

200730016A

厚生労働科学研究費補助金  
こころの健康科学研究事業

# RNAi を用いた神経・筋疾患の画期的治療法の開発

平成 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 水澤 英洋

平成 20 (2008) 年 3 月

# 目 次

## I. 総括研究報告

RNAi を用いた神経・筋疾患の画期的治療法の開発

水澤 英洋

## II. 分担研究報告

1. 神経変性疾患の治療、siRNA のデザイン

横田隆徳

2. RNA 工学的研究の遂行、siRNA 発現ライブラリーの開発

宮岸 真

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表

## IV. 研究成果の刊行物・別刷

# I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金(こころの健康科学研究事業)  
総括研究報告書

siRNA を用いた神経疾患に対する遺伝子治療

主任研究者 水澤 英洋 東京医科歯科大学大学院教授

研究要旨：今年度は、我々の開発した「あらゆる変異に対応可能な変異アリル特異的な新しいRNAiを用いた遺伝子発現抑制方法」について、in vivoでの検証として、SOD siRNAで抑制された内因性野生型SOD1の発現とそれによる脂肪肝の副作用を、アミノ酸配列を変えずに塩基配列を置換させてsiRNAが効かないようデザインしたsiRNA抵抗性野生型SOD1で抑制されたSOD1活性を補うことによってその副作用を回避させることに成功した。また、siRNAの新規のin vivoデリバリーベクターとして、ビタミンE、中でも最も生体内における分布や肝臓への輸送経路が判明している $\alpha$ -Tocopherol (Toc)を直接siRNAに共有結合させることにより、静脈投与で有効に肝臓の内因性遺伝子の抑制することに成功した。さらにこれを血清のリポプロテインと結合させることにより、さらにその効果を増強することに成功し、この発明を米国に国際特許出願した(米国特許出願番号PCT/JP2007/308085)。さらに、これに改良を加えて、中枢神経内へのsiRNAのデリバリーを試みている。また、昨年までにtRNA連結型siRNA発現ベクターでより高いインターフェロン応答が起きることを報告してきたが、今年度はそのインターフェロン応答が細胞質のPKRの活性化によって引き起こされることを見出した。

分担研究者

横田 隆徳	東京医科歯科大学大学院医歯学 総合研究科 准教授
宮岸 真	東京大学大学院医学系研究科 特任准教授

A. 研究目的

本研究の目的は、RNA 干渉によるノックダウン技術である siRNA (short interfering RNA) を用いた各種神経筋疾患の画期的治療法開発の基礎研究を行うことである。今年度はまた、如何なる変異にも対応可能な RNAi 技術が、siRNA トランスジェニックマウスを用いて in vivo でも有効であることを明らかにする。臨床応用に向けて生体内へのデリバリーが問題となる。しかし、そのデリバリーの方法はいまだに不十分であり、かつ近年 siRNA/カチオンリポソーム複合体は 1 型インターフェロンや TNF $\alpha$  や IL-6 などのサイトカインを誘導すること (*Nat Biotechnol.* 23:457-462, 2005) や、発現型 shRNA には microRNA のプロセス機構と競合するという新たな shRNA 毒性 (*Nature* 441:537-541, 2006) が判明して、副作用や非特異的な発現抑制効果の原因になりうる可能性が問題になっている。我々も同様の問題に直面したが、それぞれ本研究により新しいベクターを開発することでその解決方法を見出す。

B. 研究方法

1) siRNA トランスジェニックマウス (TgM)  
作製：マウス ES 細胞に SOD1-siRNA 発現断片を導入し、クローンを選択した。高率に SOD1 タンパクの発現を抑制したクローンからキメラマウスを作製し F1 マウスを得た。また、siRNA 抵抗性ヒト野生型 SOD1 トランスジーンを受精卵前核へマイクロインジェクションにより、siRNA 抵抗性ヒト野生型 SOD1 を過剰に発現する TgM を作製した。この両者を体外受精させダブル TgM を得た

3) ビタミン E ベクター-Toc-siRNA のマウスへの投与  
ビタミン E ベクターは化学合成した siRNA のアンチセンス鎖の 5' 末端にアミダイト化した  $\alpha$ -tocopherol をリン酸結合した。マウスを 1 日絶食後に経口投与して、尾静脈からアポ B に対する Toc-siRNA を通常の方法で静注し、48 時間後に肝臓を取り出して標的遺伝子の mRNA の発現量を qRT-PCR、ノザンプロットで、組織分布を siRNA に標識した Cy3 の蛍光信号を共焦点顕微鏡を用いて検索した。

(倫理面への配慮)

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

### C. 研究結果

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

また、siRNA 抵抗性 SOD1 過剰発現 TgM は、ヒト SOD1 プロモーターとゲノム遺伝子の siRNA 標的配列において変異導入をおこない、その発現断片を受精卵の前核にマイクロインジェクションして産児を得た。その尾から抽出した DNA を PCR 法にて増幅して遺伝子型を決定した。その上で、SOD1-siRNA TgM と掛け合わせることで SOD1 蛋白が回復するかどうかを検証し、副作用である脂肪肝の回復に成功した。

ビタミン E ベクターは  $\alpha$ -tocopherol の 6 位の唯一の水酸基をアミダイト化し、29 塩基の化学修飾を施した siRNA のアンチセンス鎖 5' 末端にアミダイトを介して直接結合した。その後これに対応する 27 塩基のセンス鎖をアニーリングさせた (Toc-siRNA)。Toc-siRNA のマウスへの投与はマウスを 1 日絶食後に経口投与して、尾静脈からアポ B に対する Toc-siRNA を通常の方法で静注し、48 時間後に肝臓を取り出して標的遺伝子の mRNA の発現量を定量 RT-PCR、Northern blot、組織分布を siRNA に標識した Cy3 の蛍光信号を共焦点顕微鏡を用いて検索した。また、安全性として Toc-siRNA 投与 24 時間後と 48 時間後の血算、生化学に加えて、投与 3 時間後の血清中 IFN- $\alpha$  値を ELISA により、肝臓での IFN- $\beta$  の誘導を定量 RT-PCR により検索していずれの副作用も認められなかった。

インターフェロン応答については、宮岸氏らもこれまで開発してきた様々なタイプの siRNA 発現系に対して、その解析を行った。特に長さ 50 塩基対、100 塩基対を発現する tRNA 連結タイプの shRNA 発現ベクターを作製し、細胞に導入後、インターフェロンの発現量を定量 PCR により解析した。このインターフェロン誘導の機序を調べるために siRNA を用いて細胞の内因性 PKR をノックダウンして PKR 活性化の意義を明らかにするとともに、さらにインターフェロンの上流の NF $\kappa$ B や IRS の関与についてもレポータープラスミドを用いて検索を行った。

### D. 考察

まず、トランスジェニックマウスをもちいた変異 SOD1 遺伝子特異的な新規 RNAi 方法の有効性を *in vivo* で示せたことは、siRNA を標的臓器にまでデリバリーすれば神経変性疾患も副作用なく治療可能であるという原理原則を明確に示すことができ、siRNA を用いた遺伝子治療の将来性に大きな進歩をもたらした。昨年までの成果で、肝臓へ安全で有効な長期のデリバリー方法が確立している shRNA 発現アデノ随伴ウイルス 8 ベクターを用いることにより、肝臓で産生される変異トランスサイレチン (TTR) が原因である家族性アミロイドニューロパチーに対して、変異アリル特異的な遺伝子治療の可能性を大きく高めたと言え、V30MTTR トランスジェニックマウスを用いてその有用性を検証したい。

一般の神経疾患への siRNA を用いた遺伝子治療には中枢神経系へのデリバリー方法が最大の課題だが、ウイルスベクターには実際の臨床応用は安全性の面でまだ問題があり、非ウイルス性ベクターの開発が望まれる。今年度、我々は神経細胞にも導入可能な新規の  $\alpha$ -tocopherol (ビタミン E) 結合ベクターを開発し、静脈注射で肝臓への安全で有効な siRNA の *in vivo* デリバリーを示すことが出来た。ビタミン E の代謝からは経口投与の可能性もある薬物への発展が期待される。さらにこれを血清のリポプロテインと結合させることにより、さらにその効果を増強することに成功し、同様の方法で中枢神経系への応用を試みて有望な結果を得ている。

また、ウイルスベクターを用いる場合は発現型 shRNA が必要であるが、その際のインターフェロン誘導に PKR が中核的な役割を果たしていることを明らかにできたことから、その副作用の克服に向けて重要な知見を得た。

### E. 結論

siRNA を用いた神経変性疾患の遺伝子治療の有効性と副作用回避の方法の有用性を *in vivo* で示した。さらに全身性の siRNA のデリバリー方法として新規のビタミン E 結合性 shRNA ベクターを開発して、肝臓へのデリバリーに成功した。さらにこれを中枢神経系に発展させる実験を行なっている。

### F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Nishina K, Unno T, Uno Y, Kubodera T, Kanouchi T, Mizusawa H, Yokota T. Efficient In Vivo delivery of siRNA to liver by conjugation of  $\alpha$ -Tocopherol. *Mol Ther* 16:734-740, 2008
- 2) Sakamoto N, Tanabe Y, Yokota T, Saito K, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Sakurai Y, Chen CH, Yano M, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Maekawa S, Enomoto N, Kohara M, Watanabe M: Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA. *J Gastro Hepatol* (in press)
- 3) Yokota T, Iijima S, Kubodera T, Ishii K, Katakai Y, Ageyama N, Chen YW, Lee YJ, Unno T, Nishina K, Iwasaki Y, Maki N, Mizusawa H, Akari H. Efficient regulation of viral replication by siRNA in a non-human primate surrogate model for hepatitis C. *Biochem Biophys Res Com.*361:294-300, 2007
- 4) Yokota T. siRNA-based gene therapy for autosomal dominant disease of the nervous system. In *RNA i therapeutics*. Ed by Takaku H, Yamamoto N. Transworld Research Network, pp137-146, 2007.
- 5) Wu S, Murai S, Kataoka K, Miyagishi M. Yin Yang 1 induces transcriptional activity of p73 through cooperation with E2F1. *Biochem Biophys Res Commun.*365, 75-81, 2008
- 6) Takaoka A, Wang Z, Choi MK, Yanai H, Negishi H, Ban T, Lu Y, Miyagishi M, Kodama T, Honda K, Ohba Y, Taniguchi T. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 448, 501-505, 2007

### 2. 学会発表

- 1) 山田宏美, 久保寺隆行, 横田隆徳, 水澤英洋 : ALS モデルマウスの siRNA を用いた遺伝子治療の副作用の回避, 第 48 回日本神経学会総会、名古屋、5 月 16 日-18 日、2007
- 2) 山田宏美, 久保寺隆行, 横田隆徳, 水澤英洋 : A New RNA strategy for selective suppression of a mutant allele to any mutation. 第 13 回日本遺伝子治療学会, 名古屋, 6 月 28-30 日, 2007
- 3) Yokota T, Sasaguri H, Saito Y, Mitani T, Mizusawa H. Transgenic siRNA halts ALS in a mouse model. 59th AAN annual meeting, Boston, May 4, 2007
- 4) 横田隆徳. これが siRNA 創薬成功の鍵。日経 BP 社 B T J プロフェッショナルセミナー。2007. 7. 4、東京
- 5) 横田隆徳 : RNAi トランスジェニックマウスと in vivo デリバリー。第 121 回東北大学薬学部セミナー、2007. 12. 18、仙台

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許出願中 :

- 1) ES細胞を用いた新しいsiRNAトランスジェニックマウスの作製方法の開発  
(特許出願番号2007-118962)

- 2) Yokota T, et al. Gene delivery of siRNA new endogenous lipoprotein.  
(米国特許出願番号 PCT/JP2007/308085)

## Ⅱ. 分担研究報告

siRNA を用いた神経疾患に対する遺伝子治療

分担研究者 横田隆徳 東京医科歯科大学 准教授

研究要旨 1) 我々の考案した「あらゆる変異に対応可能な変異アリル特異的な RNAi 法」の有  
用性の検証として、SOD siRNA で抑制された内因性野生型 SOD1 の発現を、アミノ酸配列を変え  
ずに塩基配列を置換させて siRNA が効かないようデザインし、siRNA 抵抗性野生型 SOD1 で補う  
ことによって副作用の脂肪肝を回避させることに成功した。

2) siRNA の新規の in vivo デリバリーベクターとして、ビタミン E、中でも最も生体内におけ  
る分布や肝臓への輸送経路が判明している  $\alpha$ -Tocopherol (Toc) を直接 siRNA に共有結合させる  
ことにより、静脈投与で有効に肝臓の内因性遺伝子の抑制することに成功した。

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

B. 研究方法

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

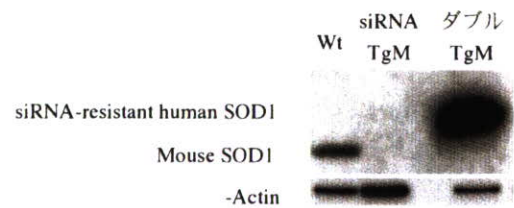
2) siRNA トランスジェニックマウス (TgM)  
作製: マウス ES 細胞に SOD1-siRNA 発現断片  
を導入し、クローンを選択した。高率に SOD1  
タンパクの発現を抑制したクローンからキメ  
ラマウスを作製し F1 マウスを得た。また、  
siRNA 抵抗性ヒト野生型 SOD1 トランスジーン  
の受精卵前核へマイクロインジェクションに  
より、siRNA 抵抗性ヒト野生型 SOD1 を過剰に  
発現する TgM を作製した。この両者を体外受  
精させダブル TgM を得た

3) Toc-siRNA のマウスへの投与  
マウスを 1 日絶食後に経口投与して、尾静脈  
からアポ B に対する Toc-siRNA を通常の方法  
で静注し、48 時間後に肝臓を取り出して標的  
遺伝子の mRNA の発現量を qRT-PCR、ノザンブ  
ロットで、組織分布を siRNA に標識した  
Cy3 の蛍光信号を共焦点顕微鏡を用いて  
検索した。

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

C. 研究結果、D. 考察

1) 我々はあらゆる変異に対応可能な変異  
アリル特異的な新しい RNAi を用いた遺伝子  
発現抑制方法として、まず siRNA で変異型と野  
生型、両者の RNA の発現を抑制し、その siRNA  
で切断されないようにエンジニアした cDNA  
によって野生型タンパクを戻す方法を報告し  
た。昨年、siRNA 抵抗性 SOD1 過剰発現 TgM  
を作製し、この TgM と SOD1 siRNA TgM と掛け合  
わせることにより、ダブル TgM を作製した。こ  
れにより、内因性のマウス SOD1 の発現は抑制  
したまま、ヒト SOD1 の発現を補うことに成功  
し (下図)、末梢血の低下した SOD1 活性を補  
うことに成功した。



図、 脊髄の SOD1 抗体による Western  
Blotting

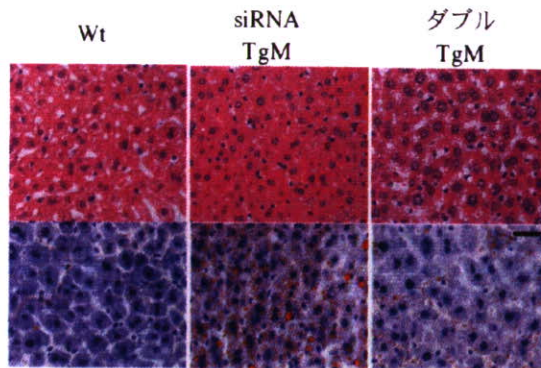
ダブル TgM では Mouse SOD1 は抑制されたままで、  
siRNA-resistant human SOD1 が補われている。

c) 組織学的解析

肝臓の組織切片のズダンⅢ染色を行い、抗  
SOD1 siRNA TgM で認められた SOD1 低下によ  
る副作用である肝臓の脂肪沈着がダブル TgM  
では認められず、血液生化学検査に加え組織  
学的にも脂肪肝を改善させることに成功した  
(下図)。



ス鎖をアニーリングさせた（右上図）。



図，肝臓の組織学的検査

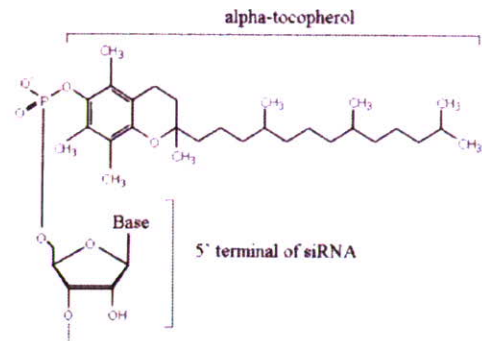
ヘマトキシリン・エオジン染色(上段)及びズダンⅢ染色(下段)を行った。siRNA TgMで認められた肝臓の脂肪沈着がダブルTgMでは認められない。(bar=20 $\mu$ m)

今回、ALS に対する siRNA を用いた遺伝子治療において認められた内因性野生型 SOD1 の発現抑制による副作用に対して、我々が考案した「変異遺伝子特異的な RNAi 法」を適用することでその副作用を回避させることに成功した。

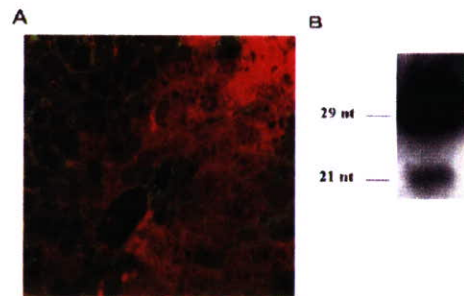
この「変異遺伝子特異的な RNAi 法」とは、野生型・変異型アレルの発現を効率の良い siRNA で抑制すると同時に、その siRNA で切断されないようにエンジニアした siRNA 抵抗性野生型遺伝子で野生型タンパクを補うことで変異遺伝子特異的な発現抑制効果が得られる。本方法を実際の遺伝子治療へ応用することを考える際、補充した野生型タンパクが果たして本来の内因性タンパクと同等の機能を果たすのかという点が問題点として最も懸念された。その点に関して、本研究において siRNA 抵抗性野生型遺伝子によって発現させた SOD1 タンパクが、siRNA で抑制された SOD1 活性低下によるフェノタイプを補うことが可能であることを *in vivo* において証明することができた。これにより、本法の常染色体優性遺伝性神経変性疾患に対する、siRNA の変異アレル特異的な遺伝子治療法の有用性を示せた。

## 2) ビタミンEベクター

Toc の 6 位の唯一の水酸基をアミダイト化し、29 塩基の化学修飾を施した siRNA のアンチセンス鎖 5' 末端にアミダイトを介して直接結合した。その後これに対応する 27 塩基のセン



生体内での Toc-siRNA の取り込み及びその分布を調べるため、Toc-siRNA に蛍光色素である Cy3 を結合させたものをマウス尾静脈から 8mg/kg で静注し、肝細胞の細胞質内への高率の取り込みを確認した（下図 A）。さらに

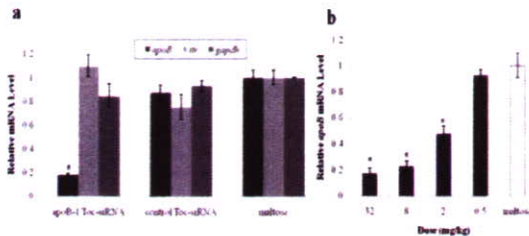


Cy3ラベルsiRNAの肝細胞とりこみ(A)とノザンプロット(B)

Toc-siRNA のアンチセンス鎖を認識するプローブでノザンプロット(NB)を行ったところ、29nt の Toc-siRNA に加えて、細胞内で Dicer プロセスされた 29nt のバンドも検出できた（下図 B）。

さらに、生体内における Toc-siRNA の効果を調べるため、マウス尾静脈からアポ B に対する Toc-siRNA を静注し、48 時間後に肝臓を取り出して標的遺伝子の mRNA の発現量を qRT-PCR を用いて調べた。その結果以下の図に示すように、肝臓の内因性遺伝子の標的遺伝子特異的に 2mg/kg の低濃度で有効な抑制効果が得られた。





また、安全性として Toc-siRNA 投与 3 時間後の血清中 IFN- $\alpha$  値は検出感度以下であり、肝臓での IFN- $\beta$  の mRNA 発現はいずれも認められなかった。加えて 24 時間後と 48 時間後の血算における白血球数と血小板数の異常値、血清生化学における肝機能・腎機能障害はいずれも認められず Toc-siRNA による明らかな副作用は認められなかった。Toc-siRNA を 2mg/kg で投与した時のマウスへの Toc 静注量は 46  $\mu$ g/kg であり、人間が一日に必要な Toc の摂取量が 125-200  $\mu$ g/kg であることを考えると非常に少量である。またビタミン E の作用として抗酸化作用が有名であるが、この Toc-siRNA では Toc の抗酸化作用を示す唯一の水酸基をアミダイト化しているため、抗酸化作用は失活化されている。また特にカチオニックリポソームを用いて siRNA を投与した時に問題となる IFN 応答は認められていない。生体内への siRNA 投与により IFN 応答を生じる原因として siRNA の Toll 様受容体への結合が報告されている。Toc-siRNA が IFN 誘導しなかった原因として、化学修飾を施していない Toc-siRNA も IFN 応答を起こしていないことから、Toc-siRNA はカチオニックリポソームとは経路が異なり、ビタミン E が生理的に肝臓に取り込まれる経路を用いるため IFN 応答を生じない可能性を考えている。

さらにこれを血清のリポプロテインと結合させることにより、さらにその効果を増強することに成功し、同様の方法で中枢神経系への応用を試みている。

#### E. 結論

siRNA を用いた神経変性疾患の遺伝子治療の有効性と副作用回避の方法の有効性 in vivo で示した。さらに全身性の siRNA のデリバリー方法として新規のビタミン E 結合性 shRNA ベクターを開発して、肝臓へのデリバリーに成功した。さらにこれを中枢神経系に発展させる実験をしている。

#### F. 健康危険情報

健康を損なう実験系は使用していない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Nishina K, Unno T, Uno Y, Kubodera T, Kanouchi T, Mizusawa H, Yokota T. Efficient In Vivo delivery of siRNA to liver by conjugation of  $\alpha$ -Tocopherol. *Mol Ther* 16:734-740, 2008

2) Sakamoto N, Tanabe Y, Yokota T, Saito K, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Sakurai Y, Chen CH, Yano M, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Maekawa S, Enomoto N, Kohara M, Watanabe M: Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA. *J Gastro Hepatol* (in press)

3) Yokota T, Iijima S, Kubodera T, Ishii K, Katakai Y, Ageyama N, Chen YW, Lee YJ, Unno T, Nishina K, Iwasaki Y, Maki N, Mizusawa H, Akari H. Efficient regulation of viral replication by siRNA in a non-human primate surrogate model for hepatitis C. *Biochem Biophys Res Com.*361:294-300, 2007

4) Yokota T. siRNA-based gene therapy for autosomal dominant disease of the nervous system. In *RNA i therapeutics*. Ed by Takaku H, Yamamoto N. Transworld Research Network, pp137-146, 2007.

##### 2. 学会発表 (シンポジウムのみ)

1) 山田宏美, 久保寺隆行, 横田隆徳, 水澤英洋: ALS モデルマウスの siRNA を用いた遺伝子治療の副作用の回避, 第 48 回日本神経学会総会、名古屋、5 月 16 日-18 日、2007

2) 山田宏美, 久保寺隆行, 横田隆徳, 水澤英洋: A New RNA strategy for selective suppression of a mutant allele to any mutation. 第 13 回日本遺伝子治療学会、名古屋、6 月 28-30 日、2007

3) Yokota T, Sasaguri H, Saito Y, Mitani T, Mizusawa H. Transgenic siRNA halts ALS in a mouse model. 59th AAN annual meeting, Boston, May 4, 2007

4) 横田隆徳.これが siRNA 創薬成功の鍵。日経 BP 社 B T J プロフェッショナルセミナー。2007. 7. 4、東京

5) 横田隆徳: RNAi トランスジェニックマウスと in vivo デリバリー。第 121 回東北大学薬学部セミナー、2007. 12. 18、仙台

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願中：

1) ES細胞を用いた新しいsiRNAトランスジェニックマウスの作製方法の開発。

(特許出願番号2007-118962)。

2) Yokota T, et al. Gene delivery of siRNA with new endogenous lipoprotein.

(米国特許出願番号 PCT/JP2007/308085)

厚生労働科学研究費補助金（心の健康科学研究事業）  
分担研究報告書

siRNA を用いた神経疾患に対する遺伝子治療

分担研究者 宮岸 真 東京大学大学院医学系研究科 特任准教授

研究要旨

本研究事業の目的は、RNA 干渉 (RNAi) 技術を用いて神経・筋疾患の遺伝子治療の基礎的な研究を行うことである。今年度、分担者は、RNAi 技術を神経・筋疾患関連遺伝子治療に用いる際に問題となっているインターフェロン応答に対して、siRNA 発現ベクター系の解析研究を行った。tRNA 連結タイプの siRNA ベクターによって生じるインターフェロン応答について、シグナル経路の解析を行ったところ、核内の PKR が必須であることが判明した。また、インターフェロンβの上流にあり、発現を調節していることが知られている NFκB および IRS のどちらも関与していないということが明らかになった。

A. 研究目的

RNA 干渉を用いたノックダウン技術である RNAi ベクターを用いて、神経・筋疾患の遺伝子治療を目指した基礎研究を行う。その中で、分担者は siRNA 発現系に伴う、インターフェロン応答等の非特異的な抑制の解析研究を行う。

B. 研究方法

申請者らがこれまで開発してきた tRNA 連結タイプの siRNA ベクターによって生じるインターフェロン応答のパスウェイを調べるために、核内 PKR をノックダウンした細胞に上記 siRNA ベクターを導入し、インターフェロンβの発現量を Realtime PCR により解析した。さらに、詳細な経路を調べるためにインターフェロンβを調節していることが知られている NFκB および IRS の関与についてレポータープラスミドを用いて解析した。

(倫理面への配慮)

培養細胞を使った実験であるため倫理面の問題は無い。

C. 結果

tRNA 連結タイプの siRNA ベクターによって生じるインターフェロン応答は、PKR のノックダウンにより、インターフェロン応答がなくなったことから、PKR が必須であることがわかった。また、レポーターを用いた実験から、インターフェロンβの上流にあり、発現を調節していることが知られている NFκB および IRS のどちらも関与していないということが明らかになった。

D. 考察

これまで、明らかにされていなかった二本鎖 RNA の発現によって生じるインターフェロン応答の新しい機序の解明を行うことができた。また、未知の因子が関与することを示唆する結果を得ることができたことは、今後の研究の発展に繋がる。

E. 結論

今回、RNAi を用いて、神経・筋疾患に対する遺伝子治療を行う際に問題となるインターフェロン応答等の非特異的な抑制について、新たな知見が得られた。今後、これらの情報をもとに、さらに安全で、効果的な RNAi 技術の応用開発が期待される。

F. 健康危険情報

健康を損なう実験系は使用していない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Wu S, Murai S, Kataoka K, Miyagishi M, Yin Yang 1 induces transcriptional activity of p73 through cooperation with E2F1. *Biochem Biophys Res Commun.* 365, 75-81, 2008

Takaoka A, Wang Z, Choi MK, Yanai H, Negishi H, Ban T, Lu Y, Miyagishi M, Kodama T, Honda K, Ohba Y, Taniguchi T. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 448, 501-505, 2007

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Yokota T	siRNA-based gene therapy for autosomal dominant disease of the nervous system.	Takaku H, Yamamoto N	RNAi Therapeutics	Transworld Research Network	India	2007	137-146

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nishina K, Unno T, Uno Y, Kubodera T, Kanouchi T, Mizusawa H, Yokota T	Efficient In Vivo delivery of siRNA to liver by conjugation of $\alpha$ -Tocopherol.	Mol Ther	16	734-740	2008
Sakamoto N, Tanabe Y, Yokota T, Saito K, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Sakurai Y, Chen CH, Yano M, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Maekawa S, Enomoto N, Kohara M, Watanabe M	Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA.	J Gastro Hepatol	in press		
Yokota T, Iijima S, Kubodera T, Ishii K, Katakai Y, Ageyama N, Chen YW, Lee YJ, Unno T, Nishina K, Iwasaki Y, Maki N, Mizusawa H, Akari H	Efficient regulation of viral replication by siRNA in a non-human primate surrogate model for hepatitis C.	Biochem Biophys Res Com	361	294-300	2007

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Wu S, <u>Miyagishi M</u> , et al.	Yin Yang 1 induces transcriptional activity of p73 through cooperation with E2F1.	Biochem Biophys Res Commun.	365	75-81	2008
Goto E, <u>Miyagishi M</u> , et al.	An excellent monitoring system for surface ubiquitination-induced internalization in mammals.	PLoS ONE	3	e1490	2008
Sutou S, <u>Miyagishi M</u> , et al.	Knockdown of the bovine prion gene PRNP by RNA interference (RNAi) technology.	BMC Biotechnol.	26	44	2007
Takaoka A, <u>Miyagishi M</u> , et al.	DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response.	Nature	173	665-671	2007

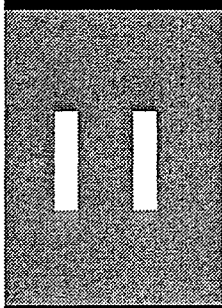
## IV. 研究成果の刊行物・別刷



Transworld Research Network  
37/661 (2), Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India



RNAi Therapeutics, 2006:137-146 ISBN: 81-7895-245-9  
Editors: Hiroshi Takaku and Naoki Yamamoto



## siRNA-based gene therapy for autosomal dominant disease of the nervous system

**Takanori Yokota**

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

### Abstract

*Most mutant gene of autosomal dominant diseases usually induces the disease by its toxic property. Such a 'gain of toxic function' of mutant protein is predicted to cause cell death in autosomal dominant neurodegenerative diseases with a missense point mutation, such as familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS), familial Alzheimer disease, prion disease, familial Parkinson disease, and familial amyloid neuropathy. In all these familial diseases, one rational approach to therapy is to develop a method to specifically eliminate the aberrant protein by RNAi, even if each mechanism of cell death is unknown.*

Correspondence/Reprint request: Dr. Takanori Yokota, Department of Neurology and Neurological Science Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519 Tokyo, Japan. E-mail: tak-yokota.nuro@tmd.ac.jp

*For gene therapy of familial ALS, we made the transgenic (Tg) mouse of modified siRNA and confirmed the in vivo knockdown effect of siRNA on SOD1 expression. By crossing this anti-SOD1 siRNA Tg mouse with SOD1<sup>G93A</sup> Tg mouse as a model for ALS, siRNA prevented the development of disease by inhibiting mutant G93A SOD1 in the central nervous system. This clearly provides the proof of principle that siRNA-mediated gene silencing can stop familial ALS with SOD1 mutation.*

*In autosomal dominant disease, furthermore, a most effective therapeutic approach requires the reduction of the aberrant mutant protein leaving wild-type protein intact. Here, we show the method to discriminate the point mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS), and expanded CAG repeat in Machado-Joseph disease.*

## **Introduction**

In hereditary disease, generally speaking, there are two different mechanism of gene product protein. Most mutant gene of autosomal recessive diseases does not express (null mutation) or lose it's function. In contrast, mutant gene of autosomal dominant diseases usually induces the disease by its toxic property. Such a 'gain of toxic function' of mutant protein is predicted to cause cell death in autosomal dominant neurodegenerative diseases with a missense point mutation, such as familial amyotrophic lateral sclerosis, familial Alzheimer disease, prion disease, familial Parkinson disease, and familial amyloid neuropathy. In all these familial diseases, one rational approach to therapy is to develop a method to specifically eliminate the aberrant protein by RNAi, even if each mechanism of cell death is unknown.

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

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease characterized by the degeneration of motor neurons in the central nervous system. Although most cases of ALS are sporadic, 5% to 10% of ALS cases

are familial, and, of these, approximately 20% are due to missense point mutations in the gene encoding Cu/Zn superoxide dismutase (*SOD1*) (1). Recent studies using transgenic (Tg) mice and cell culture models of ALS with *SOD1* mutations have indicated that *SOD1* mutations induce the disease by their toxic properties, not by a loss of *SOD1* activity (1). Therefore, inhibition of mutated allele expression is expected to provide a direct approach to therapy for this type of familial ALS. In cultured cells, siRNA can effectively inhibit the production of mutant proteins in various neurodegenerative diseases including ALS (2). Furthermore, virus-mediated siRNA delivered by direct injection of viral vectors to the brain or muscle delays phenotypic expression in Tg mice *in vivo* (3-6). However, it has not been proved in principle whether inhibition of mutant genes with siRNA can truly stop dominantly inherited diseases. The most difficult problem in *in vivo* therapy with siRNA is that there is no sophisticated method of delivering siRNA throughout the central nervous system. Therefore, to answer this question, as a first step, we tried to make siRNA Tg mice in which siRNA was ubiquitously expressed in the brain, and we then crossed these siRNA Tg mice with *SOD1*<sup>G93A</sup> Tg mice to efficiently deliver siRNA throughout the central nervous system.

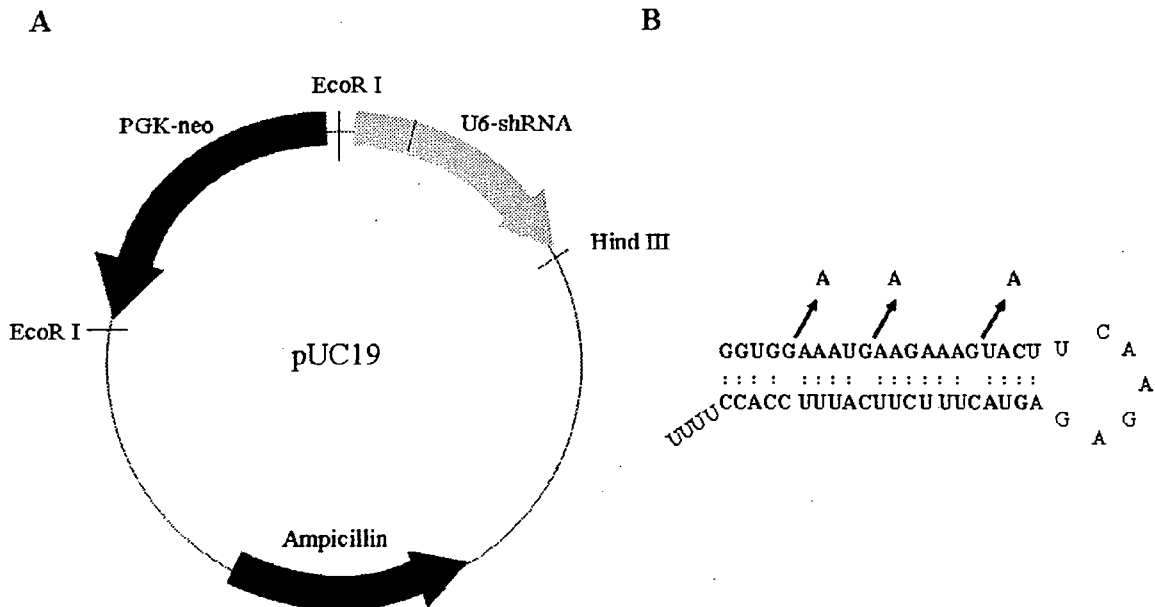
### Transgenic siRNA halts ALS in a mouse model (7)

We generated construction of Anti-*SOD1* shRNA Expression Vector by inserting the anti-*SOD1* shRNA cassette (2) immediately downstream of the human U6 promoter in pUC19 were introduced (denoted by asterisks below) in the sense strand: GGUGG\*AAAUG\*AAGAAAG\* UAC (Fig. 1B). We selected ES cell clones that showed an ~80% reduction in the level of endogenous *SOD1* protein. Each ES cell clone was injected into C57BL/6 blastocysts, and obtained chimeric male mice were out-crossed, and germline transmission of the shRNA was confirmed. In the brains of anti-*SOD1* siRNA Tg mice, expression of siRNA was clearly detected, and mouse *SOD1* mRNA and protein were strikingly reduced. Anti-*SOD1* siRNA Tg mice did not show any obvious phenotype, with the exception of infertility in females.

By crossing anti-*SOD1* siRNA Tg mice with *SOD1*<sup>G93A</sup> Tg mice, we obtained six double Tg mice and 26 *SOD1*<sup>G93A</sup> Tg mice. In the spinal cords of the double Tg mice, we clearly detected the expression of siRNA. Levels of both mutant human G93A *SOD1* protein and mouse wild-type *SOD1* protein in the spinal cords of the double Tg mice were similarly reduced by 80%(Fig. 1C). The level of mutant G93A *SOD1* protein in the double Tg mice was about half that in the low copy strain of *SOD1*<sup>G93A</sup> Tg mice howed the first signs of motor deficits at a mean age of  $127.3 \pm 1.2$

days. All of these mice then showed hindlimb dysfunctions and muscle atrophy and were dead by 157 days of age (Figs. 1D). In contrast, double Tg mice appeared normal, and grew up similarly to wild-type littermates. Their motor performance on the rotating rod test did not differ from that of wild-type littermates over the entire 300-day duration of the experiment (Fig. 1D).

Our results showed that development of the ALS phenotype in *SOD1*<sup>G93A</sup> Tg mice was completely suppressed by crossing with anti-SOD1 siRNA Tg mice. In our double Tg mice, siRNA overexpressed against the *SOD1* gene in anti-SOD1 siRNA Tg mice cleaved the mRNA of G93A *SOD1* expressed in the crossed mice. We consider that prevention of development of the ALS phenotype in the double Tg mice was caused by the knockdown effect on SOD1 protein production. The mouse wild-type *SOD1* gene was similarly inhibited by the siRNA, but elimination of wild-type *SOD1* has been reported to have no effect on the mutant *SOD1*-mediated ALS phenotype. Therefore, these clearly prove the principle that siRNA-mediated gene silencing can stop the development of familial ALS with *SOD1* mutation.



**Figure 1A, B.** Construction of anti-SOD1 shRNA-expression vector. A, The anti-SOD1 shRNA-expression vector included an anti-SOD1 shRNA cassette with human U6 promoter and a PGK-neo-poly(A) cassette. B, Predicted secondary structure of anti-SOD1 shRNA. Three G-to-A alternations were introduced, only in the sense sequence of shRNA (arrows).