

which results in the embryo being composed entirely of ES cells. Using this strategy, it has been demonstrated that knockdown ES cell-derived embryos reproduce a genetic null phenotype [12]. In an experiment, ES cells were transfected with a shRNA expression vector directed against an endogenous gene, p120-Ras GTPase-activating protein (*RasGAP*), followed by injection into enhanced green fluorescent protein transgenic tetraploid embryos. As the tetraploid cells were derived from a transgenic line that ubiquitously expressed *EGFP*, contamination of host tetraploid cells in the embryo proper was detectable by their fluorescence. Indeed, *RasGAP* shRNA ES cell-derived embryos exhibited phenotypes that were strikingly similar to the null phenotype. Again, the reduction in expression of the target protein in ES cell lines was reflected by the degree of the phenotype in the embryos.

In contrast to homologous recombination, introduction of a shRNA expression vector into ES cells has similar problems to the microinjection of a vector construct into zygotes; that is, the copy number and integration site of the transgene are uncontrollable. Regarding these limitations, controllable integration of a single copy of a shRNA transgene into a defined locus *rosa26* has been demonstrated [66]. In addition to this site-specific insertion, the *Cre-loxP* system was combined at the *rosa26* locus to induce tissue-specific shRNA expression. Furthermore, injection of ES cells with a shRNA transgene into tetraploid blastocysts has been shown to produce shRNA transgenic ES cell-derived mice at a frequency of 3% [66].

Generation of Conditional Knockdown Mice

Since the phenotypic effect of the shRNA transgene emerges in hemizygous mice, it is difficult to establish shRNA transgenic mouse strains and to analyze the function of the target gene in adult tissues when silencing of the target gene causes embryonic or juvenile lethality. To circumvent this limitation, effective conditional knockdown systems under the spatial and temporal control of RNAi have been developed. Recently, two knockdown systems, a combined RNAi and *Cre-loxP* system [59, 62–64, 66–69] and a pDECAP vector system [70], have been proposed to have the potential which generate transgenic mice with controllable gene silencing. These systems are expected to advance markedly the functional characterization of genes involved in development and disease.

The *Cre-loxP* system has been widely utilized for conditional gene knockout [71]. This system uses the Cre recombinase encoded by the bacteriophage P1 to catalyze recombination between consensus DNA sequences, called *loxP* recognition sites. To develop inducible regulation of RNAi, Coumoul *et al.* modified the Pol III U6 promoter to make a spatio-temporal switch controlled by the *Cre-loxP* system, as illustrated in Fig. 4b. The insertion of a *loxP*-flanked neomycin (*loxPneo*) cassette between the regulatory elements of the U6 promoter impairs its ability to express a downstream shRNA targeting *Fgfr2* [67]. This inducible shRNA expression vector was injected into mouse zygotes and transgenic mice were obtained [68]. These mice did not express shRNA, owing to an interruption by a *loxPneo* cassette, but showed germline transmission of the transgene. Mice carrying the *Fgfr2*-shRNA transgene were crossed with two kinds of *Cre* transgenic mice, *Ella-Cre* expressed in the germline and *Ap2-Cre* expressed in the progress zone of the limb, to obtain transgenic mice with an *Fgfr2*-shRNA transgene and Cre recombinase. In these double transgenic (bigenic) mice, the *loxPneo* cassette was looped-out by Cre recombinase in a Pol II-dependent manner, and the U6 promoter retrieved its activity. The resulting mice showed a dramatic reduction of *Fgfr2* expression in a tissue-specific manner, and consequently embryonic lethality was induced in *Fgfr2* shRNA/*Ella* mice and the malformation of digits of both the forelimbs and hindlimbs occurred in *Fgfr2* shRNA/*Ap2* mice. As demonstrated by Coumoul *et al.*, even a gene whose mutation or suppression induces embryonic lethality can be silenced *in vivo* using this method, such that its function can be analyzed. Fritsch *et al.* developed a *Cre-loxP* controlled shRNA expression vector in a different way as illustrated in Fig. 4c. In this vector, the neomycin cassette with the Pol III stop codon was used as terminator to interrupt complete transcription of an inverted repeat at the spacer (loop) sequence. Nowadays, a wide variety of transgenic mouse strains expressing Cre recombinase from tissue-specific promoters have been developed to achieve spatial and temporal control of gene targeting. An adenoviral vector encoding Cre recombinase can also transiently express this enzyme in transfected cells, and hence may also be useful for conditional gene silencing [64].

Another example of an approach designed to gain both spatial and temporal control over Cre recombinase transcription is provided by the use of a tetracycline (*tet*)-responsive system [58]. The *tet* system is based

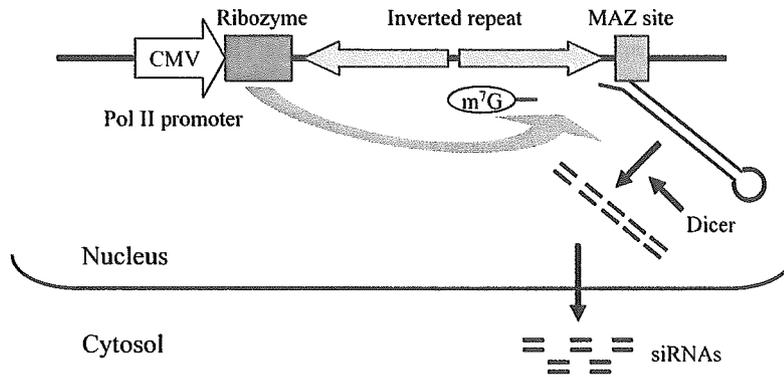


Fig. 5. Structure of pDECAP vector [70]. The pDECAP vector contains the Pol II promoter (e.g. CMV promoter), a ribozyme cassette and MAZ site. DNA template of an inverted repeat separated by a spacer is inserted between the ribozyme cassette and MAZ site. Transcription from the Pol II promoter is paused and the resulting long dsRNA is anchored at the MAZ site, which is cut off the m⁷G cap structure by the ribozyme and is processed into siRNAs by RNase (Dicer) localized in the nucleus. The siRNAs then move to the cytosol.

on binding of the tet repressor to the tet operator (*tetO*). Tetracycline binds to the repressor, inducing a conformational change that causes the repressor to dissociate from *tetO*. If the tet repressor is fused to the transcriptional activation domain of the herpes simplex virus VP16 protein, a conditional transcription activator is obtained that can be shut off or, in another variation of the system, turned on by the addition of doxycycline, which is much less toxic to vertebrate cells than to *E.coli*. This inducible gene knockdown system, named the SIRIUS-Cre system, combines three elements: siRNA for specific gene silencing, *Cre-loxP* for tissue-specific expression and tetracycline for inducible expression. Transgenic mice were generated by mating two independent transgenic mouse strains which contained *ABCA1* siRNA expression vector with a *loxP*-flanked *EGFP* cassette and a tissue-specific Cre recombinase under tetracycline control. The bigenic mice have been shown to avoid embryonic lethality and to provide a successful mimic of Tangier disease, which is caused by mutation of the *ABCA1* gene. The combination of the RNAi and *Cre-loxP* approaches may facilitate the deciphering of the true functions of genes *in vivo*. However, a significant disadvantage of this system is that the Cre recombinase does not act in 100% of cells, and its induction results in a genetically heterogeneous population of target cells. Therefore, when a small number of Cre non-induced cells act complementarily in the target organs, the phenotypes of the transgenic mice may be complex. Hence, adoption

of this system requires some care to confirm the correctness of the observed phenotype.

The pDECAP system may also have the potential to generate tissue-specific gene knockdown animals (Fig. 5) [70]. This novel vector expresses hairpin-type long dsRNA under the control of a Pol II promoter, instead of a Pol III promoter. To avoid the interferon response against long dsRNA, the vector is engineered to transcribe dsRNA that lacks both the 5'-cap structure and the 3'-poly adenylate tail needed for export to the cytosol. The transcripts form dsRNA structure, are processed into small siRNAs in the nucleus, and are then transferred to the cytosol, where they direct the degradation of the target mRNA without eliciting the interferon response. Using this system, a pDECAP vector expressing long dsRNA of the endogenous *Ski* gene from a CMV promoter was injected into mouse zygotes. pDECAP-*Ski* transgenic mouse embryos had recapitulated phenotypes that were remarkably similar to those of *Ski*-deficient embryos, with defects in neural tube closure and eye formation. Although Shinagawa and Ishii used a CMV promoter to control the pDECAP vector, it may be possible to express siRNAs derived from long dsRNAs using tissue-specific promoters.

Since oocytes and early embryos lack interferon-induced pathways, long dsRNAs can silence specific genes at these developmental stages [72]. Hence, microinjection of a long dsRNA directed against the *Mos* gene from the oocyte-specific ZP3 promoter has been used to generate transgenic mice. These founder

animals appeared healthy, but while males were fertile, females were sterile in accordance with the genetic null phenotype. Germline transmission of the transgene was confirmed from the founder males to F1 progeny. In the transgenic F1 females, the amount of *Mos* mRNA was reduced specifically, resulting in suppression of MAP kinase and H1 kinase activities in MII eggs; these eggs underwent spontaneous parthenogenetic activation. These observations demonstrate the recapitulations of the phenotype of the *Mos* null mutant.

Proof of Principle of siRNA-mediated Gene Silencing for the Correction of Genetic Diseases, using Knockdown Mice

RNAi has been employed as an innovative and powerful tool to investigate gene function *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, this technology has fascinating potential applications as a therapeutic approach [73–77]. To date, to suppress viral replication, various vaccines and drugs targeting envelope proteins or enzymes derived from the virus have been investigated. The advent of RNAi has raised the possibility of developing a novel approach for targeting the viral genome. Recently, specific siRNAs targeted against replication of viruses such as the human immunodeficiency virus (HIV) [78, 79], poliovirus [80], SARS virus [81] and hepatitis B [82, 83] and C [84–86] viruses have been developed. For example, Yokota and colleagues have shown efficient inhibition of hepatitis C virus replication by both synthetic and vector-derived siRNAs using an HCV replicon system in the human hepatoma cell line Huh7 [84].

Furthermore, suppression of mutant proteins that cause disease provides a new strategic approach for the treatment of inherited diseases. Dominantly inherited diseases are caused by a mutant allele of a gene causing loss of function or gain of toxic function. In cases of loss of function caused by the mutant allele in which the normal allele has an insufficient compensatory effect, disease is caused by loss of function, whereas if the mutant gene induces a novel altered function or disturbs the metabolic conditions, pathological symptoms are caused by a gain of toxic function. Using the RNAi strategy, effective clinical treatment for intractable neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and Parkinson's syndrome may be possible. Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is another fatal neurodegenerative disease characterized by degeneration of motor neurons in the central nervous system, and 20% of such cases are caused by gain of

toxic function due to a mutated Cu/Zn superoxide dismutase (*SOD1*) enzyme. Therefore, inhibition of mutant *SOD1* expression may provide a direct approach to treatment for this type of familial ALS, in which onset and progression of the disease are prevented. In culture cells, siRNA can effectively suppress the expression of mutant proteins in various neurodegenerative diseases, including ALS [87]. Furthermore, virus-mediated siRNA delivered by direct injection of viral vectors to the spinal cord or muscles has been shown to delay the onset or progression of ALS in an ALS mouse model [88,89]. However, the most difficult problem in *in vivo* therapy with siRNA is that a sophisticated method of siRNA delivery throughout the central nervous system has yet to be developed. To address this issue, we generated *SOD1* knockdown mice in which siRNA is ubiquitously expressed in the whole body, including the brain, and then crossed these mice with *SOD1*^{G93A} transgenic mice, a widely used animal model of ALS, to investigate the true efficacy of siRNA *in vivo*, especially in the central nervous system. In treating autosomal dominant inheritance, the siRNA sequence should in principle be selected to target only the mutant transcripts, but in the case of the *SOD1* gene, *SOD1*-deficient mice show no severe pathological phenotypes, except for fragility of nerve cells after an axonal injury, hearing loss and female sterility [90]. We therefore first designed a siRNA sequence for ubiquitous suppression of both the normal and mutant *SOD1* proteins.

Microinjection of a shRNA expression vector into mouse zygotes

We first tried to generate *SOD1* knockdown mice using a conventional transgenic method, as used in other studies [11, 56]. The shRNA expression vector was constructed by inserting the stem-loop type *SOD1* siRNA cassette immediately downstream of the human U6, H1 promoter or tRNA promoter in pUC19 with a pgk1/neomycin cassette. When these vectors were introduced into the pronucleus of the mouse fertilized eggs, no suppression of *SOD1* protein was observed in either case, despite integration of the shRNA transgene into the genome (Fig. 6, unpublished data). Consequently, as also found by Carmell *et al.* [11], we were unable to generate siRNA transgenic mice by the microinjection method.

Generation of SOD1 knockdown mice from ES cells using a shRNA expression vector

As an alternative approach, we also examined the ES

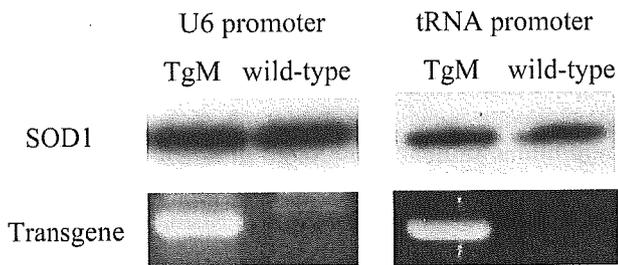


Fig. 6. Microinjection of the *SOD1* siRNA expression vectors into the mouse zygotes. Human U6 promoter and tRNA promoter were used as the Pol III promoter. Western blot analysis showed no down-regulation of the endogenous *SOD1* protein (upper) despite the integration of transgene into the mouse genome being detected by PCR analysis.

cell method for production of shRNA transgenic mice that express siRNA. A *SOD1* shRNA expression vector was introduced into 129/Sv ES cells by electroporation, followed by drug selection with G418. As a result, some stable integrants showed more than an 80% reduction level of endogenous *SOD1* protein by western blot analysis (Fig. 7a). The ES clones were injected into C57BL/6 blastocysts, and the resulting chimeric male mice were crossed with wild type C57BL/6 female mice. Germline transmission of the shRNA transgene was achieved in F1 progeny. The presence of the transgene in genomic DNA from the tails of these progeny was proved by PCR analysis, and a remarkable reduction of the level of *SOD1* transcripts was detected by northern blot analysis, which resulted in about 80% suppression of the *SOD1* protein level on western blot analysis (Fig. 7b).

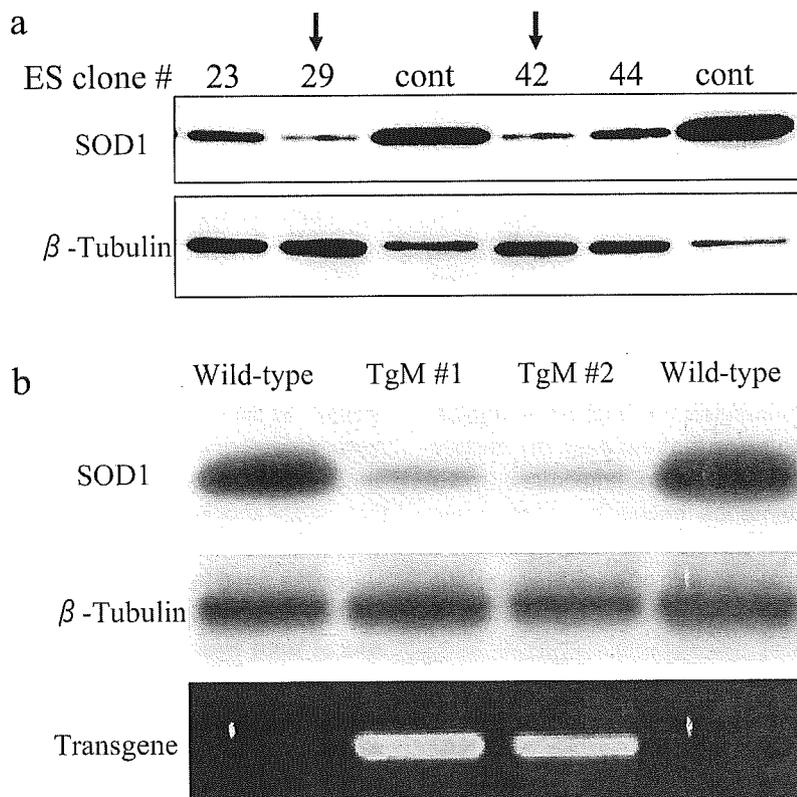


Fig. 7. Production of *SOD1* knockdown mice derived from ES cells. (a) Western blot analysis of whole cell lysate from individual ES cell clones for *SOD1* and tubulin. Suppression of the *SOD1* expression was successfully observed in many ES cell clones, some of which showed drastically enhanced down-regulation of the endogenous *SOD1* (Arrows). (b) Analysis of *SOD1* shRNA transgenic mice generated from the “knockdown” ES cells. Transgenic mice confirmed the integration of the transgene by PCR analysis in the genome from the tails (lower) showed the inhibition of *SOD1* expression by western blot analysis (upper) similar to that in the ES cells of their origin.

Similar to *SOD1*-deficient mice, the *SOD1* knockdown mice did not show any obvious phenotype, showing neither growth retardation nor motor signs, except for infertility in female mice.

siRNA directed against the SOD1 gene suppresses the onset of ALS in SOD1^{G93A} transgenic mice

Two different groups have recently demonstrated that injection of lentiviral vectors which express siRNA specifically targeting the human *SOD1* gene has a therapeutic effect in an ALS animal model [88, 89]. In these reports, human *SOD1* siRNA expression lentiviral vectors were delivered by intraspinal injection [88] or intramuscular injection [89]. Both treatments showed a retardation of the onset of ALS, an extension of survival and an improvement of motor performance in the mice. These results clearly demonstrate that siRNA has the potential to reduce the gain of toxic function caused by mutant proteins, which will encourage the exploration of gene therapy using RNAi technology.

We have also investigated the onset and progression of ALS in *SOD1* shRNA/*SOD1^{G93A}* bigenic mice generated by crossing *SOD1* knockdown mice with *SOD1^{G93A}* transgenic mice. If the expression level of both mutant human *SOD1^{G93A}* and mouse endogenous *SOD1* are simultaneously reduced in the bigenic mice, the *SOD1* shRNA/*SOD1^{G93A}* bigenic mice are expected to appear normal and to grow up healthy without any pathological features of ALS. Our approach of expressing siRNA constitutively in the whole body makes it possible to investigate the true physiological response in all the cell types that express the mutant gene with toxic function. Therefore, knockdown mice will facilitate investigation of the mechanism of the onset of genetic disorders, and will allow harnessing of RNAi technology for the development of new therapeutic approaches.

Conclusions and Future Prospects

The major advantage of production of RNAi knockdown mice is that the basic structure of a DNA-based knockdown vector and its introduction into cells are relatively simple. These features make it possible to regulate the suppression of splicing variants or multiple genes simultaneously [91], which requires quite time-consuming and laborious work using knock-out or knock-in methods based on homologous recombination. On the other hand, RNAi technology still has some disadvantages. In knockdown mice, non-specific and off-target effects of siRNAs may complicate the

phenotype, and the efficacy of suppression of gene expression varies with both the target genes and organs. Guidelines for the RNAi approach are being developed to avoid these problems, including software algorithms to design the most effective and specific siRNA sequence against a given target gene [92–94].

Finally, although the application of RNAi to animals has yet to be investigated thoroughly, knockdown mice can facilitate the understanding of the true function of numerous genes *in vivo*. This fascinating technology represents an essential tool that will provide answers to many questions and enhance progress in the life sciences. Furthermore, genetic manipulation using RNAi is likely to develop as a novel technology with applications in non-human primates and domestic animals, in addition to its value as a therapeutic approach.

Acknowledgements

This work was supported in part by the Wakayama Prefecture Collaboration of Regional Entities for the Advancement of Technological Excellence of the JST (T.M.), and the Ministry of Education, Culture, Science, Sports and Technology, Japan (T.Y.), from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan (T.Y.).

Supplementary Note

Our study on ALS using *SOD1* knockdown mice, entitled "Transgenic siRNA halts ALS in a mouse model" by Saito, Y., Yokota, T., Mitani, T. *et al.*, has been accepted in J. Biol. Chem., and published on line on October 12, 2005. In this study, we demonstrated that *SOD1* knockdown mice expressing modified siRNA with multiple mismatch alterations could successfully suppress both human *SOD1^{G93A}* mutant protein and endogenous mouse *SOD1* protein throughout lifetime and at least over four generations. As expected, in the *SOD1* shRNA/*SOD1^{G93A}* bigenic mice, siRNA prevented the development of disease in the central nervous system. Our findings clearly prove the principle that siRNA-mediated gene silencing can halt the development of certain autosomal dominant diseases.

References

- 1) Gordon, W.J., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A. and Ruddle, F.H. (1980): Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 77, 7380–7384.
- 2) Capecchi, M.R. (1989): Altering the genome by

- homologous recombination. *Science*, 244, 1228–1292.
- 3) Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 806–811.
 - 4) Timmons, L. and Fire, A. (1998): Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*, 395, 854.
 - 5) Montgomery, M.K., Xu, S. and Fire, A. (1998): RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 95, 15502–15507.
 - 6) Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001): Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411, 494–498.
 - 7) Miyagishi, M. and Taira, K. (2002): U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.*, 20, 497–500.
 - 8) Lee, N.S., Dohjima, T., Bauer, G., Li, H., Li, M.J., Ehsani, A., Salvaterra, P. and Rossi, J. (2002): Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 *rev* transcripts in human cells. *Nat. Biotechnol.*, 20, 500–505.
 - 9) Paul, C.P., Good, P.D., Winer, I. and Engelke, D.R. (2002): Effective Expression of small interfering RNA in human cells. *Nat. Biotechnol.*, 20, 505–508.
 - 10) Paddison, P.J., Caudy, A.A., Bernstein, E., Hannon, G.J. and Conklin, D.S. (2002): Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev.*, 16, 948–958.
 - 11) Carmell, M.A., Zhang, L., Conklin, D.S., Hannon, G.J. and Rosenquist, T.A. (2003): Germline transmission of RNAi in mice. *Nat. Struct. Biol.*, 10, 91–92.
 - 12) Kunath, T., Gish, G., Lickert, H., Jones, N., Pawson, T. and Rossant, J. (2003): Transgenic RNA interference in ES cell-derived embryos recapitulates a genetic null phenotype. *Nat. Biotechnol.*, 21, 559–561.
 - 13) Sharp, P.A. (1999): RNAi and double-strand RNA. *Genes Dev.*, 13, 139–141.
 - 14) Bosher, J.M. and Labouesse, M. (2000): RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. *Nat. Cell Biol.*, 2, E31–E36.
 - 15) Bass, B.L. (2000): Double-Stranded RNA as a Template for gene silencing. *Cell*, 101, 235–238.
 - 16) Sharp, P.A. (2001): RNA interference—2001. *Genes Dev.*, 15, 485–490.
 - 17) Matzke, M., Matzke, A.J.M. and Kooter, J.M. (2001): RNA:guiding gene silencing. *Science*, 293, 1080–1083.
 - 18) Zamore, P.D. (2001): RNA interference: listening to the sound of silence. *Nat. Struct. Biol.*, 8, 746–750.
 - 19) Tuschl, T. (2002): Expanding small RNA interference. *Nat. Biotechnol.*, 20, 446–448.
 - 20) Plasterk, R.H.A. (2002): RNA silencing: The genome's immune system. *Science*, 296, 1263–1265.
 - 21) Zamore, P.D. (2002): Ancient pathways programmed by small RNAs. *Science*, 296, 1265–1269.
 - 22) Ahlquist, P. (2002): RNA-dependent RNA polymerases, Viruses, and RNA silencing. *Science*, 296, 1270–1273.
 - 23) Hannon, G.J. (2002): RNA interference. *Nature*, 418, 244–251.
 - 24) Hutvagner, G. and Zamore, P.D. (2002): RNAi: nature abhors a double-strand. *Genet. Dev.*, 12, 225–232.
 - 25) Agrawal, N., Dasaradhi, P.V.N., Mohammed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R.K. and Mukherjee, S.K. (2003): RNA interference: Biology, mechanism, and applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67, 657–685.
 - 26) Catalanotto, C., Azzalin, G., Macino, G. and Cogoni, C. (2002): Involvement of small RNAs and role of the *qde* genes in the gene silencing pathway in *Neurospora*. *Genes Dev.*, 16, 790–795.
 - 27) Ngô, H., Tschudi, C., Gull, K. and Ullu, E. (1998): Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 95, 14687–14692.
 - 28) Tuschl, T., Zamore, P.D., Lehmann, R., Bartel, D.P. and Sharp, P.A. (1999): Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA *in vitro*. *Genes Dev.*, 13, 3191–3197.
 - 29) Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D. and Hannon, G.J. (2000): An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 404, 293–296.
 - 30) Caplen, N.J., Fleenor, J., Fire, A. and Morgan, R.A. (2000): dsRNA-mediated gene silencing in cultured *Drosophila* cells: a tissue culture model for the analysis of RNA interference. *Gene*, 252, 95–105.
 - 31) Wei, Q., Marchler, G., Edington, K., Karsch-Mizrachi, I. and Paterson, B.M. (2000): RNA interference demonstrates a role for *nautilus* in the myogenic conversion of schneider cells by *daughterless*. *Dev. Biol.*, 228, 239–255.
 - 32) Wargelius, A., Ellingsen, S. and Fjose, A. (1999): Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 263, 156–161.
 - 33) Li, YX., Farrell, M.J., Liu, R., Mohanty, N. and Kirby, M.L. (2000): Double-stranded RNA injection produces null phenotypes in zebrafish. *Dev. Biol.*, 217, 394–405.
 - 34) Oates, A.C., Bruce, A.E.E. and Ho, R.K. (2000): Too much interference: Injection of double-stranded RNA has nonspecific effects in the zebrafish embryo. *Dev. Biol.*, 224, 20–28.
 - 35) Nakano, H., Amemiya, S., Shiokawa, K. and Taira, M. (2000): RNA interference for the organizer-specific gene *Xlim-1* in *Xenopus* embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 274, 434–439.
 - 36) Napoli, C., Lemieux, C. and Jorgensen, R. (1990): Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes *in trans*. *Plant Cell*, 2, 279–289.
 - 37) van der Krol, A.R., Mur, L.A., Beld, M., Mol, J.N.M. and Stuitje, A.R. (1990): Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell*, 2, 291–299.
 - 38) Waterhouse, P.M., Graham, M.W. and Wang, M-B. (1998): Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense

- RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 95, 13959–13964.
- 39) Chuang, C-F. and Meyerowitz, E.M. (2000): Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis Thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 97, 4985–4990.
 - 40) Baulcombe, D. (2004): RNA silencing in plants. Nature, 431, 356–363.
 - 41) Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H. and Schreiber, R.D. (1998): How cells respond to interferons. Annu. Rev. Biochem., 67, 227–264.
 - 42) Kaufman, R.J. (1999): Double-stranded RNA-activated protein kinase mediates virus-induced apoptosis: a new role for an old actor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 96, 11693–11695.
 - 43) Iordanov, M.S., Wong, J., Bell, J.C. and Magun, B.E. (2001): Activation of NF- κ B by double-stranded RNA (dsRNA) in the absence of protein kinase R and RNase L demonstrates the existence of two separate dsRNA-triggered antiviral programs. Mol. Cell Biol., 21, 61–72.
 - 44) Ghosh, A., Sarkar, S.N., Rowe, T.M. and Sen, G.C. (2001): A specific isozyme of 2'-5' oligoadenylate synthetase is a dual function proapoptotic protein of the Bcl-2 family. J. Biol. Chem., 276, 25447–25455.
 - 45) Khabar, K.S.A., Siddiqui, Y.M., Al-zoghaibi, F., Al-Haj, L., Dhalla, M., Zhou, A., Dong, B., Whitmore, M., Paranjape, J., Al-Ahdal, M.N., Al-Mohanna, F., Williams, B.R.G. and Silverman, R.H. (2003): RNase L mediates transient control of the interferon response through modulation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. J. Biol. Chem., 278, 20124–20132.
 - 46) Sledz, C.A. and Williams, B.R.G. (2004): RNA interference and double-stranded-RNA-activated pathways. Biochem. Soc. Trans., 32, 952–956.
 - 47) Wianny, F. and Zernicka-Goetz, M. (2000): Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. Nat. Cell Biol., 2, 70–75.
 - 48) Svoboda, P., Stein, P., Hayashi, H. and Schultz, R.M. (2000): Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. Development, 127, 4147–4156.
 - 49) Elbashir, S.M., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001): RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. Genes Dev., 15, 188–200.
 - 50) Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001): Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. EMBO J., 20, 6877–6888.
 - 51) Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A. and Bartel, D.P. (2000): RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. Cell, 101, 25–33.
 - 52) Caplen, N.J., Parrish, S., Imani, F., Fire, A. and Morgan, R.A. (2001): Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 98, 9742–9747.
 - 53) Tavernarakis, N., Wang, S.L., Dorovkov, M., Ryazanov, A. and Driscoll, M. (2000): Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes. Nat. Genet., 24, 180–183.
 - 54) Brummelkamp, T.R., Bernards, R. and Agami, R. (2002): A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. Science, 296, 550–553.
 - 55) Sui, G., Soohoo, C., Affar, E.B., Gay, F., Shi, Y., Forrester, W.C. and Shi, Y. (2002): A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 99, 5515–5520.
 - 56) Hasuwa, H., Kaseda, K., Einarsdottir, T. and Okabe, M. (2002): Small interfering RNA and gene silencing in transgenic mice and rats. FEBS Lett., 532, 227–230.
 - 57) Hasuwa, H., Inagaki, Y. and Okabe, M. (2004): Transgenic RNAi knockdown mice. IGAKU NO AYUMI, 208, 664–668.
 - 58) Chang, H.S., Lin, C.H., Chen, Y.C. and Yu, W.C.Y. (2004): Using siRNA technique to generate transgenic animals with spatiotemporal and conditional gene knockdown. Am. J. Pathol., 165, 1535–1541.
 - 59) Pfeifer, A., Ikawa, M., Dayn, Y. and Verma, I.M. (2002): Transgenesis by lentiviral vectors: Lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 99, 2140–2145.
 - 60) Lois, C., Hong, E.J., Pease, S., Brown, E.J., Baltimore, D. (2002): Germline Transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. Science, 295, 868–872.
 - 61) Tiscornia, G., Singer, O., Ikawa, M. and Verma, I.M. (2003): A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 100, 1844–1848.
 - 62) Rubinson, D.A., Dillon, C.P., Kwiatkowski, A.V., Sievers, C., Yang, L., Kopinja, J., Zhang, M., McManus, M.T., Gertler, F.B., Scott, M.L. and Parijs, L.V. (2003): A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. Nat. genet., 33, 401–406.
 - 63) Tiscornia, G., Tergaonkar, V., Galimi, F. and Verma, I.M. (2004): CRE recombinase-inducible RNA interference mediated by lentiviral vectors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 101, 7347–7351.
 - 64) Ventura, A., Meissner, A., Dillon, C.P., McManus, M., Sharp, P.A., Parijs, L.V., Jaenisch, R. and Jacks, T. (2004): Cre-lox-regulated conditional RNA interference from transgenes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 101, 10380–10385.
 - 65) Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W. and Roder, J.C. (1993): Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 90, 8424–8428.
 - 66) Seibler, J., Küter-Luks, B., Kern, H., Streu, S., Plum, L., Mauer, J., Kühn, R., Brüning, J.C. and Schwenk, F. (2005): Single copy shRNA configuration for ubiquitous gene knockdown in mice. Nucleic Acids Res., 33, e67.
 - 67) Coumoul, X., Li, W., Wang, R.H. and Deng, C. (2004): Inducible suppression of Fgfr2 and survivin in ES cells using a combination of the RNA interference (RNAi) and

- the Cre-LoxP system. *Nucleic Acids Res.*, 32, e85.
- 68) Coumoul, X., Shukla, V., Li, C., Wang, R.H. and Deng, C.X. (2005): Conditional knockdown of *Fgfr2* in mice using Cre-LoxP induced RNA interference. *Nucleic Acids Res.*, 33, e102.
 - 69) Fritsch, L., Martinez, L.A., Sekhri, R., Naguibneva, I., Gerárd, M., Vandromme, M., Schaeffer, L. and Harel-Bellan, A. (2004): Conditional gene knock-down by CRE-dependent short interfering RNAs. *EMBO Rep.*, 5, 178–182.
 - 70) Shinagawa, T. and Ishii, S. (2003): Generation of *Ski*-knockdown mice by expressing a long double-strand RNA from an RNA polymerase II promoter. *Genes Dev.*, 17, 1340–1345.
 - 71) Nagy, A. (2000): Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis*, 26, 99–109.
 - 72) Stein, P., Svoboda, P. and Schultz, R.M. (2003): Transgenic RNAi in mouse oocytes: a simple and fast approach to study gene function. *Dev. Biol.*, 256, 187–193.
 - 73) Wall, N.R. and Shi, Y. (2003): Small RNA: can RNA interference be exploited for therapy? *Lancet*, 362, 1401–1403.
 - 74) Xu, Z. and Xia, X.G. (2005): Dominant disease gene gets silenced. *Gene Ther.*, 12, 1159–1160.
 - 75) Crombie, C. and Fraser, A. (2005): Treating genetic disease through RNA interference. *Lancet*, 365, 1288–1290.
 - 76) Rao, M. and Sockanathan, S. (2005): Molecular mechanisms of RNAi: implications for development and disease. *Birth Def. Res.*, 75, 28–42.
 - 77) Sledz, C.A. and Williams, B.R.G. (2005): RNA interference in biology and disease. *Blood*, 106, 787–794.
 - 78) Kitabwalla, M. and Ruprecht, R.M. (2002): RNA interference—a new weapon against HIV and beyond. *New Engl. J. Med.*, 347, 1364–1367.
 - 79) Li, M.-J., Bauer, G., Michienzi, A., Yee, J.K., Lee, N.S., Kim, J., Li, S., Castanotto, D., Zaia, J. and Rossi, J.J. (2003): Inhibition of HIV-1 infection by lentiviral vectors expressing Pol III-promoted anti-HIV RNAs. *Mol. Ther.*, 8, 196–206.
 - 80) Gitlin, L., Karelsky, S. and Andino, R. (2002): Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature*, 418, 430–434.
 - 81) Elmen, J., Thonberg, H., Ljungberg, K., Frieden, M., Westergaard, M., Xu, Y., Wahren, B., Liang, Z., Ørum, H., Koch, T. and Wahlestedt, C. (2005): Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality. *Nucleic Acids Res.*, 33, 439–447.
 - 82) Shlomai, A. and Shaul, Y. (2003): Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference. *Hepatology*, 37, 764–770.
 - 83) Giladi, H., Ketzinel-Gilad, M., Rivkin, L., Felig, Y., Nussbaum, O. and Galun, E. (2003): Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus replication in mice. *Mol. Ther.*, 8, 769–776.
 - 84) Yokota, T., Sakamoto, N., Enomoto, N., Tanabe, Y., Miyagishi, M., Maekawa, S., Yi, L., Kurosaki, M., Taira, K., Watanabe, M. and Mizusawa, H. (2003): Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO Rep.*, 4, 602–608.
 - 85) Randall, G., Grakoui, A. and Rice, C.M. (2003): Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 100, 235–340.
 - 86) McCaffrey, A.P., Meuse, L., Pham, T.T.T., Conklin, D.S., Hannon, G.J., Kay, M.A. (2002): RNA interference in adult mice. *Nature*, 418, 38–39.
 - 87) Yokota, T., Miyagishi, M., Hino, T., Matsumura, R., Andrea, T., Urushitani, M., Rao, R.V., Takahashi, R., Bredesen, D.E., Taira, K. and Mizusawa, H. (2004): siRNA-based inhibition specific for mutant SOD1 with single nucleotide alternation in familial ALS, compared with ribozyme and DNA enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 314, 283–291.
 - 88) Raoul, C., Abbas-Terki, T., Bensadoun, J.C., Guillot, S., Haase, G., Szulc, J., Henderson, C.E. and Aebischer, P. (2005): Lentiviral-mediated silencing of SOD1 through RNA interference retards disease onset and progression in a mouse model of ALS. *Nat. Med.*, 11, 423–428.
 - 89) Ralph, G.S., Radcliffe, P.A., Day, D.M., Carthy, J.M., Leroux, M.A., Lee, D.C.P., Wong, L.F., Bilsland, L.G., Greensmith, L., Kingsman, S.M., Mitrophanous, K.A., Mazarakis, N.D. and Azzouz, M. (2005): Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nat. Med.*, 11, 429–433.
 - 90) Reaume, A.G., Elliott, J.L., Hoffman, E.K., Kowall, N.W., Ferrante, R.J., Siwek, D.F., Wilcox, H.M., Flood, D.G., Beal, M.F., Brown, R.H.Jr., Scott, R.W. and Snider, W.D. (1996): Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat. Genet.*, 13, 43–47.
 - 91) Sui, D. and Wilson, J.E. (2004): Selective depletion of the type I, Type II, and Type III isozymes of hexokinase in mammalian cells using small interfering RNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 319, 768–773.
 - 92) Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W.S. and Khvorova, A. (2004): Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol.*, 22, 326–330.
 - 93) Naito, Y., Yamada, T., Ui-Tei, K., Morishita, S. and Saigo, K. (2004): siDirect: highly effective, target-specific siRNA design software for mammalian RNA interference. *Nucleic Acids Res.*, 32, W124–W129.
 - 94) Gong, D. and Ferrell, J.E.Jr. (2004): Picking a winner: new mechanistic insights into the design of effective siRNAs. *Trends Biotechnol.*, 22, 451–454.

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

i 横田隆徳 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 脳神経機能病態 (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腐心している。

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

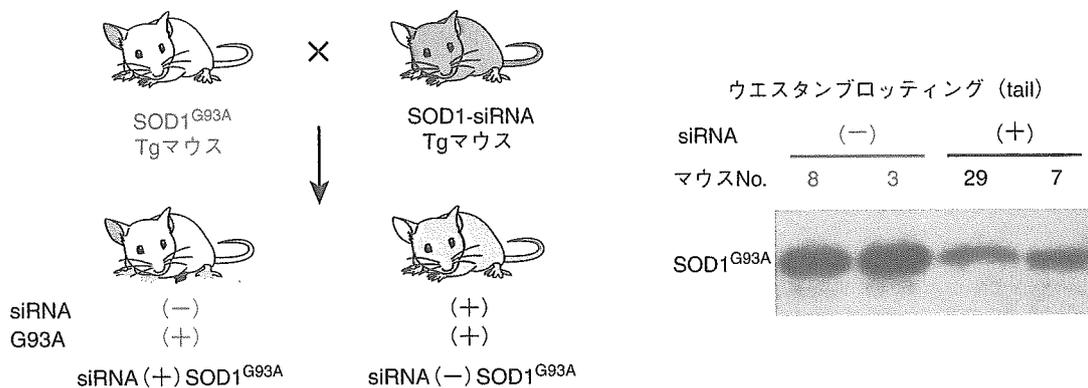


図1. SOD1^{G93A} トランスジェニックマウスの遺伝子治療

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ことで (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つて初めて発症する常染色体劣性遺伝形式の疾患の多くは loss of function をその機序とし, 一方のアレルのみで発症する常染色体優性遺伝形式の疾患の多くの場合は gain of function 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

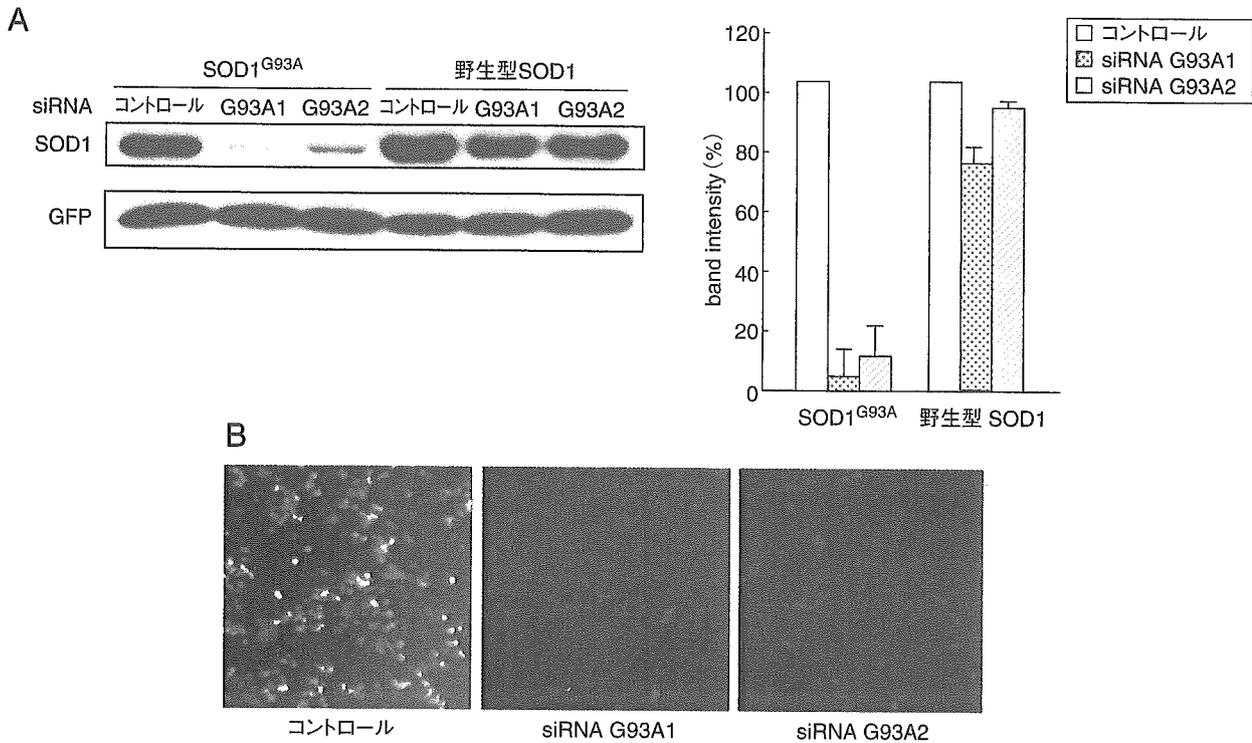


図2. 変異SOD1に特異的に作用するsiRNA

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。

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

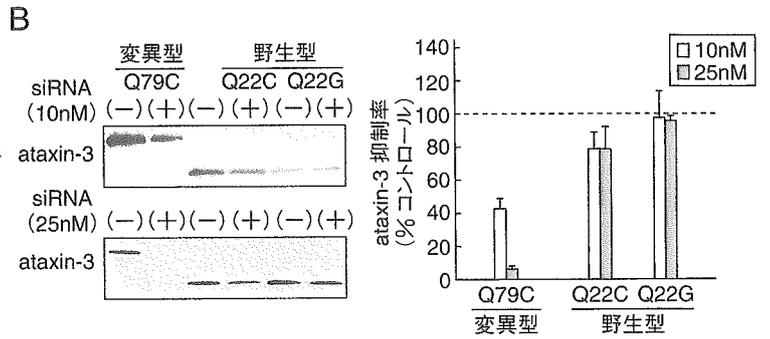
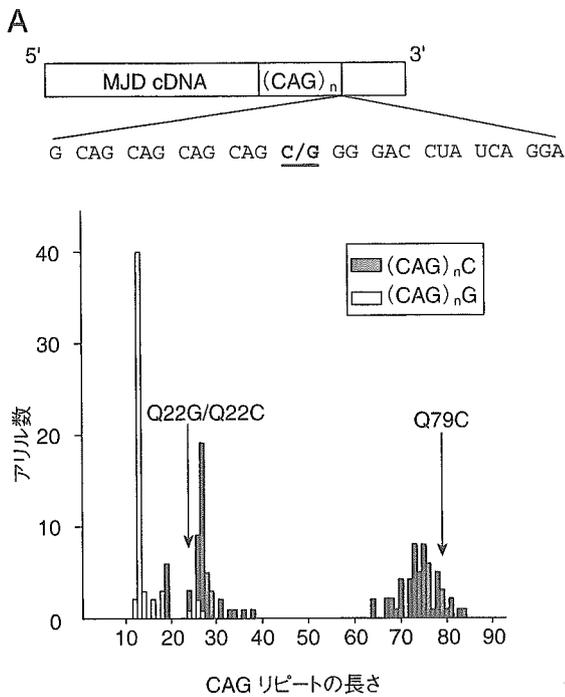


図3. Machado-Joseph病 (MJD) RNA に対する配列変異アリル特異的な一次配列非依存的な siRNA の切断

A: 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 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。
 B: 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 と標的配列のまったく同じのもう一つの正常アリル (Q22C) もわずかにしか切断しなかった。
 Li Y, et al: Ann Neurol (2004) 56: 124-129 より改変。

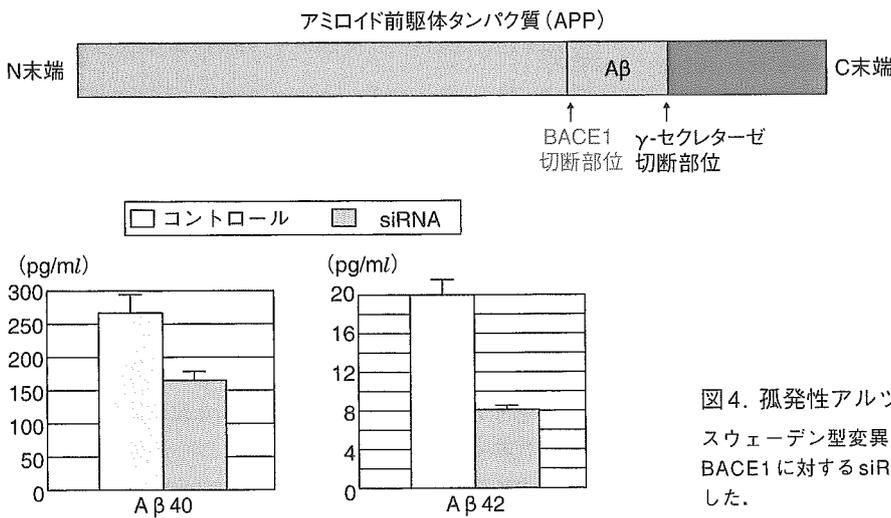


図4. 孤発性アルツハイマー病に対する siRNA による治療
 スウェーデン型変異 APP (APP^{sw}) 安定発現培養細胞株において BACE1 に対する siRNA により培養液中に分泌される Aβ 産生を抑制した。

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な異常を示さない。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

になるかもしれない。

VI. 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。McCaffrey¹⁵⁾らはマウスの尾静脈から10~50 μ 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クス法で、マウス肝細胞への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法で導入されたFas¹⁶⁾やCaspase-8に対する合成siRNAが、マウスにおいて誘発された劇症肝炎による死亡率を低下させたことが報告され、siRNAが*in vivo*でも有効であることが示された。またマウスにおいて、siRNAは脳血管関門があるため中枢神経系には入らないが、肝臓のほか腎臓、脾臓、肺、膵臓に導入可能であることが報告されている¹⁷⁾。だがヒトでは、臓器組織への圧力と循環系への用量負荷のため、そのまま臨床応用することは難しい。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¹⁸⁾。その他、有効なカチオニックリポソームベクターが開発されており、これらについては和田氏や平林氏の稿を参照されたい。

長期の抑制効果にはウイルスベクターが必要となる。shRNA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¹⁹⁾。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は非常に高い遺伝子導入効率があり期待されている。

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は困難で、siRNAによる神経変性疾患治療の大きな問題になっている。最近筆者らは脳血管内皮細胞へのsiRNAの導入に成功した。脳血管障害、多発性硬化症への応用が期待される。

おわりに

siRNAの核酸医薬としての臨床応用の研究には、上記以外にもサイレンシングの突然の停止の問題(シャットダウン現象)など解決すべき課題はまだ多くある。しかし、基礎研究は爆発的に進んでおり、最も大きな問題であるデリバリー方法にも急速な進歩がある。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が利用が突破口になると期待している。

文献

- 1) Amarzguiou M, et al: Nucleic Acids Res (2003) 31: 589-595
- 2) Jackson AL, et al: Nat Biotechnol (2003) 21: 635-637
- 3) Bridge AJ, et al: Nat Genet (2003) 34: 263-264
- 4) Yokota T, et al: EMBO Rep (2003) 4: 602-608
- 5) Garrus JE, et al: Cell (2001) 107: 55-65
- 6) Surabhi RM, et al: J Virol (2002) 76: 12963-12973
- 7) Arteaga HJ, et al: Nat Biotechnol (2003) 21: 230-231
- 8) Sorensen DR, et al: J Mol Biol (2003) 327: 761-766
- 9) Xia H, et al: Nat Med (2004) 10: 816-820
- 10) Yokota T, et al: Biochem Biophys Res Commun (2004) 314: 283-291
- 11) Gonzalez-Alegre P, et al: Ann Neurol (2003) 53: 781-787
- 12) Miller VM, et al: Proc Natl Acad Sci USA (2003) 100: 7195-7200
- 13) Li Y, et al: Ann Neurol (2004) 56: 124-129
- 14) Kao SC, et al: Biol Chem (2004) 279: 1942-1949
- 15) McCaffrey AP, et al: Nature (2002) 418: 38-39
- 16) Song E, et al: Nat Med (2003) 9: 347-351
- 17) Lewis DL, et al: Nat Genet (2002) 32: 107-108
- 18) Soutschek J, et al: Nature (2004) 432: 173-178
- 19) Davidson B, et al: Lancet Neurol (2004) 3: 145-149

for beginners

- ・「改訂RNAi実験プロトコール」多比良和誠ら 編: 羊土社 (2004)
- ・“RNAi” グレゴリー・ハノン 編, 中村義一 日本語版監修: メディカル・サイエンス・インターナショナル (2004)

Neuroscience

RNA干渉を用いた神経疾患の遺伝子治療

横田隆徳¹⁾

Takanori YOKOTA

1) 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科脳神経機能病態 (神経内科)
〒113-8519 東京都文京区湯島1-5-45

I. はじめに

RNA干渉 (RNAi) は、いかなる遺伝子に対してもデザインできて、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) 高いといわれている。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二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ついて神経疾患を中心に概説したい。

II. RNA干渉 (RNAi)

長い2本鎖RNAによって誘導される遺伝子発現抑制であるRNAi現象は植物から昆虫、哺乳動物に至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。

細胞内に導入された2本鎖RNAは、Dicerと

よばれるRNase III核酸分解酵素ファミリーによって21~24merの短い3'突出型の2本鎖RNA short interference RNA (siRNA) に分解される。siRNAは解きほぐされてアンチセンス鎖のみがヘリケースなどのいくつかの蛋白質からなるRNA蛋白質複合体であるRISC複合体 (RNA-induced silencing complex) に取り込まれ、アンチセンス鎖に相補的な配列をもつmRNAをその中央で分解する。

しかし、哺乳動物における2本鎖RNAの導入ではPKR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年にRNAi機構の中間産物であるsiRNAを合成して用い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¹⁾。

III. siRNAを用いた遺伝性疾患の遺伝子治療の考え方

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) の二つがあることが知られている。

遺伝子変異が常染色体にある場合、対立する二つのアレルの双方に遺伝子変異があって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ので、本来のタンパク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、 α -synuclein 変異による Parkinson 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でgain of toxic functionがその発症機序と考えられている。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。

IV. siRNAの特異性：変異遺伝子特異的な siRNA

siRNAと基質RNAとの特異性については、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とのかか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'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。

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1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も正常配列にはほとんど影響しない siRNA の例を示す¹³⁾。同様の報告はfrontotemporal dementia⁴⁾ や捻転dystonia²⁾ でも報告されている。

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。Machado-Joseph 病 (SCA3) の場合、CAGリピートの直下の下流にC/Gのpolymorphisms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。長い繰り返しをもつ病的アレルはすべてCだが、短い繰り返しをもつ正常アレルでは約半数の例でGである (図2 A)。

そこでわれわれはこのC/Gのpolymorphismsの標的として siRNA を設計し、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 polymorphisms 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2 B)³⁾。この機序は、CAGリピート長の変化に伴うRNAの二次構造の変化によって siRNA の標的配列へのアクセスに差異が生じたためと考えている。

V. トランスジェニックマウスへの *in vivo* の有効性

SCA1のトランスジェニックマウスの小脳に

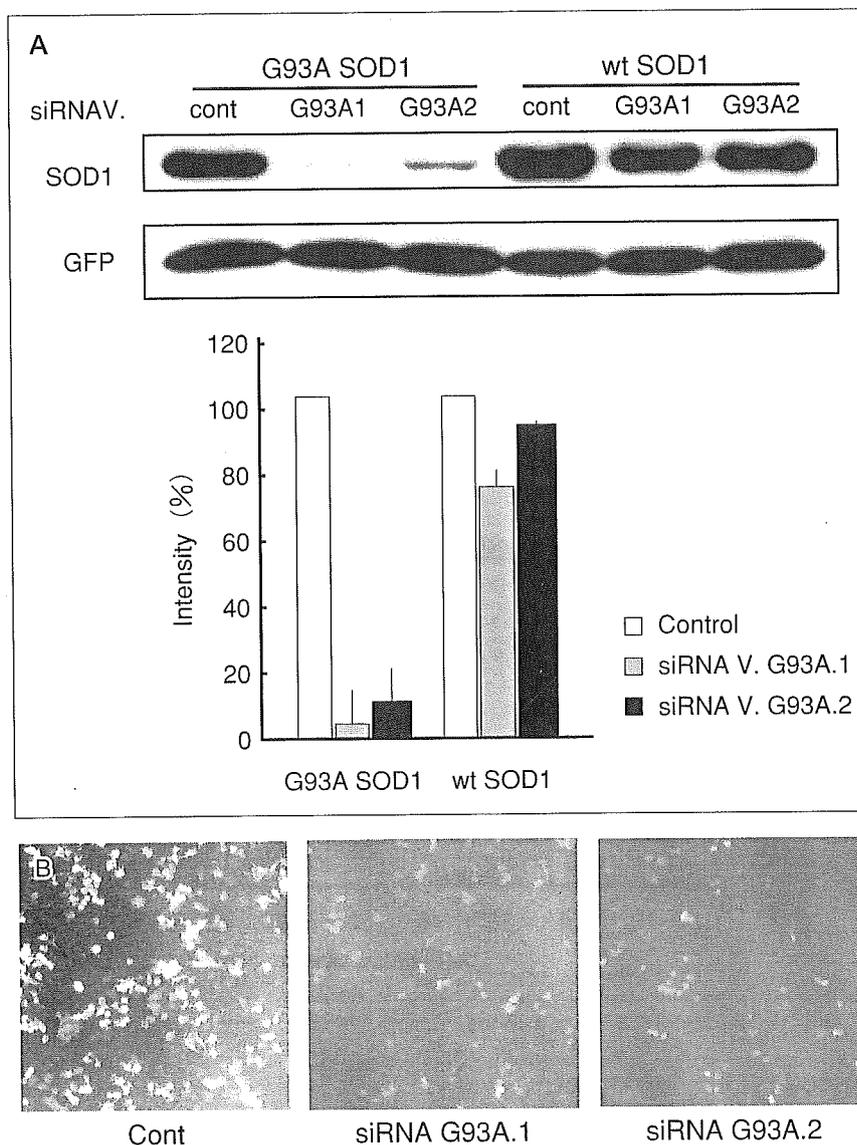


図1 変異SOD1に特異的に作用するsiRNA

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、野生型および変異SOD1の発現をウエスタンブロットした。siRNAG93A1, 2をとともに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¹⁾より改変)。

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¹¹⁾。さらに最近、SOD1に対するsiRNA発現型lenti-virusを全身の骨格筋に注射して逆行性に運動ニューロンにsiRNAを発現させ、G93A変異SOD1トランスジェニックマウスの発症を抑制した報告もされている⁶⁾。

われわれも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3)。この効果により8月齢の時点でALS症状の発症は完全に

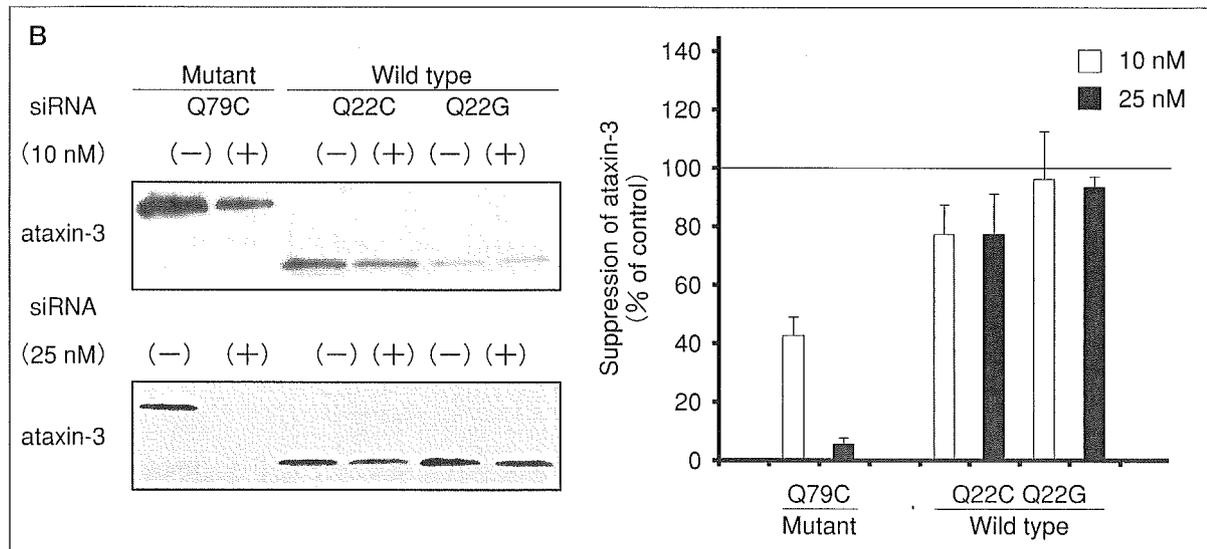
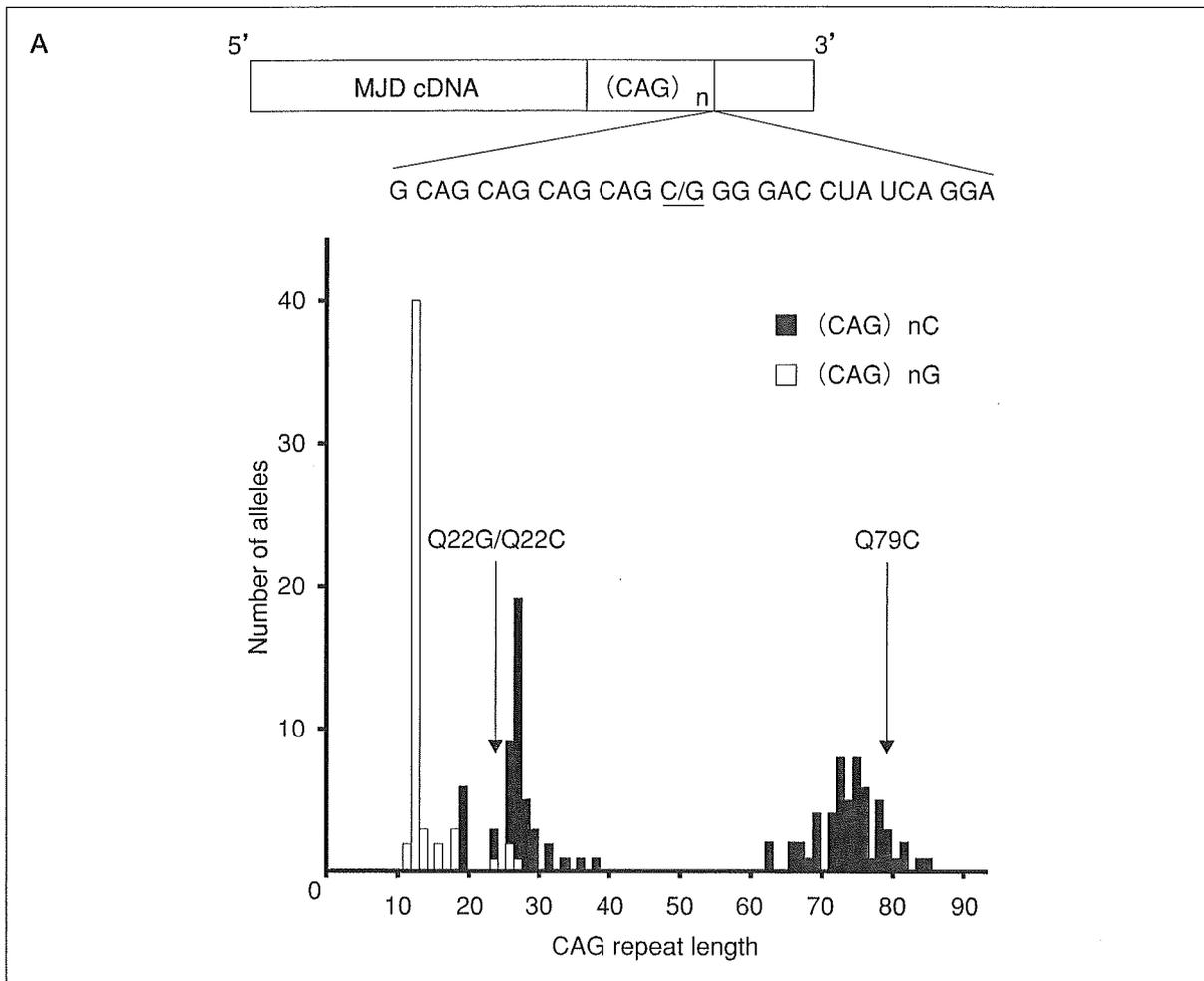


図2 Machado-Joseph病 (MJD) RNA に対する配列変異アリル特異的な一次配列非依存的な siRNA の切断

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 をも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。

B: われわれのデザインした 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 と標的配列のまったく同じのもう一つの正常アリル (Q22C) もわずかにしか切断しなかった (文献⁴⁾ より改変)。

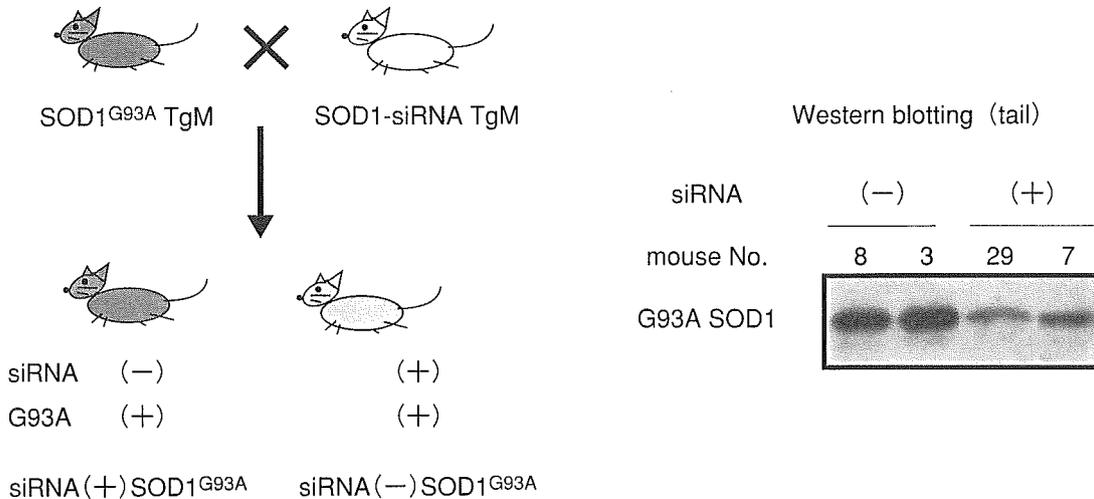


図3 SOD1G93Aトランスジェニックマウスの遺伝子治療

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ことで(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。

抑制されている。

VI. がんに対する *in vivo* の有効性

siRNAの *in vivo* デリバリーによってマウスの転移性がんの縮小効果が相次いで報告されている。大腸がん関連遺伝子であるβカテニンに対するnaked siRNAを静脈注射することにより皮下に移植された大腸がん¹⁰⁾、またbcl-2に対するsiRNAをカチオンリポソームを用いて静脈注射することにより肝臓に移植された肺がん¹²⁾、その大きさの縮小が報告された。さらにマウスの膀胱内に移植された膀胱がんでは、polo-like kinase-1 (PLK-1) に対するsiRNAをリポソームを用いて経尿道的に投与することによってPLK-1の発現低下とがん細胞の増殖抑制が観察された⁷⁾。

VII. 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。

マウスの尾静脈から10~50μg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、この導入法で導入されたFas⁷⁾やcaspase 8に対する合成siRNAでマウスに誘発された劇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。

ハイドロダイナミクス導入法によりsiRNAが肝臓以外に腎臓、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、脳血管関門があるため中枢神経系には入らない。

しかし、ハイドロダイナミ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、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速度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⁹⁾。また、IgGをsiRNA結合させて受容体を介したsiRNAの新しいデリバリーも報告されている⁸⁾。そのほかにも有望なカチオンベクターが次々に報告されているが、神経細胞への導入には成功していない。

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*の神経細胞へのsiRNA導入の報告が次々とされている。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、期待されている。

VIII. まとめ

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silencingなど効果の持続の問題、血液脳関門を越える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) Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al: Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494-498, 2001
- 2) Gonzalez-Alegre P, Miller VM, Davidson BL, et al: Toward therapy for DYT1 dystonia: allele-specific silencing of mutant TorsinA. *Ann Neurol* 53: 781-787, 2003
- 3) Li Y, Yokota T, Taira K, et al: Sequence-dependent and independent inhibition specific for mutant ataxin-3 by small interfering RNA. *Ann Neurol* 56: 124-129, 2004
- 4) 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
- 5) Nogawa M, Yuasa T, Kimura S, et al: Intravesical administration of small interfering RNA targeting PLK-1 successfully prevents the growth of bladder cancer. *J Clin Invest* 115: 978-985, 2005
- 6) Ralph GS, Radcliffe PA, Day DM, et al: Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nat Med* 11: 429-433, 2005
- 7) Song E, Lee SK, Wang J, et al: RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nature Med* 9: 347-351, 2003
- 8) Song E, Zhu P, Lee SK, et al: Antibody mediated *in vivo* delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat Biotechnol* 23: 709-717, 2005
- 9) Soutschek J, Akinc A, Blamlage B, et al: Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432: 173-178, 2004
- 10) Verma UN, Surabhi RM, Schmalstieg A, et al: Small interfering RNAs directed against beta-catenin inhibit the *in vitro* and *in vivo* growth of colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 9: 1291-1300, 2003
- 11) Xia H, Mao Q, Eliason SL, et al: RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nat Med* 10: 816-820, 2004
- 12) Yano J, Hirabayashi K, Nakagawa S, et al: Antitumor activity of small interfering RNA/cationic liposome complex in mouse models of cancer. *Clin Cancer Res* 10: 7721-7726, 2004
- 13) Yokota T, Miyagishi M, Hino T, et al: siRNA-based inhibition of superoxide dismutase expression; potential use in familial Amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Com* 314: 283-291, 2004

RNA干渉による神経変性疾患の遺伝子治療の現状

横田 隆徳 (東京医科歯科大学院医歯学総合研究科脳神経機能病態(神経内科)助教授)

RNA干渉(RNA interference: RNAi)は配列特異的な遺伝子発現抑制法で、いかなる遺伝子に対してもデザインできて、その標的遺伝子の発現抑制効果は極めて高く、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る。RNAi中間産物である short interfering RNA (siRNA)は、分子生物学の手法として広く利用されているが、核酸医薬としてもウイルス性疾患、遺伝性疾患、悪性腫瘍などで臨床応用に向けた研究が急速に進んでいる。本稿では、遺伝性神経変性疾患を対象を絞って、siRNAによる遺伝子治療の開発と問題点について概説したい。



<文献>

- 1) Yokota T, Miyagishi M, Hino T et al: siRNA-based inhibition of superoxide dismutase expression; potential use in familial Amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Com* 314: 283-291, 2004
- 2) Li Y, Yokota T, Taira K et al: Sequence-dependent and independent inhibition specific for mutant ataxin-3 by small interfering RNA. *Ann Neurol* 56: 124-129, 2004
- 3) Xia H, Mao Q, Eliason SL et al: RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nat Med* 10: 816-820, 2004
- 4) Ralph GS, Radcliffe PA, Day DM et al: Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nat Med* 11: 429-433, 2005
- 5) Soutschek J, Akinc A, Blamlage B et al: Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432: 173-178, 2004

siRNAを用いた遺伝性神経変性疾患の遺伝子治療の考え方

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蛋白の本来のもつ機能が消失または低下する場合(loss of function)と変異遺伝子や変異蛋白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蛋白は発現しているため、本来の蛋白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蛋白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(amyotrophic lateral sclerosis: ALS)、各種ポリグルタミン病、APPやPS1遺伝子変異によるAlzheimer病、 α -synuclein変異によるParkinson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、変異した蛋白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。

siRNAの特異性: 変異遺伝子特異的なsiRNA

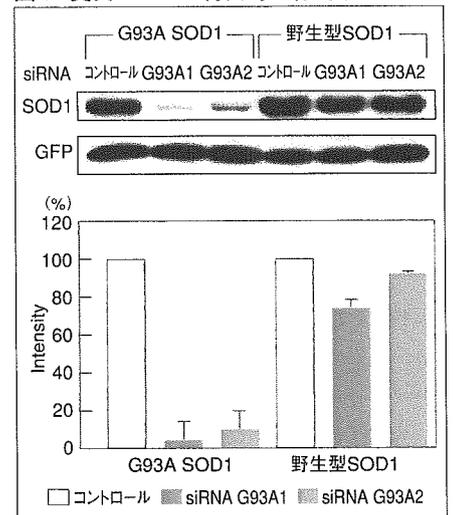
siRNAと基質RNAとの特異性について

は、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RNA-induced silencing complex(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。

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1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¹⁾。同様の報告は捻転dystoniaやfrontotemporal dementiaで報告されている。

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。Machado-Joseph病(SCA3)の場合、CAGリピートの直下の下流にC/G

図1 変異SOD1に特異的に作用するsiRNA



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、野生型及び変異SOD1の発現をウエスタンブロットした。siRNA G93A1, 2を共にG93A SOD1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(上)。GFPをタグにSOD1の発現を蛍光顕微鏡にて撮影(下)。 (文献1)より改変転載