

- 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, Matsumura R, Tasinato A, et al: 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, Moore JT, Schelter J, et al: Designing siRNA that distinguish between genes that differ by a single nucleotide. *PLoS Genetics* **4**: 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, Crews L, Coufal NG, 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, Chen M, Jackson-Lewis V, 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, Carthy JM, Leroux MA, 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, Guillot S, Haase G, 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, Yamanaka K, Christian LJ, 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, Fitzsimons HL, Mattis P, 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, Storm TA, Pandey K, 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, Maier R, Muller M, et al: 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
 - 22) 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
 - 23) Luo MC, Zhang DQ, Ma SW, Huang YY, Shuster SJ, 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, Monia BP, Condon TP, et al: Antisense oligonucleotide therapy for neurodegenerative disease. *J Clin Invest* **116**: 2290-2296, 2006
 - 25) Song E, Zhu P, Lee SK, Chowdhury D, Kussman S, et al: Antibody mediated *in vivo* delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat Biotechnol* **23**: 709-717, 2005
 - 26) McNamara JO 2nd, Andrechek ER, Wang Y, Viles KD, Rempel RE, 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, Charles A, Boado RJ, 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, Prunell GF, Shelanski ML, 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, Jung KE, Kim MH, 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, Kobayashi SV, Burchard 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, Ilesley-Tyree D, Leake D, 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, Chau BN, Cleary M, 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, Reynolds A, Schelter J, et al: Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing. *RNA* **12**: 1197-1205, 2006

RNA干渉による 神経変性疾患の治療

横田隆徳 東京医科歯科大学大学院 脳神経病態科 (まとめ:編集部)

長い2本鎖RNAによって遺伝子発現が抑制されるRNA干渉(RNAi)は、植物から昆虫、哺乳動物にいたるまで広く観察される現象である。いまRNAiは、疾患の原因となっている遺伝子を高い配列特異性をもって抑制できる治療薬として期待されている。RNAiをつかった、アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患の治療の可能性と課題について検討する。



疾患にかかわる遺伝子を抑える技術としては、RNAi以外にもリボザイムやDNA酵素などが以前から検討されていた。私がアメリカでリボザイムについて研究していた1998年、RNAiが発見された。しかし当初、哺乳動物にはRNAiはインターフェロン反応の副作用があり、使用できなかった。

それが2001年、ドイツのTuschl教授らがsiRNA (short interference RNA) を見いだしてから、副作用がなくなり、哺乳動物に使うことができるようになった。

siRNAは30塩基以下からなる2本鎖RNAであり、利用されているものの多くは21~22塩基、最近では25、27塩基が使われるようになった。

2本鎖RNAによる発現抑制は配列特異的であり、理論的には、いかなる遺伝子に対しても適用できる。そのターゲット遺伝子の抑制効果は、従来のリボザイムやアンチセンス核酸(DNA, RNA)とくらべても、約 $10^3 \sim 10^5$ も高いことがわかっている。この現象を培養細胞で観察したときは、何かの間違いではないかと思っただけだ。

RNAiは、いまや分子生物学のツールとして

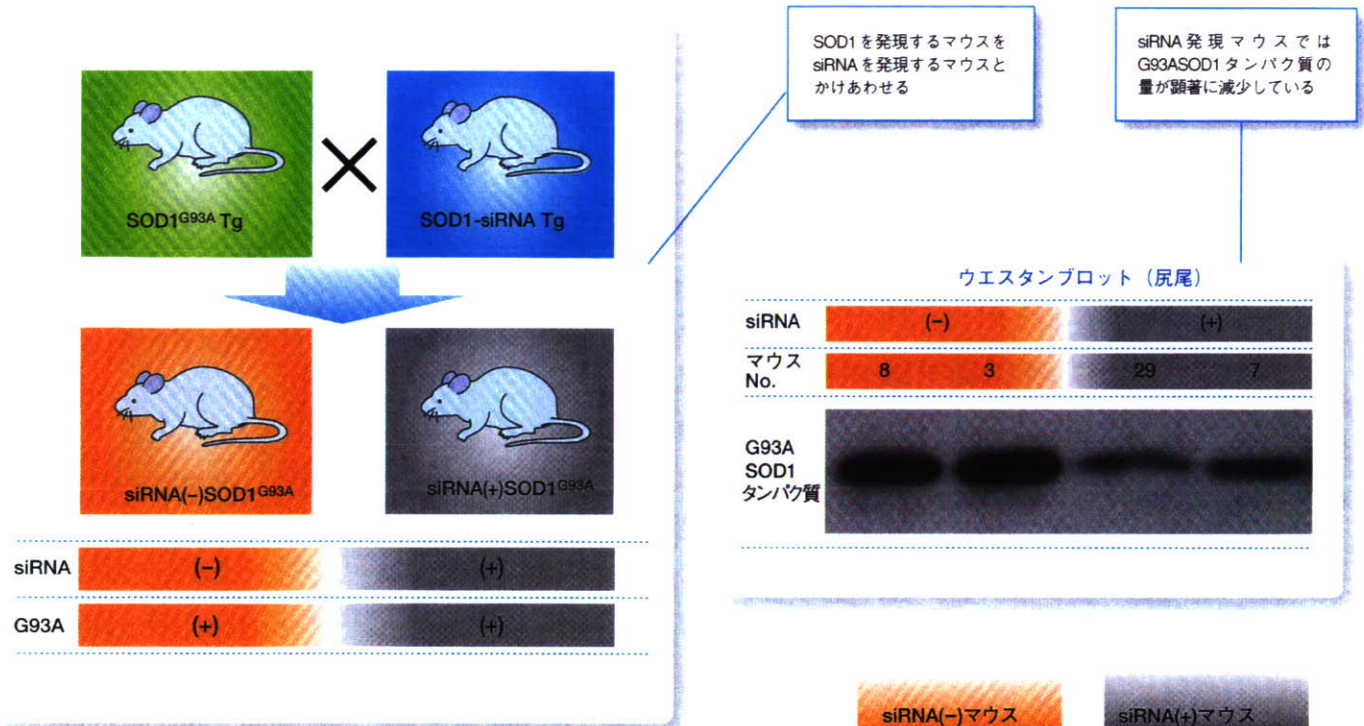
ほぼ定着し、誰でも使えるものになった。それだけ効果の高いツールであるのだから、これを治療に応用できないか、という考えは発見当初から存在していた。

悪さをする遺伝子をたたく治療薬

では、このsiRNAを治療に利用するには、どういった疾患が対象となるのだろうか。siRNAは、発現すると望ましくない遺伝子を抑制することに役立つ。つまり、何か足りないことで発症している疾患ではなく、悪さをする遺伝子が働くことで発症する疾患が対象となる。

siRNAが治療薬として役立つと考えられる代表的な疾患のタイプには、以下の三つのカテゴリーがある。まず第1は、外から侵入してきた細菌やウイルスによってもたらされる疾患。RNAiが生体のなかで果たしている本来の役割は、抗ウイルス作用にあり、RNAiで細菌やウイルスの遺伝子発現を抑制することができる。細菌感染にたいしては抗生物質が有効だが、RNAiは抗ウイルス薬として期待されている。

a SOD1 発現マウスと RNAi 発現マウスのかけあわせ



b かけあわせマウスの生存曲線

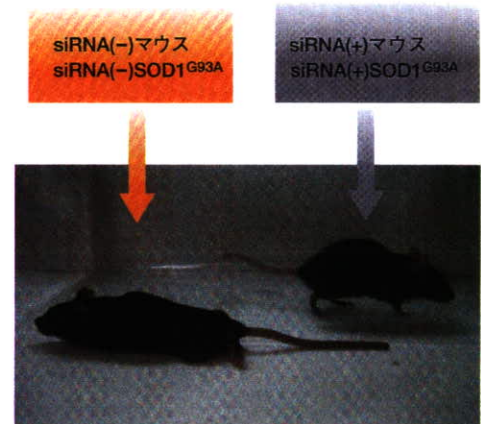
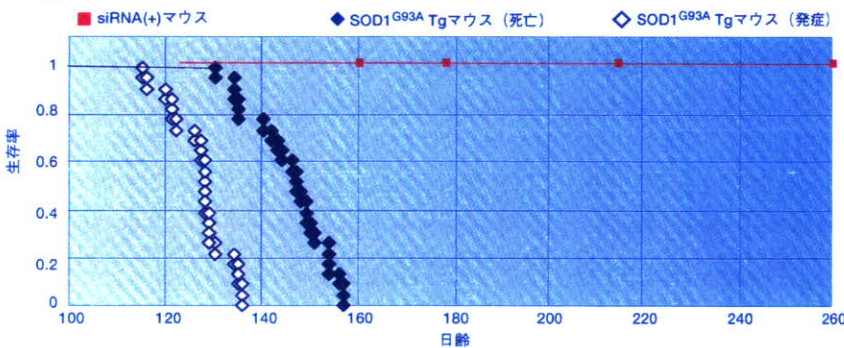


図1

RNAi 発現による ALS 原因遺伝子の抑制

ALSの原因遺伝子であるSODを発現したトランスジェニックマウス(SOD1^{G93A})と、siRNAが脳を含め全身で発現したトランスジェニックマウス(SOD1-siRNA)をかけあわせて生まれたsiRNA(+)マウスでは、G93ASOD1の発現量が8割ちかく減少している。ALSマウスはほとんど動くことができないが、かけあわせたマウスは正常に動き回っており、生存曲線にも大きな違いがある。

現在、AIDSやC型肝炎、SARSなど難治性のウイルス疾患を対象として研究が進展している。

つぎに、遺伝性疾患。遺伝性疾患のなかには何かが足りないために発症するタイプもあるが、RNAi薬が対象とするのは、変異遺伝子の発現が病因となっている遺伝性疾患である。その多くが、常染色体優性遺伝の疾患である。悪い遺伝子産物がいわば「毒」となって発病しているから、その遺伝子を抑制すれば病気は治癒する。そしてもう一つの重要な対象疾患が、悪性腫瘍である。RNAiのがん治療応用については、多くの研究者が研究開発を進めている。

RNAiの治療応用の可能性と二つの課題

私たちが研究対象としているのは、神経変性疾患に対するRNAiを使った治療法である。アルツハイマー病はその代表的な疾患であり、それ以外に、パーキンソン病、脊髄小脳変性症、筋萎縮性側索硬化症(ALS)などを対象としている。

これらの疾患で常染色体優性遺伝のものは、悪い遺伝子から悪いRNA、悪いタンパク質がつくられることで発症しているので、RNAiでそのRNAの発現を抑制できれば治療できるという理論が成り立つ。

しかし、これらの病気の治療に siRNA を利用するにあたって、大きな課題が二つある。

一つは、siRNA には毒性があるという点であり、もう一つは、いかにして siRNA をターゲットとなる臓器の細胞内に運ぶかという点にある。これらの課題については、いま現在も、完全には解決されていない。

中枢神経は、物理的に頭蓋骨や脊椎などの骨格で守られているだけでなく、化学的にも血液脳関門があることで、特定の分子以外はほとんどの分子がこれを通過しないようになっている。よって外から導入された RNA は、そのままではこの脳関門を通過できないため、脳に到達しない。また神経細胞は、十分に分化した細胞なので、細胞内への導入はさらに困難である。二重の意味で神経は、siRNA を導入するのにむずかしい場所であるといえる。

トランスジェニックマウスでは ALS を根治

論理的に可能であるとはいえ、本当に遺伝性疾患を RNAi という手法で治療することができるのか、という疑問を当初から抱いていた。そこで、まずデリバリー（薬物送達）の問題を回避して RNAi の効果を確かめるために、ALS の原因遺伝子である変異 SOD1（スーパーオキシドディスムターゼ 1）を発現したトランスジェニックマウスと、それを阻害する siRNA が脳を含め全身で発現したトランスジェニックマウスを作製した。これらをかけあわせれば、病因となる遺伝子とそれを抑制する siRNA の双方を発現するマウスができる。もちろんヒトの治療においては非現実的だが、理論的には、RNAi が治療の手段となりうるかを検証できる。

結果、変異 SOD1 タンパク質の発現量は 8 割ちかく抑制され、かけあわせたマウスはまったく症状を呈さなかった（図 1）。ALS は手足が萎えて動かなくなる病気なので、ALS マウスはほとんど動くことができない。それに

くらべ、かけあわせたマウスは正常に動き回っており、その効果は一目瞭然だった。

それぞれの生存曲線を見ると、ALS マウスは 3～4 か月でほぼすべて死亡するのにたいして、かけあわせたマウスはその後ずっと生き続けた。著明な効果だった。

この実験によって、RNAi で遺伝性疾患を治療することができるのか、という疑問については水解した。

アルツハイマー病治療の可能性

ではアルツハイマー病にたいしてはどうか。APP（アミロイド前駆タンパク質）の点変異と、PS1（プレセニリン 1, Presenilin1）という酵素の点変異が、家族性アルツハイマー病の原因となっていることが知られている。アルツハイマー病は、老人斑（A β , アミロイド β ）が神経細胞に蓄積することで発症する。アミロイド前駆タンパク質（APP）から、 β セクレターゼ（BASE1）と γ セクレターゼ（PS1 など）という二つの酵素によって、A β が切り出される（図 2）。遺伝性のアルツハイマー疾患では、この APP や γ セクレターゼに点変異があることで、A β の切り出し効率が増加して、沈着が増加し発症にいたると考えられている。つまりこの酵素の発現を抑制してあげれば、A β を切り出すことができなくなるので、病気は治ることになる。2005 年、ウイルスベクターを使った siRNA の導入によって、A β の蓄積が局所的に減少したという報告が『nature medicine』誌に発表されている。

では、 β セクレターゼと γ セクレターゼのどちらを抑制すればいいのか。 γ セクレターゼの基質となる分子は APP 以外にもさまざまあり、この酵素を阻害するとそれら APP 以外の基質も代謝できなくなってしまうため、非常に強い副作用がでる。一方、 β セクレターゼは APP に特異的に作用するので抑制しても問題はないと考えられている。多くの製薬会社が、この

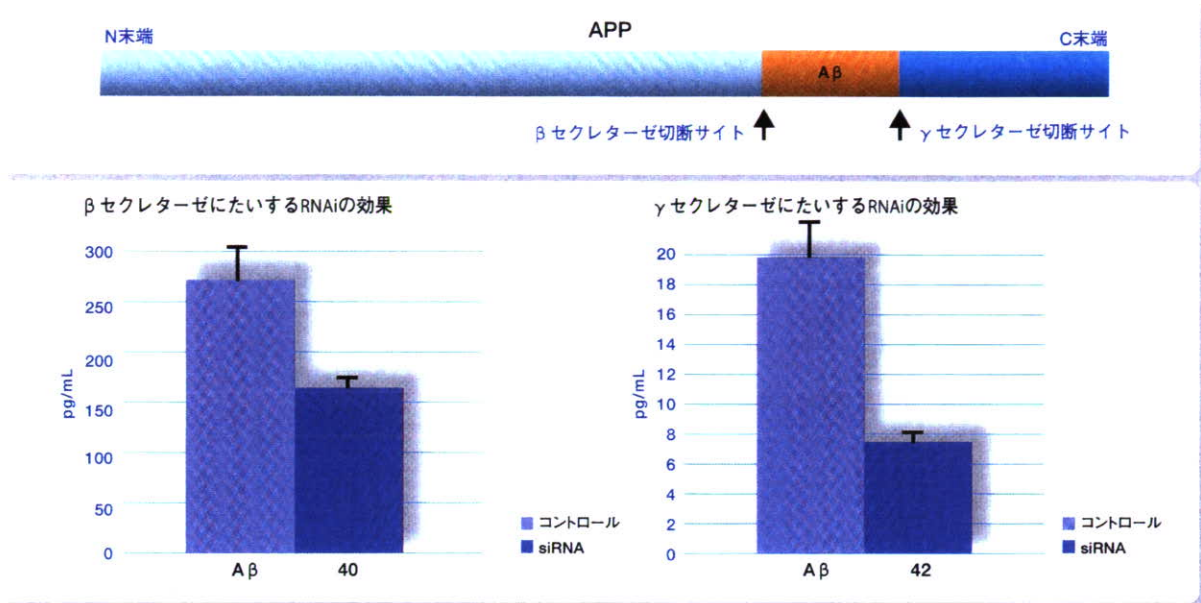


図2

βセクレターゼにたいするRNAiの効果

アミロイド前駆タンパク質(APP)から、βセクレターゼ (BASE1) とγセクレターゼ (PS1など) によって、切り出されたAβが沈着することで老人斑が形成される。培養細胞でβセクレターゼに対するsiRNAを投与したところ、Aβ40、Aβ42ともに産生量が減少している。なお、Aβに40と42の2種類の分子種があるのは、γセクレターゼによって切断されるサイトが2種類あるためである。アルツハイマー病ではAβ42がコアとなってそのまわりにAβ40が集合して沈着する。

βセクレターゼにたいする阻害薬を開発している。

図中のデータは培養細胞での結果だが、βセクレターゼをsiRNAで抑制したところ、Aβの産生を減少させることができた。つまり理論的には、βセクレターゼを抑制できればアルツハイマー病は治療可能であると考えられる。

RNAiをいかに患部へとデリバリーするか

RNAを体内にデリバリーする方法としては、大きく分けてウイルスベクターを使う方法と、使わない方法の二つがある。

いまのところ、神経細胞に確実にRNAを導入するにはウイルスベクターを使用するしか手段がない。レトロウイルス、レンチウイルス、アデノ随伴ウイルスといったウイルスベクターが使用されているが、このうち最も安全性が高いのはアデノ随伴ウイルスである。ただし、これらはすべて脳に直接注入する必要がある。脳に針を刺してウイルスを注入するのは、治療法としては乱暴なやり方である。

先に挙げた神経変性疾患のなかでは、パーキ

ンソン病のように脳の局部に疾患がある場合はこの方法でも可能なのだが、アルツハイマー病では、海馬が一番重要ではあるものの、病変は脳全体にわたる。脳全体に満遍なく針を打つことは現実的にはできない。先の『nature』誌の報告も、ウイルスを注入して染み込んだ場所が改善したということであって、病気を治したということではない。

ALSもアルツハイマー病と同様に、原因遺伝子が脳全体で発現する。私たちが作製したトランスジェニックマウスでは、RNAiを脳全体で発現させることができるために治癒した。

ウイルスベクターは、神経細胞に導入することはできるが、脳血液関門を通過できるわけではないので、脳全体に行き渡らせることができないのが問題となる。

非ウイルスのベクターとしては大きく分けて三つある。RNAをはじめとして、核酸はマイナスに荷電した親水性の物質である。細胞膜はマイナスに荷電している上に疎水性なので、RNA自体が細胞膜を通過することはない。それを解決するために、プラスに荷電した脂質でくみ細胞膜と融合できるようにするのが一つ

の方法である。ベクターとしてはおもにカチオンニック・リボソームが利用されている。また、RNAにコレステロールなどの疎水性分子を結合させる方法もある。ただ、どちらも毒性が高い。また、細胞に導入するためには、多量の投与が必要となる。薬物では、治療域と毒性域がオーバーラップしているため、投与量が多くなると毒性が高まる。また、これも脳血管関門を越えることができず、神経細胞内にもほとんど入っていかない。デリバリー媒体としては、安全に治療域に達したものはいいがたい。

そして三つ目が、神経細胞の表面あるいは、血液脳関門に表出している受容体を介するデリバリー方法である。とくにトランスポーターの機構を利用することができれば、これらのバリアを通り抜けることができる。現在、血液脳関門の受容体やトランスポーターを介して脳にsiRNAを導入する試みは、世界各所でおこなわれている。これからどこまで可能性が高まるかは未知数だが、多くの研究者が参入したことで急速に知見が変化している分野である。

毒性の問題は克服できるか

RNAiが抱える毒性の問題としては、おもにオフ・ターゲット・エフェクト、インターフェロン誘導、shRNA毒性の三つが挙げられる。

(1) オフ・ターゲット・エフェクト

これは、導入されたsiRNAが対象以外の遺伝子を抑えてしまう効果をさす。基本的に、siRNA (RNAi) は21塩基で構成されている。そのうち2本鎖がハイブリダイズしているのは19塩基。この19塩基に相補的な配列をもつ遺伝子が抑制される。塩基の組合せとしては 4^{19} なので、ヒトで2万数千個あると考えられている遺伝子の数からすれば、十分にそのターゲットは一つとなり、ターゲット遺伝子にたいする特異性は担保されるはずである。ところが実際には、19塩基すべてが相補的でなくても、抑制効果がでてしまう。たとえばそのうちの15塩基が相補的でも抑制しうるとなると、不

必要に抑えられてしまう遺伝子が現れる可能性がある。しかもその遺伝子を予想することはかなりむずかしく、このオフ・ターゲット・エフェクトは、siRNAの抱える大きな問題の一つとなっている。

最近、RNAiのどの部分の配列が相補的だとオフ・ターゲット・エフェクトがおきやすいのかが徐々に判明してきた。ガイド鎖とよばれる配列の5'末端から2~8番目のシード領域の7塩基が、オフ・ターゲット・エフェクトを示すのに重要だということがわかった。しかしこれは解決策にはならない。というのも、いままでsiRNAは、その19塩基に相補的な塩基配列をもつ遺伝子と特異的にハイブリダイズすると考えられていたのだが、わずか8塩基で決定されているということになってしまう。するとターゲットが逆に増加することになり、オフ・ターゲット・エフェクトを調査する対象が膨大となってしまう。

オフ・ターゲット・エフェクトを解決する方法はいくつかある。ターゲット遺伝子に効果が見れると同時にオフ・ターゲット・エフェクトがおこったとしてもその効果ははるかに低い、つまり、効果的なsiRNAを低濃度で使用すれば、オフ・ターゲット・エフェクトは抑えられるはずである。とはいえ、患部へのデリバリー効率は非常に低いので、投与量を多くせざるをえない。そうすると、論理的にオフ・ターゲット・エフェクトを抑えるしくみが必要になる。昨年、その方法として、核酸に化学修飾を加えることで、オフ・ターゲット・エフェクトをかなり抑えることができるといった発表がいくつかされている。

(2) インターフェロン誘導

先に、短い2重鎖RNA (siRNA) の発見によって毒性の問題が克服されたと述べた。細胞には長い2本鎖RNA依存性のインターフェロン誘導パスウェイがある(図3)。それによって細胞はアポトーシスをおこす。それを短くしたところインターフェロン誘導がおこらなかつ

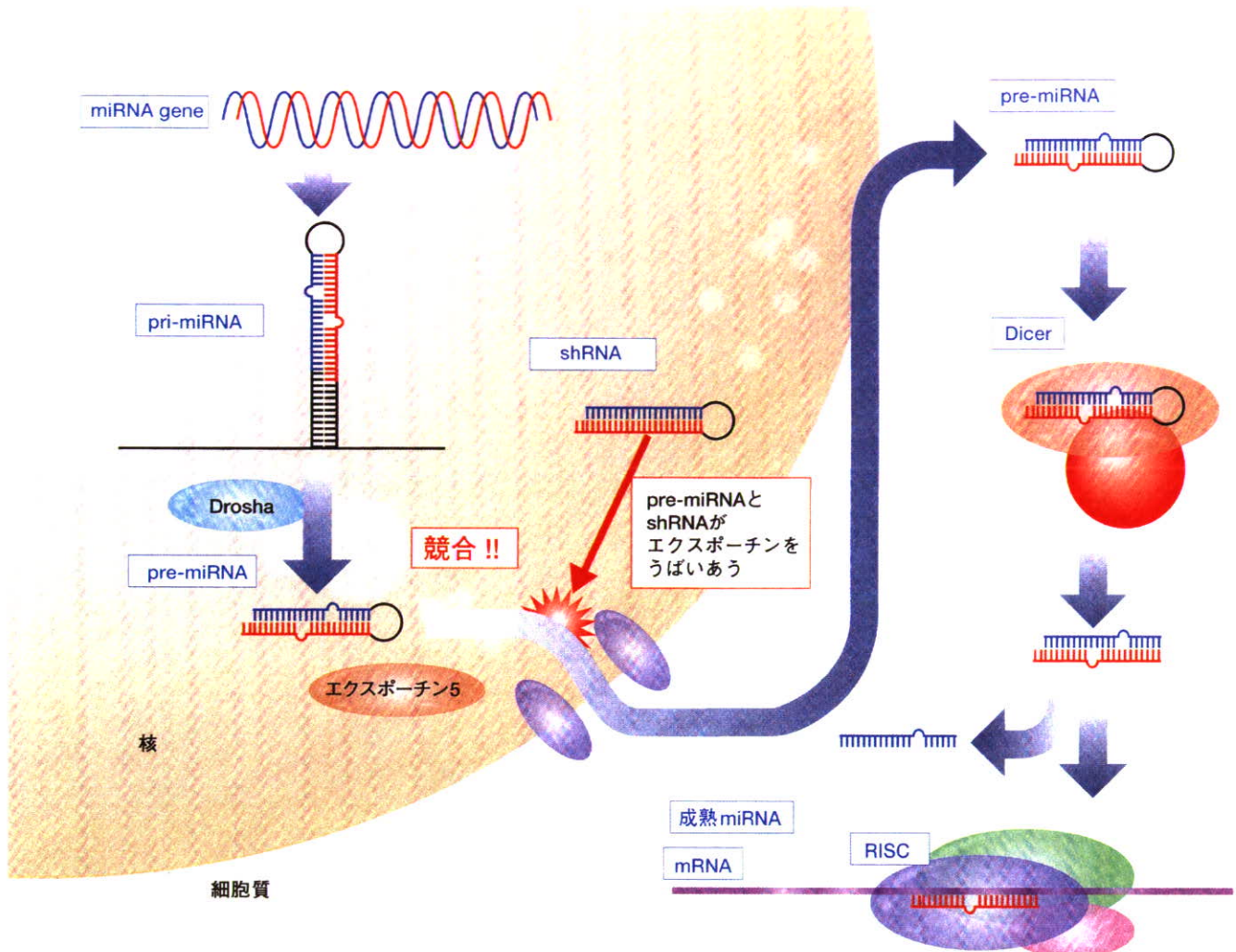


図3

shRNA が microRNA 前駆体の核外移行を競争阻害する

ウイルスベクターによって導入された RNAi は、shRNA として増幅される。その生成過程は、細胞がもつ microRNA の生成過程と競合し、microRNA が欠乏することで生体にダメージを与える。

たというのが、siRNA のブレイクにつながった。ところが最近、短い 2 本鎖 RNA でも毒性を示すことがわかってきた。

カチオン性・リボソームをデリバリーキャリアとして siRNA を細胞に導入すると、細胞に取り込まれるときにエンドソームという膜に包まれる (図 3)。するとそこにある自然免疫のレセプターが刺激され、それがインターフェロン誘導につながり、細胞死へと導くということがわかった。つまりトランスジェニックマウスのように、細胞のなかで発現させると問題はないのだが、細胞の外から RNA を導入しようとすると、インターフェロン誘導がおきてしまうことになる。

しかしこれらのインターフェロン誘導につい

ては、RNA を化学修飾することで、自然免疫による反応を抑えることができるようになりつつある。

(3) shRNA 毒性

ウイルスベクターで RNAi を細胞に導入するときには、発現型の DNA から short-hairpin RNA (shRNA) を発現させる。大量の shRNA 発現型ウイルスベクターをマウスに投与すると、黄疸になり肝不全で死亡してしまうといった致死的な副作用があることが昨年わかった。そのおよそのメカニズムがわかってきた。microRNA という non-coding RNA が前駆体から RNA になる過程の機構と、shRNA がつくられる過程の機構がオーバーラップしている。ウイルスを利用して shRNA を大量に発現させ

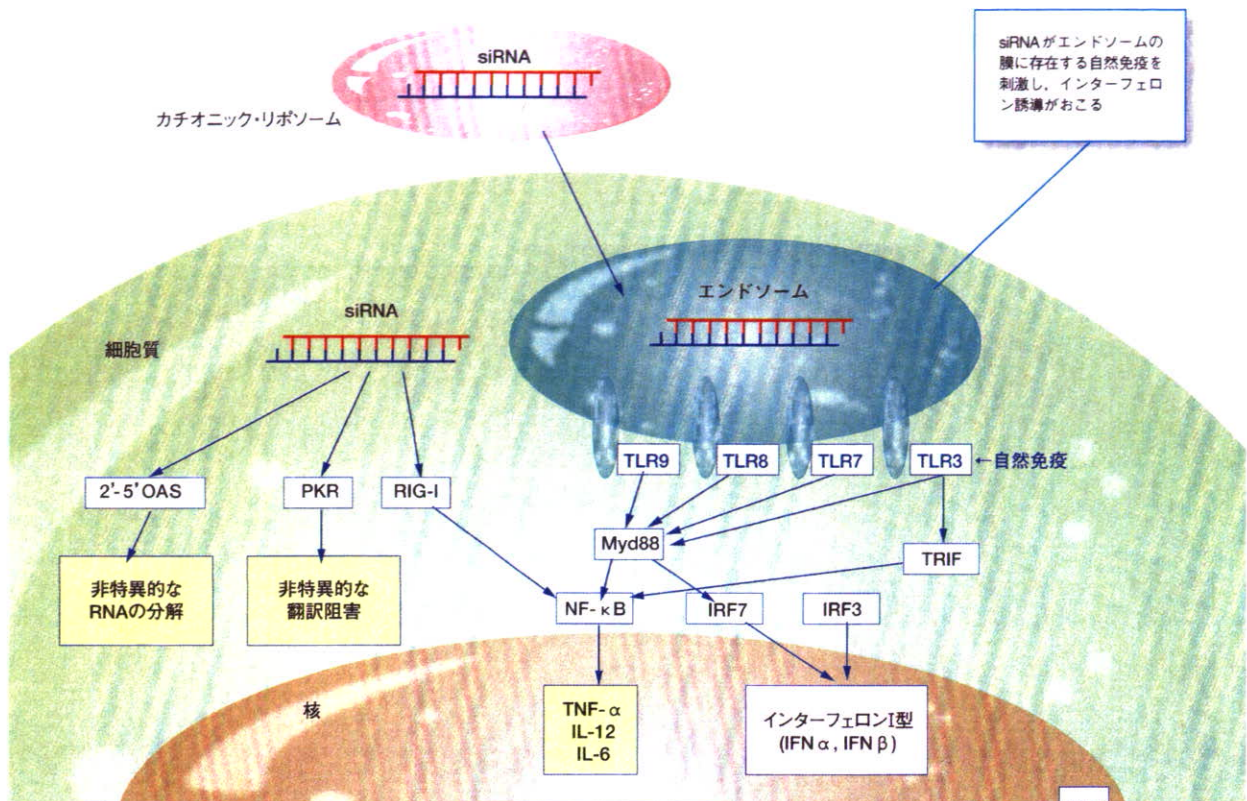


図4

ると、microRNAの生成機構をうばってしまい、結果、副作用につながるのではないかと考えられている。私たちがこの実験を再現したところ、やはり非常に肝毒性が高いことがわかった。ただこれは生成されるshRNAの量による。大量にできると副作用がでるのであるから、効率のよいshRNAを用いれば、少ないshRNAで効果をあげることができ、副作用を回避できるだろう。

これからRNAi医薬の可能性は、高まってくだろう。ここに挙げた課題のなかで、毒性については課題が克服されるのに長い時間はかからないと思える。問題はデリバリー方法についてだろう。肝臓ではデリバリーシステムの確立は可能になると期待しているが、脳についてはまだ不透明なままだ。しかし、世界で巻き起こっているRNAi医薬にたいする大きな流れから察するに、脳を含めてデリバリーの課題が解決されるのは、それほど遠い先のことだとは考えていない。肝臓で2年以内、脳で5年以内ぐらいに解決されると期待している。

Profile

よこた・たかのり

1989年東京医科歯科大学大学院卒。現東京医科歯科大学大学院脳神経病態学（神経内科）准教授。1998-2000年アメリカ・バーナム研究所留学。神経内科の診療の傍ら、siRNAを用いた遺伝子治療の実現に腐心している。

参考文献

- [1] Elbashir S, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K & Tuschl T: "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells" Nature 411 (2001) 494-498
- [2] 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 (2005) 42826-42830
- [3] 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 (2004) 7721-7726
- [4] 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, Limmmer S, Manoharan M & Vornlocher HP: "Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs" Nature 432 (2004) 173-178
- [5] 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 (2006) 537-541

siRNAによる二つのインターフェロン誘導パスウェイ

長いsiRNA、細胞外からとりこまれたsiRNAとともに、図のような反応経路を経て、インターフェロンなどの免疫反応を誘導し、細胞をアポトーシスへと向かわせてしまう。

—特集にあたって—

RNAi 医薬の可能性と展望

横田隆徳*

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た。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 Ago 2 (Ago 2) にリクルートされ、RLC (RISC-loading complex) を形成する。siRNA の 2 本鎖のうちパッセージ鎖 (センス鎖) は Ago 2 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。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、Ago 2 により標的 RNA の相互部分の中央で切断する。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 21~30 塩基対の short interfering RNA (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。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^{3-6} 倍、リボザイムの 10^{2-5} (自験) 高く、分子生物学のツールとして急速に汎用化され、現在では PCR 並みに一般的となって 2006 年のノーベル医学生理学賞に選ばれた。

その強力な遺伝子抑制効果に加え、配列特異性も高く、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、siRNA を直接核酸医薬として疾患に適応するという 2 つの方面から行われてきた。本特集では、siRNA を核酸医薬としての現在における可能性と展望について取り上げる。siRNA の核酸医薬は従来の低分子医薬と比較して、以下の 3 点の特徴を有していると考えられる。

①低分子化合物医薬品の大半はその化学的、構造化学的特性から G タンパク関連受容体、イオンチャンネル、酵素、核内ホルモン受容体などが特定の分子が対象なりやすい。さらに有効な低分子化合物医薬品が発見されてもそれが安全性や代

*Takanori Yokota 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) 准教授

謝動態が「ドラッグプル」であるために、個々の低分子化合物においてその最適化に多大の時間と労力が必要となる。その点で、siRNA はすべての mRNA を標的にでき、そのデザインから導入、問題点は標的分子にかかわらず共通して、一度そのシステムが確立すれば汎用性がある。言い換えれば、ポストゲノム研究の成果をそのままその標的遺伝子として用いることが可能である。

② RNAi 現象は microRNA (miRNA) 制御機構とあわせて、広く真核生物に共通する重要な遺伝子発現制御機構であり、より生理学的な反応系を利用する点から制限もあるが、いままでにない薬効や強烈な有効性をもたらす可能性がある。

③ 標的分子は mRNA だけでなく、non-coding RNA も可能で、今後のさらに広い標的分子が対象にでき得る。

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。しかし、臨床応用という観点ではその進展は必ずしも順調というわけではなく、siRNA 医薬がいかなる疾患でどの程度の有用性が期待できるかはいまだ不透明と言わざるをえない。

その問題は大きく分けて ① *in vivo* デリバリー、② siRNA による副反応の 2 点である。

siRNA は 5 炭糖のリボースの 3' または 5' の間に重合したジエステル結合のリン酸がマイナスに荷電していて、親水性の物質である。一方、細胞膜は脂質 2 重膜で疎水性な上にマイナスに荷電しているため、RNA 分子自体が受動的に細胞膜を通過することはない。したがって、siRNA を以下に効率的に標的臓器に運んで細胞内に導入できるかが最も重要な課題となっている。それを解決するために、プラスに荷電した脂質で包埋して細胞膜と融合できるようにしたカチオニックリポゾームが利用されている。また、それ以外にカチオニックペプチド、コレステロール結合、プロタミンと抗体との融合タンパク、ナノ粒子などの様々な開発が試みられている。ただ、現在のところいずれのデリバリー媒体として、十分に安全に治療域に達したものとは言いがたい。ウイルスベ

クターの臨床応用はウイルスベクター自身の副作用でまだまだ困難な面が大きいが、その中ではアデノ随伴ウイルスが安全性の点で優れていて、これを用いた発現型 siRNA の研究が進んでいる。しかし、この発現型 siRNA は、トランスジーンに通常 short-hairpin RNA (shRNA) を用いるが、shRNA が細胞内で siRNA にプロセスされる段階で、内因性の miRNA の前駆体 (pre-miRNA) から miRNA への成熟に必要な細胞内マシナリーと同一のものを使うため、競合が生じて miRNA 量が減少するという毒性が判明して、問題になっている。

siRNA 自身による副反応については、オフターゲット効果、インターフェロン誘導を含む免疫反応、および上述の shRNA 毒性などがすでに明らかになっている。それらの詳細は本特集に記載したので参照されたい。

siRNA 医薬品の開発状況は米国を中心に急速に進行しているので、そのリーディングカンパニーである Alnylam 社と Sirna Therapeutics 社についてその現状を簡単に説明する。Alnylam 社は Dr. Tuschl, Dr. Zamore をはじめとする RNAi 研究者が創立者となって RNAi の基本特許と 150 件以上の特許を取得保持している。コレステロール結合や SNALP などの非ウイルスベクターの方法で合成 siRNA の全身投与でサルにおいてその有用性を発表している。2006 年末には経鼻吸収のデリバリー方法でヒトで呼吸器合胞体ウイルス (RSV) の感染臨床試験を開始している。

Sirna Therapeutics 社は従来 C 型肝炎、B 型肝炎、糖尿病、喘息、がん、ハンチントン病など広範な対象疾患で RNAi 治療薬の開発に取り組んでおり、特に加齢性黄斑変性症に対して Allergan 社と共同で VEGF に対する化学修飾 siRNA を後眼窩部への直接投与する方法で Phase II に入った。また、カチオニックベクターを用いて近日中に C 型肝炎の Phase I に入る予定という。2006 年末にメガファーマの Merck 社に買収され、今後のさらなる発展が注目されている。

siRNA 医薬品開発状況については、本特集の巻末に詳細に編集部によりまとめたので、参照されたい。

siRNA 医薬の開発はポストゲノムの創薬の発展も相まって、特に難治性疾患において大きく期待されている。siRNA の安全性に対する問題点が次々に明らかになっているが、それらに対する化学修飾などの対応策も開発されおり、結局はい

かに低濃度で有効であるかがその解決策になりそうである。最大の課題はやはり生体へのデリバリー方法であろう。その良否が必要投与量を規定して安全性にも決定的な因子となろう。理論的に siRNA 医薬の将来性は極めて高いが、その最終的な siRNA 医薬の有用性はこれからというのが現状である。

☆

☆

☆

BIO INFORMATION

千里ライフサイエンスセミナー 第20回ブレインサイエンスシリーズ 小胞体ストレスと脳神経疾患

【概要】 小胞体ストレスは異常タンパク質を細胞内に蓄積させ、細胞に致命的の傷害を与える。近年、アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患や精神疾患の発症に、小胞体ストレスが密接に関わることが示唆されている。本セミナーでは、小胞体ストレスおよびその応答機構の仕組みと小胞体機能が破綻して生じる脳神経疾患発症の分子機序について取り上げる。

日時 平成19年9月28日(金) 10:00~17:00

場所 千里ライフサイエンスセンタービル5階ライフホール

コーディネーター

大阪大学大学院医学系研究科 遠山正彌

宮崎大学医学部解剖学講座 今泉和則

プログラム

1) 小胞体ストレス応答の多様性

宮崎大学医学部解剖学講座 今泉和則

2) 遺伝性神経変性疾患における小胞体ストレスの役割

マサチューセッツ大学医学部分子医学部門 浦野文彦

3) 虚血と小胞体ストレス

金沢大学医学系研究科脳医科学 小川 智

4) ニトロソ化ストレスによる小胞体ストレス惹起機構と神経変性疾患との関係

北海道大学薬学研究院薬理学研究室 上原 孝

5) パーキンソン病と小胞体ストレス

京都大学医学研究科臨床神経学 高橋良輔

6) 精神疾患における小胞体ストレス反応障害の意義

理化学研究所脳科学総合研究センター 加藤忠史

定員 300名

参加費 一般5,000円

問合せ先 (財)千里ライフサイエンス振興財団ブレインサイエンス係

〒560-0082 大阪府豊中市新千里東町1-4-2 千里ライフサイエンスセンタービル8階

TEL06-6873-2001/FAX06-6873-2002

E-mail: tkd-lsf@senri-ic.co.jp

siRNA の生体内における問題点

The Problems of siRNA in Living Body

久保寺隆行*¹ 横田隆徳*²

small interfering RNA (siRNA) の遺伝子発現抑制効果は非常に高く、遺伝性疾患・ウイルス性疾患においてその変異遺伝子、病原遺伝子自体を siRNA で治療する究極の遺伝子治療を目指した基礎研究が進行している。その研究の中で、実際の医療への応用に際して障害となるであろう off-target 効果・インターフェロン (IFN) 誘導・short-hairpin RNA (shRNA) 毒性などの問題点も指摘されるようになった。しかし同時に、それら問題点に対する回避策・解決策も見出されてきており、siRNA が近い将来、難治性疾患における治療法の新しい選択肢となることが非常に期待される。

1. はじめに

RNA interference (RNAi) は 2 本鎖 RNA (double-stranded RNA : dsRNA) 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、さらの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、現在世界中で激しい医薬品開発の競争が展開されている。

RNAi を生体内に人工的に誘導するには化学合成 siRNA (small interfering RNA) や siRNA 発現ベクターをツールとして利用し、さらにこれらを生体にデリバリーさせる方法として、siRNA の場合にはカチオニックリポソームやアテロコラーゲンなどの担体が、siRNA 発現ベクターの

場合にはアデノ随伴ウイルスやアデノウイルス、レンチウイルスなどのウイルスベクターが用いられ実際に有効性が報告されている¹⁻⁵⁾。

しかし、siRNA の研究開発が進むにつれ核酸医薬品として用いる場合の問題点も幾つか浮き彫りになってきた。本稿では、これら siRNA の医療への応用を試みる際の問題点について概説したい。

2. siRNA の配列特異性

2.1 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大きな問題となる。

*¹Takayuki Kubodera 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 (神経内科) 研究員

*²Takanori Yokota 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 (神経内科) 准教授

Jackson⁶⁾らの検討では、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、さらに、パッセンジャー鎖の直接効果によっても非標的遺伝子の発現抑制が生じることが示された。また、最近のバイオインフォマティクス解析により off-target 効果を受ける遺伝子群は3'側の非翻訳領域(UTR)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^{7, 8)}。これは標的遺伝子の3'側のUTRに結合しその発現を抑制するmicroRNA(miRNA)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~7(8)塩基目の6(7)塩基(miRNAのシード領域に相当)(図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にこのシード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、シード領域は6(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シード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⁹⁾。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(図1)。

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。

2.2 変異遺伝子特異的な発現抑制

遺伝性疾患や癌遺伝子をsiRNAで治療しようとした場合、疾患の発症に対して優性に働く変異遺伝子のみを選択的に発現抑制し、正常遺伝子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、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¹⁰⁾。

現在のところ、1塩基対のミスマッチを識別させるにはミスマッチがシード領域中に位置していない場合に比較的良好な識別効果が得られ、ガイド鎖の5'から10および16塩基目の位置で、特にプリン:プリンミスマッチが最も効果的であると報告された¹¹⁾(図1)。しかし、例えば遺伝性疾患の中でpresenilin 1(PS1)遺伝子変異による家族性アルツハイマー病やsuperoxide dismutase 1(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良いsiRNAをデザインすることは困難である。

そこで筆者らは、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、その有効性を神経変性疾患の一つであるポリ

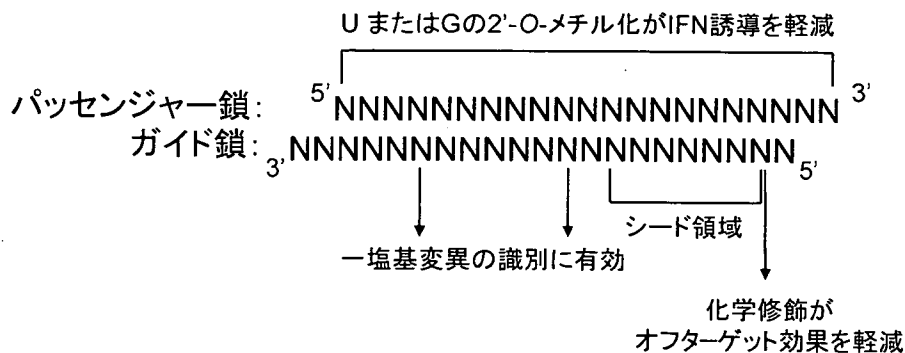


図1 siRNA配列上の重要なヌクレオチドの位置

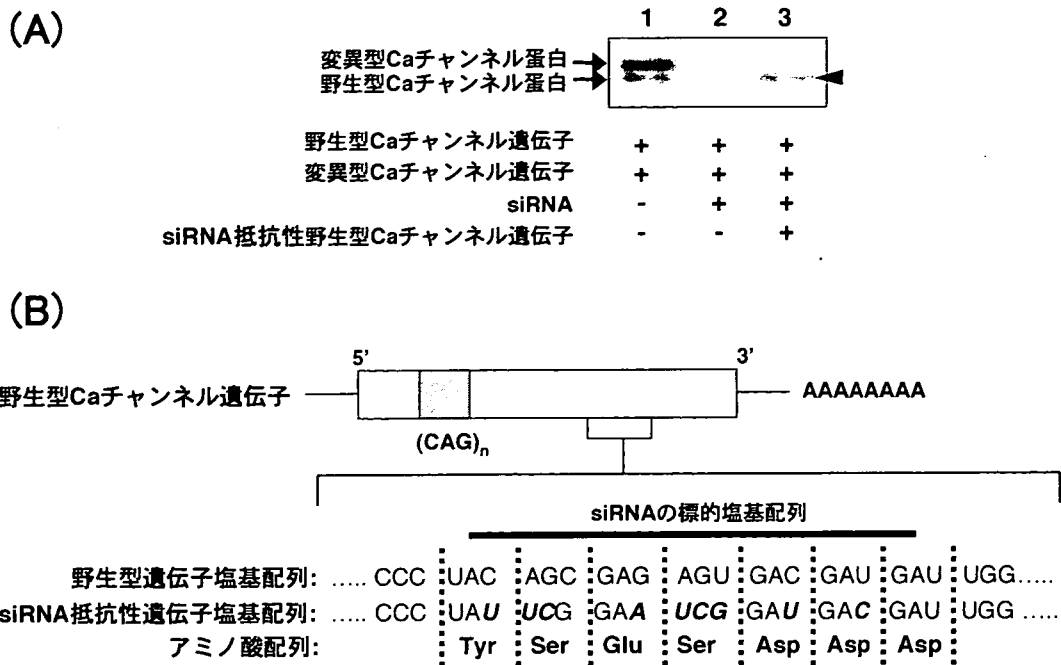


図2 いかなる変異に対しても変異特異的な RNAi 法

ポリグルタミン病の一つである脊髄小脳失調症6型 (SCA6) は α 1A カルシウムチャンネル遺伝子内の CAG リピートの伸長によって発症する。このように繰り返し配列の長さが変わる変異である場合は、伸長した繰り返し配列そのものに対し siRNA をデザインすることは困難である。そこで、(A)野生型および変異型 Ca チャンネル遺伝子の発現を野生型・変異型を問わず効率の良い siRNA によりいったん抑制する (レーン2) 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 Ca チャンネル遺伝子を発現させることで変異型遺伝子の発現は抑制されたまま野生型タンパクが保持された (レーン3, 矢頭)。(B) siRNA 抵抗性遺伝子の作製は siRNA 標的塩基配列の中で、そのコドンよりコードされるアミノ酸は変えずに変換できる塩基を全て置換することによって (イタリック体塩基) 作製した。
(文献 12 より改変, 引用)

グルタミン病を対象に証明した¹²⁾ (図2)。現在、その *in vivo* での有効性を検証中である。

3. インターフェロン誘導

哺乳動物系では、30 塩基を超える長さの2本鎖 RNA の細胞内への導入はインターフェロン (IFN) 応答遺伝子である PKR (dsRNA-dependent protein kinase) や OAS (2' 5' -oligosynthetase) を活性化する結果、非特異的な翻訳抑制や RNA の分解を引き起こし、細胞障害をもたらしてしまうため RNAi の利用の大きな妨げとなっていた。しかし 2001 年にブレークスルーがあり、RNAi 機構の中間産物である 21 塩基長の短い RNA (siRNA) を直接用いることでこれらの IFN 応答を回避し、RNAi 効果の特異的に得ることが可能となった¹³⁾、と従来考えられてきた。

ところが最近、そのような短い2本鎖 RNA でも *in vitro*, *in vivo* において IFN 応答を誘導することが相次いで報告されている^{14~17)}。細胞が siRNA を感知し免疫応答を誘導する機構には2種類知られており、細胞内に導入された siRNA は、1つは Toll-like receptor (TLR) を介する経路、もう1つは retinoic acid inducible gene I (RIG-I) を介する経路により認識され IFN 応答が誘導される (図3)。

3.1 TLR

TLR は、膜タンパク質で細胞表面やエンドソームにおいて病原体構成成分を認識し自然免疫系を活性化する必須の受容体である¹⁸⁾。TLR は現在までにヒトで 10 種類、マウスで 13 種類それぞれ同定されており、その中で TLR3, TLR7,

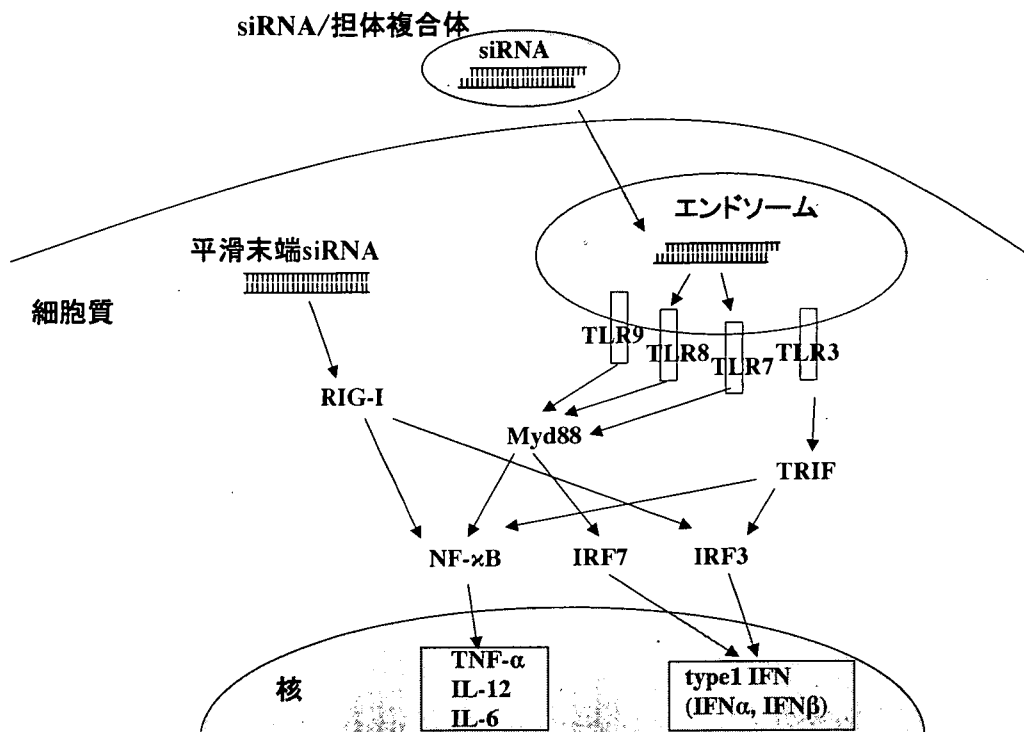


図3 siRNAによるIFN誘導

siRNA をカチオニックリポソームなどの担体を用いて細胞内に導入し、エンドサイトーシスによって取り込まれた場合は、siRNA が TLR7, 8 を介して IFN を誘導する。また、平滑末端 siRNA が細胞質内に導入された場合は RIG-I を活性化し IFN を誘導する。

TLR8, TLR9 は細菌またはウイルス由来の核酸抗原を認識し、細胞内での分布はエンドソーム/リソソームに局在している。

siRNA を細胞内に導入、とりわけカチオニックリポソームをベクターとして用いて導入した場合は、IFN α 産生能の高い形質細胞様樹状細胞 (pDC) にエンドサイトーシスによって取り込まれた siRNA がエンドソーム内の主として TLR7 (マウス), TLR8 (ヒト) を介して IFN の産生が誘導されることが示された¹⁴⁾。この siRNA により誘導される IFN 産生には配列依存性があり、例えばセンス鎖に UGUGU や GUCCUUCAA などの IFN 刺激モチーフをもつ siRNA 配列が極めて IFN 誘導を引き起こしやすいなど、siRNA の配列によって IFN を誘導しやすい配列、誘導しにくい配列が存在することも同時に明らかとなった^{14, 15)}。

TLR を介する IFN 誘導を回避する方法としては、上記で述べたように siRNA による IFN 誘導

には配列依存性があることから複数の siRNA 配列から IFN 誘導を起こしにくい配列をスクリーニングする方法がまず挙げられる。しかし、まだどのような塩基配列が IFN 誘導に関与しやすいかという明確なルールは定まっていないためこの方法では非常に効率が悪い。

他の IFN 回避の方法として最近、これまで RNA の安定化を目的として試みられてきた siRNA を構成する核酸への 2'-O-メチル化、2'-フルオロ化、locked nucleic acid (LNA) などの化学修飾が IFN 誘導の軽減にも有用であることが見出された^{14, 19, 20)}。これらの化学修飾は、修飾を施す siRNA 配列には非依存性に化学修飾を施すことで IFN 軽減効果が認められる。ただ、化学修飾を施し過ぎると RNAi 効果を減弱させてしまう恐れがあるので、化学修飾を加えるヌクレオチドの数を適切に保つことが必要である。最近の Judge らの報告によれば、siRNA のパッセンジャー鎖の G または U を 2'-O-メチル化するだ

けでも IFN 誘導はほとんど回避でき、しかも RNAi 効果は本来の siRNA の活性を保つことができたと報告している²⁰⁾。

3.2 RIG-I

RIG-I は、細胞質内でのウイルスの侵入を察知する分子として近年発見され、ウイルス構成成分である 2 本鎖 RNA を認識し IFN を誘導する²¹⁾。TLR がエンドサイトーシスによって取り込まれた微生物由来の核酸成分を認識するのに対し、RIG-I はウイルス感染により細胞質内に生成された 2 本鎖 RNA を認識する。最近、この RIG-I が siRNA による IFN 誘導に関与していることが報告された²²⁾。

この RIG-I による siRNA の認識には siRNA の塩基配列には依存せず siRNA の骨格が関与している。2 塩基 overhang をもつ siRNA と平滑末端の siRNA と比較すると、両者はいずれも RIG-I に結合するが、平滑末端の siRNA のみが RIG-I を活性化し IFN を誘導することが観察され、siRNA による RIG-I の活性化にはその 2 本鎖 RNA の構

造に依存していることが示された。short-hairpin RNA (shRNA) 発現ベクターを用いた場合には、細胞質内に発現した shRNA が RIG-I により認識され IFN を誘導することが懸念されるが、shRNA 発現ベクターを免疫系細胞に導入しても IFN 誘導は認められない²³⁾。これは核から細胞質内に移行した shRNA は、Dicer により速やかにプロセスされ 2 塩基 overhang をもつ siRNA が生成されるからであると考えられる。

4. shRNA 毒性

最近、shRNA 発現アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを経静脈的にマウスに全身性投与する実験系において致命的な肝障害が認められたという報告がなされた²⁴⁾。この肝障害には配列依存性はなく、導入した shRNA の発現量との間に相関が認められ、障害を受けた肝臓では複数の miRNA の発現が低下していた。

miRNA とは 22 塩基前後の内在性に存在する機能性低分子 RNA で、翻訳レベルでタンパク質の発現を抑制することで細胞の基本的な遺伝子発

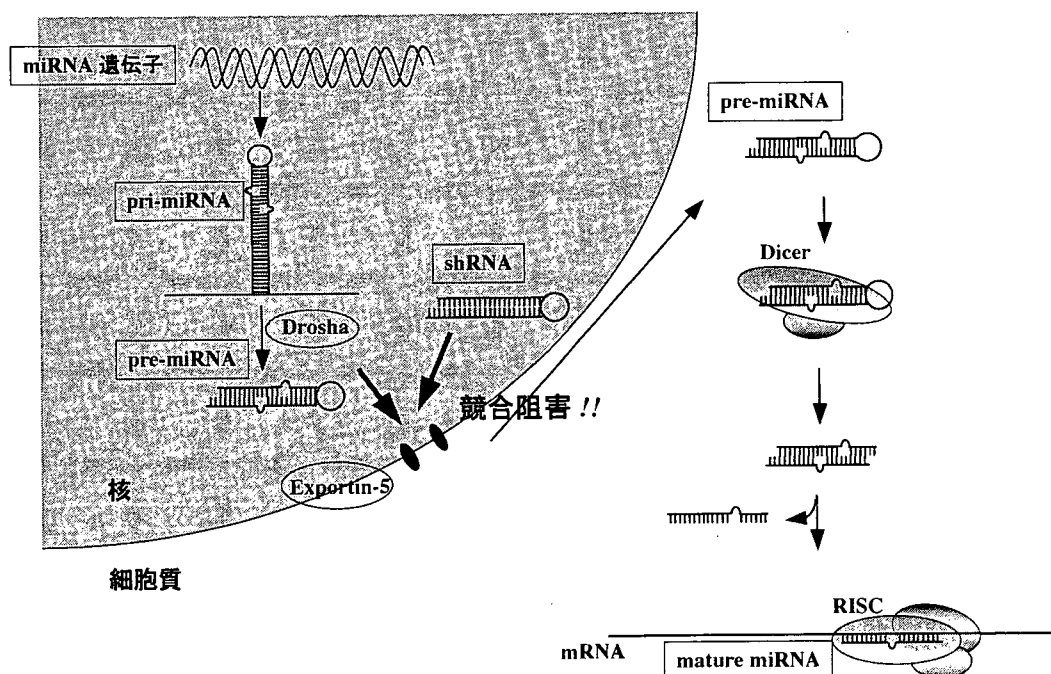


図4 過剰 shRNA による miRNA プロセス障害

人工的に核内に shRNA を過剰に発現させた場合、miRNA の前駆体である pre-miRNA の exportin-5 を介する核から細胞質への移行を競合的に阻害する結果、成熟型 miRNA の発現が低下してしまう。

現調節を行っており、主に細胞の分化・増殖やアポトーシスを制御する役割を担っていると推測されている²⁵⁾。

ほ乳動物において、miRNAの前駆体 (pre-miRNA) と shRNA は exportin-5 という共通の担体を通じて核から細胞質へ移行するため、核内に過剰に発現した shRNA が exportin-5 による pre-miRNA の細胞質への移行を競合的に阻害する結果 miRNA へのプロセスが障害され、肝毒性に関与したことが示唆された²⁴⁾ (図4)。筆者らも、shRNA 発現 AAV8 型ベクターのマウスへの全身性投与により過剰な shRNA を発現した場合には重篤な肝障害が生じることを確認している。shRNA 毒性の機序の詳細は明らかでないが、過剰な shRNA の発現は細胞毒性を誘導する可能性があるため、shRNA 発現ベクターを用いる際は、ただ shRNA を多く発現させて RNAi 効果を高めさえすれば良いのではなく、効率の良い shRNA をデザインし、少ない shRNA の発現で RNAi 効果が得られるように工夫する必要がある

5. おわりに

siRNA の有効性は高く医療への応用を目的とした研究が急速に展開されている。本稿で挙げたいくつかの問題点はあるが、それに対する解決法も提案されてきており、siRNA が近い将来、難治性疾患における治療法の新しい選択肢となることが非常に期待される。

文 献

- 1) Zimmernann, T. S., Lee, A. C. H., Akinc, A., Bramlage, B., Bumcrot, D., Fedoruk, M. N., Harborth, J., Heyes, J. A., Jeffs, L. B., John, M., Judge, A. D., Lam, k., McClintock, K., Nechev, L. V., Palmer, L. R., Racie, T., Rohl, I., Seiffert, S., Shanmugam, S., Sood, V., Soutcchek, J., Toudjarska, I., Wheat, A. J., Yawoski, E., Zedalis, W., Koteliansky, V., manoharan, M.,

- Vornlocher, H-P., MacLacian, I., *Nature*, **441**, 111-114 (2006)
- 2) Takeshita, F., Minakuchi, Y., Nagahara, S., Honma, K., Sasaki, H., Hirai, K., Teratani, T., Namatame, N., Yamamoto, Y., Hanai, K., Kato, T., Sano, A., Ochiya, T., *Proc. Natl. Acad., Sci. USA*, **102**, 12177-12182 (2005)
- 3) Xia, H., Mao, Q., Eliason, S. L., Harpe, S. Q., Martins, I. H., Orr, H. T., Paulson, H. L., Yang, L., Kotin, R. M., Davidson, B. L., *Nat. Med.*, **10**, 816-820 (2004)
- 4) Gou, D., Narasaraju, T., Chintagari, N. R., Jin, N., Wang, P., Liu, L., *Nucleic Acids Res.*, **32**, e134 (2004)
- 5) Morris, K. V., Rossi, J. J., *Gene Therapy*, **13**, 553-558 (2006)
- 6) Jackson, A. L., Bartz, S. R., Schelter, J., Kobayashi, S. V., Burchard, J., Mao, M., Li, B., Cavet, G., Linsley, P. S., *Nature Biotech.*, **21**, 635-637 (2003)
- 7) Brmingham, A., Anderson, E. M., Reynolds, A., Isley-Tyree, D., Leake, D., Fedorov, Y., Baskerville, S., Maksimova, E., Robinson, K., Karpilow, J., Marshall, W. S., Khvorova, A., *Nat. Methods*, **3**, 199-204 (2006)
- 8) Jackson, A. L., Burchard, J., Schelter, J., Chau, B. N., Cleary, M., Lim, L., Linsley, P. S., *RNA*, **12**, 1179-1187 (2006)
- 9) Jackson, A. L., Burchard, J., Leake, D., Reynolds, A., Schelter, J., Guo, J., Johnson, J. M., Lim, L., Karpilow, J., Nichols, K., Marshall, W. S., Khvorova, A., Linsley, P. S., *RNA*, **12**, 1197-1205 (2006)
- 10) Amarzguioui, M., Holen, T., Babaie, E., Prydz, H., *Nucleic Acids Res.*, **31**, 589-595 (2003)
- 11) Schwartz, D. S., Ding, H., Kennington, L., Moore, J. T., Schelter, J., Burchard J., Linsley, P. S., Aronin, N., Xu, Z., Zamore, P. D., *PLoS Genetics.*, **2**, e140 (2006)
- 12) Kubodera, T., Yokota, T., Ishikawa, K., Mizusawa, H., *Oligonucleotides*, **15**, 298-302 (2005)
- 13) Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschel, T., *Nature*, **411**, 494-498 (2001)
- 14) Hornung, V., Guenther-Biller, M., Bourquin, G.,

- Ablasser, A., Schlee, M., Uematsu, S., Noronha, A., Manoharan, M., Akira, S., Fougerolles, A., Endres, S., Hartmann, G., *Nat. Med.*, **11**, 263-270 (2005)
- 15) Judge, A., Sood, V., Shaw, J. R., Fang, D., McClintock, K., MacLaclan, I., *Nat. Biotech.*, **23**, 457-462 (2005)
- 16) Sioud, M., *J. Mol. Biol.*, **348**, 1079-1090 (2005)
- 17) Marques, J. T., Williams, B. R. G., *Nat. Biotech.*, **23**, 1399-1405 (2005)
- 18) Akira, S., Takeda, K., *Nat. Rev. Immunol.*, **4**, 499-511 (2004)
- 19) Morrissey, D. V., Lockridge, J. A., 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, C. S., Jeffs, C. S., Judge, A., MacLachlan, I., Polisky, B., *Nat. Biotech.*, **23**, 1002-1007 (2005)
- 20) Judge, A., Bola, G., Lee, A. C. H., MacLaclan, I., *Mol. Therapy*, **13**, 494-505 (2006)
- 21) Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., Fujita, T., *Nat. Immunol.*, **5**, 730-737 (2004)
- 22) Marques, J. T., Devosse, T., wang, D., Zamanian-Daryoush, M., Serbinowski, P., Hartmann, R., Fujita, T., Behlke, M. A., Williams, B. R. G., *Nat. Biotech.*, **24**, 559-565 (2006)
- 23) Robbins, M. A., Li, M., Leung, I., Li, H., Boyer, D. V., Song, Y., Behlke, M. A., Rossi, J. J., *Nat. Biotech.*, **24**, 566-571 (2006)
- 24) Grimm, D., Streetz, K. L., Jupling, C. L., Storm, T. A., Pendey, K., Davis, C. R., Marion, P., Salazar, F., Kay, M. A., *Nature*, **25**, 537-541 (2006)
- 25) Ambros, V., *Nature*, **431**, 350-355 (2004)

☆

☆

☆

BIO INFORMATION

オルガテクノ 2007 出展社募集

「オルガテクノ 2007」では、注目を集める有機 EL やフレキシブルディスプレイの新展開、ブロードバンド社会を支える液晶や有機系光通信部材等の光・電子機能材料・デバイスでの最新状況や、高機能・生体由来の有機材料開発事例、バイオ・メディカル分野や自動車・エネルギー分野での応用展開の他、基盤となる評価・計測の最新機器の展示等を紹介する。

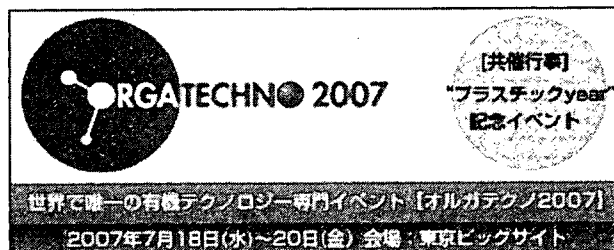
本展示会への出展要領は以下のとおり。

会 期 2007年7月18日(水)~7月20日(金)

会 場 東京ビッグサイト

主 催 有機テクノロジー実行委員会

詳しくは、オルガテクノ 2007 ホームページへ ([http://](http://www.orga-techno.com/)



www.orga-techno.com/。

問合せ先 日本イージェイケイ(株)

〒107-0052 東京都港区赤坂 4-9-17 赤坂第一ビル

TEL03-5772-1321/FAX03-5772-1324

E-mail: tahira@ejk-japan.co.jp

URL: <http://www.ejk-japan.co.jp/>

ズムが末梢のみならず SCN でも IFN により障害されることが明らかとなった⁸⁾。一方、IFN により誘導される時計機能障害は投薬時刻を考慮することで回避できる。すなわち、薬物が時計機能の異常を引き起こす可能性があること、そしてこのような有害反応は投薬スケジュールを最適化することで避けることができる。

光刺激のみならず種々の薬物が体内時計の時計遺伝子に作用し、生体リズムの位相を変化させる^{9,10)}。また、摂食条件を繰り返し操作することにより、末梢での時計遺伝子の日周リズムが摂食時間帯に応じて変化する¹¹⁾。そのため、摂食条件や薬物で体内環境を操作することにより、積極的な時間治療を展開できる。

おわりに

以上のように、体内時計の分子機構を考慮することで、生体リズムマーカーのモニタリング、薬物

誘発リズム障害の防止、および生体リズムの操作を基盤にした時間治療が効率よく行われることが期待される。

- 1) Ohdo, S.: *Drug Safety*, **26**(14): 999-1010, 2003.
- 2) Jin, X. et al.: *Cell*, **96**: 57-68, 1999.
- 3) Toh, K. L. et al.: *Science*, **291**: 1040-1043, 2001.
- 4) Maemura, K. et al.: *J. Biol. Chem.*, **275**: 36847-36851, 2000.
- 5) Koyanagi, S. et al.: *Cancer Res.*, **63**: 7277-7283, 2003.
- 6) Nakagawa, H. et al.: *Cancer Res.*, **64**: 8328-8333, 2004.
- 7) Gachon, F. et al.: *Cell Metab.*, **4**: 25-36, 2006.
- 8) Ohdo, S. et al.: *Nat. Med.*, **7**: 356-360, 2001.
- 9) Shigeyoshi, Y. et al.: *Cell*, **91**: 1043-1053, 1997.
- 10) Viyoch, J. et al.: *J. Biol. Chem.*, **280**(8): 6309-6315, 2005.
- 11) Damiola, F. et al.: *Genes Dev.*, **14**: 2950-2961, 2000.

大戸茂弘/Shigehiro OHDO
九州大学大学院薬学研究院薬剤学分野

で急速に進んでいるが、遺伝性疾患についてもとくに神経変性疾患を中心に成果がでている²⁾。

常染色体優性遺伝の単一遺伝子疾患の遺伝子治療

単一遺伝子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の消失または低下による場合(loss of function)と、変異遺伝子や変異蛋白があら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。常染色体優性遺伝の場合、変異アリルから発現した変異蛋白が何らかの毒性(gain of toxic function)をあら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)、多くのポリグルタミン病、APP や PSI 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、その機序の如何にかかわらず

神経内科学

siRNAを用いたALSの遺伝子治療

Gene therapy of ALS with siRNA

RNA 干渉(RNAi)は二本鎖 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。細胞内に導入された二本鎖 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 21~24 mer の短い 3' 突出型の二本鎖の short interference RNA (siRNA) に分解される。siRNA の二本鎖のうち、ガイド鎖(アンチセンス鎖)のみの一本鎖となって他の蛋白質を伴って RNA 蛋白質複合体である RISC 複合体(RNA-induced silencing complex)を構成する。そして、RISC 複合体がガイド鎖に相補的な配列をもつ標的 mRNA にアクセスして分解する。

RNAi の中間産物である siRNA¹⁾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

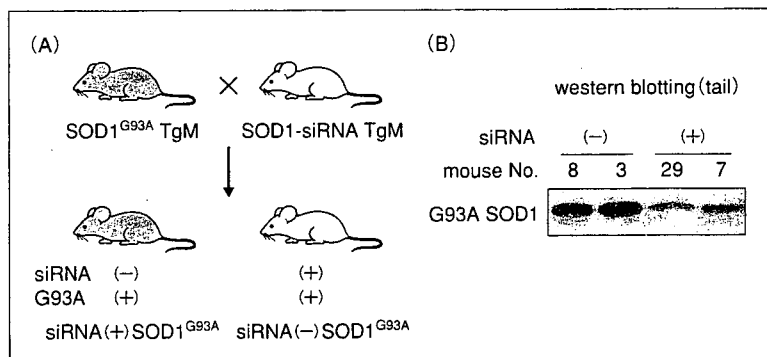


図 1 SOD1G93Aトランスジェニックマウスの遺伝子治療(文献³⁾より改変)

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かけ合わせるにより(A)、変異 SOD1 蛋白の発現を 80%以上抑制することに成功した(B)。

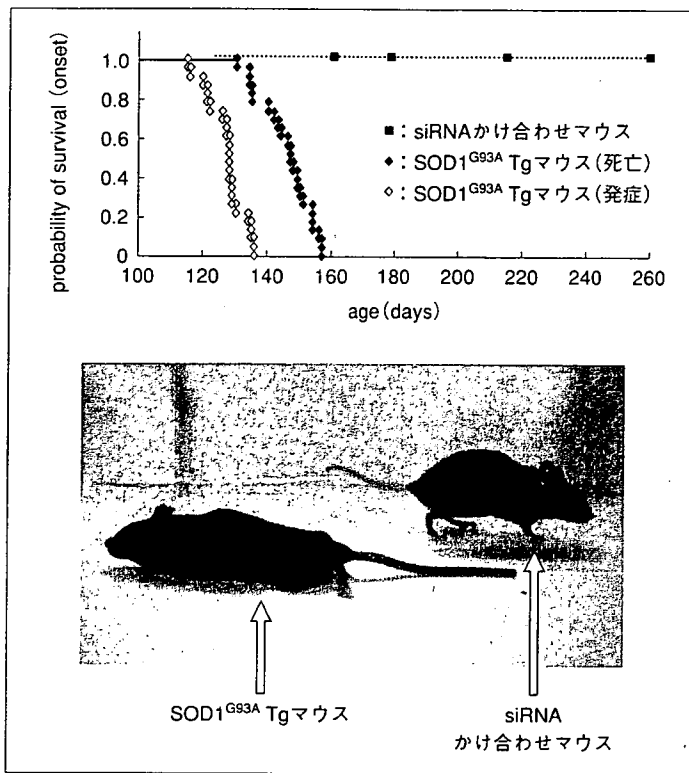


図 2 SOD1G93Aトランスジェニックマウスの遺伝子治療の経過 (文献³⁾より改変)
6月齢の時点で ALS 症状の発症は完全に抑制されている。

発症，進行を防止することが期待できるわけである。

RNAiによるALSのモデルマウスの治療

しかし，RNAi という方法で本当に遺伝性神経変性疾患の変異遺伝子を抑制し疾患の発症を抑制できるかという命題に答えるには，siRNA の神経系へのデリバリーという大きな障害がある。そこで，著者らは SOD1 に対する siRNA を過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製して，これを ALS のモデルマウスである G93A 変異 SOD1 トランスジェニックマウスとかけ合わせ，神経系のすべての変異 SOD1 蛋白の発現を抑制して上記の問題に対する答えを出そうとした。まず，U6 プロモーターの支配下にステム型の short hairpin RNA (shRNA) を発現する DNA 断

片を ES 細胞に導入して，内因性の SOD1 が抑制された ES クローンを選択した。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成した。このマウスは全身で内因性の SOD1 が 75~98% 以上抑制されていた³⁾。このマウスと ALS のモデルマウスである G93A SOD1 トランスジェニックマウスとかけ合わせるにより中枢神経の変異 SOD1 蛋白の発現を 80% 以上抑制することに成功した(図 1)。この効果により，9 月齢の時点で ALS 症状の発症は完全に抑制されていた(図 2)。

同様に SOD1 に対する shRNA 発現レンチウイルスを直接脊髄に注入することや，骨格筋に注入して運動ニューロンに逆行性に 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^{4,5)}。

今後の課題

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，不妊の副作用がある。一般に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。変異が 1 塩基のみ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⁶⁾。しかし，SOD1 や PS1 の点変異は 100 種類以上知られており，そのすべてに特異的で効率な siRNA がデザインできるわけではない。著者らは，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⁷⁾，現在その *in vivo* での有効性を検証中である。

おわりに

siRNA の核酸医薬としての臨床応用の研究には，中枢神経系への導入方法が神経疾患治療の大きな障害になっている。その点で最近，化学修飾した合成 siRNA を直接，脳室内に 1~2 週間持続注入するなどの新しいデリバリー方法も急速に進歩している⁸⁾。非常に近い将来に，ALS の新しい治療法の開発に siRNA の利用が突破口になると期待している。

- 1) Elbashir, S. et al. : Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411** : 494-498, 2001.
- 2) Davidson, B. L. and Paulson, H. L. : Molecular medicine for the brain : silencing of disease genes with RNA interference. *Lancet Neurol.*, **3** : 145-149, 2004.
- 3) Saito, Y. et al. : Transgenic small interfering RNA halts amyotrophic lateral sclerosis in a