

はHCV レプリコン RNA のノザンブロットや非構造タンパクのウエスタンブロットでも確かめられた (図3)。この siRNA の効果は従来の機能性核酸試薬であるアンチセンスオリゴDNA, リボザイムと効果の比較しても圧倒的に低濃度でより高い抑制活性であった。

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 TSG101¹⁹⁾ や NF κ B p65²⁰⁾ 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受容体を標的としてその発現を抑

制する方法も成果があり注目されている²¹⁾。CD34+ 造血幹細胞に CCR5 に対する siRNA をレンチウイルスで安定発現させたところ, 正常に分化して *in vitro* でマクロファージに *in vivo* で T 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持たれている²²⁾。

4. HCV に対する siRNA 発現ウイルスベクターの *in vivo* 効果

siRNA をウイルスベクターで細胞内に発現するためには siRNA 発現 DNA ベクターの作製が必要である。我々は Pol III 系のプロモーターであるヒト U6 プロモーターの下流に

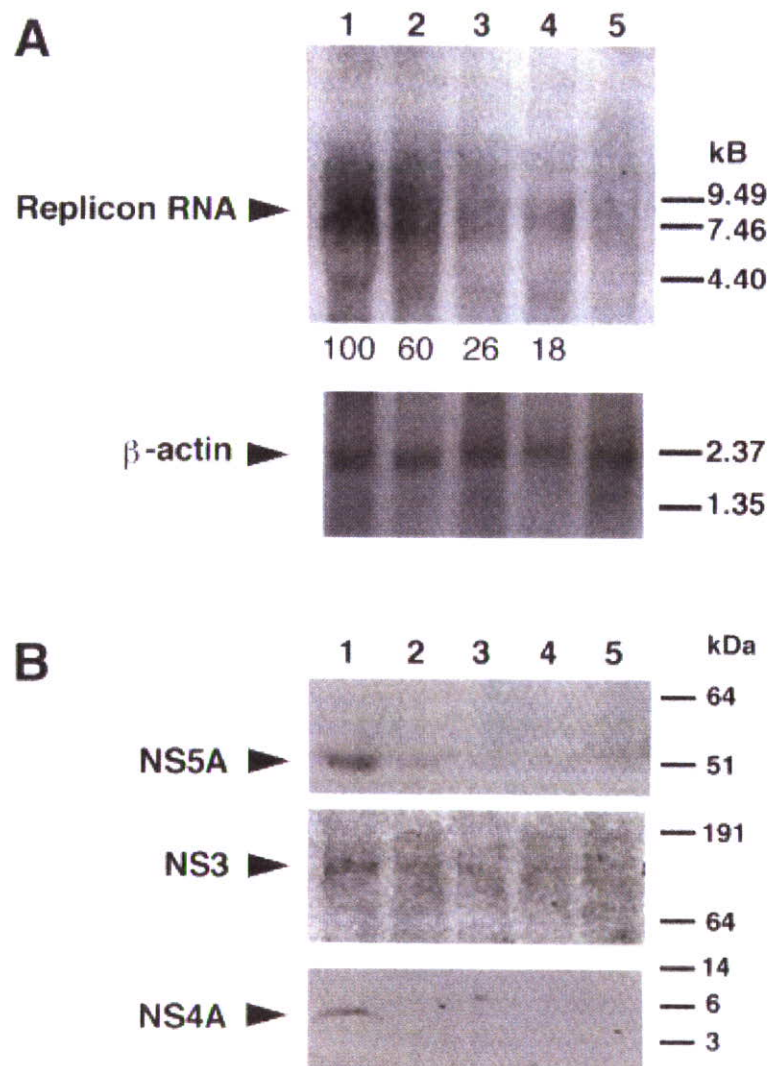


図3 siRNA331 の HCV レプリコン RNA, 非構造タンパクへの発現抑制効果 (文献5 から転載)

(A) レプリコン配列全長に対するプローブを用いたノザンブロット

(B) NS5B に対するプローブや抗体を用いたウエスタンブロット

lane 1, mock; lane 2 siRNA 331 2.5 nM; lane 2 siRNA 331 25 nM; lane 2 siRNA 331 125 nM; no transfection

ステムループタイプの siRNA 発現ベクター配列を挿入してその効果を検索した。ステムループタイプでは複製に際してセンスやアンチセンス配列に高頻度に変異が入ることが知られており、それを防ぐため複数のミスマッチ変異をセンス鎖に導入した²³⁾。これによって、HCV ゲノム切断効率は下がらず、より安定な siRNA 発現ベクターが完成した。さらにこれをアデノウイルスベクターに導入することによって、HCV レプリコンのルシフェラーゼ活性を測定感度以下にすることに成功し、これを用いて肝臓に HCV ゲノムが発現するトランスジェニックマウスにおいて、*in vivo* での HCV 遺伝子発現抑制に成功している (論文投稿中)。さらに、現在、サルでの C 型肝炎モデルにおいてその効果を検証中である。

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。McCaffrey²⁴⁾らはマウスの尾静脈から 10-50 (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 の導入に成功した。この方法によって腎臓、脾臓、肺、すい臓にも有効な siRNA の導入が可能である²⁵⁾。このハイドロダイナミックス導入法で導入された Fas²⁶⁾ や caspase 8²⁷⁾ 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との報告がされた。このハイドロダイナミックス導入法をそのまま臨床応用することは難しいが、siRNA が *in vivo* で有効に作用することを示した重要な報告である。最近、siRNA のセンス鎖の 3' 末端にコレステロールを結合させることにより、通常速度の静脈注射でも肝臓と腸管への導入が可能でありことが示された²⁸⁾。その他、肝臓への有効なカチオニックリポソームベクターが次々と開発されており²⁹⁾³⁰⁾、期待できる。

長期の抑制効果にはウイルスベクターが必要となる。ステムループタイプアピン型 siRNA 発現ベクターコンストラクトをアデノウイルス³¹⁾ やレンチウイルス³²⁾、レトロウイルス³³⁾、アデノ随伴ウイルス³⁴⁾ 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。特に最近開発されたアデノ随伴ウイルスの新しい血清型 8 型 (AAV-8) は非常に高い遺伝子導入効率があり期待されている^{35,36)}。

6. おわりに

siRNA による臨床応用には siRNA のデリバリーと off-target が大きな問題点であろう。肝臓は siRNA のデリバリーの面では最も良い臓器の 1 つと考えられ、特にウイルス

性肝炎は siRNA のターゲットの疾患として今後の発展に大いに期待が持たれる。

文 献

- 1) Elbashir S., Harborth, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. : Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494-498, 2001.
- 2) BrummelkampTR, Bernards R, Agami R. : A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 29: 550-553, 2002.
- 3) Kawasaki H, Taira K. : Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells. *Nature*. 431: 211-217. 2004.
- 4) Kitabwalla MN, Ruprecht RM. : RNA interference—a new weapon against HIV and beyond. *Engl. J. Med.*, 347: 1364-1367, 2002.
- 5) Yokota T, Sakamoto N, Enomoto N, et al. Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO Rep* 4: 602-8, 2003.
- 6) Randel G, Grakoui A, Rice CM. Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 235-340, 2003.
- 7) Kapadia SB, Brideau-Andersen A, Chisari FV. Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100: 2014-8, 2003.
- 8) Wilson JA, Jayasena S, Khvorova A, et al. RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100: 2783-8, 2003.
- 9) Shlomai A, Shaul Y. : Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference. *Hepatology* 37: 764-770, 2003.
- 10) Giladi H, Ketzinel-Gilad M, Rivkin L, Felig Y, Nussbaum O, Galun E. : Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus replication in mice. *Mol. Ther.*, 8: 769-776, 2003.
- 11) Gitlin, L, Karelsky S, Andino, R. : Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature*, 418: 430-434, 2002.
- 12) Ge Q, McManus MT, Nguyen T, Shen CH, Sharp PA, Eisen, HN, Chen J. : RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 100: 2718-2723. 2003
- 13) McCown M, Diamond MS, Pekosz A. : The utility of siRNA transcripts produced by RNA polymerase I in down regulating viral gene expression and replication of negative- and positive-strand RNA viruses. *Virology*, 313: 514-524, 2003.
- 14) Amarzguioui, M., Holen, T., Babaie, E., & Prydz, H. Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA, *Nucleic Acids Res.*, 31: 589-595, 2003.
- 15) Boden, D. Oliver Pusch, Frederick Lee, Lynne Tucker, and Bharat Ramratnam Human Immunodeficiency

- Virus Type 1 Escape from RNA Interference. *J. Viol.*, 77: 11531-11535, 2003.
- 16) Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*. 115: 209-16, 2003.
 - 17) Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115: 199-208, 2003.
 - 18) Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A. : Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol.* 22: 326-330, 2004.
 - 19) Garrus, J.E., von Schwedler, U.K., Pornillos, O.W., Morham, S.G., Zavitz, K.H., Wang, H.E., Wettstein, D.A., Stray, K.M., Cote, M., Rich, R.L., Myszka, D.G., & Sundquist, W.I. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* 107: 55-65, 2001
 - 20) Surabhi RM, Gaynor RB. : RNA interference directed against viral and cellular targets inhibits human immunodeficiency Virus Type 1 replication. *J Virol.* 76: 12963-12973, 2002
 - 21) Arteaga HJ, Hinkula J, van Dijk-Hard I, Dilber MS, Wahren B, Christensson B, Mohamed AJ, Smith CI. : Choosing CCR5 or Rev siRNA in HIV-1. *Nat Biotechnol.* 21: 230-231, 2003.
 - 22) Qin XF, An DS, Chen IS, Baltimore, D. : Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 183-188, 2003
 - 23) Miyagishi M, Sumimoto H, Miyoshi H, Kawakami Y, Taira K. : Optimization of an siRNA-expression system with an improved hairpin and its significant suppressive effects in mammalian cells. *J Gene Med* 6: 715-723, 2004.
 - 24) McCaffrey AP, Meuse L, Pham, TT, Conklin D, Hannon G.J, Kay MA. : RNA interference in adult mice. *Nature* 418: 38-39, 2002.
 - 25) Lewis DL, Hagstrom JE, Loomis AG, Wolff JA, Herweijer H. Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nat Genet* 32: 107-108, 2002.
 - 26) Song E, Lee S-K, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar P, Lieberman J. : RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nature Med* 9: 347-351, 2003.
 - 27) Zender L, Hutker S, Liedtke C, Tillmann HL, Zender S, Mundt B, Waltemathe M, Gosling T, Flemming P, Malek NP, Trautwein C, Manns MP, Kuhnel F, Kubicka S. : Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100: 7797-802, 2003
 - 28) 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, Koteliansky V, Limmer S, Manoharan M, Vornlocher HP. : Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432: 173-8, 2004
 - 29) 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: 7721-6, 2004
 - 30) Spagnou S, Miller AD, Keller M. : Lipidic carriers of siRNA : differences in the formulation, cellular uptake, and delivery with plasmid DNA. *Biochemistry.* 43: 13348-56, 2004.
 - 31) Xia H, Mao Q, Paulson HL, Davidson BL. : siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. *Nat. Biotechnol.*, 20: 1006-1010, 2002.
 - 32) Qin XF, An DS, Chen IS, Baltimore D. : 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.
 - 33) Barton GM, Medzhitov R. : Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 14943-14945, 2002.
 - 34) Hommel JD, Sears R., Georgescu D, Simmons DL, DiLeone RJ. : Local gene knockdown in the brain using viral-mediated RNA interference. *Nature Medicine* 9: 1539 - 1544, 2003.
 - 35) Nakai H, Fuess S, Storm TA, Muramatsu S, Nara Y, Kay MA. : Unrestricted hepatocyte transduction with adeno-associated virus serotype 8 vectors in mice. *J Virol.* 79: 214-24, 2005.
 - 36) Wang Z, Zhu T, Qiao C, Zhou L, Wang B, Zhang J, Chen C, Li J, Xiao X. : Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nat Biotechnol.* 23: 321-8, 2005.

Gene therapy of virus replication with RNAi

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 short interference RNA (siRNA) cleaves target RNA even in mammalian cells without adverse effects of long dsRNA such as an interferon response, and works much more efficiently than antisense oligonucleotide and ribozyme. The clinical application of siRNA has been tried especially for the viral diseases. 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.

Neuroscience

RNA干渉を用いた神経疾患の遺伝子治療

横田隆徳¹⁾

Takanori YOKOTA

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

I. はじめに

RNA干渉(RNAi)は、いかなる遺伝子に対してもデザインできて、その標的遺伝子の発現抑制効果は他の核酸医薬であるアンチセンス核酸の $10^3\sim 7$ 倍、リボザイムの $10^2\sim 5$ (自験)高いといわれている。しかもその配列特異性も高く、1塩基の違いの認識も可能であり、医療分野におけるその臨床応用については発見当初から大きく期待されていた。それは、RNAiライブラリーをはじめとする創薬におけるツールといった側面と、short interfering RNA (siRNA)を直接核酸医薬として疾患に適応するという二つの側面から行われている。

ここでは、すでにウイルス性疾患、遺伝性疾患、悪性腫瘍などで急速に進んでいるsiRNAの核酸医薬としての開発の研究現状と問題点について神経疾患を中心に概説したい。

II. RNA干渉(RNAi)

長い2本鎖RNAによって誘導される遺伝子発現抑制であるRNAi現象は植物から昆虫、哺乳動物に至るまで広く保存して観察され、元来真核細胞に備わった抗ウイルス機構として知られていた。

細胞内に導入された2本鎖RNAは、Dicerと

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

しかし、哺乳動物における2本鎖RNAの導入ではPKRや2'5'oligoadenylate synthetaseの活性化による非特異的な翻訳抑制やRNAの分解が生じ、ホストの細胞が死んでしまうため、分子生物学的手法としても、遺伝子治療の方法としてもRNAiの利用の大きな妨げになっていた。

しかし、2000年にRNAi機構の中間産物であるsiRNAを合成して用いることによってこれらの副反応が回避され、siRNAの配列に特異的な遺伝子発現抑制が可能となった¹⁾。

III. siRNAを用いた遺伝性疾患の遺伝子治療の考え方

遺伝性疾患でゲノム遺伝子の変異が原因で発症する場合、遺伝子変異に起因する発症機序には変異のある遺伝子の遺伝子産物であるタンパク本来のもつ機能の消失または低下する場合

(loss of function) と変異遺伝子や変異タンパクが新たに病的機能を獲得する場合 (gain of function) の二つがあることが知られている。

遺伝子変異が常染色体にある場合、対立する二つのアリ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、一方のアリ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リからは原則として正常個体の半分の量の正常のタンパクは発現しているので、本来のタンパクの機能の影響は少ないかまったくなく、変異アリから発現した変異タンパクが何らかの正常と異なった機能 (gain of adverse function) や毒性 (gain of toxic function) を新たに獲得することにより疾患が発症することが想定されている。

SOD1 変異による筋萎縮性側索硬化症(ALS)、各種ポリグルタミン病、APPやPS1 遺伝子変異によるAlzheimer病、 α -synuclein変異によるParkinson病などの常染色体優性遺伝形式を示す主要な神経変性疾患の多くでgain of toxic functionがその発症機序と考えられている。このような疾患の治療を考える場合、変異したタンパクの発現を抑制する方法があれば、その機序のいかんにかかわらず発症、進行を防止することが期待できるわけである。

IV. siRNAの特異性：変異遺伝子特異的なsiRNA

siRNAと基質RNAとの特異性については、ミスマッチの位置によってその効果は異なる。5'側は基質との結合よりRISCとのかかわりから基質を切断するルーラー (物差し) として働

き、基質の認識としては3'側のほうが重要で、したがってミスマッチによる失活効果が強いと考えられている。

変異が1塩基の違いである点変異でも正常アリと変異アリの配列の差を認識して変異アリのみを切断できるsiRNAの作製は可能である。図1に家族性ALSの原因遺伝子であるSOD1の点変異G93Aを選択的に切断しても正常配列にはほとんど影響しないsiRNAの例を示す¹³⁾。同様の報告はfrontotemporal dementia⁴⁾や捻転dystonia²⁾でも報告されている。

ポリグルタミン病のように繰り返し配列の長さが変わることが変異である場合は、この伸長した繰り返し配列そのものに対するsiRNAのデザインをすることは難しい。Machado-Joseph病(SCA3)の場合、CAGリピートの直下の下流にC/Gのpolymorphismがあり、これはCAGリピートの繰り返し配列の長さに関連している。長い繰り返しをもつ病的アリはすべてCだが、短い繰り返しをもつ正常アリでは約半数の例でGである(図2A)。

そこでわれわれはこのC/Gのpolymorphismの標的としてsiRNAを設計し、病的アリに特異的なsiRNAを作製した。ところが驚いたことに、このsiRNAはpolymorphismが変異アリと同じCである短いCAGリピートの正常アリもあまり切断しなかった(図2B)³⁾。この機序は、CAGリピート長の変化に伴うRNAの二次構造の変化によってsiRNAの標的配列へのアクセスに差異が生じたためと考えている。

V. トランスジェニックマウスへのin vivoの有効性

SCA1のトランスジェニックマウスの小脳に

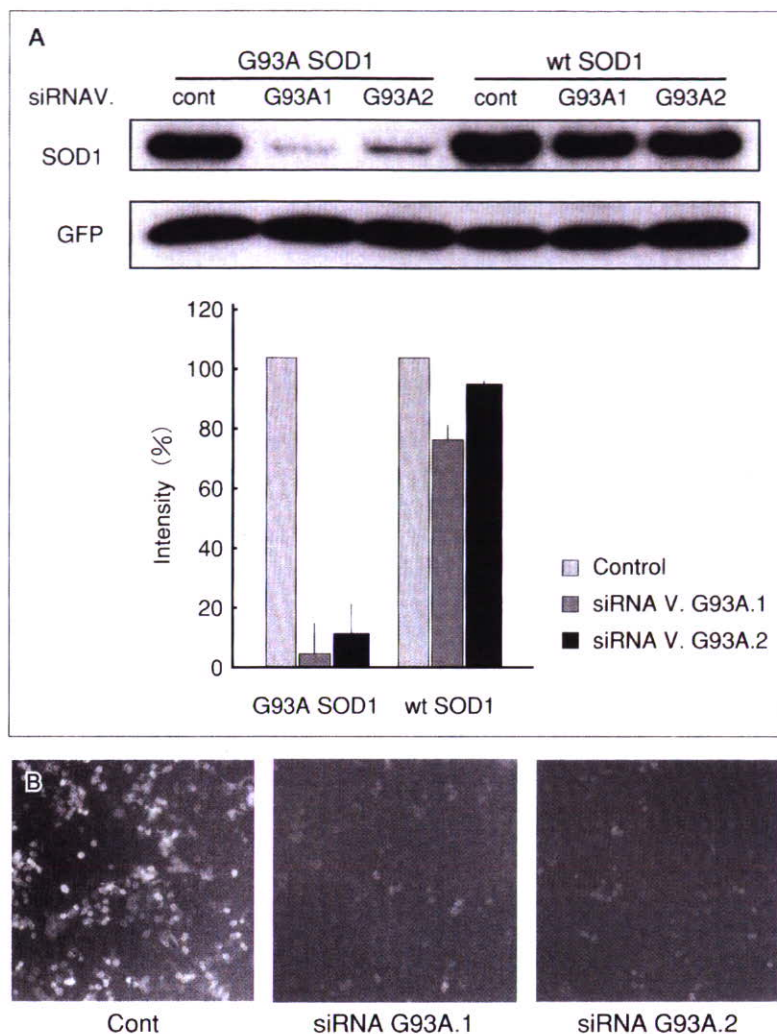


図1 変異SOD1に特異的に作用するsiRNA

A：293T細胞にG93Aまたは野生型SOD1発現ベクターとsiRNAG93A1, 2を共発現させ、野生型および変異SOD1の発現をウエスタンブロットした。siRNAG93A1, 2をともにG93ASOD1の発現を著明に抑制して、野生型SOD1の発現はほとんど抑制しなかった。

B：GFPをタグにSOD1の発現を蛍光顕微鏡にて撮影（文献¹⁾より改変）。

siRNA発現型アデノ随伴ウイルスを注入して、運動障害と神経変性を改善したとの報告がなされた¹⁾。さらに最近、SOD1に対するsiRNA発現型lenti-virusを全身の骨格筋に注射して逆行性に運動ニューロンにsiRNAを発現させ、G93A変異SOD1トランスジェニックマウスの発症を抑制した報告もされている⁶⁾。

われわれもSOD1に対するsiRNAを過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製して、これをALSのモデルマウスであるG93A変異SOD1トランスジェニックマウスと掛け合わせ、全身の変異SOD1タンパクの発現を80%以上抑制することに成功した（図3）。この効果により8月齢の時点でALS症状の発症は完全に

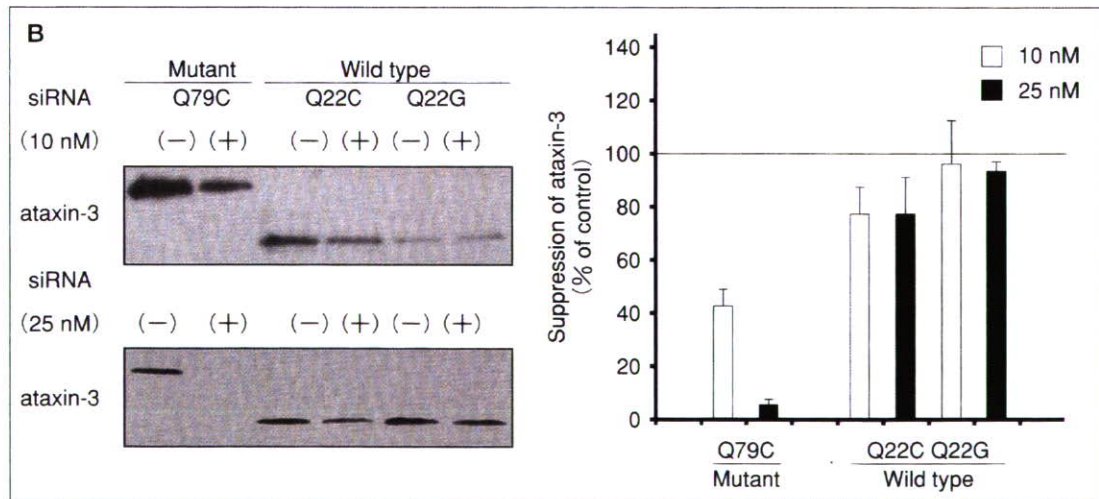
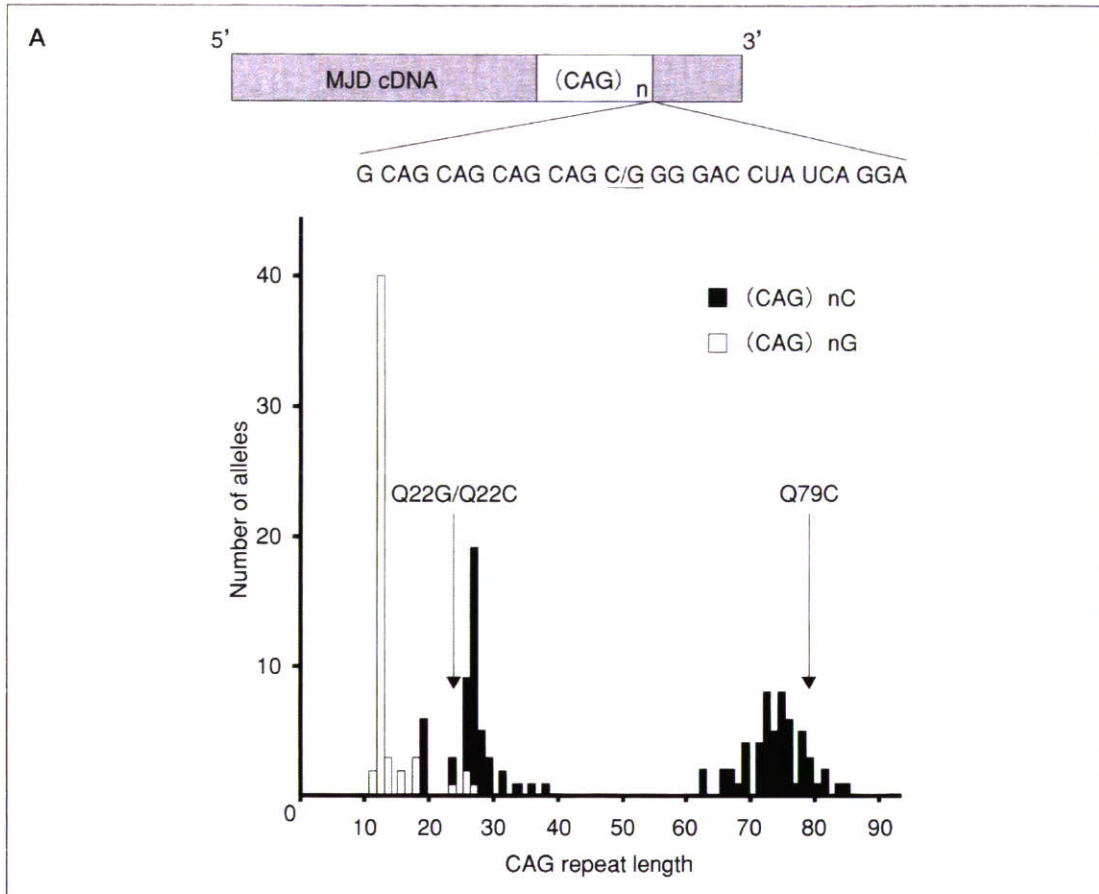


図2 Machado-Joseph病 (MJD) RNAに対する配列変異アリル特異的な一次配列非依存的な siRNA の切断

A : MJD病遺伝子はMJD遺伝子内のCAG repeatの伸長によって発症する。CAG repeatの後にはG/C polymorphismがあり、伸長したCAG repeatをもつ変異アリルはすべてGで、正常アリルではG/Cが同頻度で見られる。

B : われわれのデザインしたMJD siRNAはこの1塩基の差を認識して変異アリル (Q79C) を切断し、正常アリル (Q22G) は切断しなかった。加えて、驚いたことにこのMJD siRNAはQ79Cと標的配列のまったく同じのもう一つの正常アリル (Q22C) もわずかにしか切断しなかった (文献⁴より改変)。

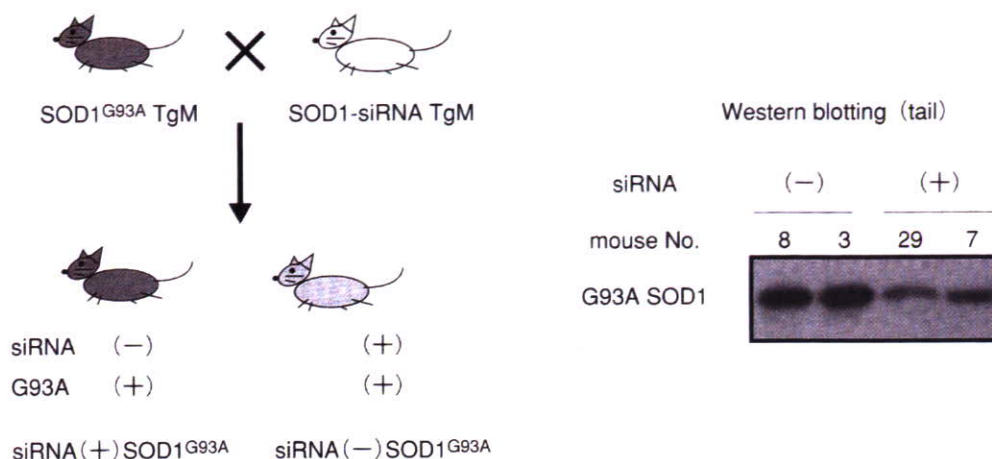


図3 SOD1G93Aトランスジェニックマウスの遺伝子治療

SOD1に対するsiRNAを過剰発現させたトランスジェニックマウスをALSのモデルマウスであるG93A変異SOD1トランスジェニックマウスと掛け合わせることで(左)、変異SOD1タンパクの発現を80%以上抑制することに成功した(右)。6月齢の時点でALS症状の発症は完全に抑制されている。

抑制されている。

VI. がんに対する *in vivo* の有効性

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

VII. siRNAの *in vivo* へのデリバリー

siRNAは細胞質でRISCに取り込まれて切断活性を発揮することより、siRNAのデリバリーは細胞膜さえ越えればよく、遺伝子治療によ

く使われる発現DNAベクターのように核にアクセスする必要がない。

マウスの尾静脈から10~50μgの合成siRNAを体重の5~10%の大量のPBS溶液で5~7秒の短時間で注入するハイドロダイナミックス導入法でマウスの肝細胞にsiRNAの導入に成功した。さらに最近、この導入法で導入されたFas⁷⁾やcaspase 8に対する合成siRNAでマウスに誘発された劇症肝炎による死亡率を低下させたとの報告がされた。このハイドロダイナミックス導入法をそのまま臨床応用することは難しいが、siRNAが *in vivo* で有効に作用することを示した重要な報告である。

ハイドロダイナミックス導入法によりsiRNAが肝臓以外に腎臓、脾臓、肺、すい臓に導入可能であることが報告されているが、脳血管関門があるため中枢神経系には入らない。

しかし、ハイドロダイナミ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、ヒトへの応用は難しい。

最近、siRNAのセンス鎖の3'末端にコレス

テロールを結合させることにより通常の水速の静脈注射でも肝臓と腸管への導入が可能であることが示された⁹⁾。また、IgGをsiRNA結合させて受容体を介したsiRNAの新しいデリバリーも報告されている⁸⁾。そのほかにも有望なカチオンベクターが次々に報告されているが、神経細胞への導入には成功していない。

ヘアピン型siRNA発現ベクターコンストラクトをアデノウイルスやレンチウイルス、レトロウイルス、アデノ随伴ウイルスなどのウイルスベクターに組み込んで作製したsiRNA発現ウイルスベクターを用いて、*in vivo*の神経細胞へのsiRNA導入の報告が次々とされている。特に最近開発されたアデノ随伴ウイルスの新しい血清型8型(AAV-8)は非常に高い遺伝子導入効率があり、期待されている。

VIII. まとめ

siRNAの核酸医薬としての臨床応用の研究にはoff-target effectなど安全性の問題やsilencingなど効果の持続の問題、血液脳関門を越えるデリバリー方法など解決すべき課題はまだ多くある。しかし、siRNAの遺伝子抑制効果は顕著で、その機序は急速に解明され、基礎研究は爆発的に進んでいる。したがって、非常に近い将来に難治性疾患での新しい治療法の開発にsiRNAの利用が突破口になることに十分に期待したい。

文 献

- 1) Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al: Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494-498, 2001
- 2) Gonzalez-Alegre P, Miller VM, Davidson BL, et al: Toward therapy for DYT1 dystonia: allele-specific silencing of mutant TorsinA. *Ann Neurol* 53: 781-787, 2003
- 3) Li Y, Yokota T, Taira K, et al: Sequence-dependent and independent inhibition specific for mutant ataxin-3 by small interfering RNA. *Ann Neurol* 56: 124-129, 2004
- 4) Miller VM, Xia H, Marrs GL, et al: Allele-specific silencing of dominant disease genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7195-7200, 2003
- 5) Nogawa M, Yuasa T, Kimura S, et al: Intravesical administration of small interfering RNA targeting PLK-1 successfully prevents the growth of bladder cancer. *J Clin Invest* 115: 978-985, 2005
- 6) Ralph GS, Radcliffe PA, Day DM, et al: Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nat Med* 11: 429-433, 2005
- 7) Song E, Lee SK, Wang J, et al: RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nature Med* 9: 347-351, 2003
- 8) Song E, Zhu P, Lee SK, et al: Antibody mediated *in vivo* delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat Biotechnol* 23: 709-717, 2005
- 9) Soutschek J, Akinc A, Blamlage B, et al: Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432: 173-178, 2004
- 10) Verma UN, Surabhi RM, Schmaltieg A, et al: Small interfering RNAs directed against beta-catenin inhibit the *in vitro* and *in vivo* growth of colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 9: 1291-1300, 2003
- 11) Xia H, Mao Q, Eliason SL, et al: RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nat Med* 10: 816-820, 2004
- 12) Yano J, Hirabayashi K, Nakagawa S, et al: Antitumor activity of small interfering RNA/cationic liposome complex in mouse models of cancer. *Clin Cancer Res* 10: 7721-7726, 2004
- 13) Yokota T, Miyagishi M, Hino T, et al: siRNA-based inhibition of superoxide dismutase expression; potential use in familial Amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Com* 314: 283-291, 2004

RNA干渉による神経変性疾患の遺伝子治療の現状

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

RNA干渉(RNA interference: RNAi)は配列特異的な遺伝子発現抑制法で、いかなる遺伝子に対してもデザインできて、その標的遺伝子の発現抑制効果は極めて高く、しかもその配列特異性も高く1塩基の違いの認識も可能である。RNAi中間産物である short interfering RNA (siRNA)は、分子生物学の手法として広く利用されているが、核酸医薬としてもウイルス性疾患、遺伝性疾患、悪性腫瘍などで臨床応用に向けた研究が急速に進んでいる。本稿では、遺伝性神経変性疾患を対象を絞って、siRNAによる遺伝子治療の開発と問題点について概説したい。

siRNAを用いた遺伝性神経変性疾患の遺伝子治療の考え方

遺伝性疾患でゲノム遺伝子の変異が原因で発症する場合、遺伝子変異に起因する発症機序には変異のある遺伝子の遺伝子産物である蛋白の本来のもつ機能が消失または低下する場合(loss of function)と変異遺伝子や変異蛋白が新たに病的機能を獲得する場合(gain of function)の2つがあることが知られている。遺伝子変異が常染色体にある場合、対立する2つのアレルの双方に遺伝子変異があってはじめて発症する常染色体劣性遺伝形式の疾患の多くはloss of functionをその機序とし、一方のアレルのみで発症する常染色体優性遺伝形式の疾患の多くの場合はgain of functionであることが多い。常染色体優性遺伝の場合は野生型のアレルからは原則として正常個体の半分の量の正常の蛋白は発現しているので、本来の蛋白の機能の影響は少ないか全くなく、変異アレルから発現した変異蛋白が何らかの正常と異なった機能(gain of adverse function)や毒性(gain of toxic function)を新たに獲得することにより疾患が発症することが想定されている。SOD1変異による筋萎縮性側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis: ALS)、各種ポリグルタミン病、APPやPS1遺伝子変異によるAlzheimer病、 α -synuclein変異によるParkinson病などの常染色体優性遺伝形式を示す主要な神経変性疾患の多くがgain of toxic functionをその発症機序と考えている。このような疾患の治療を考える場合、変異した蛋白の発現を抑制する方法があれば、その機序の如何にかかわらず発症、進行を防止することが期待できるわけである。

siRNAの特異性: 変異遺伝子特異的なsiRNA

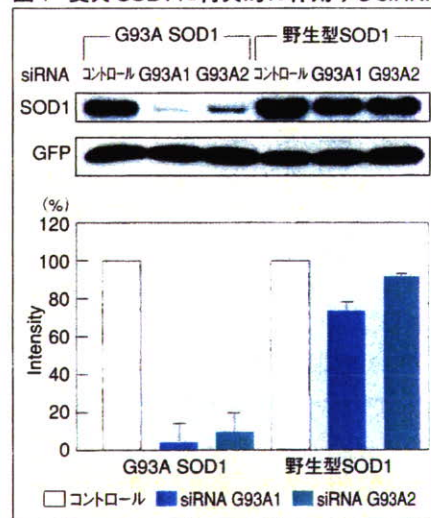
siRNAと基質RNAとの特異性について

では、ミスマッチの位置によってその効果は異なる。5'側は基質との結合よりRNA-induced silencing complex (RISC)との関わりから基質を切断するルーラー(物差し)と働き、基質の認識としては3'側のほうが重要で、したがってミスマッチによる失活効果が強いと考えられている。

変異が1塩基の違いである点変異でも正常アレルと変異アレルの配列の差を認識して変異アレルのみを切断できるsiRNAの作製は可能である。図1に家族性ALSの原因遺伝子であるSOD1の点変異G93Aを選択的に切断して正常配列にはほとんど影響しないsiRNAの例を示す¹⁾。同様の報告は捻転dystoniaやfrontotemporal dementiaで報告されている。

ポリグルタミン病のように、繰り返し配列の長さが変わることが変異である場合は、この伸長した繰り返し配列そのものに対するsiRNAのデザインをすることは難しい。Machado-Joseph病(SCA3)の場合、CAGリピートの直下の下流にC/G

図1 変異SOD1に特異的に作用するsiRNA

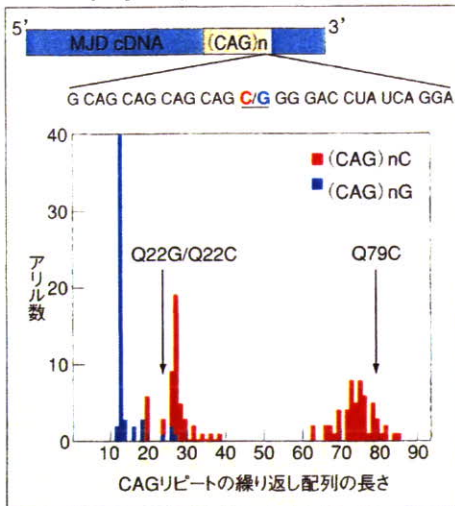


293T細胞にG93Aまたは野生型SOD1発現ベクターとsiRNA G93A1, 2を共発現させ、野生型及び変異SOD1の発現をウエスタンブロットした。siRNA G93A1, 2を共にG93A SOD1の発現を著明に抑制して、野生型SOD1の発現はほとんど抑制しなかった(上)。GFPをタグにSOD1の発現を蛍光顕微鏡にて撮影(下)。(文献1)より改変転載

<文献>

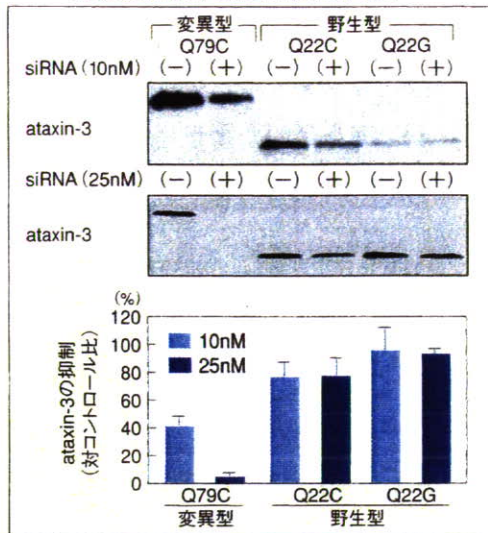
- 1) Yokota T, Miyagishi M, Hino T et al: siRNA-based inhibition of superoxide dismutase expression; potential use in familial Amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Com* 314: 283-291, 2004
- 2) Li Y, Yokota T, Taira K et al: Sequence-dependent and independent inhibition specific for mutant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

図2 Machado-Joseph病におけるCAGリピートの繰り返し配列の長さとのC/Gのpolymorphism



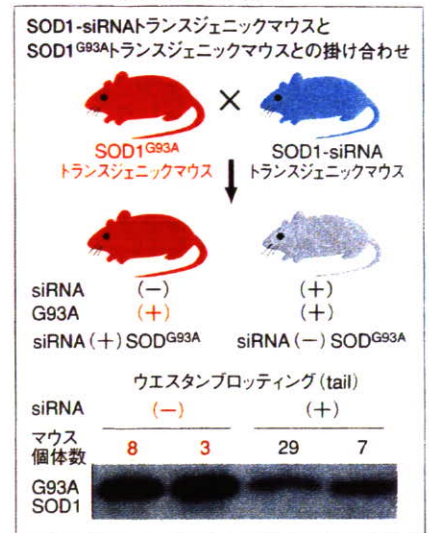
Machado-Joseph病はMJD遺伝子内のCAGリピートの伸長によって発症する。CAGリピートの後にはG/C polymorphismがあり、伸長したCAGリピートを持つ変異アリルはすべてGで、正常アリルではG/Cが同頻度で見られる。(文献2)より改変転載

図3 MJD RNAに対する配列変異アリル特異的な1次配列非依存的なsiRNAの切断



われわれのデザインしたMJD siRNAはこの1塩基の差を認識して変異アリル(Q79C)を切断し、正常アリル(Q22G)は切断しなかった。加えて、驚いたことにこのMJD siRNAはQ79Cと標的配列の全く同じのもう一つの正常アリル(Q22C)もわずかにしか切断しなかった。(文献2)より改変転載

図4 SOD1 G93A トランスジェニックマウスの遺伝子治療



SOD1に対するsiRNAを過剰発現させたトランスジェニックマウスをALSのモデルマウスであるG93A変異SOD1トランスジェニックマウスと掛け合わせることで、変異SOD1蛋白の発現を80%以上抑制することに成功した。6月齢の時点でALS症状の発症は完全に抑制されている。

のpolymorphismがあり、これはCAGリピートの繰り返し配列の長さに関連している。長い繰り返しを持つ病的アリルはすべてCだが、短い繰り返しを持つ正常アリルでは約半数の例でGである(図2)。そこでわれわれはこのC/Gのpolymorphismの標的としてsiRNAを設計して、病的アリルに特異的なsiRNAを作製した。ところが驚いたことにこのsiRNAはpolymorphismが変異アリルと同じCである短いCAGリピートの正常アリルもあまり切断しなかった(図3)²⁾。この機序は、CAGリピート長の変化に伴うRNAの2次構造の変化によって、siRNAの標的配列へのアクセスに差異が生じたためと考えている。

トランスジェニックマウスへのin vivoの有効性

SCA1のトランスジェニックマウスの小脳にsiRNA発現型アデノ随伴ウイルスを注入して、運動障害と神経変性を改善したとの報告がなされた³⁾。さらに最近、SOD1に対するsiRNA発現型レンチウイルスを全身の骨格筋に注射して、逆行性に運動ニューロンにsiRNAを発現させて、G93A変異SOD1トランスジェニック

マウスの発症を抑制した報告もされている⁴⁾。われわれもSOD1に対するsiRNAを過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製して、これをALSのモデルマウスであるG93A変異SOD1トランスジェニックマウスと掛け合わせ、全身の変異SOD1蛋白の発現を80%以上抑制することに成功した。この効果により、6月齢の時点でALS症状の発症は完全に抑制されている(図4)(投稿中)。

siRNAのin vivoへのデリバリー

最近、siRNAのセンス鎖の3'末端にコレステロールを結合させることにより、通常の静脈注射でも肝臓と腸管への導入が可能でありことが示された⁵⁾。その他にも、有望なカチオンベクターが次々に報告されている。しかし、これらの非ウイルスベクターの持続時間は短く、長期の抑制効果にはウイルスベクターが必要となる。各種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が、血液脳関門を有効に越える方法はいまだ確立していない。

siRNAのoff-target効果などの副反応

siRNAには、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いうわゆる交叉反応が報告されている。siRNAの配列19塩基中15塩基以上にホモロジーのある他の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、臨床応用する際に大きな問題になる可能性がある。

おわりに

siRNAの核酸医薬としての臨床応用の研究には、off-target effectなど安全性の問題やsilencingなど効果の持続の問題、血液脳関門を越えるデリバリー方法など解決すべき課題はまだ多くある。しかし、siRNAの遺伝子抑制効果は顕著で、その機序は急速に解明され、基礎研究は爆発的に進んでいる。したがって、非常に近い将来に、難治性疾患での新しい治療法の開発にsiRNAの利用が突破口になることに十分に期待したい。

特集 現実化する RNAi 創薬

RNAi の神経変性疾患治療への応用

Gene Therapy with RNAi to Neurodegenerative Diseases

横田隆徳

Takanori Yokota

遺伝性神経変性疾患においてその変異遺伝子自体を siRNA で治療するといった究極の遺伝子治療を目指した基礎研究が進行している。さらに孤発性神経変性疾患においてもその機序の解明に伴い、判明したキーとなる分子を標的とした siRNA による治療戦略も始まった。ウイルス性神経変性疾患、脳血管障害、多発性硬化症への応用も可能である。デリバリーの方法や off-target 効果など、まだまだ解決すべき問題点も多いが、siRNA の高い抑制効果からその神経変性疾患への応用が急速に進展していくことは間違いないものと思われる。

key words

siRNA, off-target 効果, アルツハイマー病, ポリグルタミン病, SOD1, 遺伝子治療

i 横田隆徳 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 脳神経機能病態 (神経内科) E-mail: tak-yokota.nuro@tmd.ac.jp
1990 年東京医科歯科大学大学院医学研究科修了, 2004 年より現所属, 助教授, 一般臨床の傍ら, 神経変性疾患の根本的な治療の実現に腐心している。

はじめに

RNAi (RNA interference, RNA 干渉) はいかなる遺伝子に対してもデザインでき, その標的遺伝子の発現抑制効果は他の核酸医薬であるアンチセンス核酸の $10^3 \sim 7$ 倍, リボザイムの $10^2 \sim 5$ (筆者; 私信) 高いと言われている。しかもその配列特異性も高く 1 塩基の違いの認識も可能であり, 医療分野におけるその臨床応用については発見当初から大きく期待されていた。それは, RNAi ライブラリーを始めとする創薬におけるツールといった側面と, siRNA (small interfering RNA) を直接核酸医薬として疾患に適用するという 2 つの側面から行われている。ここでは, すでにウイルス性疾患, 遺伝性疾患, 悪性腫瘍などで急速に進んでいる siRNA の核酸医薬としての開発の研究現状と問題点に神経変性疾患を中心に概説したい。

I. siRNA の特異性: 変異遺伝子特異的な siRNA

遺伝性疾患や癌遺伝子を siRNA で治療しようとした場合, 変異遺伝子のみを選択的に発現抑制して, 野生型には作用しないことが望ましい。siRNA と基質 RNA との特異性については, 一般に 4 塩基以上ミスマッチがあった場合で siRNA の切断活性はおおむね消失するが, 1~2 塩基のミスマッチによる切断効率の低下は完全ではなく, ミスマッチの位置によってその効果は異なる。5' 末端側は基質との結合より RISC (RNAi-induced silencing complex) との関わりから基質を切断するルーラー (物差し) として働き, 基質の認識としては 3' 末端側のほうが重要で, したがってミスマッチ

による失活効果が強いと考えられている¹⁾。

II. siRNA の特異性: off-target 効果などの副反応

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

また, 通常の 19 塩基長の shRNA (short hairpin RNA) 発現ベクターの発現によって, 動物細胞で PKR (double strand RNA activated protein kinase) の活性化などのインターフェロン反応が実は起こっていて, 非特異的なタンパク質合成と停止と RNA 変性が起こりうるという報告がされ, これもその程度によっては今後問題になるかもしれない³⁾。

III. 神経変性疾患への応用: ウイルス性, 免疫性疾患

RNAi の本来の生理学的役割の 1 つとして, 細胞に感染したウイルスのタンパク質合成を阻害する作用が考えられ, siRNA の発見以来, ウイルスゲノム遺伝子やウイルス mRNA を標的とした研究が急速に進んでいる。現在まで, HIV (human immunodeficiency virus), C 型・B 型肝炎ウ

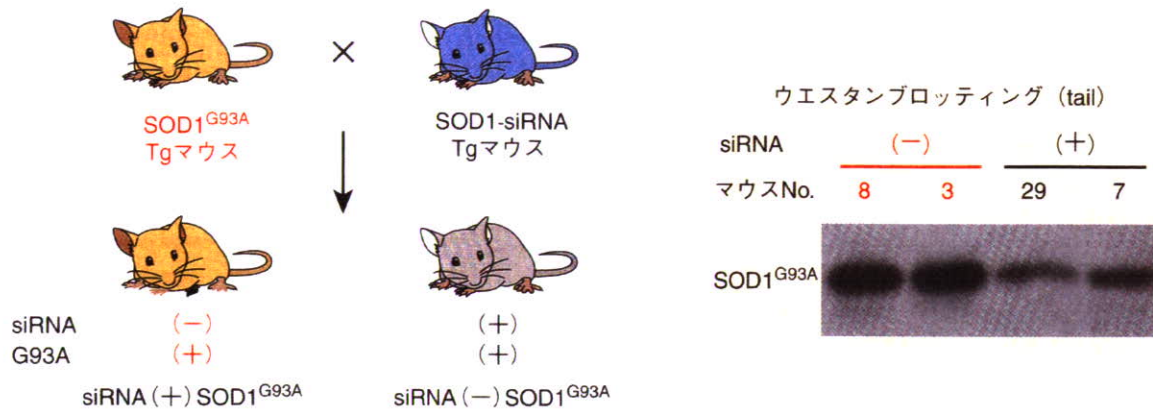


図1. SOD1^{G93A} トランスジェニックマウスの遺伝子治療

SOD1 (superoxide dismutase 1) に対する siRNA を過剰発現させたトランスジェニック (Tg) マウスを筋萎縮性側索硬化症 (ALS) のモデルマウスである G93A 変異 SOD1 (SOD1^{G93A}) Tg マウスと掛け合わせることで (左), 変異 SOD1 タンパク質の発現を 80% 以上抑制することに成功した (右). 6 カ月齢の時点で ALS 症状の発症は完全に抑制されている.

イルス, ポリオウイルス, インフルエンザウイルス, ウエストナイルウイルスで培養細胞レベルではあるが各ウイルスのレプリコンを用いるなどで有効な siRNA が報告されている. 筆者らも C 型肝炎で有効な siRNA を開発し⁴⁾, 現在サルモデルを用いた検討をしている.

また, ウイルス遺伝子そのものを標的とするのではなく, ウイルス増殖に必要な宿主側の内在性遺伝子を標的にする方法も考えられている. HIV 感染における TSG101⁵⁾ や NF- κ B p65⁶⁾ サブユニット⁶⁾ などの発現を siRNA で抑制し, HIV 増殖を抑制したとの報告もある.

さらに, CD4 や CCR5 などの HIV-1 感染におけるリンパ球側に内在するウイルス受容体を標的としてその発現を抑制する方法も成果があり注目されている⁷⁾. CD34⁺ 造血幹細胞に CCR5 に対する siRNA をレンチウイルスで安定発現させたところ, 正常に分化して *in vitro* でマクロファージに *in vivo* で T 細胞になり, その両者ともに HIV に抵抗性になったとの報告がなされ, 今後の臨床応用に期待が持たれている.

一方, IL-1 (interleukin-1) や TNF- α (tumor necrosis factor- α) などの炎症性サイトカインの発現を抑制することにより, 免疫性疾患の治療としての可能性や感染症の初期治療としての試みが報告されている⁸⁾.

IV. 神経変性疾患への応用: 遺伝性神経変性疾患

遺伝性疾患でゲノム遺伝子の変異が原因で発症する場合, 遺伝子変異に起因する発症機序には変異のある遺伝子の遺伝子産物であるタンパク質の本来の持つ機能の消失または低下する場合 (loss of function) と変異遺伝子や変異タンパク質が新たに病的機能を獲得する場合 (gain of function)

の2つがあることが知られている. 遺伝子変異が常染色体にある場合, 対立する2つのアレルの双方に遺伝子変異があ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タンパク質は発現しているため, 本来のタンパク質の機能の影響は少ないかまったくなく, 変異アレルから発現した変異タンパク質が何らかの正常と異なった機能 (gain of adverse function) や毒性 (gain of toxic function) を新たに獲得することにより疾患が発症することが想定されている. SOD1 (superoxide dismutase 1) 変異による筋萎縮性側索硬化症 (ALS), 各種ポリグルタミン病, アミロイド前駆体タンパク質 (APP) や PS1 (presenilin1) 遺伝子変異によるアルツハイマー病, α -シヌクレイン変異によるパーキンソン病などの常染色体優性遺伝形式を示す主要な神経変性疾患の多くが gain of toxic function をその発症機序と考えている. このような疾患の治療を考える場合, 変異したタンパク質の発現を抑制する方法があれば, その機序のいかんにかかわらず発症, 進行を防止することが期待できるわけである. 最近, SCA1 のトランスジェニック (Tg) マウスの小脳に siRNA 発現型アデノ随伴ウイルスを注入して, 運動障害と神経変性を改善したとの報告がなされた⁹⁾. 筆者らは SOD1 に対する siRNA を過剰発現させた Tg マウスを作製して, これを ALS のモデルマウスである G93A 変異 SOD1 Tg マウスと掛け合わせ, 全身の変異 SOD1 タンパク質の発現を 80% 以上抑制することに成功した (図 1). この効果により, 6 カ月齢の時点で ALS 症状の発症は完全に抑制されている. 野生型 SOD1 はノックアウトしても明

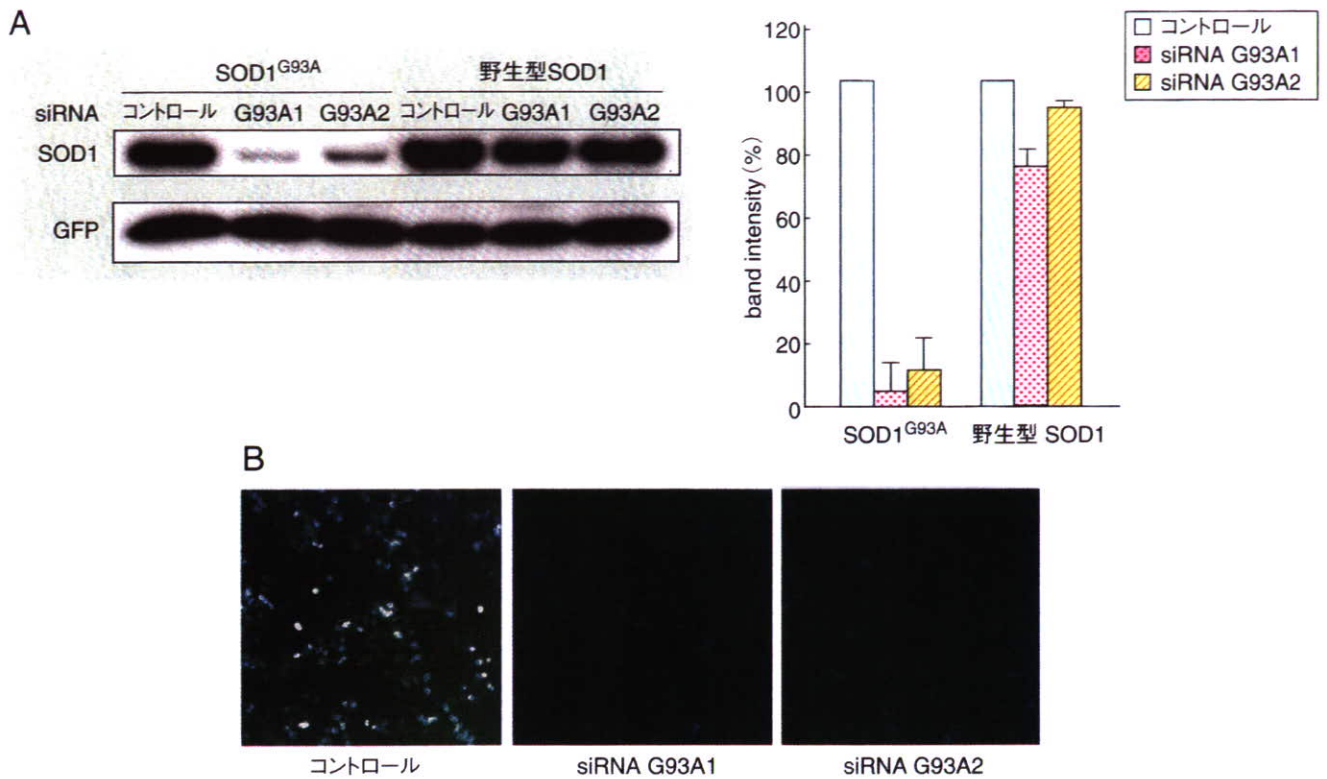


図2. 変異SOD1に特異的に作用するsiRNA

A: 293T細胞にG93Aまたは野生型SOD1発現ベクターとsiRNA G93A1, 2を共発現させ、野生型および変異SOD1の発現をウエスタンブロットした。siRNA G93A1, 2とともにSOD1^{G93A}の発現を著明に抑制して、野生型SOD1の発現はほとんど抑制しなかった。

B: GFPをタグにSOD1の発現を蛍光顕微鏡にて撮影。

Yokota T, et al: Biochem Biophys Res Commun (2004) 314: 283-291 より改変。

瞭な神経症状は示さないで副作用はない可能性が高いが、例えばSCA6の場合、その原因遺伝子カルシウム1Aチャネルのノックアウトマウスは生後1~2週で死亡することが知られており、正常アリの発現抑制は新たな症状を来す可能性が高い。したがって、優性遺伝疾患の治療には、正常アリの発現を損わずに、変異アリの発現のみを抑制することが望ましい。

上述のように、変異が1塩基の違いである点変異でも正常アリと変異アリの配列の差を認識して変異アリのみを切断できるsiRNAの作製は可能である。図2に家族性ALSの原因遺伝子であるSOD1の点変異G93Aを選択的に切断して正常配列にはほとんど影響しないsiRNAの例を示す¹⁰⁾。同様の報告は捻転ジストニア¹¹⁾やfrontotemporal dementia¹²⁾で報告されている。しかし、SOD1やPS1の点変異は100種類以上知られており、そのすべてに特異的で効率的なsiRNAがデザインできるわけではない。筆者らはいかなる遺伝子変異に対しても特異的で有効な新しいRNAi法を考案して(投稿中)、現在その*in vivo*での有効性を検証中である。

ポリグルタミン病のように、繰り返し配列の長さが変わることが変異である場合は、この伸長した繰り返し配列そ

のものに対するsiRNAのデザインをすることは難しい。MJD [Machado-Joseph病 (SCA3)]の場合、CAGリピートの直下の下流にC/Gの多型があり、これはCAGリピートの繰り返し配列の長さに関連している。長い繰り返しを持つ病的アリはすべてCだが、短い繰り返しを持つ正常アリでは約半数の例でGである^{12), 13)}(図3A)。そこで筆者らはこのC/Gの多型の標的としてsiRNAを設計して、病的アリに特異的なsiRNAを作製した。ところが驚いたことにこのsiRNAは多型が変異アリと同じCである短いCAGリピートの正常アリもあまり切断しなかった(図3B)¹³⁾。この機序は不明だが、CAGリピート長の変化に伴うRNAの二次構造の変化やMJD RNAの多型付近に結合するRNA結合タンパク質の結合度の変化によって、siRNAの標的配列へのアクセスに差異が生じるためかもしれない。

V. 神経変性疾患への応用: 孤発性神経変性疾患

ほとんどのアルツハイマー病、パーキンソン病やALSは家族歴のない孤発性で遺伝子異常は明らかでないが、それぞれの発症機序のキーとなる分子がわかれば、その発現を抑制することで治療が可能かもしれない。例えば、アルツハ

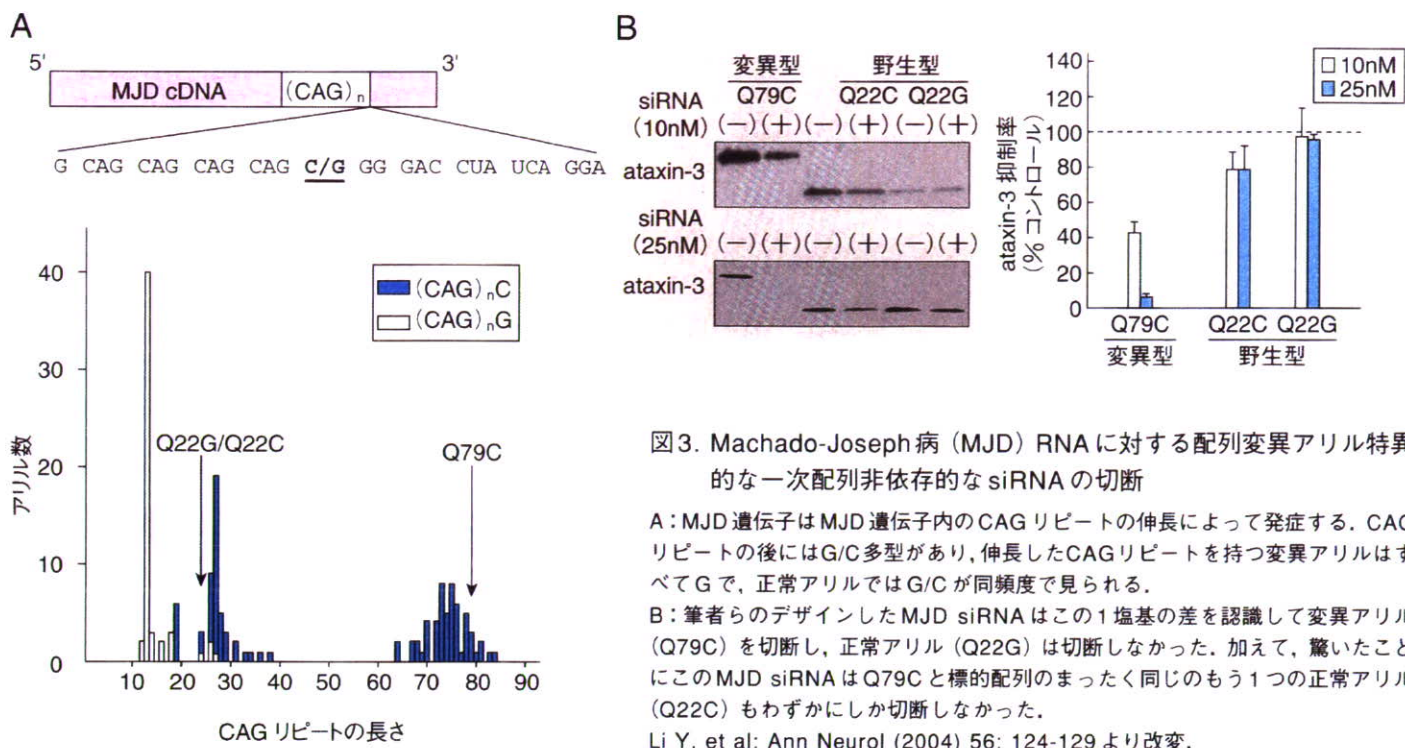


図3. Machado-Joseph病 (MJD) RNAに対する配列変異アレル特異的な一次配列非依存的な siRNA の切断

A: MJD 遺伝子は MJD 遺伝子内の CAG リピートの伸長によって発症する。CAG リピートの後には G/C 多型があり、伸長した CAG リピートを持つ変異アレルはすべて G で、正常アレルでは G/C が同頻度で見られる。

B: 筆者らのデザインした MJD siRNA はこの 1 塩基の差を認識して変異アレル (Q79C) を切断し、正常アレル (Q22G) は切断しなかった。加えて、驚いたことにこの MJD siRNA は Q79C と標的配列のまったく同じのもう一つの正常アレル (Q22C) もわずかにしか切断しなかった。

Li Y, et al: Ann Neurol (2004) 56: 124-129 より改変。

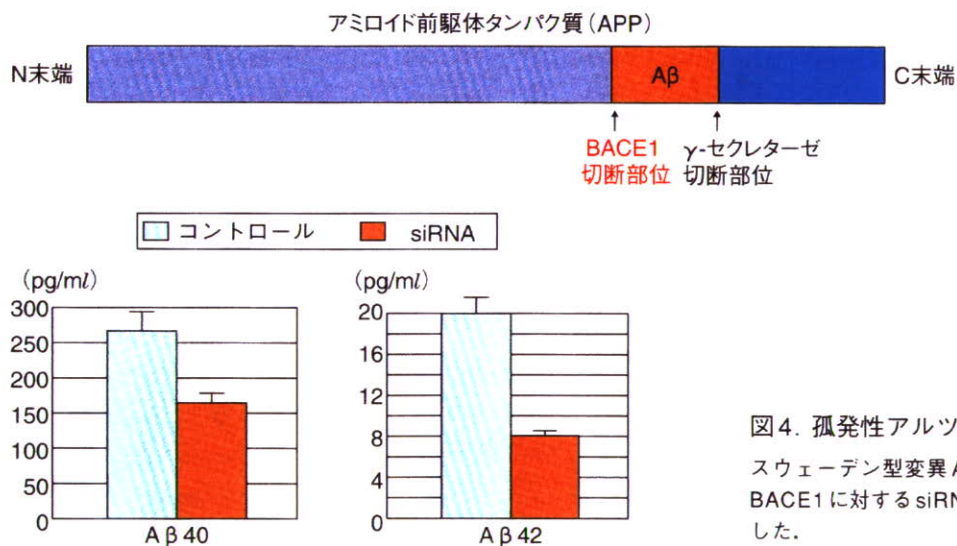


図4. 孤発性アルツハイマー病に対する siRNA による治療
スウェーデン型変異 APP (APP^{sw}) 安定発現培養細胞株において BACE1 に対する siRNA により培養液中に分泌される Aβ 産生を抑制した。

イマー病の β セクレターゼは有望な標的分子である¹⁴⁾。アルツハイマー病のモデル動物は Aβ (amyloid β) のワクチン治療やその抗体の受動免疫により老人斑の生成を抑制し、認知障害も軽減したと報告されている。最近の欧米で進められている臨床試験の結果も副作用はあるが効果はありそうである。これはアルツハイマー病の発症機序に由来から言われてきた Aβ 仮説を大きく支持するもので、Aβ の産生を抑制することが治療のターゲットとなる。Aβ は APP

から β と γ セクレターゼによって切り出されて生成される。PS1 などから成る γ セクレターゼは Notch などの他の重要な分子も基質としているためその機能を抑制すると問題が出るが、β セクレターゼの本体と言われる BACE1 のノックアウトマウスは特別の異常を示さない。筆者らも BACE1 に対する siRNA を作製して、培養細胞系で Aβ 産生を抑制できることを示した (図4)。今後、広範な神経細胞に siRNA を持続的に導入することが可能となれば、画期的な治療方法

になるかもしれない。

VI. siRNAの*in vivo*へのデリバリー

siRNAは細胞質でRISCに取り込まれて切断活性を発揮することより、siRNAのデリバリーは細胞膜さえ越えればよく、遺伝子治療によく使われる発現DNAベクターのように核にアクセスする必要がない。McCaffrey¹⁵⁾らはマウスの尾静脈から10~50 μ gの合成siRNAを体重の5~10%の大量のPBS溶液で5~7秒の短時間で注入するハイドロダイナミクス法で、マウス肝細胞へのsiRNAの導入に成功した。さらに最近、このハイドロダイナミクス法で導入されたFas¹⁶⁾やCaspase-8に対する合成siRNAが、マウスにおいて誘発された劇症肝炎による死亡率を低下させたことが報告され、siRNAが*in vivo*でも有効であることが示された。またマウスにおいて、siRNAは脳血管関門があるため中枢神経系には入らないが、肝臓のほか腎臓、脾臓、肺、膵臓に導入可能であることが報告されている¹⁷⁾。だがヒトでは、臓器組織への圧力と循環系への用量負荷のため、そのまま臨床応用することは難しい。最近、siRNAのセンス鎖の3'末端にコレステロールを結合させることにより、通常の方法の静脈注射でも肝臓と腸管への導入が可能であることが示された¹⁸⁾。その他、有効なカチオニックリポソームベクターが開発されており、これらについては和田氏や平林氏の稿を参照されたい。

長期の抑制効果にはウイルスベクターが必要となる。shRNA発現ベクターコンストラクトをアデノウイルスやレンチウイルス、レトロウイルス、アデノ随伴ウイルスなどのウイルスベクターに組み込んで作製したsiRNA発現ウイルスベクターを用いて、*in vivo*の細胞へのsiRNA導入の報告が次々とされている¹⁹⁾。特に最近開発されたアデノ随伴ウイルスの新しい血清型は非常に高い遺伝子導入効率があり期待されている。

しかし、これらのいずれの方法でも静脈注射などの全身性の投与でsiRNAを脳血管関門を越えて中枢神経系にデリバリーすることは困難で、siRNAによる神経変性疾患治療の大きな問題になっている。最近筆者らは脳血管内皮細胞へのsiRNAの導入に成功した。脳血管障害、多発性硬化症への応用が期待される。

おわりに

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

文献

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

for beginners

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



Yin Yang 1 induces transcriptional activity of p73 through cooperation with E2F1

Shourong Wu^{a,c}, Saomi Murai^a, Kazunori Kataoka^{b,c}, Makoto Miyagishi^{d,*}

^a Department of Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan

^b Department of Materials Engineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan

^c Division of Clinical Biotechnology, Center for Disease Biology and Integrative Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

^d 21st Century COE Program, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

Received 18 October 2007

Available online 1 November 2007

Abstract

The transcription factor p73 is a structural homologue of p53 and plays an important role in tumorigenesis, differentiation and development. However, the regulation of p73 pathway has not been wholly understood. Here we reported that YY1-silencing resulted in significant reductions in the activities of the p73 promoters and the endogenous p73 expression level, conversely, overexpression of YY1 could induce the activities of them. Furthermore, we showed that YY1 and E2F1 have synergistic effect on p73 promoter activity. The results of YY1-silencing and E2F1-silencing alone revealed that both factors are involved in the doxorubicin-induced activation of p73 promoter. Immunofluorescence staining and co-immunoprecipitation assays demonstrated that cooperation of YY1 and E2F1 is concomitant with physical interaction in nuclei. The results presented here suggested the cooperative transcriptional regulation of p73 by YY1 and E2F1, and might provide a new regulation mechanism by the YY1 network on tumorigenesis, differentiation and development.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Yin Yang 1; E2F1; p73; Transcriptional activation; Synergistic effect

Yin Yang 1 (YY1) is a multifunctional transcription factor that exerts its effects on genes involved in various biological processes via its ability to initiate, activate, or repress transcription depending upon the context to which it binds, directly or indirectly via cofactor recruitments [1–3]. Today, YY1 is known to have a fundamental role in normal biological processes such as embryogenesis, differentiation, DNA replication, and cellular proliferation [3]. YY1-deficient embryos died at the time of implantation, and furthermore, its heterozygote knockout mice displayed significant growth retardation and neurological defects, indicating that YY1 plays an indispensable role in embryonic development and neuronal differentiation [4,5]. Recently, the physiologic significance of YY1 activity has also been reported to be associated with tumor biology

[3,5,6]. It was known that YY1 is overexpressed in prostate cancer and sarcoma. Therefore, it is helpful to explain the cancer biological function of YY1 via studying its putative interactions with cell cycle regulators, death genes, as well as transcription factors and cofactors in the suppression or progression of various malignancies.

p73 has initially been known as a homologue of p53. They share relatively high sequence homology that includes an N-terminal transactivating (TA) domain and a central DNA binding domain. p73 has been reported to induce cell growth arrest and apoptosis in some cell lines irrespective of p53 status [7,8], and activate some p53 responsive genes, such as bax, cyclin G, IGF-BffB, and 14-3-3σ [9]. However, despite these similarities, p53 and p73 also show some fundamental differences in mechanisms and responses to DNA damage, and furthermore, in the phenotypes of their knockout mice. p73-null mice showed some defects in nervous system, which is not exhibited in p53-null mice

* Corresponding author. Fax: +81 3 5628 3770.

E-mail address: makoto-m@umin.ac.jp (M. Miyagishi).

[10,11]. On the other hand, p73-null mice do not develop spontaneous tumor formation while p53 knockout mice exhibit high susceptibility to tumorigenesis [3]. Furthermore, a very recent report showed that p73 could promote cell growth in a synergistic manner with the proto-oncogene c-Jun, and conversely, silencing p73 resulted in the reduction of growth rate and decrease of cyclin D1, indicating that p73 could act positively in tumorigenesis [12]. Therefore, p73 has a complex functions in biological processes including apoptosis, differentiation, tumorigenesis, and cell growth.

E2F1 has been identified as a regulation factor for p73 transcription. Fediconi et al. reported that responding to certain DNA damages, E2F1, but not E2F2, E2F3, or E2F4, can recruit the p73 promoter and efficiently and specifically activate its transactivation [13]. However, transcriptional regulation factors of the p73 promoter, excepting E2F1, remain unknown. Identification of other regulators that might control p73 is needed to further understand its functions and roles in tumorigenesis, differentiation and development.

Here, we identified a transcription factor, YY1, as a novel regulator of p73 transcription. Moreover, we showed that YY1 cooperates with E2F1 to induce the transcriptional activity of p73. Taken together, these findings not only shed new light on the nature of YY1's biological activities but also indicate the complex regulation mechanism of p73 in diverse biological processes.

Materials and methods

Cell cultures and chemicals. The U2fS, and HCT116 cells were obtained from the American Type Culture Collection; the Saff S2 cells were from Riken Cell Bank (Tsukuba, Japan). The U2fS and HEK293T cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich) containing 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen); The HCT116 and Saff S2 cells were maintained in McCoy's 5A medium (Invitrogen) containing 10% FBS or 15% FBS, respectively.

Plasmids and constructs. The long human p73-Luciferase reporter, which contains the p73 gene fragment –4052 to +438, was generously provided by Prof. Levrero (University of Rome 'La Sapienza', Rome, Italy) [13]. The short human p73-Luciferase reporter (–857 to +71) and the human p21-Luciferase reporter were constructed by inserting each fCR products into the BglII site and HindIII site of the pGL4 basic vector (ffromega).

To generate the Flag-E2F1 expression vector, pEF9-Flag-E2F1, the coding regions of human E2F1 were amplified by fCR and inserted into the HindIII and BamHI restriction sites of pEF9 vector [14]. For the YY1 expression vector, the coding region of human YY1 was inserted into the pcDNA3 vector (Invitrogen). For construction of the HA-YY1 vector for use in immunofluorescence staining, the YY1 coding region in pcDNA3-YY1 was excised and inserted into the BamHI and EcoRI sites of pcDNA3-HA. To construct the Flag-YY1 expression vector for use in co-immunoprecipitation experiments, the Flag-YY1 coding region fragment was generated by fCR using pcDNA3-YY1 as a template, and the fCR product was again inserted into pcDNA3 vector predigested with BamHI and EcoRI.

RNA interference. To construct siRNA expression vectors, oligonucleotides with a hairpin, overhanging sequences and terminator were synthesized, annealed and then inserted into the BspMI sites of the pcENTRhuU6 vector [15]. Based on the results of applying our algorithm [16], we identified the target sequences for YY1 and E2F1 genes: siYY1-1 (GCAAGAAGAGTTACCTCAG), siYY1-2 (GGCAGAATTTGCTAG

AATG), siE2F1 (GGCTGGACCTGGAAACTGA). We used a T7 siRNA expression vector, which contains a stretch of 7 thymine (Ts) terminator sequences exactly downstream of the U6 promoter, as a control.

Transient transfection and luciferase assays. The U2fS and HCT116 cells were transfected with the different p73 firefly luciferase reporters along with indicated amounts of expression vectors and *Renilla* luciferase expression vector (pRL-SV40, ffromega) for transfection normalization. For knockdown experiments, HCT116 and U2fS were transfected with siRNA expression vectors, and 24 h later selection was performed by puromycin. The selected cells were transfected with p73-luciferase reporters and pRL-SV40. FuGENE6 (Roche) were used for all transfections in U2fS cells, and Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) for HCT116 cells. Forty-eight hours after transfection, luciferase assays were performed in triplicate using the Dual Luciferase Assay System (ffromega). All relative luciferase activities were determined by calculating the ratio between firefly and *Renilla* luciferase activities, and the results were shown as means ± SDs.

Real-time RT-PCR analysis. The total RNA was isolated using TRIzol™ Reagent (Invitrogen) and treated with DNase I (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The total RNA (1 µg) were then reverse-transcribed using a QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen). Real-time fCR was carried out using an Applied Biosystems 7500 system (Applied Biosystems) and QuantiTect™ SYBR Green fCR Master Mix (Qiagen). All reactions were run in triplicate and expressional results were normalized to actin. Data were expressed as means ± SDs of triplicate wells. The primer sequences are available upon request.

Western blotting analysis. The cells were lysed in whole-cell extract buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.3, 10% glycerol, 250 mM sodium chloride, 2 mM EDTA, 0.1% Nonidet f40, and 1 mM NaF) with protease inhibitors (complete cocktail; Roche), and the lysate samples proteins were electrophorated on 10% SDS-polyacrylamide gel and transferred to a polyvinylidene fluoride (ffVDF) membrane (Millipore). After blocking, the membrane was incubated with indicated primary antibodies, and then with horseradish peroxidase (HRff)-conjugated secondary antibody IgG (Amersham Biosciences). Detections were performed with ECL ffus™ reagent (Amersham Biosciences). Antibodies used for western blotting were a rabbit polyclonal anti-E2F1 antibody (C-20, Santa Cruz), a mouse monoclonal anti-YY1 antibody (H-10, Santa Cruz), and a rabbit monoclonal anti-actin antibody (Sigma-Aldrich).

Immunofluorescence staining. The U2fS cells were seeded on cover-slips in 6-well plates and transfected with plasmids encoding HA-YY1 and E2F1. Forty-eight hours after transfection, cells were fixed for 20 min at room temperature with 10x ffBS containing 4% paraformaldehyde, and permeabilized for 30 min in ffBS containing 0.1% Triton X-100. After blocking, cover-slips were incubated at room temperature for 1 h in a 1:250 dilution of rat anti-HA and a 1:50 dilution of rabbit anti-E2F1 (Santa Cruz). Slides were then incubated for 1 h with a 1/1000 dilution of Alexa Fluor® 488 goat anti-rat IgG (H + L) and a 1/1000 dilution of Alexa Fluor® 568 goat anti-rabbit IgG (H + L) (Molecular ffobes).

Co-immunoprecipitation. HEK293T cells were transfected with 10 µg of pcDNA3-Flag-YY1 or pcDNA3 using Lipofectamine™ 2000. Transfected cells were harvested 48 h post-transfection for Immunoprecipitation–Western blotting. Cell lysates were solved in lysis buffer (10 mM HEPES, pH 7.5, 100 mM KCl, 0.1% Nff40) with protease inhibitors on ice for 30 min and then cleared by centrifugation at 15,000 rpm. The supernatants were incubated at 4°C for 1 h with protein G-beads in the presence of 3 µg of anti-flag monoclonal antibody. Then, the immunoprecipitated proteins were subjected to western blot analysis using anti-E2F1 antibody as described above.

Results and discussion

YY1-silencing reduces the transcriptional activity of p73

Although YY1 is well known as a p53 inhibitor, recent reports have implied that YY1 has p53-independent

pathway(s) for cell cycle regulation and apoptosis [5,6]. To elucidate novel pathways of YY1, we generated siRNA vectors, siYY1-1 and siYY1-2, targeted against two different sites of YY1 for knock-down experiments. The two siRNA vectors were used to ensure elimination of off-target effect of RNAi. Western blot analysis of YY1 siRNA vectors-transfected cells revealed that both siYY1-1 and siYY1-2 could significantly suppress the endogenous level of YY1 without affecting levels of E2F1 (Fig. 1A). Furthermore, using a p21 promoter/reporter construct, which is essentially dependent on p53, we confirmed the ability of the siYY1 vectors to functionally repress endogenous YY1, which resulted in the up-regulation of p53, and subsequently, the increase of p21 promoter/reporter activities

(Supplemental Fig. 1). Thus, the siRNA vectors for YY1 used here were able to knockdown and block the endogenous function of YY1 effectively and specifically.

Next, using a p73 promoter/reporter construct, we found that in contrast to the case of the p21 promoter, YY1-silencing led to a significant reduction of p73 promoter activity in both HCT116 cells and U2f S (Fig. 1B and 1C). To further confirm this finding, we performed real-time RT-ffCR using total RNA extracted from YY1-silenced U2f S cells. The results showed that the reduction of p73 mRNA level was observed in the YY1-silenced U2f S cells (Fig. 1D), indicating that in contrast with p53, knockdown of YY1 was able to reduce the transcriptional activity of p73. The results implied the novel regulation of p73 by YY1.

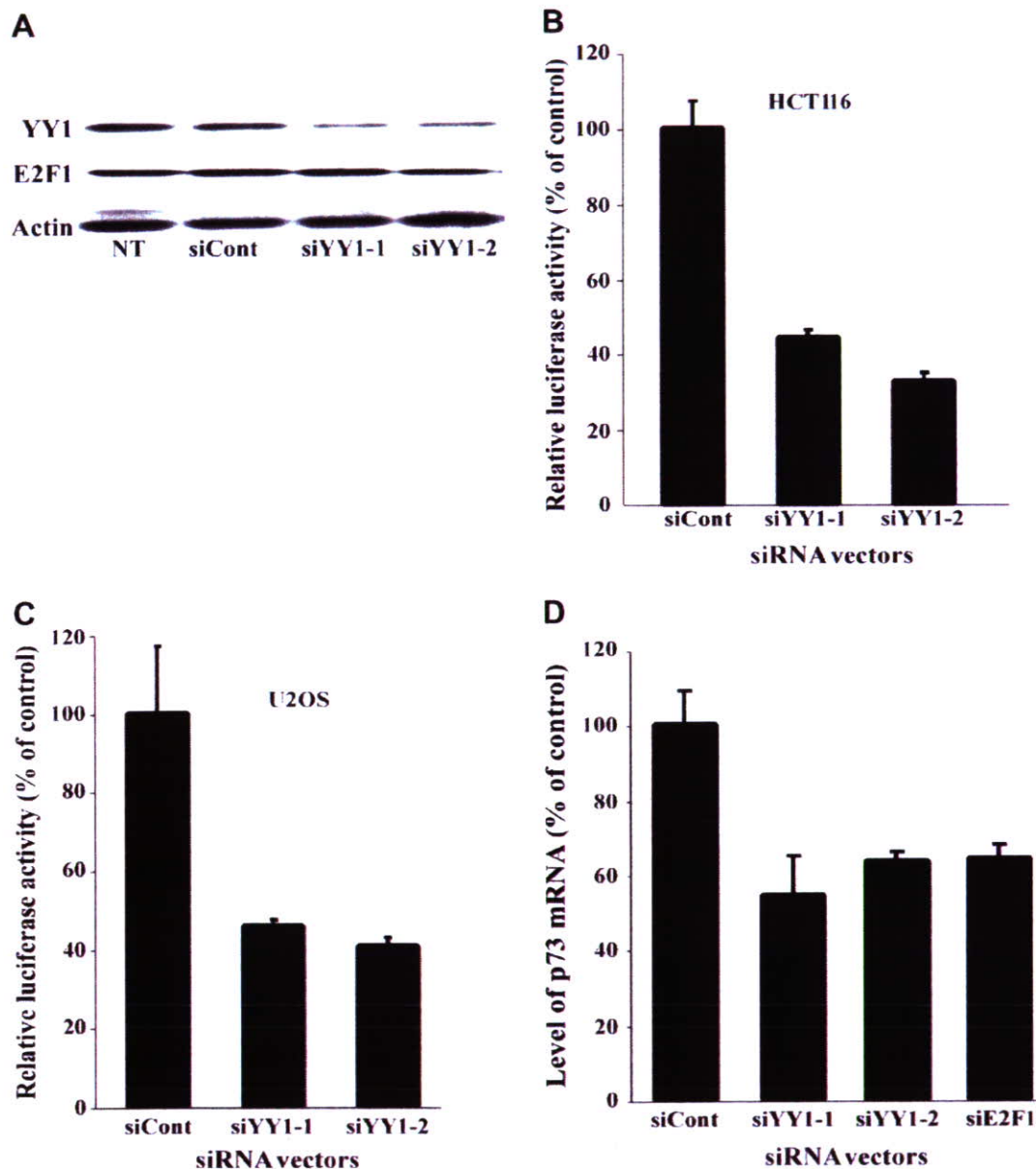


Fig. 1. The knockdown of YY1 reduces the transcriptional activity of p73. (A) HCT116 cells were transfected with siYY1-1 or siYY1-2 vectors or the siCont vector, the Western blotting was performed for detection of YY1 and E2F1. NT: non-transfected cells. (B–C) The effect of YY1-silencing on p73 promoter-driven transcription in HCT116 cells and U2f S cells. The indicated siRNA vectors-transfected HCT116 cells (B) and U2f S cells (C) were co-transfected with p73 luciferase (–4052/+438)/reporter and *Renilla* luciferase expression vector (pRL-SV40). Dual luciferase activity assay was performed 48 h after transfection. (D) Expression of p73 mRNA in YY1, E2F1-knocked down U2f S cells, determined by real-time RT-ffCR analysis.