

200730016B

厚生労働科学研究費補助金
こころの健康科学研究事業

RNAi を用いた神経・筋疾患の画期的治療法の開発

平成 17～19 年度 総合・分担研究報告書

主任研究者 水澤 英洋

平成 20(2008) 年 4 月

目 次

- I. 総合研究報告
RNAi を用いた神経・筋疾患の画期的治療法の開発
水澤 英洋
- II. 研究成果の刊行に関する一覧表
- III. 研究成果の刊行物・別刷

I. 総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金(こころの健康科学研究事業)
総合研究報告書

siRNA を用いた神経疾患に対する遺伝子治療

主任研究者 水澤 英洋 東京医科歯科大学大学院 教授

研究要旨：1) 家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) の原因である SOD1 遺伝子に対する siRNA 過剰発現トランスジェニックマウス (TgM) を作製し、家族性 ALS のモデル動物である G93A SOD1 TgM と掛け合わせることにより、ALS の発症と症状進行の著明な遅延に成功した (J Biol Chem 2005; Arch Neurol 2007)。2) 我々の考案した「あらゆる変異に対応可能な変異アレル特異的な RNAi 法」の有用性の検証として、SOD siRNA で抑制された内因性野生型 SOD1 の発現を、アミノ酸配列を変えずに塩基配列を置換させて siRNA が効かないようデザインしたリコンビナント siRNA 抵抗性野生型 SOD1 で補うことによって副作用である脂肪肝を回避させることに成功した (Oligonucleotide 2005)。3) 新規の高発現アデノ随伴ウイルスベクター (AAV8) を用いることにより、経静脈的全身投与によって従来より高効率にかつ安全に、肝臓の内因性遺伝子の顕著な抑制に成功した。さらに、発現型 Short hairpin RNA (shRNA) を用いる際に最近問題になっている shRNA 毒性に対して shRNA 発現量を適切に調節することによって副作用を回避できる可能性があることを示した。4) 霊長類を用いて肝炎ウイルス遺伝子を標的に従来のカチオンベクターを用いた siRNA 治療で一定効果を認めたが、インターフェロン誘導の副作用も判明した (BBRC 2007)。5) siRNA の新規の in vivo デリバリーベクターとして、ビタミン E、中でも最も生体内における分布や肝臓への輸送経路が判明している α -Tocopherol (Toc) を直接 siRNA に共有結合させることにより、静脈投与で有効に肝臓の内因性遺伝子の抑制することに成功した (Mol Ther 2008; 米国特許出願番号 PCT/JP2007/308085)。6) siRNA の高圧静脈内投与による in vivo における脳血管内皮への導入に成功した (BBRC 2006)。7) ウイルスなどの標的遺伝子の変異に耐性がある、かつインターフェロン誘導をおこさない長い shRNA 発現ベクターを開発した (Molecular BioSystems 2005)。

分担研究者

横田隆徳 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科脳神経病態学
宮岸 真 東京大学大学院医学系研究科

A. 研究目的

1) 研究の背景：疾病の発症機序が明らかになるに従い発症に係わる分子が次々と判明している。そこで、それらの分子の発現を遺伝子レベルで抑制することにより疾病治療の効果が期待できる。特に神経細胞変性をきたす常染色体優性遺伝性の疾患については、一般に変異遺伝子産物が毒性を獲得 (gain of toxic function) して発症すると考えられ、その変異遺伝子の発現を抑制することは疾患の根本治療に成りうる。このようなある特定の遺伝子の

発現を選択的に抑制する (silencing) ことにより、疾患を治療しようとする試みは従来もなされてきた。

RNAi (RNA interference) は2本鎖RNAによる転写後遺伝子発現抑制 (post-transcriptional gene silencing) 機構の1つで、線虫やショウジョウバエなどいくつかの生物種では効果的な遺伝子発現ノックダウン法として用いられてきた。一方、哺乳動物細胞では2本鎖RNAを導入すると、インターフェロン応答としてよく知られている2本鎖RNA依存的タンパク質キナーゼ (PKR) とオリゴアデニル酸合成酵素 (2-5AS)

の活性化によって翻訳阻害やmRNAの分解が起きてしまいこれまで応用できなかった。しかし、2000年にTuschlらにより3'側に2塩基突出した21-22塩基の短い2本鎖RNAを用いることによって哺乳動物細胞においても発現抑制に有効で、かつ上記毒性を回避できる siRNA (short interfering RNA)が開発され、その顕著な有効性から2006年のノーベル医学生理学賞に選ばれた。この siRNA を神経・筋疾患の遺伝子治療に応用しようとした場合、RNAの核酸としての不安定性と神経・筋へのデリバリーが大きな問題となる。しかし、生体内へのデリバリーの方法はいまだに不十分であり、かつ近年に 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 α や IL-6 などのサイトカインを誘導すること (*Nat Biotechnol.* 23:457-462, 2005) や、発現型 shRNA には microRNA のプロセス機構と競合するという新たな shRNA 毒性 (*Nature* 441:537-541, 2006) が判明して、副作用や非特異的な発現抑制効果の原因になりうる可能性が問題になっている。我々の同様の問題に直面したが、それぞれ本研究によりその解決方法を見出した。

2) 研究の目的：まず、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、アルツハイマー病、脳血管障害（とくに脳動脈硬化症）などで標的遺伝子の発現を効率よく抑制する siRNA を作成する。哺乳動物の培養細胞や動物モデルにおいて効率良く長期間発現し、副作用のないアデノ随伴ウイルスや独自のリポソームベクターを開発に組み込む。最終的には、疾患モデル動物を用いてその有用性の実証を目指す。

B. 研究方法

発現型 RNAi の作製

家族性筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病、脊髄小脳変性症、脳血管障害

などにおいて標的遺伝子を確定する。その標的遺伝子の cDNA から RNA の 2 次構造、配列の特徴を検討して数個の発現型 siRNA を作成し培養細胞に導入し、同時に導入した標的分子の recombinant 蛋白や内因性蛋白を Western blot することにより最も有効な発現型 siRNA を選択する。また、条件が整えば本来より特異性が高く効率的に siRNA を作製しやすいウイルス性疾患についても検討を行う。

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

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

4) 新規 shRNA 発現 AAV ベクター：

SOD1 に対する shRNA 発現 AAV8 ベクターについてトランスジーンを U6-shRNA を 8 つ繋げるコンストラクトを作製した。ペンシルバニア大学の G Gao 博士から譲り受けた AAV8 発現ベクターに上記コンストラクトをサブクローニングして Stratagene の AAV 作製キットを用いて 293 細胞に遺伝子導入して、AAV 作製した。硫酸とアオイデサノールで精製して、スロットプロットや定量的 PCR でウイルス量を定量した。これをマウスに経静脈的に全身性に投与し、その効果と microRNA のプロセス障害を含めた副作用を Western blot 法、Northern blot 法、定量的 RT-PCR のアッセイ

で評価した。

5) Toc-siRNA のマウスへの投与 :

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

6) 脳血管内皮細胞へのsiRNA導入 :

ICRマウスを用いて、脳血管内皮細胞の内因性蛋白(SOD1)に対するsiRNAを作製し、尾静脈からの1mlの高圧導入方法で投与してその1日後に脳血管内皮分画を分離してSOD1の発現をWestern blot法で評価した。次に血管内皮細胞の機能として、輸送系蛋白の1つであるorganic anion transporter3(OAT3)に対するsiRNAを作製し、尾静脈からの投与36時間後にOAT3基質薬物の排出に対する効果をBrain Efflux Index法で評価した。

倫理面への配慮について、siRNAは化学合成により作製し、変異cDNAはmutagenesisによって作製しており倫理的な問題は全くない。また、動物実験は当該研究施設の動物実験委員会等の承認を得ており、倫理面や動物愛護には十分に配慮して実施されている。

C. 研究結果

1) 変異SOD1によるALSモデルマウスのsiRNAトランスジーンによる遺伝子治療 :

まず、SOD1に対するshRNAを全身で発現したshRNA TgMを作製したshRNA TgMは、F1マウス的大脑において、SOD1-siRNAトランスジーンの組み込みが確認され、大脑におけるsiRNAのアンチセンス鎖の発現と標的遺伝子であるSOD1 mRNAやタンパクの発現抑制が確認された。さらにSOD1-siRNA TgMとG93A SOD1 TgMを掛け合わせ、SOD1-siRNAトランスジーンとG93A SOD1トランスジーンを有するダブル

TgMが得られた。このダブルTgMではG93A SOD1タンパクおよびマウス内因性SOD1タンパクの発現抑制が認められた。G93A SOD1 TgMは136日齢までに23匹全例発症、157日齢までに全例死亡しているのに対し、ダブルTgMでは発症が300-550日と著明に遅延して、さらにALS発症後のALS症状の進行も遅かった。(J Biol Chem, 280; 42826-30, 2005; Arch Neurol 64; 145-146, 2007)

これらの結果により、常染色体優性遺伝性神経変性疾患のsiRNAによる遺伝子治療法の有用性の原理を示せたと考えている。

2) 「あらゆる変異に対応可能な変異アリル特異的なRNAi法」:

我々はあらゆる変異に対応可能な変異アリル特異的な新しいRNAiを用いた遺伝子発現抑制方法として、まずsiRNAで変異型と野生型、両者のRNAの発現を抑制し、そのsiRNAで切断されないようにエンジニアしたcDNAによって野生型タンパクを戻す方法を報告した(Oligonucleotides, 15; 298-302, 2005)。

さらに、そのin vivoでの実証として、siRNA抵抗性SOD1過剰発現TgMを作製し、このTgMとSOD1siRNATgMと掛け合わせることで、ダブルTgMを作製した。これにより、内因性のマウスSOD1の発現は抑制したまま、ヒトSOD1の発現を補うことに成功し、末梢血の低下したSOD1活性を補うことに成功した。さらに、肝臓の組織切片のズダンIII染色を行い、SOD1 siRNA TgMで認められたSOD1活性の低下による副作用である肝臓の脂肪沈着がダブルTgMでは認められず、AST/ALTに加え組織学的にも脂肪肝を改善させることに成功した。

この「変異遺伝子特異的なRNAi法」とは、野生型・変異型アレルの発現を効率の良いsiRNAで抑制すると同時に、そのsiRNAで切断されないようにエンジニアしたsiRNA抵抗性野生型

遺伝子で野生型タンパクを補うことで変異遺伝子特異的な発現抑制効果が得られる。本方法を実際の遺伝子治療へ応用することを考える際、補充した野生型タンパクが果たして本来の内因性タンパクと同等の機能を果たすのかという点が問題点として最も懸念された。その点に関して、本研究において siRNA 抵抗性野生型遺伝子によって発現させた SOD1 タンパクが、siRNA で抑制された SOD1 活性低下によるフェノタイプを補うことが可能であることを *in vivo* において証明することでできた。これにより、本法の常染色体優性遺伝性神経変性疾患に対する、siRNA の変異アリル特異的な遺伝子治療法の有用性を示せた（論文投稿準備中）。

3) 新規 shRNA 発現 AAV ベクター :

最近 AAV8 型による shRNA 過剰発現マウスにおいて致死的な肝障害の shRNA 毒性という副作用が報告され、その機序として microRNA のプロセス障害が提案された (Nature, 2006)。今回これらの問題点についてその評価法及び解決法を検討した。

AAV の shRNA のトランスジーンのコストラクトに U6-shRNA のカセットを head-and-tail に 8 カセット連結した新しい shRNA 発現 AAV ベクターを作製した。1.5x10¹² vg の SOD1 shRNA 発現 AAV8 ベクターの静脈注射の後、shRNA に起因する明らかな副作用なく、肝臓において長期間持続する SOD1 の発現抑制に成功した。shRNA の発現量を増やすと肝機能障害及び病理学的な肝細胞壊死が認められたが、ウイルス量を調整することにより siRNA の有効性は保ちつつ、肝障害や microRNA のプロセス障害のない投与方法が見つけれられた（論文投稿準備中）。

4) 霊長類でのカチオニックベクターによる siRNA の遺伝子治療 :

霊長類である新世界ザルで GB ウイルス B (GBV-B) を用いて C 型肝炎の代用モデルを日本新薬のカチオニックベクターを用いて治療実験を行った。GBV-B の接種前後、3 日間 siRNA を静脈投与したところ、投与 8 週後でも 5.0 mg/kg では血清のウイルス量は検出感度以下という劇的な効果を認めた。しかし、Negative control の siRNA でも、ウイルス増殖抑制効果が見られたため、両者の siRNA にインターフェロン α , β が誘導されることが確認され、siRNA/カチオニックベクターは siRNA とインターフェロンの両者の効果があったと考えた (BBRC 361:294-300, 2007)。

5) ビタミン E ベクター :

一般の神経疾患への siRNA を用いた遺伝子治療には中枢神経系へのデリバリー方法が最大の課題だが、ウイルスベクターには実際の臨床応用は安全性の面でまだ問題があり、非ウイルス性ベクターの開発が望まれる。しかし、上記の経験から、合成カチオニックベクターが本質的にその物理的特性により細胞膜を通過させようとしていることに限界があると考え、我々は新たに生体内の生理的な細胞導入系を活用する必要があると考えた。それには生体に必要でかつ生体内で合成できないビタミン E (alpha-tocopherol:Toc) 結合ベクターを開発した (Toc-siRNA)。Toc-siRNA のマウス尾静脈から静脈注射で、肝細胞の細胞質内への高率の取り込みと、細胞内で Dicer プロセスが確認され、2mg/kg の低容量の投与で 48 時間後に肝臓の内因性遺伝子の mRNA の発現の低下が得られた。さらに、安全性として Toc-siRNA 投与 3 時間後の血清中 IFN- α 値、肝臓での IFN- β の mRNA 発現は皆無で、加えて 24 時間後と 48 時間後の血算における白血球数と血小板数の異常値、血清生化学における肝機能・腎機能障害

はいずれも認められなかった。

生体内への siRNA 投与により IFN 応答を生じる原因として siRNA の Toll 様受容体への結合が報告されている。Toc-siRNA が IFN 誘導しなかった原因として、化学修飾を施していない Toc-siRNA も IFN 応答を起こしていないことから、Toc-siRNA はカチオニックリポソームとは経路が異なり、ビタミン E が生理的に肝臓に取り込まれる経路を用いるため IFN 応答を生じない可能性を考えている。(Mol Ther 16:734-740, 2008)

さらにこれを血清のリポタンパクと結合させることにより、さらにその効果を増強することに成功し(論文投稿準備中)、同様の方法で中枢神経系への応用を試みている。

6) siRNA の脳血管内皮への導入

siRNA の高圧静脈内投与により脳血管内皮細胞の内因性タンパク(SOD1)の発現が抑制され、同様の方法で導入された脳血管内皮細胞に発現する輸送系蛋白 OAT3 に対する siRNA により、OAT3 基質薬物の排出に対する効果を Brain Efflux Index 法で評価した結果、その機能が阻害され、BBB における基質排出能が低下した。この結果は、特に行政施策的にニーズの高い脳卒中や多発性硬化症への siRNA による治療の可能性を示した(BBRC, 340; 263-67, 2006)。

7) 標的遺伝子の変異に耐性 shRNA 発現ベクターの開発:

ウイルスなどの標的遺伝子の変異が生じると siRNA はその有効性が現弱-消失するが、50-100 塩基の長い shRNA をデザインすることにより、1 つの shRNA から細胞内の Dicer によって複数の有効な siRNA がプロセスされれば、仮に標的遺伝子の変異によって 1 つの siRNA が無効となっても、全体としての有効性は維持できる可能性がある。

ところが、50-100 塩基の長い shRNA は細胞内で RIG-I や PKR の活性化を介したインターフェロン誘導をおこし、副作用になる。そこで、shRNA のセンス鎖にミスマッチ変異を導入することにより 2 本鎖 RNA の構造を変化させてインターフェロン誘導おこさない shRNA 発現ベクターを開発した(Molecular BioSystems 2005)。

D. 考察

1) 達成度について

我々の考案した RNAi 法よりの常染色体優性遺伝性神経変性疾患に対する、siRNA の変異アレル特異的な遺伝子治療の有用性を示せた。次にその siRNA を生体内に到達させるデリバリー方法が大きな問題となるが、本研究で shRNA 毒性を回避する AAV ベクターコンストラクトの方法を開発して、その有用性をマウスで示した。さらに、独自の発想から生体内の生理的な細胞導入系を活用するビタミン E を用いた新しいベクターシステムを開発して、より安全で有効な肝臓へのデリバリーに成功した。これまでに、神経変性疾患、脳血管障害などの多くの神経難病に対して非常に効率的に特異的 siRNA を作製し、それを細胞内で機能するように発現型 RNAi としてベクターを作製することに成功しており、今回その遺伝子治療としての適応方法に上記の大きな進歩を達成できたと考えている。

2) 研究成果の学術的、国際的、社会的意義について

多くの神経変性疾患の原因遺伝子、外来性のウイルス遺伝子、さらには脳卒中などの一般的な疾患の関連遺伝子について、その発現をほとんど完全に抑制する siRNA の開発に成功しており、研究論文に見られるように学術的意義はきわめて大きい。また、難病治療の研究に画期的な進歩をもたらしたことになり、多くのメ

ディアにも高い評価を受けており社会的意義も大きい。

さらに国内学会では学会賞を、国際学会でもシンポジウムでの発表の機会も得て、高い評価を受けている。

3) 今後の展望について

今回発明したビタミン E ベクターのコンセプトを、中枢神経系へのデリバリーに応用して、いよいよ脳室内への siRNA の投与による神経疾患への個体レベルでの有効性の検証と副作用のチェックを進める。

さらに、中枢神経内へのデリバリーには不可欠の血液脳関門の通過についても同様の観点から新たなブレイクスルーを考案しており、静脈注射や経口投与により血液脳関門を通過して神経細胞に到達できる方法を開発して、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、脳血管障害などの各動物モデルでの治療実験に発展させたい。

4) その他特記すべき事項

これらの研究は平成 17 年 1 月 7 日ネイチャー日本語版、平成 17 年 2 月 23 日読売新聞、平成 17 年 11 月 7 日日本経済新聞、平成 18 年 10 月 9 日日本経済新聞にて紹介された。

これらの業績のうち、特に行政施策的にニーズの高い脳卒中や多発性硬化症への siRNA による治療の可能性を示したことにより平成 18 年度日本神経免疫学会賞（筆頭著者 横田）を受賞した。

E. 結論

siRNA を用いた遺伝性神経変性疾患の遺伝子治療の有効性を shRNA TgM を用いて示し、さらに、その正常アレル抑制による副作用回避のために考案した新しい RNAi 方法の有効性を *in vivo* で示した。

次に、我々独自に開発したウイルス性ベクター

AAV8 と非ウイルス性ベクターであるビタミン E 結合性 shRNA ベクターの有用性を *in vivo* にて示した。

脳卒中や多発性硬化症を対象に、siRNA による脳血管内皮細胞の内因性遺伝子の有効な抑制とその *in vivo* 効果を示した。

このように予定の研究は着実に進展しており目的も達成されている。すでに、さらなる発展の萌芽となるべき成果も上がりつつあり、今後の飛躍が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

2) Sakamoto N, Tanabe Y, Yokota T, Saito K, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Sakurai Y, Chen CH, Yano M, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Maekawa S, Enomoto N, Kohara M, Watanabe M: Inhibition of hepatitis C virus infection and expression *in vitro* and *in vivo* by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA. *J Gastro Hepatol* 2007; *in press*.

3) Li Y, Yokota T, Gama V, Yoshida T, Gomez JA, Ishikawa K, Sasaguri H, Cohen HY, Sinclair DA, Mizusawa H, Matsuyama S. Bax-inhibiting peptide protects cells from polyglutamine toxicity caused by Ku70 acetylation. *Cell Death Differ* 14; 2058-67, 2007

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

- 5) Yokota T, Sasaguri H, Saito Y, Yamada H, Unno N, Yamamoto T, Kubodera T, Anzai M, Mitani T, Mizusawa H. Increase of disease duration of amyotrophic lateral sclerosis in a mouse model by transgenic small interfering RNA. *Arch Neurol* 64; 145-146, 2007
- 6) Hino T, Yokota T, Ito S, Nishina K, Kang YS, Mori S, Hori S, Kanda T, Terasaki T, Mizusawa H. In vivo delivery of small interfering RNA targeting brain capillary endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 340; 263-67, 2006
- 7) Hayashita-Kitoh H, Yamada M, Yokota T, Mizuno Y, Mochizuki H. Down-regulation of α -synuclein expression can rescue dopaminergic cells from cell death in the substantia nigra of Parkinson's disease rat model. *Biochem Biophys Res Com*, 341; 1088-95, 2006
- 8) Akashi H, Miyagishi M, Yokota T, Watanabe T, Hino T, Nishina K, Kohara M, Kazunari Taira K. Escape from the interferon response associated with RNA interference using vectors that encode long modified hairpin-RNA. *Molecular BioSystems*, 1; 382-390, 2005
- 9) Mitani T, Yokota T. RNA interference as a tool for producing knockdown mice. *J Mamm Ova Res*, 22; 139-51, 2005
- 10) Kubodera T, Yokota T, Ishikawa K, Mizusawa H. New RNAi Strategy for Selective Suppression of Mutant Allele in Polyglutamine Disease. *Oligonucleotides*, 15; 298-302, 2005
- 11) Saito Y, Yokota T, Mitani T, Anzai M, Miyagishi M, Taira K, Mizusawa H. Transgenic siRNA halted amyotrophic lateral sclerosis in a mouse model. *J Biol Chem*, 280; 42826-30, 2005
- 12) Yokota T. siRNA-based gene therapy for autosomal dominant disease of the nervous system. In *RNA i therapeutics*. Ed by Takaku H, Yamamoto N. *Transworld Research Network*, pp137-146, 2007
- 13) 横田隆徳: RNAi を用いた神経変性疾患への臨床応用。「神経変性疾患のサイエンス」高橋良輔編、南山堂、198-207, 2007
- 14) 久保寺隆行、横田隆徳、水澤英洋: ALS の遺伝子治療 *Clin Neurosci* 26:337-339. 2008
- 15) 横田隆徳: 家族性 ALS の RNA 干渉を用いた遺伝子治療。 *神経治療学* 25, 31-39, 2008
- 16) 横田隆徳: siRNA 干渉による ALS の治療戦略。 *Brain and Nerve* 59, 1187-1194, 2007
- 17) 横田隆徳: RNA 干渉による神経変性疾患の治療、 *メディカルバイオ* 5 : 28-33, 2007
- 18) 横田隆徳: RNAi 医薬品開発の現状と展望。 *バイオインダストリー* 24:5-7. 2007
- 19) 久保寺隆行、横田隆徳: siRNA の生体内における問題点。 *バイオインダストリー* 24:22-28. 2007
- 20) 横田隆徳: siRNA を用いた ALS の遺伝子治療。 *医学のあゆみ* 220(10) 855-856, 2006
- 21) 横田隆徳: 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。 *Neuroimmunology*, 14; 141-5, 2006
- 22) 横田隆徳: siRNA の核酸医薬としての可能性。 *分子細胞治療*, 5(3); 231-6, 2006
- 23) 横田隆徳: RNA 干渉によるアルツハイマー病治療の可能性。 *Progress in Medicine*, 26 (2); 441-5, 2006
- 24) 水澤英洋: RNA 干渉による脊髄小脳変性症の治療。 *神経治療学* 23(1); pp17-24, 2006
- 25) 水澤英洋: RNA 干渉-神経疾患治療の新しいテクノロジー。 *神経研究の進歩* 49(6); 915-920, 2005
- 26) 横田隆徳: RNAi によるウイルス複製抑制。 *ウイルス*, 55(1); 1-8, 2005
- 27) 横田隆徳: RNA 干渉を用いた神経疾患の遺伝子治療。 *脳神経外科速報*, 15(8); 765-70, 2005

- 28) 横田隆徳: RNAi を用いたウイルス複製抑制. ウイルス, 55(1); 1-8, 2005
- 29) 横田隆徳: RNA 干渉による神経変性疾患の遺伝子治療の現状. Curr Insight Neurol Sci, 13(3); 177-9, 2005
- 30) 横田隆徳: ビタミンE 欠乏による神経障害薬の知識, 56; 96-8, 2005
- 31) 横田隆徳: RNAi の神経変性疾患治療への応用. 細胞工学, 24; 378-82, 2005

2. 学会発表 (国際学会、シンポジウム、ワークショップのみ)

- 1) Yokota T, et al : Gene Efficient In Vivo delivery of siRNA to liver by conjugation of α -Tocopherol. 2008 siRNA Keystone symposium. 3.29.2008 in Whstler, Canada
- 2) Yokota T, et al. Tranegenic siRNA holts ALS in a mouse model. 59th AAN annual meeting, 5.4.2007 in Boston, USA
- 3) 横田隆徳: RNA 干渉の医療への応用。第1回神戸カンファレンス、2008.3.1、神戸
- 4) 横田隆徳: これが siRNA 創薬成功の鍵。日経 BP 社 B T J プロフェッショナルセミナー、2007.7.4、東京
- 5) Yokota T: Clinical application of siRNA. Neuro 2007, 2007.9.4, Yokohama, Japan
- 6) 横田隆徳: RNAi トランスジェニックマウスと in vivo デリバリー。第121回東北大学薬学部セミナー、2007.12.18、仙台
- 7) 横田隆徳: ウイルス性疾患、遺伝性疾患への siRNA による遺伝子治療。「RNA 創薬最前線」、2006.11.13、東京
- 8) 横田隆徳: RNA 干渉の基本原則と神経疾患への応用。第6回山陽神経フォーラム学術集会、2006.10.21、山口
- 9) 横田隆徳: RNA 干渉の基本原則と siRNA トランスジェニックマウス。第59回発生工学・疾患モデル研究会、2006.10.13、東京
- 10) Yokota T: In vivo application of siRNA/shRNA. Bio-Japan Symposium, 2006.9.15, Osaka, Japan,
- 11) 横田隆徳: ALS 治療実現の見通し。RNA 干渉からのアプローチ。ALS ワークショップ 厚生労働科学研究費 難治性疾患克服研究事業「筋萎縮性側索硬化症の画期的診断・治療法に関する研究」班、2006.7.28、東京
- 12) 横田隆徳: siRNA 過剰発現トランスジェニックマウス。シンポジウム「神経疾患モデル動物 update」、第24回神経培養研究会、2006.3.11、東京
- 13) 横田隆徳: 神経変性疾患の siRNA による遺伝子治療。第2回六甲カンファレンス、2005.10.1、淡路市
- 14) 横田隆徳: Transgenic siRNA halts ALS in a model mouse. 第15回アンチセンスシンポジウム、2005.11.25、桐生
- 15) 横田隆徳: トランスレーショナルニューロサイエンス—難病 ALS への神経科学の挑戦— siRNA による ALS の遺伝子治療、第28回日本神経科学会 2005.7.28、東京
- 16) 横田隆徳: RNA 干渉と神経疾患、神経変性疾患の最新の原因・病態解析。第45回日本神経学会総会、2005.5.28、鹿児島
- 17) 横田隆徳: siRNA の神経疾患への応用。第16回フォーラム・イン・ドージン、2005.12.2、熊本
- 18) 横田隆徳: 神経変性疾患は細胞死か? 第24回六甲カンファレンス、2005.9.30、淡路
- 19) 横田隆徳: RNAi の基本原則と神経内科疾患への応用。21世紀COEプログラム「脳の機能統合とその失調」大学院特別プログラム第四部: 神経系でのシグナル伝達、2005.4.18、東京

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許申請

- 1) 横田隆徳、他。ES細胞を用いた新しいsiRNAトランスジェニックマウスの作製方法の開発。(特許出願番号2007-118962)。
- 2) Yokota T, et al. Gene delivery of siRNA with new endogenous lipoprotein.
(米国特許出願番号PCT/JP2007/308085)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
水澤英洋	RNAiを用いた神経難病の治療戦略		組織細胞化学 2006 (第 31 回組織細胞化学 講習会)	日本組織細胞 化学会		2006.7.10	195-202

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
水澤英洋	RNA 干渉による脊髄小脳変性症の治療	神経治療学	23(1)	17-24	2006
水澤英洋	RNA 干渉 - 神経疾患治療の新しいテクノロジー	神経研究の進歩	49(6)	915-920	2005

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
横田隆徳	RNAi の神経疾患への応用	中村義一 大内将司	RNA 工学の最前線	シーエムシー出版	東京	2005	77-87
Yokota T	RNAi-Based Inhibition Specific for Mutant Alleles in Autosomal Dominant Diseases: Sequence-Dependent and-Independent Discrimination of Mutant and Wild-Type Alleles by siRNA	Taira K, Kataoka K, Niidome T	Non-Viral Gene Therapy: Gene Design and Delivery		Tokyo	2005	398-404
Yokota T	siRNA-based gene therapy for autosomal dominant disease of the nervous system.	Takaku H, Yamamoto N	RNAi Therapeutics	Transworld Reseach Network	India	2007	137-146

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nishina K, Unno T, Uno Y, Kubodera T, Kanouchi T, Mizusawa H, Yokota T	Efficient In Vivo delivery of siRNA to liver by conjugation of α -Tocopherol.	Mol Ther	16	734-740	2008
Sakamoto N, Tanabe Y, Yokota T, Saito K, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Sakurai Y, Chen CH, Yano M, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Maekawa S, Enomoto N, Kohara M, Watanabe M	Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA.	J Gastro Hepatol	in press		2007
Li Y, Yokota T, Gama V, Yoshida T, Gomez JA, Ishikawa K, Sasaguri H, Cohen HY, Sinclair DA, Mizusawa H, Matsuyama S	Bax-inhibiting peptide protects cells from polyglutamine toxicity caused by Ku70 acetylation.	Cell Death Differ	14	2058-67	2007
Yokota T, Iijima S, Kubodera T, Ishii K, Katakai Y, Ageyama N, Chen YW, Lee YJ, Unno T, Nishina K, Iwasaki Y, Maki N, Mizusawa H, Akari H	Efficient regulation of viral replication by siRNA in a non-human primate surrogate model for hepatitis C.	Biochem Biophys Res Com	361	294-300	2007
Yokota T, Sasaguri H, Saito Y, Yamada H, Unno N, Yamamoto T, Kubodera T, Anzai M, Mitani T, Mizusawa H	Increase of disease duration of amyotrophic lateral sclerosis in a mouse model by transgenic small interfering RNA.	Arch Neurol	64	145-146	2007
Yokota T, Hino T, Ito S, Nishina K, Kang YS, Mori S, Hori S, Kanda T, Terasaki T, Mizusawa H	In vivo delivery of small interfering RNA targeting brain capillary endothelial cells.	Biochem Biophys Res Commun	340	263-67	2006
Hayashita-Kitoh H, Yamada M, Yokota T, Mizuno Y, Mochizuki H	Down-regulation of α -synuclein expression can rescue dopaminergic cells from cell death in the substantia nigra of Parkinson's disease rat model.	Biochem Biophys Res Com	341	1088-95	2006
Akashi H, Miyagishi M, Yokota T, Watanabe T, Hino T, Nishina K, Kohara M, Kazunari Taira K	Escape from the interferon response associated with RNA interference using vectors that encode long modified hairpin-RNA.	Molecular BioSystems	1	382-390	2005

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Mitani T, Yokota T	RNA interference as a tool for producing knockdown mice.	J Mamm Ova Res	22	139-51	2005
Kubodera T, Yokota T, Ishikawa K, Mizusawa H	New RNAi Strategy for Selective Suppression of Mutant Allele in Polyglutamine Disease.	Oligonucleotides	15	298-302	2005
Saito Y, Yokota T, Mitani T, Anzai M, Miyagishi M, Taira K, Mizusawa H	Transgenic siRNA halted amyotrophic lateral sclerosis in a mouse model.	J Biol Chem	280	42826-30	2005
横田隆徳	RNAi を用いた神経変性疾患への臨床応用。「神経変性疾患のサイエンス」高橋良輔編	南山堂		198-207	2007
久保寺隆行、横田隆徳、水澤英洋	ALS の遺伝子治療	Clin Neurosci	26	337-339	2008
横田隆徳	家族性 ALS の RNA 干渉を用いた遺伝子治療	神経治療学	25	31-39	2008
横田隆徳	siRNA 干渉による ALS の治療戦略	Brain and Nerve	59	1187-1194	2007
横田隆徳	RNA 干渉による神経変性疾患の治療	メデイカルバイオ	5	28-33	2007
横田隆徳	RNAi 医薬品開発の現状と展望	バイオインダストリー	24	5-7	2007
久保寺隆行、横田隆徳	siRNA の生体内における問題点	バイオインダストリー	24	22-28	2007
横田隆徳	siRNA を用いた ALS の遺伝子治療	医学のあゆみ	220(10)	855-856	
横田隆徳	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	Neuroimmunology	14	141-5	2006
横田隆徳	siRNA の核酸医薬としての可能性	分子細胞治療	5(3)	231-6	2006
横田隆徳	RNA 干渉によるアルツハイマー病治療の可能性	Progress in Medicine	26(2)	441-5	2006,
横田隆徳	RNAi によるウイルス複製抑制	ウイルス	55(1)	1-8	2005
横田隆徳	RNA 干渉を用いた神経疾患の遺伝子治療	脳神経外科速報	15(8)	765-70	2005
横田隆徳	RNA 干渉による神経変性疾患の遺伝子治療の現状	Curr Insight Neurol Sci	13(3)	177-9	2005
横田隆徳	RNAi の神経変性疾患治療への応用	細胞工学	24	378-82	2005

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kasim V, <u>Miyagishi M.</u> et al.	Screening of siRNA target sequences by using fragmented DNA.	J Gene Med.	8	782-791	2006
Nishimura G, <u>Miyagishi M.</u> et al.	DeltaEF1 mediates TGF-beta signaling in vascular smooth muscle cell differentiation.	Dev Cell	11	93-104	2006
Hiraoka-Kanie, <u>Miyagishi M.</u> et al.	Differentiation stage-specific analysis of gene function with inducible short hair-pin RNA in differentiating embryonic stem cells.	Biochem Biophys Res Commun.	351	669-674	2006
Nakamori Y, <u>Miyagishi M.</u> et al.	Myosin motor Myo1c and its receptor NEMO/IKK-gamma promote TNF-alpha-induced serine307 phosphorylation of IRS-1.	J Cell Biol.	173	665-671	2006
Watanabe T, <u>Miyagishi M.</u> et al.	Intracellular-diced dsRNA has enhanced efficacy for silencing HCV RNA and overcomes variation in the viral genotype.	Gene Ther.	13	883-892	2006
Furumoto Y, <u>Miyagishi M.</u> et al.	Cutting Edge: Lentiviral short hairpin RNA silencing of PTEN in human mast cells reveals constitutive signals that promote cytokine secretion and cell survival.	J Immunol.	176	5167-5171	2006
Ito M, <u>Miyagishi M.</u> et al.	Down-regulation of endogenous Wt1 expression by Sry transgene in the murine embryonic mesonephros-derived M15 cell line.	J Reprod Dev.	52	415-427	2006
Wu S, <u>Miyagishi M.</u> et al.	Yin Yang 1 induces transcriptional activity of p73 through cooperation with E2F1.	Biochem Biophys Res Commun.	365	75-81	2008
Goto E, <u>Miyagishi M.</u> et al.	An excellent monitoring system for surface ubiquitination-induced internalization in mammals.	PLoS ONE	3	e1490	2008
Sutou S, <u>Miyagishi M.</u> et al.	Knockdown of the bovine prion gene PRNP by RNA interference (RNAi) technology.	BMC Biotechnol.	26	44	2007
Takaoka A, <u>Miyagishi M.</u> et al.	DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response.	Nature	173	665-671	2007

Ⅲ. 研究成果の刊行物・別刷

RNAi を用いた神経難病の治療戦略

水澤英洋

Key words : RNA 干渉 (RNA interference (RNAi)), 小干渉 RNA (small interfering RNA (siRNA)), 神経変性疾患 (neurodegenerative disease), ポリグルタミン病 (polyglutamine disease), siRNA トランスジェニックマウス (siRNA transgenic mouse), スーパーオキシドジスムターゼ (super-oxide dismutase (SOD)), ウイルスベクター (viral vector), デリバリー (delivery), オフターゲット効果 (off-target effect), インターフェロン反応 (interferon reaction)

I. RNAi 干渉とは

RNAi 干渉 (RNA interference: RNAi) とは二本鎖 RNA (dsRNA) の存在が引き金となり mRNA が配列特異的に切断される機構である。具体的には長い dsRNA が dicer と呼ばれる ribonuclease III により約 21 mer の小干渉 RNA (small interfering RNA: siRNA) に切断され、さらに RNA-induced silencing complex (RISC) により一本鎖 RNA となり、それが標的 mRNA を切断してその発現を阻害する¹⁻⁴⁾ (図1)。この siRNA の他にも内在性のヘアピン型 dsRNA から作られる約 22 mer の一本鎖の microRNA (miRNA) が、mRNA の分解以外に translational repression, transcriptional silencing, heterochromatin formation などの様々な生理的な機能を担っていることが知ら

れつつありこれらは機能性低分子 RNA と呼ばれる。現在、dicer や RISC の実態が徐々に明らかとなってきており RNA silencing 機構の解明が進んでいる。

この siRNA による mRNA 発現抑制過程は非常に特異的であり、病的な遺伝子発現が原因となる疾患に対して用いることができればまさに根本的な治療となることが期待される。まず原因遺伝子の変異により gain of toxic function の機序で発症に至ると考えられる常染色体優性遺伝性の神経変性疾患や、外来性の病的な核酸そのものの侵入・増殖したともいえるウイルス感染症が siRNA を用いた遺伝子治療のよい標的と考えられる。さらに、生活習慣病や悪性腫瘍などのいわゆるコモン・ディゼイズは大部分が孤発性であるが、それでも多くの分子の発現が発症機序に関与しており、その発現抑制が治療に結びつく

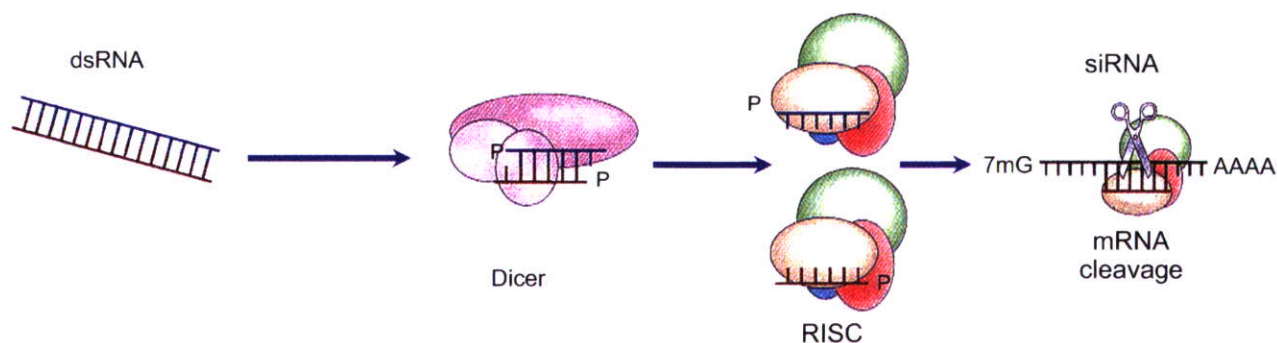


図1 RNAi の作用機構
説明は本文参照 (文献3より引用)。