

mouse model. *J. Biol. Chem.*, 280: 42826-42830, 2005.

- 4) Ralph, G.S. et al.: Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nat. Med.*, 11: 429-433, 2005.
- 5) Raoul, C. 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.
- 6) Yokota, T. et al.: siRNA-based inhibition of superoxide dismutase expression: potential use in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 314: 283-291, 2004.

- 7) Kubodera, T. et al.: New RNAi strategy for selective suppression of mutant allele in polyglutamine disease. *Oligonucleotides*, 15: 298-302, 2005.
- 8) Thakker, D.R. 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.

横田隆徳 / Takanori 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)

フルエンザ”が含まれ、ワクチンによる発病防止効果が過小評価され、有効率はもっと高い可能性もあると報告されている。接種後48時間以内の副反応調査では、37.5°C以上の発熱2.7~4.6%、38.0°C以上1.3~2.8%、39.0°C以上0.2~1.4%であった。接種局所の変化は、発赤10.6~18.9%、硬結7.6~12.0%、腫脹6.6~11.4%で、いずれも軽微であった。発熱の頻度が高齢者より高いが、これも小児は発熱性疾患に罹患する頻度が高いためとも考えられる。

疫学

## インフルエンザワクチンの有用性

—わが国の不活化インフルエンザワクチンは、どの程度の予防効果が期待できるのか?

*Clinical usefulness of inactivated influenza vaccine*

### インフルエンザはワクチンで予防できるのか?

流行シーズンにはだれもが罹患しうるインフルエンザを、ワクチンにより予防できるのか、肺炎の合併や死亡など重症化を防げるのか、それは皆が注目する点である。ウイルス抗原変異への対処、粘膜免疫獲得など、現行の注射不活化ワクチンに限界が存在することは事実である。

ワクチン有用性の評価には、免疫原性、臨床的予防効果、副反応の頻度や程度が関連する。わが国のこれまでの研究結果をもとに概説する。

### 高齢者の死亡防止効果80%以上、発症予防効果30~50%台、副反応はおおむね軽微である

65歳以上と60歳以上で基礎疾患を有する者は、予防接種法に基づいたインフルエンザワクチンの接種対象(二類)である。この法制化は、全国多施設共同研究の結果<sup>1)</sup>に基づいたものであった。65

歳以上の施設入所者を対象にワクチン1回接種で解析した結果、予防接種を受けた群では死亡リスクは0.2以下(有効率80%以上)、発病リスクは0.45~0.66(有効率34~55%)に減少していた。これはアメリカの高齢者における効果<sup>2)</sup>とほぼ一致する。副反応調査では、接種後48時間以内に37.5°C以上の発熱(0.8%)、発疹(0.2%)、接種局所の発赤(13.3%)、腫脹(4.5%)、痛み(2.3%)などが観察されたが、いずれも軽微であった<sup>1)</sup>。

### 小児でも有意な発症予防効果あり、有効率は20%台以上

6歳未満児をワクチン接種群と非接種群にエンタリーし、接種群は4週間隔で2回接種した<sup>3)</sup>。3シーズン継続して検討した結果、各シーズンとも統計学的有意差をもって接種群の発熱リスクが0.75~0.78に減少していた(有効率22~25%)。結果指標が“発熱”であり、感染性疾患に罹患しやすい小児の冬季発熱者には“非イン

### 低年齢児では効果が乏しい可能性あり

小児における研究で年齢別解析を行った結果、1歳未満乳児では接種による有意な発症予防効果が認められなかった<sup>3)</sup>。登録された1歳未満児は少数であり、結論には至れないとしているが、乳児における効果が乏しい可能性が指摘された。平成14年(2002)度の解析<sup>4)</sup>でも、2歳未満の児ではワクチン接種による有効性が検出されなかった。過去に免疫学的プライミングを受けていない低年齢児では、不活化インフルエンザワクチンによる予防効果が乏しいのかもしれない。

### わが国のインフルエンザワクチン、これまでのあゆみと今後

1960年代、小中学校の学童集団が感染増幅の場と考えられ、インフルエンザ集団接種が開始された。しかしその後、学校での集団接種で流行は阻止できない、ワクチンの有効性が低いなどの論議があり、接種率は低迷した。1994年には予防接種法から外れ、任意接種のワクチンとなった。一方、諸外国では高齢者や基礎疾患を有するハイリスク者への接種が勧告される背景のなかで、個人防衛の観点から接種方式の見直しを求める

## 〈特集 学会賞記念論文：日本神経免疫学会賞〉

### 脳血管内皮細胞をターゲットとした siRNA を用いた遺伝子治療の可能性

横田 隆徳

#### Gene therapy with siRNA targeting brain endothelial cells

Takanori Yokota, MD

##### Abstract

Short interfering RNA (siRNA) is much more effective than other functional nucleic acids such as antisense and ribozyme, and has been expected to be useful for application of gene therapy to viral diseases, cancer, and hereditary diseases. Brain endothelial cells play an important role in mediating pathological process of autoimmune neurological diseases, and the regulation of brain endothelial cells function is beneficial for treatment of these diseases. Although there are still many problems such as delivery method and off-target effect, siRNA has a potential for the development of gene therapy for neuroimmunological diseases.

**Key words;** siRNA; brain endothelial cells; RNAi; viral vector; cationic vector

##### はじめに

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アンチセンス核酸の  $10^{37}$  倍、リボザイムの  $10^{25}$  (自験) 高いと言われている。しかもその配列特異性も高く、医療分野における臨床応用については発見当初から大きく期待されている。ここでは、急速に進んでいる siRNA の核酸医薬開発について免疫性神経疾患への応用の可能性とその問題点について概説したい。

##### 1. 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 short interference RNA (siRNA) に分解される。siRNA のパッセンジャー鎖 (センス鎖) は Ago2 によりその中央

部で切断されて、ガイド鎖 (アンチセンス鎖) のみがヘリケースなどのいくつかの蛋白質から成る RNA 蛋白質複合体である RISC 複合体 (RNA-induced silencing complex) を形成する。RISC 複合体がガイド鎖に相補的な配列を持つ標的 mRNA にアクセスして、その中央で分解する。しかし、哺乳動物における 2 本鎖 RNA の導入は PKR や 2' 5' oligosynthetase の活性化による非特異的な翻訳抑制や RNA の分解を引き起こし、ホストの細胞の死んでしまうため、分子生物学的手法としても遺伝子治療の方法としても RNA (RNAi) 干渉の利用の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、siRNA の配列に特異的な遺伝子発現抑制が可能となった<sup>1)</sup>。さらに、siRNA 配列を短い 9mer のループ配列でつないだ stem 型のパンドロミックな配列を 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作成も可能になった。

### 1) 変異遺伝子特異的な siRNA

がん遺伝子や遺伝性疾患を siRNA で治療しようとした場合、変異遺伝子のみを選択的に発現抑制して、野生型には作用しないことが望ましい。siRNA と基質 RNA との特異性については、siRNA の発見当初は 5' 端から 9, 10, 11 塩基目の中央部位の変異が失活化に最も有効とされた<sup>2)</sup>。5' 側は基質との結合より RISC との関わりから基質を切断するルーラー (物差し) 効果があるといわれ<sup>3)</sup>、3' 側よりのミスマッチほうがより失活効果が強いとの報告がされ<sup>4)</sup>、現在のところ siRNA の 5' 端から 9-16 塩基目にミスマッチをデザインすると変異遺伝子の識別が最もよいと考えられている (図 1)。

### 2) Off-Target 効果などの副反応

siRNA を臨床応用する際に、off-target 効果、すなわち、ターゲットとした遺伝子以外に、用いた 19 塩基の siRNA に部分的にホモロジーのある別の遺伝子の発現を抑えてしまういわゆる交叉反応が報告されている<sup>5)</sup>。全般にその特異性はアンチセンスなどに比較してかなり少ないが、それでも多くの遺伝子の発現が影響を受ける可能性がある。Jackson らの検討では<sup>6)</sup>、通常 19 塩基中 15 塩基以上で、最低では 11 塩基のホモロジーのある遺伝子において影響があったと報告された。今後この off-target 効果の評価とその回避は重要な問題である。

### 3) siRNA による脳血管内皮の遺伝子発現抑制

接着分子を含む脳血管内皮に発現するシグナル分子は

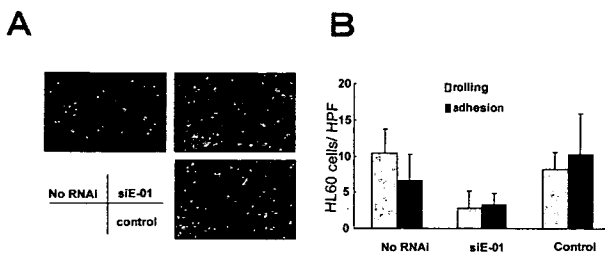


図 1 siRNA を用いた E-セレクトインの発現抑制による白血球のローリングや接着を減少。カバースリップ上に敷き詰めたカバースリップに HUVEC を敷き詰めて培養して、E-セレクトインに対する siRNA (siE-01) を導入したものを用意した。これを TNF  $\alpha$  で刺激後 4 時間に HL-60 細胞を吹き付けてビデオを撮影してそのローリングと接着を評価した (A)。HL-60 細胞のローリングと接着は siRNA なしやコントロール siRNA (scE-01) に比較して siRNA (siE-01) を導入した HUVEC では有意に減少した (B)。[文献 6 から転載]

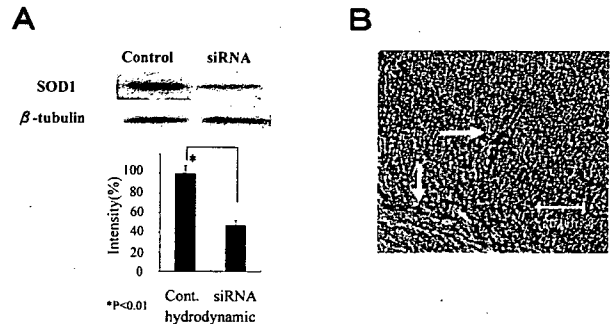


図 2 ハイドロダイナミクス導入法によるマウスの脳血管内皮の内因性遺伝子の発現抑制。マウスへ SOD1 に対する siRNA 50  $\mu$ g 発現をハイドロダイナミクス導入法で尾静脈から注射後、脳血管内皮を含む大脳の小血管文画の内因性 SOD1 の発現が抑制されたことを示された (A)。[文献 9 から転載] さらに、Cy3 ラベルした siRNA (赤) を同様の方法で導入後マウスの大脳の血管内皮付近にそのシグナルを認めた (B)。

免疫性神経疾患の病態形成に重要な役割をはたしている。我々は白血球と内皮細胞の初期の相互作用 (ローリング現象) に重要な働きをされるといわれているセレクチンファミリーの 1 つで血管内皮に発現する E-セレクトインをターゲットとした。In vitro アッセイ系として、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の内因性 E-セレクトインの発現を siRNA により抑制することにより、TNF  $\alpha$  による刺激後の HUVEC への白血球のローリングや接着を減少させることを示した<sup>6)</sup>。

siRNA は細胞質で RISC に取り込まれて切断活性を発揮することから、siRNA のデリバリーは細胞膜さえ越えればよく、遺伝子治療によく使われる発現型 DNA ベクターのように核にアクセスする必要がない。McCaffrey<sup>7)</sup> らはマウスの尾静脈から 10-50g の合成 siRNA を体重の 5-10% の大量の PBS 溶液で 5-7 秒の短時間で注入するハイドロダイナミクス導入法で、マウスの肝細胞に siRNA を導入することに成功した。さらに最近このハイドロダイナミクス導入法で導入された Fas<sup>8)</sup> や caspase8 に対する合成 siRNA で、マウスに誘発された急性肝炎による死亡率を低下させたとの報告がされた。我々はこの方法を用いてマウスの脳血管内皮を含む大脳の小血管分画の内因性遺伝子である SOD1 の発現を抑制することを示した (図 2)。さらに、脳血管内皮細胞の内因性遺伝子の発現抑制が脳血管内皮細胞の機能を制御することが可能であるかを検証するために、脳血管内皮細胞の重要な機能の 1 つである脳-血液輸送を指標にそのトランスポーターをターゲットに検索した。In vivo のアッセイ系とし

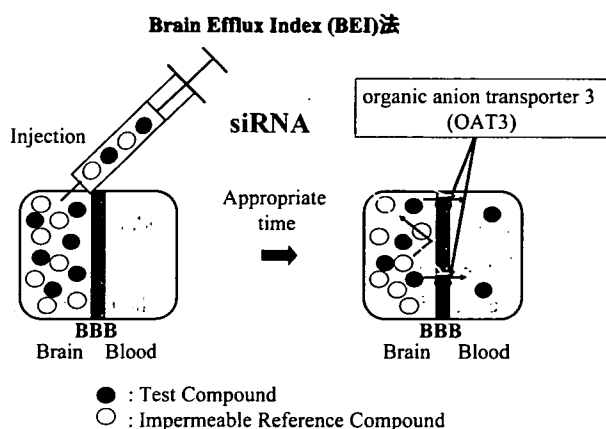


図3 Brain Efflux Index (BEI)法

脳から血液方向のBBB輸送のin vivo検索研究方法の1つ。BBB輸送タンパクの基質をラジオリベルしてBBBを透過しにくい物質と試したい物質の混合液を大脳皮質に投与し、一定時間後の脳内残存率を測定することにより、その両者の比率から基質の排泄機能を評価する方法。

てラジオリベルした輸送基質をマウス脳にマイクロインジェクションしてそのクリアランスを測定することにより脳-血液輸送能を評価する Brain Efflux Index 法 (BEI 法) (図3) を用いた。脳血管内皮細胞に発現し、脳から血液への輸送をする organic anion transporter 3 (OAT3) をターゲットに、OAT3 に対する siRNA をマウスの尾静脈からヒドロダイナミクス導入法で投与して、その効果を BEI 法評価したところ、有意な脳-血液輸送能の低下を示すことができた<sup>9)</sup>。(図4) これらの結果は siRNA が有効にデリバリーできれば、脳血管内皮細胞の機能や病的プロセスを変えることが可能であることを示している。

#### 4) siRNA の in vivo へのデリバリー

ヒドロダイナミクス導入法はその臓器組織への圧力と循環系への用量負荷のために、ヒトへの応用は難しい。

現在、合成 siRNA の in vivo デリバリーの最も有望なベクターはカチオニックリポソームであろう。合成 siRNA を疎水性でマイナスに荷電したカチオニックリポソームは静脈投与に包み込むことにより、特にがん細胞において合成 siRNA を導入させることが可能である<sup>10)</sup>。しかし、近年 siRNA/カチオニック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る可能性が問題になっている<sup>10)</sup>。脳血管内皮細胞をターゲットとする場合はその介入する機能が炎

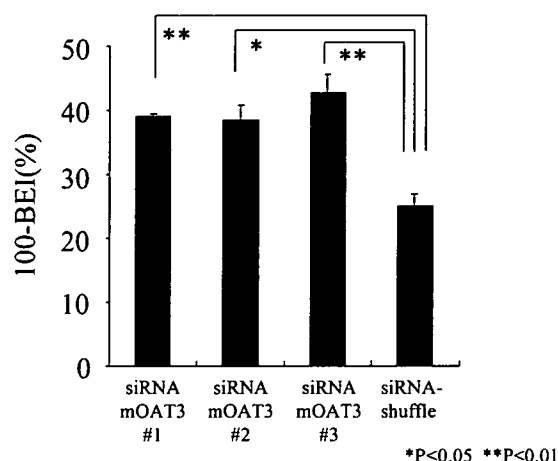


図4 siRNAを用いたOAT3発現抑制によるBBB輸送機能の低下 OAT3に対するsiRNAをマウスの尾静脈からヒドロダイナミクス導入法で投与して、その効果をBEI法評価したところ、OAT3基質の残存率がコントロール (siRNA-shuffle) に比較してsiRNA mOAT#1-3いずれでも有意に増加していた。このことはin vivoにおけるOAT3排出能が抑制されたことを示す。〔文献9から転載〕

症や BBB 通過性であるのでインターフェロン反応は大きな問題になる。siRNA/カチオニックリポソーム複合体が細胞に導入される際に、複合体がまず細胞のエンドゾームに取り込まれ、エンドゾーム内に発現している toll-like 受容体を介してインターフェロン誘導がされることが判明しており<sup>11)</sup>、上記の長い2本鎖 RNA が細胞質内で誘導するインターフェロン反応とは別の経路を介している。siRNA/カチオニックリポソーム複合体によるインターフェロンは配列依存的であるが<sup>12)</sup>、その明確な法則は明らかでない。インターフェロン反応を回避する方法として、siRNA への種々の化学修飾が試みられている<sup>13)</sup>。

また、最近、siRNA のセンス鎖の 3' 末端にコレステロール<sup>14)</sup> や IgG<sup>15)</sup> を siRNA 結合させて、受容体を介した siRNA の新しいデリバリーも報告されている。

長期の抑制効果にはウイルスベクターが必要となる。ヘアピン型 siRNA 発現ベクターコンストラクトをレンチウイルスやアデノ随伴ウイルスなどのウイルスベクターに組み込んで作製した siRNA 発現ウイルスベクターを用いて、in vivo の細胞への siRNA 導入の報告が次々とされている<sup>16,17)</sup>。特に最近開発されたアデノ随伴ウイルスの新しい血清型 8 型 (AAV-8) は非常に高い遺伝子導入効率で期待されているが、副作用も問題になっている<sup>18)</sup>。

## おわりに

siRNAの核酸医薬としての臨床応用は様々な側面で適応が可能であることから、その研究は急速に進行しており、ベクターの開発さえできればもう1歩のところきている。非常に近い将来に、siRNAの利用が免疫性神経疾患においても新しい治療法の開発の突破口になることに期待したい。

## 文 献

- 1) 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.
- 2) Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R.: A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 29: 550-553, 2002.
- 3) Holen T, Amarzguioui M, Wiiger MT, et al: Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res.*, 2002;30:1757-1766.
- 4) Amarzguioui M, Holen T, Babaie E, et al: Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. *Nucleic Acids Res.*, 31:589-595, 2003.
- 5) Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, et al: Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 2003;21:635-637.
- 6) Nishiwaki Y, Yokota T, Hiraoka M, et al. Introduction of short interfering RNA to silence endogenous E-selectin in vascular endothelium leads to successful inhibition of leukocyte adhesion. *Biochem Biophys Res Com*, 2003 ; 310: 1062-1066.
- 7) McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, et al. RNA interference in adult mice. *Nature* 2002;418:38-39.
- 8) Song E, Lee S-K, Wang J, et al. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nature Med* 2003;9:347-351.
- 9) Hino T, Yokota T, Ito S, et al. In vivo delivery of small interfering RNA targeting brain capillary endothelial cells *Biochem Biophys Res Com*. 2006 ; 340 : 263-267.
- 10) Nogawa M, Yasuda T, Kimura S, et al: Intravesical administration of small interfering RNA targeting PLK-1 successfully prevents the growth of bladder cancer. *J Clin Invest* 2005;115:978-985.
- 11) Marques J, Williams BRG. Activation of the mammalian immune system by siRNAs. *Nat Biotechnol*. 2005;23:1399-405.
- 12) Hornung, V. Guenther-Biller M, Bourquin C, et al. Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 2005;11:263-270.
- 13) Judge AD, Sood V, Shaw JT, et al. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol* 2005;23:457-462.
- 14) Morrissey DV, lockridge JA, Shaw L, et al. Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat Biotechnol* 2005;23:1002-1007.
- 15) Soutschek J, Akinc A, Bramlage S, et al. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 2004 ;432:173-178.
- 16) Song E, Lee SK, Chowdhury D, et al :Antobody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat Biotechnol* 2005;23:709-717.
- 17) Morris KV, Rossi JJ. Lentiviral-mediated delivery of siRNAs for antiviral therapy. *Gene Ther*. 2006;13:553-8
- 18) Miller TM, Kasper BK, Kops GJ, et al. Virus-delivered small RNA silencing sustains strength in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2005;57:773-776.
- 19) Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, et al. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature*. 2006;441:537-541.

### 要 旨

Short interfering RNA (siRNA) の遺伝子発現抑制効果はアンチセンス核酸より、有効性、配列特異性いずれもはるかに優れており、核酸医薬としてウイルス性疾患、悪性腫瘍、遺伝性疾患などの疾患遺伝子を標的とした基礎研究が進行している。脳血管内皮は多発性硬化など免疫性神経疾患の場として重要であり、脳血管内皮の内因性遺伝子の siRNA による発現制御はこれらの疾患の治療に有用であることが予想される。その実現にはデリバリー方法や遺伝子抑制の持続、off-target 効果など解決すべき問題点も多いが、免疫性神経疾患の遺伝子治療の新しいツールとしてその可能性に期待がもたれている。

キーワード；脳血管内皮細胞；RNAi；ウイルスベクター；カチオニックベクター

## siRNA の核酸医薬としての可能性

横田隆徳\*

Short interfering RNA (siRNA) の遺伝子発現抑制効果はアンチセンス核酸より、有効性、配列特異性いずれもはるかに優れており、核酸医薬としてウイルス性疾患、悪性腫瘍、遺伝性疾患などの疾患遺伝子を標的とした基礎研究が進行している。デリバリー方法や遺伝子抑制の持続、off-target 効果など解決すべき問題点も多いが、その高い有効性から遺伝子治療の新しいツールとしてその可能性に期待がもたれている。

## はじめに

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アンチセンス核酸の  $10^{3-7}$  倍、リボザイムの  $10^{2-5}$  (白験) 高いといわれている。しかもその配列特異性も高く、医療分野における臨床応用については発見当初から大きく期待されている。本稿では、急速に進んでいる siRNA の核酸医薬開発についてその研究現状と問題点について概説したい。

## 1. 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 2 本鎖の siRNA に分解される。siRNA のセンス鎖は Ago2 によりその中央部で切断されて、アンチセンス鎖のみがヘリケースなどのいくつかの蛋白からなる RNA 蛋白複合体である RISC 複合体 (RNA-induced silencing complex) に取り込まれる<sup>1)2)</sup>。RISC 複合体がアンチセンス鎖に相補的な配列をもつ標的 mRNA にアクセスして、その中央で分解する<sup>3)4)</sup>。しかし、哺乳動物における 2 本鎖 RNA の導入は PKR や 2' 5' oligosynthetase の活性化による非特異的な翻訳抑制や RNA の分解を引き起こし、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 RNA (RNAi) 干渉の利用の大きな妨げになっていた。しかし、2000 年に、RNAi 機構の中間産物である siRNA を合成して用いることによってこれらの副反応が回避され、siRNA の配列に特異的な遺伝子発現抑制が可能となった<sup>5)</sup>。さらに、siRNA 配列を短い 9 mer のループ配列でつないだ stem 型のパリンドロミックな配列を 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た<sup>6)</sup>。また、近年、siRNA の新たな遺伝子発現抑

## Key Words

siRNA  
RNAi  
ウイルスベクター  
カチオンベクター

\* YOKOTA Takanori/東京医科歯科大学医学部脳神経病態学(神経内科)

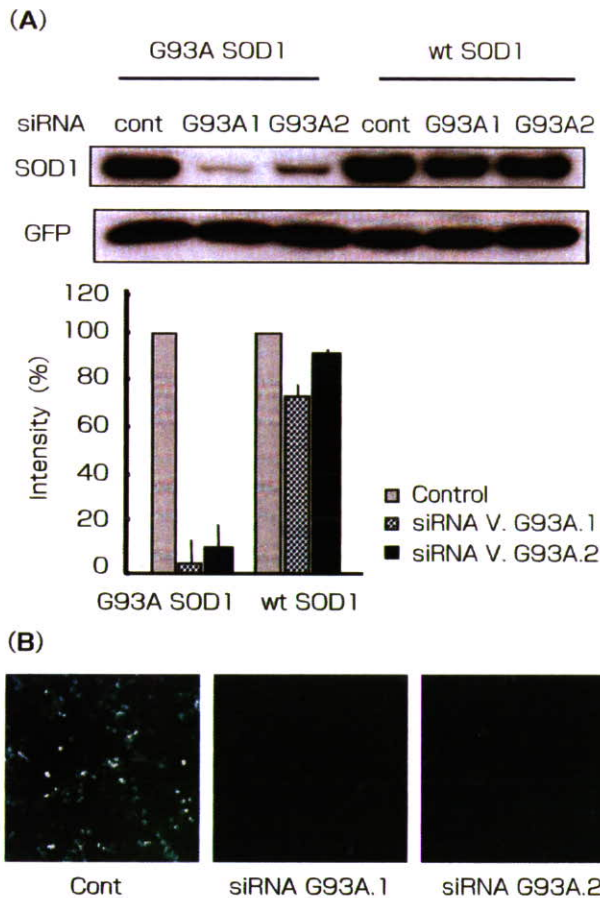


図1 野生型 SOD1 には作用せず、変異 SOD1 の発現を特異的に抑制する siRNA (Yokota *et al.*, 2004<sup>18)</sup>より引用)

(A) 293T 細胞に G93A または野生型 SOD1 発現ベクターと G93A siRNA を共発現させ、野生型および変異 SOD1 の発現をウエスタンブロットした。  
 (B) GFP をタグに SOD1 の発現を蛍光顕微鏡にて撮影。

制機構として、siRNA を介した DNA のおもにプロモータ領域の CpG アイランドをターゲットメチル化が転写抑制を起こすことが明らかになっている<sup>7)</sup>。

### 1) 変異遺伝子特異的な siRNA

がん遺伝子や遺伝性疾患を siRNA で治療しようとした場合、変異遺伝子のみを選択的に発現抑制して、野生型には作用しないことが望ましい。siRNA と基質 RNA との特異性については、siRNA の発見当初は 5' 端から 9, 10, 11 塩基目の中央部位の変異が失活化に最も有効とされた<sup>6)</sup>。5' 側は基質との結合より RISC とのかかわりから基質を切断するルーラー(物差し)効果があるといわれ<sup>8)</sup>、3' 側よりのミスマッチのほうがより失活効果が強いとの報告がされ<sup>9)</sup>、現在のところ siRNA の 5' 端から 9 ~ 16 塩基目にミスマッチをデザインすると変異遺伝子の識別が最もよいと考えられている(図1)。

### 2) Off-Target 効果などの副反応

siRNA を臨床応用する際に、off-target 効果、すなわち、ターゲットとした遺伝子以外に、用いた 19 塩基の siRNA に部分的にホモロジーのある別の遺伝子の発現を抑えてしまういわゆる交叉反応が報告されている<sup>10)</sup>。全般にその特異性はアンチセンスなどに比較してかなり少ないが、それでも多くの遺伝子の発現が影響を受ける可能性がある。Jackson ら<sup>10)</sup>の検討では、通常 19 塩基中 15 塩基以上で、最低では 11 塩基のホモロジーのある遺伝子において影響があったと報告された。今後この off-target 効果の評価とその回避は重要な問題である。

### 3) ウイルス性疾患への応用

RNAi の本来の生理学的役割の一つとして細胞に感染したウイルスの蛋白合成を阻害する作用が考えられ、siRNA の発見以来、ウイルスゲノム遺伝子やウイルス mRNA を標的とした研究が急速に進んでいる。現在まで、エイズウイルス(HIV)、C 型・B 型肝炎ウイルス、



ポリオウイルス, SARS ウイルス, インフルエンザウイルス, ウエストナイルウイルスで培養細胞レベルではあるが有効な siRNA が報告されている。われわれも C 型肝炎で有効な siRNA を開発し<sup>14)</sup>, 現在サルモデルを用いた検討をしている。

このウイルス遺伝子の変異に対して, 上記のように変異のない保存されたウイルス遺伝子領域を使うことや, 複数の siRNA を使用する解決方法が考えられる。

また, ウイルス遺伝子そのものを標的とするのではなく, ウイルス増殖に必要な宿主側の内在性遺伝子を標的にする方法も考えられている。HIV 感染における TSG101<sup>12)</sup>や NF $\kappa$ Bp65<sup>13)</sup>サブユニットなどを siRNA で発現を抑制し, HIV ウイルス増殖を抑制したとの報告もある。

さらに, CD4 や CCR5 などの HIV-1 感染におけるリンパ球側に内在するウイルスレセプターを標的としてその発現を抑制する方法も成果があり注目されている<sup>14)</sup>。CD34<sup>+</sup>造血幹細胞に CCR5 に対する siRNA をレンチウイルスで安定発現させたところ, 正常に分化して *in vitro* でマクロファージに *in vivo* で T リンパ球になり, その両者ともに HIV ウイルスに抵抗性になったとの報告がされ, 今後の臨床応用に期待がもたれている<sup>15)</sup>。

一方, IL-1 や TNF $\alpha$  などの炎症性サイトカインの発現を抑制することにより免疫性疾患の治療としての可能性や感染症の初期治療としての試みが報告されている<sup>16)</sup>。

#### 4) 遺伝性疾患への応用

遺伝性疾患でゲノム遺伝子の変異が原因で発症する場合, 遺伝子変異に起因する発症機序には変異のある遺伝子の遺伝子産物である蛋白の本来のもつ機能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) の二つがあることが知られている。遺伝子変異が常染色体にある場合, 対立する二つのアレルの双方に遺伝子変異があってはじめて発症する常染色体劣性遺伝形式の疾患の多くは loss of function をその機序とし, 一方のアレルのみで発症する常染色体優性遺伝形式の疾患の多くの場合は gain of function であることが多い。常染色体優性遺伝の場合は野生型のアレルからは原則として正常

個体の半分の量の正常の蛋白は発現しているので, 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。

神経疾患では, superoxide dismutase 1 (SOD1) 変異による筋萎縮性側索硬化症 (ALS), 各種ポリグルタミン病, アミロイド前駆蛋白 (APP) や PS1 遺伝子変異によるアルツハイマー病,  $\alpha$ -synuclein 変異によるパーキンソン病などの常染色体優性遺伝形式を示す主要な疾患の多くは gain of toxic function を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, その機序のいかににかかわらず発症, 進行を防止することが期待できるわけである。最近, われわれは 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掛け合わせ, 全身の変異 SOD1 蛋白の発現を 80% 以上抑制することに成功した (図 2)。この効果により, 270 日齢の時点で ALS 症状の発症は抑制されている<sup>17)</sup>。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ので副作用はない可能性が高いが, たとえば SCA6 の場合, その原因遺伝子カルシウム 1A チャネルのノックアウトマウスは生後 1~2 週で死亡することが知られており, 正常ア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。

上述のように, 変異が 1 塩基の違いである点変異でも正常ア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<sup>18)19)</sup>。しかし, たとえば SOD1 や PS1 の点変異は 100 種類以上知られており, そのすべてに特異的で効率的な siRNA がデザインできるわけではない。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 法を考案して, 現在その *in vivo* での有効性を検証中である<sup>20)</sup>。

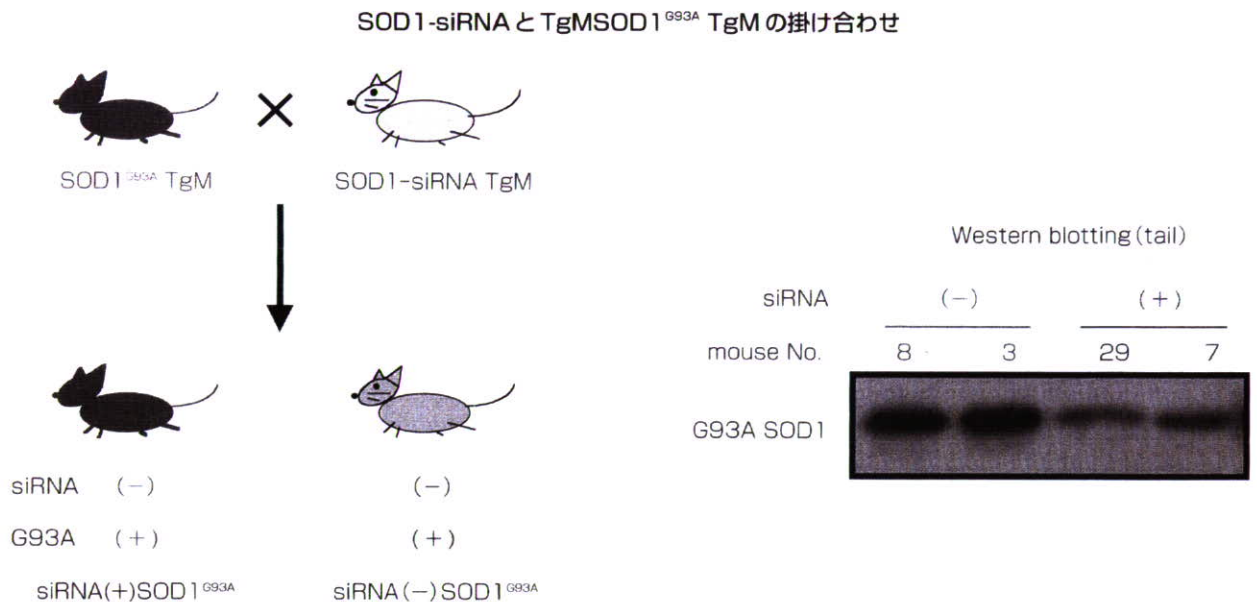


図2 野生型 SOD1 には作用せず、変異 SOD1 の発現を特異的に抑制する siRNA (Saito *et al.*, 2005<sup>17)</sup> より引用)  
 SOD1 に対する siRNA を過剰発現させたトランスジェニックマウスを ALS のモデルマウスである G93A 変異 SOD1 トランスジェニックマウスと掛け合わせるにより(左), 変異 SOD1 蛋白の発現を 80% 以上抑制することに成功した(右). 270 日齢の時点で ALS 症状の発症は完全に抑制されている.

### 5) siRNA の *in vivo* へのデリバリー

siRNA は細胞質で RISC に取り込まれて切断活性を発揮することより, siRNA のデリバリーは細胞膜さえ越えればよく, 遺伝子治療によく使われる発現 DNA ベクターのように核にアクセスする必要がない. McCaffrey ら<sup>21)</sup> はマウスの尾静脈から 10 ~ 50  $\mu$ g の合成 siRNA を体重の 5 ~ 10% の大量の PBS 溶液で 5 ~ 7 秒の短時間で注入するハイドロダイナミックス導入法で, マウスの肝細胞に siRNA を導入することに成功した. さらに最近, このハイドロダイナミックス導入法で導入された Fas<sup>22)</sup> やカスパーゼ 8 に対する合成 siRNA で, マウスに誘発された激症肝炎による死亡率を低下させたとの報告がなされた. しかし, ハイドロダイナミックス導入法はその臓器組織への圧力と循環系への用量負荷のために, ヒトへの応用は難しい.

現在, 合成 siRNA の *in vivo* デリバリーの最も有望なベクターはカチオニックリポソームであろう. 合成 siRNA を疎水性でマイナスに荷電したカチオニックリポソームは静脈投与に包み込むことにより, とくにがん細胞において合成 siRNA を導入させることが可能である<sup>23) ~ 25)</sup>. しかし, 近年 siRNA/カチオニックリポソーム

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る可能性が問題になっている<sup>26)</sup>. siRNA/カチオニックリポソーム複合体が細胞に導入される際に, 複合体がまず細胞のエンドゾームに取り込まれ, エンドゾーム内に発現している toll-like レセプターを介してインターフェロン誘導がされることが判明しており<sup>27)</sup>, 上記の長い 2 本鎖 RNA が細胞質内で誘導するインターフェロン反応とは別の経路を介している. siRNA/カチオニックリポソーム複合体によるインターフェロンは配列依存的であり<sup>28)</sup>, その明確な法則は明らかでない. インターフェロン反応を回避する方法として, siRNA への種々の化学修飾が試みられている<sup>24)</sup>.

また, 最近, siRNA のセンス鎖の 3' 末端にコレステロール<sup>29)</sup> や IgG<sup>30)</sup> を siRNA 結合させて, レセプターを介した siRNA の新しいデリバリーも報告されている.

長期の抑制効果にはウイルスベクターが必要となる. ヘアピン型 siRNA 発現ベクターコンストラクトをレンチウイルスやアデノ随伴ウイルスなどのウイルスベクターに組み込んで作製した siRNA 発現ウイルスベクターを用いて, *in vivo* の細胞への siRNA 導入の報告が次々と

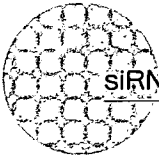
されている<sup>31)32)</sup>。とくに最近開発されたアデノ随伴ウイルスの新しい血清型8型(AAV-8)は非常に高い遺伝子導入効率があり、期待されている。

## おわりに

siRNAの核酸医薬としての臨床応用はさまざまな側面で適応が可能であることから、その研究は急速に進行しており、ベクターの開発さえできればもう1歩のところにきている。非常に近い将来に、難治性疾患において新しい治療法の開発にsiRNAの利用が突破口になることに期待したい。

## 文献

- 1) Rand TA *et al* : Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* 123 : 621-629, 2005
- 2) Matranga C *et al* : Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* 123 : 607-620, 2005
- 3) Song JJ *et al* : Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 305 : 1434-1437, 2004
- 4) Liu J *et al* : Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305 : 1437-1441, 2004
- 5) Elbashir S *et al* : Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411 : 494-498, 2001
- 6) Brummelkamp TR *et al* : A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 29 : 550-553, 2002
- 7) Morris KV *et al* : Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science* 305 : 1289-1292, 2004
- 8) Holen T *et al* : Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res* 30 : 1757-1766, 2002
- 9) Amarzguioui M *et al* : Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. *Nucleic Acids Res* 31 : 589-595, 2003
- 10) Jackson AL *et al* : Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nature Biotechnol* 21 : 635-637, 2003
- 11) Yokota, T *et al* : Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO Rep* 4 : 602-608, 2003
- 12) Garrus JE *et al* : Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* 107 : 55-65, 2001
- 13) Surabhi RM *et al* : RNA interference directed against viral and cellular targets inhibits human immunodeficiency Virus Type 1 replication. *J Virol* 76 : 12963-12973, 2002
- 14) Arteaga HJ *et al* : Choosing CCR5 or Rev siRNA in HIV-1. *Nat Biotechnol* 21 : 230-231, 2003
- 15) Qin XF *et al* : Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 : 183-188, 2003
- 16) Sorensen DR *et al* : Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice. *J Mol Biol* 327 : 761-766, 2003
- 17) Saito Y *et al* : Transgenic small interfering RNA halts amyotrophic lateral sclerosis in a mouse model. *J Biol Chem* 280 : 42826-42830, 2005
- 18) Yokota T *et al* : siRNA-based inhibition of superoxide dismutase expression; potential use in familial Amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Com* 314 : 283-291, 2004
- 19) Davidson BL *et al* : Molecular medicine for the brain: silencing of disease genes with RNA interference. *Lancet Neurol* 3 : 145-149, 2004
- 20) Kubodera T *et al* : New RNAi Strategy for Selective Suppression of Mutant Allele in Polyglutamine Disease. *Oligonucleotides* 15 : 298-302, 2005
- 21) McCaffrey AP *et al* : RNA interference in adult mice. *Nature* 418 : 38-39, 2002
- 22) Song E *et al* : RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nature Med* 9 : 347-351, 2003
- 23) Yano J *et al* : Antitumor activity of small interfering RNA/cationic liposome complex in mouse models of cancer. *Clin Cancer Res* 10 : 7721-7726, 2004
- 24) Morrissey DV *et al* : Potent and persistent *in vivo* anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat Biotechnol* 23 : 1002-1007, 2005
- 25) Nogawa M *et al* : Intravesical administration of small interfering RNA targeting PLK-1 successfully prevents the growth of bladder cancer. *J Clin Invest* 115 : 978-985, 2005
- 26) Marques J *et al* : Activation of the mammalian immune system by siRNAs. *Nat Biotechnol* 23 : 1399-1405, 2005
- 27) Hornung V *et al* : Sequence-specific potent induction of IFN- $\alpha$  by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 11 : 263-270, 2005
- 28) Judge AD *et al* : Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol* 23 : 457-462, 2005
- 29) Soutschek J *et al* : Therapeutic silencing of an endoge-



- nous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432 : 173-178, 2004
- 30) Song E *et al* : Antibody mediated *in vivo* delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat Biotechnol* 23 : 709-717, 2005
- 31) Morris KV *et al* : Lentiviral-mediated delivery of siRNAs for antiviral therapy. *Gene Ther* Jan 5 2006 (Epub ahead of print)
- 32) Miller TM *et al* : Virus-delivered small RNA silencing sustains strength in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 57 : 773-776, 2005

## YOKOTA Takanori

---

よこた・たかのり

1959年、東京都生まれ

1984年、東京医科歯科大学医学部卒

1990年、東京医科歯科大学神経内科 助手

1998年、米国バーナム研究所リサーチフェロー

1999年、米国バック神経変性疾患研究所リサーチフェロー

2000年、東京医科歯科大学神経内科 講師

2005年より東京医科歯科大学医学部脳神経病態学 助教授(現職)

専門は神経内科、分子生物学、遺伝子治療

研究テーマは神経疾患の遺伝子治療

---



## &lt;近未来の根治治療&gt;

## 5. RNA干渉によるアルツハイマー病治療の可能性

Yokota Takanori  
横田 隆徳\*

\*東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科脳神経病態学(神経内科)

◎◎◎  
◎はじめに

RNA干渉(RNAi)は, いかなる遺伝子に対してもデザインできて, その標的遺伝子の発現抑制効果は, 他の核酸医薬であるアンチセンス核酸の $10^{3-7}$ 倍, リボザイムの $10^{2-5}$ 倍(自験)高いといわれている. しかも, その配列特異性も高く, 1塩基の違いの認識も可能であり, 医療分野におけるその臨床応用については発見当初から大きく期待されていた. それは, RNAiライブラリーをはじめとする創薬におけるツールといった側面と, short interfering RNA (siRNA)を直接核酸医薬として疾患に適用するという2つの方面から行われている.

ここでは, 既にウイルス性疾患, 遺伝性疾患, 悪性腫瘍などで急速に進んでいるsiRNAの核酸医薬としての開発の研究現状と問題点について, アルツハイマー病を中心に概説したい.

◎◎◎  
◎RNAi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RNAであるsiRNAに分解される. siRNAはセンス鎖がAgo2により切断分解されて, アンチセン

ス鎖のみがヘリケースなどのタンパク質からなるRNAタンパク質複合体であるRISC複合体(RNA-induced silencing complex)に取り込まれ, アンチセンス鎖に相補的な配列をもつターゲットRNAをその中央で分解する. しかし, 哺乳動物における2本鎖RNAの導入は, 2本鎖RNA誘導性タンパク質キナーゼ(PKR)や2',5'-oligosynthetaseの活性化による非特異的な翻訳抑制やRNAの分解を引き起こし, 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RNAiの利用の大きな妨げになっていた. しかし, 2000年に, RNAi機構の中間産物であるsiRNAを合成して用いることによって, これらの副反応が回避され, siRNAの配列に特異的な遺伝子発現抑制が可能となった. さらに, siRNA配列を短い9 merのループ配列でつないだstem型のパリンドロミックなsiRNA配列を, 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た. また, 近年, 加えてsiRNAの新たな遺伝子発現抑制機構として, siRNAを介したDNAの主にプロモーター領域のCpGアイランドをターゲットに, メチル化が転写抑制を起こすことも明らかになっている.

◎◎◎  
◎siRNAの特異性: 変異遺伝子特異的なsiRNA

遺伝性疾患や癌遺伝子をsiRNAで治療しようとした場合, 変異遺伝子のみを選択的に発現抑制して, 野生型には作用しないことが望ましい. siRNAと基質RNAとの特異性については, 一般に4塩基以上ミスマッチ

があった場合で、siRNAの切断活性はおおむね消失するが、1～2塩基のミスマッチによる切断効率の低下は完全ではなく、ミスマッチの位置によってその効果は異なる。5'側は、基質との結合よりRISCとの関わりから基質を切断するルーラー(物差し)として働き、基質の認識としては3'側の方が重要で、したがってミスマッチによる失活効果が強いと考えられている<sup>1)</sup>。

### ●●●● ●●●● ●●●● ●●●●

## siRNAの特異性：off-target効果などの副反応

siRNAを臨床応用する際にも、ライブラリーを用いた遺伝子探索をする際にも、off-target効果、すなわちターゲットとした遺伝子以外に、用いた19塩基のsiRNAの配列に部分的にホモロジーのある別の遺伝子の発現を抑えてしまう、いわゆる交叉反応が報告されている<sup>2)</sup>。全般にその特異性はアンチセンスなどに比較してかなり高いが、それでも多くの遺伝子の発現が少なからず影響を受ける可能性がある。Jacksonらの検討で<sup>2)</sup>、通常19塩基中15塩基以上で、最低では11塩基のホモロジーのある遺伝子においても影響があったと報告された。今後、このoff-target効果の評価とその回避は重要な問題である。

また、通常の21塩基長の合成siRNAを、カチオンリポソームでマウスなどに静脈注射すると、エンドソーム内のtoll-like受容体を介してインターフェロンなどのサイトカインが誘導されることが判明して、非特異的なタンパク合成の停止とRNA変性が起こり得るという報告がなされ、問題になっている<sup>3,4)</sup>。

### ●●●● ●●●● ●●●●

## 遺伝性神経変性疾患への応用

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が本来もっている機能が消失、または低下する場合(loss of function)と、変異遺伝子や変異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 func-

tion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ため、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(ALS)、各種ポリグルタミン病、アミロイド前駆タンパク(APP)やPS1遺伝子変異によるアルツハイマー病、 $\alpha$ -synuclein変異によるパーキンソン病などの常染色体優性遺伝形式を示す主要な神経変性疾患の多くは、gain of toxic functionがその発症機序と考えられている。このような疾患の治療を考える場合、変異したタンパクの発現を抑制する方法があれば、その機序のいかににかかわらず発症、進行を防止することが期待できるわけである。

われわれは、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掛け合わせ、全身の変異SOD1タンパクの発現を80%以上抑制することに成功した(図1)。この効果により、9カ月齢の時点でALS症状の発症は完全に抑制されている<sup>5)</sup>。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ため副作用はない可能性が高いが、例えばSCA6の場合、その原因遺伝子カルシウム1Aチャンネルのノックアウトマウスは生後1～2週で死亡することが知られており、正常アレルの発現抑制は新たな症状を来す可能性が高い。したがって、優性遺伝疾患の治療には、正常ア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。

上述のように、変異が1塩基の違いである点変異でも、正常ア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。APPの最も高頻度に認められるスウェーデン型変異APP RNAを特異的に切断して、野生型には作用しないsiRNAは報告されている<sup>6)</sup>。しかし、SOD1やPS1の点変異は100種類以上知られており、そのすべてに特異的で効率的なsiRNAがデザインできるわけではない。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法を考案して<sup>7)</sup>、現在その*in vivo*での有効性を検証中である。

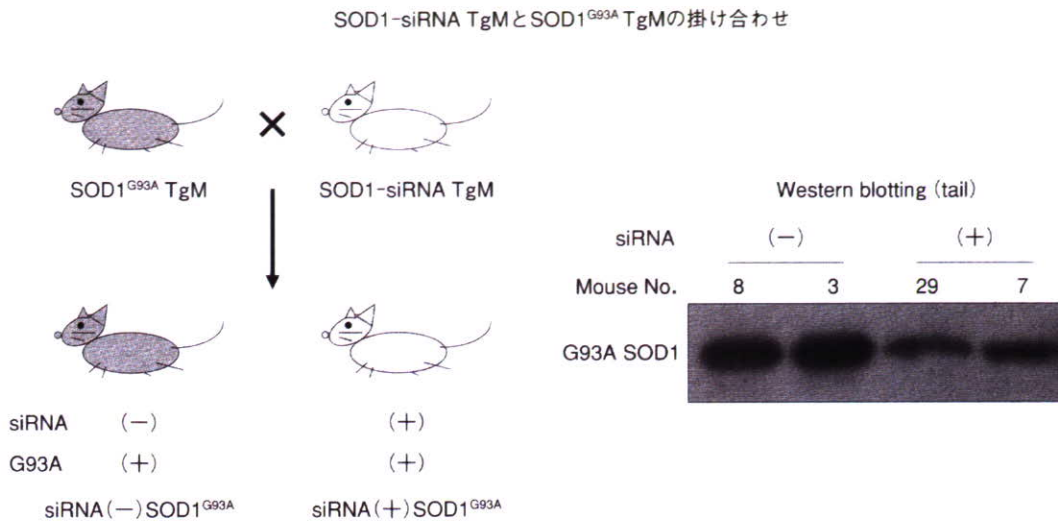
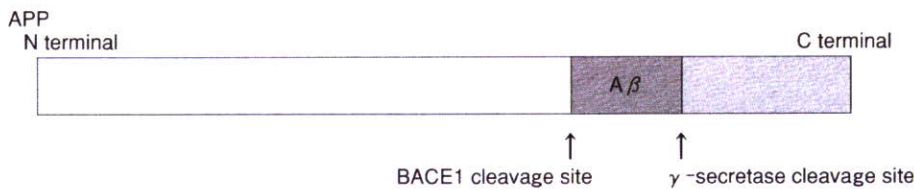


図1 SOD1<sup>G93A</sup>トランスジェニックマウスの遺伝子治療

SOD1に対するsiRNAを過剰発現させたトランスジェニックマウスを, ALSのモデルマウスであるG93A変異SOD1トランスジェニックマウスと掛け合わせるにより(左), 変異SOD1タンパクの発現を80%以上抑制することに成功した(右). 270日齢の時点で, ALS症状の発症は完全に抑制されている.



培養細胞でのAβプロセスに対するsiRNA to BACE1の効果

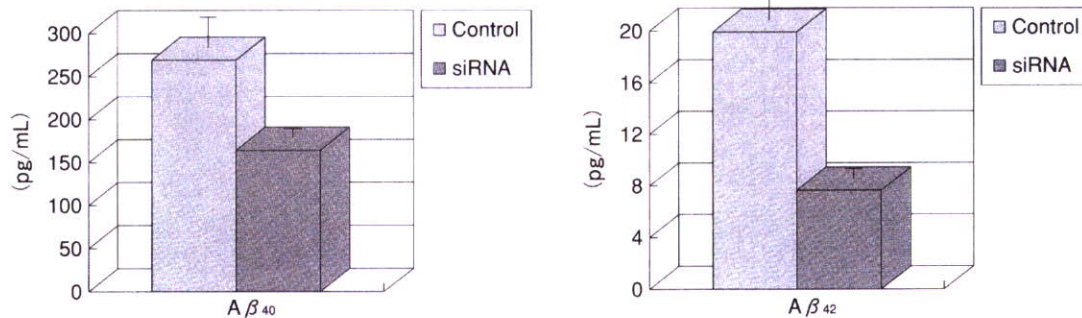


図2 孤発性アルツハイマー病に対するsiRNAによる治療

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

### ●●● 神経疾患への応用：孤発性神経変性疾患

ほとんどのアルツハイマー病, パーキンソン病やALSは家族歴のない孤発性で, 遺伝子異常は明らかでないが, それぞれの発症機序のキーとなる分子がわかれば, その発現を抑制することで治療が可能かもしれない. 特にアルツハイマー病のβセクレターゼは有望な標的分子である. アルツハイマー病のモデル動物では, アミロイドβタンパク(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. 最近の欧米で進められている臨床治験の結果も, 副作用はあるが効果はありそうである. これは, アルツハイマー病の発症機序に従来からいわれてきたAβ仮説を大きく支持するもので, Aβの産生を抑制することが治療のターゲットとなる. Aβはアミロイド前駆タンパクAPPからβとγセクレターゼによって切り出されて生成される. PS1などからなるγセクレターゼは, Notchなどの他の重要な分子も基質としているため, その機能を抑制すると問題が出るが, βセクレターゼの本体といわ

れるBACE1のノックアウトマウスは特別の異常を示さない。大脳の神経細胞の初期培養に、BACE1に対するsiRNAを導入してA $\beta$ 産生を抑制できることが示され<sup>8)</sup>、われわれもスウェーデン型変異APPの安定発現させた培養細胞を用いて同様の効果を認めている(図2)。

最近、BACE1に対するsiRNAを発現するレンチウイルスを、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直接注入して、老人斑の沈着を減少させ、認知機能障害を改善させたとの報告がなされた<sup>9)</sup>。後述のようにデリバリーの問題が解決できれば、画期的な治療方法になるかもしれない。また、他の基質への影響なく $\gamma$ セクレターゼ機能を低下させる可能性のあるAPPアダプター分子、X11a $\alpha$ とX11a $\beta$ をターゲットとしたsiRNAでA $\beta$ 産生を抑制できる可能性や<sup>10)</sup>、ミクログリアの活性化をcathepsin Bに対するsiRNAで抑制し、神経細胞毒性を軽減したとの報告もなされている<sup>11)</sup>。

## ●●●● ●●●● siRNAの*in vivo*へのデリバリー

siRNAは、細胞質でRISCに取り込まれて切断活性を発揮することより、siRNAのデリバリーは細胞膜さえ越えればよく、遺伝子治療によく使われる発現DNAベクターのように核にアクセスする必要がない。McCaffreyら<sup>12)</sup>は、マウスの尾静脈から10~50 $\mu$ gの合成siRNAを体重の5~10%の大量のPBS溶液で5~7秒の短時間で注入するハイドロダイナミックス導入法で、マウスの肝細胞にsiRNAを導入することに成功した。ハイドロダイナミックス導入法では、脳血液関門のために中枢神経系には入らないが、最近われわれはこの方法を用いて脳血管内皮にはsiRNAをデリバリーすることに成功した<sup>13)</sup>。上記のミクログリアの活性化などには脳血管内皮がその場になっており、応用が可能かもしれない。

長期の抑制効果にはウイルスベクターが必要となる。ヘアピン型siRNA発現ベクターコンストラクトを、アデノウイルスやレンチウイルス、レトロウイルス、アデノ随伴ウイルスなどのウイルスベクターに組み込んで作製したsiRNA発現ウイルスベクターを用いて、*in vivo*の細胞へのsiRNA導入の報告が次々となされている<sup>14)</sup>。特に、最近開発されたアデノ随伴ウイルスの新しい血清型8型(AAV-8)は、非常に高い遺伝子導入効率が期待されている。

しかし、これらのいずれの方法でも、静脈注射などの全身性の投与でsiRNAを脳血液関門を越えて中枢神経系にデリバリーすることは困難で、siRNAによる神経疾患治療の大きな問題になっている。

## ●●●● ●●●● おわりに

siRNAの核酸医薬としての臨床応用の研究には、上記以外にもsilencingの突然の停止の問題(シャットダウン現象)など解決すべき課題はまだ多くある。しかし、基礎研究は爆発的に進んでおり、最も大きな問題であるデリバリー方法にも急速な進歩がある。非常に近い将来に、難治性疾患での新しい治療法の開発に、siRNAの利用が突破口になると期待している。

## ●●●● ●●●● 文 献

- 1) Amarzguioui M, Hohen T, Babaie E, et al: Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. *Nucleic Acids Res* 2003; **31**: 589-595.
- 2) Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, et al: Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 2003; **21**: 635-637.
- 3) Judge AD, Sood V, Shaw JR, et al: Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol* 2005; **23**: 457-462.
- 4) Hornung V, Guenther-Biller M, Bourquin C, et al: Sequence-specific potent induction of IFN- $\alpha$  by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 2005; **11**: 263-270.
- 5) 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**: 42826-42830.
- 6) Miller VM, Gouvion CM, Davidson BL, et al: Targeting Alzheimer's disease genes with RNA interference: an efficient strategy for silencing mutant alleles. *Nucleic Acids Res* 2004; **32**: 661-668.
- 7) Kubodera T, Yokota T, Ishikawa K, et al: New RNAi strategy for selective suppression of a mutant allele in polyglutamine disease. *Oligonucleotides* 2005; **15**: 298-302.
- 8) Kao SC, Krichevsky AM, Kosik KS, et al: BACE1 suppression by RNA interference in primary cortical neurons. *J Biol Chem* 2004; **279**: 1942-1949.
- 9) Singer O, Marr RA, Rockenstein E, et al: Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model. *Nat Neurosci* 2005; **8**: 1343-1349.
- 10) Xie Z, Romano DM, Tanzi RE: RNA interference-mediated silencing of X11alpha and X11beta attenuates



- amyloid beta-protein levels via differential effects on beta-amyloid precursor protein processing. *J Biol Chem* 2005 ; 280 : 15413-15421.
- 11) Gan L, Ye S, Chu A, et al : Identification of cathepsin B as a mediator of neuronal death induced by Abeta-activated microglial cells using a functional genomics approach. *J Biol Chem* 2004 ; 279 : 5565-5572.
- 12) McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, et al : RNA interference in adult mice. *Nature* 2002 ; 418 : 38-39.
- 13) Hino T, Yokota T, Ito S, et al : *In vivo* delivery of small interfering RNA targeting brain capillary endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006 ; 340 : 263-267.
- 14) Davidson BL, Paulson HL : Molecular medicine for the brain : silencing of disease genes with RNA interference. *Lancet Neurol* 2004 ; 3 : 145-149.

### *siRNA-based Gene Therapy for Alzheimer Disease*

Takanori Yokota\*

\*Department of Neurology and Neurological Science, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University

Most mutant genes of autosomal dominant diseases usually induce 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 Alzheimer disease, a most effective therapeutic approach requires the reduction of the aberrant mutant APP protein leaving wild-type intact.

In sporadic Alzheimer disease, increased  $\beta$ -secretase (BACE1) activity has been associated with neurodegeneration and accumulation of amyloid precursor protein (APP) products. Thus, inactivation of BACE1 could be important in the treatment of Alzheimer disease. It was reported that the lowering BACE1 levels using lentiviral vectors expressing siRNAs targeting BACE1 reduced amyloid production and the neurodegenerative and behavioral deficits in APP transgenic mice, a model of Alzheimer disease.

Although there is a problem of delivery of siRNA to neuron, siRNA-based therapy for Alzheimer disease is promising strategy.

# 1. RNAi を用いたウイルス複製抑制

横田 隆徳

東京医科歯科大学 脳神経機能病態

RNA interference (RNAi) は2本鎖 RNAi によって誘導される配列特異的な遺伝子発現抑制である。その中間産物である Short interfering RNA (siRNA) は哺乳動物細胞においても、インターフェロン反応などの副反応なく目的の遺伝子を切断でき、治験段階に入っているアンチセンス核酸やライボザイムより、有効性、配列特異性いずれもはるかに優れている。その核酸医薬として臨床応用は特にウイルス性疾患において進行している。OFF-Target 効果やデリバリー方法などまだまだ解決すべき問題点も多いが、siRNA の高い可能性から種々の方面において医療分野への応用が急速に進展していくことは間違いないものと思われる。

## 1. RNAi とは

今日までのウイルス増殖抑制の方法はワクチンかウイルス蛋白やウイルス特異酵素をターゲットとした創薬であった。ここ数年、ウイルスゲノム複製に関わる転写、翻訳を核酸レベルで直接抑制しようという試みが、アンチセンス核酸、ライボザイム、DNA エンザイムなどで行われていたが、十分な抑制効果は得られなかった。最近、新しい遺伝子発現抑制 (gene silencing) として、これらをはるかに凌ぐ効果を持つ RNA interference (RNAi) が注目されている。

長い2本鎖 RNAi 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 RNA である short interfering RNA (siRNA) に分解される。siRNA はアンチセンス鎖のみがとくほぐされて、ヘリケースなどの蛋白質から成る RNA 蛋白質複合体である RISC 複

合体 (RNA-induced silencing complex) に取り込まれ、アンチセンス鎖に相補的な配列を持つターゲット RNA をその中央で分解する。しかし、哺乳動物における2本鎖 RNA の導入は PKR や 2' 5' oligosynthetase の活性化による非特異的な翻訳抑制や RNA の分解が生じ、ホストの細胞の死んでしまうため、分子生物学的手法としても遺伝子治療の方法としても RNAi の利用の大きな妨げになっていた。しかし、2000年に、RNAi 機構の中間産物である siRNA を合成して用いることによってこれらの副反応が回避され、siRNA の配列に特異的な遺伝子発現抑制が可能となった<sup>1)</sup>。さらに、siRNA 配列を短い9mer のループ配列でつないだ stem 型のパリンドロミックな siRNA 配列を 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た<sup>2)</sup>。また、近年、加えて siRNA の新たな遺伝子発現抑制機構として siRNA を介した DNA の主にプロモーター領域の CpG アイランドをターゲットにメチル化が転写抑制を起こすことも明らかになっている<sup>3)</sup>。

RNAi 機構は酵母からヒトに至るまで多くの生物種で保存されていて、その生物学的な意義としてはウイルスなどに対する防御機構として進化してきたという仮説が提唱されている。siRNA の発見以来、すぐにいくつかのウイルスにおいて、細胞内でのウイルス遺伝子の切断やウイルス遺伝子複製モデルにおいて siRNA が有効であるとの報告が相次いでいる。現在まで、エイズウイルス (HIV)<sup>4)</sup>、C 型<sup>5,8)</sup>・B 型<sup>9,10)</sup> 肝炎ウイルス、ポリオウイルス<sup>11)</sup>、インフルエンザウイルス<sup>12,13)</sup>、ウエストナイルウイルス<sup>13)</sup> SARS ウイルス、ウエストナイルウイルスを含むの多くウイルスで

## 連絡先

〒113-8519 東京都文京区湯島1-5-45

TEL : 03-5803-5234

FAX : 03-5803-0169

E-mail : tak-yokota.nuro@tmd.ac.jp

有効な siRNA の報告がある。ここでは、我々が作製した C 型肝炎ウイルス (HCV) に対する siRNA について<sup>5)</sup> 紹介する。

### 2. siRNA ターゲットサイトの選択

HCV 遺伝子は 9600 塩基からなるプラス 1 本鎖 RNA で、5' と 3' 非翻訳領域 (UTR) に挟まれた ORF からなる。5' 側の 341 塩基の UTR は複雑な RNA 構造の IRES (internal ribosome entry site) (一部コアタンパクコード領域に及ぶ) を含み、HCV RNA はキャップ非依存的にこの 5' IRES により翻訳される。3' UTR にはポリ U 配列と 98 塩基からなる 3'X 領域が存在している。ORF は 5' から C, E1, E2, p7 の構造蛋白, NS2, NS3, NS4A, NS5A, NS5B の非構造蛋白を含む 3010 のアミノ酸からなる 1 本の大きなポリプロテインをコードしている (図 1 上)。

HCV は 1 本鎖 RNA ウイルスであるがゆえ、プルーフリーディング機能がなく、ウイルス複製時に特に ORF 領域において RNA ポリメラーゼの読み違いによる変異を起こし易い。HCV 遺伝子が同定されて以来、様々な遺伝子型が報告されてきたが、現在では分子進化学的に遺伝的に距離

をもつ 6 つの遺伝子型に分類、整理されている。また、同一個体内においても遺伝子配列の異なったウイルス集団が存在して quasispecies と呼ばれている。

Quasispecies の問題から、もし siRNA にその配列上ターゲットサイトとのミスマッチ変異が生じた場合、特にその変異部位が 19 nt のうち 5' から 9-13 塩基目付近であると、たとえ 1 塩基でも大きく切断効率を下げる場合があることが報告されている<sup>14)</sup>。実際に HIV で siRNA の効果が HIV に生じた点変異で著しく減弱すること報告されている<sup>15)</sup>。そこで我々は HCV の遺伝子型に関わらず 92-98% 配列が保存されている 5'UTR IRES に siRNA のターゲットを絞ってデザインした (図 1 下)。siRNA の至適配列については、一定の法則がわかっている。siRNA が RISC に取り込まれる際にアンチセンス鎖がとりこまれるために、アンチセンス鎖の 5' 末端の内部エネルギーが低いことが望ましく 5' 末端が A または U であるなどが重要とされる<sup>16)17)18)</sup>。

### 3. HCV に対する siRNA の効果

HCV は通常の培養細胞には感染せず、感染培養細胞がないことが、HCV 研究の大きな妨げとなっていたが、1999 年

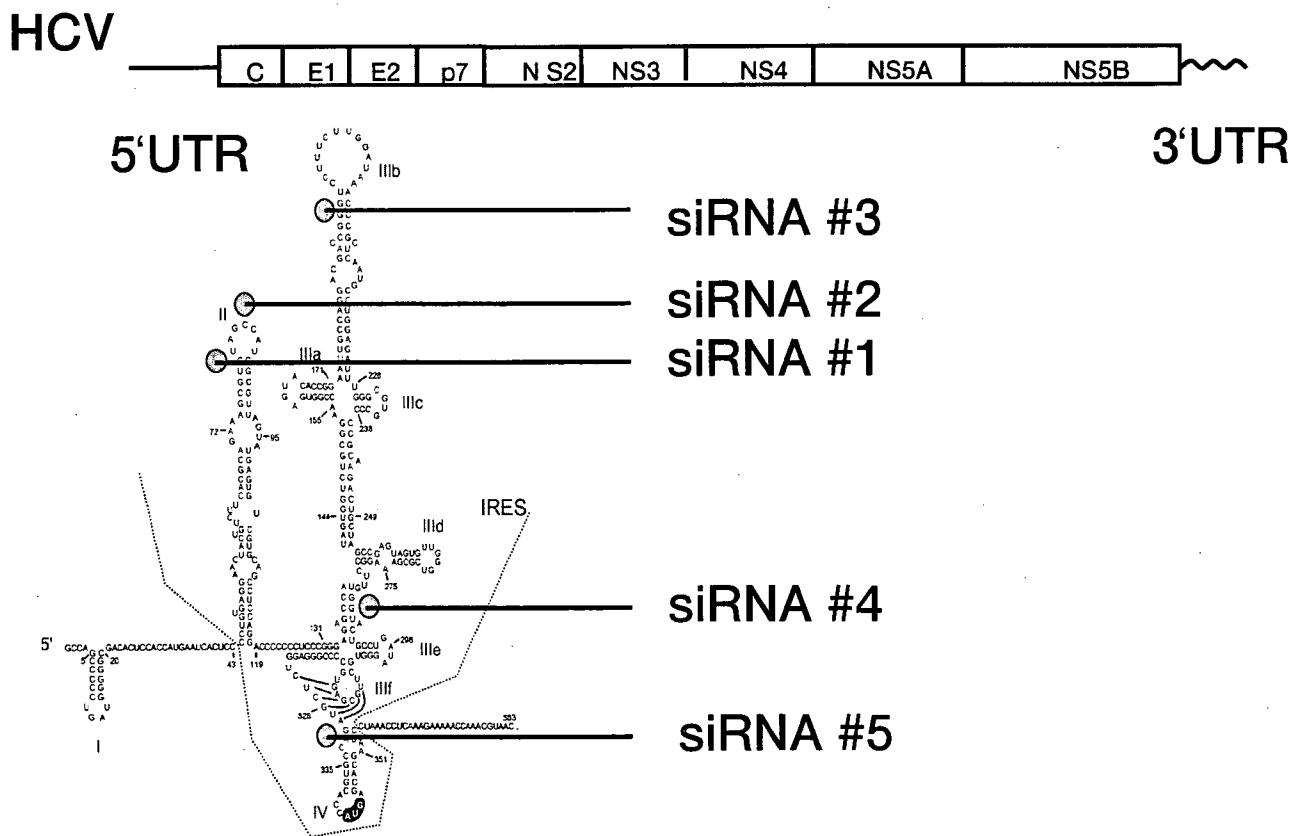


図 1 (上) HCV の遺伝子構造と (下) HCV 5'UTR IRES の RNA の 2 次構造と siRNA のターゲット部位

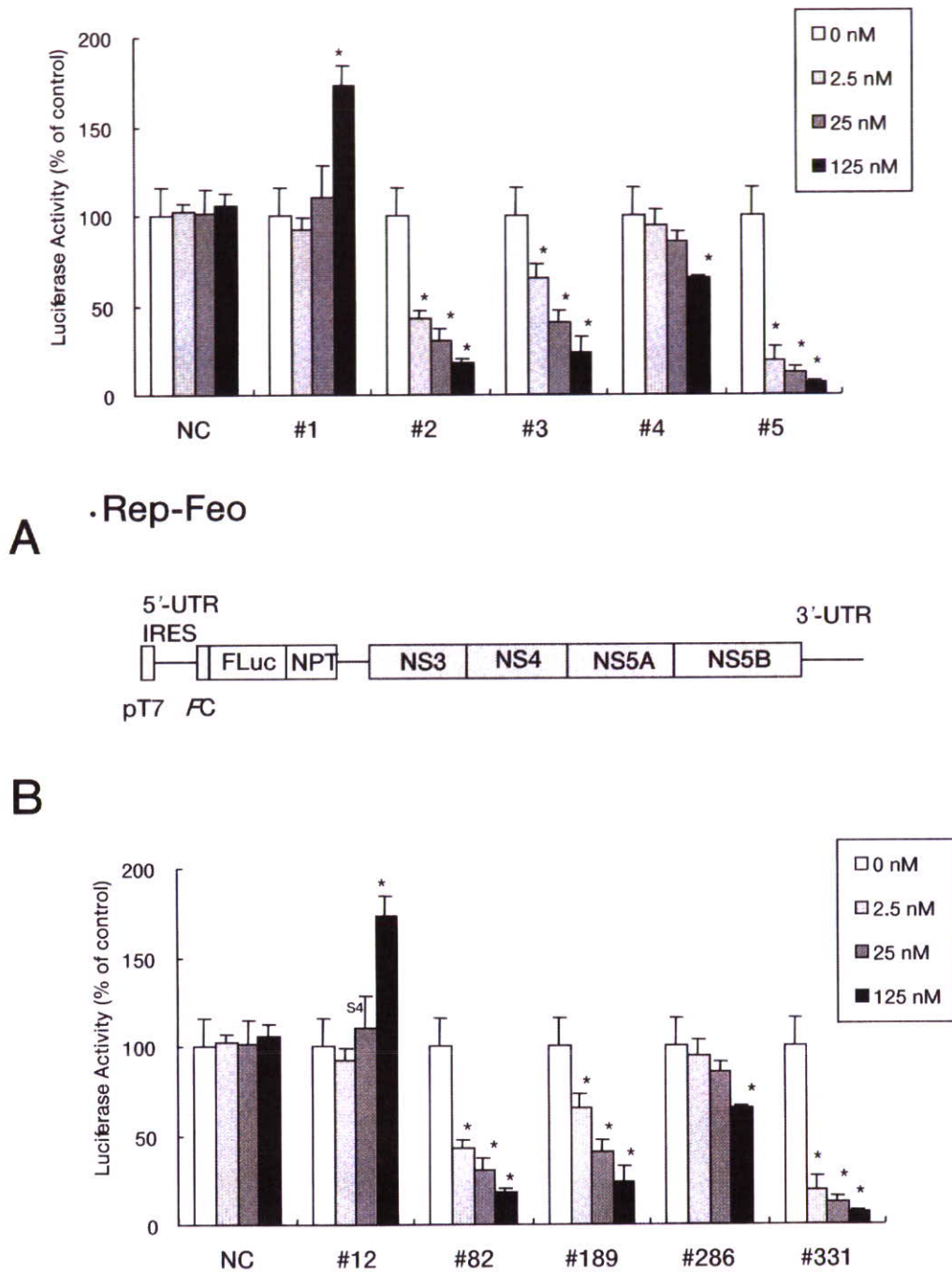


図2 合成 siRNA の HCV レプリコン (Rep-Feo) へのルシフェラーゼ活性抑制効果 (文献 5 から転載)

に Bartenschlagar らによりヒト肝細胞癌株 Huh-7 細胞を用いて HCV の自己増殖を可能にした HCV レプリコンが報告された。HCV ゲノムの構造蛋白をコードする部分をネオマイシン耐性遺伝子に置換した構造で、ヒト肝細胞癌株 Huh-7 細胞に導入して、HCV の複製機構を介して獲得したネオマイシン耐性によって安定増殖クローンが選択され、さらにレポーター遺伝子としてネオマイシン耐性遺伝子にルシフェラーゼ遺伝子を融合させて、HCV 遺伝子複製効率

をルシフェラーゼ活性によって簡便に評価できるようになった。

図 2 に我々の 5' UTR IRES に対してデザインした siRNA の効果を示す。上記 HCV レプリコン (Rep-Feo) システムにおいて siRNA331 が最も有効に発現を抑制した。コントロールに比較して 125 nM の siRNA 濃度では 97% のルシフェラーゼ活性の抑制が達せられ、2.5 nM の非常に低濃度 siRNA でも約 80% の抑制が見られた。この結果