

- 8) 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. Biotechnol.*, 21 : 635-637, 2003.
- 9) Saito Y, Yokota T, Mitani T, Ito K, Anzai M, Miyagishi M, Taira K, Mizusawa H : Transgenic small interfering RNA halts amyotrophic lateral sclerosis in a mouse model. *J. Biol. Chem.*, 280 : 42826-42830, 2005.
- 10) Yokota T, Miyagishi M, Hino T, Matsumura R, Tasinato A, Urushitani 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.
- 11) Gonzalez-Alegre P, Bode N, Davidson BL, Paulson HL : Silencing primary dystonia : lentiviral-mediated RNA interference therapy for DYT1 dystonia. *J. Neurosci.*, 25 : 10502-10509, 2005.
- 12) Miller VM, Xia H, Marrs GL, Gouvion CM, Lee G, Davidson BL, Paulson HL : Allele-specific silencing of dominant disease genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100 : 7195-7200, 2003.
- 13) Li Y, Yokota T, Matsumura R, Taira K, Mizusawa H : Sequence-dependent and independent inhibition specific for mutant ataxin-3 by small interfering RNA. *Ann. Neurol.*, 56 : 124-129, 2004.
- 14) Kubodera T, Yokota T, Ishikawa K, Mizusawa H : New RNAi strategy for selective suppression of mutant allele in polyglutamine disease. *Oligonucleotides*, 15 : 298-302, 2005.
- 15) Singer O, Marr RA, Rockenstein E, Crews L, Coufal NG, Gage FH, Verma IM, Masliah E : Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model. *Nat. Neurosci.*, 8 : 1343-1349, 2005.
- 16) McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA : RNA interference in adult mice. *Nature*, 418 : 38-39, 2002.
- 17) 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. Cancer Res.*, 10 : 7721-7726, 2004.
- 18) Judge AD, Sood V, Shaw JR, Fang D, McClintock K, MacLachlan I : Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat. Biotechnol.*, 23 : 457-462, 2005.
- 19) Morrissey DV, Lockridge JA, Shaw L, Blanchard K, Jensen K, Breen W, Hartsough K, Macheimer L, Radka S, Jadhav V, Vaish N, Zinnen S, Vargeese C, Bowman K, Shaffer CS, Jeffs LB, Judge A, MacLachlan I, Polisky B : Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat. Biotechnol.*, 23 : 1002-1007, 2005.
- 20) 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, Rohl I, Toudjarska I, Wang G, Wuschko S, Bumcrot D, Kotliansky V, Limmer S, Manoharan M, Vornlocher HP : Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*, 432 : 173-178, 2004.
- 21) Song E, Zhu P, Lee SK, Chowdhury D, Kussman S, Dykxhoorn DM, Feng Y, Palliser D, Weiner DB, Shankar P, Marasco WA, Lieberman J : Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat. Biotechnol.*, 23 : 709-717, 2005.
- 22) McNamara JO 2nd, Andrechek ER, Wang Y, Viles KD, Rempel RE, Gilboa E, Sullenger BA, Giangrande PH : Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. *Nat. Biotechnol.*, 24 : 1005-1015, 2006.
- 23) Thakker DR, Natt F, Husken D, Maier R, Muller M, van der Putten H, Hoyer D, Cryan JF : Neurochemical and behavioral consequences of widespread gene knockdown in the adult mouse brain using nonviral RNA interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101 : 17270-17275, 2004.
- 24) Guissouma H, Froidevaux MS, Hassani Z, Demeneix BA : In vivo siRNA delivery to the mouse hypothalamus confirms distinct roles of TR beta isoforms in regulating TRH transcription. *Neurosci. Lett.*, 406 : 240-243, 2006.
- 25) Luo MC, Zhang DQ, Ma SW, Huang YY, Shuster SJ, Porreca F, Lai J : An efficient intrathecal delivery of small interfering RNA to the spinal cord and peripheral neurons. *Mol. Pain*, 1 : 1-8, 2005.
- 26) Davidson TJ, Harel S, Arboleda VA, Prunell GF, Shelanski ML, Greene LA, Troy CM : Highly efficient small interfering RNA delivery to primary mammalian neurons induces MicroRNA-like effects before mRNA degradation. *J. Neurosci.*, 24 : 10040-10046, 2004.
- 27) Zhang Y, Zhang YF, Bryant J, Charles A, Boado RJ, Pardridge WM : Intravenous RNA interference gene therapy targeting the human epidermal growth factor receptor prolongs survival in intracranial brain cancer. *Clin. Cancer Res.*, 10 : 3667-3677, 2004.
- 28) Davidson BL, Harper SQ : Viral delivery of recombinant short hairpin RNAs. *Methods Enzymol.*, 392 : 145-173, 2005.
- 29) Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, Storm TA, Pandey K, Davis CR, Marion P, Salazar F, Kay MA : Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature*, 441 : 537-541, 2006.

ALS の遺伝子治療

久保寺 隆行 横田 隆徳 水澤 英洋

はじめに

ALS は神経筋疾患の中で根本的治療法が期待される難病中の難病のひとつである。しかし、その原因・分子病態はまだ十分には解明されていないため、有効な治療法の確立には至っていない。このような現状の中、全体の10%未満ではあるものの家族性 ALS の原因遺伝子がいくつか判明した。中でもその10~20%を占める superoxide dismutase 1 (SOD 1) 遺伝子の変異遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを用いた病態解明と治療法開発のアプローチがさかんに行われている。本稿では ALS に対する治療法の中でも遺伝子治療の試みについてわれわれの研究成果を含め概説したい。

遺伝子治療

ALS に対する遺伝子治療戦略は大きく2つの手法に分かれて研究が進められている。一つは ALS の病因が明確でない中、運動ニューロンの保護・救済を目的に神経栄養因子・抗アポトーシス分子などの遺伝子を導入する方法、もう一つは家族性 ALS に対しその原因となる変異遺伝子の発現を RNA 干渉 (RNAi) を用いて遺伝子レベルで抑制する方法である。

1. 神経保護を目的とした遺伝子治療

運動ニューロンの保護作用を有する神経栄養因子を治療薬として用いる試みは動物実験レベルから臨床試験まで精力的に行われてきた。しかし、それら栄養因子をリコンビナント蛋白として ALS 患者に投与した試験では確固とした治療効果が認められたとはいえない。遺伝子治療はこれらの遺伝子をウイルスベクターを用いて障害されている運動ニューロンに導入しようというものであり、目的とする

運動ニューロンに効率よく導入できれば栄養因子のもつ効果もより発揮できることが期待される。治療遺伝子を導入するには血液脳関門を通過する必要があり、その方法には主に、① 筋肉内にウイルスベクターを注入し逆行性軸索輸送によって運動ニューロンに導入する方法、② 運動ニューロンの存在する脊髄内に直接ウイルスベクターを注入する方法、の2つがある(図1)。ここで①の逆行性軸索輸送を用いる方法では運動ニューロンのみならず遺伝子導入できない。最近の変異 SOD 1 のモデルマウスの知見では、運動ニューロン以外のグリア細胞に発現した変異 SOD 1 が ALS の病態形成に重要な役割を果たしている (non-cell autonomous) ことが指摘されている¹⁾。したがって導入する遺伝子がグリア細胞にも寄与するかなどの導入遺伝子の特徴に応じて①、②は使い分ける必要がある。

これまでの動物実験では、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクターによって glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), vascular endothelial growth

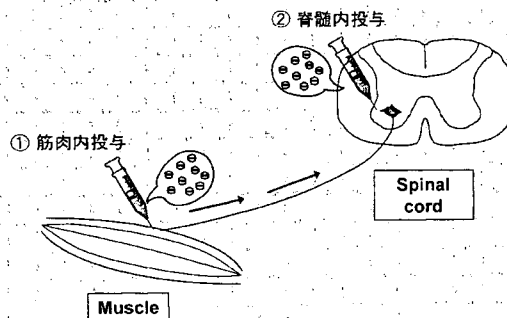


図1 運動ニューロンへの遺伝子導入法

治療遺伝子を組み込んだウイルスベクターを、① 筋肉内に注入し逆行性軸索輸送を利用して運動ニューロンへ導入する、または、② 脊髄内に直接注入して運動ニューロンへ導入する。

くぼでら たかゆき 東京医科歯科大学大学院/医歯学総合研究科
脳神経病態学

よこた たかのり 同 准教授
みずさわ ひでひろ 同 教授

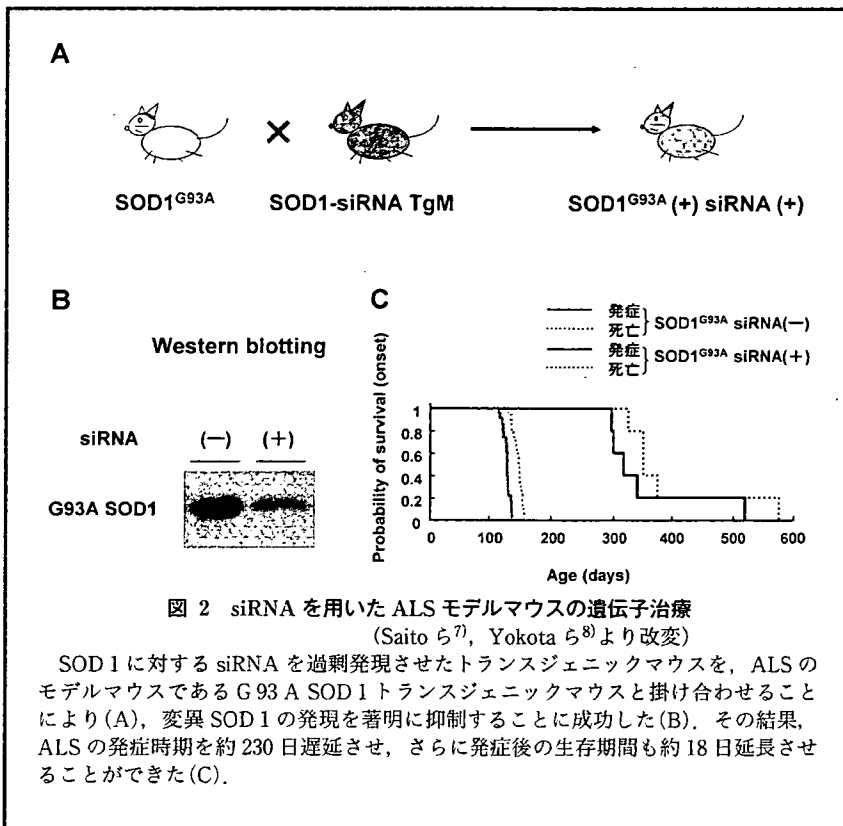


図 2 siRNA を用いた ALS モデルマウスの遺伝子治療 (Saito ら⁷⁾, Yokota ら⁸⁾より改変)

SOD 1 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 G 93 A SOD 1 トランスジェニックマウスと掛け合わせることにより (A), 変異 SOD 1 の発現を著明に抑制することに成功した (B). その結果、ALS の発症時期を約 230 日遅延させ、さらに発症後の生存期間も約 18 日延長させることができた (C).

factor (VEGF), insulin-like growth factor (IGF) などの神経栄養因子の遺伝子が筋肉内または脊髄内投与され有効性が報告されている^{2~4)}. 栄養因子以外では、抗アポトーシス分子である Bcl-2 ファミリー、抗アポトーシス阻害蛋白 (IAP) などの遺伝子を導入する試みもなされているがその効果は栄養因子と比較すると軽微なものである⁵⁾.

2. RNA 干渉 (RNAi) を利用した遺伝子治療

常染色体優性遺伝形式をとる SOD 1 変異では変異アレルから発現した変異タンパク質が何らかの毒性を獲得すること (gain of toxic function) により発症すると考えられている。従って、その変異したタンパク質の発現を抑制する方法があれば、その機序の如何に関わらず発症を阻止することが期待できる。

RNAi は 2 本鎖 RNA によって配列特異的に mRNA が分解され、その結果遺伝子の発現が抑制される現象である。その標的遺伝子の発現抑制効果はこれまでのアンチセンスやリボザイムよりも高いとされ、さらにその配列特異性も高いことから医療分野における応用が発見当初から大きく

期待されている。細胞内に導入された 2 本鎖 RNA は細胞質内で Dicer と呼ばれる RNase III ファミリーに属する酵素によって 3' 側が 2 塩基突出した長さ 21~23 塩基に短い 2 本鎖の small interfering RNA (siRNA) に分解される。その後 siRNA は 1 本鎖化され、1 本鎖となった siRNA は他の因子を伴うことで RISC (RNA-induced silencing complex) を形成する。RISC は取り込まれた siRNA をガイド分子として相補的な配列をもつ標的 RNA を認識し切断する⁶⁾.

この RNAi によって変異 SOD 1 の発現を抑制するためには RNAi を目的の組織に誘導する必要がある。しかし、ここには siRNA の神経系へのデリバリーという大きなハードルがある。そこで、まずわれわれは SOD 1 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、これを ALS のモデルマウスである G 93 A SOD 1 トランスジェ

ニックマウスと掛け合わせることによって、デリバリーの問題を回避しつつ全身の変異 SOD 1 タンパク質の発現を抑制して ALS の発症を阻止できるかを検証した。まず、SOD 1 に対する siRNA を発現する DNA ベクターを ES 細胞に導入して内因性の SOD 1 が抑制された ES クローンを選択し、これを胚盤胞にマイクロインジェクションして siRNA トランスジェニックマウスを作製した。このマウスと G 93 A SOD 1 トランスジェニックマウスとを掛け合わせ、脊髄における変異 SOD 1 タンパク質の発現を 80% 以上抑制することに成功した。この効果により、ALS の発症時期は大幅に抑制され、さらに発症後の生存期間も延長した (図 2)^{7,8)}.

同様に SOD 1 に対する siRNA 発現レンチウイルス・アデノ随伴ウイルスベクターを骨格筋に注入もしくは直接脊髄内に注入して G 93 A SOD 1 トランスジェニックマウスの発症時期を遅延させたとの報告がなされた^{9~11)}. しかし発症後の生存期間に関しては延長効果は認められていない。これは、先程述べた運動ニューロンに発現する変異

SOD 1 は ALS の発症に、グリアに発現する変異 SOD 1 は ALS の進行に関与しているという non-cell autonomous に関する知見¹⁾を反映した結果ともとれる。骨格筋にベクターを投与した場合は運動ニューロン特異的に変異 SOD 1 を抑制することで ALS の発症時期を遅延させることはできたが、非神経細胞の変異 SOD 1 の発現には変化を与えなかったために疾患の進行は抑制できなかったと考えられる。

一方、われわれの掛け合わせ実験では運動ニューロンおよびグリア細胞を含む中枢神経系の全ての細胞で siRNA を発現し変異 SOD 1 を抑制する結果、発症時期のみならず発症後の病勢の進行も抑制できることを示した。した

が、たとえ発症後であっても siRNA によって変異遺伝子の発現を抑制することができれば疾患の進行を少しでも遅らせる効果が期待できるものと考えられる。

むすび

ALS に対する遺伝子治療の試みに関して、運動ニューロン保護を目的とした治療法と変異遺伝子の発現を siRNA により抑制する治療法を紹介した。これらの遺伝子治療法はまだ動物実験の段階であり克服すべき課題も多いが、これを足掛かりに ALS 治療の研究開発が進展することを期待したい。

文 献

- 1) Boillée S, Yamanaka K, Lobsiger CS, et al. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science*. 2006 ; 312 : 1389-92.
- 2) Kaspar BK, Llado J, Sherkat N, et al. Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. *Science*. 2003 ; 301 : 839-42.
- 3) Arrouz M, Ralph GS, Strokebaum E, et al. VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. *Nature*. 2004 ; 429 : 413-7.
- 4) Ascadi G, Anguelov RA, Yang H, et al. Increased survival and function of SOD 1 mice after glial cell-derived neurotrophic factor gene therapy. *Hum Gene Ther*. 2002 ; 13 : 1047-59.
- 5) Arrouz M, Hottinger A, Paterna JG, et al. Increased motoneuron survival and improved neuromuscular function in transgenic ALS mice after intraspinal injection of an adeno-associated virus encoding Bcl-2. *Hum Mol Genet*. 2000 ; 9 : 803-11.
- 6) Bumcrot D, Manoharan M, Koteliensky V, et al. RNAi therapeutics : a potential new class of pharmaceutical drugs. *Nat Chem Biol*. 2006 ; 12 : 711-9.
- 7) Saito Y, Yokota T, Mitani T, et al. Transgenic small interfering RNA halts amyotrophic lateral sclerosis in a mouse model. *J Biol Chem*. 2005 ; 280 : 42826-30.
- 8) Yokota T, Sasaguri H, Saito Y, et al. Increased of disease duration of amyotrophic lateral sclerosis in a mouse model by transgenic small interfering RNA. *Arch Neurol*. 2007 ; 64 : 145-6.
- 9) Ralph GS, Radcliffe PA, Day DM, et al. Silencing mutant SOD 1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nat Med*. 2005 ; 11 : 429-33.
- 10) Miller TM, Kasper BK, Kops GJ, et al. Virus-delivered small RNA silencing sustains strength in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 2005 ; 57 : 773-6.
- 11) Raoul C, Abbas-Terki T, Bensadoun JC, et al. Lentiviral-mediated silencing of SOD 1 through RNA interference retards disease onset and progression in a mouse model of ALS. *Nat Med*. 2005 ; 11 : 423-8.

家族性筋萎縮性側索硬化症のRNA干渉を用いた遺伝子治療*

横田 隆徳**

Key Words : siRNA, shRNA, SOD1, gene therapy, RNAi

はじめに

RNA干渉 (RNAi) は2本鎖RNAによって配列特異的に遺伝子の発現が抑制される現象で、1998年にFireとMelloらによって報告され、2006年のノーベル医学生理学賞に選ばれた。RNAiはいかなる遺伝子に対してデザインできて、その標的遺伝子の発現抑制効果は他の核酸医薬であるアンチセンス核酸の 10^{3-7} 倍、リボザイムの 10^{2-5} (自験) 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、医療分野における臨床応用についてはその発見当初から大きく期待されていた。siRNAを用いた遺伝子治療の研究はすでにウイルス性疾患、悪性腫瘍などで急速に進んでいる。ここでは、ALSへのsiRNAおよびshort hairpin RNA (shRNA)の核酸医薬としての開発の研究現状と問題点について概説する。

I. RNA干渉とは

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、哺乳動物にいたるまで広く保存して観察され、元来真核細胞に備わった抗ウイルス機構として知られていた。細胞内に導入された2本鎖RNAはDicerと呼ばれる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本鎖のsiRNAに分解される。siRNAはDicerの結合タンパクであるTRBP (human immunodeficiency virus transacting response RNA-binding protein) によってAgonaute2 (Ago2) にリクルートされ¹⁾、RLC (RISC-loading complex) を形成する²⁾。siRNAの2本鎖のうちパッセンジャー鎖 (センス鎖) はAgo2によりその中央部で切断されて取り除かれ、ガイド鎖 (アンチセンス鎖) のみの1本鎖化が起こる。1本鎖となったsiRNAは他のいくつかのタンパク質を伴ってRNAタンパク質複合体であるRISC複合体 (RNA induced silencing complex) を構成する³⁾。このRISC複合体がガイド鎖に相補的な配列を持つ標的RNAにアクセスして、その中央で分解する³⁾。しかし、哺乳動物における2本鎖RNAの導入はPKRやRIG-Iや2'5' oligosynthetaseの活性化による非特異的な翻訳抑制やRNAの分解を引き起こし、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大きな妨げになっていた。しかし、2001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、効率的で特異的な遺伝子発現抑制が可能となった⁴⁾。さらに、siRNA配列を短い9merのループ配列でつないだstem型の

* Gene Therapy with siRNA to Familial ALS.

** 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) Takanori Yokota : Department of Neurology and Neurological Science, Tokyo Medical and Dental University

パリンδροミックな配列であるshRNAをpol III系のプロモーター下に挿入したsiRNA発現DNAプラスミドも開発され、ウイルスベクターやトランスジェニックマウスのトランスジーンとして定常的な長期の発現に用いられている⁵⁾。

II. 遺伝性神経変性疾患のRNAiによる 遺伝子治療の基本概念

遺伝性疾患でゲノム遺伝子の変異が原因で発症する場合、遺伝子変異に起因する発症機序には変異のある遺伝子の遺伝子産物であるタンパクの本来のもつ機能の消失または低下する場合 (loss of function) と変異遺伝子や変異タンパクが新たに病的機能を獲得する場合 (gain of function) の2つがあることが知られている。遺伝子変異が常染色体にある場合、対立する2つのアレルの双方に遺伝子変異があってはじめて発症する常染色体劣性遺伝形式の疾患の多くはloss of functionをその機序とし、一方のアレルのみで発症する常染色体優性遺伝形式の疾患の多くの場合はgain of functionであることが多い。常染色体優性遺伝の場合は野生型のアレルからは原則として正常個体の半分の量の正常のタンパクは発現しているので、本来のタンパクの機能の影響は少ないか全くなく、変異アレルから発現した変異タンパクが何らかの正常と異なった機能 (gain of adverse function) や毒性 (gain of toxic function) を新たに獲得することにより疾患が発症することが想定されている。

SOD1変異による筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis : ALS), 多くのポリグルタミン病, 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において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。ただし、近年発見された家族性ALSの遺伝子であるangiogenin⁶⁾は常染色体優性遺伝性だが、変異タンパクの活性低下が原因とされるhaplotype insufficiencyがその機序として考えられ、

上記の戦略はあてはまらない。

III. SOD1による家族性ALSモデルマウスを用いたRNAiによる遺伝子治療

以下に述べるように、siRNAの中枢神経へのデリバリーは容易でないため、まずRNAiという新しい戦略で本当にALSが治療可能であるかどうかを検証する目的で、我々はsiRNAを全身で発現させたsiRNA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てその治療効果を検討した⁷⁾。siRNAトランスジェニックマウスのトランスジーンをFig. 1A示す。短いRNAの転写の能力に優れたPol III系のU6プロモーターの下流にsense配列とパリンδροミックなantisense配列を9塩基のhinge配列で結合させたshort hairpin型のSOD1に対するsiRNAを過剰に発現するベクターを作製した。sense配列には複製に際して配列を安定させるためにmismatch mutationを挿入した。このshRNA発現断片をES細胞に導入して、50のES細胞クローンからWestern blotによってES細胞の内因性のSOD1タンパクの発現が最も抑制されたクローンを選択して、それをB6マウスのblastocystにmicroinjectionしてキメラマウスを作製した。これをB6と交配させてF1トランスジェニックマウスを作製した。このマウスは中枢神経においてsiRNAのアンチセンス鎖 (ガイド鎖) の発現を確認し、内因性SOD1の発現を80%以上抑制することに成功した。

このSOD1 siRNAトランスジェニックマウスをG93A変異SOD1トランスジェニックマウスと掛け合わせ、中枢神経の変異SOD1タンパクの発現を80%以上抑制することに成功した (Fig. 1B)。G93A変異SOD1トランスジェニックマウスは全例160日以内に死亡するが、このsiRNA効果により、掛け合わせマウスのALS症状の発症は500日以上抑制され、発症後の病勢の進行も2倍以上に遅延していた^{7,8)} (Fig. 1C)。これらの結果はsiRNAという方法で家族性ALSが治療可能であることを理論的に示したと考えられる。

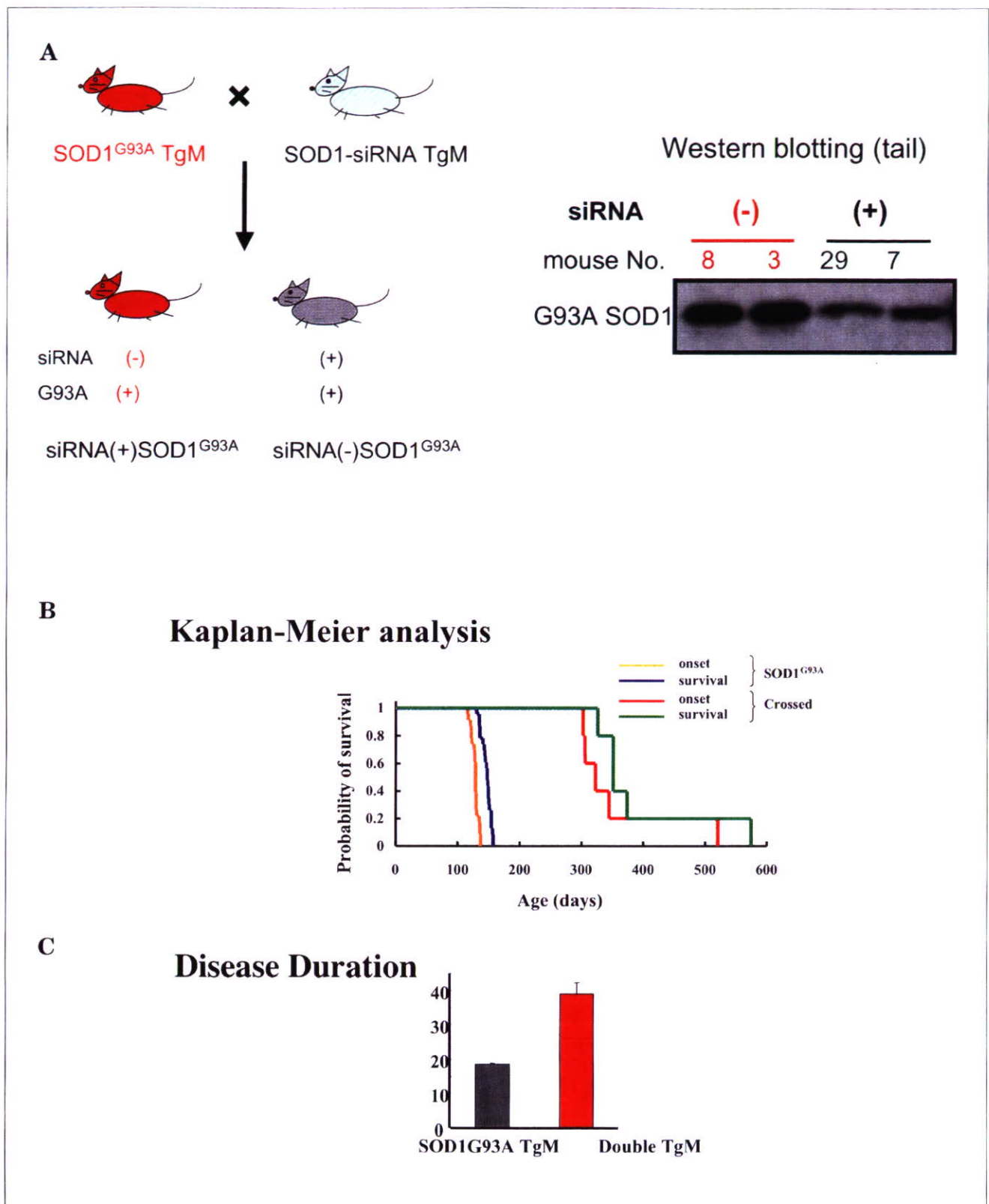


Fig. 1 Transgenic siRNA delayed the ALS phenotype in the mice model (ref 7, 8)

By crossing siRNA-overexpressing transgenic mouse with SOD1^{G93A} transgenic mouse, mutant SOD1 protein was reduced to express by about 80% (A). All SOD1^{G93A} transgenic mouse died of muscle weakness before 160 days old, but crossed mice survive even more than 500days old (B), and the duration of the disease was prolonged (C).

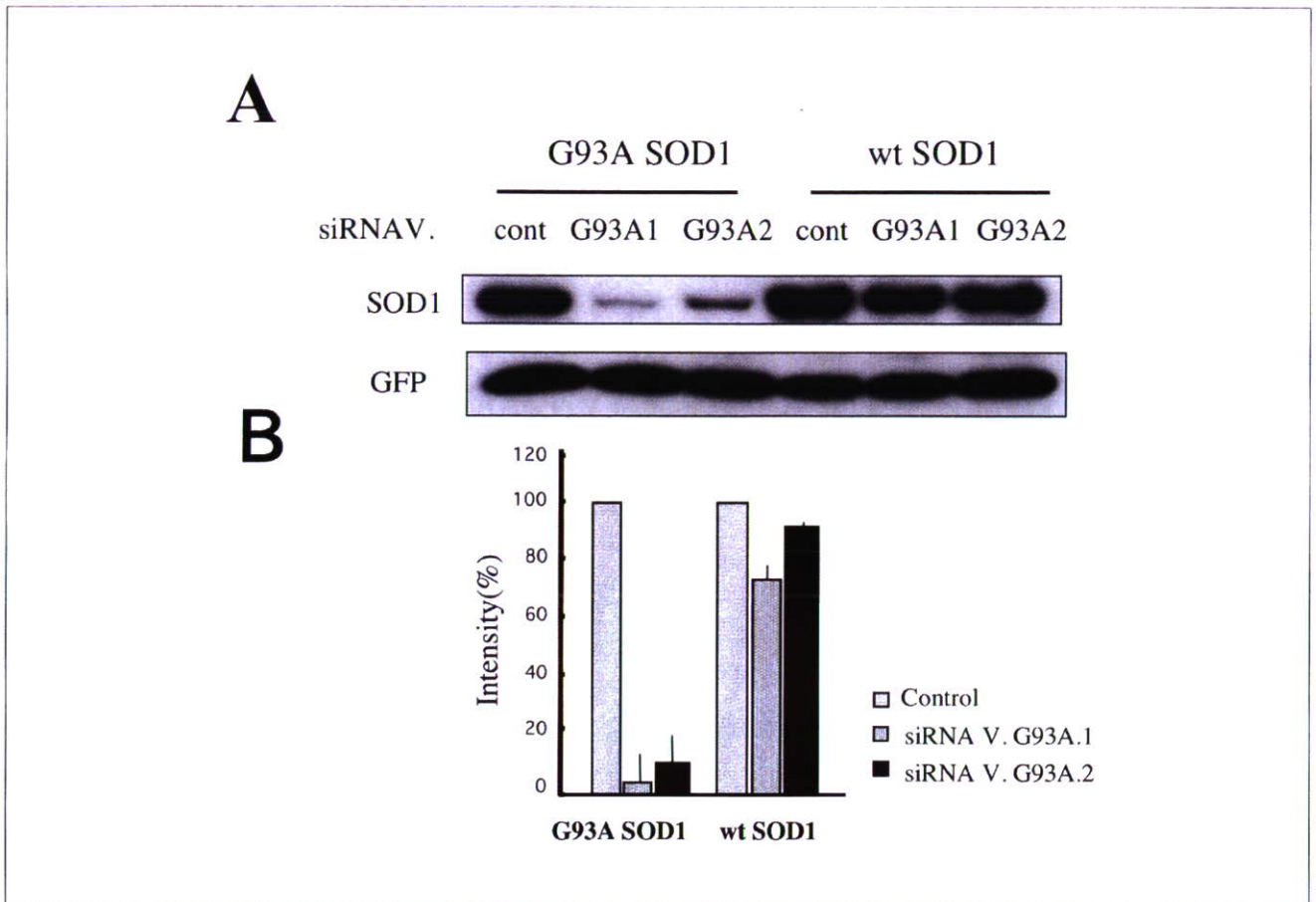


Fig. 2 siRNA specific for mutant SOD1 (ref 10)

Effect of siRNA G93A.1 and 2. on G93A and wild-type SOD1 proteins expressed in 293T cells as detected by Western blotting (A). B shows the percentages of band intensity with siRNAG93A.1 with respect to that with each mock transfection. siRNA G93A. 2 is more specific for cleaving G93A SOD1 RNA. Values are the mean and SEM.

IV. 変異遺伝子特異的なRNAi法

野生型SOD1はノックアウトしても明瞭な神経症状は示さないが、脂肪肝の副作用が知られており⁹⁾、例えばSCA6の場合、その原因遺伝子alphaカルシウム1Aチャンネルのノックアウトマウスは生後1~2週で死亡するなど、正常アレルの発現抑制は新たな症状をきたす可能性が高い。したがって、優性遺伝疾患の治療には、正常アレルの発現を損わずに、変異アレルの発現のみを抑制することが望ましい。SOA1変異のように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のデザインはある程度は可能である。G93A SOD1の場合はsiRNAの配列の5'側から10から13番目の塩基に変異部位を置いた場合が最も野生型SOD1の切断効率が低下した¹⁰⁾。最近の

バイオインフォマティクス解析ではガイド鎖の5'から10塩基目および16塩基目で、特にプリン：プリン (GA) ミスマッチが最も効果的と報告されている¹¹⁾。実際に我々が作製したG93A SOD1の点変異 (G>C) を認識して変異アレルを選択的に切断して正常アレルにはほとんど影響しないsiRNAの例を示す (Fig. 2)¹⁰⁾。しかし、SOD1遺伝子変異による家族性筋萎縮性側索硬化症などではその点変異が100種類以上知られており、そのすべての変異に対し特異的でかつ効率の良いsiRNAをデザインすることは困難である。そこで、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法を考案した。それは、野生型および変異型、両者の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野生型遺伝子で野生型タンパクを補おうという方法で、その有効性を

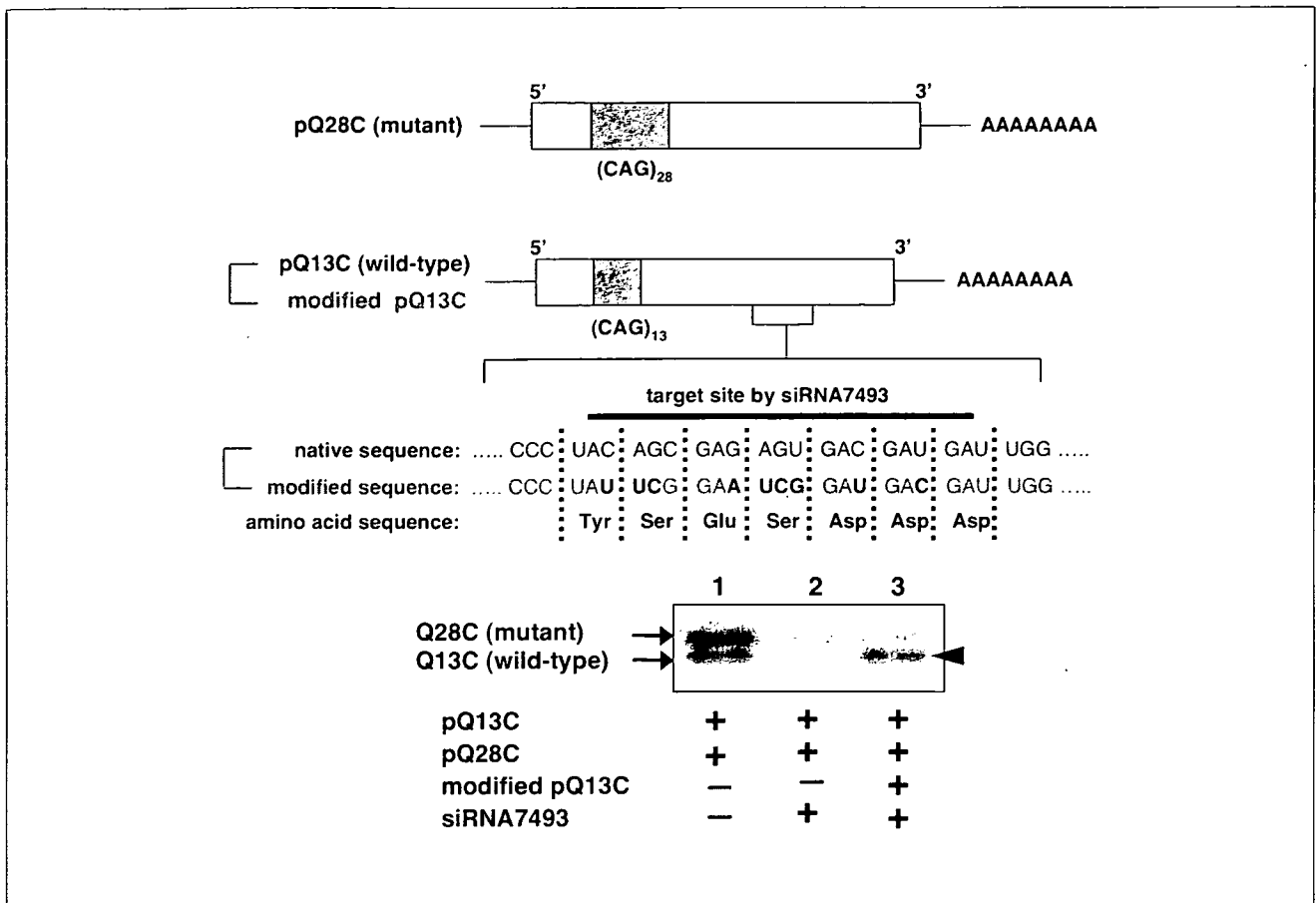


Fig. 3 Schema of mRNAs transcribed by expression plasmids of truncated CACNA1A

RNA sequence around the target site of siRNA7493 is showed in the lower part of the panel. The bold bar indicates the targeted sequence by siRNA7493. Blue characters are RNA nucleotides that are mutated from the wild-type. There is no change in amino acid sequences expressed by pQ13C and modified pQ13C.

神経変性疾患の一つであるポリグルタミン病を対象に証明した¹²⁾ (Fig. 3).

V. siRNAのin vivoへのデリバリー

1. siRNA発現ウイルスベクター

ALSなどの神経変性疾患の治療にはRNAiの年単位の長期に渡る効果が必要であり、それにはウイルスベクターが必要となる。siRNA発現ベクターコンストラクトをアデノウイルスやレンチウイルス、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¹⁵⁾。

特にレンチウイルスとアデノ随伴ウイルスは神経細胞にも高効率に導入できてしかも長期の遺伝子発現効果が期待できるため有望である。レンチウイルスによるSOD1に対するshRNA発現ベク

ターを変異SOD1トランスジェニックマウスの脊髄に直接注入したり、骨格筋に注入して運動ニューロンに逆行性にレンチウイルスを輸送してshRNAを発現させてG93A変異SOD1トランスジェニックマウスの発症を遅延させたとの報告もなされた^{16, 17)}。同様にアデノ随伴ウイルスによりshRNA発現ベクターを骨格筋に注入して、当該筋肉の筋力低下を抑制したとの報告もされた¹⁸⁾。アデノ随伴ウイルスはParkinson病を中心にすでに患者さんで実際の臨床応用が始まっており¹⁹⁾、shRNA発現AAVを用いた中枢神経への遺伝子治療は現実の段階に入ってきた。

しかし、最近AAVを用いたshRNAの全身投与にて、遅発性の致死的な重篤な肝障害があるとの重要な報告がなされた²⁰⁾。この肝障害は導入したsiRNAの発現量に依存し、複数の異なった標的遺伝子に対するshRNAにおいて生じており、複数

の microRNA (miRNA) の低下を伴っていた。これは細胞内で shRNA と内因性の miRNA の前駆体である pre-miRNA が共通のプロセス機構であって、核から細胞質への移行タンパクである exportin-5 や Ago2 を shRNA が競合することにより、miRNA の成熟化プロセスが障害されて成熟 miRNA が低下するためと考察されている。我々もマウスにおいて同様の肝障害を経験しており、今後の shRNA 発現ベクターを用いた遺伝子治療の問題になる可能性がある。

2. siRNA 核酸の脳室内投与

化学修飾した合成 siRNA を直接の脳室内に 1~2 週間持続注入することによって脳室の表層に近い海馬や大脳基底核においての標的遺伝子の発現を 50% 程度抑制したとの報告がなされ²¹⁾、注目されている。siRNA をカチオンリポソームに包埋して同様に長期脳室内持続注入して、脊髄、後根神経節や視床下部などにおいて有効に導入に成功したとの報告もある^{22, 23)}。SOD1 に対するアンチセンス核酸を脳室に持続投与して変異 SOD1 トランスジェニックラットを治療したとの報告もされたが²⁴⁾、アンチセンス核酸の脳室投与による有効性については議論がある。

3. 抗体や細胞導入シグナルペプチドを利用した新しい siRNA のデリバリー

siRNA のデリバリー方法として抗体²⁵⁾ や RNA アプタマー²⁶⁾ を siRNA 結合させて、導入細胞の受容体を介した siRNA の新しいデリバリーも報告されている。しかし、これらのいずれの方法でも静脈注射で siRNA が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容易でない。血液脳関門を通過するようにするためにトランスフェリン受容体に対するモノクローナル抗体や、神経細胞に導入するためにインスリンに対するモノクローナル抗体を結合させたペグ化免疫リポソームを作成して、全身投与することにより神経細胞へ導入させようとする試みも始まっている²⁷⁾。

神経細胞へ導入するため細胞導入シグナルペプチドの利用も研究されてきたが²⁸⁾、ごく最近に重要な報告がされた。狂犬病ウイルスの糖タンパクからデザインした 29 アミノ酸からなるペプチドに 9 つのアルギニンを結合させ (RVG-9R)、これと siRNA とで複合体を作製して、静脈投与

により脳血管関門を越えて、脳内の SOD1 の発現を 50% 程度抑制したという²⁹⁾。狂犬病ウイルスは脳血管内皮や神経細胞に発現しているニコチンアセチルコリン受容体の $\alpha 7$ サブユニットに結合して受容体介在性トランスサイトosis によって脳内に運ばれ神経細胞にデリバリーしたと考えている。その明確な輸送経路や脳内局在が明らかになり、詳細な副作用の評価ができれば有効な投与量が siRNA 量で 1~2mg/kg と比較的 low 容量であることから、今後の臨床応用へ将来性が期待される。

VI. off-target 効果

siRNA は確かに標的遺伝子に対する配列特異性は高いが、用いる siRNA が 21 塩基と短いため部分的に相同性のある別の遺伝子の発現まで抑制されてしまう可能性がある。この現象は off-target 効果と呼ばれており、siRNA を臨床応用する際には siRNA の発見当初からある大きな問題である。off-target 効果には濃度依存性がみられるために、できるだけ投与量を最小限に抑える必要があることは言うまでもないが、理論的な off-target 回避方法が模索されている。

Jackson ら³⁰⁾ の検討では、通常 19 塩基中 15 塩基以上で、最低では 11 塩基の相同性のある遺伝子において影響があったと報告された。また、最近のバイオインフォマティクス解析で off-target 効果を受ける遺伝子群は 3' 側の非翻訳領域に相同性を多く認める傾向があることが明らかとなった^{31, 32)}。これは標的遺伝子の 3' 側の非翻訳領域に結合しその発現を抑制する microRNA の作用機序に類似しており、siRNA のガイド鎖の 5' から 2 塩基目~8 塩基目の 7 塩基 (microRNA の seed 領域に相当) (Fig. 1) が 3' 側の UTR に相同性をもつ遺伝子に影響を及ぼすことによる。

off-target 効果を回避するには、ホモロジー検索で 3' 側 UTR にこの seed 領域の塩基配列に相同性をもつ遺伝子が存在しない siRNA 配列を選択することが望ましい。しかし、seed 領域は 7 塩基と短いため、この配列だけで siRNA に特異性および有効性を保たせるのは非常に困難である。最近、off-target 効果を回避する新たな手法としてガイド鎖の seed 領域のヌクレオチドに対する化学修飾の有用性が報告された³³⁾。とりわけ、5' か

ら2塩基目の2'-O-メチル化がoff-target効果の抑制に効果的とされる。これは、結晶構造の解析からこの部位の修飾によりRISCとmRNAとの結合が不安定となるために、target遺伝子の抑制効果は保ちつつoff-target遺伝子の発現抑制がなくなると考えられている。

おわりに

siRNAの核酸医薬としての臨床応用の研究には、shRNA毒性、off-target効果など解決すべき課題はまだ多くあるが、その潜在能力は計り知れないものがある。それがゆえ、その基礎研究は爆発的に進んでおり、最も大きな問題である中枢神経へのデリバリー方法にも大きな進歩がある。Parkinson病でAAVによる遺伝子治療はヒトで始まっており、AAVによるshRNAを用いたSOD1変異家族性ALSの遺伝子治療は現実性がある。さらに、非ウイルス性ベクターの進歩から比較的近い将来にALS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を期待している。

文 献

- 1) Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E et al : TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436 : 740-744, 2005
- 2) Tomari Y, Zamore PD : Perspective : machines for RNAi. *Genes Dev* 19 : 517-529, 2005
- 3) Matranga C, Tomari Y, Shin C et al : Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* 123 : 607-620, 2005
- 4) Elbashir S, Harborth J, Lendeckel W et al : Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411 : 494-498, 2001
- 5) Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R : A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 29 : 550-553, 2002
- 6) Greenway MJ, Andersen PM, Russ C et al : ANG mutations segregate with familial and 'sporadic' amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 38 : 411-413, 2006
- 7) Saito Y, Yokota T, Mitani T et al : Transgenic small interfering RNA halts amyotrophic lateral sclerosis in a mouse model. *J Biol Chem* 280 : 42826-42830, 2005
- 8) Yokota T, Sasaguri H, Saito Y et al : Increase of disease duration of amyotrophic lateral sclerosis in a mouse model by transgenic small interfering RNA. *Arch Neurol* 64 : 145-146, 2007
- 9) Uchiyama S, Shimizu T, Shirasawa T : CuZn-SOD deficiency causes ApoB degradation and induces hepatic lipid accumulation by impaired lipoprotein secretion in mice. *J Biol Chem* 281 : 31713-31719, 2006
- 10) Yokota T, Miyagishi M, Hino T et al H : siRNA-based inhibition of superoxide dismutase expression ; potential use in familial Amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Com* 314 : 283-291, 2004
- 11) Schwartz DS, Ding H, Kennington L et al : Designing siRNA that distinguish between genes that differ by a single nucleotide. *PLoS Genetics* 446 : 864-865, 2006
- 12) Kubodera T, Yokota T, Ishikawa K, Mizusawa H : New RNAi strategy for selective suppression of a mutant allele in polyglutamine disease. *Oligonucleotides* 15 : 298-302, 2005
- 13) Singer O, Marr RA, Rockenstein E et al : Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model. *Nat Neurosci* 8 : 1343-1349, 2005
- 14) Li M, Ona VO, Guegan C et al : Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model. *Science* 288 : 335-339, 2000
- 15) Davidson BL, Harper SQ : Viral delivery of recombinant short hairpin RNAs. *Methods Enzymol* 392 : 145-173, 2005
- 16) 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
- 17) Raoul C, Abbas-Terki T, Bensadoun JC et al : 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
- 18) Miller TM, Kaspar BK, Kops GJ et al : Virus-delivered small RNA silencing sustains strength in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 57 : 773-776, 2005
- 19) Kaplitt MG, Feigin A, Tang C et al : Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease : an open label, phase I trial. *Lancet* 369 :

- 2056-2058, 2007
- 20) Grimm D, Streetz KL, Jopling CL et al : Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 441 : 537-541, 2006
 - 21) Thakker DR, Natt F, Husken D et al : Neurochemical and behavioral consequences of widespread gene knockdown in the adult mouse brain using nonviral RNA interference. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 : 17270-17275, 2004
 - 22) Guissouma H, Froidevaux MS, Hassani Z et al : In vivo siRNA delivery to the mouse hypothalamus confirms distinct roles of TR beta isoforms in regulating TRH transcription. *Neurosci Lett* 406 : 240-243, 2006
 - 23) Luo MC, Zhang DQ, Ma SW et al : An efficient intrathecal delivery of small interfering RNA to the spinal cord and peripheral neurons. *Mol Pain* 1 : 1-8, 2005
 - 24) Smith RA, Miller TM, Yamanaka K et al : Antisense oligonucleotide therapy for neurodegenerative disease. *J Clin Invest* 116 : 2290-2296, 2006
 - 25) 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
 - 26) MacNamara JO, Andrechek ER, Wang Y et al : Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. *Nat Biotechnol* 24 : 1005-1015, 2006
 - 27) Zhang Y, Zhang YF, Bryant J et al : Intravenous RNA interference gene therapy targeting the human epidermal growth factor receptor prolongs survival in intracranial brain cancer. *Clin Cancer Res* 10 : 3667-3677, 2004
 - 28) Davidson TJ, Harel S, Arboleda VA et al : Highly efficient small interfering RNA delivery to primary mammalian neurons induces MicroRNA-like effects before mRNA degradation. *J Neurosci* 24 : 10040-10046, 2004
 - 29) Kumar P, Wu H, McBride JL et al : Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature* 448 : 39-43, 2007
 - 30) Jackson AL, Bartz SR, Schelter J et al : Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 21 : 635-637, 2003
 - 31) Birmingham A, Anderson EM, Reynolds A et al : 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nat Methods* 3 : 199-204, 2006
 - 32) Jackson AL, Burchard J, Schelter J et al : Widespread siRNA "off-target" transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *RNA* 12 : 1179-1187, 2006
 - 33) Jackson AL, Burchard J, Leake D et al : Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing. *RNA* 12 : 1197-1205, 2006

Gene Therapy with siRNA to Familial ALS

Takanori YOKOTA

Department of Neurology and Neurological Science, Tokyo Medical and Dental University

RNA interference (RNAi) is the process of sequence-specific, post-transcriptional gene silencing, initiated by double-stranded RNA (dsRNA). The gene silencing therapy with siRNA is a promising strategy to autosomal dominant diseases, such as familial ALS with SOD1. Transgenic siRNA markedly delayed ALS phenotype in the model mice, indicating the proof of principle of this strategy. There is a recent progress in the delivery of siRNA to the central nervous system. Especially adeno-associated virus is safe and long-lasting delivery method to neurons.

There are still important problems for application of gene therapy including off-target effect and short-hairpin RNA toxicity including processing impairment of microRNA. Moreover, non-viral delivery of siRNA is needed to develop actual application of siRNA gene therapy, and there is a rapid progress in field, using receptor-mediated transfer with antibody and aptamers. There are still important problems including off-target effect and gene delivery of siRNA, but it is not a fairy tale to apply gene therapy with siRNA to familial ALS patients.



特集 □ ALS—研究と診療の進歩

RNA 干渉による ALS の治療戦略

Gene Therapy of ALS with Short Interfering RNA

横 田 隆 徳*

Takanori Yokota*

Abstract

RNA interference (RNAi) is the process of sequence-specific, post-transcriptional gene silencing, initiated by double-stranded RNA (dsRNA). The gene therapy for familial ALS with siRNA had been started and showed promising results in the model mouse. There is a recent progress in the delivery of siRNA to the central nervous system. There are still important problems for application of gene therapy including off-target effect and gene delivery of siRNA, but a rapid progress can be expected because of the extremely high efficiency of siRNA.

Key words : siRNA, shRNA, agonaute, gene therapy, RNAi

はじめに

RNA 干渉 (RNAi) は 2 本鎖 RNA によって配列特異的に遺伝子の発現が抑制される現象で、1998 年に Fire と Mello らによって報告され、2006 年のノーベル医学生理学賞に選ばれた。RNAi はいかなる遺伝子に対してデザインできて、その標的遺伝子の発現抑制効果は他の核酸医薬であるアンチセンス核酸の 10^{3-7} 倍、リボザイムの 10^{2-5} (自験) 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、その発見当初から大きく期待されていた。Small interfering RNA (siRNA) を用いた遺伝子治療の研究は既にウイルス性疾患、悪性腫瘍などで急速に進んでいる。ここでは、ALS への siRNA および short hairpin RNA (shRNA) の核酸医薬としての開発の研究現状と問題点について概説する。

I. RNA 干渉とは

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 と呼ばれる RNase III 核酸分解酵素ファミリーによって、21~24 mer の短い 3' 突出型の 2 本鎖の siRNA に分解される。siRNA は Dicer の結合蛋白である TRBP (human immunodeficiency virus transacting response RNA-binding protein) によって Agonaute2 (Ago2) にリクルートされ¹⁾、RLC (RISC-loading complex) を形成する²⁾。siRNA の 2 本鎖のうちパッセンジャー鎖(センス鎖)は Ago2 によりその中央部で切断されて取り除かれ、ガイド鎖 (アンチセンス鎖) のみの 1 本鎖化が起こる。1 本鎖となった siRNA は他のいくつかの蛋白質を伴って、RNA 蛋白質複合体である RISC 複合体 (RNA induced silencing complex) を構成する³⁾。この RISC 複合体がガイド鎖に相補的な配列を持つ標的 RNA にアクセスして、その中央で分解する³⁾。しかし、哺乳動物における 2 本鎖 RNA の導入は PKR や RIG-I や 2'5' oligosynthetase の活性化による非特異的な翻訳抑制や RNA の分解を引き起こし、ホストの細胞も死んでしまうため、分子生物学的手法としても遺伝子治療の方法としても大きな妨げになっていた。しかし、2001 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、効率的で特異的な遺伝子発現抑制が可能となった⁴⁾。

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

さらに、siRNA 配列を短い 9 mer のループ配列でつないだ stem 型のパンドロミックな配列である shRNA を pol III 系のプロモーター下に挿入した siRNA 発現 DNA プラスミドも開発され、ウイルスベクターやトランスジェニックマウスのトランスジーンとして定常的な長期の発現に用いられている⁹⁾。

II. 遺伝性神経変性疾患の RNAi による遺伝子治療の基本概念

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まったくなく、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。

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis : ALS)、多くのポリグルタミン病、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において、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、変異した蛋白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。ただし、近年発見された家族性 ALS の遺伝子である angiogenin⁹⁾ は常染色体優性遺伝性だが、遺伝子量の減少が原因とされる haplotype insufficiency がその機序として考えられ、上記の戦略はあてはまらない。

III. SOD1 による家族性 ALS モデルマウスを用いた RNAi による遺伝子治療

以下に述べるように、siRNA の中枢神経へのデリバリーは容易でないため、まず RNAi という新しい戦略で本当に ALS が治療可能であるかどうかを検証する目的で、われわれは siRNA を全身で発現させた siRNA 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て、その治療効果を検討した⁷⁾。siRNA トランスジェニックマウスのトランスジーン構造を示す (Fig. 1 A)。短い RNA の転写の能力に優れた Pol III 系の U6 プロモーターの下流に、sense 配列とパンドロミックな antisense 配列を 9 塩基の hinge 配列で結合させた short hairpin 型の SOD1 に対する siRNA を過剰に発現するベクターを作製した。Sense 配列には複製に際して、配列を安定させるために mismatch mutation を挿入した。この shRNA 発現断片を ES 細胞に導入して、50 の ES 細胞クローンから Western blot によって ES 細胞の内因性の SOD1 蛋白の発現が最も抑制されたクローンを選択し、それを B6 マウスの blastocyst に microinjection してキメラマウスを作製した。これを B6 と交配させて F1 ; トランスジェニックマウスを作製した。このマウスは中枢神経において siRNA のアンチセンス鎖 (ガイド鎖) の発現を確認し、内因性 SOD1 の発現を 80% 以上抑制することに成功した。

この SOD1 siRNA トランスジェニックマウスを G93A 変異 SOD1 トランスジェニックマウスと掛け合わせ、中枢神経の変異 SOD1 蛋白の発現を 80% 以上抑制することに成功した (Fig. 1 B)。この siRNA 効果により、ALS 症状の発症は 300 日以上抑制されている (Fig. 1 C)。これらの結果は siRNA という方法で家族性 ALS が治療可能であることを理論的に示したと考えられる。

IV. 変異遺伝子特異的な RNAi 法

野生型 SOD1 はノックアウトしても明瞭な神経症状は示さないが、軽微な運動神経障害⁸⁾ や脂肪肝の副作用が知られており⁹⁾、例えば SCA6 の場合、その原因遺伝子 alpha カルシウム 1 A チャンネルのノックアウトマウスは生後 1~2 週で死亡するなど、正常アレルの発現抑制は新たな症状をきたす可能性が高い。したがって、優性遺伝疾患の治療には、正常アレルの発現を損なわずに、変異アレルの発現のみを抑制することが望ましい。SOA1

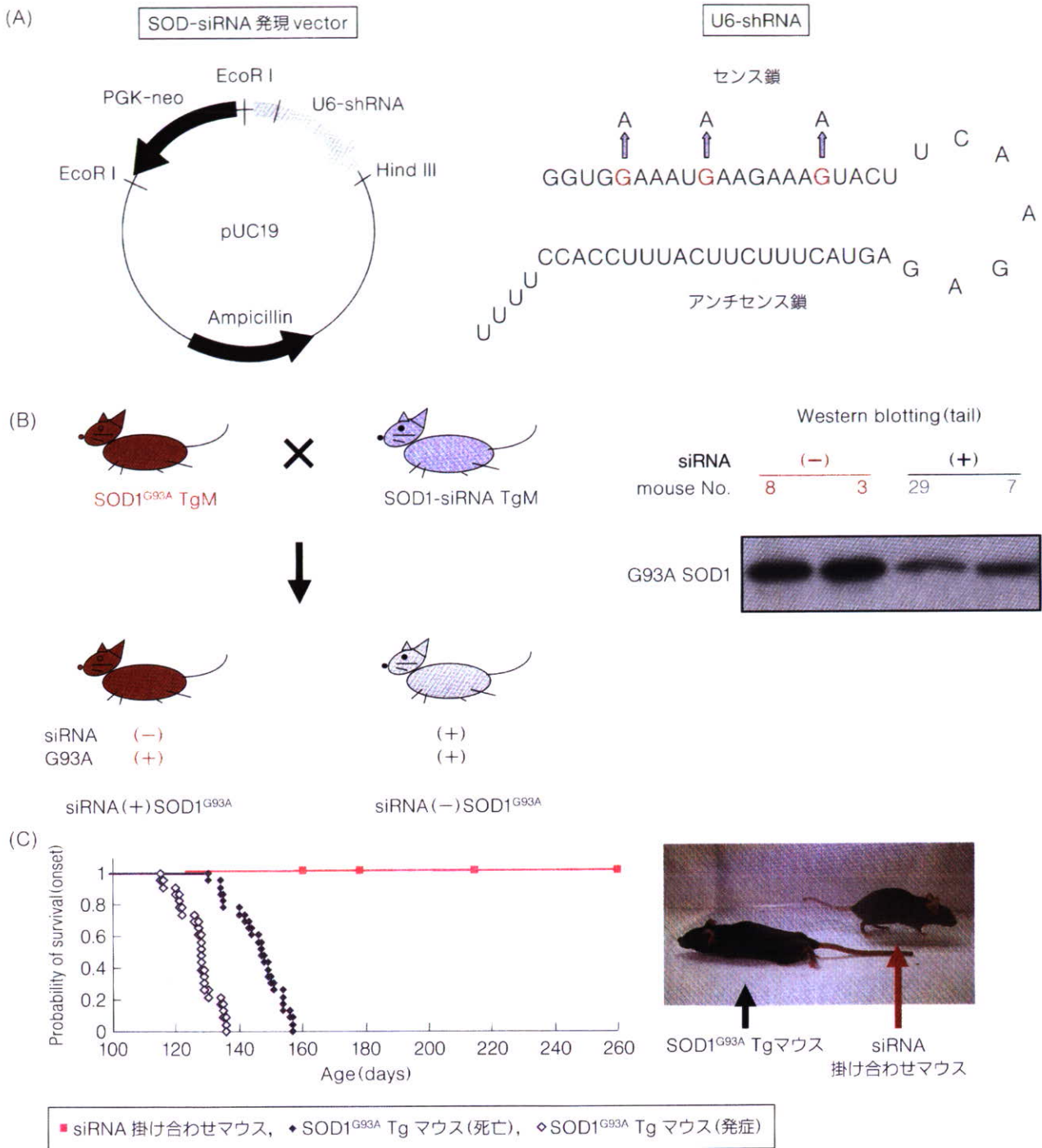


Fig. 1 SOD1^{G93A} トランスジェニックマウスの遺伝子治療 (文献 7 より改変転載)

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、変異 SOD1 蛋白の発現を 80% 以上抑制することに成功した (A)。6 月齢の時点で ALS 症状の発症は完全に抑制されている (B)。

変異のように 1 塩基の違いである点変異でも、正常アリルと変異アリルの配列の差を認識して変異アリルのみを切断できる siRNA のデザインはある程度は可能である。SOD1^{G93A} の場合は、siRNA の配列の 5'側から

10~13 番目の塩基に変異部位を置いた場合が最も野生型 SOD1 の切断効率が低下した¹⁰⁾。最近のバイオインフォマティクス解析では、ガイド鎖の 5'から 10 塩基目および 16 塩基目で、特にプリン：プリン (G→A) ミス

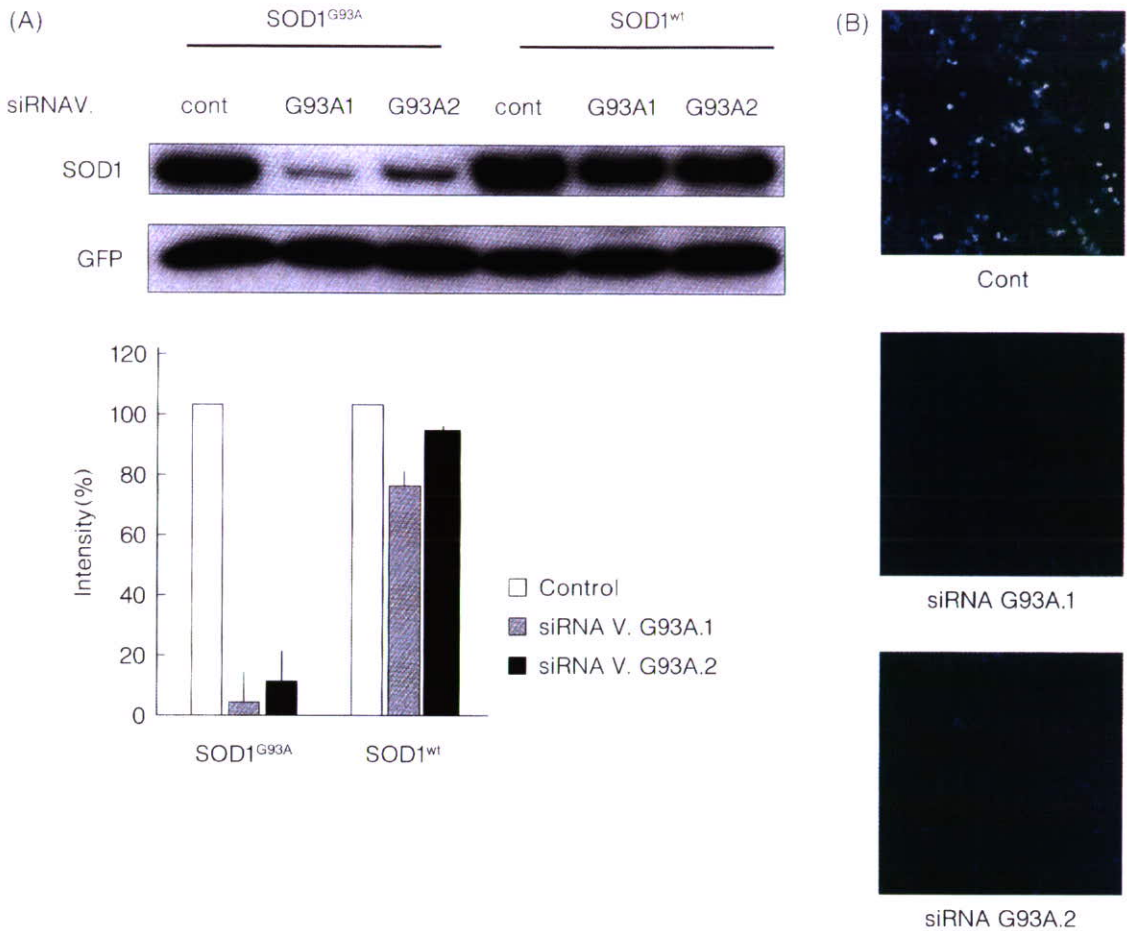


Fig. 2 変異 SOD1 に特異的に作用する siRNA (文献 10 より改変)

A : 293 T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 Western blot した。siRNA G93A1, 2 を共に 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。

マッチが最も効果的と報告されている¹¹⁾。実際にわれわれが作製した SOD1^{G93A} の点変異 (G→C) を認識し、変異アリルを選択的に切断して正常アリルにはほとんど影響しない siRNA の例を示す (Fig. 2)¹⁰⁾。しかし、SOD1 遺伝子変異による家族性筋萎縮性側索硬化症などではその点変異が 100 種類以上知られており、そのすべての変異に対し特異的かつ効率のよい siRNA をデザインすることは困難である。そこで、われわれ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 法を考案した。それは、野生型および変異型、両者のアレルの発現を効率のよい 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野生型遺伝子で野生型蛋白を補おうという方法で、その有効性を神経変性疾患の 1 つであるポリグルタミン病を対象に証明した¹²⁾ (Fig. 3)。現在、その *in vivo* での SOD1 を補う有効性を *in vivo* で実証中で、良好な結果を得ている。

V. 孤発性 ALS への応用

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。例えば、Alzheimer 病の β セクレターゼは有望な標的分子である。Alzheimer 病のモデル動物は Aβ 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。Aβ はアミロイド前駆蛋白 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。最近、スウェーデン型変異 APP を過剰発現させたトランスジェニックマウスの海馬に、BACE1 に対する siRNA を発現するレンチウイルスを直接注入して老人斑の沈着を現象させ、認知機能障害を改善させたとの報告がなされた¹³⁾。孤発性 ALS の発症

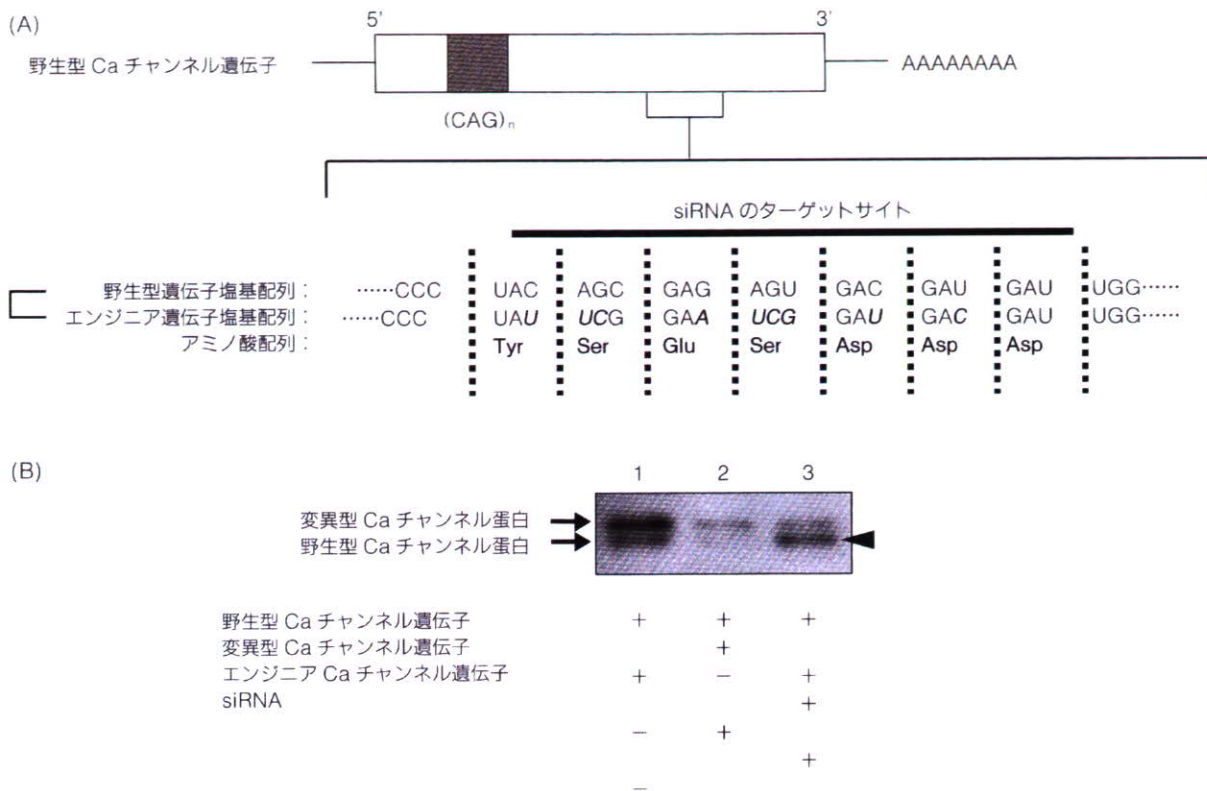


Fig. 3 いくつの変異に対しても変異アレル特異的な RNAi 法 (文献 12 より改変)

SCA6 の原因遺伝子は alpha1A カルシウムチャンネル遺伝子内の CAG リピートの異常伸長だが変異アレル特異的な siRNA を設計することは不可能である。そこで、非特異的な siRNA によって変異型と野生型、両者の mRNA の発現を抑制し、その siRNA で切断されないようにエンジンアした cDNA を利用して野生型蛋白を戻す方法によって、変異アレル特異的な遺伝子発現抑制が可能となる。

機序において、本質的なキー分子は明らかではないが、caspase 阻害剤が有効である¹⁴⁾ ことなどから、例えば細胞死の最終経路の各種 caspase などは標的分子になるかもしれない。最近明らかになった孤発性 ALS の脊髄の神経細胞、グリアの細胞質に凝集する TDP-43 は今後の siRNA の標的分子同定の突破口になるかもしれない〔長谷川成人博士の稿 (pp 1171-1177) を参照〕。

VI. siRNA の *in vivo* へのデリバリー

1. siRNA 発現ウイルスベクター

ALS などの神経変性疾患の治療には RNAi の年単位の長期にわたる効果が必要であり、それにはウイルスベクターが必要となる。siRNA 発現ベクターコンストラクトをアデノウイルスやレンチウイルス、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¹⁵⁾。

特にレンチウイルスとアデノ随伴ウイルスは神経細胞にも高効率に導入でき、しかも長期の遺伝子発現効果が期待できるため有望である。レンチウイルスによる SOD1 に対する shRNA 発現ベクターを、変異 SOD1 トランスジェニックマウスの脊髄に直接注入したり、骨格筋に注入して運動ニューロンに逆行性にレンチウイルスを輸送し、shRNA を発現させて G93A 変異 SOD1 トランスジェニックマウスの発症を遅延させたとの報告もなされた^{16,17)}。同様にアデノ随伴ウイルスにより shRNA 発現ベクターを骨格筋に注入して、当該筋肉の筋力低下を抑制したとの報告もされた¹⁸⁾。アデノ随伴ウイルスは Parkinson 病を中心に既に患者で実際の臨床応用が始まっており¹⁹⁾、shRNA 発現 adeno associated virus (AAV) を用いた中枢神経への遺伝子治療は現実の段階に入ってきた。

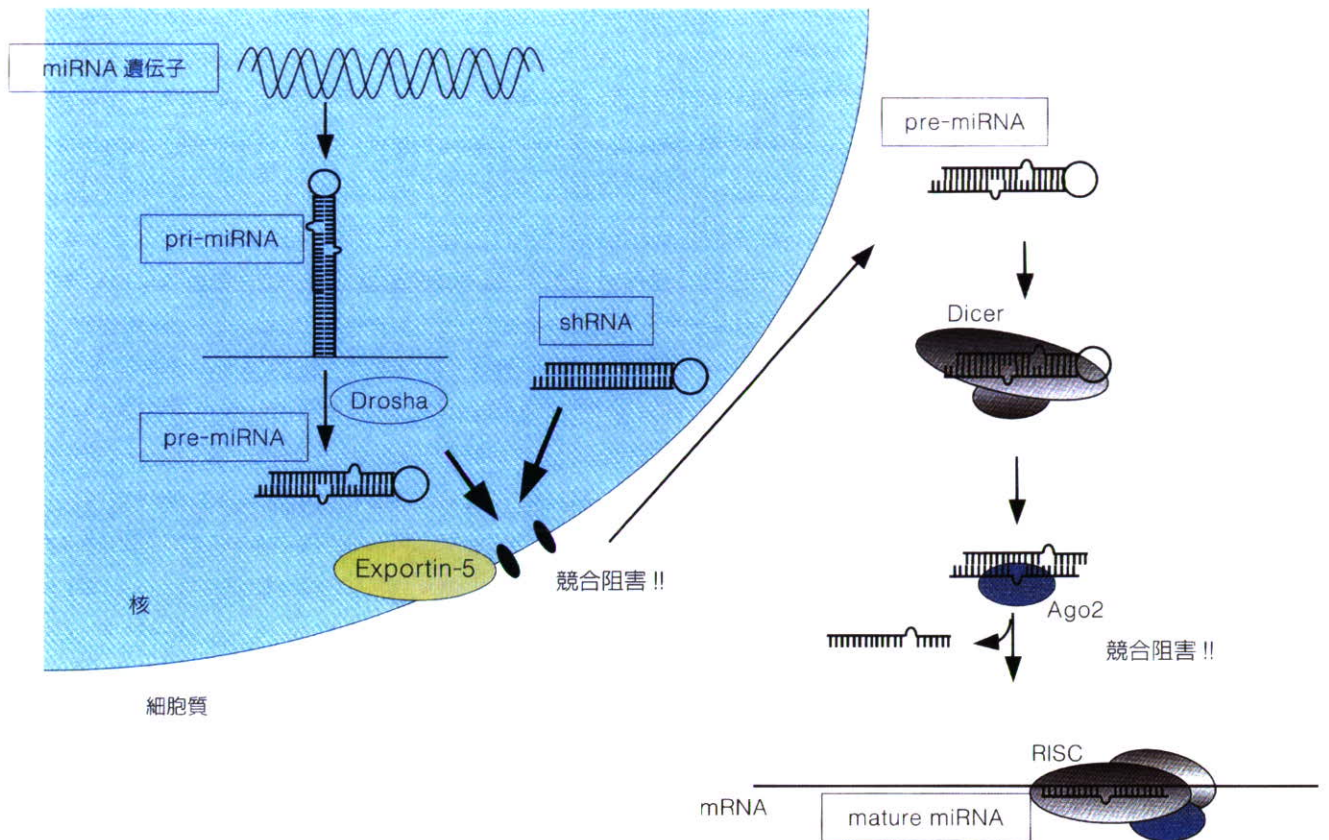


Fig. 4 過剰 shRNA 発現による microRNA (miRNA) プロセス障害の機序

しかし、最近 AAV を用いた shRNA の全身投与にて、遅発性の致死的な重篤な肝障害があるとの重要な報告された²⁰⁾。この肝障害は導入した siRNA の発現量に依存し、複数の異なる標的遺伝子に対する shRNA において生じており、複数の microRNA (miRNA) の低下を伴っていた。これは細胞内で shRNA と内因性の miRNA の前駆体である pre-miRNA が共通のプロセス機構であって、核から細胞質への移行蛋白である exportin-5 や Ago2 を shRNA が競合することにより、miRNA の成熟化プロセスが障害されて成熟 miRNA が低下するためと考察されている (Fig. 4)。われわれもマウスにおいて同様の肝障害を経験しており、今後の shRNA 発現ベクターを用いた遺伝子治療の問題になる可能性がある。

2. siRNA 核酸の脳室内投与

化学修飾した合成 siRNA を直接の脳室内に 1～2 週間持続注入することによって、脳室の表層に近い海馬や大脳基底核においての標的遺伝子の発現を 50%程度抑制したとの報告がなされ²¹⁾、注目されている。siRNA をカチオンリポソームに包埋して同様に長期脳室内持

続注入して、脊髄、後根神経節や視床下部などにおいて有効に導入に成功したとの報告もある^{22,23)}。SOD1 に対するアンチセンス核酸を脳室に持続投与して変異 SOD1 トランスジェニックラットを治療したとの報告もされたが²⁴⁾、アンチセンス核酸の脳室投与による有効性については議論がある。

3. 抗体や細胞導入シグナルペプチドや利用した新しい siRNA のデリバリー

siRNA のデリバリー方法として抗体²⁵⁾ や RNA アプタマー²⁶⁾ を siRNA 結合させて、導入細胞の受容体を介した siRNA の新しいデリバリーも報告されている。しかし、これらのいずれの方法でも静脈注射で、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容易ではない。血液脳関門を通過するためにトランスフェリン受容体に対するモノクローナル抗体を、神経細胞に導入するためにインスリンに対するモノクローナル抗体を結合させたペグ化免疫リポソームを作成して、全身投与することにより神経細胞へ導入させようとする試みも始まっている²⁷⁾。

神経細胞へ導入のため細胞導入シグナルペプチドの利

用も研究されてきたが²⁸⁾、ごく最近に重要な報告がなされた。狂犬病ウイルスの糖蛋白からデザインした29アミノ酸からなるペプチドに9つのアルギニンを結合させ(RVG-9R)、これと siRNA とで複合体を作製して、静脈投与により脳血管関門を越えて、脳内の SOD1 の発現を50%程度抑制したという²⁹⁾。狂犬病ウイルスは脳血管内皮や神経細胞に発現しているニコチンアセチルコリン受容体の $\alpha 7$ サブユニットに結合して、受容体介在性トランスサイトーシスによって脳内に運ばれ、神経細胞にデリバリーしたと考えている。その明確な輸送経路や脳内局在が明らかになり、詳細な副作用の評価ができれば有効な投与量が siRNA 量で1~2 mg/kg と比較的low容量であることから、今後の臨床応用へ将来性が期待される。

VII. Off-target 効果

siRNA は確かに標的遺伝子に対する配列特異性は高いが、用いる siRNA が21塩基と短い部分に相同性のある別の遺伝子の発現まで抑制されてしまう可能性がある。この現象は off-target 効果と呼ばれており、siRNA を臨床応用する際には siRNA の発見当初からある大きな問題である。

Jackson ら³⁰⁾の検討では、通常19塩基中15塩基以上で、最低では11塩基の相同性のある遺伝子において影響があったと報告された。また最近のバイオインフォマティクス解析で、off-target 効果を受ける遺伝子群は3'側の非翻訳領域に相同性を多く認める傾向があることが明らかとなった^{31,32)}。これは標的遺伝子の3'側の非翻訳領域に結合し、その発現を抑制する microRNA の作用機序に類似しており、siRNA のガイド鎖の5'から2~8塩基目の7塩基 (microRNA の seed 領域に相当) (Fig. 1) が3'側の UTR に相同性を持つ遺伝子に影響を及ぼすことによる。

Off-target 効果を回避するには、ホモロジー検索で3'側 UTR にこの seed 領域の塩基配列に相同性を持つ遺伝子が存在しない siRNA 配列を選択することが望ましい。しかし、seed 領域は7塩基と短いため、この配列だけで siRNA に特異性および有効性を保たせるのは非常に困難である。最近、off-target 効果を回避する新たな手法として、ガイド鎖の seed 領域のヌクレオチドに対する化学修飾の有用性が報告された³³⁾。とりわけ、5'から2塩基目の2'-O-メチル化が off-target 効果の抑制に効果的とされる。これは、結晶構造の解析からこの部位の修飾により RISC と mRNA との結合が不安定となるた

めに、target 遺伝子の抑制効果は保ちつつ off-target 遺伝子の発現抑制がなくなると考えられている。

また、off-target 効果には濃度依存性がみられるために、できるだけ投与量を最小限に抑える必要があることは言うまでもない。

おわりに

siRNA の核酸医薬としての臨床応用の研究には、shRNA 毒性、off-target 効果など解決すべき課題はまだ多くあるが、その潜在能力は測り知れないものがある。それゆえ、その基礎研究は爆発的に進んでおり、最も大きな問題である中枢神経へのデリバリー方法にも大きな進歩がありそうである。比較的近い将来に、ALS 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を期待している。

文 献

- 1) Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, et al: TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* **436**: 740-744, 2005
- 2) Tomari Y, Zamore PD: Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev* **19**: 517-529, 2005.
- 3) Matranga C, Tomari Y, Shin C, Bartel DP, Zamore PD: Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* **123**: 607-620, 2005
- 4) Elbashir S, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, et al: Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**: 494-498, 2001
- 5) Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R: A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **29**: 550-553, 2002
- 6) Greenway MJ, Andersen PM, Russ C, Ennis S, Cashman S, et al: ANG mutations segregate with familial and "sporadic" amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* **38**: 411-413, 2006
- 7) Saito Y, Yokota T, Mitani T, Ito K, Anzai M, et al: Transgenic small interfering RNA halts amyotrophic lateral sclerosis in a mouse model. *J Biol Chem* **280**: 42826-42830, 2005
- 8) Shefner JM, Reaume AG, Flood DG, Scott RW, Kowall NW, et al: Mice lacking cytosolic copper/zinc superoxide dismutase display a distinctive motor axonopathy. *Neurology* **53**: 1239-1246, 1999
- 9) Uchiyama S, Shimizu T, Shirasawa T: CuZn-SOD