

- 22) Ralph GS, Radcliffe PA, Day DM, Carthy JM, Leroux MA, Lee DCP, Wong L-F, Bilslund LG, Greensmith L, Kingsman SM, Mitrophanous KA, Mazarakis ND, Azzouz M : Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nat Med* 11 : 429-433, 2005
- 23) Miller TM, Kaspar BK, Kops GJ, Yamanaka K, Christian LJ, Gage FH, Cleveland DW : Virus-delivered small RNA silencing sustains strength in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 57 : 773-776, 2005
- 24) Hommel JD, Sears RM, Georgescu D, Simmons DL, DiLeone RJ : Local gene knockdown in the brain using viral-mediated RNA interference. *Nat Med* 9 : 1539-1544, 2003
- 25) Gregorevic P, Blankinship MJ, Allen JM, Crawford RW, Meuse L, Miller DG, Russell DW, Chamberlain JS : Systemic delivery of genes to striated muscles using adeno-associated viral vectors. *Nat Med* 10 : 828-834, 2004
- 26) 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 Biotech* 23 : 321-328, 2005
- 27) 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 : 214-224, 2005
- 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, Röhl I, Toudjarska I, Wang G, Wuschko S, Bumcrot D, Koteliensky V, Limmer S, Manoharan M, Vornlocher HP : Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432 : 173-178, 2004
- 29) Hornung V, Guenther-Biller M, Bourquin C, Ablasser A, Schlee M, Uematsu S, Noronha A, Manoharan M, Akira S, de Fougerolles A, Endres S, Hartmann G : Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 11 : 263-270, 2005
- 30) Kim DH, Longo M, Han Y, Lundberg P, Cantin E, Rossi JJ : Interferon induction by siRNAs and ssRNAs synthesized by phage polymerase. *Nat Biotech* 22 : 321-325, 2004
- 31) Bridge AJ, Pebernard S, Ducraux A, Nicoulaz AL, Iggo R : Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* 34 : 263-264, 2003
- 32) Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS : Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotech* 21 : 635-637, 2003

Abstract

New technologies for treatment of neurological diseases : RNA interference

Hidehiro Mizusawa

from

Department of Neurology and Neurological Science, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan

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. We have been studying to develop gene therapies for neurological diseases using siRNA. First, we have successfully developed specific siRNAs for many neurological diseases including spinocerebellar ataxias and amyotrophic lateral sclerosis. Sporadic diseases such as Alzheimer's disease and cerebral infarction with arteriosclerosis could also be targets of siRNA therapy. SiRNA transgenic mouse was produced and its crossing with SOD1^{G93A} transgenic mouse revealed almost complete suppression of the onset of ALS in the SOD1^{G93A} and siRNA double transgenic animals. In addition to neurological diseases, there have been reported many studies on siRNA gene therapies for viral infections, cancers and so on. Vectors such as adenovirus, adeno-associated virus, and liposome have been developed and improved resulting in sufficient suppression of endogenous genes. The next problem is the delivery of siRNAs. We have succeeded to suppress a function of the brain endothelial cells by the hydrodynamic method. Further studies are necessary to deliver siRNA into the brain parenchyma across the blood brain barrier and to address many questions regarding specificity, efficacy, and safety of siRNA therapy *in vivo*.

(Received : October 27, 2005)

2. RNAi 創薬

4) 神経変性疾患

横田 隆徳

short interfering RNA (siRNA) は既に治験段階に入っているアンチセンス核酸より、有効性、配列特異性いずれもはるかに優れており、臨床への応用が期待されている。現在、siRNA を用いた遺伝性神経変性疾患の変異遺伝子自体を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ターゲットとした siRNA による治療戦略も始まった。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、他に治療法のない神経変性疾患に siRNA 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。

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 $10^3 \sim 10^7$ 倍、リボザイムの $10^2 \sim 10^5$ 倍 (自験) 高いといわれている。アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患には常染色体優性遺伝性の疾患が多く、変異アリの発現を short interfering RNA (siRNA) で抑制する根本的な遺伝子治療は siRNA の発見の当初から期待されていた。ここでは神経変性疾患をターゲットとした核酸医薬としての siRNA の開発の現状と問題点について概説したい。

I. siRNA の特異性

1. 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 mismatches 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 mismatches による切断効率の低下は完全ではなく、mismatches の位置によってその効果は異なる。5' 側は基質との結合より、RISC との関わりから基質を切断するルーラー (物差し) として働き、基質の認識としては 3' 側のほうが重要で、従って mismatches による失活効果が強いと考えられている¹⁾。

2. siRNA の特異性: off-target 効果などの副反応

siRNA を臨床応用する際にも、ライブラリーを用いた遺伝子探索をする際にも、off-target 効果、すなわちターゲットとした遺伝子以外に、用いた 19 塩基の siRNA の配列に部分的にホモロジーのある別の遺伝子の発現を抑えてしまう、いわゆる交差反応が報告されている²⁾。全般にその特異性

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, ALS, gain of toxic function, RNAi, siRNA 発現ベクター

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 short-hairpin 型の siRNA 発現ベクターの発現によって、動物細胞で PKR 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⁾。

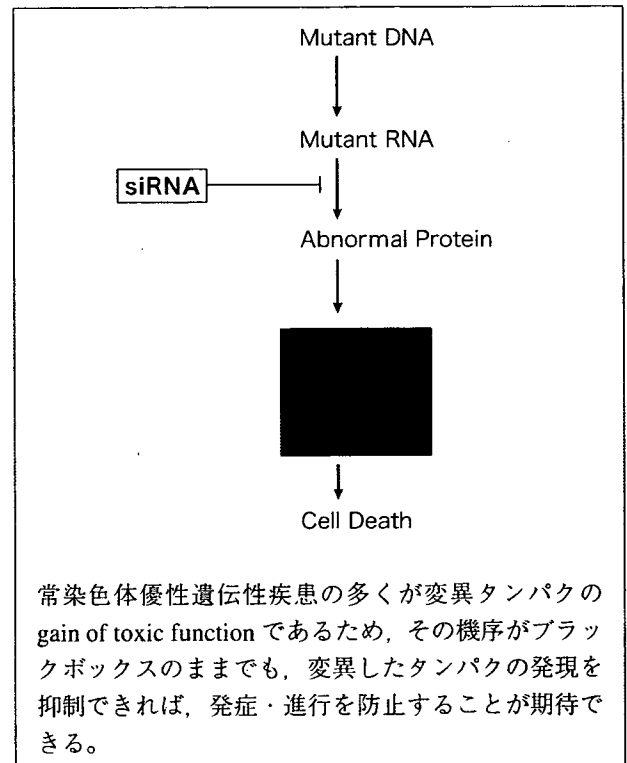
II. 神経疾患への応用

1. 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が本来もつ機能を消失または低下する場合 (loss of function) と、変異遺伝子や変異タンパクが新たに病的機能を獲得する場合 (gain of function) の 2 つがあることが知られている。遺伝子変異が常染色体にある場合、対立する 2 つのアリ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、一方のアリ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、野生型のアリルからは原則として正常個体の半分の量の正常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全くなく、変異アリルから発現した変異タンパクが何らかの正常と異なった機能 (gain of adverse function) や毒性 (gain of toxic function) を新たに獲得することにより、疾患が発症することが想定されている。SOD1 変異による筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、各種ポリグルタミン病、APP や PS1 遺伝子変異によるアルツハイマー病、 α -synuclein 変異によるパーキン

図① siRNA を用いた遺伝子治療



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 (図①)。最近、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⁴⁾。われわれは SOD1 に対する siRNA を過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製して、これを ALS のモデルマウスである G93A 変異 SOD1 トランスジェニックマウスと掛け合わせ、全身の変異 SOD1 タンパクの発現を 80% 以上抑制することに成功した (図②)。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。野生型 SOD1 はノックアウトしても明瞭な神経症状は示さないので副作用はない可能性が高いが、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胎生死亡となることが知られており、正常アリルの発現抑制は新たな症状をきたす

図2 SOD1^{G93A} トランスジェニックマウス (TgM) の遺伝子治療

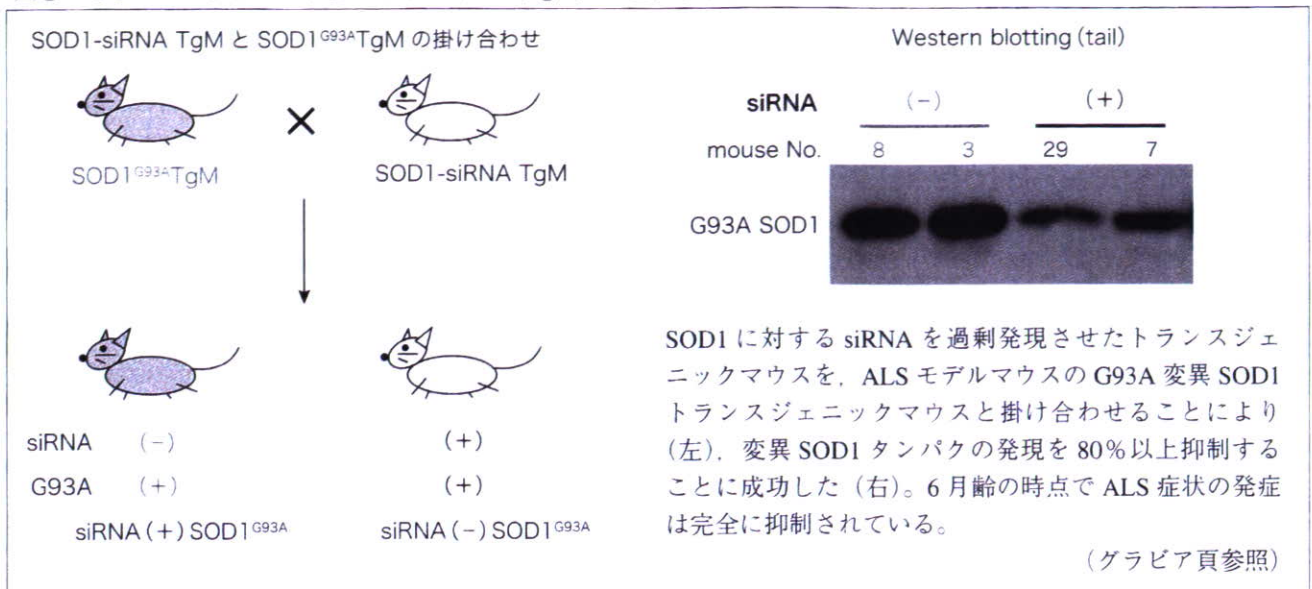
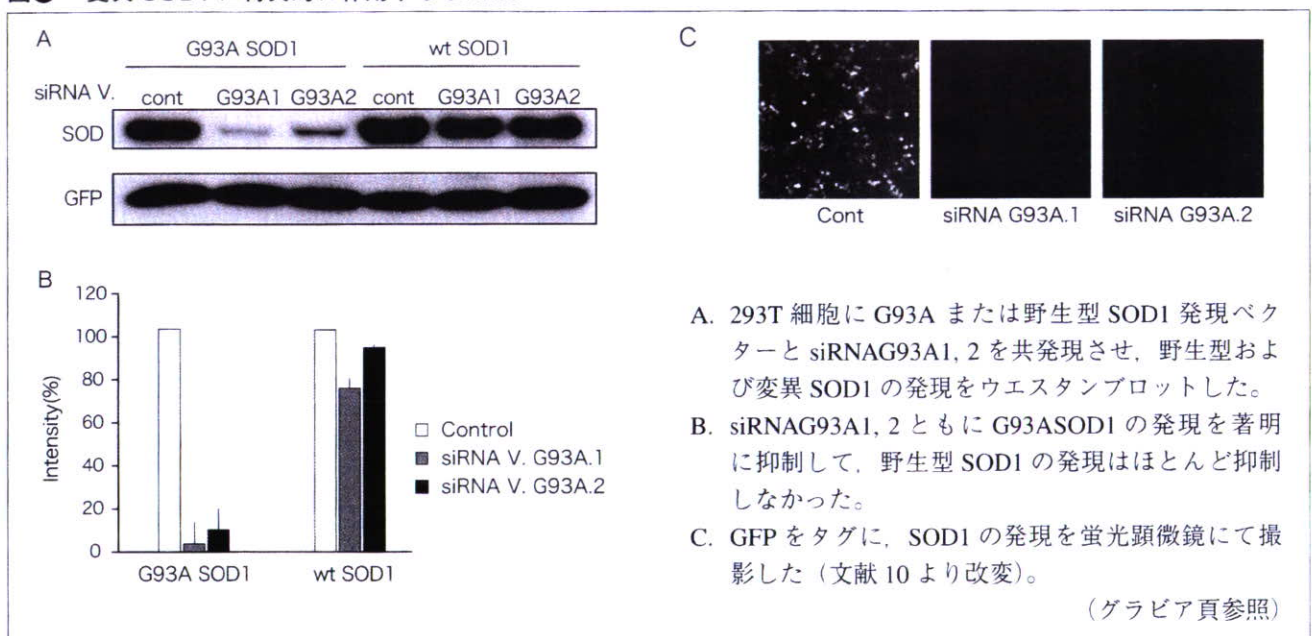


図3 変異 SOD1 に特異的に作用する siRNA



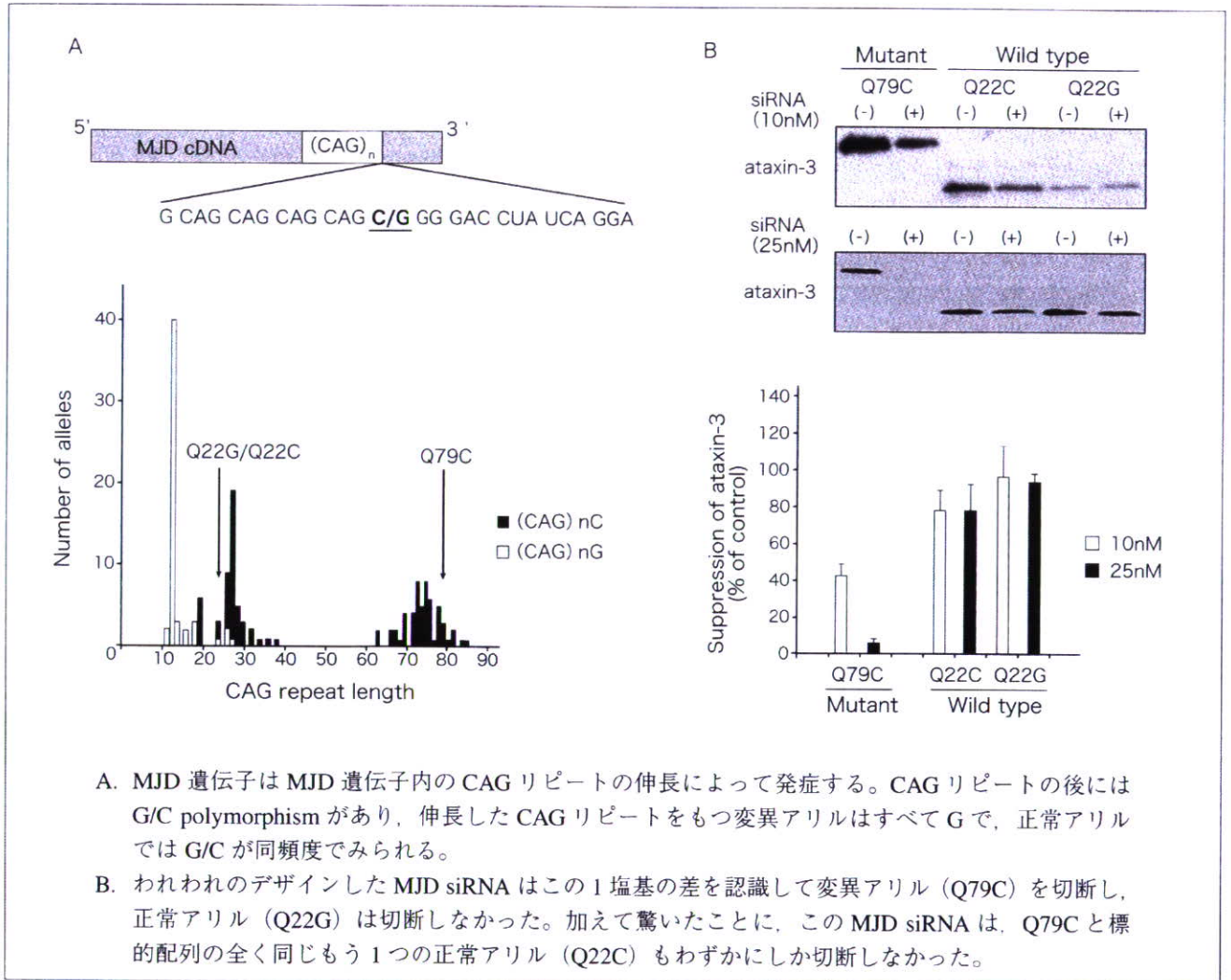
可能性が高い。従って、優性遺伝疾患の治療には、正常アリの発現を損なわずに変異アリの発現のみを抑制することが望ましい。

上述のように、変異が1塩基の違いである点変異でも、正常アリの配列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3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⁵⁾。同様の報告は捻転 dystonia⁶⁾ や

frontotemporal dementia⁷⁾ 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。われわれは、いかなる遺伝子変異に対しても特異的で有効な新しい RNAi 法を考案して (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

図4 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
(文献 13 より改変)



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ルはすべて C だが、短い繰り返しをもつ正常アリルでは約半数の例で G である⁷⁾⁸⁾ (図4 A)。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⁸⁾ (図4 B)。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 polymorphism 付近に結合す

る RNA 結合タンパク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。

2. 孤発性神経変性疾患

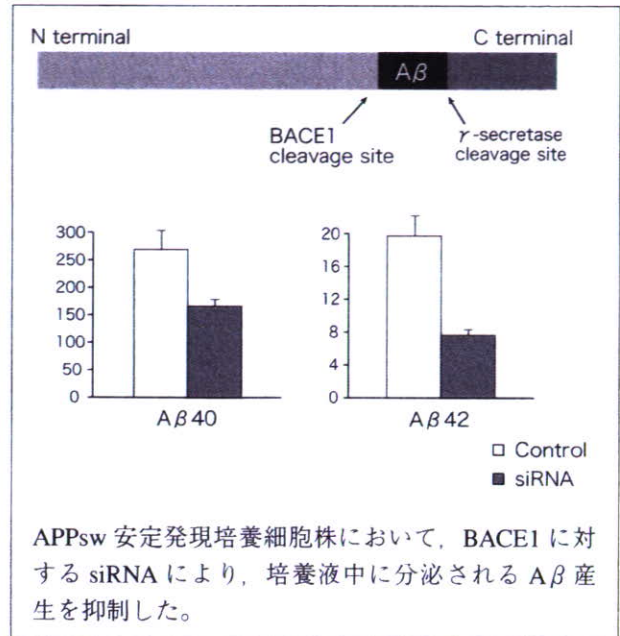
ほとんどのアルツハイマー病、パーキンソン病や ALS は家族歴のない孤発性で、遺伝子異常は明らかでないが、それぞれの発症機序のキーとなる分子がわかれば、その発現を抑制することで治療が可能かもしれない。例えば、アルツハイマー病の β セクレターゼは有望な標的分子である⁹⁾。アルツハイマー病のモデル動物はアミロイド β (A β) のワクチン治療やその抗体の受動免疫により老人斑の生成を抑制し、認知障害も軽減しえたと報告されている。最近の欧米で進められている臨床試験の結果も副作用はあるが効果は

ありそうである。これはアルツハイマー病の発症機序に従来からいわれてきた A β 仮説を大きく支持するもので、A β の産生を抑制することが治療のターゲットとなる。A β はアミロイド前駆タンパク APP から β と γ セクレターゼによって切り出されて生成される。PS1 などからなる γ セクレターゼは Notch などの他の重要な分子も基質としているため、その機能を抑制すると問題が出るが、 β セクレターゼの本体といわれる BACE1 のノックアウトマウスは特別の異常を示さない。われわれも BACE1 に対する siRNA を作製して、培養細胞系で A β 産生を抑制できることを示した (図 5)。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。

III. 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から、siRNA のデリバリーは細胞膜さえ越えればよく、遺伝子治療によく使われる発現 DNA ベクターのように核にアクセスする必要がない。McCaffrey¹⁰⁾ 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、このハイドロダイナミクス導入法で導入された Fas¹¹⁾ 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。ハイドロダイナミクス導入法により、siRNA は肝臓以外に腎臓、脾臓、肺、膵臓に導入可能であることが報告されているが¹²⁾、脳血管関門のために中枢神経系には入らない。しかし、ハイドロダイナミクス導入法はその臓器組織への圧力と循環系への用量負荷のために、ヒトへの応用は難しい。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

図5 孤発性アルツハイマー病に対する siRNA による治療



管への導入が可能であることが示された¹³⁾。また、いくつかのカチオニックリポソームも特に *in vivo* の癌細胞への導入法として有望で^{14) 15)}、正常臓器細胞への適応も検討されている。

長期の抑制効果にはウイルスベクターが必要となる。hairpin 型 siRNA 発現ベクターコンストラクトをアデノウイルス¹⁶⁾ やレンチウイルス¹⁷⁾、レトロウイルス¹⁸⁾、アデノ随伴ウイルス¹⁹⁾ 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²⁰⁾。

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ができず、siRNA による神経疾患治療の大きな問題になっている。

おわりに

siRNA の核酸医薬としての臨床応用の研究には、上記以外にも silencing の突然の停止の問題 (シャットダウン現象) など解決すべき課題はま

だ多くある。しかし、基礎研究は爆発的に進んでおり、最も大きな問題であるデリバリー方法にも急速な進歩がある。非常に近い将来に、難治性疾

患での新しい治療法の開発に siRNA の利用が突破口になると期待している。

参考文献

- 1) Amarzguiou M, et al : Nucleic Acids Res 31, 589-595, 2003.
- 2) Jackson AL, et al : Nature Biotechnol 21, 635-637, 2003.
- 3) Bridge AJ, Holen T, et al : Nature Genet 34, 263-264, 2003.
- 4) Xia H, Mao Q, et al : Nat Med 10, 816-820, 2004.
- 5) Yokota T, Miyagishi M, et al : Biochem Biophys Res Commun 314, 283-291, 2004.
- 6) Gonzalez-Alegre P, Miller VM, et al : Ann Neurol 53, 781-787, 2003.
- 7) Miller VM, Xia H, et al : Proc Natl Acad Sci USA 100, 7195-7200, 2003.
- 8) Li Y, Yokota T, et al : Ann Neurol 56, 124-129, 2004.
- 9) Kao SC, Krichevsky AM, et al : Biol Chem 279, 1942-1949, 2004.
- 10) McCaffrey AP, Meuse L, et al : Nature 418, 38-39, 2004.
- 11) Song E, Lee S-K, et al : Nature Med 9, 347-351, 2003.
- 12) Lewis DL, Hagstrom JE, et al : Nat Genet 32, 107-108, 2002.
- 13) Soutschek J, Akinc A, et al : Nature 432, 173-178, 2004.
- 14) Yano J, Hirabayashi K, et al : Clin Cancer Res 10, 7721-7726, 2004.
- 15) Chien PY, Wang J, et al : Cancer Gene Ther, 2004 (advance online publication).
- 16) Xia H, Mao Q, et al : Nat Biotechnol 20, 1006-1010, 2002.
- 17) Qin XF, An DS, et al : Proc Natl Acad Sci USA 100, 183-188, 2003.
- 18) Barton GM, Medzhitov R : Proc Natl Acad Sci USA 99, 14943-14945, 2002.
- 19) Hommel JD, Sears RM, et al : Nature Med 9, 1539-1544, 2003.
- 20) Nakai H, Fuess S, et al : J Virol 79, 214-224, 2005.

参考図書

- * 改訂 RNAi 実験プロトコール, 多比良和誠 他編, 羊土社, 2004.
- * RNAi : A Guide to Gene Silencing, 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.

横田隆徳

1984年 東京医科歯科大学医学部卒業
 1985年 武蔵野赤十字病院内科研修医
 1990年 東京医科歯科大学大学院医学研究科卒業
 都立神経病院神経内科医員
 東京医科歯科大学神経内科助手
 1998年 米国バーナム研究所リサーチフェロー
 1999年 米国バック神経変性疾患研究所リサーチフェロー
 2000年 東京医科歯科大学神経内科講師
 2004年 東京医科歯科大学神経内科助教授

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。

第2章 新しい神経治療法

1. RNAi の神経疾患への応用

1.1 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することができ、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 $10^2 \sim 5$ 倍 (自験) 高いといわれている。しかもその配列特異性も高く1塩基の違いの認識も可能であり、医療分野におけるその臨床応用については発見当初から大きく期待されていた。それは、RNAi ライブラリを始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2つの方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。

1.2 siRNA の特異性

1.2.1 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。当初は5'端から9、10、11塩基目の中央部位の変異が失活化に最も有効とされた¹⁾。5'側は基質との結合より RISC とのかかわりから基質を切断するルーラー (物差し) 効果があるといわれ²⁾、3'側よりのミスマッチほうがより失活効果が強い場合が多い³⁾。現在のところ siRNA の5'端から9~16塩基目にミスマッチをデザインすると変異遺伝子の識別が最もよいと考えられている。

われわれも変異 G93A SOD1RNA において野生型の SOD1 を切断しない siRNA を作製する際、最も有効なミスマッチの位置を検討した結果、類似の結果を得た (図 2.1.1)。

1.2.2 off-target 効果などの副反応

siRNA を臨床応用する際にも、ライブラリーを用いた遺伝子探索をする際にも、off-target 効果、すなわちターゲットとした遺伝子以外に、用いた19塩基の siRNA の配列に部分的にホモロジーのある別の遺伝子の発現を抑えてしまういわゆる交叉反応が報告されている⁴⁾。全般にその特異性はアンチセンスなどに

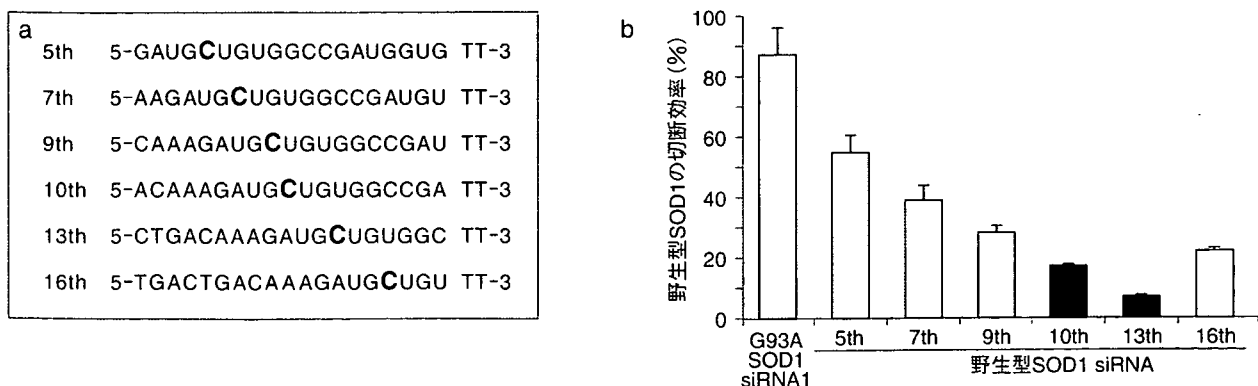


図 2.1.1 siRNA への標的遺伝子とのミスマッチ変異挿入位置による siRNA 効果への影響

a : 家族性筋萎縮性側索硬化症の遺伝子変異である G93ASOD1 (点変異 G → C、太字で示す) を標的とした G93AsiRNA のデザイン。

b : G93AsiRNA の 5' 側から、10 ~ 13 番目の塩基に変異部位を置いた場合、野生型 SOD1 の切断効率が最も低下する。

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⁴⁾で、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。その場合は上述のようにホモロジーのあるsiRNAの部位はセンス配列の中央部や3'側にある場合が多い。さらに稀ではあるが、アンチセンス配列でもその影響が出る場合もあり得るという。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short-hairpin型のsiRNA発現ベクターの発現によって、動物細胞でPKR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、非特異的な蛋白合成と停止とRNA変性が起こり得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⁵⁾。

1.3 疾患への遺伝子治療

1.3.1 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蛋白合成を阻害する作用が考えられ、siRNAの発見以来、ウイルスゲノム遺伝子やウイルスmRNAを標的とした研究が急速に進んでいる。現在まで、エイズウイルス(HIV)⁶⁾、C型⁷⁾・B型肝炎ウイルス、ポリオウイルス⁸⁾、インフルエンザウイルス、西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。ここでは、われわれが作製したC型肝炎ウイルス(HCV)に対するsiRNAについて⁷⁾紹介する。

HCV遺伝子は9600塩基からなるプラス1本鎖RNAで、5'と3'非翻訳領域(UTR)に挟まれた翻訳領域(ORF)からなる。5'側の341塩基のUTRは複雑なRNA構造のIRES(internal ribosome entry site)を含み、HCV RNAはキャップ非依存的にこの5' IRESにより翻訳される。(図2.1.2a)。

HCVは1本鎖RNAウイルスであるがゆえ、ブルーフリーディング機能がなく、ウイルス複製時にORFに変異を起こしやすくquasispeciesと呼ばれている。このため慢性のウイルス感染においては、siRNAによる治療をする際、siRNAの効果からすり抜け現象が予想される。そこで、われわれはHCVの遺伝子型にかかわらず保存されている5' UTR IRESにsiRNAのターゲットを絞ってデザインした。

図2.1.2bにわれわれの5' UTR IRESに対してデザ

インしたsiRNAの効果を示す。ヒト肝細胞癌株Huh-7細胞に導入したHCV遺伝子が自己複製するHCVレプリコンシステムにおいて、siRNA#5が著明にHCV遺伝子増殖を抑制した。このウイルス遺伝子の変異に対して、上記のように変異のない保存されたウイルス遺伝子領域を使うことや、複数のsiRNAを使用する方法および、長いhairpin発現ベクターを作製する解

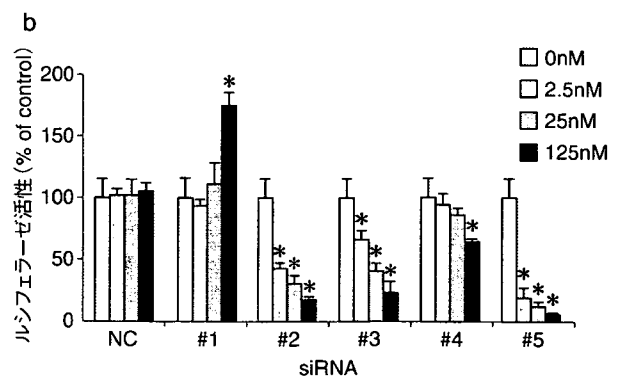
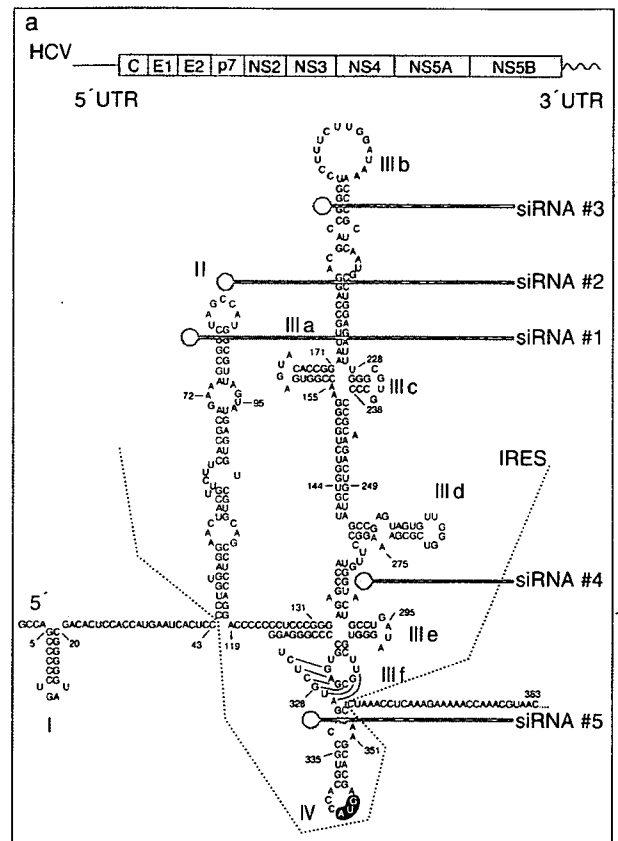


図2.1.2 HCV遺伝子とsiRNA (文献7より改変転載)

a: HCVの遺伝子構造と、HCV 5' UTR領域(IRES)のRNAの2次構造とsiRNAのターゲット部位。

b: siRNAのHCVレプリコンへのHCV遺伝子増殖抑制効果。siRNA#5がコントロールに比較して125 nMのsiRNA濃度では97%のルンファエラーゼ活性の抑制が達せられ、2.5 nMの非常な低濃度siRNAでも約80%の抑制がみられた。

決方法も考えられている。

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 TSG101⁹ や NF κ B p65¹⁰ 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¹¹。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。

一方、IL-1 や TNF- 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¹²。

1.3.2 遺伝性疾患

遺伝性疾患でゲノム遺伝子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 と考え

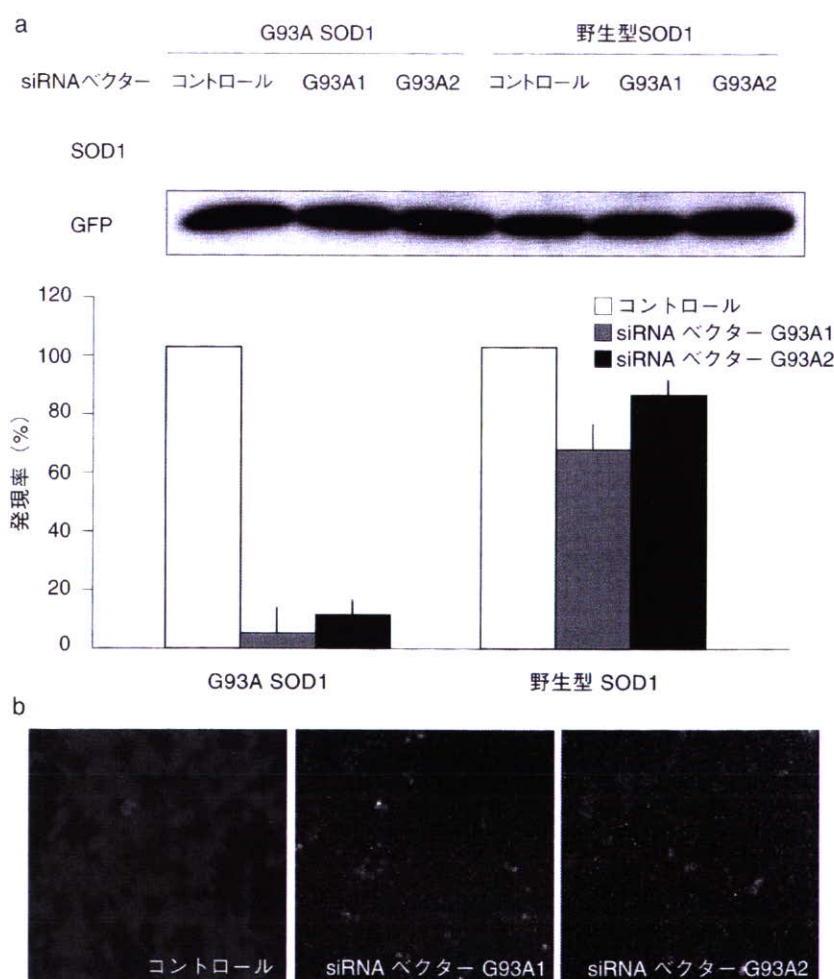


図 2.1.3 変異 SOD1 に特異的に作用する siRNA (文献 13 より改変転載、口絵 7 参照)

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 の発現をウェスタンブロットした。siRNAG93A1、2 はともに G93ASOD1 の発現を著明に抑制し、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した。

られている。常染色体劣性遺伝形式は、遺伝子産物である蛋白自体がまったく発現しないか（null 変異）、発現しても発現蛋白すべてが変異体であるため、その機能が低下または消失していることが多い。一方、常染色体優性遺伝の場合は野生型のアリルからは原則として正常個体の半分の量の正常の蛋白は発現しているので、本来の蛋白の機能の影響は少ないかまったくなく、変異アリ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。

gain of toxic function が強く想定されている神経変性疾患の1つとしてCu/Zn superoxide dismutase（SOD1）遺伝子変異による筋萎縮性側索硬化症（ALS）が知られている。常染色体優性遺伝形式をとる家族性ALSの1部の原因遺伝子がSOD1であることが判明した当初はSOD1が代表的なradical scavengerの1つであることから、SOD1酵素活性低下（loss of

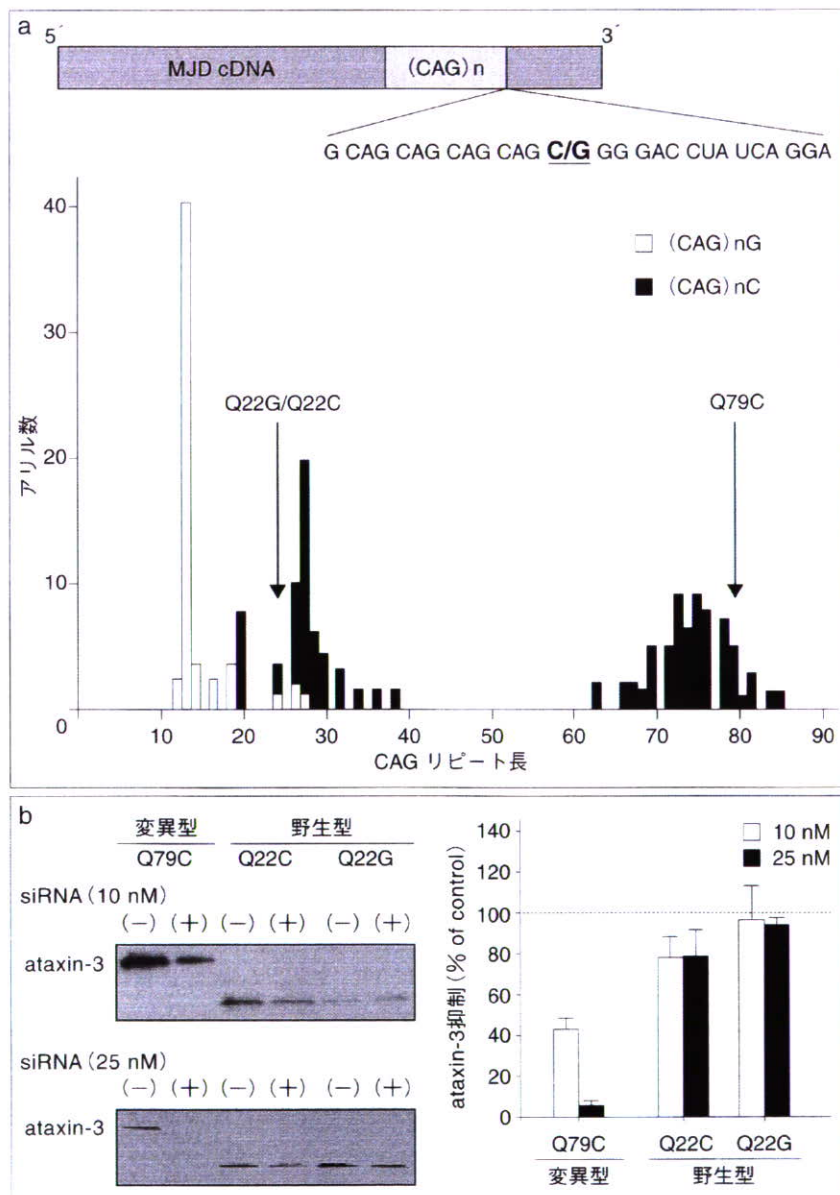


図 2.1.4 MJD RNA に対する配列変異アリル特異的な 1 次配列非依存的な siRNA の切断（文献 16 より改変転載）
 a : Machado-Joseph (MJD) 病遺伝子は MJD 遺伝子内の CAG リピートの伸長によって発症する。CAG リピートの後には G/C polymorphism があり、伸長した CAG リピートを持つ変異アリルはすべて G で、正常アリルでは G/C が同頻度で見られる。
 b : われわれのデザインした MJD siRNA はこの 1 塩基の差を認識して変異アリル (Q79C) を切断し、正常アリル (Q22G) は切断しなかった。加えて、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 1 つの正常アリル (Q22C) もわずかにしか切断しなかった。この原因として MJD mRNA の 2 次構造の変化や RNA 結合蛋白の存在がその活性に影響したことが考えられた。

function) が ALS 発症機序と疑われたが、① SOD1 をノックアウトしても前角細胞障害が起こらず、②患者遺伝子変異のほとんどが1塩基置換により1つのアミノ酸の置換が生じる missense 変異で、null 変異がみつからない、③患者の赤血球中 SOD1 活性低下の程度と症状の重症度が相関しない、④変異 SOD1 を過剰発現したトランスジェニックマウスの SOD1 活性自体は正常以上にある (G93A など) にもかかわらず運動神経が細胞変性を示す、などの根拠により、現在は変異 SOD1 が何らかの毒性を獲得する (gain of toxic function) ことがその機序と考えられている。各種ポリグルタミン病、APP、PS1 遺伝子変異によるアルツハイマー病、alpha-synuclein 変異によるパーキンソン病など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このような gain of toxic function が原因と考えられている。それぞれの疾患においてその gain of toxic function の機序について必ずしも明らかになっていないが、このような疾患の治療を考えた場合、変異した蛋白の発現を抑制する方法があれば、その機序のいか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。

さらにこれらの優性遺伝疾患の治療は、正常アリの発現を損なわずに、変異アリの発現のみを抑制することが望ましい。例えば SCA6 は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胎生死亡となることが知られており、正常アリの発現抑制は新たな神経症状をきたす可能性が高い。

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 2.1.3 に家族性筋萎縮性側索硬化症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¹³⁾。同様の報告は捻転ジストニア¹⁴⁾ や frontotemporal dementia¹⁵⁾ 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と考えられていた。Machado-Joseph 病 (SCA3) の場合、CAG リピートの直下の下流に C/G の polymorphism がある。この polymorphism は CAG リピートの繰り返し配列の長さに関連しており、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 (図 2.1.4a)。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 2.1.4b)¹⁶⁾。この機序は不明だが、CAG リピート長の変化に伴う RNA の 2 次構造の変化や MJD RNA の polymorphism 付近に結合する RNA 結合蛋白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。結果として、すべての MDJ 患者において、変異アリ特異的な siRNA が作製できた。

1.4 siRNA の *in vivo* へのデリバリー

McCaffrey¹⁷⁾ らはマウスの尾静脈から 10 ~ 50 mg の NS5B に対する合成 siRNA や siRNA 発現ベクターを体重の 5 ~ 10 % の大量の PBS 溶液で 5 ~ 7 秒の短時間で注入するハイドロダイナミクス導入法で、マウスの肝細胞に siRNA 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導入法で導入された Fas¹⁸⁾ や caspase 8 に対する合成 siRNA (2'-ACE で化学的に修飾した siRNA でその安定性の上昇を図っている) 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。

長期の抑制効果にはウイルスベクターが必要となる。hairpin 型 siRNA 発現ベクターコンストラクトをアデノウイルス¹⁹⁾ やレンチウイルス²⁰⁾、レトロウイルス²¹⁾、アデノ随伴ウイルス²²⁾ 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の、*in vivo* の細胞への siRNA 導入が次々と報告されている。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。

1.5 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、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) Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R: A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **29**: 550-553, 2002
- 2) Holen T, Amarzguioui M, Wiiger MT, et al: Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res* **30**: 1757-1766, 2002
- 3) Amarzguioui M, Holen T, Babaie E, et al: Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. *Nucleic Acids Res* **31**: 589-595, 2003
- 4) Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, et al: Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nature Biotechnol* **21**: 635-637, 2003
- 5) Bridge AJ, Pebernard S, Ducraux A, et al: Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nature Genet* **34**: 263-264, 2003
- 6) Sledz CA, Holko M, de Veer MJ, et al: Activation of the interferon system by short - interfering RNAs. *Nature Cell Biol* **5**: 834-839, 2003
- 7) 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
- 8) Song E, Lee SK, Dykxhoorn DM, et al: Sustained small interfering RNA-mediated human immunodeficiency virus type 1 inhibition in primary macrophages. *J Virol* **77**: 7174-7181, 2003
- 9) Garrus JE, von Schwedler UK, Pornillos OW, et al: Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* **107**: 55-65, 2001
- 10) 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
- 11) Arteaga HJ, Hinkula J, van Dijk-Hard I, et al: Choosing CCR5 or Rev siRNA in HIV-1. *Nat Biotechnol* **21**: 230-231, 2003
- 12) Sorensen DR, Leirdal M, Sioud M: Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice. *J Mol Biol* **327**: 761-766, 2003
- 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 Commun* **314**: 283-291, 2004
- 14) Gonzalez-Alegre P, Miller VM, Davidson BL, et al: Toward therapy for DYT1 dystonia: allele-specific silencing of mutant Torsin A. *Ann Neurol* **53**: 781-787, 2003
- 15) Miller VM, Xia H, Marrs GL, et al: Allele-specific silencing of dominant disease genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 7195-7200, 2003
- 16) Li Y, Yokota T, Taira K, et al: Sequence dependent and independent discrimination siRNA-based Inhibition of Mutant ataxin 3 Gene Expression by siRNA. *Ann Neurol* **56**: 124-129, 2004
- 17) McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, et al: RNA interference in adult mice. *Nature* **418**: 38-39, 2002
- 18) Song E, Lee S-K, Wang J, et al: RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nature Med* **9**: 347-351, 2003
- 19) Xia H, Mao Q, Paulson HL, et al: siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. *Nat Biotechnol* **20**: 1006-1010, 2002
- 20) Qin XF, An DS, Chen IS, et al: Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 183-188, 2003
- 21) Barton GM, Medzhitov R: Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. *Proc. Natl Acad Sci USA* **99**: 14943-14945, 2002
- 22) Hommel JD, Sears RM, Georgescu D, et al: Local gene knockdown in the brain using viral-mediated RNA interference. *Nature Med* **9**: 1539-1544, 2003

(横田隆徳、水澤英洋)

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

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

■ おわりに

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

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

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

大戸茂弘/Shigehiro OHDO
九州大学大学院薬学研究院薬剤学分野

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

■ 常染色体優性遺伝の単一遺伝子疾患の遺伝子治療

単一遺伝子疾患でゲノム遺伝子の変異が原因で発症する場合、遺伝子変異に起因する発症機序には、変異のある遺伝子の遺伝子産物である蛋白の本来のもつ機能の消失または低下による場合(loss of function)と、変異遺伝子や変異蛋白があらたに病的機能を獲得する場合(gain of function)の2つがあることが知られている。常染色体優性遺伝の場合、変異アリルから発現した変異蛋白が何らかの毒性(gain of toxic function)をあらたに獲得することにより疾患が発症することが想定されている。SOD1 変異による筋萎縮性側索硬化症(ALS)、多くのポリグルタミン病、APP や 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において gain of toxic function がその発症機序と考えられている。このような疾患の治療を考える場合、変異した蛋白の発現を抑制する方法があれば、その機序の如何にかかわらず

神経内科学

siRNAを用いたALSの遺伝子治療

Gene therapy of ALS with siRNA

RNA 干渉(RNAi)は二本鎖 RNA によって配列特異的に遺伝子の発現が抑制される現象で、1998 年に Fire と Mello らによって報告され、2006 年のノーベル医学生理学賞に選ばれた。細胞内に導入された二本鎖 RNA は、Dicer とよばれる RNase III 核酸分解酵素ファミリーによって 21~24 mer の短い 3' 突出型の二本鎖の short interference RNA (siRNA) に分解される。siRNA の二本鎖のうち、ガイド鎖(アンチセンス鎖)のみの一本鎖となって他の蛋白質を伴って RNA 蛋白質複合体である RISC 複合体(RNA-induced silencing complex)を構成する。そして、RISC 複合体がガイド鎖に相補的な配列をもつ標的 mRNA にアクセスして分解する。

RNAi の中間産物である siRNA¹⁾を用いた遺伝子治療の研究は、すでにウイルス性疾患、悪性腫瘍など

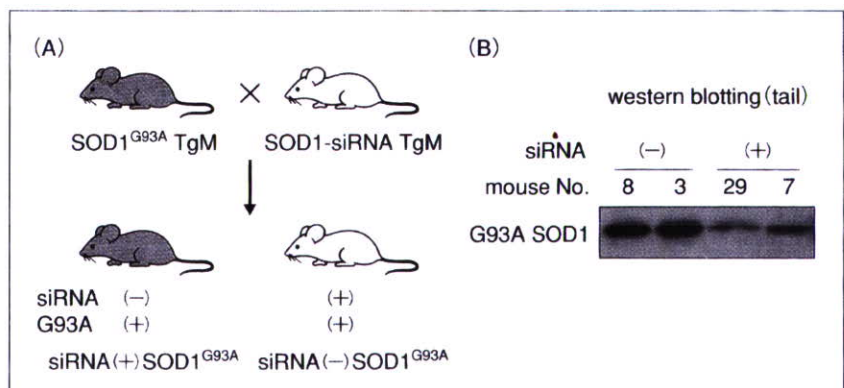


図 1 SOD1G93Aトランスジェニックマウスの遺伝子治療(文献³⁾より改変)

SOD1 に対する siRNA を過剰発現させたトランスジェニックマウスを、ALS のモデルマウスである G93A 変異 SOD1 トランスジェニックマウスとかけ合わせるにより(A)、変異 SOD1 蛋白の発現を 80% 以上抑制することに成功した(B)。

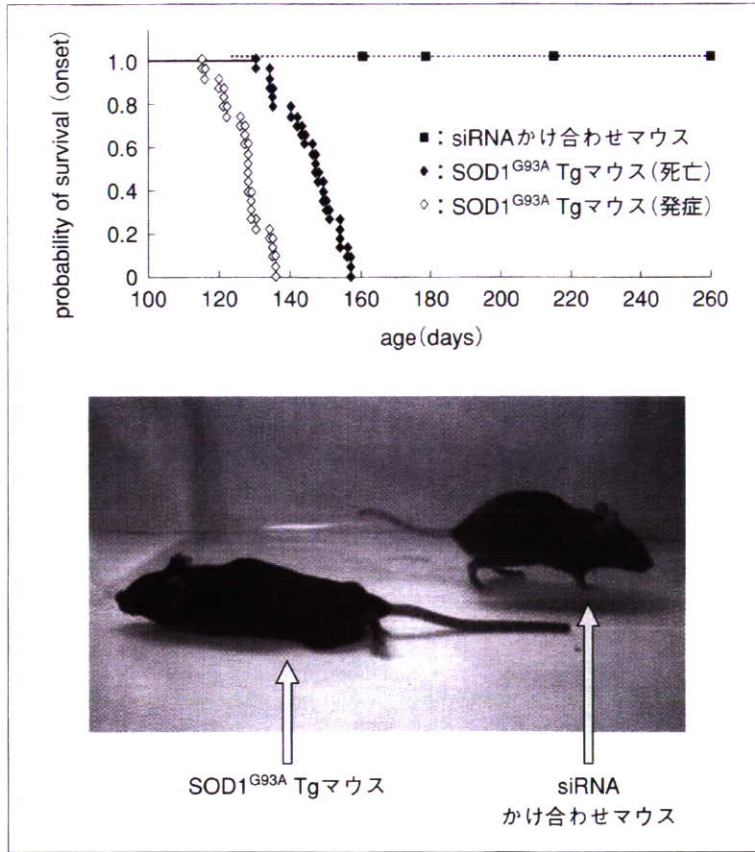


図2 SOD1^{G93A}トランスジェニックマウスの遺伝子治療の経過 (文献³⁾より改変)
6月齢の時点でALS症状の発症は完全に抑制されている。

発症，進行を防止することが期待できるわけである。

RNAiによるALSのモデルマウスの治療

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

片をES細胞に導入して，内因性のSOD1が抑制されたESクローンを選択した。これを胚盤胞にマイクロインジェクションしてsiRNAトランスジェニックマウスを作成した。このマウスは全身で内因性のSOD1が75~98%以上抑制されていた³⁾。このマウスとALSのモデルマウスであるG93ASOD1トランスジェニックマウスとかけ合わせるにより中枢神経の変異SOD1蛋白の発現を80%以上抑制することに成功した(図1)。この効果により，9月齢の時点でALS症状の発症は完全に抑制されていた(図2)。

同様にSOD1に対するshRNA発現レンチウイルスを直接脊髄に注入することや，骨格筋に注入して運動ニューロンに逆行性にshRNAを発現させて，G93A変異SOD1トランスジェニックマウス

の発症を遅延させたとの報告もなされた^{4,5)}。

今後の課題

野生型SOD1はノックアウトしても明瞭な神経症状は示さないが，不妊の副作用がある。一般に優性遺伝疾患の治療には正常アレルの発現を損わずに，変異アレルの発現のみを抑制することが望ましい。変異が1塩基のみの違いである点変異でも，正常アレルと変異アレルの配列の差を認識して変異アレルのみを切断できるsiRNAの作製は可能である⁶⁾。しかし，SOD1やPS1の点変異は100種類以上知られており，そのすべてに特異的で効率なsiRNAがデザインできるわけではない。著者らは，いかなる遺伝子変異に対しても特異的で有効な新しいRNAi法を考案して⁷⁾，現在その*in vivo*での有効性を検証中である。

おわりに

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

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

- mouse model. *J. Biol. Chem.*, **280** : 42826-42830, 2005.
- 4) Ralph, G. S. et al. : Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nat. Med.*, **11** : 429-433, 2005.
 - 5) Raoul, C. et al. : Lentiviral-mediated silencing of SOD1 through RNA interference retards disease onset and progression in a mouse model of ALS. *Nat. Med.*, **11** : 423-428, 2005.
 - 6) Yokota, T. et al. : siRNA-based inhibition of superoxide dismutase expression : potential use in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **314** : 283-291, 2004.
 - 7) Kubodera, T. et al. : New RNAi strategy for selective suppression of mutant allele in polyglutamine disease. *Oligonucleotides*, **15** : 298-302, 2005.
 - 8) Thakker, D. R. et al. : Neurochemical and behavioral consequences of widespread gene knockdown in the adult mouse brain using nonviral RNA interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101** : 17270-17275, 2004.
- 横田隆徳 / Takanori YOKOTA
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科脳神経病態学(神経内科)

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

疫学

インフルエンザワクチンの有用性

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

Clinical usefulness of inactivated influenza vaccine

インフルエンザはワクチンで予防できるのか？

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

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

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

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

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

小児でも有意な発症予防効果あり、有効率は20%台以上

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

低年齢児では効果が乏しい可能性あり

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

わが国のインフルエンザワクチン、これまでのあゆみと今後

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

意見がだされた。1990年代後半に社会の関心事となった、小児における重篤な合併症“インフルエンザ脳症”を、ワクチンにより予防できるのかも議論された。2001年11月には高齢者に対する接種が法制化された。また、わが国の学童集団接種の有用性を再評価する報告⁵⁾もなされた。

不活化 HA ワクチンは本稿で述べた結果から、インフルエンザ予防の有用な手段であることは確かである。ただし、有効率の点でさらに改善の余地がある。諸外国では経鼻不活化ワクチンや生ワク

チンも開発されている。わが国において基礎・臨床の連携により、より有用なワクチンが登場することも期待したい。

- 1) 平成 9-11 年度厚生科学研究報告書「インフルエンザワクチンの効果に関する研究」(主任研究者：神谷 齊)。2000。
- 2) CDC：Chapter16：Influenza. In：National Immunization Program Pink Book 9th ed. CDC, Atlanta, 2006, pp.233-253. (<http://www.cdc.gov/nip/publications/pink/flu.pdf>)
- 3) 平成 12-14 年度厚生科学研究報告書「乳幼児に対するインフル

エンザワクチンの効果に関する研究」(主任研究者：神谷 齊，加地正郎)。2003。

- 4) Fujieda, M. et al.：Inactivated influenza vaccine effectiveness in children under 6 years of age during the 2002-2003 season. *Vaccine*, **24**：957-963, 2006.
- 5) Reichert, T. A. et al.：The Japanese experience with vaccinating schoolchildren against influenza. *N. Engl. J. Med.*, **344**：889-896, 2001.

中野貴司 / Takashi NAKANO

国立病院機構三重病院臨床研究部国際保健医療研究室

次号の特集予告(220巻11号)**

◆広がる薬疹の世界——最新の概念・病態・治療

(企画：塩原哲夫 / 杏林大学医学部皮膚科学教室)

薬剤性過敏症候群(DIHS)の患者は、けっして“薬疹らしく”みえる患者ばかりではない。現在 DIHS として治療されている患者のなかにも、かつては難治性の接触皮膚炎やアトピー性皮膚炎として誤った治療をされていたものもかなりいる。DIHSに限らず、重症薬疹が昨今の医療裁判の場に出てくることの多い疾患となっているのは、このような経緯を知らなければ納得できるであろう。また、DIHS はしばしば予期せぬ後遺症を起こしてふたたび病院にやってくるが、残念ながら多くの施設では問診を十分にとっていないため、DIHS と後遺症の関連を見逃してしまう。このように、従来の観点だけで薬疹をみていると、現在明らかにされつつある薬疹の病態を見逃すことになる。薬疹(とくに重症薬疹)はあなたの現在みている患者のなかに潜んでいるかもしれない。本特集を精読していただければ、それに気づくこともできるであろう。

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ため、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

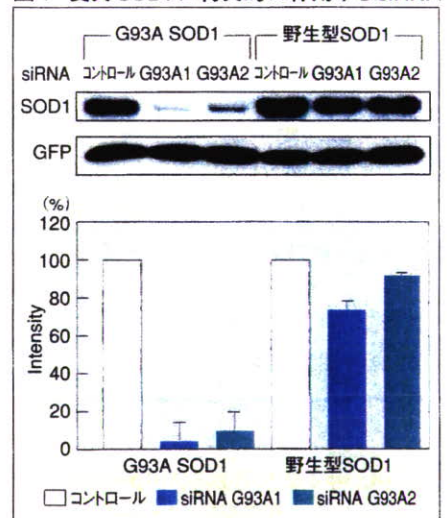
siRNAと基質RNAとの特異性について

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

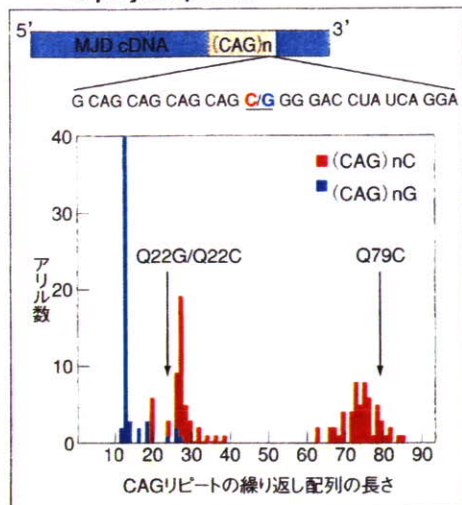


293T細胞にG93Aまたは野生型SOD1発現ベクターとsiRNA G93A1, 2を共発現させ、野生型及び変異SOD1の発現をウエスタンブロットした。siRNA G93A1, 2を共にG93A SOD1の発現を著明に抑制して、野生型SOD1の発現はほとんど抑制しなかった(上)。GFPをタグにSOD1の発現を蛍光顕微鏡にて撮影(下)。(文献1)より改変転載

<文献>

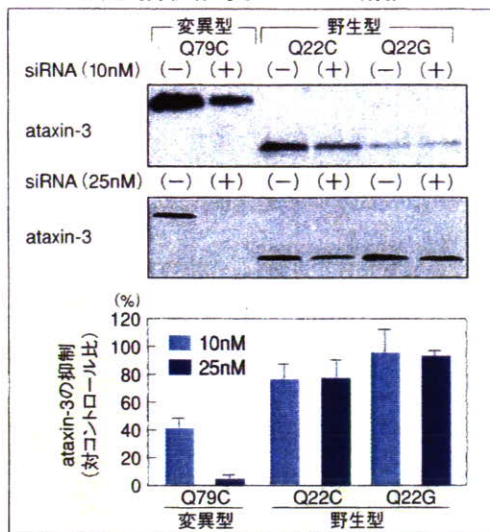
- 1) Yokota T, Miyagishi M, Hino T et al: siRNA-based inhibition of superoxide dismutase expression; potential use in familial Amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Com* 314: 283-291, 2004
- 2) Li Y, Yokota T, Taira K et al: Sequence-dependent and independent inhibition specific for mutant 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



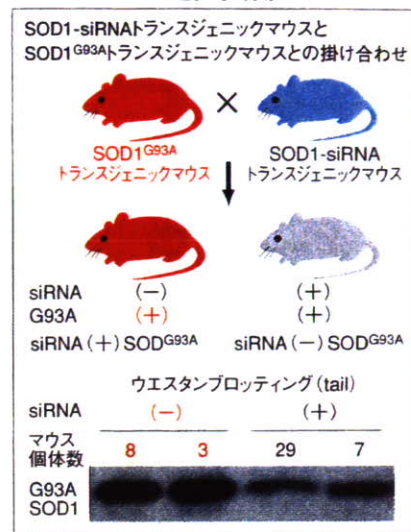
Machado-Joseph病はMJD遺伝子内のCAGリピートの伸長によって発症する。CAGリピートの後にはG/C polymorphismがあり、伸長したCAGリピートを持つ変異アレルはすべてGで、正常アレルではG/Cが同頻度で見られる。(文献2)より改変転載

図3 MJD RNAに対する配列変異アレル特異的な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と標的配列の全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。(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レルはすべてCだが、短い繰り返しを持つ正常アレ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、病的アレルに特異的なsiRNAを作製した。ところが驚いたことにこのsiRNAは polymorphismが変異アレルと同じCである短いCAGリピートの正常アレ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、有望なカチオン性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うい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。

Selective gene silencing of rat ATP-binding cassette G2 transporter in an *in vitro* blood–brain barrier model by short interfering RNA

Satoko Hori,*†¶ Sumio Ohtsuki,*†¶ Masashi Ichinowatari,* Takanori Yokota,‡ Takashi Kanda‡ and Tetsuya Terasaki*†¶

*Department of Molecular Biopharmacy and Genetics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Sendai, Japan

†New Industry Creation Hatchery Center, Tohoku University, Sendai, Japan

¶CREST and SORST of the Japan Science and Technology Agency (JST), Japan

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

Abstract

The aim of the present study was to specifically silence the rat ATP-binding cassette transporter G2 (*rABCG2*) gene in brain capillary endothelial cells by transfection of short interfering RNA (siRNA). Four different siRNAs designed to target *rABCG2* were each transfected into HEK293 cells with myc-tagged *rABCG2* cDNA. Quantitative real-time PCR and western blot analyses revealed that three of the siRNAs were able to reduce exogenous *rABCG2* mRNA and protein levels in HEK293 cells. Moreover, *rABCG2*-mediated mitoxantrone efflux transport was suppressed by the introduction of these three siRNAs into HEK293 cells. In contrast, the other siRNA and non-specific control siRNA did not significantly affect the mRNA expression, the protein level or the transport activity. Endogenous *rABCG2* mRNA and protein

expression in a conditionally immortalized rat brain capillary endothelial cell line (TR-BBB13) was suppressed by the most potent siRNA among the four siRNAs tested. Furthermore, this siRNA did not affect the mRNA levels of other ABC transporters, such as ABCB1, ABCC1 and ABCG1, and the protein level of ABCB1 in TR-BBB13 cells, suggesting that it can selectively silence *rABCG2* at the blood–brain barrier. This should be a useful and novel strategy for clarifying the contribution of *rABCG2* to brain-to-blood transport of substrate drugs and endogenous compounds across the blood–brain barrier.

Keywords: ABC transporter, ATP-binding cassette transporter G2, 17 β -estradiol, blood–brain barrier, *in vitro* blood–brain barrier model, short interfering RNA.

J. Neurochem. (2005) 93, 63–71.

The blood–brain barrier (BBB), which is formed by the tight intercellular junctions of brain capillary endothelial cells (BCECs), strictly regulates the transfer of substances between the circulating blood and the brain (Terasaki and Hosoya 1999; Hosoya *et al.* 2002). Therefore, the molecular mechanisms of efflux transport from the brain have important implications for drug delivery and CNS homeostasis.

ABCG2 (BCRP/MXR/ABCP1) is an ATP-binding cassette (ABC) transporter localized on the luminal side of brain capillaries in humans (Cooray *et al.* 2002) and rats (Hori *et al.* 2004), and transports a diverse array of compounds out of the cells (Allen and Schinkel 2002). Therefore, ABCG2 present in BCECs may act to restrict the penetration of xenobiotics into the brain and to pump out potential toxins or metabolites from the brain. ABCG2 transports sulfated

conjugates of drugs and sterols (Suzuki *et al.* 2003), whereas p-glycoprotein (P-gp), a well-characterized efflux transporter at the BBB, preferentially transports hydrophobic

Received May 10, 2004; revised manuscript received November 16, 2004; accepted November 17, 2004.

Address correspondence and reprint requests to Tetsuya Terasaki, Department of Molecular Biopharmacy and Genetics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980–8578, Japan. E-mail: terasaki@mail.pharm.tohoku.ac.jp

Abbreviations used: ABC, ATP-binding cassette; BBB, blood–brain barrier; BCEC, brain capillary endothelial cell; DHEAS, dehydroepiandrosterone sulfate; NC, non-specific control; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; SDS–PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; siRNA, short interfering RNA; TR-BBB, conditionally immortalized brain capillary endothelial cell line.