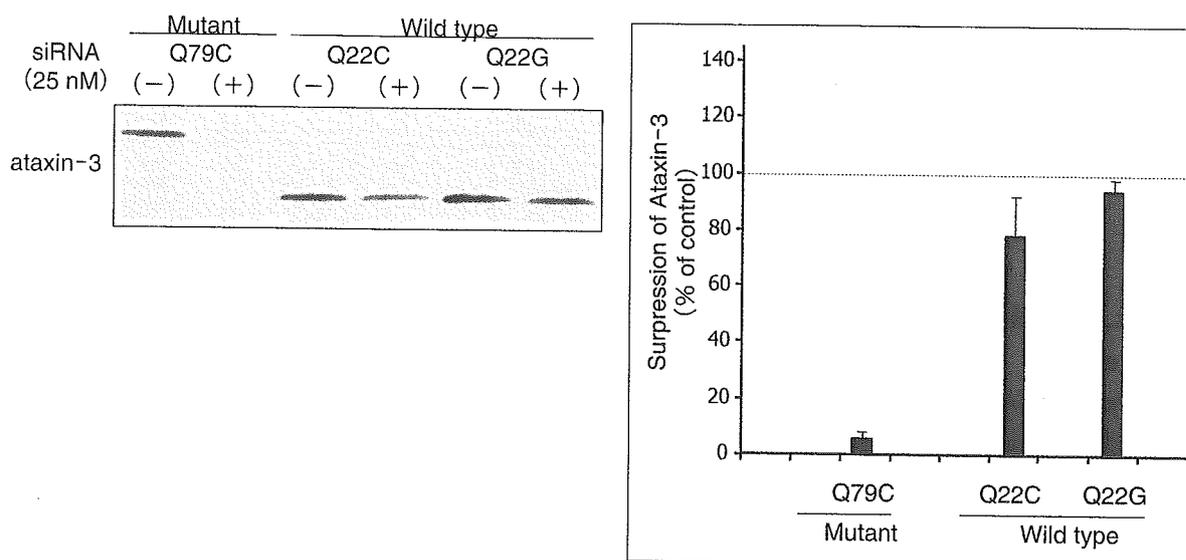


図 2 作製した siRNA は 25nM 用いると Q79C (ポリグルタミン鎖が 79 で多型が C) の蛋白の発現をほとんど完全に抑制するが, Q22G はもちろん Q22C に対してもほとんど影響しない (文献 8 から引用改変)。

核, 脳幹, 大脳基底核の変性がみられる。原因は 1 番染色体長腕にある MJD1 遺伝子の中の 3 塩基配列 CAG の繰り返し (CAG リピート) の異常伸長で, 正常では CAG リピート数が 13~36 であるのに対して, 患者では 62~82 と増加している。発症はふつう成人期であるが, 世代を経るごとにリピート数が伸長して, 発症も若年化する。CAG はアミノ酸のグルタミンをコードしており, 翻訳された異常伸長したポリグルタミンが神経細胞の変性を引き起こすと考えられている。

MJD1 遺伝子に対する siRNA を作製する場合, 前述の CAG リピートの長さの違いを認識することは困難であり, リピート以外のところは全く同じである。いろいろ検討した結果, CAG リピートの直後が C あるいは G になる多型があり, CAG が異常伸長した場合は全て C であり, 正常リピート数であっても 20 以上では多くの場合 C, それ以外は G となる<sup>7)</sup>。したがって, 完全には野生型と変異型を区別してはいないが, まずこの多型に注目して (CAG)<sub>n</sub>C のみを抑制し, (CAG)<sub>n</sub>G

には影響しない siRNA を設計・作製し, その効果を検索した<sup>8)</sup>。

まず, アッセイ系として 22 回あるいは 79 回の CAG リピートを含み, CAG 直後を C あるいは G とした MJD1 遺伝子断片を組み込んだプラスミドを作製した (Q22G, Q22C, Q79C)。これらを前述のように複数作製した siRNA とともに培養系の HEK293T 細胞に導入し, siRNA の効果を検討した。その結果, 1 つの siRNA により容量依存性に Q79C に由来する変異 ataxin3 の発現を, ほとんど完全に抑制することに成功した (図 2)。もちろん Q22G に由来する正常 ataxin 3 には全く影響しない。類似の結果は Miller らによっても報告されている<sup>9,10)</sup>。ここで問題は Q22C に対する効果であり, 当初 siRNA を配列特異的に作製していることから, 理論的には C を有する Q22C も Q79C と同様に抑制されるのではないかと考えられた。しかし, 実際には興味深いことに Q22C は Q22G と同様に全く抑制されず, この Q79C 選択的発現抑制効果は, LDH 遊離

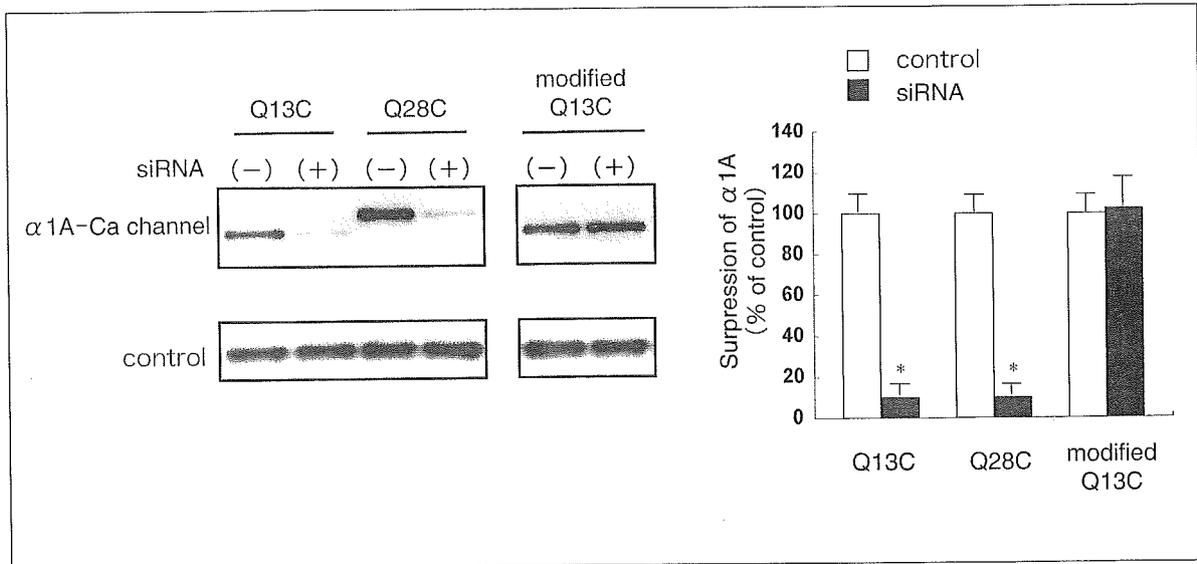


図 3 作製した siRNA はリピード数 13 回, 28 回の両方の α1A-Ca チャネル蛋白の発現を抑制するが, 塩基配列を変えた modified construct には全く影響しない (文献 13 から引用改変)。

や trypan blue 染色による細胞死の抑制効果でも確認された。すなわちこの siRNA は, 変異 ataxin 3 の発現とその機能のみをほぼ完全に抑制するといえる。この特異性変化の理由はまだ不明であるが, 標的となる RNA の二次あるいは三次構造が関係しているのではないかと推測される。

#### IV. 脊髄小脳失調症 6 型 (SCA6) とポリグルタミン病一般への対応

SCA6 も CAG リピード病の 1 つであり, やはり変異と正常を完全に区別する特異な配列は存在しない<sup>11)</sup>。一応, リピード前の GGCAG という配列が挿入されるかされないかで, CAG リピードがポリグルタミンに翻訳されるかどうかが決まり, SCA6 では挿入されたものの比率が大きくなることが知られている<sup>12)</sup>。したがって, GGCAG の有無を区別する siRNA を作製したところ, *in vitro* では GGCAG をもつ mRNA を特異的に抑制するものが得られた。しかし, GGCAG の挿入の有無は MJD の G/C 多型ほどは疾患との関連はないと思われることから, SCA6 に代表されるポリグルタミン病に対する siRNA 戦略としては, 別の工夫が必要である。

ふつう 1 つのアミノ酸には複数の塩基配列が対応しており, 例えば, ロイシンは UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG によってコードされている。したがって, 塩基配列を変更してもアミノ酸配列は不変, すなわち蛋白としては不変ということが可能となる。我々は, このことを活用して非特異的 siRNA により正常および変異 CACNA1A 遺伝子の発現を全て抑制するが, 同時にこの siRNA が作用しないように対応する塩基配列

を変更し, かつアミノ酸配列は変わらないコンストラクトを導入することを試みた<sup>13)</sup>。その結果, CAG リピードが 28 回に異常伸長したもののみを抑制し, 正常蛋白をレスキューすることに成功した (図 3)。このことは, 理論的には全てのポリグルタミン病のみならず, 全ての遺伝子変異に応用可能な手法である。もちろん, 導入する塩基配列の異なった '正常' 遺伝子が本当に同じ機能を有するか, 安全かといった多くの解決すべき問題は残っているが, siRNA 技術を応用するに当たり, 様々な工夫が可能であることを示す 1 つの例といえる。

#### V. 非遺伝性疾患への応用

生活習慣病である脳血管障害や孤発性アルツハイマー病など, 非遺伝性のいわゆる common disease に対しても siRNA 治療は可能であろうか。我々は脳血管障害時に発現する分子として細胞接着分子の E-selectin に注目し, 培養細胞に発現した外来性の E-selectin のみならず, ヒト血管内皮細胞へのリポソームを用いた新規遺伝子導入法を工夫することにより, 炎症刺激による内在性の E-selectin 発現をも著明に抑制することに成功した<sup>14)</sup>。その結果, 実際に白血球の血管内皮細胞への接着を長時間にわたり抑制することが判明した。したがって, siRNA 治療は適切な標的分子を選択することで, 非遺伝性の common disease にも十分に応用可能であると思われる。これは悪性腫瘍についても同様であり, 適切な標的分子を選択することで siRNA を応用することが可能であり, 実際に大きな成果が上げられつつある<sup>15)</sup>。また, 感染症とくにウ

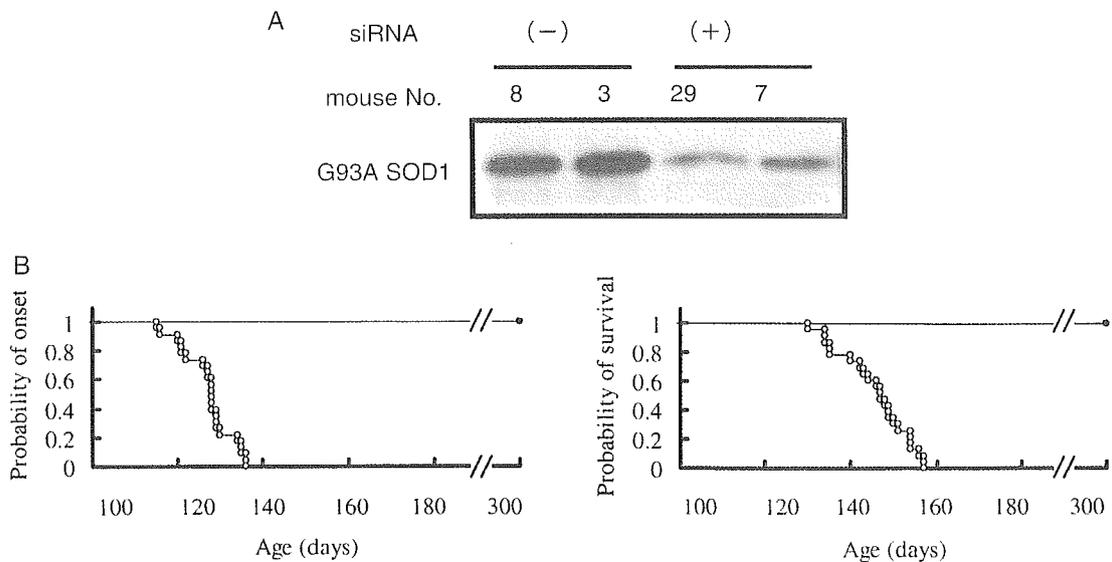


図4 掛け合わせによってできた siRNA を持つ G93ASOD1 トランスジェニックマウスでは SOD1 蛋白の発現が高度に抑制されており (A), 約 300 日までの経過観察では全く発症しないが (●), siRNA を持たないものは 110~130 日でほとんどが発症する (○) (B: 文献 20 から引用)。

ウイルス感染はまさに外来性の遺伝子そのものであり非常によいターゲットである<sup>16,17)</sup>。もちろん、一般にウイルスは非常に変異しやすいなど、生体の防御機構をくぐり抜ける工夫が備わっているため、siRNA を応用するにはそれなりの工夫が必要である。我々は日本に多い C 型肝炎ウイルスに対する非常に効率の良い siRNA を開発することに成功し、現在動物実験を進めている<sup>18)</sup>。

## VI. 実際の個体内では siRNA は本当に有効であろうか？

これは siRNA による遺伝子治療における最も本質的な命題の 1 つである。我々はこれに対して変異 SOD1 による家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) を対象疾患として、SOD1 に対する siRNA を過剰発現したトランスジェニック・マウス (SOD1-siRNA TgM) を作製し、それと疾患モデルの変異 SOD1 トランスジェニック・マウス (SOD1G93ATgM) とを掛け合わせることを試みた<sup>19,20)</sup>。SOD1-siRNA TgM は ES 細胞を用いる方法で作製したが、中枢神経系で 85~90% の SOD1 蛋白の抑制を示し、特別な症状、加齢や世代による影響は見られなかった。掛け合わせにより siRNA を有する疾患マウスと siRNA を持たない疾患マウスを得て経過を観察したところ、siRNA 非治療群では 110 日を過ぎた頃から後肢の麻痺が始まり急速に進行したが、siRNA 治療群では 300 日近くまでフォローしてもまだ発症は見られなかった (図 4)。このことは、siRNA をうまく標的細胞まで到達させれば極めて有用な治療手段になりうることを示している。この治療成績は、

SOD1G93ATgM を用いた多くの研究の中でも最も良いものである。また、我々は SOD1-siRNA TgM との掛け合わせを用いたが、ウイルスベクターを用いて注射により治療効果を示した報告も相次いでおり<sup>21-23)</sup>、神経難病の代表である筋萎縮性側索硬化症の siRNA 治療法の確立に向けて大きな前進といえる。

## VII. ベクターとデリバリー

前述のように、標的細胞までうまく到達すれば siRNA は非常に有効であるが、いかにして効率よくデリバリーするかが大きな課題である。これは遺伝子治療の持つ共通の問題であるが、siRNA の場合、運ぶべきコンストラクトが十分に小さく大きさによる制約がないことが 1 つの利点である。ベクターとしては大きく分けるとウイルスベクター<sup>24-27)</sup>、カチオニックリポソーム<sup>15)</sup>などの非ウイルスベクター、さらに化学修飾などの方法がある<sup>28)</sup>。デリバリーとしては現段階では直接脳に打ち込むといったレベルであるが、やはり最終的には経口投与はともかく静脈注射、筋肉注射などの通常の投与方法にて目的組織まで到達させることが必要である。さらに、神経系ではいわゆる血液脳関門があり、そこを越えないと神経細胞には到達できないという大きな課題もある。逆に、神経疾患であっても標的細胞が脳外にあれば、治療応用への距離はグンと短縮されることにもなる。

我々はこれまで、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、カチオニックリポソームを用いた方法を開発し利用するとともに、静注にて脳内の血管内皮細胞にま

で siRNA を到達させることにも成功している。さらに、Soutschek らが ApoB に対する化学修飾した siRNA により、血清コレステロール値の低下に成功していることや<sup>28)</sup>、アデノ随伴ウイルスやレンチウイルスベクターによる siRNA の筋注などにより SOD1 トランスジェニック・マウスの治療に成功した報告などもある<sup>21-23)</sup>。すなわち、この siRNA に関わる発見や技術革新の進歩はすさまじく、その治療応用の領域も着実に進歩している。また、siRNA の安全性の検討も必要であるし、ようやくそれが可能な時期に到達したともいえる<sup>29-32)</sup>。今後のさらなる発展と一日も早く難病治療に役立つことが切に望まれる。

謝辞

本研究は、厚生労働科学研究費補助金「こころの健康科学研究事業」の補助を受け(主任研究者:水澤), 当教室の横田隆徳, 李 一, 日野太郎, 齋藤友紀ら, 本学大学院病態代謝解析学の吉田雅幸らを中心として行われたものである。

文 献

- 1) Elbashir S, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T : Duplexes of 21 nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411 : 494-498, 2001
- 2) Mello C, Conte Jr D : Revealing the world of RNA interference. *Nature* 431 : 338-342, 2004
- 3) Meister G, Tuschl T : Mechanism of gene silencing by double-strand RNA. *Nature* 431 : 343-349, 2004
- 4) Rosenberg RN : Machado-Joseph disease : an autosomal dominant motor system degeneration. *Mov Disord* 7 : 193-203, 1992
- 5) Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, et al : CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet* 8 : 221-228, 1994
- 6) Ikeda H, Yamaguchi M, Satoshi S, Aze Y, Narumiya S, Kakizuka A : Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induced cell death *in vitro* and *in vivo*. *Nat Genet* 13 : 196-201, 1996
- 7) Matsumura R, Takayanagi T, Murata K, Futamura N, Hirano M, Ueno S : Relationship of (CAG) nC configuration to repeat instability of the Machado-Joseph disease gene. *Hum Genet* 98 : 643-645, 1996
- 8) Li Y, Yokota T, Matsumura R, Kakizuka A, Taira K, Mizusawa H : Sequence-dependent and independent inhibition specific for mutant ataxin-3 by small interfering RNA. *Ann Neurol* 56 : 124-129, 2004
- 9) Caplen NJ, Taylor JP, Statham VS, Tanaka F, Fire A, Morgan RA : Rescue of polyglutamine-mediated cytotoxicity by double-stranded RNA-mediated RNA interference. *Hum Mol Genet* 11 : 175-184, 2002
- 10) Miller VM, Xia H, Marrs GL, et al : Allele-specific silencing of dominant disease genes. *Proc Natl Acad Sci*

U S A 100 : 7195-7200, 2003

- 11) Takahashi H, Ishikawa K, Tsutsumi T, Fujigasaki H, Kawata A, Okiyama R, Fujita T, Yoshizawa K, Yamaguchi S, Tomiyasu H, Yoshii F, Mitani K, Shimizu N, Yamazaki M, Miyamoto T, Orimo T, Shoji S, Kitamura K, Mizusawa H : A clinical and genetic study in a large cohort of patients with spinocerebellar ataxia type 6. *J Hum Genet* 49 : 256-264, 2004
- 12) Ishikawa K, Tanaka H, Saito M, Ohkoshi N, Fujita T, Yoshizawa K, Ikeuchi T, Watanabe M, Hayashi A, Takiyama Y, Nishizawa M, Nakano I, Matsubayashi K, Miwa M, Shoji S, Kanazawa I, Tsuji S, Mizusawa H : Japanese families with autosomal dominant pure cerebellar ataxia map to chromosome 19p13.1-p13.2 and are strongly associated with mild CAG expansions in the spinocerebellar ataxia type 6 gene in chromosome 19p13.1. *Am J Hum Genet* 61 : 336-346, 1997
- 13) Kubodera T, Yokota T, Ishikawa K, Mizusawa H : A new RNAi strategy for selective suppression of mutant allele in polyglutamine disease. *Oligonucleotide* (in press)
- 14) Nishiwaki Y, Yokota T, Hiraoka M, Miyagishi M, Taira K, Isobe M, Mizusawa H, Yoshida M : Introduction of short interfering RNA to silence endogenous E-selectin in vascular endothelium leads to successful inhibition of leukocyte adhesion. *Biochem Biophys Res Com* 310 : 1062-1066, 2003
- 15) Yano J, Hirabayashi K, Nakagawa S, Yamaguchi T, Nogawa M, Kashimori I, Naito H, Kitagawa H, Ishiyama K, Ohgi T, Irimura T : Antitumor activity of small interfering RNA/cationic liposome complex in mouse models of cancer. *Clin Can Res* 10 : 7721-7726, 2004
- 16) Jacque JM, Triques K, Stevenson M : Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* 418 : 435-438, 2002
- 17) Gitlin L, Karelsky S, Andino R : Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature* 418 : 430-434, 2002
- 18) Yokota T, Sakamoto N, Enomoto N, Tanabe Y, Miyagishi M, Maekawa S, Yi L, Kurosaki M, Taira K, Watanabe M, Mizusawa H : Inhibition of intracellular hepatitis C Virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO Rep* 4 : 602-608, 2003
- 19) Yokota T, Miyagishi M, Hino T, Matsumura R, Andria T, Urushidani M, Rao RV, Takahashi R, Bredesen DE, Taira K, Mizusawa H : siRNA-based inhibition of superoxide dismutase expression ; potential use in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Com* 314 : 283-291, 2004
- 20) 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* (in press)
- 21) Raoul C, Abbas-Terki T, Bensadoun J-C, Guillot S, Szulc J, Henderson CE, Aebischer P : Lentiviral-mediated silencing of SOD1 through RNA interference retards disease onset and progression in a mouse model of ALS. *Nat Med* 11 : 423-428, 2005

- 22) Ralph GS, Radcliffe PA, Day DM, Carthy JM, Leroux MA, Lee DCP, Wong L-F, Bilstrand LG, Greensmith L, Kingsman SM, Mitrophanous KA, Mazarakis ND, Azzouz M : Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nat Med* 11 : 429-433, 2005
- 23) Miller TM, Kaspar BK, Kops GJ, Yamanaka K, Christian LJ, Gage FH, Cleveland DW : Virus-delivered small RNA silencing sustains strength in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 57 : 773-776, 2005
- 24) Hommel JD, Sears RM, Georgescu D, Simmons DL, DiLeone RJ : Local gene knockdown in the brain using viral-mediated RNA interference. *Nat Med* 9 : 1539-1544, 2003
- 25) Gregorevic P, Blankinship MJ, Allen JM, Crawford RW, Meuse L, Miller DG, Russell DW, Chamberlain JS : Systemic delivery of genes to striated muscles using adeno-associated viral vectors. *Nat Med* 10 : 828-834, 2004
- 26) Wang Z, Zhu T, Qiao C, Zhou L, Wang B, Zhang J, Chen C, Li J, Xiao X : Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nat Biotech* 23 : 321-328, 2005
- 27) Nakai H, Fuess S, Storm TA, Muramatsu S, Nara Y, Kay MA : Unrestricted hepatocyte transduction with adeno-associated virus serotype 8 vectors in mice. *J Virol* 79 : 214-224, 2005
- 28) Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, Elbashir S, Geick A, Hadwiger P, Harborth J, John M, Kesavan V, Lavine G, Pandey RK, Racie T, Rajeev KG, Röhl I, Toudjarska I, Wang G, Wuschko S, Bumcrot D, Koteliansky V, Limmer S, Manoharan M, Vornlocher HP : Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432 : 173-178, 2004
- 29) Hornung V, Guenther-Biller M, Bourquin C, Ablasser A, Schlee M, Uematsu S, Noronha A, Manoharan M, Akira S, de Fougerolles A, Endres S, Hartmann G : Sequence-specific potent induction of IFN- $\alpha$  by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 11 : 263-270, 2005
- 30) Kim DH, Longo M, Han Y, Lundberg P, Cantin E, Rossi JJ : Interferon induction by siRNAs and ssRNAs synthesized by phage polymerase. *Nat Biotech* 22 : 321-325, 2004
- 31) Bridge AJ, Pebernard S, Ducaux A, Nicoulaz AL, Iggo R : Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* 34 : 263-264, 2003
- 32) Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS : Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotech* 21 : 635-637, 2003

## Abstract

### New technologies for treatment of neurological diseases : RNA interference

Hidehiro Mizusawa

from

*Department of Neurology and Neurological Science, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan*

RNA interference (RNAi) is a process whereby small noncoding RNAs silence specific genes. It is important to realize that dsRNAs shorter than 30 base pairs (small interfering RNA : siRNA) could be used to trigger an RNAi response in mammals. Using the RNAi machinery, it would be possible to suppress the expression of genes which cause many intractable neurological diseases. We have been studying to develop gene therapies for neurological diseases using siRNA. First, we have successfully developed specific siRNAs for many neurological diseases including spinocerebellar ataxias and amyotrophic lateral sclerosis. Sporadic diseases such as Alzheimer's disease and cerebral infarction with arteriosclerosis could also be targets of siRNA therapy. SiRNA transgenic mouse was produced and its crossing with SOD1<sup>G93A</sup> transgenic mouse revealed almost complete suppression of the onset of ALS in the SOD1<sup>G93A</sup> and siRNA double transgenic animals. In addition to neurological diseases, there have been reported many studies on siRNA gene therapies for viral infections, cancers and so on. Vectors such as adenovirus, adeno-associated virus, and liposome have been developed and improved resulting in sufficient suppression of endogenous genes. The next problem is the delivery of siRNAs. We have succeeded to suppress a function of the brain endothelial cells by the hydrodynamic method. Further studies are necessary to deliver siRNA into the brain parenchyma across the blood brain barrier and to address many questions regarding specificity, efficacy, and safety of siRNA therapy *in vivo*.

(Received : October 27, 2005)