

- where Dicer and eIF2C translation initiation factors are barely expressed. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319, 50–57.
- [20] Johnson, S.M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K.L., Brown, D. and Slack, F.J. (2005) RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 120, 635–647.
- [21] Sampson, V.B., Rong, N.H., Han, J., Yang, Q., Aris, V., Soteropoulos, P., Petrelli, N.J., Dunn, S.P. and Krueger, L.J. (2007) MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer Res.* 67, 9762–9770.
- [22] McBride, J.L., Boudreau, R.L., Harper, S.Q., Staber, P.D., Montey, A.M., Martins, L., Gilmore, B.L., Burstein, H., Peluso, R.W., Polisky, B., Carter, B.J. and Davidson, B.L. (2008) Artificial miRNAs mitigate shRNA-mediated toxicity in the brain: implications for the therapeutic development of RNAi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 5868–5873.

Efficient *In Vivo* Delivery of siRNA to the Liver by Conjugation of α -Tocopherol

Kazutaka Nishina^{1,2}, Toshinori Unno¹, Yoshitaka Uno¹, Takayuki Kubodera^{1,2}, Tadashi Kanouchi¹, Hidehiro Mizusawa^{1,2} and Takanori Yokota¹

¹Department of Neurology and Neurological Science, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan; ²21st Century Center of Excellence Program on Brain Integration and Its Disorders, Tokyo Medical and Dental University, Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan

RNA interference is a powerful tool for target-specific knockdown of gene expression. However, efficient and safe *in vivo* delivery of short interfering RNA (siRNA) to the target organ, which is essential for therapeutic applications, has not been established. In this study we used α -tocopherol (vitamin E), which has its own physiological transport pathway to most of the organs, as a carrier molecule of siRNA *in vivo*. The α -tocopherol was covalently bound to the antisense strand of 27/29-mer siRNA at the 5'-end (Toc-siRNA). The 27/29-mer Toc-siRNA was designed to be cleaved by Dicer, producing a mature form of 21/21-mer siRNA after releasing α -tocopherol. The C6 hydroxyl group of α -tocopherol, associated with antioxidant activity, was abolished. Using this new vector, intravenous injection of 2 mg/kg of Toc-siRNA, targeting apolipoprotein B (*apoB*), achieved efficient reduction of endogenous *apoB* messenger RNA (mRNA) in the liver. The downregulation of *apoB* mRNA was confirmed by the accumulation of lipid droplets in the liver as a phenotype. Neither induction of interferons (IFNs) nor other overt side effects were revealed by biochemical and pathological analyses. These findings indicate that Toc-siRNA is effective and safe for RNA interference-mediated gene silencing *in vivo*.

Received 13 October 2007; accepted 7 January 2008; advance online publication 12 February 2008. doi:10.1038/mt.2008.14

INTRODUCTION

Short interfering RNAs (siRNAs) have potential for therapeutic application in a wide spectrum of disorders including cancer, infectious diseases, and inherited diseases. Effective *in vivo* delivery of siRNAs to the specific target cells is the most important challenge in respect of clinical applications. *In vivo* gene silencing with RNA interference has been reported using either viral vectors¹ or high-pressure, high-volume intravenous injection of synthetic siRNAs,^{2,3} but these approaches have limitations in clinical practice because of their side effects. Accordingly, a variety of nonviral systems are being developed for delivery of siRNA to liver, tumors, and other tissues *in vivo*.

Recent work in the area of nonviral delivery of synthetic siRNAs has used cationic liposomes⁴⁻⁶ or nanoparticles.⁷ Among these approaches, the most efficient systemic administration was achieved using stable nucleic acid lipid particles.⁴ However, a therapeutic dose (2.5 mg/kg) of these particles, when administered in cynomolgus monkeys, caused marked liver damage.⁴ A key drawback of cationic liposomes and nanoparticles is that their physical lipophilic property promotes passive transfer of their complexes to the liver, potentially causing toxicity. More recently, a new class of receptor-mediated siRNA vectors, consisting of a synthetic compound and a ligand, has been reported. These ligands are (i) *N*-acetylgalactosamine⁸ or galactose⁹ ligands that target asialoglycoprotein receptors on hepatocytes, (ii) apolipoprotein A-I ligands that target scavenger receptor class B type I on the hepatocytes,¹⁰ and (iii) rabies virus glycoprotein ligands that target acetylcholine receptors on the neurons.¹¹ These receptor-mediated delivery systems could increase efficiency and specificity of target cells *in vivo*. However, the synthetic molecules of these vectors were found to exert an immunostimulatory effect.⁸

We hypothesized that the most effective *in vivo* carrier would be a molecule that is essential for target tissue cells but cannot be synthesized within the cells. Vitamins fit these requirements well, and the only vitamin that is not toxic even at high doses is vitamin E.¹² α -Tocopherol (vitamin E) is a fat-soluble natural molecule that has many physiological pathways from serum to liver. The majority of the absorbed vitamin E is transferred into lipoproteins including chylomicrons, low-density lipoprotein, and high-density lipoprotein, and these constitute an important source of plasma vitamin E for hepatic uptake (reviewed in ref. 13). In addition, the three α -tocopherol-associated proteins (SEC14L2, SEC14L3, and SEC14L4), and the albumin-related protein, afamin, are known to be vitamin E-binding proteins in the serum (reviewed in ref. 14). In this study, we have tried to utilize these physiological pathways of vitamin E transport to the liver as an *in vivo* delivery system for siRNA.

RESULTS

Design of α -tocopherol-bound siRNA

Asymmetric double-strand RNA having 2 nucleotides (nt) in 3'-overhang only in the antisense strand is good for predicting a

The first two authors contributed equally to this work.

Correspondence: Takanori Yokota, Department of Neurology and Neurological Science, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan. E-mail: tak-yokota.nuro@tmd.ac.jp

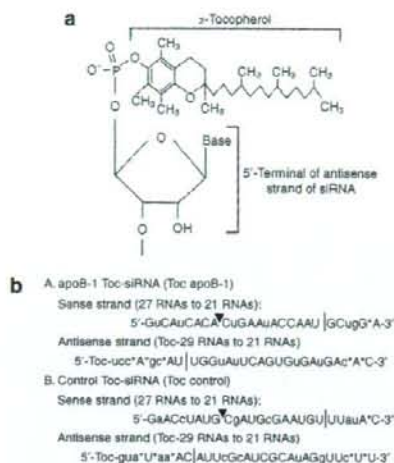


Figure 1 Design of α -tocopherol-bound short interfering RNA (siRNA). **(a)** Chemical structure of vitamin E (α -tocopherol)-bound siRNA. **(b)** Sequences and chemical modifications of α -tocopherol-bound siRNA for targeting *apoB* messenger RNA (apoB-1 Toc-siRNA) or for targeting unrelated gene (control Toc-siRNA). The lower-case letters represent sugar 2'-O-methylation, and asterisks represent phosphorothioate backbone linkage. The predicted cleavage sites by Dicer¹⁵ and Argonaute2 (ref. 19) are indicated by black bars and arrowheads, respectively. The sequences in bold letters indicate the predicted 21-mer siRNA sequences after Dicer cleavage. Toc, α -tocopherol.

Dicer cleavage site and can therefore define the 21-mer siRNA sequence cleaved from 27/29-mer siRNA by Dicer.¹⁵ The α -tocopherol was covalently bound to the 5'-end of the antisense strand of these siRNAs. The chemical structure of α -tocopherol-bound siRNA (Toc-siRNA) is shown in Figure 1a. The sequences of (i) Toc-siRNA for targeting mouse *apolipoprotein B* (*apoB*) messenger RNA (mRNA) (NM_009693) (apoB-1 Toc-siRNA)¹⁶ and (ii) Toc-siRNA for targeting mouse *beta-site APP cleaving enzyme 1* (*BACE1*) mRNA (NM_011792) (control Toc-siRNA) are shown in Figure 1b.

For *in vivo* application of Toc-siRNA, it is essential to ensure the stability of siRNA against serum-derived nucleases. For this purpose, we made chemical modifications with phosphorothioate backbone linkage and sugar 2'-O-methylation on both the sense and the antisense strands. The portions of siRNA that were predicted to be cleaved out by Dicer, *i.e.*, 8 nt in the 5'-side of the antisense strand and 6 nt in the 3'-side of the sense strand, were substantially modified. Further, in order to increase stability against endonucleases while preserving siRNA activity,¹⁷ partial internal modifications were made to the siRNA sequences with 2'-O-methylation, in addition to modifications at the termini.¹⁸ The Dicer cleavage sites in both sense and antisense strands, and the Argonaute2 cleavage site¹⁹ in the sense strand were spared any modification (Figure 1b).

Improved stability of siRNA with preserved cleaving efficiency by chemical modifications

The naked and the chemically modified siRNA in serum were compared for stability *in vitro*. With and without α -tocopherol,

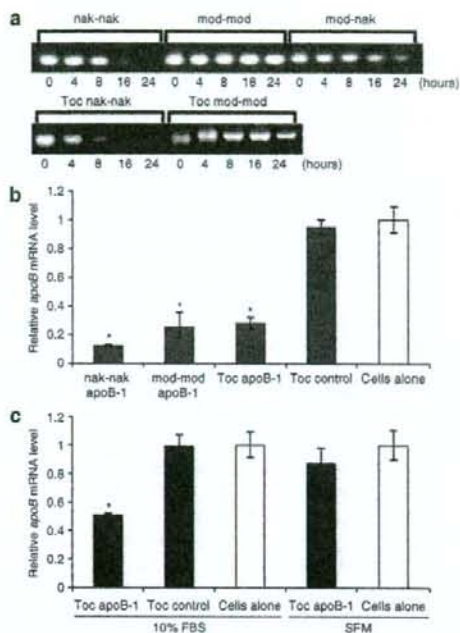


Figure 2 Improvement in stability and preservation of cleaving efficiency of short interfering RNA (siRNA) after chemical modification. **(a)** The stability of modified siRNA in the serum. The both-strands-naked siRNA (nak-nak), both-strands-modified siRNA (mod-mod), only-sense-strand-modified siRNA (mod-nak), both-strands-naked α -tocopherol-bound siRNA (Toc nak-nak), and both-strands-modified α -tocopherol-bound siRNA (Toc mod-mod) were incubated in the mouse serum at 37°C for 4, 8, 16, and 24 hours. The samples were treated with Proteinase K and electrophoresed in 2% agarose gel. **(b)** Reduction of *apoB* messenger RNA (mRNA) levels in the Hepa 1-6 cell line after transfection with apoB-1 siRNA using Lipofectamine RNAiMAX. The quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR) analyses of *apoB* mRNA levels relative to *gapdh* mRNA were performed 24 hours after transfection of both-strand-naked apoB-1 siRNA (nak-nak apoB-1), both-strand-modified apoB-1 siRNA (mod-mod apoB-1), both-strand-modified apoB-1 Toc-siRNA (Toc apoB-1), and control Toc-siRNA (Toc control). The data shown are relative to the values in untreated cells (Cells alone). $n = 3$, Data are shown as mean values \pm SEM. * $P < 0.005$ as compared to cells-alone group. **(c)** Reduction of *apoB* mRNA levels in the Hepa 1-6 cell line after transfection using apoB-1 Toc-siRNA alone. The qRT-PCR analyses of *apoB* mRNA levels relative to *gapdh* mRNA were performed 24 hours after transfection with apoB-1 Toc-siRNA (Toc apoB-1) and control Toc-siRNA (Toc control). The Hepa 1-6 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) only [serum-free medium (SFM)], or in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (10% FBS). The data shown are relative to the values in untreated cells (Cells alone). $n = 3$, Data are shown as mean values \pm SEM. * $P < 0.005$ as compared to cells-alone group. Toc, α -tocopherol. *gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

the stability of the siRNA with both strands modified was much greater than those of the siRNA with both strands naked, and the siRNA with only the sense strand modified. The conjugation of α -tocopherol did not increase the stability of siRNA (Figure 2a).

The impact of the silencing ability conferred by the chemical modification of siRNAs and binding of α -tocopherol was studied in cultured cells of mouse hepatocellular carcinoma (Hepa 1-6)

using a transfection reagent. Even with considerable chemical modification of both strands, the silencing effect of apoB-1 siRNA on endogenous *apoB* mRNA in the Hepa 1-6 cells was not much impaired when compared with the silencing effect of apoB-1 siRNA with both strands naked. Further, the binding of α -tocopherol to the apoB-1 siRNA with both strands modified also did not interfere with the silencing activity (Figure 2b). In effect, we succeeded in carrying out considerable appropriate chemical modifications in the siRNA sequences to increase serum stability, while preserving silencing activity.

Next, α -tocopherol-mediated induction of siRNA was confirmed in Hepa 1-6 cells without any transfection reagents. The addition of apoB-1 Toc-siRNA to the culture medium reduced endogenous *apoB* mRNA in Hepa 1-6 cells. This silencing effect disappeared when serum was absent in the cultured medium (Figure 2c). This finding suggests that α -tocopherol can introduce siRNA into the cells in association with molecules in the serum.

Effective delivery and processing of Toc-siRNA in mice liver

In order to investigate whether successful delivery of Toc-siRNA had been achieved, liver sections were taken from mice 1 hour after injection with Cy3-labeled Toc-siRNA (Cy3 bound to the sense strand of siRNA), and the sections were subjected to confocal imaging. We observed marked accumulation of Cy3 signal both in hepatocytes and nonparenchymal cells in the liver sinusoids. Almost all the hepatocytes had the Cy3 signal. There was predominant signal density around central veins. There was no Cy3 signal in the control liver sections from the mouse injected with Cy3-labeled siRNA without α -tocopherol (Figure 3a). We also confirmed a less prominent Cy3 signal in other organs including lung; the details of the systemic distribution of Toc-siRNA are to be published elsewhere.

In order to study whether Toc-siRNA is processed to a mature form of 21/21-mer siRNA, northern blotting was performed on mouse liver after injection of 32 mg/kg Toc-siRNA. The assay showed two bands of sizes ~21 nt and ~29 nt, corresponding to the

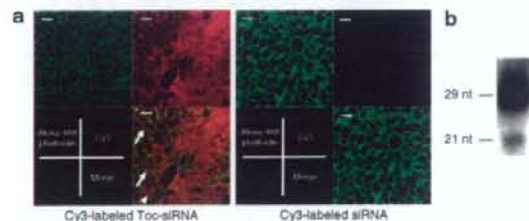


Figure 3 Targeted delivery of Toc-siRNA to mice livers after injection. (a) Confocal images of liver sections from mice injected intravenously with Cy3-labeled Toc-siRNA (left panel) and Cy3-labeled siRNA (right panel). Cy3 signal (red) was noted in hepatocytes (arrowhead) and nonparenchymal cells (arrows). Liver sections were stained with Alexa-488 phalloidin to visualize cell outlines (green). Scale bar = 20 μ m. (b) Small RNAs isolated from livers of apoB-1 Toc-siRNA-injected mice were probed with siRNA sense strand oligonucleotide in order to examine for the presence of apoB-1 Toc-siRNA antisense strand using northern blotting. The bands for the 21 nucleotides (nt) as well as the 29–30-nt antisense strands were detected. siRNA, short interfering RNA; Toc, α -tocopherol.

processed 21-mer antisense strand and the 29-mer α -tocopherol-bound antisense strand, respectively (Figure 3b). These results clearly show that Toc-siRNA has the ability to enter mouse liver cells and be processed by Dicer in the cytosol.

Knockdown of target genes in liver and phenotypic analyses of mice using Toc-siRNA

In order to assess the silencing ability of Toc-siRNA *in vivo*, the level of endogenous *apoB* mRNA in the liver was evaluated. The liver was removed 48 hours after the injection and assayed for *apoB* mRNA levels using quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR). The 2 mg/kg apoB-1 Toc-siRNA markedly suppressed *apoB* mRNA when compared with the effect produced by the same volume of maltose, and this silencing effect disappeared when α -tocopherol was not bound to the siRNA. The knockdown effect was specific for the target molecule, as evidenced by the finding that other endogenous mRNAs in the liver, *transferrin* (*ttr*) and *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (*gapdh*), did not change, and that a control Toc-siRNA targeting an unrelated gene did not affect them, when mRNA levels were measured relative to total RNA (Figure 4a).

Next, we performed a time-course experiment to determine the duration of *apoB* mRNA knockdown effect after single injection of apoB-1 Toc-siRNA. After injection, the reduction of *apoB* mRNA in liver was maximal on day 1 and gradually returned to the baseline level on day 4 (Figure 4b). We also performed a dose-response experiment on day 2 after injection. Mice treated with 2, 8, and 32 mg/kg of apoB-1 Toc-siRNA showed significant dose-dependent reduction in *apoB* mRNA levels (Figure 4c). The intestine, another organ where *apoB* is expressed, was also removed 24 hours after injection and assayed for *apoB* mRNA levels using qRT-PCR. There was no knockdown effect in the intestine as a result of the apoB-1 Toc-siRNA injection (data not shown).

The reduction in liver *apoB* mRNA lowered the export of very low-density lipoprotein (VLDL) from the liver, resulting in a decrease of serum triglyceride (TG) and cholesterol levels and an increase in hepatic lipids.⁸ Injection of Toc-siRNA produced significant reduction in TG and cholesterol levels on day 1 (Figure 5a and b). Further, we performed pathological analysis using Sudan III lipid-staining of liver tissue. The liver sections from mice injected with 2 mg/kg of apoB-1 Toc-siRNA showed a higher number of hepatic lipid droplets than liver sections from control Toc-siRNA-injected mice (Figure 5c). Taken together, these results indicate that apoB-1 Toc-siRNA inhibits *apoB* mRNA and alters the phenotype of lipid metabolism in the liver.

No side effects are produced by Toc-siRNA

White blood cell and platelet counts and biochemical analysis of the serum including total protein, aminotransaminases, and blood urea nitrogen after the injection of 2 mg/kg Toc-siRNA (Table 1), and pathological analysis of the liver tissue stained with hematoxylin/eosin (data not shown) did not show any marked abnormalities.

The level of induction of interferons (IFNs) was examined at 3 hours (the time interval known to be the IFN phase) after the injection of Toc-siRNA.⁵ No IFN- α was detected in the serum (Table 1), and RT-PCR of the liver RNA did not amplify IFN- β

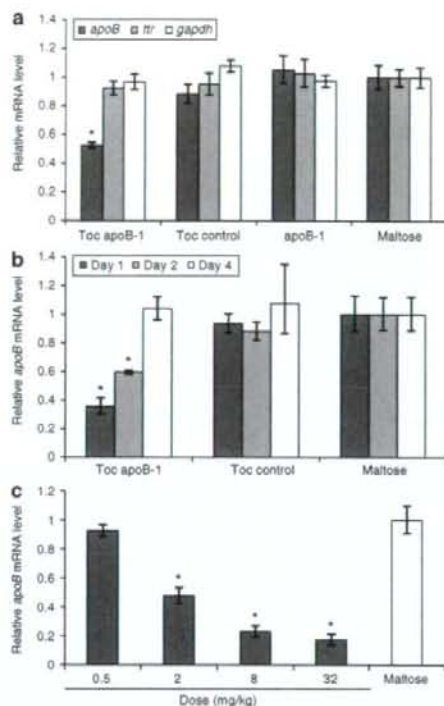


Figure 4 Toc-siRNA-mediated silencing of mouse *apoB* messenger RNA (mRNA) in liver is potent, specific, and dose-dependent. **(a)** The quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR) analyses of several endogenous mRNAs, *apoB*, *ttr*, and *gapdh* mRNAs in the liver (removed 2 days after injection) relative to total input RNA, $n = 3$. The data shown are mean values \pm SEM. * $P < 0.005$ as compared to the maltose injection group. **(b)** Duration of the gene silencing caused by apoB-1 Toc-siRNA. The qRT-PCR analyses of liver *apoB* mRNA levels relative to *gapdh* mRNA were performed at the indicated time points after injection of apoB-1 Toc-siRNA (Toc apoB-1) or control Toc-siRNA (Toc control), $n = 3$. The data shown are mean values \pm SEM. * $P < 0.005$ as compared to the maltose injection group. **(c)** Dose-dependent reduction of *apoB* mRNA levels in the liver after injection of apoB-1 Toc-siRNA. The *apoB* mRNA levels (normalized to *gapdh* mRNA) were determined 2 days after injection of apoB-1 Toc-siRNA quantitated by qRT-PCR. The data shown are relative to those of mice receiving maltose alone, $n = 3$. The data shown are mean values \pm SEM. * $P < 0.005$ as compared to the maltose injection group. siRNA, short interfering RNA; Toc; α -tocopherol. *gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *ttr*, transthyretin.

mRNA (data not shown). The chemical modifications have been reported as preventing stimulation of Toll-like receptor in the endosomes when siRNA is delivered with cationic liposomes.^{20,21} However, the absence of an IFN response to Toc-siRNA does not seem to be the result of chemical modification alone; indeed, a 2 mg/kg dose of Toc-siRNA without chemical modifications also did not induce IFNs (data not shown).

DISCUSSION

We hypothesized that the most effective *in vivo* carrier of siRNA would be a molecule that is essential for target tissue cells but cannot be synthesized within the cells. Vitamins fit these

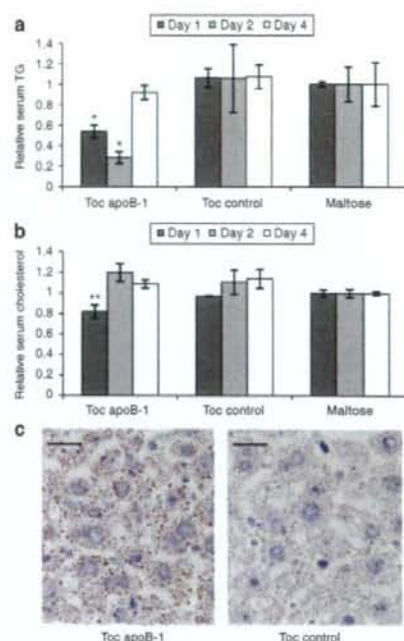


Figure 5 Phenotypic change in lipid metabolism caused by inhibition of liver *apoB* messenger RNA (mRNA). Decreased levels of **(a)** serum triglyceride (TG) and **(b)** cholesterol after knockdown of *apoB* mRNA by apoB-1 Toc-siRNA. Sera were collected from mice before the injections and at 24, 48, and 96 hours after the injections of apoB-1 Toc-siRNA (Toc apoB-1) or control Toc-siRNA (Toc control). The sera were analyzed for TG and cholesterol levels. The values obtained after the injections were divided by those obtained before the injections, and the resultant ratios were normalized to mice which treated with maltose injection, $n = 3$. The data shown are mean values \pm SEM. * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$ as compared to the maltose injection group. **(c)** Reduction in *apoB* mRNA results in increased hepatic lipid accumulation. Liver sections were prepared 4 days after injection of apoB-1 Toc-siRNA and control Toc-siRNA. The sections were fixed, and lipids were detected by staining with Sudan III. Scale bar = 2 μ m. siRNA, short interfering RNA; Toc; α -tocopherol.

requirements well, and the least toxic of the vitamins even at high doses is vitamin E.¹² Among the eight natural isomers of vitamin E, α - and γ -tocopherol are the most abundant in human diets and are equally well absorbed, but peripheral tissues contain much more of α -tocopherol than of γ -tocopherol,²² thereby indicating the presence of a selective transport system for α -tocopherol. We therefore planned to use α -tocopherol and its transport system to effect the delivery of siRNA. Because (hydrophilic) siRNA and (lipophilic) α -tocopherol cannot be admixed, we directly bound α -tocopherol molecule to siRNA at the 5'-end of the 29-mer siRNA antisense strand with a phosphate bond (Toc-siRNA) (Figure 1a and b). We designed 27/29-mer Toc-siRNA with 2 nt 3'-overhang of the antisense strand. The α -tocopherol with 6/8-mer double-strand RNAs is to be cleaved by Dicer in the cytosol, generating the mature form of 21/21-mer siRNA (Figure 1b). We actually confirmed, using northern blotting, that the processed 21-mer siRNA antisense strand was detected in mouse liver after injection with Toc-siRNA (Figure 3b), and that the binding of

Table 1 IFN- α , BUN, TP, AST, ALT, WBC, and Plt levels in mouse serum after intravenous injection of 2mg/kg apoB-1 Toc-siRNA or maltose

Treatment		IFN- α (pg/ml)	BUN (mg/dl)	TP (g/dl)	AST (U/l)	ALT (U/l)	WBC (/ μ l)	Plt ($\times 10^4$ / μ l)
apoB-1 Toc-siRNA	3 hours	<12.5						
	24 hours		19.1 \pm 1.0	5.1 \pm 0.1	78 \pm 1	21 \pm 3	2,800 \pm 330	122.0 \pm 0.3
	48 hours		24.0 \pm 2.4	5.5 \pm 0.1	67 \pm 4	22 \pm 1	2,600 \pm 550	112.2 \pm 18.9
maltose	3 hours	<12.5						
	24 hours		22.0 \pm 0.9	5.5 \pm 0.1	79 \pm 9	25 \pm 2	2,600 \pm 560	117.9 \pm 13.8
	48 hours		24.5 \pm 1.5	5.5 \pm 0.1	60 \pm 3	26 \pm 3	3,700 \pm 900	109.0 \pm 7.0

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BUN, blood urea nitrogen; IFN- α , interferon- α ; Plt, platelet; TP, total protein; WBC, white blood cell.

The values shown are mean values \pm SEM ($n = 3$).

α -tocopherol did not interfere with the siRNA activity *in vitro* (Figure 2b).

This study showed that the binding of α -tocopherol to siRNA enables the efficient *in vivo* delivery of siRNA to the liver. The direct conjugation to siRNA of another lipophilic molecule, cholesterol (Chol-siRNA), was also reported to enhance liver uptake of siRNA.¹⁶ However, the silencing effect produced by Toc-siRNA was more efficient than that by Chol-siRNA, in relation to the identical target gene; much higher doses of Chol-siRNA (50–100 mg/kg) were required for achieving an efficient reduction of *apoB* mRNA in the liver.^{4,16} Actually, when cholesterol was conjugated to the same 27/29-mer apoB-1 siRNA with the same chemical modifications as used in apoB-1 Toc-siRNA at the 3'-end of the sense strand, the reduction of *apoB* mRNA induced by 2 mg/kg of this Chol-siRNA was not statistically significant in the livers of mice (data not shown).

The mechanism of uptake of Toc-siRNA by the liver was not elucidated, and the cause of the difference in silencing efficiency between Toc-siRNA and Chol-siRNA is not known. However, there are some possible explanations. First, if α -tocopherol and cholesterol fuse into the lipid bilayer of hepatocyte membrane as cationic liposome does, the difference in hydrophobicity and polarity between α -tocopherol and cholesterol might influence the efficiency of uptake of siRNA by the liver. This cannot be proved, however, because the negative charge of siRNA cannot be cancelled by the addition of α -tocopherol or cholesterol. Moreover, our *in vitro* experiments indicated that Toc-siRNA does not enter the hepatoma culture cell without serum. Second, Toc-siRNA might be incorporated into the serum lipoproteins and enter the hepatocytes via lipoprotein receptors. Recently, Chol-siRNA was shown to use the lipoprotein receptor-mediated pathway to enter hepatocytes.²³ In contrast to cholesterol, α -tocopherol is an exogenous lipid which cannot be synthesized *in vivo*, and therefore the distribution of α -tocopherol among lipoproteins and the mediating receptors in the liver might be different from those of cholesterol. Third, binding of α -tocopherol might enhance uptake of siRNA in the liver by an interacting serum molecule other than lipoprotein. Soutschek and colleagues¹⁶ proposed that the mechanism of Chol-siRNA *in vivo* is related to enhanced binding to serum protein such as albumin. Similarly, α -tocopherol is known to interact with other serum proteins such as SEC14L2, SEC14L3, SEC14L4, and afamin (reviewed in ref. 14).

We observed significant decreases of serum TG and cholesterol and an increase in lipid droplets in the liver after injection

of apoB-1 Toc-siRNA. The downregulation of liver ApoB-100 impairs VLDL export and is expected to decrease serum TG as well as cholesterol, because large amounts of TG are incorporated into VLDL particles. This is supported by the fact that the transgenic mouse of truncated *apoB*,²⁴ and the microsomal TG transfer protein-null mouse,^{25,26} neither of which can assemble and secrete VLDL in the liver, show lower serum TG and cholesterol and an accumulation of lipid droplets in the liver. Our results, showing decrease in serum TG as well as in cholesterol, were similar to those of a recent study that used a different siRNA *in vivo* delivery system.⁸ Although the decreases in serum TG and cholesterol might be caused by mechanisms other than impaired VLDL export, these results indicate the phenotype of ApoB-100 silencing by Toc-siRNA.

There was no remarkable side effect in blood cell count and biochemical analysis after intravenous injection of Toc-siRNA. The delivered amount of α -tocopherol was only 46 μ g/kg when 2 mg/kg Toc-siRNA was injected. This value is very small, considering the need of α -tocopherol as a nutritional element is estimated 10 mg/day for man (125–200 μ g/kg/day).²⁷ In addition, the anti-oxidant activity of α -tocopherol in Toc-siRNA is abolished, because the reactive site of α -tocopherol for anti-oxidation, hydroxyl group at the C6 position, is covalently connected to siRNA (Figure 1a). More important, the Toc-siRNA did not induce IFN- α in serum (Table 1) and IFN- β mRNA in the liver. This absence of adverse side effects associated with the use of Toc-siRNA is important to note, because it is in sharp contrast to the outcome generally described for lipid vector-associated siRNA delivery. The latter is known to produce an immunostimulatory effect,²⁸ which could cause elevation of transaminases, thrombocytopenia, and lymphopenia.²⁹ When synthetic lipid-coated siRNA is intravenously injected, it is incorporated in the endosome and then induces IFNs and cytokines through activation of Toll-like receptors located in the endosomal membrane.²⁰ The possible mechanism of escape from an immunostimulatory effect in Toc-siRNA-injected mice was that Toc-siRNA used the different pathway to enter the cells from synthetic lipid-coated siRNAs. Together, Toc-siRNA is considered to be a noninvasive delivery method of siRNA.

In summary, vitamin E-mediated *in vivo* delivery of siRNA is effective and safe. Although further investigation into the precise delivery pathway of Toc-siRNA is required for better optimization of its use, the findings of this study represent an important step in advancing the use of synthetic siRNA as a very promising system for gene therapy.

MATERIALS AND METHODS

Synthesis of siRNAs. siRNAs were chemically synthesized. In order to combine vitamin E with siRNA, α -tocopherol phosphoramidite was prepared, and then was it connected with the 5'-end of the antisense strand of the siRNA. The DL- α -tocopherol was purchased from Tokyo Kasei, Tokyo, Japan. Synthetic sense and antisense strands of siRNA were then annealed.

Cell culture. Hepa 1-6 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) only, or supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen, Carlsbad, CA), 100 U/ml penicillin, and 100 μ g of streptomycin at 37°C in 5% CO₂.

qRT-PCR. Total RNA was extracted from the culture cells or mice liver using Isogen (Nippon Gene, Tokyo, Japan). The RNA was reverse transcribed with Superscript III and random hexamers (Invitrogen, Carlsbad, CA). The qRT-PCR was performed on 1.5 μ g of complementary DNA using the TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) in accordance with the manufacturer's instructions. The amplification conditions were 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 seconds and annealing at 60°C for 60 seconds with ABI PRISM 7700 Sequence Detector. Primers for mouse *apoB*, *gapdh*, *itr*, and *IFN- β* mRNAs were designed by Applied Biosystems (Foster City, CA).

In vitro activity and stability assays. In order to determine *in vitro* activity of siRNAs, Hepa 1-6 cells were transfected with 10 nmol/l of siRNAs using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA), or transfected with 2 μ mol/l of Toc-siRNAs without any transfection reagents. The cells were harvested 24 hours after transfection. Total RNA was extracted and the amount of endogenous *apoB* mRNA was measured using qRT-PCR.

In order to study the stability of the siRNAs in serum, (i) siRNA with both strands naked, (ii) siRNA with both strands modified, (iii) siRNA with only the sense strand modified, (iv) Toc-siRNA with both strands naked, and (v) Toc-siRNA with both strands modified (100 pmol each) were incubated at 37°C in mouse serum for 4, 8, 16, and 24 hours. Aliquots taken at different time points were treated with Proteinase K (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) and frozen in urea Tris-buffered electrophoresis-loading buffer. All samples were subjected to electrophoresis on 2% agarose gels.

Northern blotting. Total RNA was extracted from mice liver using MirVana (Ambion, Austin, TX). Total RNA was condensed with Ethachinmate (Nippon gene) and 2 μ g of RNA was separated by electrophoresis on a 14% polyacrylamide-urea gel and transferred to a Hybond-N⁺ membrane (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). The blot was hybridized with a probe of the siRNA antisense sequence which was labeled with fluorescein using Gene Images 3'-Oligolabelling kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). The signals were visualized by Gene Images CDP-star detection Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

Pathological analysis. For pathological analysis of side effects by Toc-siRNA, the liver sample was postfixed in 4% paraformaldehyde/phosphate-buffered saline solution for 6 hour and embedded in paraffin, sectioned at 4- μ m thick using a Leica CM 3050 S cryostat (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), and then stained with hematoxylin/eosin.

To analyze of liver lipid accumulation, liver samples from apoB-1 and control Toc-siRNA-treated mice were sectioned (4 μ m) and fixed in 4% paraformaldehyde/phosphate-buffered saline for 5 minutes, and then stained with filtered Sudan III (Muto Pure Chemicals, Tokyo, Japan) 37°C for 30 minutes. Counterstaining of nuclei was performed with Mayer hematoxylin solution (Muto Pure Chemicals, Tokyo, Japan) for 3 minutes.

For pathological analysis of delivery of siRNA to liver, 8 mg/kg Cy3-labeled siRNA with or without α -tocopherol within 0.25 ml of 10% maltose was injected from the tail vein of ICR mouse. One hour after intravenous

injection, mouse was killed and liver samples were harvested. Liver samples were fixed in 4% paraformaldehyde/phosphate-buffered saline for 6 hour. Fixed tissue samples were snap-frozen in liquid nitrogen. Frozen tissue sections were prepared and stained with 13 nmol/l Alexa-488 phalloidin (Invitrogen, Carlsbad, CA). The slides were analyzed using LSM 510 confocal microscope (Carl Zeiss MicroImaging, Oberkochen, Germany). Each image comprised a flattened projection of 11 optical images (0.4 μ m each) to represent combined fluorescence signals from a 4- μ m thick section.

Statistical analysis. Student's *t*-test was used to evaluate differences between siRNA-transfected groups and cells alone *in vitro*, and between Toc-siRNA-injected groups and maltose only injected group *in vivo*.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Tadaaki Ohgi, Nippon Shinyaku, for his technical support. This work was supported by grants from the Ministry of Education, Science and Culture, Japan (#18650103) and the Ministry of Health Labor and Welfare, Japan (#2212065), and a grant from the 21st Century Center of Excellence Program on Brain Integration and its Disorders given to Tokyo Medical and Dental University.

REFERENCES

- Davidson, BL and Harper, SQ (2005). Viral delivery of recombinant short hairpin RNAs. *Methods Enzymol* **392**: 145-173.
- McCaffrey, AP, Meuse, L, Pham, TT, Conklin, DS, Hannon, GJ and Kay, MA (2002). RNA interference in adult mice. *Nature* **418**: 38-39.
- Hino, T, Yokota, T, Ito, S, Nishina, K, Kang, YS, Mori, S *et al.* (2006). *In vivo* delivery of small interfering RNA targeting brain capillary endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **340**: 263-267.
- Zimmermann, TS, Lee, AC, Akinc, A, Bramlage, B, Bumcrot, D, Fedoruk, MN *et al.* (2006). RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* **441**: 111-114.
- Yokota, T, Iijima, S, Kubodera, T, Ishii, K, Katakai, Y, Ageyama, N *et al.* (2007). Efficient regulation of viral replication by siRNA in a non-human primate surrogate model for hepatitis C. *Biochem Biophys Res Commun* **361**: 294-300.
- Spagnou, S, Miller, AD and Keller, M (2004). Lipidic carriers of siRNA: differences in the formulation, cellular uptake, and delivery with plasmid DNA. *Biochemistry* **43**: 13348-13356.
- Baigude, H, McCarroll, J, Yang, CS, Swain, PM and Rana, TM (2007). Design and creation of new nanomaterials for therapeutic RNAi. *ACS Chem Biol* **2**: 237-241.
- Rozena, DR, Lewis, DL, Wakefield, DH, Wong, SC, Klein, JJ, Roesch, PL *et al.* (2007). Dynamic PolyConjugates for targeted *in vivo* delivery of siRNA to hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 12982-12987.
- Sato, A, Takagi, M, Shimamoto, A, Kawakami, S and Hashida, M (2007). Small interfering RNA delivery to the liver by intravenous administration of galactosylated cationic liposomes in mice. *Biomaterials* **28**: 1434-1442.
- Kim, SI, Shin, D, Choi, TH, Lee, JC, Cheon, GJ, Kim, KY *et al.* (2007). Systemic and specific delivery of small interfering RNAs to the liver mediated by apolipoprotein A-I. *Mol Ther* **15**: 1145-1152.
- Kumar, P, Wu, H, McBride, JL, Jung, KE, Kim, MH, Davidson, BL *et al.* (2007). Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature* **448**: 39-43.
- Kappus, H and Diplock, AT (1992). Tolerance and safety of vitamin E: a toxicological position report. *Free Radic Biol Med* **13**: 55-74.
- Rigotti, A (2007). Absorption, transport, and tissue delivery of vitamin E. *Mol Aspects Med* **28**: 423-436.
- Zingg, JM (2007). Vitamin E: an overview of major research directions. *Mol Aspects Med* **28**: 400-422.
- Rose, SD, Kim, DH, Amarzougouli, M, Heideil, JD, Collingwood, MA, Davis, ME *et al.* (2005). Functional polarity is introduced by Dicer processing of short substrate RNAs. *Nucleic Acids Res* **33**: 4140-4156.
- Soutschek, I, Akinc, A, Bramlage, B, Charis, K, Constien, R, Donoghue, M *et al.* (2004). Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* **432**: 173-178.
- Chiu, YL and Rana, TM (2003). siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis. *RNA* **9**: 1034-1048.
- Czuderna, F, Fechtner, M, Dames, S, Ayygun, H, Klippel, A, Pronk, CJ *et al.* (2003). Structural variations and stabilizing modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **31**: 2705-2716.
- Miyoshi, K, Tsukumo, H, Nagami, T, Siomi, H and Siomi, MC (2005). Slicer function of *Drosophila* Argonautes and its involvement in RISC formation. *Genes Dev* **19**: 2837-2848.
- Judge, AD, Bola, G, Lee, AC and MacLachlan, I (2006). Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing *in vivo*. *Mol Ther* **13**: 494-505.
- Sloud, M, Furset, G and Cekaite, L (2007). Suppression of immunostimulatory siRNA-driven innate immune activation by 2'-modified RNAs. *Biochem Biophys Res Commun* **361**: 122-126.

22. Atergood, L and Allin-Slater, RB (1978). Effect of administration of α - and γ -tocopherol on tissue distribution and red cell hemolysis in rats. *Int J Vitam Nutr Res* **48**: 32-37.
23. Wolfrum, C, Shi, S, Jayaprakash, KN, Jayaraman, M, Wang, C, Pandey, RK et al. (2007). Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs. *Nat Biotechnol* **25**: 1149-1157.
24. Chen, Z, Fitzgerald, RL, Averna, MR and Schonfeld, C (2000). A targeted apolipoprotein B-38,9-producing mutation causes fatty livers in mice due to the reduced ability of apolipoprotein B-38,9 to transport triglycerides. *J Biol Chem* **275**: 32807-32815.
25. Raabe, M, Véniant, MM, Sullivan, MA, Zlot, CH, Björkegren, J, Nielsen, LB et al. (1999). Analysis of the role of microsomal triglyceride transfer protein in the liver of tissue-specific knockout mice. *J Clin Invest* **103**: 1287-1298.
26. Minehira-Castelli, K, Leonard, SW, Walker, OM, Traber, MG and Young, SG (2006). Absence of VLDL secretion does not affect α -tocopherol content in peripheral tissues. *J Lipid Res* **47**: 1733-1738.
27. Food and Nutrition Board, National Academy of Sciences, National Research Council (1989). *Recommended Dietary Allowances* 10th edn. National Academy Press: Washington, DC, pp 99-107.
28. Robbins, M, Judge, A, Liang, L, McClintock, K, Yaworski, E and MacLachlan, I (2007). 2'-O-methyl-modified RNAs act as TLR7 antagonists. *Mol Ther* **15**: 1663-1669.
29. Morrissey, DV, Lockridge, JA, Shaw, L, Blanchard, K, Jensen, K, Breen, W et al. (2005). Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat Biotechnol* **23**: 1002-1007.

MicroRNA と中枢神経系

横田 隆徳*

MicroRNA and Central Nervous System

Takanori Yokota*

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are 21-24 nucleotide (nt) duplex RNAs that participate in the translational regulation of messenger RNAs (mRNA). These miRNAs are created from precursor transcripts by subsequent processing steps that are mediated by Drosha and Dicer-members of the RNaseIII family. One of the two strands is incorporated into the active sites of a protein that belongs to the argonaute family of proteins, where it serves as a guide for complementary sequences in the 3'-UTR site of the target mRNAs.

miRNAs are expressed at high levels within the as well as mature developing brain. These miRNAs orchestrate the maintenance of adult neural cell traits, promote cellular homeostasis and dampen endogenous and exogenous stress responses, and modulate multiple parameters that are associated with synaptic plasticity. In this regard, the expression of a brain-specific miRNA (miR-124a) in nonneuronal cells enables the conversion of the overall gene-expression pattern to a neuronal one. Another brain-specific miRNA, namely, miR-134, modulates the development of dendritic spines-neuronal protrusions that connect with other neurons and therefore probably controls neuronal transmission and plasticity. Recent evidence suggests that miRNAs may be a contributing factor cases of neurodegeneration, such as those in Alzheimer diseases and polyglutamine diseases. Research on miRNAs in the context of neurodegeneration has been rapidly advancing, and the goal of this review is to provide perspective for new data that may aid specialists in this field.

Key words : miRNA, non-coding RNA, Drosha, argonaute family, antagomir

はじめに

分子生物学の中心原理であるセントラルドグマとは、遺伝情報はゲノムにインプリントされており、それが転写された RNA を介して最終生理活性物質である蛋白質に翻訳されるというものである。この原理に基づいて、さまざまな生物でゲノムプロジェクトが進行した結果、驚くことに蛋白質をコードする遺伝子 (mRNA) の数は約 23,000 で、全ゲノムの 2% にすぎず、遺伝子の数もイネとヒトとではほとんど変わらないことが明らかになっ

た。その一方で、2005 年にゲノムの約 70% の領域が RNA に転写されているという報告がなされ、それまでにジャンク (がらくた) とされていたゲノム領域からも多数の転写産物がみつかったのである。興味深いことに、生物学的複雑さの増大は、全ゲノム DNA に対する non-coding 領域の割合の増大と正の相関関係を示し、その割合はヒトにおいて最大になるという¹⁾。特に神経系においては、他臓器にも増してこの複雑さの増幅機構 'complex multiplier' がその機能形成に重要な役割を果たしていると思定されている。

一方、2本鎖の RNA の導入によって誘導される配列

* 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科, 脳神経機能病態学 (神経内科) [〒113-8519 東京都文京区湯島 1-5-45] Department of Neurology and Neurological Science, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan

特異的な遺伝子発現抑制である RNA 干渉が発見され、この機構が進化的に保存された生体防御機構であり、遺伝子発現制御やゲノムの品質管理として機能していることがわかった。上記の non-coding RNA には膨大な数の 20~30 塩基長の「小さな RNA (small RNA)」があり、これまでの RNA 干渉および関連分子経路の解析から、これらの生体内の内因性の小さな RNA が重要な遺伝子発現抑制機構を果たしていることが判明し³⁾、総称して「RNA サイレンシング」と呼ばれている³⁾。

その後の small RNA の研究の進歩はめざましく、piRNA, rasiRNA, ta-siRNA や内因性 siRNA などさまざまな RNA サイレンシングに関わる small RNA が同定されている。本稿ではその中で最も研究が進んで、臨床応用への研究も始まった microRNA (miRNA) について、その基本知見と神経系との関わりについて概説したい。

I. miRNA の概念とその働き

miRNA は「ヘアピン構造をとる前駆体から Drosha, Dicer などの RNase によって切り出される 21~24 塩基 (主に 22 塩基) の RNA」と定義される。miRNA は Victor Ambros のグループが 1993 年に線虫 (*C. elegans*) が幼虫から成虫へと成長する過程において、時期特異的に発現するヘテロクロニック遺伝子 (heterochronic gene) の 1 つとして *lin-4* 遺伝子を同定し⁴⁾、同遺伝子は転写物の中に 22 塩基の non-coding RNA が *lin-14* の発現を制御していることを明らかにした。その後、Melloらのグループによって RNAi 経路を担う経路と *lin-4* との関連が示され、これらの小さな RNA が進化を通じて保存され、RNAi 同様に転写後遺伝子抑制に関わることを示されてきた。これらは miRNA と呼ばれ、すべての mRNA の 30% は miRNA の支配下にあり、生物の発生や細胞の機能制御に重要な働きを果たしていることが次々に示されている。

miRNA は標的 mRNA の 3'-UTR (非翻訳領域) に後述の Seed 配列の相補性を主たる認識機構として、直接結合してその遺伝子の発現を調節している。1 つの miRNA は 100 以上の非常に多くの mRNA を標的とするが、その抑制程度は 1.5~2 倍程度と比較的軽度であり 4 倍を超えることはほとんどない^{5,6)}。1 つの miRNA が多数の mRNA を標的にするのは、miRNA が少数の特定の遺伝子の発現を抑える以外に、その miRNA の実現したい表現型に好ましくない一群の遺伝子全般に作用して、表現型を制御している可能性が考えられてい

る^{7,8)}。例えば、神経細胞に特異的に発現する miR-124 の標的遺伝子は、グリアや表皮細胞などで特異的に転写される mRNA に多く存在して、逆に神経細胞で発現する mRNA にはほとんどみつからず (mutually exclusive expression)、その細胞の特異性を規定している可能性が考えられる⁷⁾。このように miRNA には大まかに 2 種類の働き方があり、1 つは特定のいくつかの標的遺伝子の発現を制御するものと、もう 1 つは多数の遺伝子に働いて、ある表現型の決定のノイズを消してその精度を上げる作用があると考えられている⁹⁾。また、1 つの mRNA は数個の miRNA から制御を受け、それらの複数の miRNA は協調的に 1 つの標的 miRNA の発現を抑制している¹⁰⁾。さらに単一のプロモーターに複数の miRNA がコードされている場合があり、複数の miRNA がセットで発現する場合がある (polycistronic miRNA cluster)。さらに、miRNA 同士も互いにその発現を制御し合っており、また miRNA 自身の発現も転写因子とペアになって調節するシステムがあることが報告された。例えば、ドパミン神経細胞に発現する転写因子 Pitx3 は miR-133b の転写因子だが、miR-133b は Pitx3 mRNA の 3'-UTR に結合して negative feedback をしている¹¹⁾。

このように miRNA と標的 mRNA は「多対多」の関係であり、表現型の決定に上流に下流におそらく階層をなして複雑に発現調節をしているが、個々の抑制の程度は軽度で、標的遺伝子の個別の制御にも細胞全体の表現系の制御にも fine tuning を行っていると考えられる¹⁰⁾。

II. ゲノム上の pri-miRNA の存在様式

ゲノムもコードされた miRNA 遺伝子は長い一次転写分子である pri-miRNA (primary transcript) として転写される。多くの pri-miRNA は mRNA として RNA ポリメラーゼ II によって転写されるため、5' 末端に CAP 構造と 3' 末端にポリ A テール配列を持つ (1 部例外的に RNA ポリメラーゼ III によって転写される¹²⁾)。ゲノム上、pri-miRNA はその約半数がイントロン領域 (1 部は 3' 非翻訳領域) に存在するが (intronic miRNA)、そのうち 80% はメッセンジャー RNA (mRNA) のイントロン領域に、残りの 20% は non-coding RNA のイントロン領域に見出されている¹³⁾ (Fig. 1)。Non-coding RNA にはエクソンやイントロンとの両領域にまたがる部位の遺伝子内にも見出されている。この長い non-coding RNA の多くは CAP 構造と 3' 末端にポリ A テール配列を持ち、mRNA-like non-

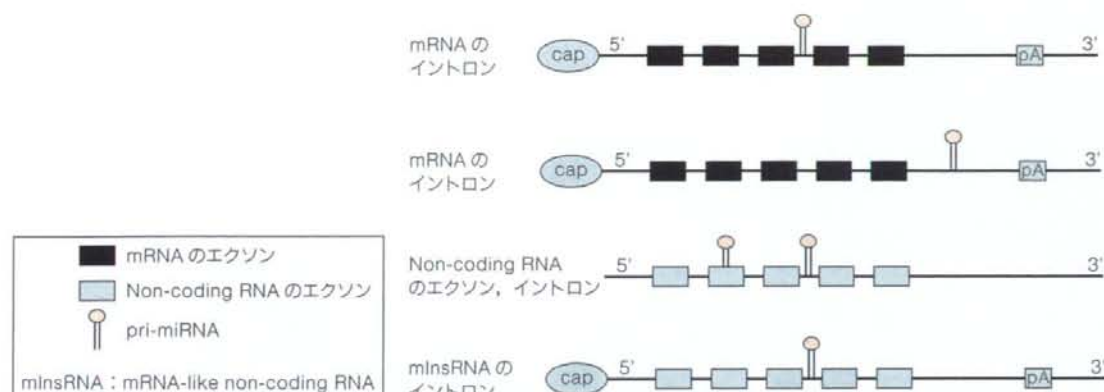


Fig. 1 ゲノム上の pri-miRNA の存在部位

coding RNA (mInsrNA) と呼ばれる。一方、遺伝子間領域 (intergenic region) にも pri-miRNA は存在して、独自のプロモーターを持ち、3-4kb の non-coding RNA が一般的と推定されている¹⁴⁾。

一方、pri-miRNA 自体の発現制御のメカニズムも重要であるが、現在までのところ十分には解明されていない。異なる intergenic pri-miRNA の発現の promotor には共通の保存されたモチーフがあり、その発現の制御の機構の一端がうかがわれる¹⁵⁾。また、いくつかの pri-miRNA は CpG アイランド内に位置しており、脱メチル化や脱アセチル化酵素阻害によってその発現が上昇することからエピジェネティックな発現制御を受け、その病態ががん化やがん転移¹⁶⁾などと密接に関連している。

III. miRNA 生成のプロセス (Fig. 2 A)

miRNA のプロセスは3つの段階からなっている。まず、核内で転写された数100塩基の大きさの pri-miRNA はそのステム構造の基部に11塩基の部分で Drosha と DGCR8 (ショウジョウバエでは Drosha と Pasha) を含む 500~650 kDa の巨大な microProcessor 複合体によって切り出され(プロセッシング)、60~70塩基の pre-miRNA が生成される (Fig. 2 B)。Intronic miRNA の場合、ホストの mRNA のスプライシングとの関係は、Drosha/DGCR8 による pre-miRNA の切り出しは mRNA のスプライシングに先行して行われ、mRNA のスプライシング自体に pre-miRNA の切り出しは影響しない¹⁷⁾。

pri-miRNA が mRNA のイントロン領域にコードされている場合、miRNA と蛋白質の両者が1つの遺伝子

から同一のプロモーターで発現するが、miRNA の配列はその蛋白の mRNA の 3' 非翻訳領域に相関のある場合とない場合があるという¹²⁾。ファミリー形成する miRNA (polycistronic miRNA cluster) では、そのホスト mRNA の機能には関係ない場合が多い。また、pri-miRNA のすべてが miRNA にプロセスされるわけではなく¹⁸⁾、pri-miRNA と miRNA 発現量は相関しないことが示されている¹⁹⁾。例えば、let-7 の pri-miRNA は RNA 結合蛋白である lin-28 によって Drosha の段階でその切り出しに制御を受けて、miRNA はホストの mRNA と独立して pri-miRNA からの切り出しの制御を受けている²⁰⁾。

一方で、最近イントロンそのものが pre-miRNA である場合が報告された。イントロン=pre-miRNA の場合は mirtron と呼ばれ、その場合はスプライシングされたイントロンがそのまま pre-miRNA として機能してその生成に Drosha は必要ない²¹⁾。

第2のステップとして pre-miRNA は exportin-5 によって認識され、RanGTP 依存的に核から細胞質に輸送される^{22,23)}。第3のステップとして、細胞質に出た pre-miRNA は Dicer によって22塩基程度の2本鎖 RNA に切断され、Dicer と TRBP (TAR RNA binding protein) の共同作用によって5'末端が自由エネルギー的により不安定な miRNA 鎖のみが最終的な agonaute を含む蛋白核酸複合体に取り込まれ、他方の miRNA 鎖は分解される²⁴⁾。siRNA を含む蛋白核酸複合体は、RISC (RNA-induced silencing complex) と呼ばれるが²⁵⁾、miRNA を含む場合は micro-ribonucleoprotein (miRNP)²⁶⁾ や miRNA-induced silencing complex (miRISC)²⁷⁾ と呼ばれている。

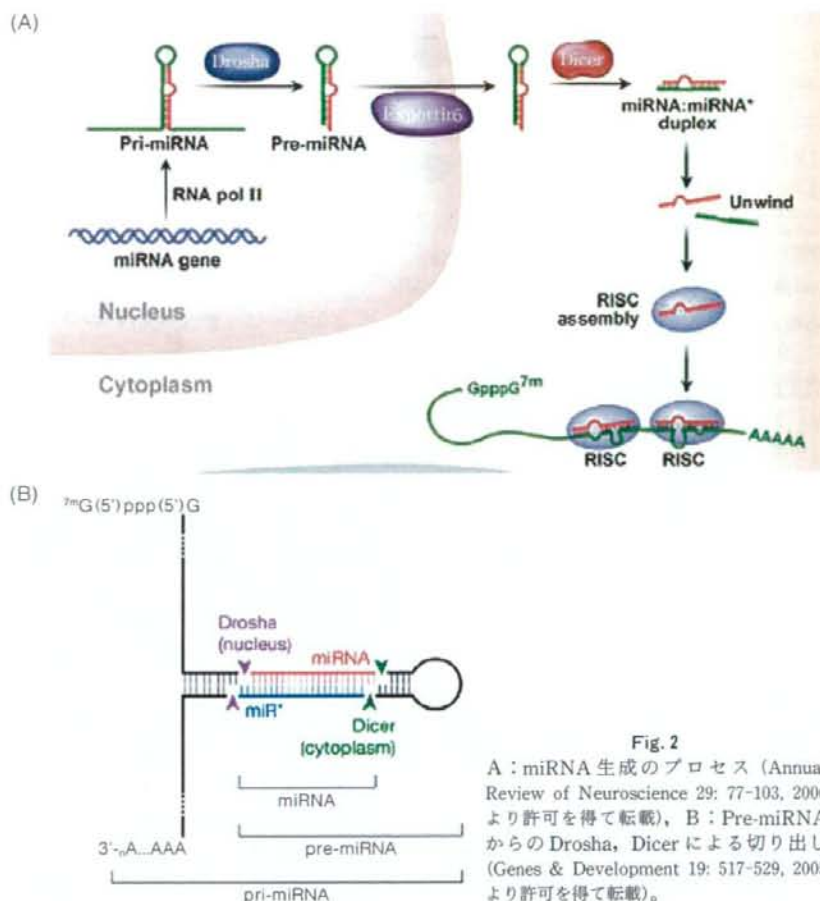


Fig. 2

A: miRNA 生成のプロセス (Annual Review of Neuroscience 29: 77-103, 2006 より許可を得て転載), B: Pre-miRNA からの Drosha, Dicer による切り出し (Genes & Development 19: 517-529, 2005 より許可を得て転載)。

ショウジョウバエではこのプロセスは Dicer1 と Ago1 を含む RISC に限定され siRNA のプロセス機構と独立しているが、ヒトでは Dicer は 1 種類で siRNA と共通であり、miRNA は 4 つの Agonaute ファミリーのいずれをも含む RISC にも取り込まれている²⁸⁾。そして、細胞内の翻訳抑制の場として、miRNA とその標的 mRNA、および argonaute 蛋白は細胞質内に GW182 や p54 などの他の構成分子とともに濃縮凝集して P-body (processing body) を形成する²⁹⁾。

IV. miRNA の遺伝子発現抑制機構

1. 標的の認識 (Fig. 3 A)

標的の認識には以下の 3 つの原則が判明している。最も重要な認識の原則は、RISC に取り込まれた miRNA の 5' 側から 2 塩基から 8 塩基までの 7 塩基の 'seed' と

呼ばれる部位が、標的 mRNA の 3'-UTR (稀に 5'-UTR) に完全に相補性にマッチすることである^{5,30)}。第 1 の原則は A と第 9 塩基に対応する標的 mRNA の配列が、A または U であると結合効率が上昇する。第 2 の原則は、miRNA-mRNA の中央部分に buldge か mismatches がなければいけない。これがあると、siRNA のように agonaute 依存性の RNA 切断が起こってしまう³¹⁾。第 3 の原則は miRNA の 3' 側の特に第 13~16 の 4 塩基が標的 mRNA に相補性があるとその結合効率が上昇する³²⁾。さらに加えて、seed 領域が標的 mRNA の 3'UTR に通常複数カ所存在して結合することができるのが有効に標的 RNA の発現を抑制する必要条件である可能性が指摘されている³⁰⁻³³⁾。

2. 翻訳抑制の機序 (Fig. 3 B)

miRNA の翻訳抑制の機序として、① agonaute,

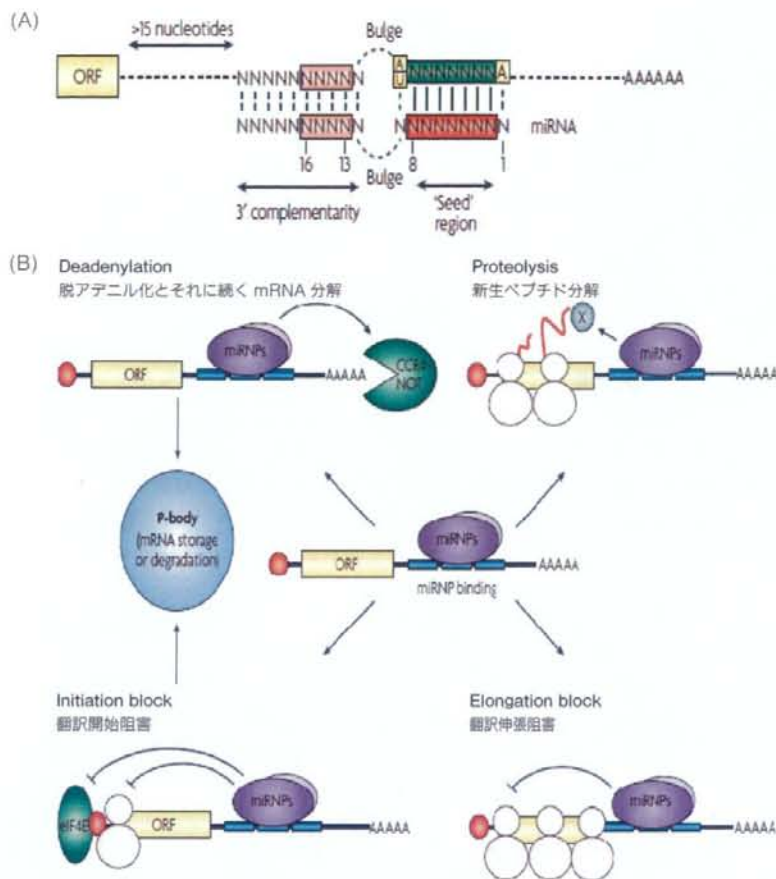


Fig. 3 miRNA の遺伝子発現抑制機構

(Nature Review Genetics 9: 102-114, 2008 より許可を得て転載)

GW182 と miRNA の複合体 (miRNP/miRISC) が CAP 構造への翻訳開始因子 eIF4E の結合を競合阻害することによる翻訳開始の阻害 (Fig. 3 B 左下)³⁴⁾。②ポリ A テールの脱アデニル化による除去とそれに引き続く mRNA の分解 (Fig. 3 B 上)³⁵⁾。③翻訳開始後の翻訳伸張阻害またはリボソームの脱落 (Fig. 3 B 右上)³⁶⁾。④翻訳されたばかりの新生ポリペプチドの分解 (Fig. 3 B 右下)³⁷⁾などが考えられている。これらの複数の翻訳抑制の機序の相関関係は十分に解明されていないが、少なくともある一部の miRNA の標的においては、第 1 段階として miRNA は翻訳開始を阻害して、その後の経過で標的の mRNA を分解していると考えられている³⁸⁾。また、プロテオミク解析から翻訳段階で 3 分の 1 以上抑制された標的では、mRNA の検出可能な不安定化もみられ、より大きな抑制を受けた標的ではほとんどの場合、

mRNA の不安定化によって主に抑制される傾向にある⁴⁾。

認識の原則でも触れたように、この翻訳抑制の機序は標的 mRNA を切断する siRNA の機能と基本的に異なっていて、その差は siRNA の 2 本鎖が通常完全に相補であるのに対して、miRNA/miRNA の 2 本鎖部分が中央領域のミスマッチや G-U wobble 塩基対を含む配列上の差異によって振り分けられていると考えられている。ショウジョウバエでは siRNA 経路の RISC loading complex (RLC) 中の Dicer-2/R2D2 がミスマッチを含まない 2 本鎖を選択的に RISC にリクルートする機構が判明している³⁹⁾が、ヒトではその機序は明らかでない。

Table 神経系関連 miRNA 発現プロフィール

中枢神経特異的 miRNA	miR-9, miR-124, miR-128, miR-134
中枢神経多量発現	miR-125
時間的特異性	発生初期から徐々に増加して出生後に低下: miR-9, miR-125b, miR-181a 発生初期から徐々に増加して成体でも持続: miR-103, miR-128
部位特異的	神経細胞特異的: miR-124, miR-128 アストロサイト特異的: miR-23, miR-26, miR-29
中脳特異的	miR-133b
海馬特異的	miR-384 *

* アンチセンス鎖の転写物

V. miRNA と神経系

一般に、脳の miRNA は他の臓器に比較してその種類や発現量が多く、1,000 以上の miRNA が発現しているといわれる⁴⁰⁾。特に発生期の miRNA の発現が多く、かつ重要で、ゼブラフィッシュでは Dicer の変異で神経系の発生は大幅に障害されるが、miR-430 を補うことのみでその障害のかなりの部分が救済される^{41,42)}。このことは、単一の miRNA が神経系の発生期のトランスクリプトームにおいて多量の遺伝子の時間部位特異的な発現を協調的に制御していることを示している。また、pri-miRNA のプロセッシングを行っている DGCR-8 遺伝子の deletion で、学習能力の障害を含む多器官奇形を示す DiGeorge 症候群が発症することが知られている⁴³⁾。

発生の初期の脳に発現が豊富なものや後期に増加するものなど、時期特異的な発現にはさまざまなものがあることが知られている⁴⁴⁾。さらに部位特異的な発現として、中脳(黒質)特異的¹¹⁾や海馬中脳特異的な miRNA⁴⁵⁾の発現が報告されている (Table)。miR-134 など多くの miRNA はシナプスに発現している synapsin 1, ssynaptotagmin や、海馬神経細胞の樹状突起に局限して発現しているキナーゼである Limk1⁴⁶⁾ などの転写物を標的にしており、シナプス伝達機能や記憶能力に重要な働きをしていると考えられている。

老年期を含む成熟した神経系にも miRNA は発現しており、神経細胞のホメオスタシス、内因性、外因性のストレス応答、シナプス可塑性に関わっていることが想定されている^{47,48)}。細胞レベルでは虚血、酸化ストレス、飢餓ストレスなどさまざまなストレスで特定の miRNA の発現が変化することが知られている⁴⁹⁻⁵¹⁾。miR-124 は哺乳動物の成熟した神経系に最も多く発現している miRNA で、脳に発現しているすべての miRNA の 25~48% を占めるといわれる⁵²⁾。

miR-124 は、単一の miRNA がその発現によって多く

の miRNA の発現を変化させ、細胞のプロファイル全体を制御していることを初めて示された miRNA である。miR-124 の発現により HeLa 細胞の 174 の遺伝子発現が低下して (その 76% はその 3'-UTR に miR-124 の seed 配列に相補の配列を有して直接抑制される)、HeLa 細胞の発現プロファイル脳のプロファイルに近づくことが示された⁵³⁾。

VI. miRNA と神経疾患

主に、老年期に進行性に神経細胞が変性する神経変性疾患の病態と miRNA が関係があるという知見が累積しつつある。細胞内で pre-miRNA を miRNA にプロセスする、RNase である Dicer をノックアウトすると胎生致死になるが⁵⁴⁾、ドパミン神経細胞に特異的に Dicer の発現をノックアウトすると、寿命の後半で進行性の細胞死が生じ Parkinson 病類似の病態になる¹¹⁾。Dicer の変異で SCA3 のショウジョウバエのモデルのポリグルタミン毒性が増強することが示された⁵⁵⁾。Cre-lox システムを用いたブルキンエ細胞特異的な Dicer のノックアウトマウスで、ブルキンエ細胞の脱落と運動失調の症状がみられた⁵⁶⁾。これらの実験事実は、miRNA は神経細胞の生存に必要で、その機能障害は神経変性の原因になりうることを示したものと見える。さらに、Dicer の下流の miRISC の異常と神経障害との関連も示唆されている。脆弱 X 症候群は X 染色体上の FMR1 遺伝子内の CGG 反復配列の伸長により発症する進行性の精神遅滞を呈する遺伝子性の疾患で、FMR1 蛋白 (FMRP) の機能喪失がその原因と考えられている。FMRP は RNA 結合蛋白で、RISC の構成因子として agonaute 蛋白と結合しており、RISC での miRNA/siRNA の翻訳抑制機能におそらく補助的な役割を果たしており、その変異による機能喪失で学習機能に障害が生じる⁵⁷⁾。

一方、孤発性の神経変性疾患での病態生理における miRNA の関与の実態についてはまだ明らかではない。

以下に示すように、いくつかの神経変性疾患でそのプロファイリングの変化が指摘されており、miRNAの発現量の変化が病態の危険因子となり、その他の危険因子と重なって発症や病態に関与する'multiple hit hypothesis'が考え得る。また、miRNAの標的遺伝子側の病態として、Tourette症候群において神経に発現するSlit and Trk-like 1 (SLITRK1)のmRNAの3'-UTRのmiRNAの結合部位にpolymorphismが発見され、miRNAとの結合の障害が病態と関連する機序が知られている⁵⁸⁾。

1. アルツハイマー病 (Alzheimer disease: AD)

Hébertら⁵⁹⁾はAD脳のmiRNAプロファイリングを検索して、正常対照脳と比較してA β の産生に関わる分子(APP, BACE1, PSEN)を標的とする7つのmiRNAの変化を見出した。その中で、彼らはAD患者の約30%ではBACE1蛋白量は増加しているといわれる一方、BACE1のmRNA量は変化に乏しいことに注目し、AD脳でのmiR-29aの発現量が約30%減少し、miR-29a/b-1の発現量とBACE1の蛋白量に負の相関があることを報告した。同様に、Wangら⁶⁰⁾もAD脳をMCI (mild cognitive impairment) 脳や正常脳でも老人斑のある非認知障害脳、老人斑のない非認知障害脳と比較して、老人斑の出現量に相関して発現量が低下して、かつび漫性レビー小体病 (diffuse Lewy body disease: DLB) 脳に変化のないmiRNAとしてmiR-107を発見した。miR-107は神経細胞に発現し、AD脳で*in situ* hybridizationにでも発現低下が示された。miR-107またはそのparalogはBACE1のmRNAの3'-UTRを4カ所認識して、AD脳でmiR-107の発現量は低下していた。

また、ヒト神経細胞の初代培養に対してアルミニウムや硫酸鉄で酸化ストレスをかけて発現するmiR-9, miR-125bやmiR-128がAD脳の海馬でも発現が増加していることが報告されている⁶¹⁾。miR-125bはsynapsin Iやsynapsin IIを標的にしており、AD脳のシナプス障害との関連が疑われている⁶²⁾。

2. ポリグルタミン病

歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (dentato-rubropallido-luysian atrophy: DRPLA) の原因遺伝子のatrophinを標的とするmiR-8をショウジョウバエのモデルで機能喪失型変異miR-8を用いて解析すると、atrophin mRNAレベルは2倍に増加して、神経細胞死やその症状は増悪した⁶³⁾。同様にLeeら⁶⁴⁾はataxin1の長い3'-UTRを認識するmiR-19, miR-101, miR-130が協調的にataxin1の発現を抑制することを示し、特にmiR-101,

miR-130はブルキンエ細胞で発現しており、ataxin1の3'-UTRの認識部位の変異によってポリグルタミン毒性が増強することからその病態に関与すると考えた。これらの結果は、内因性のmiRNAによるポリグルタミンの発現量の'fine tuning'によって、その毒性や症状が変化し得ることが示された。さらにSCA3のショウジョウバエのモデルで遺伝的スクリーニングによって見出されたmiRNA bandamは、ポリグルタミン毒性をその下流で修飾しうるということが報告された⁶⁵⁾。

VII. miRNAを用いた治療

上述のように、いくつかの神経疾患においてmiRNAはそのプロファイルに変化があり、それが病態形成に関与している可能性があり、その異常なmiRNAは治療の対象となる可能性がある。悪性腫瘍では、例えばLet-7など、いくつかのmiRNAは既に癌抑制遺伝子(癌遺伝子)としてその役割はかなり明らかとなっており、治療上重要な標的遺伝子となっている⁶⁶⁾。

過剰なmiRNAを抑制する方法として、標的のmiRNAに相補的な1本鎖の合成RNAが開発され'antagonir'と呼ばれ、2'-O-メチルやLNAなどのいくつかの異なる糖鎖骨格の修飾やコレステロールを結合させたものが報告されている^{67,68)}。最近、両端にshort-hairpin型の2本鎖RNAを付加することによりmiRNA抑制効果を上昇させた報告は、miRNA-RISC-mRNA相互作用の介入をその機序として想定しており興味深い⁶⁹⁾。Antagonirは静脈投与や腹腔内投与などの全身投与によって肝臓や心臓にはデリバリー可能である^{67,68,70)}、中枢神経へのデリバリーはいまだ報告がなく、核酸医薬全般に言えることではあるが、特に中枢神経系へのデリバリーの問題がその臨床応用にとって大きな障害となっている。

一方、miRNAを細胞内に導入させる場合は、化学合成miRNAやDrosha基質としての化学合成pre-miRNAが用いられている^{71,72)}。In vivoや長期の発現にはウイルスベクターなどを用いた発現型miRNAが有用である。shRNA⁷³⁾やpre-miRNA⁷⁴⁾をPol IIIプロモーターで発現させる方法が報告されているが、shRNAの発現量が多いと内因性miRNAとexportin-5の競合が生じて内因性miRNAの成熟障害による毒性が懸念されている⁷⁵⁾。その点に考慮して、発現量の比較的少ないPol IIプロモーターでDrosha基質のpre-miRNAを発現させる方法も報告されている^{76,77)}。Pol IIIプロモーターはユビキタスな発現だが、Pol IIプロモーターを用いることに

より組織特異的な発現が可能となる利点もある⁷⁸⁾。

おわりに

哺乳動物,特に中神経系の複雑さの増幅機構 'complex multiplier' を担う主役の1つである機能核酸として,さまざまな non-coding RNA の存在が次々と明らかとなっている。その中でも miRNA の分子生物学的機構の解明は最も進んでおり,その制御機構は極めて複雑で,従来の概念と異質の巧みな体系を持っていることがおぼろげながらもみえてきた。その疾患の病的機序への関与の研究は始まったばかりであり,その役割や重要性,および治療の対象としての意義はまだまだ明らかでない。しかし, non-coding RNA の果たす複雑さの増幅機構は,最も複雑で深淵な臓器である脳において必ずや中核的役割を果たしていることが予想される。さらに, miRNA の病態はヒトの神経疾患において重要な役割を果たしている可能性があり,その治療が現実のものとなる日はいずれ来ると思われる。

文 献

- Mattick JS: RNA regulation: a new genetics? *Nature Rev Genet* 5: 316-323, 2004
- Neilson JR, Sharp PA: Small RNA regulators of gene expression. *Cell* 134: 899-902, 2008
- Tomari Y, Zamore PD: Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev* 19: 517-529, 2005
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V: The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843-854, 1993
- Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, et al: Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 455: 58-63, 2008
- Baek D, Villén J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, et al: The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 455: 64-71, 2008
- Stark A, Brennecke J, Bushati N, Russell RB, Cohen SM: Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution. *Cell* 123: 1133-1146, 2005
- Farh KK, Grimson A, Jan C, Lewis BP, Johnston WK, et al: The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science* 310: 1817-1821, 2005
- Seila AC, Sharp PA: Small RNAs tell big stories in Whistler. *Nat Cell Biol* 10: 630-633, 2008
- Bartel DP: MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281-297, 2004
- Kim J, Inoue K, Ishii J, Vanti WB, Voronov SV, et al: A MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science* 317: 1220-1224, 2007
- Borchert GM, Lanier W, Davidson BL: RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 13: 1097-1101, 2006
- Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A: Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 14: 1902-1910, 2004
- Saini HK, Griffiths-Jones S, Enright AJ: Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 17719-17724, 2007
- Zhou X, Ruan J, Wang G, Zhang W: Characterization and identification of microRNA core promoters in four model species. *PLoS Comput Biol* 3: e37, 2007
- Saito Y, Jones PA: Epigenetic activation of tumor suppressor microRNAs in human cancer cells. *Epigenetic activation of tumor suppressor microRNAs in human cancer cells. Cell Cycle* 5: 2220-2222, 2006
- Kim YK, Kim VN: Processing of intronic microRNAs. *EMBO J* 26: 775-783, 2007
- Thomson JM, Newman M, Parker JS, Morin-Kensicki EM, Wright T, et al: Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev* 20: 2202-2207, 2006
- Tang GQ, Maxwell ES: *Xenopus* microRNA genes are predominantly located within introns and are differentially expressed in adult frog tissues via post-transcriptional regulation. *Genome Res* 18: 104-112, 2008
- Viswanathan SR, Daley GQ, Gregory RI: Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science* 320: 97-100, 2008
- Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai EC: The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell* 130: 89-100, 2007
- Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U: Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303: 95-98, 2004
- Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D: Exportin 5 is a RanGTP-dependent RNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 10: 185-191, 2004
- Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, et al: TREBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436: 740-744, 2005
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ: An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional

- gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**: 293-296, 2000
- 26) Schwarz DS, Zamore PD: Why do miRNAs live in the miRNP? *Genes Dev* **16**: 1025-1031, 2002
 - 27) Tang G: siRNA and miRNA: an insight into RISCs. *Trends Biochem Sci* **30**: 106-114, 2005
 - 28) Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, et al: Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* **305**: 1437-1441, 2004
 - 29) Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, Closs EI, Filipowicz W: Stress-induced reversal of microRNA repression and mRNA P-body localization in human cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **71**: 513-521, 2006
 - 30) Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen S: Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* **3**: 404-418, 2005
 - 31) Lewis BP, Burge C, Bartel DP: Conserved seed pairing, often flanked by adenines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* **120**: 15-20, 2005
 - 32) Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, et al: MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* **27**: 91-105, 2007
 - 33) Nielsen CB, Shomron N, Sandberg R, Hornstein E, Kitzman J, et al: Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs. *RNA* **13**, 1894-1910, 2007
 - 34) Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E: GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 346-53, 2008
 - 35) Giraldez AJ, Mishima Y, Rihel J, Grocock RJ, Van Dongen S, et al: Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* **312**: 75-79, 2006
 - 36) Maroney PA, Yu Y, Fisher J, Nilsen T: Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nature Struct Mol Biol* **13**: 1102-1107, 2006
 - 37) Nottrott S, Simard MJ, Richter JD: Humanlet-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nature Struct Mol Biol* **13**: 1108-1114, 2006
 - 38) Mourelatos Z: Small RNAs: The seeds of silence. *Nature* **455**: 44-45, 2008
 - 39) Tomari Y, Du T, Zamore PD: Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs. *Cell* **130**: 299-308, 2007
 - 40) Berezikov E, Thuemmler F, van Laake LW, Kondova I, Bontrop R, et al: Diversity of microRNAs in human and chimpanzee brain. *Nat Genet* **38**: 1375-1377, 2006
 - 41) Giraldez AJ, Cinalli RM, Glasner ME, Enright AJ, Thomson JM, et al: MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science* **308**: 833-838, 2005
 - 42) Giraldez AJ, Mishima Y, Rihel J, Grocock RJ, Van Dongen S, et al: Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* **312**: 75-79, 2006
 - 43) Shiohama A, Sasaki T, Noda S, Minoshima S, Shimizu N: Molecular cloning and expression analysis of a novel gene DGCR8 located in the DiGeorge syndrome chromosomal region. *Biochem Biophys Res Commun* **304**: 184-190, 2003
 - 44) Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Townsend M, Yoshii A, Sestan N, et al: Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain. *Genome Biol* **5**: R68, 2004
 - 45) He X, Zhang Q, Liu Y, Pan X: Cloning and identification of novel MicroRNAs from rat hippocampus. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **39**: 708-714, 2007
 - 46) Schratt GM, Tuebing F, Nigh EA, Kane CG, Sabatini ME, Kiebler M, Greenberg ME: A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature* **439**: 283-289, 2006
 - 47) Conaco C, Otto S, Han JJ, Mandel G: Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 2422-2427, 2006
 - 48) Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, Moss E, Dmitrovsky E, et al: Expression profiling of mammalian microRNA uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol* **5**: R13, 2004
 - 49) Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, Closs EI, Filipowicz W: Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* **125**: 1111-1124, 2006
 - 50) Lukiw WJ, Pogue AI: Induction of specific micro RNA (miRNA) species by ROS-generating metal sulfates in primary human brain cells. *J Inorg Biochem* **101**: 1265-1269, 2007
 - 51) Sunkar R, Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK: Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends Plant Sci* **12**: 301-309, 2007
 - 52) Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T: Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* **12**: 735-739, 2002
 - 53) Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, et al: Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* **433**: 769-773, 2005

- 54) Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, et al: Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* **35**: 215-217, 2003
- 55) Bilen J, Liu N, Burnett BG, Pittman RN, Bonini NM: MicroRNA pathways modulate polyglutamine-induced neurodegeneration. *Mol Cell* **24**: 157-163, 2006
- 56) Schaefer A, O'Carroll D, Tan CL, Hillman D, Sugimori M, et al: Cerebellar neurodegeneration in the absence of microRNAs. *J Exp Med* **2004**: 1553-1558, 2007
- 57) Schaeffer C, Beaulande M, Ehresmann C, Ehresmann B, Moine H: The RNA binding protein FMRP: new connections and missing links. *Biol Cell* **95**: 221-228, 2003
- 58) Abelson JF, Kwan KY, O'Roak BJ, Baek DY, Stillman AA, et al: Sequence variants in SLITRK1 are associated with Tourette's syndrome. *Science* **310**: 317-320, 2005
- 59) Hébert SS, Horrè K, Nicolai L, Papadopoulou AS, Mandemakers W, et al: Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 6415-6420, 2008
- 60) Wang WX, Rajeev BW, Stromberg AJ, Ren N, Tang G, et al: The expression of microRNA miR-107 decreases early in Alzheimer's disease and may accelerate disease progression through regulation of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1. *J Neurosci* **28**: 1213-1223, 2008
- 61) Lukiw WJ: MicroRNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus. *Neuroreport* **18**: 297-300, 2007
- 62) Lukiw WJ, Pogue AI: Induction of specific micro RNA (miRNA) species by ROS-generating metal sulfates in primary human brain cells. *J Inorg Biochem* **101**: 1265-1269, 2007
- 63) Karres JS, Hilgers V, Carrera I, Treisman J, Cohen SM: The conserved microRNA miR-8 tunes atrophin levels to prevent neurodegeneration in *Drosophila*. *Cell* **131**: 136-145, 2007
- 64) Lee Y, Samaco RC, Gatchel JR, Thaller C, Orr HT, et al: miR-19, miR-101 and miR-130 co-regulate ATXN1 levels to potentially modulate SCA1 pathogenesis. *Nat Neurosci* **11**: 1137-1139, 2008
- 65) Bilen J, Liu N, Burnett BG, Pittman RN, Bonini NM: MicroRNA pathways modulate polyglutamine-induced neurodegeneration. *Mol Cell* **24**: 157-163, 2006
- 66) Soifer HS, Rossi JJ, Sætrom P: MicroRNAs in disease and potential therapeutic applications. *Mol Ther* **15**: 2070-2079, 2007
- 67) Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, et al: Silencing of microRNAs *in vivo* with 'antagomirs'. *Nature* **438**: 685-689, 2005
- 68) Elmén J, Lindow M, Schüttz S, Lawrence M, Petri A, et al: LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature* **452**: 896-899, 2008
- 69) Vermeulen A, Robertson B, Dalby AB, Marshall WS, Karpilow J, et al: Double-stranded regions are essential design components of potent inhibitors of RISC function. *RNA* **13**: 723-730, 2007
- 70) Carè A, Catalucci D, Felicetti F, Bonci D, Addario A, et al: MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med* **13**: 613-618, 2007
- 71) Sætrom P, Snove O, Nedland M, Grunfeld TB, Lin Y, et al: Conserved microRNA characteristics in mammals. *Oligonucleotides* **16**: 115-144, 2006
- 72) Siolas D, Lerner C, Burchard J, Ge W, Linsley PS, et al: Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. *Nat Biotechnol* **23**: 227-231, 2005
- 73) Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R: Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell* **2**: 243-247, 2002
- 74) Zeng Y, Wagner EJ, Cullen BR: Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol Cell* **9**: 1327-1333, 2002
- 75) Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, Storm TA, Pandey K, et al: Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* **441**: 537-541, 2006
- 76) Giering JC, Grimm D, Storm TA, Kay MA: tissue-specific pol II promoter is an effective and safe RNAi therapeutic. *Mol Ther* **16**: 1630-1636, 2008
- 77) McBride JL, Boudreau RL, Harper SQ, Staber PD, Montey AM, et al: Artificial miRNAs mitigate shRNA-mediated toxicity in the brain: implications for the therapeutic development of RNAi. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 5868-5873, 2008
- 78) Robson, T and Hirst, DG: Transcriptional targeting in cancer gene therapy. *J Biomed Biotechnol* **2003**: 110-137, 2003

ALS の遺伝子治療

はじめに

ALS は神経筋疾患の中で根本的治療法が期待される難病中の難病のひとつである。しかし、その原因・分子病態はまだ十分には解明されていないため、有効な治療法の確立には至っていない。このような現状の中、全体の10%未満ではあるものの家族性 ALS の原因遺伝子がいくつか判明した。中でもその10~20%を占める superoxide dismutase 1 (SOD 1) 遺伝子の変異遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを用いた病態解明と治療法開発のアプローチがさかんに行われている。本稿では ALS に対する治療法の中でも遺伝子治療の試みについてわれわれの研究成果を含め概説したい。

遺伝子治療

ALS に対する遺伝子治療戦略は大きく2つの手法に分かれて研究が進められている。一つは ALS の病因が明確でない中、運動ニューロンの保護・救済を目的に神経栄養因子・抗アポトーシス分子などの遺伝子を導入する方法、もう一つは家族性 ALS に対しその原因となる変異遺伝子の発現を RNA 干渉 (RNAi) を用いて遺伝子レベルで抑制する方法である。

1. 神経保護を目的とした遺伝子治療

運動ニューロンの保護作用を有する神経栄養因子を治療薬として用いる試みは動物実験レベルから臨床試験まで精力的に行われてきた。しかし、それら栄養因子をリコンビナント蛋白として ALS 患者に投与した試験では確固とした治療効果が認められたとはいえない。遺伝子治療はこれらの遺伝子をウイルスベクターを用いて障害されている運動ニューロンに導入しようというものであり、目的とする

久保寺 隆行 横田 隆徳 水澤 英洋

運動ニューロンに効率よく導入できれば栄養因子のもつ効果もより発揮できることが期待される。治療遺伝子を導入するには血液脳関門を通過する必要があり、その方法には主に、① 筋肉内にウイルスベクターを注入し逆行性軸索輸送によって運動ニューロンに導入する方法、② 運動ニューロンの存在する脊髄内に直接ウイルスベクターを注入する方法、の2つがある(図1)。ここで①の逆行性軸索輸送を用いる方法では運動ニューロンのみには遺伝子導入できない。最近の変異 SOD 1 のモデルマウスの知見では、運動ニューロン以外のグリア細胞に発現した変異 SOD 1 が ALS の病態形成に重要な役割を果たしている (non-cell autonomous) ことが指摘されている¹⁾。したがって導入する遺伝子がグリア細胞にも寄与するかなどの導入遺伝子の特徴に応じて①、②は使い分ける必要がある。

これまでの動物実験では、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクターによって glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), vascular endothelial growth

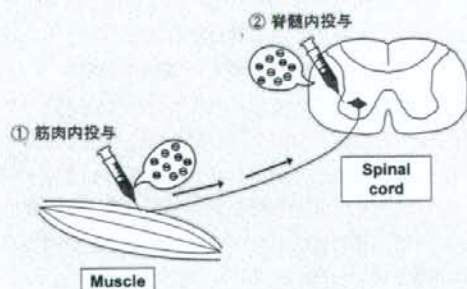


図1 運動ニューロンへの遺伝子導入法
治療遺伝子を組み込んだウイルスベクターを、① 筋肉内に注入し逆行性軸索輸送を利用して運動ニューロンへ導入する、または、② 脊髄内に直接注入して運動ニューロンへ導入する。

くぼら たかゆき 東京医科歯科大学大学院/歯学総合研究科 脳神経病態学

よこた たかひら 同 准教授
みずさわ ひでひろ 同 教授

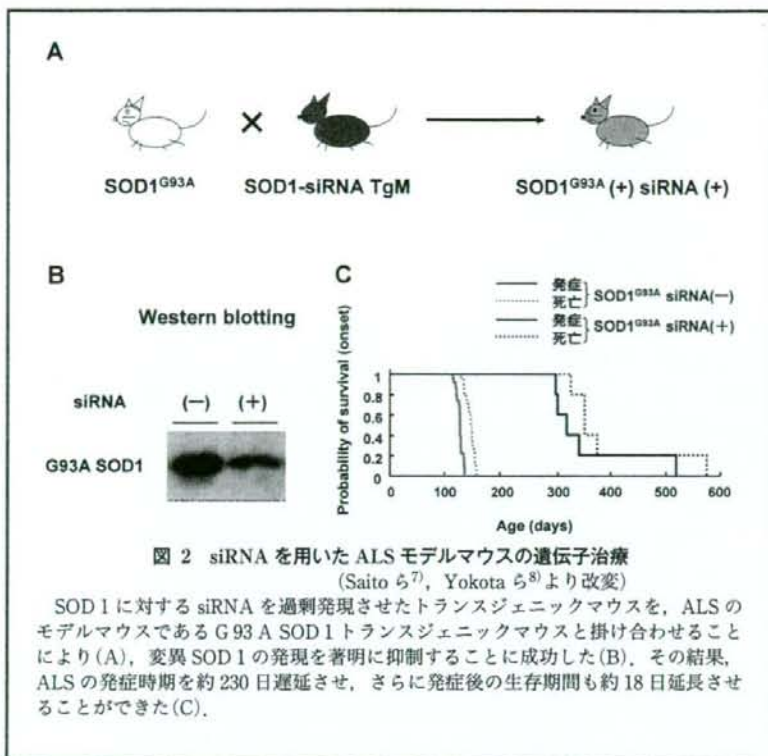


図2 siRNAを用いたALSモデルマウスの遺伝子治療 (Saitoら⁷⁾, Yokotaら⁸⁾より改変)

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 SOD1トランスジェニックマウスと掛け合わせるにより(A), 変異SOD1の発現を著明に抑制することに成功した(B), その結果、ALSの発症時期を約230日遅延させ、さらに発症後の生存期間も約18日延長させることができた(C)。

factor(VEGF), insulin-like growth factor(IGF)などの神経栄養因子の遺伝子が筋肉内または脊髄内投与され有効性が報告されている²⁻⁴⁾。栄養因子以外では、抗アポトーシス分子であるBcl-2ファミリー、抗アポトーシス阻害蛋白(IAP)などの遺伝子を導入する試みもなされているがその効果は栄養因子と比較すると軽微なものである⁵⁾。

2. RNA干渉(RNAi)を利用した遺伝子治療

常染色体優性遺伝形式をとるSOD1変異では変異アレルから発現した変異タンパク質が何らかの毒性を獲得すること(gain of toxic function)により発症すると考えられている。従って、その変異したタンパク質の発現を抑制する方法があれば、その機序の如何に関わらず発症を阻止することが期待できる。

RNAiは2本鎖RNAによって配列特異的にmRNAが分解され、その結果遺伝子の発現が抑制される現象である。その標的遺伝子の発現抑制効果はこれまでのアンチセンスやリボザイムよりも高いとされ、さらにその配列特異性も高いことから医療分野における応用が発見当初から大きく

期待されている。細胞内に導入された2本鎖RNAは細胞質内でDicerと呼ばれるRNase IIIファミリーに属する酵素によって3'側が2塩基突出した長さ21~23塩基に短い2本鎖のsmall interfering RNA (siRNA)に分解される。その後siRNAは1本鎖化され、1本鎖となったsiRNAは他の因子を伴うことでRISC(RNA-induced silencing complex)を形成する。RISCは取り込まれたsiRNAをガイド分子として相補的な配列をもつ標的RNAを認識し切断する⁶⁾。

このRNAiによって変異SOD1の発現を抑制するためにはRNAiを目的の組織に誘導する必要がある。しかし、ここにはsiRNAの神経系へのデリバリーという大きなハードルがある。そこで、まずわれわれは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、これをALSのモデルマウスであるG93A SOD1トランスジェ

ニックマウスと掛け合わせることによって、デリバリーの問題を回避しつつ全身の変異SOD1タンパク質の発現を抑制してALSの発症を阻止できるかを検証した。まず、SOD1に対するsiRNAを発現するDNAベクターを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、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製した。このマウスとG93A SOD1トランスジェニックマウスとを掛け合わせ、脊髄における変異SOD1タンパク質の発現を80%以上抑制することに成功した。この効果により、ALSの発症時期は大幅に抑制され、さらに発症後の生存期間も延長した(図2)^{7,8)}。

同様にSOD1に対するsiRNA発現レンチウイルス・アデノ随伴ウイルスベクターを骨格筋に注入もしくは直接脊髄内に注入してG93A SOD1トランスジェニックマウスの発症時期を遅延させたとの報告がなされた⁹⁻¹¹⁾。しかし発症後の生存期間に関しては延長効果は認められていない。これは、先程述べた運動ニューロンに発現する変異