

可能性がある。例えば、Alzheimer病ではアミロイドβ蛋白を切り出す酵素セクレターゼをうまく抑制できればよいわけである。したがって、RNAiを活用した治療はほとんどの疾患において可能であると思われる。一旦治療技術が確立すればその応用範囲はほとんど無限と期待される。このような遺伝子発現の抑制という発想に立つ治療としてはすでにアンチセンスDNA、リボザイムなどが知られておりそれぞれ利点と欠点があるが、総合的にはsiRNAが最も有用と思われる。

II. 効率的な siRNA の作製

まず最初のステップとしては、標的分子のmRNAの塩基配列から特異性が高く効率のよいsiRNAをデザインすることである。これにはすでにある程度のルールが存在し、Reynoldsら⁹⁾、Amarguouiら⁶⁾、内藤ら⁷⁾によれば、1) アンチセンス鎖の1番目(センス鎖の19番目)はAあるいはU、2) アンチセンス鎖の5'末端から3~7塩基の所にAあるいはUが多いこと、3) センス鎖の5'末端はGあるいはC、であることが効率的siRNAの条件といえる。現在、このような効率的siRNAを設計するためのWebsiteがいくつも公開してされている[siRirect (<http://design.RNAi.jp/>)、siSearch (<http://sonnhammer.cgb.ki.se/siSearch/>)、siDESIGN Center (<http://design.dharmacon.com/>) など]。しかし、実際は必ずしも理論通りには行かないので、少しずつ条件を変えたものを複数個作製して最も抑制効率のよいものあるいは目的にかなったものを用いる。

III. Machado-Joseph 病 (MJD) の場合

MJDは脊髄小脳失調症3型(SCA3)とも呼ばれ、本邦の遺伝性脊髄小脳変性症の中でもっとも頻度の高い病型で、主に失調性歩行障害、構音障害で発症して、錐体路徴候、ジストニアなどの不随意運動、眼球運動制限、びっくり眼などを呈し、緩徐に進行し、車椅子状態から最終的には寝たきりになる疾患である⁸⁻¹⁰⁾。神経病理学的には小脳歯状核、脳幹、大脳基底核を中心とした多系統の変性がみられる。

原因は第1番染色体長腕にあるMJD1遺伝子の中の3塩基配列CAGの繰返し(CAGリピート)の異常伸長で、正常ではCAGリピート数が13~36であるのに対して患者では62~82と増加している。発症はふつう成人期であるが、世代を降る毎にリピート数が伸長して発症年齢が若年化し(表現促進現象)、症状は重症化する。CAGはアミノ酸のグルタミンをコードしており、翻訳され異常伸長したポリグルタミン鎖を含むataxin 3蛋白が神経細胞の変性を引き起こすと考えられている。

MJD1遺伝子に対するsiRNAを作製する場合、前述のCAGリピートの長さの違いを区別して認識させることは困難であり、リピート以外のところは全く同じである。いろいろ検討した結果、CAGリピートの直後がCあるいはGになる多型があり、CAGリピートが異常伸長した場合は全てCであり、正常リピート数の場合は20以上では多くの場合Cであるがそれ以外はGとなることが知られている¹¹⁾。したがって、完全には野生型と変異型を区別してはいないが、まずこの多型に注目して(CAG)nCのみを抑制し(CAG)nGには影響しないsiRNAを設計・作製しその効果を検討した¹²⁾。

まず、アッセイ系として22回あるいは79回のCAGリピートを含み、CAG直後をCあるいはGとしたMJD1遺伝子断片を組み込んだプラスミドを作製した(Q22G、Q22C、Q79C)。これらを前述のように何種類も作製したsiRNAとともにHEK293T培養細胞に導入しsiRNAの効果を検討し、一つのsiRNAにより容量依存性にQ79Cに由来する変異ataxin 3蛋白の発現をほとんど完全に抑制することに成功した(図2)。もちろんQ22Gに由来する正常ataxin 3蛋白には全く影響しない。類似の結果はMillerらによっても報告されている^{13,14)}。ここで問題はQ22Cに対する効果であり、当初siRNAを配列特異的に作製していることから、理論的にはCを有するQ22CもQ79Cと同様に抑制されるのではないかと思われた。しかし、実際には興味深いことにQ22CはQ22Gと同様に全く抑制されず、このQ79Cに選択的な発現抑制効果は、LDH遊離やtrypan blue染色による細胞死の抑制効果でも確認された。すなわちこのsiRNAは変異ataxin 3の発現とその機能のみをほぼ完

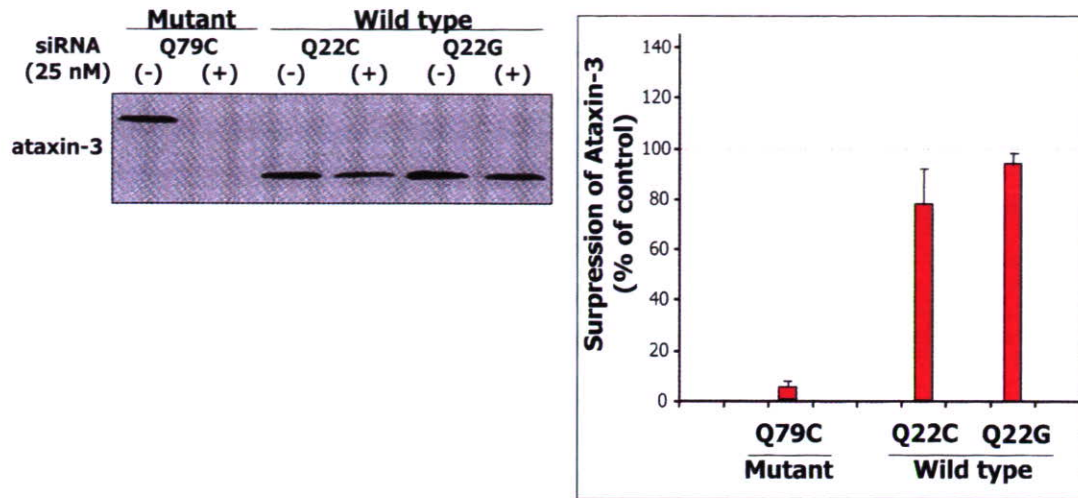


図2 作製したsiRNAは25 nM用いるとQ79C (ポリグルタミン鎖が79個でリピート直後の多型がC) の蛋白の発現をほとんど完全に抑制するが、Q22GはもちろんQ22Cに対してもほとんど影響しない(文献12から引用)。

全に抑制するといえる。この特異性変化の理由はまだ不明であるが、標的となるRNAの二次あるいは三次構造が関係しているのではないかと推測される。

IV. ポリグルタミン病一般への対応

MJDの場合は結果的に非常に疾患特異的の高いsiRNAが作製できたが、CAGリピート病であるポリグルタミン病では一般的には変異と正常を完全に区別する特異な配列は存在しない。例えばMJDと同様に本邦で非常に多い脊髄小脳変性症である脊髄小脳失調症6型 (spinocerebellar ataxia type 6: SCA6) も、 α 1A-Caチャンネル遺伝子 (CACNA1A) のCAGリピートの異常伸長により発症する¹⁵⁾。SCA6ではリピート前のGGCAGという配列が、挿入されるかされないかでCAGリピートがポリグルタミンに翻訳されるかが決まり、SCA6では挿入されたものの比率が大きくなることが知られている¹⁶⁾。我々はGGCAGをもつmRNAを特異的に抑制するsiRNAを作製することに成功したが、GGCAG挿入の有無はMJDのG/C多型ほどは疾患と対応していないと思われることから、SCA6などポリグルタミン病に対するsiRNA戦略としては別の工夫が必要である。ちなみに、ポリグルタミン病にはMJD、SCA6の他SCA1、SCA2、SCA7、SCA17、Huntington病、球脊髄性筋萎縮症、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症と計

9疾患が含まれる。したがって、もしポリグルタミン病に共通の機序に対する治療に成功すればその意義はきわめて大きい。

ふつう一つのアミノ酸には複数の塩基配列が対応しており、例えば、バリンはGUU、GUC、GUA、GUGによってコードされている。したがって、塩基配列を変更してもアミノ酸配列は不変すなわち蛋白としては不変ということになる。我々は、このことを利用してまず非特異的siRNAにより正常及び変異CACNA1Aの発現を全て抑制し、同時にこのsiRNAが作用しないように対応する塩基配列を変更しかつアミノ酸配列は変えないコンストラクトを導入して野生型蛋白を発現させることを試みた¹⁷⁾。その結果、CAGリピートが28回に異常伸長したものを抑制し“正常蛋白”を発現させる(“レスキューする”)ことに成功した(図3)。このことは、理論的には全てのポリグルタミン病のみならず全ての遺伝子変異に応用可能な手法であり、通常の方法では特異的siRNAのデザインが困難なときには有用な方法といえる。もちろん、導入する塩基配列の異なった“正常”遺伝子が本当に本来の遺伝子と同じ機能を有するか、安全であるかといった多くの解決すべき問題は残っているが、siRNA技術を応用するに当たり様々な工夫が可能であることを示す一つの例といえる。

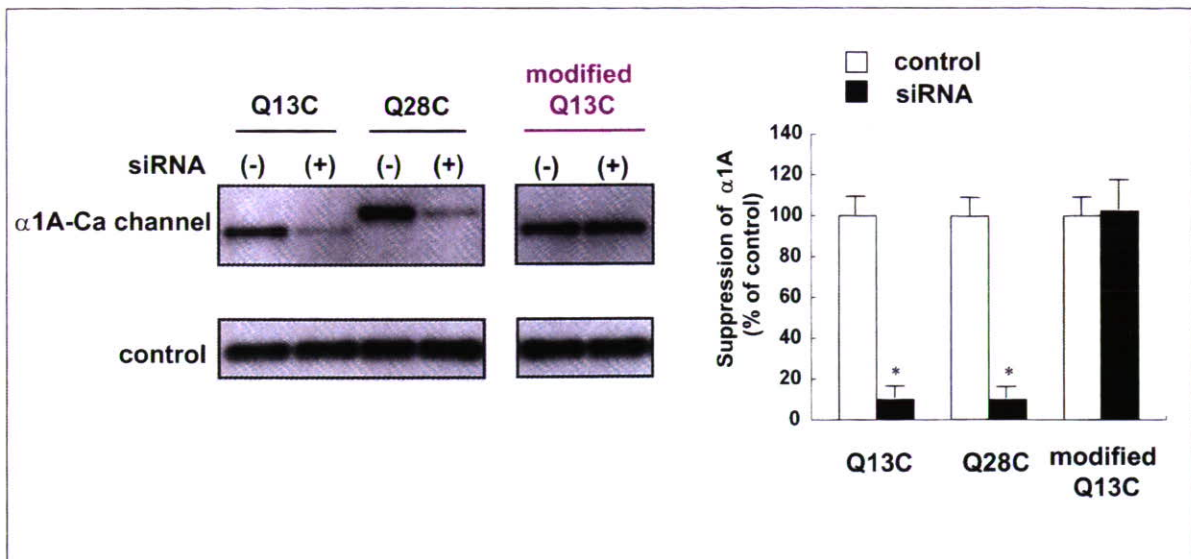


図3 作製したsiRNAはリピート数13回、28回の両方の $\alpha 1A$ -Caチャンネル蛋白の発現を抑制するが、塩基配列を変えたmodified constructには全く影響しない(文献17から引用)。

V. 非遺伝性疾患への応用

神経疾患においても全体から見ると遺伝性のものはまれであり、大部分は非遺伝性あるいは孤発性疾患である。そこには生活習慣病である脳血管障害や孤発性アルツハイマー病など重要な疾患が多数含まれる。非遺伝性のコモンディーズに対してもsiRNA治療は可能性であろうか。最初に述べたように我々は充分可能であると考えている。例えば、我々は脳血管障害時に発現する分子として細胞接着分子のE-selectinに注目し、それに対するsiRNAをデザインして培養細胞に発現した外来性のE-selectinのみならず、ヒト血管内皮細胞ヘリポソームにより導入することにより炎症刺激による内在性のE-selectin発現をも著明に抑制することに成功した¹⁸⁾。その結果、実際に白血球の血管内皮細胞への接着を長時間にわたり抑制することが判明した。したがって、siRNA治療は適切な標的分子を選択することで非遺伝性のコモンディーズにも充分に応用可能であると思われる。我々はアルツハイマー病についても研究を進めているが、すでに本症の動物モデルを用いて β セクレターゼに対するsiRNAを投与して神経病理所見を改善したとの報告も見られる¹⁹⁾。これは悪性腫瘍についても同様であり、適切な標的分子を選択することでsiRNAを応用することが可能であり、

実際に大きな成果があがりつつある²⁰⁾。また、感染症とくにウイルス感染はまさに外来性の遺伝子そのものであり非常によいターゲットである^{21,22)}。ただ、一般にウイルスは非常に変異しやすいなど生体の防御機構をくぐり抜ける工夫が備わっているため、siRNAを応用するにはそれなりの工夫が必要である。我々は日本に多いC型肝炎ウイルスに対する非常に効率の良いsiRNAを開発することに成功し現在動物実験を進めている²³⁾。

VI. 動物モデルにおける siRNA の有効性

すでにsiRNAそのものは、実験室での強力かつ特異的な遺伝子発現抑制手段として用いられている。したがって、培養細胞レベルで標的遺伝子の発現を抑制するという自体はとくに珍しいことではない。我々の目標はあくまでもヒトの疾患の治療であり、そのためには個体レベルで有効かつ安全であることをまず動物モデルで証明する必要がある。我々はこれに対してsiRNAを過剰発現したトランスジェニック・マウスを作製して、掛け合わせという手法で疾患モデル動物にsiRNAを送り込みその効果を検証することを試みた。対象疾患として変異SOD1による家族性筋萎縮性側索硬化症(家族性ALS)を選んだ²⁴⁾。まず、様々な工夫の結果ES細胞を用いて

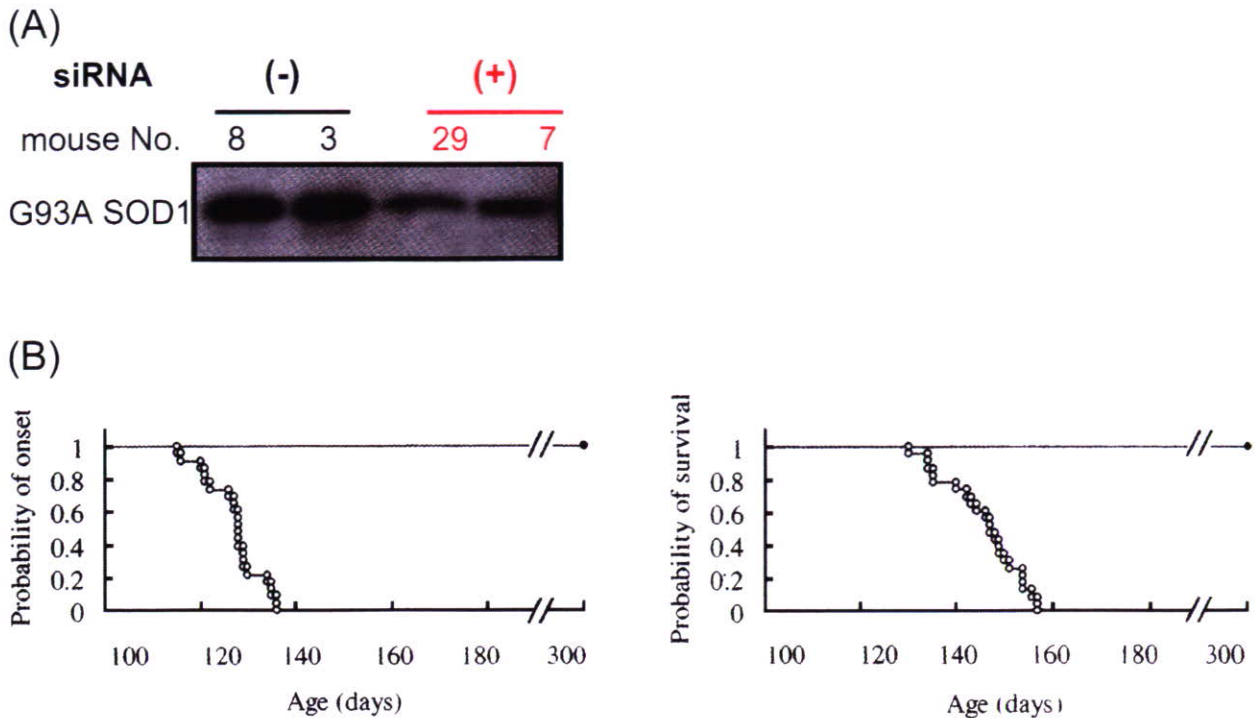


図4 掛け合わせによってできた siRNA を持つ G93ASOD1 トランスジェニックマウスでは SOD1 蛋白の発現が高度に抑制されており (A), 約 300 日までの経過観察では全く発症しないが (●), siRNA を持たないものは 110~130 日でほとんどが発症し 20 日位で死亡する (○) (B: 文献 25 から引用).

SOD1 に対する siRNA を過剰発現したトランスジェニック・マウス (SOD1-siRNA TgM) の作製に成功した²⁵. このマウスでは, 全身の臓器や組織に SOD1 に対する siRNA が発現し中枢神経系では 85~90% のマウスの内因性 SOD1 蛋白の発現が抑制されていた. しかし, 観察した限りではこの SOD1-siRNA TgM は雌の不妊以外特別な症状を示すことはなく, 加齢や世代更新により SOD1 抑制効率が影響を受けることはなかった. SOD1-siRNA TgM と疾患モデルの変異 SOD1 トランスジェニック・マウス (SOD1G93A TgM) とを掛け合わせ, siRNA を有する家族性 ALS マウスと siRNA を持たない家族性 ALS マウスを得て経過を観察したところ, siRNA 非治療群では 110 日を過ぎた頃から後肢の麻痺が始まり急速に進行したが, siRNA 治療群では 300 日近くまでフォローしてもまだ発症は見られなかった (図 4). また, 神経病理学的には siRNA 非治療群では脊髄前角細胞や脊髄前根の神経線維が高度に脱落しているのに対して, siRNA 治療群では障害を免れて野生型の健常対照群に近い状態であった. この治療成績は, siRNA 以外を含め SOD1G93A TgM を用いた数多く

の研究の中でも最も良いものであり特筆に値する. もちろん, ヒトの疾患の治療には掛け合わせといった手段は使えないが, 我々の結果は siRNA を上手く標的細胞まで到達させれば極めて有効な治療手段になりうることを明確に示したといえる. このことは, siRNA を用いた遺伝子治療の研究全体に大きな力を与えてくれた. 家族性 ALS に関しては, 我々は SOD1-siRNA TgM との掛け合わせを用いたが, 他にレンチウイルスやアデノ随伴ウイルスのベクターを用いて注射により siRNA の治療効果を示した報告も相次いでおり²⁶⁻²⁸, 神経難病の代表である ALS の siRNA 治療法の確立に向けて大きく前進している.

VII. siRNA のデリバリー

以上述べてきたように標的細胞までうまく到達すれば siRNA は非常に有効であると思われる. したがって, いかにして効率よくデリバリーするかが大きな課題である. これは遺伝子治療の持つ共通の問題であるが, siRNA の場合運ぶべきコンストラクトが十分に小さく大きさによる制約がないこと, また

DNAを標的とするわけではないので核内へ移行する必要が無く細胞質で機能すればよいことなどは利点といえる。細胞膜さえ越えられればよいとはいっても、実際の神経細胞は身体の奥深く存在することが多く、その標的となる組織あるいは細胞までsiRNAを運搬する必要がある。また一回の投与で済んでしまう場合はよいが、神経変性疾患などでは長期間にわたってsiRNAを効かせる必要があり、siRNAを細胞内で発現するようにした発現型siRNAとして運搬する必要がある²⁹⁾。後者のためにはウイルスベクター³⁰⁻³³⁾が用いられ、アデノウイルス、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による報告が多く見られる。我々は様々な血清型があり神経細胞への親和性が高く、長期間感染が持続し、細胞毒性の少ないアデノ随伴ウイルスを中心に研究を進めている。非ウイルス性ではカチオニックリポソームや化学修飾などの方法がある。カチオニックリポソームの有用性は基本的にはプラスミッドDNAを細胞に導入する試薬として汎用されていることでもわかるが、siRNAではそれに特化した工夫が必要でsiFECTamineといった細胞毒性の少ない機能性リポソームが開発されている³⁴⁾。最近、矢野らはグリセロールを基本骨格とした3級アミン脂質CLZ-42と生体安全性の高い卵黄レシチンで作製したカチオニックリポソームLIC-101にて転移性肝臓がんモデルを効率良く治療することに成功した²⁰⁾。我々も、LIC-101を用いてC型肝炎モデルのsiRNA治療の研究を進めている。化学修飾については、SoutschekらがApoBに対する化学修飾したsiRNAを普通に静注することにより血清コレステロール値の低下に成功したことは大きな反響を呼んだ³⁵⁾。

デリバリーとしては現段階では直接脳に打ち込むといったレベルであるが、やはり最終的には経口投与はともかく静脈注射、筋肉注射などの通常の投与方法にて目的組織まで到達させることが必要である。例えば、肝臓などでは大量の溶液に含まれたsiRNAを高圧で静脈から押し込むhydrodynamic法が開発され、それにより劇症肝炎モデルマウスの治療が成功したと報告されている³⁶⁾。神経疾患でも例えば家族性アミロイドポリニューロパチーでは、肝での変

異トランスサイレチンの生成が根本的原因であることから、siRNAを肝臓へデリバリーすることができれば治療できる可能性も充分あると期待される。また、神経内科領域では筋疾患も扱うがその場合は筋肉に直接注射するといったこともあり得る。さらに、前述の家族性ALSモデルマウスで筋注により運動ニューロンの神経終末から取り込まれて部分的ながらその治療に成功したことが報告されている²⁶⁻²⁸⁾。しかしながら、一般的には神経系ではいわゆる血液脳関門あるいは血液末梢神経関門があり、そこを越えないと神経細胞には到達できないという大きな課題もある。我々はその第一歩としてSOD1に対するsiRNAをhydrodynamic法によりマウスの脳血管内皮細胞に到達させることに成功し、organic anion transporter (OAT) 3に対するsiRNAを用いて実際に排出機能を抑制出来ることを確認している³⁷⁾。血液脳関門の壁は高く頑強であるが、siRNAに関わる基礎研究や技術革新の進歩はすさまじく、その治療応用の領域も着実に進歩しており、必ずその壁を破ることが可能であると期待している。

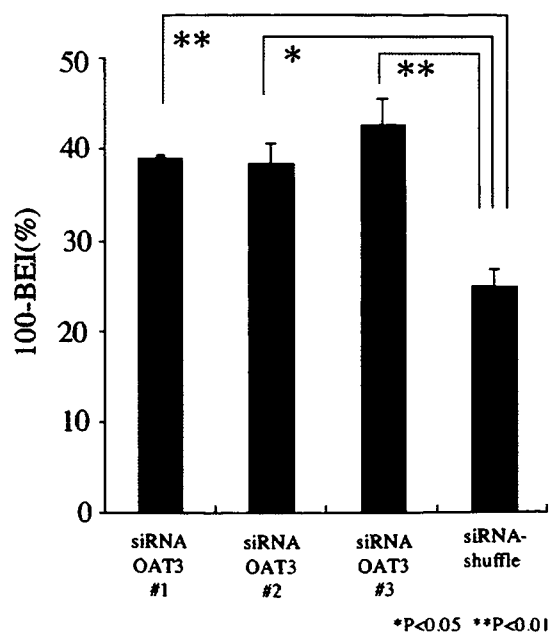


図5 Brain Efflux Index (BEI) 法で比較したorganic amine transporter (OAT) 3に対するsiRNAの機能

siRNAを投与すると100-BEIが有意に増加してOAT3の基質の排出が抑制されていることがわかる(文献37から引用)。

VIII. siRNAによる遺伝子治療の安全性

このように、siRNAによる遺伝子治療が現実のものとなってくると、その安全性の検討も必要である。実際には、ようやくそれが可能な時期に到達したともいえる。最もよくある質問は、特異性が高いとはいっても標的以外の遺伝子の発現を抑制してしまうのではないかと、ということでこれはoff-target effectと呼ばれる現象である。すなわち、標的遺伝子の標的配列に相補的な配列をもつsiRNAが、その標的配列と部分的に共通する配列をもつ別の遺伝子の発現を抑制してしまうことである³⁸⁾。19 mer中15 mer以上の相同性があるとoff-target effectが生じやすく、最低では11 merの相同性でも生じうることや、その回避にはsiRNAの中にミスマッチ配列を組み込むのがよいといった報告が見られるが、今後off-target effectのよりよい評価法とその予防法の開発を進めるとともに、実際の臨床試験においては注意深く監視していくことが必要と思われる。

今一つの大きな問題はインターフェロン反応の問題である³⁹⁻⁴¹⁾。インターフェロン反応は長鎖dsRNAによって生じ、30 mer以下の短いsiRNAでは大丈夫と思われてきたが19 merのshort hairpin RNA (shRNA)でも生じうるということが報告されている。腫瘍やウイルス感染症などの治療に用いる場合はインターフェロンそのものが治療効果を発揮する可能性があり、一概に悪いこととはいえないが、神経変性疾患の治療などでは大きな問題となる。カチオニックリポソームによるデリバリーの場合は、エンドソームに取り込まれてそこに発現しているToll like receptor (TRL)と結合することによりインターフェロン反応を惹起すると考えられている。我々自身も、このインターフェロン反応を実際に経験しそのメカニズムの検索と対処法の検討を行っているが、siRNAの設計そのもの、投与量、ベクターなど多くのことが関連していると思われる。やはり、実際の臨床試験では詳細かつ注意深い検討が必要である。

本文に紹介した我々の研究は、厚生労働省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(主任研究

者：水澤)」などの助成を受けて教室の横田隆徳助教授を中心として行われた。また、第40回脳のシンポジウムでの講演内容⁴²⁾を中心に加筆したものである。

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) Mello C, Conte D Jr.: Revealing the world of RNA interference. *Nature* **431**: 338-342, 2004.
- 3) Meister G, Tuschl T: Mechanism of gene silencing by double-strand RNA. *Nature* **431**: 343-349, 2004.
- 4) MacRae IJ, Zhou K, Li F, et al.: Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* **311**: 195-198, 2006.
- 5) Reynolds A, Leake D, Boese Q, et al.: Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol.* **22**: 326-330, 2004.
- 6) Amarzguioui M, Prydz H: An algorithm for selection of functional siRNA sequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316**: 1050-1058, 2004.
- 7) 内藤雄樹, 山田智之, 程久美子 他: 効率的なsiRNAの設計. RNA工学の最前線(中村義一, 大内将司監修), シーエムシー出版, 東京, pp. 104-113, 2005.
- 8) Rosenberg RN: Machado-Joseph disease: an autosomal dominant motor system degeneration. *Mov. Disord.* **7**: 193-203, 1992.
- 9) Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, et al.: CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat. Genet.* **8**: 221-228, 1994.
- 10) Ikeda H, Yamaguchi M, Sugai S, et al.: Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induced cell death in vitro and in vivo. *Nat. Genet.* **13**: 196-202, 1996.
- 11) Matsumura R, Takayanagi T, Murata K, et al.: Relationship of (CAG)_nC configuration to repeat instability of the Machado-Joseph disease gene. *Hum. Genet.* **98**: 643-645, 1996.
- 12) Li Y, Yokota T, Matsumura R, et al.: Sequence-dependent and independent inhibition specific for mutant ataxin-3 by small interfering RNA. *Ann. Neurol.* **56**: 124-129, 2004.
- 13) Caplen NJ, Taylor JP, Statham VS, et al.: Rescue of polyglutamine-mediated cytotoxicity by double-stranded RNA-mediated RNA interference. *Hum. Mol. Genet.* **11**: 175-184, 2002.
- 14) Miller VM, Xia H, Marrs GL, et al.: Allele-specific silencing of dominant disease genes. *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. USA **100**: 7195–7200, 2003.
- 15) Takahashi H, Ishikawa K, Tsutsumi T, et al.: A clinical and genetic study in a large cohort of patients with spinocerebellar ataxia type 6. *J. Hum. Genet.* **49**: 256–264, 2004.
 - 16) Ishikawa K, Tanaka H, Saito M, et al.: Japanese families with autosomal dominant pure cerebellar ataxia map to chromosome 19p13.1-p13.2 and are strongly associated with mild CAG expansions in the spinocerebellar ataxia type 6 gene in chromosome 19p13.1. *Am. J. Hum. Genet.* **61**: 336–346, 1997.
 - 17) Kubodera T, Yokota T, Ishikawa K, et al.: New RNAi strategy for selective suppression of a mutant allele in polyglutamine disease. *Oligonucleotides* **15**: 298–302, 2005.
 - 18) 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. Commun.* **310**: 1062–1066, 2003.
 - 19) Singer O, Marr RA, Rockenstein E, et al.: Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model. *Nat. Neurosci.* **8**: 1343–1349, 2005.
 - 20) 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.
 - 21) Jacque JM, Triques K, Stevenson M: Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* **418**: 435–438, 2002.
 - 22) Gitlin L, Karelsky S, Andino R: Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature* **418**: 430–434, 2002.
 - 23) 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**: 602–608, 2003.
 - 24) Yokota T, Miyagishi M, Hino T, et al.: siRNA-based inhibition specific for mutant SOD1 with single nucleotide alternation in familial ALS, compared with ribozyme and DNA enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **314**: 283–291, 2004.
 - 25) Saito Y, Yokota T, Mitani T, et al.: Transgenic siRNA halts amyotrophic lateral sclerosis in a mouse model. *J. Biol. Chem.* **280**: 42826–42830, 2005.
 - 26) Raoul C, Abbas-Terki T, Bensadoun JC, et al.: Lentiviral-mediated silencing of SOD1 through RNA interference retards disease onset and progression in a mouse model of ALS. *Nat. Med.* **11**: 423–428, 2005.
 - 27) 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.
 - 28) Miller TM, Kaspar BK, Kops GJ, et al.: Virus-delivered small RNA silencing sustains strength in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **57**: 773–776, 2005.
 - 29) 山田佳世子, 水谷隆之: siRNA医薬品の現状と今後の展望. RNA工学の最前線(中村義一, 大内将司監修), シーエムシー出版, 東京, pp. 126–138, 2005.
 - 30) Hommel JD, Sears RM, Georgescu D, et al.: Local gene knockdown in the brain using viral-mediated RNA interference. *Nat. Med.* **9**: 1539–1544, 2003.
 - 31) Gregorevic P, Blankinship MJ, Allen JM, et al.: Systemic delivery of genes to striated muscles using adeno-associated viral vectors. *Nat. Med.* **10**: 828–834, 2004.
 - 32) Wang Z, Zhu T, Qiao C, et al.: Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nat. Biotechnol.* **23**: 321–328, 2005.
 - 33) Nakai H, Fuess S, Storm TA, et al.: Unrestricted hepatocyte transduction with adeno-associated virus serotype 8 vectors in mice. *J. Virol.* **79**: 214–224, 2005.
 - 34) 和田 章, David MA: 機能性リボソームによる siRNA 細胞内デリバリーの現状と展望. *細胞工学* **24**: 358–362, 2005.
 - 35) Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, et al.: Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* **432**: 173–178, 2004.
 - 36) McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, et al.: RNA interference in adult mice. *Nature* **418**: 38–39, 2002.
 - 37) Hino Y, Yokota T, Ito S, et al.: In vivo delivery of small interfering RNA targeting brain capillary endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **340**: 263–267, 2006.
 - 38) Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, et al.: Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat. Biotechnol.* **21**: 635–637, 2003.
 - 39) Bridge AJ, Pebernard S, Ducraux A, et al.: Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat. Genet.* **34**: 263–264, 2003.
 - 40) Kim DH, Longo M, Han Y, et al.: Interferon induction by siRNAs and ssRNAs synthesized by phage polymerase. *Nat. Biotechnol.* **22**: 321–325, 2004.
 - 41) Hornung V, Guenther-Biller M, Bourquin C, et al.: Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat. Med.* **11**: 263–270, 2005.
 - 42) 水澤英洋: 第40回脳のシンポジウム. 神経疾患治療の新しいテクノロジー. RNA干渉. *神経進歩* **49**: 915–920, 2005.

RNA干渉による脊髄小脳変性症の治療*

水澤 英洋**

Key Words : spinocerebellar degeneration, gene therapy, RNA interference, small interfering RNA, Machado-Joseph disease

はじめに

脊髄小脳変性症とは、小脳、脳幹、脊髄を中心とする神経系の変性により主に失調性歩行、四肢協調運動障害、失調性構音障害、眼振などの運動失調症を呈する多くの神経変性疾患の総称である。人口10万人あたり7～10名と神経変性疾患の中では比較的頻度が高い。孤発性が約65%で遺伝性が約35%と遺伝性のものの比率が大きいのも特徴の一つである (Fig. 1)。孤発性のものはオリブ橋小脳萎縮症を中心に線条体黒質変性症とShy-Drager症候群を含む多系統萎縮症(MSA)と皮質性小脳萎縮症に大別される。MSAはオリゴデンドログリアや神経細胞の細胞質や核の中に α -synucleinから成る封入体を有し、現在その発症メカニズムが研究されている。皮質性小脳萎縮症は現在もほとんど研究は進んでいない。いずれも、今後発症機序が解明されればそれに基づいた治療法の開発が期待できる。一方、遺伝性疾患の多くは優性遺伝性で現在までに約30の病型が知られている (Table 1)。原因となる遺伝子変異が判明したものの多くはCAGリピートの異常伸長によるポリグルタミン病であり、それに加えて近年はミスセンス変異などによるものも知られるようになってきている。ポリグ

ルタミン病の発症機序としては変異蛋白が核内に移行し転写障害などにより細胞の機能障害を来とし、最終的には細胞死にも至ると推定されている¹⁾。これらの遺伝性疾患の頻度は少ないが、発症機序が判明しそれにもとづく治療法が開発されれば前述の孤発性のものにも活用できる可能性があり研究の価値は高い。一方、多くの疾患は優性遺伝性であることから変異遺伝子あるいはその産物が神経細胞に対して毒性を発揮している (gain of toxic function) と考えられる。したがって、発症機序に関わりなく原因遺伝子の発現そのものをブロックする遺伝子治療も重要な戦略の一つと思われる。このような考えから、われわれは今回の特集であるRNA干渉 (RNA interference: RNAi) を用いた遺伝子治療を研究しておりここではその紹介を行う²⁻⁴⁾。

I. Machado-Joseph病 (MJD)

MJDは、本邦の遺伝性脊髄小脳変性症の中でもっとも頻度の多い病型で、臨床的には主に成人期に失調性歩行障害、構音障害で発症して、錐体路徴候、ジストニー、ミオキミアなどの不随意運動、眼球運動制限、びっくり眼などを呈する。緩徐に進行し、やがて車椅子状態から最終的には寝

* Treatment of Spinocerebellar Degeneration by RNA Interference.

** 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学 Hidehiro MIZUSAWA : Department of Neurology and Neurological Science, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University

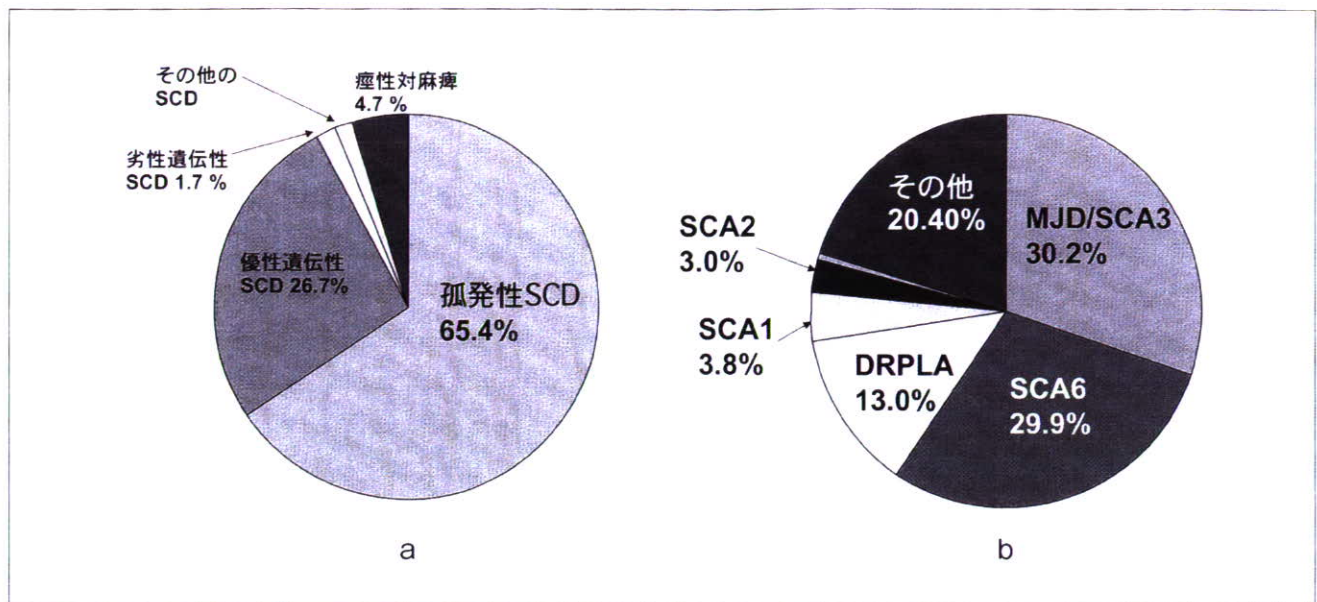


Fig. 1a, b Frequency of spinocerebellar degenerations in Japan
 Analysis of surveillance form of each patients by the research group on motor ataxias.
 DRPLA = dentatorubral pallido-luisian atrophy

たきりになる⁵⁾。原因は1番染色体長腕にあるMJD1遺伝子の中のCAGリピートの異常伸長で、正常ではCAGリピート数が13~36であるのに対して患者では62~82と増加している^{6,7)}。残念なことにこのCAGリピートの長さの差を認識するsmall interfering RNA (siRNA)の作製は困難であり原因遺伝子がそれ以外の特徴を有していないとRNAiの活用はできないことになる。MJD1遺伝子では正常の多型としてCAGリピートの直後がCあるいはGになることが知られており、CAGリピートが異常伸長した場合は全てCであり、正常リピート数であっても20以上では多くの場合Cでそれ以外はGとなる (Fig. 2)⁸⁾。したがって、完全には正常と変異遺伝子を区別してはいないがまずこの多型に注目して (CAG) nCのみを認識して抑制するsiRNAを複数設計、作製しその効果を検索した。

まず、アッセイ系として22回あるいは79回のCAGリピートを含み、CAG直後をCあるいはGとしたMJD1遺伝子断片を組み込んだプラスミドQ22G, Q22C, Q79Cを作製した。これらを前述のように複数作製したsiRNAとともに培養系のHEK293T細胞に導入しsiRNAの効果を検討した。その結果一つのsiRNAが容量依存性にQ79Cに由来する変異ataxin3の発現をほとんど

完全に抑制した (Fig. 3)。もちろんQ22Gに由来する正常ataxin 3には全く影響しない⁹⁾。類似の結果はMillerらによっても報告されている^{10,11)}。興味深いのはQ22Cに対する効果であり、siRNAを配列特異的に作製していることから、理論的にはCを有するQ22CもQ79Cと同様に抑制されるはずである。しかし、実際にはQ22CはQ22Gと同様に全く抑制されなかったのである。このsiRNAによるQ79Cに選択的な発現抑制効果は、LDHの遊離やtrypan blue染色による細胞死の抑制効果を見た研究でも裏付けられている。すなわち、このsiRNAは結果として変異ataxin 3のみを特異的にほぼ完全に抑制したのである。なぜにこのようなことが可能になったのかということについてはまだ不明であるが、標的となるRNAの二次あるいは三次構造が関係しているのではないかと推測される。

II. 脊髄小脳失調症6型 (SCA6)

SCA6もCAGリピート病の一つであり、やはり変異と正常を完全に区別する特異な配列は存在しない¹²⁾。一応、リピート前のGGCAGという配列が挿入されるかされないかでCAGリピートがポリグルタミンに翻訳されるかどうかが決まり、SCA6では挿入されたものの比率が大きくなるこ

Table 1 Autosomal dominant spinocerebellar ataxias

病型	locus	gene	mutation type	mutation site	protein	function
spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1)	6p23	<i>ATXN1</i>	CAG repeat	coding exon	ataxin-1	?
spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2)	12q24	<i>ATXN2</i>	CAG repeat	coding exon	ataxin-2	?
Machado-Joseph disease (MJD/SCA3)	14q24.3-q31	<i>ATXN3</i>	CAG repeat	coding exon	ataxin-3	?
spinocerebellar ataxia type 4 (SCA4)	16q22.1	?				
spinocerebellar ataxia type 5 (SCA5)	11p11-q11	<i>SPTBN2</i>	missense, in-frame deletion	coding exon	β III-spectrin	vesicle trafficking
spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6)	19p13.1	<i>CACNA1A</i>	CAG repeat	coding exon	α 1A-Calcium channel	
spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7)	3p21.1-p12	<i>ATXN7</i>	CAG repeat	coding exon	ataxin-7	?
spinocerebellar ataxia type 8 (SCA8)	13q21	<i>ATXN8</i>	non-coding CTG repeat	3' -UTR		?
spinocerebellar ataxia type 10 (SCA10)	22q13	<i>ATXN10</i>	non-coding AATCT repeat	intron		?
spinocerebellar ataxia type 11 (SCA11)	15q14-q21.3	?				
spinocerebellar ataxia type 12 (SCA12)	5q31-q33	<i>PPP2R2B</i>	non-coding CAG repeat	5' -UTR		?
spinocerebellar ataxia type 13 (SCA13)	19q13.3-q13.4	<i>KCNK3</i>	missense	coding exon	VGKC (potassium channel) Kv3.3	
spinocerebellar ataxia type 14 (SCA14)	19q13.4	<i>PKCγ</i>	missense mutation	coding exon	PKC γ (protein kinase)	
spinocerebellar ataxia type 15 (SCA15)	3p24.2-p25.3	?				
spinocerebellar ataxia type 16 (SCA16)	8q22.1-q24.1	?				
spinocerebellar ataxia type 17 (SCA17)	6q27	<i>TBP</i>	CAG repeat	coding exon	TBP (basic transcription factor)	
spinocerebellar ataxia type 18 (SCA18)	7q22-q32	?				
spinocerebellar ataxia type 19 (SCA19)	1p21-q21	?				
spinocerebellar ataxia type 20 (SCA20)	11p13-q11	?				
spinocerebellar ataxia type 21 (SCA21)	7p21-15	?				
spinocerebellar ataxia type 22 (SCA22) = SCA19	1p21-q23	?				
spinocerebellar ataxia type 23 (SCA23)	20p	?				
spinocerebellar ataxia type 25 (SCA25)	2p21-p13	?				
spinocerebellar ataxia type 26 (SCA26)	19p13.3	?				
dentatorubral pallido-luisian atrophy (DRPLA)	12p13.31	<i>DRPLA</i>	CAG repeat	coding exon	atrophin-1	?
spinocerebellar ataxia type 27 (SCA27)	13q34	<i>FGF14</i>	missense, frame shift	coding exon	FGF14	
Ferritin light chain gene (FTL) abnormality	19q13.3-q13.4	<i>FTL</i>	2 base pair insertion	coding exon	Ferritin light chain	
spinocerebellar ataxia type 28 (SCA28)	Chr18	?				

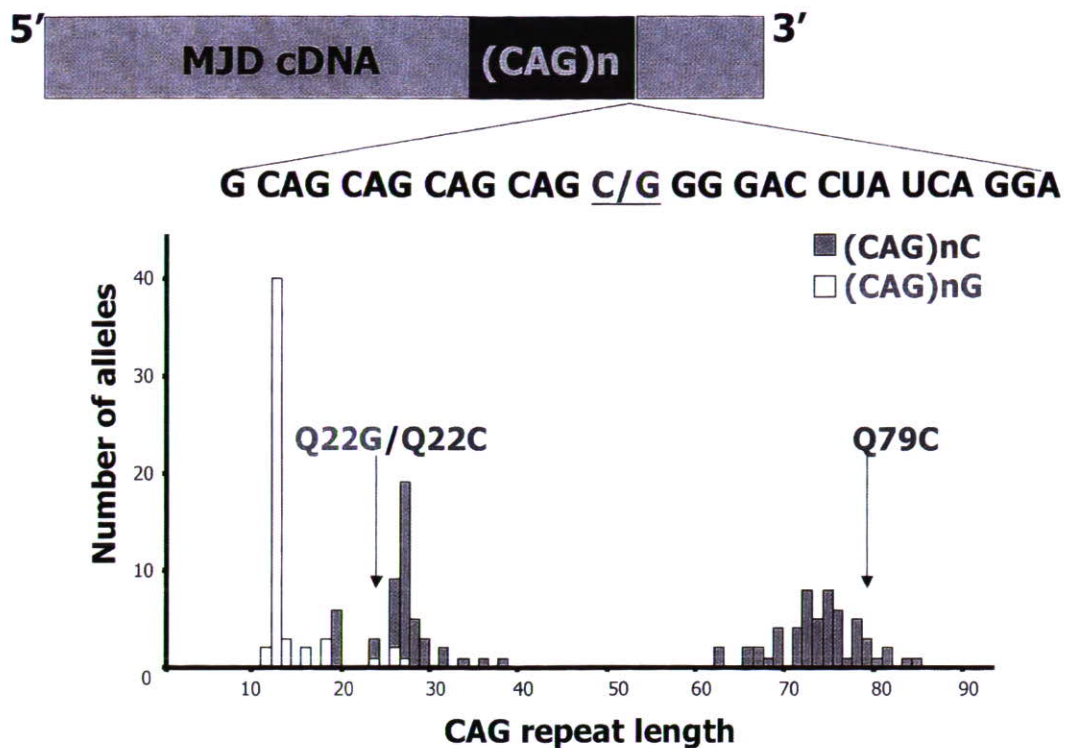


Fig. 2 C/G polymorphism following CAG repeats of MJD1 gene.

Patients with abnormally expanded repeats and normal controls with longer repeats have C. (cited from ref. 9)

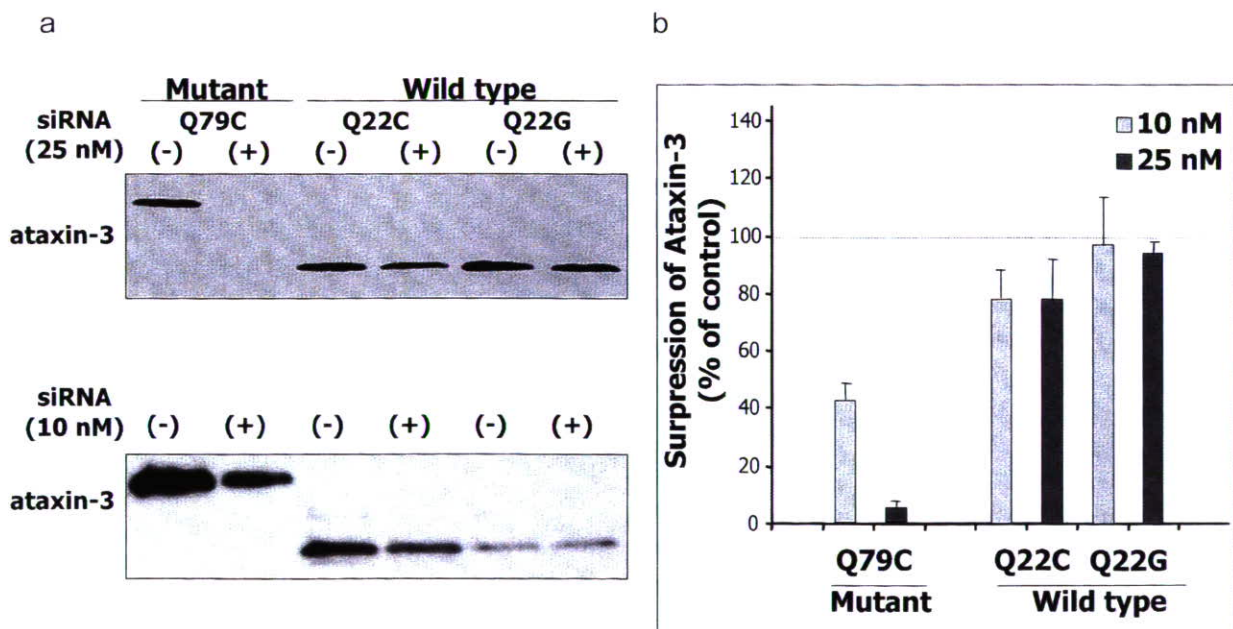


Fig. 3 A siRNA with 25nM showed no effect not only on Q22G but also Q22C, resulting in suppression only on Q79C. (cited from ref. 9)

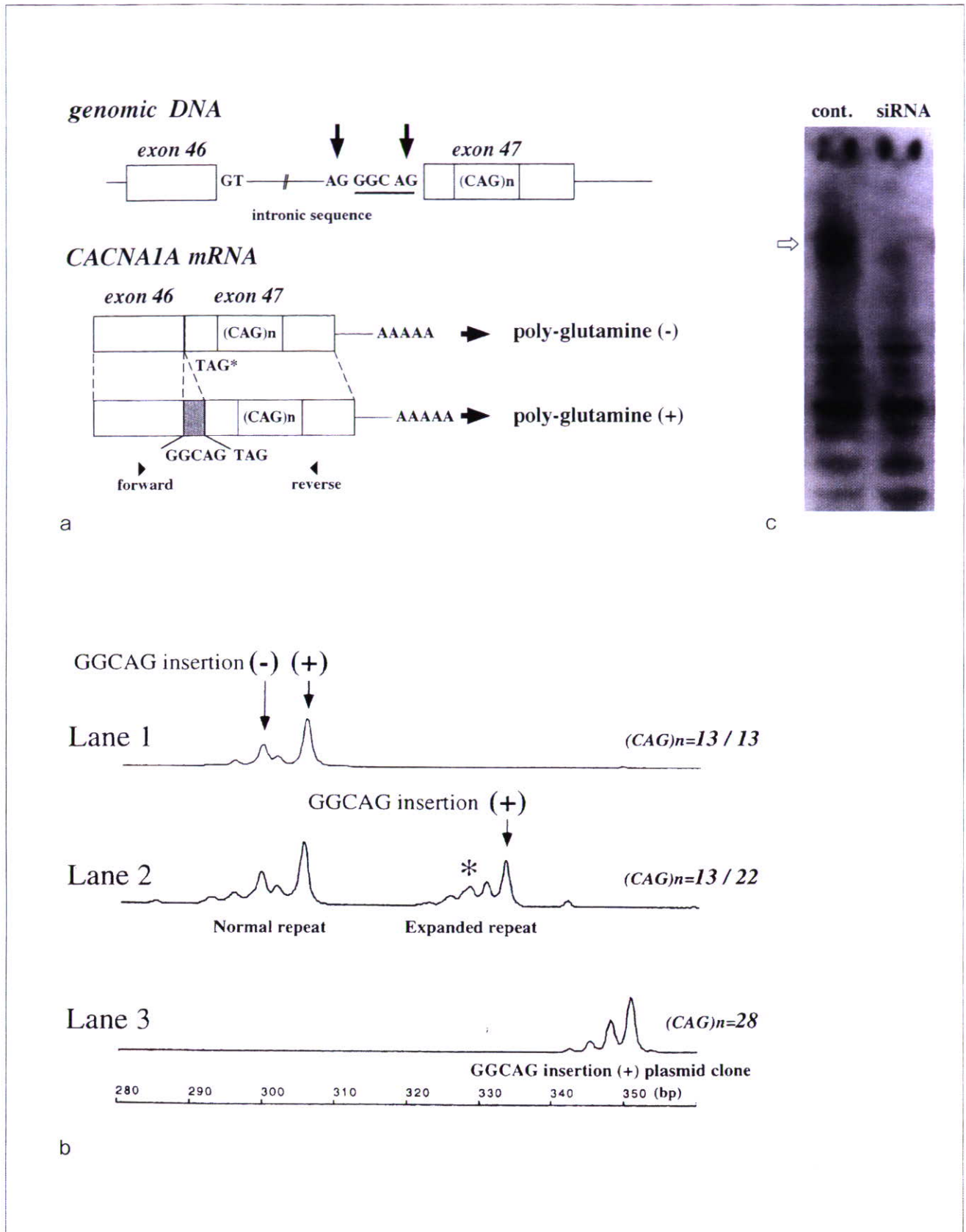


Fig. 4a, b, c Genomic DNA and mRNA of CACNA1A — the causative gene of SCA6 — CACNA1A mRNAs are divided into 2 major form with or without GGCAG insertion prior to CAG repeats (a). When the repeat is expanded, only the peak of mRNA with the insertion appears obvious suggesting the relative increase of the protein with expanded polyglutamine tract (b). A siRNA against the construct with GGCAG insertion dramatically suppress the expression of the protein (c). (cited from ref. 13)

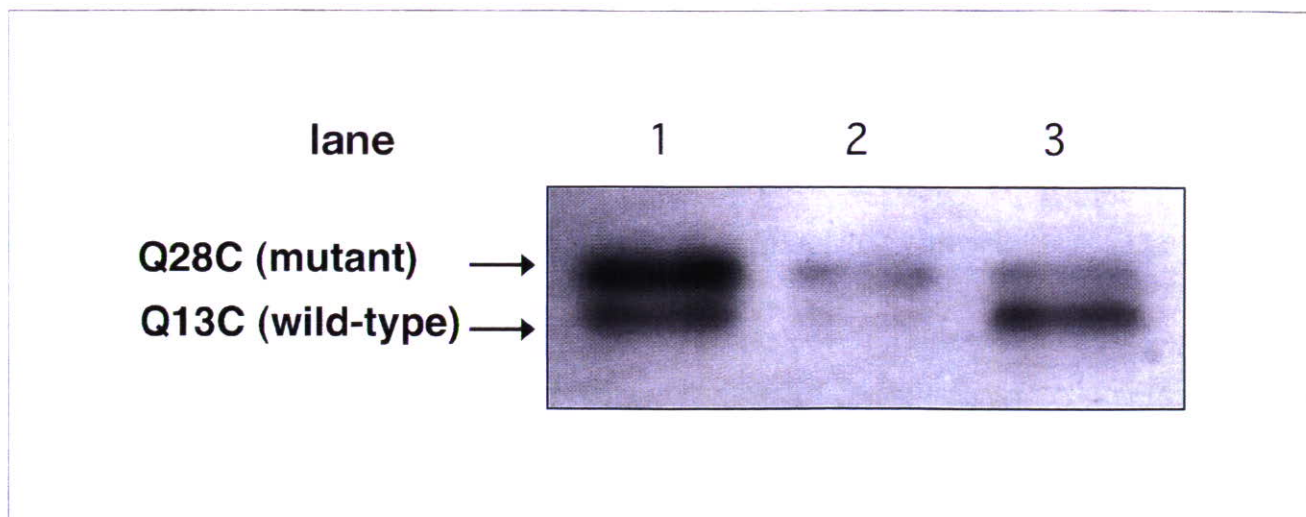


Fig. 5 Specific suppression of the mutant α 1A-Ca channel protein in SCA6

After application of a non-specific siRNA against both mutant and normal constructs on cultured cells (lane 2), the new construct containing different base sequences but without any change of amino acid sequences successfully rescued the expression of the normal protein (lane 3).

とが知られている (Fig. 4)¹³. したがって、GGCAGの有無を区別するsiRNAを作製したところ、*in vitro*ではGGCAGをもつmRNAを特異的に抑制するものが得られた (Fig. 5). しかし、GGCAGの挿入の有無はMJDのG/C多型ほどは疾患特異性はないと思われることから、SC6に代表されるポリグルタミン病一般に対するsiRNA戦略としては別の工夫が必要である. siRNAはRNAレベルで作用することから、われわれはアミノ酸配列すなわち蛋白を変えずに塩基配列のみを変更することを活用した. 一般に一つのアミノ酸には複数の塩基配列が対応しており、例えばバリンはGUU, GUC, GUA, GUGによってコードされている. まず非特異的siRNAにより正常および変異CACNA1A遺伝子の発現を全て抑制する. 同時に、この非特異的siRNAが作用しないように対応する塩基配列を変更しかつアミノ酸配列は変わらないコンストラクトを導入した¹⁴. その結果、CAGリピートが28回に異常伸長したもののみを抑制し正常蛋白を保つことに成功した (Fig. 6). この手法は、理論的には全てのポリグルタミン病のみならず全ての遺伝子変異に応用可能な手法ということが出来る. もちろん、塩基配列の異なる‘正常’遺伝子が本当に正常に機能するか、安全であるかといった多くの問題は残っており今後の課題である.

III. 今後の展望

これらは未だ培養細胞での話であるが、われわれは変異SOD1による家族性筋萎縮性側索硬化症のモデルマウスではsiRNAが十分に効果を発揮することを確認しており他にも複数のレポートがある¹⁵⁻¹⁸. したがって、siRNAをうまく標的組織まで到達させることができれば臨床応用へ向けて大きく進展すると思われる. すなわちベクターとデリバリーが大きな課題であり、とくに脳には血液脳関門も存在する. 現在、様々なウイルスベクターおよび非ウイルスベクターあるいは化学修飾などを活用して工夫しているが、動物モデルを用いてデリバリー効率を上げるとともに、安全性の検証を進める必要がある.

文 献

- 1) Ross CA : Polyglutamine pathogenesis : Emergence of unifying mechanisms for Huntington's disease and related disorders. *Neuron* 35 : 819-822, 2002
- 2) 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
- 3) Mello C, Conte Jr. D : Revealing the world of RNA interference. *Nature* 431 : 338-342, 2004

- 4) Meister G, Tuschl T : Mechanism of gene silencing by double-strand RNA. *Nature* 431 : 343-349, 2004
- 5) Rosenberg RN : Machado-Joseph disease : an autosomal dominant motor system degeneration. *Mov Disord* 7 : 193-203, 1992
- 6) Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M et al : CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet* 8 : 221-228, 1994
- 7) Ikeda H, Yamaguchi M, Satoshi S et al : Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induced cell death in vitro and in vivo. *Nat Genet* 13 : 196-201, 1996
- 8) Matsumura R, Takayanagi T, Murata K et al : Relationship of (CAG) nC configuration to repeat instability of the Machado-Joseph disease gene. *Hum Genet* 98 : 643-645, 1996
- 9) Li Y, Yokota T, Matsumura R et al : Sequence-dependent and independent inhibition specific for mutant ataxin-3 by small interfering RNA. *Ann Neurol* 56 : 124-129, 2004
- 10) Caplen NJ, Taylor JP, Statham VS et al : Rescue of polyglutamine-mediated cytotoxicity by double-stranded RNA-mediated RNA interference. *Hum Mol Genet* 11 : 175-184, 2002
- 11) Miller VM, Xia H, Marrs GL et al : Allele-specific silencing of dominant disease genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 : 7195-7200, 2003
- 12) Takahashi H, Ishikawa K, Tsutsumi T et al : A clinical and genetic study in a large cohort of patients with spinocerebellar ataxia type 6. *J Hum Genet* 49 : 256-264, 2004
- 13) Ishikawa K, Tanaka H, Saito M et al : Japanese families with autosomal dominant pure cerebellar ataxia map to chromosome 19p13.1-p13.2 and are strongly associated with mild CAG expansions in the spinocerebellar ataxia type 6 gene in chromosome 19p13.1. *Am J Hum Genet* 61 : 336-346, 1997
- 14) Kubodera T, Yokota T, Ishikawa K et al : A new RNAi strategy for selective suppression of mutant allele in polyglutamine disease. *Oligonucleotide* 15 : 298-302, 2005
- 15) Saito Y, Yokota T, Mitani T et al : Transgenic siRNA halted amyotrophic lateral sclerosis in a mouse model. *J Biol Chem* 280 : 42826-42830, 2005
- 16) Raoul C, Abbas-Terki T, Bensadoun J-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
- 17) 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
- 18) Miller TM, Kaspar BK, Kops GJ et al : Virus-delivered small RNA silencing sustains strength in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 57 : 773-776, 2005

Treatment of Spinocerebellar Degeneration by RNA Interference

Hidehiro MIZUSAWA

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

RNA interference (RNAi) is a process whereby small noncoding RNAs silence specific genes. It is important to realize that dsRNAs shorter than 30 base pairs (small interfering RNA : siRNA) could be used to trigger an RNAi response in mammals. Using the RNAi machinery, it would be possible to suppress the expression of genes which cause many intractable neurological diseases including spinocerebellar degeneration (SCD). About 35% of all ACD patients in Japan suffer from hereditary forms most of which are autosomal dominant. Unfortunately, the most common mutation is CAG repeat expansion which appears impossible to be distinguished by siRNA. First, we developed an siRNA specific for G/C polymorphism following CAG repeat in MJD1 gene and fortunately it turned out to work

very well specific for the difference between the repeat lengths 22 and 79. However, there is few such polymorphism in spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) although the GGCAG insertion leading to translation of the protein with polyglutamine may be a candidate and we successfully developed siRNA specific for the mRNA with GGCAG insertion. Then we developed a new technique to suppress only the mutant protein by rescuing the normal protein with different base sequences after suppression of the both normal and mutant proteins. The next problem is the delivery of siRNAs to target tissues particularly brain parenchyma which has blood brain barrier. There are also many questions regarding specificity, efficacy, and safety of siRNA therapy in vivo.

特集 第40回脳のシンポジウム

● 神経疾患治療の新しいテクノロジー

RNA 干渉*

水澤英洋**

キーワード：RNA interference (RNAi), small interfering RNA (siRNA), Machado-Joseph disease, SOD1, siRNA transgenic mouse

I. RNAi とは

RNAi とは、二本鎖 RNA (dsRNA) が dicer と呼ばれる rebonucleaseIII により約 21 mer の小さな 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ことである¹⁻³⁾(図 1)。この siRNA や microRNA と呼ばれる比較的小さな RNA が、mRNA の分解以外にも 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る。しかしながら、RISC そのものの実態がまだ十分解明されていないなど、わからないことも多い。この mRNA の発現抑制の過程は非常に特異的であり、病的な遺伝子発現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。筆者らは、まず常染色体優性遺伝性神経変性疾患やウイルス感染症に対して、siRNA を用いた遺伝子治療を開発すべく研究を行っている。このような発想に立つ治療としてはすでにアンチセンス DNA、リボザイムなどが知られており、それぞれ利点と欠点があるが、総合的には siRNA が最も有用とされている。

II. 標的疾患や標的遺伝子に特異的な siRNA の作製

標的分子としては、変異遺伝子が悪い機能を獲得すると考えられる常染色体優性遺伝性疾患の原因遺伝子があげられるが、ウイルス感染を中心とする感染症も、外界からの異常分子(遺伝子)が侵入増殖していると考ええると、やはり非常によい適応である。その他、例えば生活習慣病や悪性腫瘍などでも発症機序において、何か増加している分子をみつけられれば、それを抑えるという RNAi 治療は有用と思われる。まず標的 mRNA の塩基配列から、特異性が高く効率のよい siRNA をデザインする必要がある。これにはすでにある程度のルールが存在するが、実際は必ずしも理論通りには行かないので、複数個作製して最も目的に合ったものを用いることになる。

III. Machado-Joseph 病 (MJD)

MJD (脊髄小脳失調症 3 型 : SCA3) は、本邦の遺伝性脊髄小脳変性症の中で最も頻度の多い病型で、主に失調性歩行障害、構音障害で発症して、錐体路徴候、ジストニアなどの不随意運動、眼球運動制限、びっくり眼などを呈し、緩徐に進行し、車椅子状態から最終的には寝たきりになる⁴⁻⁶⁾。神経病理学的には小脳歯状

2005 年 10 月 27 日受稿

* New technologies for treatment of neurological diseases : RNA interference.

** 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学 (〒113-8519 東京都文京区湯島 1-5-45) Hidehiro MIZUSAWA : Department of Neurology and Neurological Science, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan.

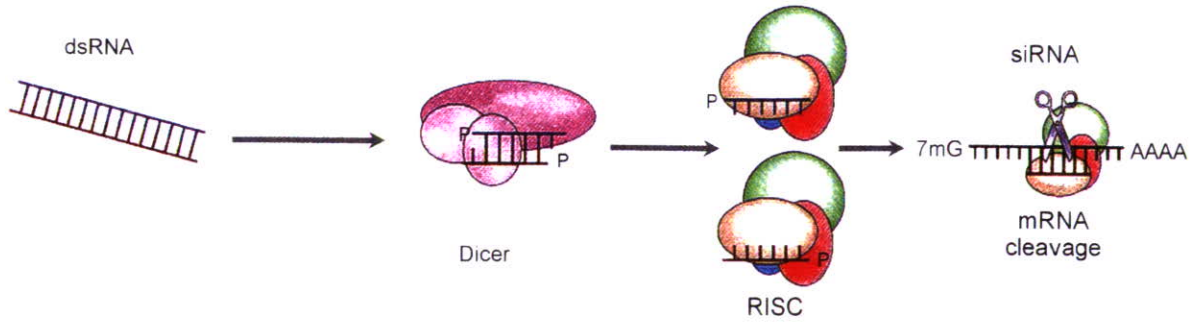


図 1 RNAi の作用機構

説明は本文参照 (文献 3 より引用改変)。

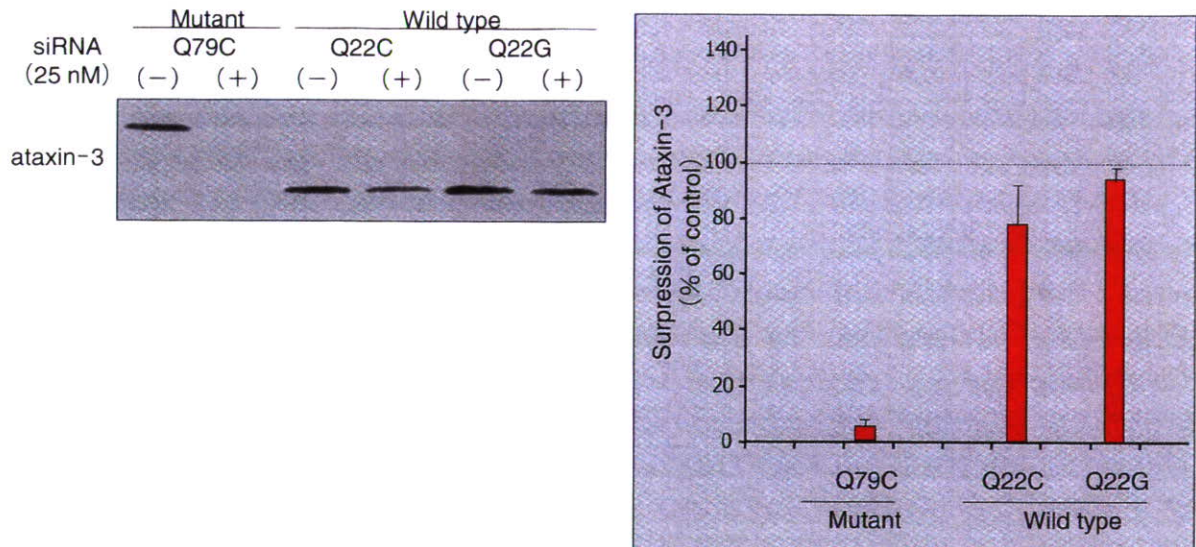


図 2 作製した siRNA は 25nM 用いると Q79C (ポリグルタミン鎖が 79 で多型が C) の蛋白の発現をほとんど完全に抑制するが, Q22G はもちろん Q22C に対してもほとんど影響しない (文献 8 から引用改変)。

核, 脳幹, 大脳基底核の変性がみられる。原因は 1 番染色体長腕にある MJD1 遺伝子の中の 3 塩基配列 CAG の繰り返し (CAG リピート) の異常伸長で, 正常では CAG リピート数が 13~36 であるのに対して, 患者では 62~82 と増加している。発症はふつう成人期であるが, 世代を経るごとにリピート数が伸長して, 発症も若年化する。CAG はアミノ酸のグルタミンをコードしており, 翻訳された異常伸長したポリグルタミンが神経細胞の変性を引き起こすと考えられている。

MJD1 遺伝子に対する siRNA を作製する場合, 前述の CAG リピートの長さの違いを認識することは困難であり, リピート以外のところは全く同じである。いろいろ検討した結果, CAG リピートの直後が C あるいは G になる多型があり, CAG が異常伸長した場合は全て C であり, 正常リピート数であっても 20 以上では多くの場合 C, それ以外は G となる⁷⁾。したがって, 完全には野生型と変異型を区別してはいないが, まずこの多型に注目して (CAG)nC のみを抑制し, (CAG)nG

には影響しない siRNA を設計・作製し, その効果を検索した⁸⁾。

まず, アッセイ系として 22 回あるいは 79 回の CAG リピートを含み, CAG 直後を C あるいは G とした MJD1 遺伝子断片を組み込んだプラスミドを作製した (Q22G, Q22C, Q79C)。これらを前述のように複数作製した siRNA とともに培養系の HEK293T 細胞に導入し, siRNA の効果を検討した。その結果, 1 つの siRNA により容量依存性に Q79C に由来する変異 ataxin3 の発現を, ほとんど完全に抑制することに成功した (図 2)。もちろん Q22G に由来する正常 ataxin 3 には全く影響しない。類似の結果は Miller らによっても報告されている^{9,10)}。ここで問題は Q22C に対する効果であり, 当初 siRNA を配列特異的に作製していることから, 理論的には C を有する Q22C も Q79C と同様に抑制されるのではないかと思われた。しかし, 実際には興味深いことに Q22C は Q22G と同様に全く抑制されず, この Q79C 選択的発現抑制効果は, LDH 遊離

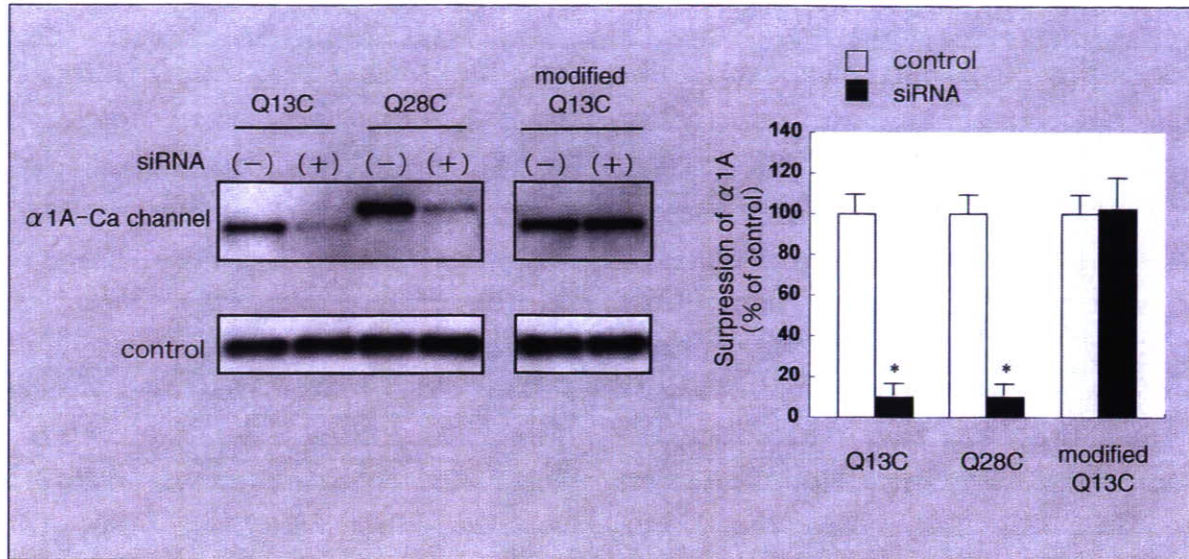


図3 作製した siRNA はリピート数 13 回, 28 回の両方の $\alpha 1A$ -Ca チャネル蛋白の発現を抑制するが, 塩基配列を変えた modified construct には全く影響しない (文献 13 から引用改変)。

や trypan blue 染色による細胞死の抑制効果でも確認された。すなわちこの siRNA は, 変異 ataxin 3 の発現とその機能のみをほぼ完全に抑制するといえる。この特異性変化の理由はまだ不明であるが, 標的となる RNA の二次あるいは三次構造が関係しているのではないかと推測される。

IV. 脊髄小脳失調症 6 型 (SCA6) とポリグルタミン病一般への対応

SCA6 も CAG リピート病の 1 つであり, やはり変異と正常を完全に区別する特異な配列は存在しない¹¹⁾。一応, リピート前の GGCAG という配列が挿入されるかされないかで, CAG リピートがポリグルタミンに翻訳されるかどうかが決まり, SCA6 では挿入されたものの比率が大きくなることが知られている¹²⁾。したがって, GGCAG の有無を区別する siRNA を作製したところ, *in vitro* では GGCAG をもつ mRNA を特異的に抑制するものが得られた。しかし, GGCAG の挿入の有無は MJD の G/C 多型ほどは疾患との関連はないと思われることから, SCA6 に代表されるポリグルタミン病に対する siRNA 戦略としては, 別の工夫が必要である。

ふつう 1 つのアミノ酸には複数の塩基配列が対応しており, 例えば, ロイシンは UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG によってコードされている。したがって, 塩基配列を変更してもアミノ酸配列は不変, すなわち蛋白としては不変ということが可能となる。我々は, このことを活用して非特異的 siRNA により正常および変異 CACNA1A 遺伝子の発現を全て抑制するが, 同時にこの siRNA が作用しないように対応する塩基配列

を変更し, かつアミノ酸配列は変わらないコンストラクトを導入することを試みた¹³⁾。その結果, CAG リピートが 28 回に異常伸長したもののみを抑制し, 正常蛋白をレスキューすることに成功した (図 3)。このことは, 理論的には全てのポリグルタミン病のみならず, 全ての遺伝子変異に応用可能な手法である。もちろん, 導入する塩基配列の異なった '正常' 遺伝子が本当に同じ機能を有するか, 安全かといった多くの解決すべき問題は残っているが, siRNA 技術を応用するに当たり, 様々な工夫が可能であることを示す 1 つの例といえる。

V. 非遺伝性疾患への応用

生活習慣病である脳血管障害や孤発性アルツハイマー病など, 非遺伝性のいわゆる common disease に対しても siRNA 治療は可能であろうか。我々は脳血管障害時に発現する分子として細胞接着分子の E-selectin に注目し, 培養細胞に発現した外来性の E-selectin のみならず, ヒト血管内皮細胞へのリポソームを用いた新規遺伝子導入法を工夫することにより, 炎症刺激による内在性の E-selectin 発現をも著明に抑制することに成功した¹⁴⁾。その結果, 実際に白血球の血管内皮細胞への接着を長時間にわたり抑制することが判明した。したがって, siRNA 治療は適切な標的分子を選択することで, 非遺伝性の common disease にも十分に応用可能であると思われる。これは悪性腫瘍についても同様であり, 適切な標的分子を選択することで siRNA を応用することが可能であり, 実際に大きな成果が上げられつつある¹⁵⁾。また, 感染症とくにウ

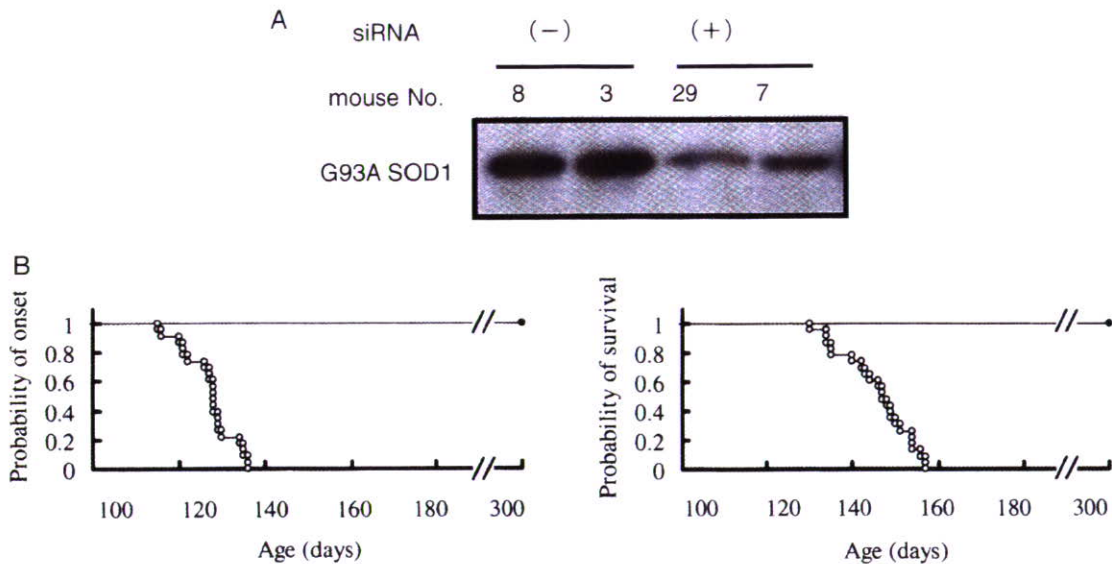


図4 掛け合わせによってできた siRNA を持つ G93ASOD1 トランスジェニックマウスでは SOD1 蛋白の発現が高度に抑制されており (A), 約 300 日までの経過観察では全く発症しないが (●), siRNA を持たないものは 110~130 日でほとんどが発症する (○) (B: 文献 20 から引用)。

ウイルス感染はまさに外来性の遺伝子そのものであり非常によいターゲットである^{16,17)}。もちろん、一般にウイルスは非常に変異しやすいなど、生体の防御機構をくぐり抜ける工夫が備わっているため、siRNA を応用するにはそれなりの工夫が必要である。我々は日本に多い C 型肝炎ウイルスに対する非常に効率の良い siRNA を開発することに成功し、現在動物実験を進めている¹⁸⁾。

VI. 実際の個体内では siRNA は本当に有効であろうか？

これは siRNA による遺伝子治療における最も本質的な命題の 1 つである。我々はこれに対して変異 SOD1 による家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) を対象疾患として、SOD1 に対する siRNA を過剰発現したトランスジェニック・マウス (SOD1-siRNA TgM) を作製し、それと疾患モデルの変異 SOD1 トランスジェニック・マウス (SOD1G93ATgM) とを掛け合わせることを試みた^{19,20)}。SOD1-siRNA TgM は ES 細胞を用いる方法で作製したが、中枢神経系で 85~90% の SOD1 蛋白の抑制を示し、特別な症状、加齢や世代による影響は見られなかった。掛け合わせにより siRNA を有する疾患マウスと siRNA を持たない疾患マウスを得て経過を観察したところ、siRNA 非治療群では 110 日を過ぎた頃から後肢の麻痺が始まり急速に進行したが、siRNA 治療群では 300 日近くまでフォローしてもまだ発症は見られなかった (図 4)。このことは、siRNA をうまく標的細胞まで到達させれば極めて有用な治療手段になりうることを示している。この治療成績は、

SOD1G93ATgM を用いた多くの研究の中でも最も良いものである。また、我々は SOD1-siRNA TgM との掛け合わせを用いたが、ウイルスベクターを用いて注射により治療効果を示した報告も相次いでおり²¹⁻²³⁾、神経難病の代表である筋萎縮性側索硬化症の siRNA 治療法の確立に向けて大きな前進といえる。

VII. ベクターとデリバリー

前述のように、標的細胞までうまく到達すれば siRNA は非常に有効であるが、いかにして効率よくデリバリーするかが大きな課題である。これは遺伝子治療の持つ共通の問題であるが、siRNA の場合、運ぶべきコンストラクトが十分に小さく大きさによる制約がないことが 1 つの利点である。ベクターとしては大きく分けるとウイルスベクター²⁴⁻²⁷⁾、カチオニックリポソーム¹⁵⁾などの非ウイルスベクター、さらに化学修飾などの方法がある²⁸⁾。デリバリーとしては現段階では直接脳に打ち込むといったレベルであるが、やはり最終的には経口投与はともかく静脈注射、筋肉注射などの通常の投与方法にて目的組織まで到達させることが必要である。さらに、神経系ではいわゆる血液脳関門があり、そこを越えないと神経細胞には到達できないという大きな課題もある。逆に、神経疾患であっても標的細胞が脳外にあれば、治療応用への距離はグンと短縮されることにもなる。

我々はこれまで、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、カチオニックリポソームを用いた方法を開発し利用するとともに、静注にて脳内の血管内皮細胞にま

で siRNA を到達させることにも成功している。さらに, Soutschek らが ApoB に対する化学修飾した siRNA により, 血清コレステロール値の低下に成功していることや²⁸⁾, アデノ随伴ウイルスやレンチウイルスベクターによる siRNA の筋注などにより SOD1 トランスジェニック・マウスの治療に成功した報告などもある²¹⁻²³⁾。すなわち, この siRNA に関わる発見や技術革新の進歩はすさまじく, その治療応用の領域も着実に進歩している。また, siRNA の安全性の検討も必要であるし, ようやくそれが可能な時期に到達したともいえる²⁹⁻³²⁾。今後のさらなる発展と一日も早く難病治療に役立つことが切に望まれる。

謝辞

本研究は, 厚生労働科学研究費補助金「こころの健康科学研究事業」の補助を受け(主任研究者:水澤), 当教室の横田隆徳, 李 一, 日野太郎, 齋藤友紀ら, 本学大学院病態代謝解析学の吉田雅幸らを中心として行われたものである。

文 献

- 1) Elbashir S, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T : Duplexes of 21 nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411 : 494-498, 2001
- 2) Mello C, Conte Jr D : Revealing the world of RNA interference. *Nature* 431 : 338-342, 2004
- 3) Meister G, Tuschl T : Mechanism of gene silencing by double-strand RNA. *Nature* 431 : 343-349, 2004
- 4) Rosenberg RN : Machado-Joseph disease : an autosomal dominant motor system degeneration. *Mov Disord* 7 : 193-203, 1992
- 5) Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, et al : CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet* 8 : 221-228, 1994
- 6) Ikeda H, Yamaguchi M, Satoshi S, Aze Y, Narumiya S, Kakizuka A : Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induced cell death *in vitro* and *in vivo*. *Nat Genet* 13 : 196-201, 1996
- 7) Matsumura R, Takayanagi T, Murata K, Futamura N, Hirano M, Ueno S : Relationship of (CAG) nC configuration to repeat instability of the Machado-Joseph disease gene. *Hum Genet* 98 : 643-645, 1996
- 8) Li Y, Yokota T, Matsumura R, Kakizuka A, Taira K, Mizusawa H : Sequence-dependent and independent inhibition specific for mutant ataxin-3 by small interfering RNA. *Ann Neurol* 56 : 124-129, 2004
- 9) Caplen NJ, Taylor JP, Statham VS, Tanaka F, Fire A, Morgan RA : Rescue of polyglutamine-mediated cytotoxicity by double-stranded RNA-mediated RNA interference. *Hum Mol Genet* 11 : 175-184, 2002
- 10) 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

- 11) Takahashi H, Ishikawa K, Tsutsumi T, Fujigasaki H, Kawata A, Okiyama R, Fujita T, Yoshizawa K, Yamaguchi S, Tomiyasu H, Yoshii F, Mitani K, Shimizu N, Yamazaki M, Miyamoto T, Orimo T, Shoji S, Kitamura K, Mizusawa H : A clinical and genetic study in a large cohort of patients with spinocerebellar ataxia type 6. *J Hum Genet* 49 : 256-264, 2004
- 12) Ishikawa K, Tanaka H, Saito M, Ohkoshi N, Fujita T, Yoshizawa K, Ikeuchi T, Watanabe M, Hayashi A, Takiyama Y, Nishizawa M, Nakano I, Matsubayashi K, Miwa M, Shoji S, Kanazawa I, Tsuji S, Mizusawa H : Japanese families with autosomal dominant pure cerebellar ataxia map to chromosome 19p13.1-p13.2 and are strongly associated with mild CAG expansions in the spinocerebellar ataxia type 6 gene in chromosome 19p13.1. *Am J Hum Genet* 61 : 336-346, 1997
- 13) Kubodera T, Yokota T, Ishikawa K, Mizusawa H : A new RNAi strategy for selective suppression of mutant allele in polyglutamine disease. *Oligonucleotide* (in press)
- 14) Nishiwaki Y, Yokota T, Hiraoka M, Miyagishi M, Taira K, Isobe M, Mizusawa H, Yoshida M : Introduction of short interfering RNA to silence endogenous E-selectin in vascular endothelium leads to successful inhibition of leukocyte adhesion. *Biochem Biophys Res Com* 310 : 1062-1066, 2003
- 15) 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 Can Res* 10 : 7721-7726, 2004
- 16) Jacque JM, Triques K, Stevenson M : Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* 418 : 435-438, 2002
- 17) Gitlin L, Karelsky S, Andino R : Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature* 418 : 430-434, 2002
- 18) Yokota T, Sakamoto N, Enomoto N, Tanabe Y, Miyagishi M, Maekawa S, Yi L, Kurosaki M, Taira K, Watanabe M, Mizusawa H : Inhibition of intracellular hepatitis C Virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO Rep* 4 : 602-608, 2003
- 19) Yokota T, Miyagishi M, Hino T, Matsumura R, Andria T, Urushidani M, Rao RV, Takahashi R, Bredesen DE, Taira K, Mizusawa H : siRNA-based inhibition of superoxide dismutase expression ; potential use in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Com* 314 : 283-291, 2004
- 20) Saito Y, Yokota T, Mitani T, Ito K, Anzai M, Miyagishi M, Taira K, Mizusawa H : Transgenic siRNA halted amyotrophic lateral sclerosis in a mouse model. *J Biol Chem* (in press)
- 21) Raoul C, Abbas-Terki T, Bensadoun J-C, Guillot S, Szulc J, Henderson CE, Aebischer P : 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