

SOD1はALSの発症に、グリアに発現する変異SOD1はALSの進行に関与しているというnon-cell autonomousに関する知見¹⁾を反映した結果ともとれる。骨格筋にベクターを投与した場合は運動ニューロン特異的に変異SOD1を抑制することでALSの発症時期を遅延させることはできたが、非神経細胞の変異SOD1の発現には変化を与えなかったために疾患の進行は抑制できなかつたと考えられる。

一方、われわれの掛け合わせ実験では運動ニューロンおよびグリア細胞を含む中枢神経系の全ての細胞でsiRNAを発現し変異SOD1を抑制する結果、発症時期のみならず発症後の病勢の進行も抑制できることを示した。した

が、たとえ発症後であってもsiRNAによって変異遺伝子の発現を抑制することができれば疾患の進行を少しでも遅らせる効果が期待できるものと考えられる。

むすび

ALSに対する遺伝子治療の試みに関して、運動ニューロン保護を目的とした治療法と変異遺伝子の発現をsiRNAにより抑制する治療法を紹介した。これらの遺伝子治療法はまだ動物実験の段階であり克服すべき課題も多いが、これを足掛かりにALS治療の研究開発が進展することを期待したい。

文 献

- 1) Bollée S, Yamanaka K, Lobsiger CS, et al. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science*. 2006; 312: 1389-92.
- 2) Kaspar BK, Llado J, Sherkat N, et al. Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. *Science*. 2003; 301: 839-42.
- 3) Arrouz M, Ralph GS, Strokebaum E, et al. VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. *Nature*. 2004; 429: 413-7.
- 4) Ascadi G, Anguelov RA, Yang H, et al. Increased survival and function of SOD1 mice after glial cell-derived neurotrophic factor gene therapy. *Hum Gene Ther*. 2002; 13: 1047-59.
- 5) Arrouz M, Hottinger A, Paterna JG, et al. Increased motoneuron survival and improved neuromuscular function in transgenic ALS mice after intraspinal injection of an adeno-associated virus encoding Bcl-2. *Hum Mol Genet*. 2000; 9: 803-11.
- 6) Bumcrot D, Manoharan M, Koteliensky V, et al. RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. *Nat Chem Biol*. 2006; 12: 711-9.
- 7) Saito Y, Yokota T, Mitani T, et al. Transgenic small interfering RNA halts amyotrophic lateral sclerosis in a mouse model. *J Biol Chem*. 2005; 280: 42826-30.
- 8) Yokota T, Sasaguri H, Saito Y, et al. Increased of disease duration of amyotrophic lateral sclerosis in a mouse model by transgenic small interfering RNA. *Arch Neurol*. 2007; 64: 145-6.
- 9) 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*. 2005; 11: 429-33.
- 10) Miller TM, Kasper BK, Kops GJ, et al. Virus-delivered small RNA silencing sustains strength in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 2005; 57: 773-6.
- 11) Raoul C, Abbas-Terki T, Bensadoun JC, et al. Lentiviral-mediated silencing of SOD1 through RNA interference retards disease onset and progression in a mouse model of ALS. *Nat Med*. 2005; 11: 423-8.

学術・技術ピックス

アンチセンス研究入門 39

ウイルスベクターを用いた shRNA による
遺伝子治療の現状と問題点

久保寺隆行, 横田隆徳

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 脳神経病態学
(2008年10月20日 受理)

1. はじめに

RNA interference (RNAi)は2本鎖RNA (double-stranded RNA: dsRNA)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類似の機能核酸である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, 現在世界中で激しい医薬品開発の競争が展開されている。

RNAi を生体内に誘導するには化学合成 siRNA (small interfering RNA) を直接細胞内に導入するか, または, 発現ベクターを用いて細胞内で siRNA を産生させる方法がある。本稿では, 細胞内で siRNA を発現させる siRNA 発現ベクターとして最も多く用いられる発現ユニットである short-hairpin RNA (shRNA) を, ウイルスベクターを用いて生体へ導入する遺伝子治療の現状と問題点について概説したい。

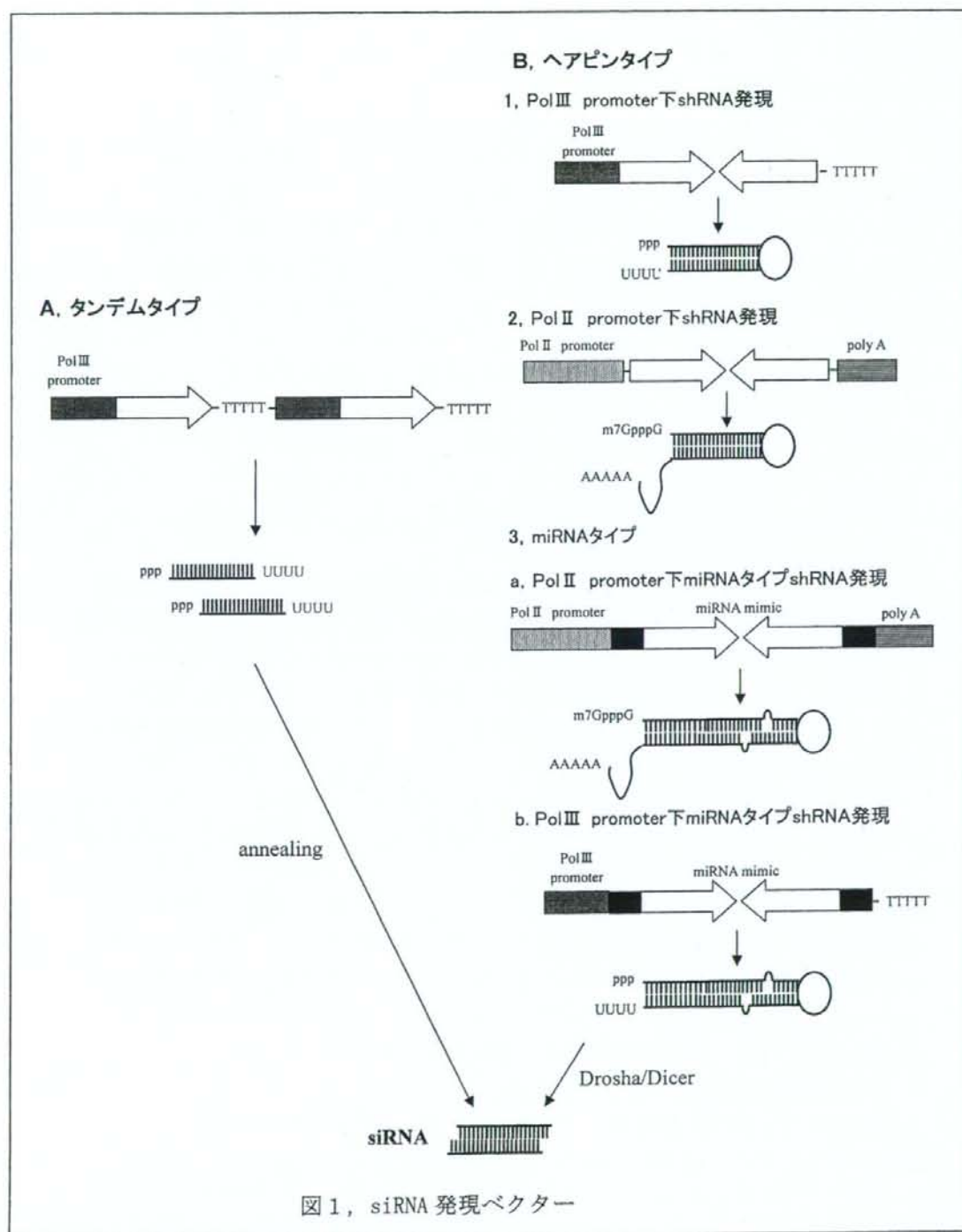
2. siRNA 発現ベクター

siRNA を細胞内で発現させるには siRNA 発現 DNA ベクターの作製が必要である。その発現システムは2002年に相次いで報告され¹⁻⁴⁾主にタンデムタイプとヘアピンタイプの2つに大別される。タンデムタイプは2つの RNA polymerase III (pol III)系プロモーターからパッセンジャー鎖とガイド鎖に相当する RNA が別々に転写され, 細胞内でアニールして siRNA を産生する。一方, ヘアピンタイプは miRNA のプロセス機構をヒントに考えられた siRNA 発現法で, パッセンジャー鎖とガイド鎖がループを介してつながる shRNA が転写され, pre-miRNA と同じように細胞質で Dicer によってプロセッシングされて siRNA が切り出される (図1)。その有効性は, プラスミドの細胞内濃度が低濃度の場合ヘアピンタイプがタンデムタイプを上回っているとされ⁵⁾, ヘアピンタイプが現在最も多く使用されている。

ヘアピンタイプでは, shRNA を転写させるのに U6 RNA や H1 RNA などの短い

RNA を転写する pol III 系プロモーターが多く用いられている。ここで、pol III 系プロモーター下に 50-100 塩基の長い mismatches shRNA を転写させ、細胞内で Dicer によって複数の siRNA を発現させることで、ターゲットの変異に耐性を持たせる方法も考案されている^{6,7)}。

一般に pol III 系プロモーターは、その転写量は pol II 系プロモーターよりも多く、また転写開始点が明確であり、転写の終結が 4 つ以上の T で決定されるといった特徴がある。しかしながら、pol III 系プロモーターはほとんどの細胞で活性化状態になっているため、標的遺伝子を組織特異的に抑制することが困難であり、また詳細は後述するが shRNA 転写量が多いために shRNA 毒性の副作用を生じる恐れがある。そこで、最近、pol II 系プロモーターを利用した shRNA 発現ベクターのシステムが報告されるようになってきた。実際に、比較できるようにエンジニアした Pol II 系が pol III 系プロモーターより shRNA の発現量が少ないことは示されている⁸⁾。pol II 系プロモーターを用いる場合にはプロモーターの下流に minipoly A などを用いるなどの工夫をして shRNA 配列を挿入する方法⁹⁻¹²⁾以外に、miRNA の多くが pol II 系プロモーターによって転写されることから pol II 系プロモーター下に配置した pri-miRNA の miRNA 配列を siRNA 配列に置き換えた miRNA タイプのベクターを構築する方法も考案されている^{13,14)}。また、miRNA 発現タイプの shRNA を Cre-loxP システムに搭載して、かつ複数の shRNA を誘導的 (inducible) に発現させたトランスジェニックマウスの報告もされた¹⁵⁾。miRNA タイプのベクターは pol III 系プロモーター下で発現させることも可能で^{16,17)}、内在性の miRNA と同じ機構でプロセッシングを受けることから細胞にとってはより生理的な状況下で siRNA を発現できると考えられ有効な RNAi 効果が期待できる。なお、ウイルスベクターを用いた shRNA の発現コンストラクトの詳細については Davidson らの総説¹⁸⁾もあるので照会されたい。



3. *in vivo*での shRNA 発現法

上記に挙げた shRNA 発現ベクターを *in vivo*に導入し、細胞内で shRNA を発現させるためには適当なデリバリー法を利用する必要がある、これまでマウスを中心とした齧歯類に対するアプローチがなされている。最初に *in vivo*に対する shRNA の導入に成功したのは、高用量の溶液に溶解した shRNA 発現プラスミドを高圧で短時間に経静脈的に注入するハイドロダイナミクス法でマウス肝臓に shRNA を導入した例である¹⁹⁾。しかし、この方法は主に肝臓、腎臓、肺などの血流の豊富な臓器に遺伝子を導入する方法であるため、それ以外の臓器に shRNA を導入することができない。その点ウイルスベクターは、全身投与もしくは局所投与のいずれのアプローチも可能であり、shRNA の *in vivo*への導入の成功例も報告されるようになってきた。現在、shRNA のデリバリー法として主に用いられているウイルスベクターはアデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターの4種類があり、それぞれの特徴を理解し、目的に応じて使い分ける必要がある。以下にその4種類のウイルスベクターについて、遺伝子治療用ベクターとしての特徴、及び shRNA 導入ベクターとしての適応を示す。

a. アデノウイルスベクター

分裂細胞に加え神経細胞、肝細胞などの非分裂細胞への遺伝子導入も可能であり、感染する細胞の範囲が広く、発現効率も高い。しかし、導入遺伝子の宿主ゲノムへの挿入は起こらず染色体外にエピソードとして存在するため、分裂・増殖する細胞では導入遺伝子の発現は細胞分裂ごとに弱くなる。また、*in vivo*投与を行った場合には、宿主側のアデノウイルスに対する免疫反応を生じやすいことが指摘されている²⁰⁾。

遺伝子治療用の shRNA 発現ベクターとして対象となる疾患としては、悪性腫瘍が大きなターゲットとなる。その戦略として、腫瘍細胞のみで増殖可能な変異アデノウイルスをバックボーンとした制限増殖型アデノウイルスベクターを利用することで、腫瘍細胞内で選択的にベクター複製により導入した shRNA のコピー数が増加するのに加え、細胞内増殖したウイルスそのものが腫瘍溶解性を発揮する効果が期待できる。最近、VEGF に対する shRNA 発現制限増殖型アデノウイルスベクターを用いて、血管新生の抑制に加え腫瘍溶解性が発揮されることでより高い抗腫瘍効果が得られたと報告されている²¹⁾。

b. アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター

AAV ベクターは非病原性で安全性が高く、分裂細胞・非分裂細胞へ効率よく遺伝子導入することが可能である。導入遺伝子の宿主ゲノムへの挿入は起こらないが、アデノウイルスベクターと比較して、より安定した長期間の遺伝子導入が可能である。ここ数年、AAV ベクターの血清型と組織特異性の関係につい

での理解が進展しており、標的組織の種類に応じて種々の血清型の AAV ベクターを使い分けることが可能である。

shRNA 発現 AAV ベクターとしては、AAV の標的細胞に遺伝子発現の持続期間が長期に及ぶ神経細胞・肝細胞などの非分裂細胞が適していることから、中枢神経・肝臓を主な対象にアプローチがなされている。神経変性疾患であるポリグルタミン病の一つ脊髄小脳萎縮症 1 型(SCA1)は、伸長したポリグルタミン鎖をもつ変異 ataxin-1 タンパク質が何らかの“gain-of-toxic function”を有するために発症すると考えられている。この変異 ataxin-1 の発現を抑制する shRNA 発現 AAV1 型ベクターをモデルマウス小脳に投与することで失調症状が改善したと報告された²²⁾。また、最近単離された新規血清型である AAV8 型は肝臓に対する親和性が高く、B 型肝炎ウイルス(HBV)に対する shRNA 発現 AAV8 型ベクターの 1 回の静脈内投与で血中の HBV を長期間抑制することができたとする報告もある²³⁾。

c, レトロウイルスベクター, レンチウイルスベクター

逆転写された導入遺伝子が宿主ゲノムへ挿入されるので遺伝子を安定に長期発現させることが可能である。レトロウイルスベクターは非分裂細胞への遺伝子導入ができないが、レトロウイルスの一種で HIV(human immunodeficiency virus)を元に改変を施されたレンチウイルスベクターは非分裂細胞へも高効率に遺伝子を導入でき、特に VSV-G(vesicular stomatitis virus)のエンベロープタンパク質で pseudotype されたレンチウイルスベクターは造血幹細胞や ES 細胞など従来遺伝子を導入することが極めて難しかった細胞に遺伝子導入することが可能である。shRNA による発現ベクターとしてもレンチウイルスベクターを用いた報告が多く、感染症、特に HIV 感染において、リンパ球側に内在するウイルス受容体である CCR5、または HIV のアクセサリータンパク質である Rev をターゲットとして、造血幹細胞へ CCR5、Rev に対する shRNA を導入した成功例があり^{24, 25)}、他に神経細胞への親和性が高いことからアルツハイマー病などの中中枢神経疾患を対象とした報告もなされている²⁶⁾。ただし、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターでは細胞に導入される遺伝子のコピー数が少ないため、良好な RNAi 効果を発揮するためには抑制効率の優れた shRNA 配列をデザインする必要がある。

表, 各種ウイルスベクターの特徴

	アデノウイルスベクター	アデノ随伴ウイルスベクター	レンチウイルスベクター	レトロウイルスベクター
組み込み可能サイズ	—35kb	4.5kb	7—7.5kb	7—7.5kb
染色体への組み込み	なし	あり	あり	あり
非分裂細胞への遺伝子導入	可能	可能	可能	不可能
発現の持続性	短い	長い	長い	短い
安全性での問題	免疫原性	少ない	遺伝子挿入による遺伝子変異	遺伝子挿入による遺伝子変異

4. 問題点

shRNA 発現ウイルスベクターの *in vivo* への投与にあたり主に3つの段階での副作用が予想される。第1は shRNA のデリバリーに用いるウイルスベクター自体の免疫原性の問題であり、第2は発現させた shRNA 自身による副作用で、これにはインターフェロン誘導と過剰な shRNA による細胞毒性の問題がある。第3は shRNA による標的遺伝子以外の遺伝子の発現抑制、つまり off-target 効果の問題である。ここでは shRNA 固有の問題点であるインターフェロン誘導と shRNA 毒性に関して紹介する。

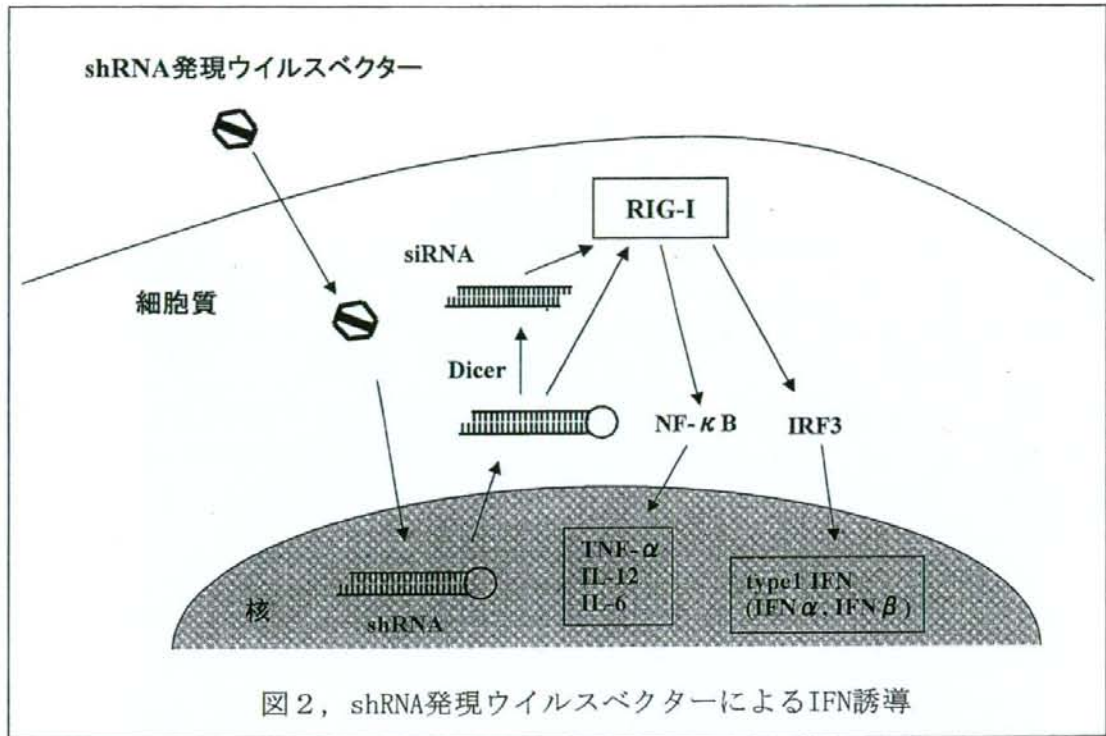
a, インターフェロン誘導

哺乳動物系では、30塩基を超える長さの2本鎖RNAの細胞内への導入はインターフェロン(IFN)応答遺伝子であるPKR(dsRNA-dependent protein kinase)やOAS(2' 5' -oligosynthetase)を活性化する結果、非特異的な翻訳抑制やRNAの分解を引き起こし、細胞障害をもたらしてしまうためRNAiの利用の大きな妨げとなっていた。しかし2001年にブレークスルーがあり、RNAi機構の中間産物である21塩基長の短いRNA(siRNA)を直接用いることでこれらのIFN応答を回避し、RNAi効果の特異的に得ることが可能となった²⁷⁾、と従来考えられてきた。

ところが、そのような短い2本鎖RNAでも *in vitro*、さらに *in vivo* においてもIFN応答を誘導することが相次いで報告された^{28,29)}。shRNA発現ベクターの場合には、培養細胞へのshRNAのDNA発現ベクター、レンチウイルスベクターを用いた導入系においてIFN応答を誘導し得るという報告³⁰⁾がある一方、shRNA発現レンチウイルスベクターをCD34+の免疫細胞に導入した際にはIFN応答が

起こらなかったことが報告されており³¹⁾、見解には相違がある。細胞が短い2本鎖RNAを感知し免疫応答を誘導する機構には2種類知られており、1つはエンドソーム内のToll-like receptor (TLR)を介する経路³²⁾、もう1つは細胞質内のretinoic acid inducible gene I (RIG-I)を介する経路³³⁾により認識されIFN応答が誘導される。shRNA発現ベクターを用いた場合には、エンドソームを経由しないでshRNAが細胞内に発現してsiRNAが生成されると予想されることからTLRの活性化が回避できると考えられる。ベクターを利用したshRNA発現系でのIFN応答は、細胞内に発現したshRNAもしくはshRNAから生成されるsiRNAが細胞質内のRIG-Iにより認識されて誘導されるものと推察される(図2)。

RIG-Iは、細胞質内でのウイルスの侵入を察知する分子として近年発見され、ウイルス感染後、ウイルスの複製過程でできる2本鎖RNAを認識しIFNを誘導する³³⁾。また、最近では、5'末端の三リン酸化されたRNAがRIG-Iのリガンドになることが報告された³⁴⁾。pol III系プロモーターにより転写されたshRNAの5'末端は三リン酸化されておりRIG-Iを活性化し、IFNを誘導する恐れがある。そこで、IFN応答を回避する方法としてpol II系プロモーターを用いてshRNAを発現させれば、その転写物は5'末端にキャップ構造を持つためRIG-Iの活性化を防げる可能性が期待できる。



b, shRNA 毒性

shRNA 発現 AAV ベクターを経静脈的にマウスに全身性投与する実験系において致死的な肝障害が認められたという報告が 2006 年になされた³⁵⁾。この肝障害には配列依存性はなく、導入した shRNA の発現量との間に相関が認められ、障害を受けた肝臓では複数の miRNA の発現が低下していた。また、最近 shRNA 発現 AAV ベクターをマウス脳実質内に局所注入した場合でも細胞障害を生じることが報告された¹⁷⁾。

ほ乳動物において、miRNA の前駆体(pre-miRNA)と shRNA は exportin-5 という共通の担体を通じて核から細胞質へ移行するため、核内に過剰に発現した shRNA が exportin-5 による pre-miRNA の細胞質への移行を競合的に阻害する結果 miRNA へのプロセスが障害され、肝毒性に関与したことが示唆された³⁵⁾ (図 3)。我々も shRNA 発現 AAV8 型ベクターのマウスへの全身性投与により過剰な shRNA を発現した場合には、血中で肝逸脱酵素が著明に上昇し、組織学的に肝細胞の腫大化・巣状壊死が認められるなど重篤な肝障害が生じることを確認している。また、shRNA 発現 AAV2 型ベクターのマウス脳実質内への局所投与で注入部位の神経細胞脱落とミクログリアの活性化などの神経毒性が認められた¹⁷⁾。

shRNA 毒性の機序の詳細は明らかでないが、過剰な shRNA の発現は細胞毒性を誘導する可能性があるため、あえて shRNA 発現効率の悪い PoI II 系プロモーターや miRNA タイプの shRNA 発現ベクターを用い、抑制効率の優れた shRNA をデザインして有効な RNAi 効果を発揮することで、shRNA 毒性を回避できる可能性が最近示された^{12,17)}。

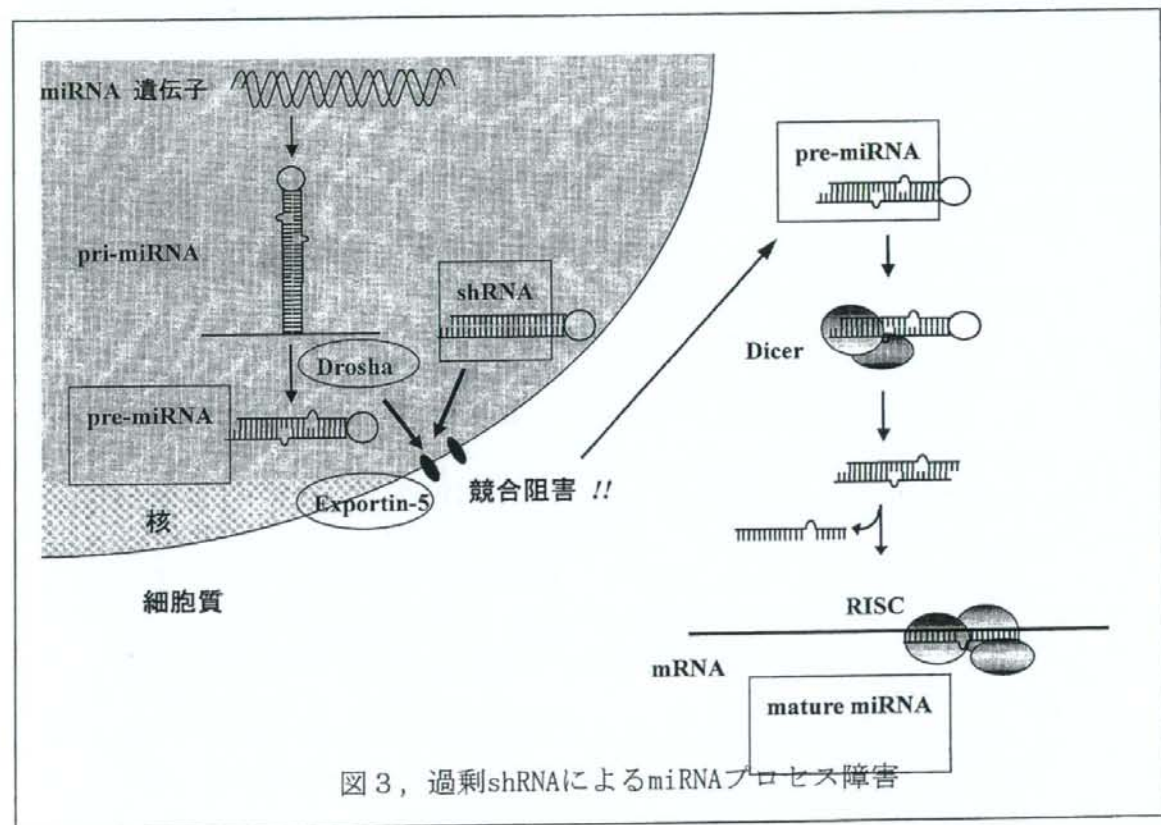


図3, 過剰shRNAによるmiRNAプロセス障害

4. おわりに

shRNA 発現ベクターにはプロモーター、shRNA 発現方式などの組み合わせに幾通りかの選択肢がある。shRNA 発現ベクターの *in vivo* でのアプローチにおいて本稿で挙げたいくつかの問題点はあるが、適切な発現様式を選択することで、それら問題点を回解決する方法も提案されてきており、今後 shRNA 発現ウイルスベクターの遺伝子治療への応用を目指した研究が発展していくことが非常に期待される。

文献

- 1) Brummelkamp, T.R., Belnards, R., Agami, R. *Science.*, 296, 550-553 (2002)
- 2) Miyagishi, M., Taira, K. *Nat. Biotech.*, 20, 497-500 (2002)
- 3) Lee, N.S., Dohjima, T., Bauer, G., Li, H., Li, M.J., Ehsani, A., Salvaterra, P., Rossi, J.J. *Nat. Biotech.*, 20, 500-505 (2002)
- 4) Paul, C.P., Good, P.D., Winer, I., Engelke, D.R. *Nat. Biotech.*, 20, 505-508 (2002)
- 5) Miyagishi, M., Sumitomo, H., Miyoshi, H., Kawakami, Y., Taira, K. *J. Gene Med.*, 6, 715-723 (2004)
- 6) Akashi, H., Miyagishi, M., Yokota, T., Watanabe, T., Hino, T., Nishina, K., Kohara, M., Taira, K. *Mol. Biosyst.*, 1, 382-390 (2005)
- 7) Watanabe, T., Sudoh, M., Miyagishi, M., Akashi, H., Arai, M., Inoue, K., Taira, K., Yoshiba, M., Kohara, M. *Gene Ther.*, 13, 883-892 (2006)
- 8) Boudreau, R.L., Monteys, A.M., Davidson, B.L. *RNA*, 14, 1834-1844 (2008)
- 9) Xia, H., Mao, Q., Paulson, H.L., Davidson, B.L. *Nat. Biotech.*, 20, 1006-1010 (2002)
- 10) Denti, M.A., Rosa, A., Standier, O., De Angelis, F.G., Bozzoni, I. *Mol. Ther.* 10, 191-199 (2004)
- 11) Unwalla, H.J., Li, H.T., Bahner, I., Li, M.J., Kohn, D., Rossi, J.J. *J. Virol.*, 80, 1863-1873 (2006)
- 12) Giering, J.C., Grimm, D., Storm, T.A., Kay, M.A. *Mol. Ther.*, 16, 1630-1636 (2008)
- 13) Zeng, Y., Wagner E.J., Cullen, B.R. *Mol. Cell.*, 9, 1327-1333 (2002)
- 14) Ely, A., Naidoo, T., Mufamadi, S., Crowther, C., Arbuthnot, P. *Mol. Ther.*, 16, 1105-1112 (2008)
- 15) Stern, P., Astrof, S., Erkeland, S.J., Schustak, J., Sharp, P.A., Hynes, R.O. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 105, 13895-13900 (2008)
- 16) Chang, K., Eledge, S.J., Hannon, G.J. *Nat. Methods.*, 3, 707-714 (2006)
- 17) McBride, J., Boudreau, R.L., Harper, S.Q., Staber, P.D., Monteys, A.M., Martins, I., Gilmore, B.L., Burstein, H., Peluso, R.W., Polisky, B., Carter, B.J., Davidson, B.L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 105, 5868-5873 (2008)
- 18) Davidson, B.L., Harper, S.Q. *Methods Mol. Biol.*, 309, 219-235 (2005)
- 19) Mccaffrey, A.P., Meuse, L., Pham, T.T., Conklin, D.S., Hannon, G.J.,

- Kay, M.A. *Nature.*, 418, 38-39 (2002)
- 20) Raper, S.E., Chirmule, N., Lee, F.S., Wivel, N.A., Bagg, A., Gao, G.P., Wilson, J.M., Batshaw, M.L. *Mol. Genet. Metab.*, 80, 148-158 (2003)
- 21) Yoo, J.Y., Kim, J.H., Kwon, Y.G., Kim, E.C., Kim, N.K., Choi, H.J., Yun, C.O. *Mol. Ther.*, 15, 295-302 (2007)
- 22) Xia, H., Mao, Q., Eliason, S.L., Martins, I.H., Orr, H.T., Paulson, H.L., Yang, L., Kotin, R.M., Davidson, B.L. *Nat. Med.*, 10, 816-820 (2004)
- 23) Chen, C.C., Ko, T.M., Ma, H.I., Wu, H.L., Xiao, X., Li, J., Chang, C.M., Wu, P.Y., Chen, C.H., Han, J.M., Yu, C.P., Jeng, K.S., Hu, C.P., Tao, M.H. *Gene Ther.*, 14, 11-19 (2007)
- 24) Qin, X-F., An, D.S., Chen, I.S.Y., Bartimore, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 100, 183-188 (2003)
- 25) Banerjea, A., Li, M.J., Bauer, G., Remling, L., Lee, N.S., Rossi, J., Akkina, R. *Mol. Ther.*, 8, 62-71 (2003)
- 26) Singer, O., Marr, R.A., Rockenstein, E., Crews, L., Coufal, N.G., Gage, F.H., Verma, I.M., Masliah, E. *Nat. Neurosci.*, 8, 1343-1349 (2005)
- 27) Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschel, T. *Nature.*, 411, 494-498 (2001)
- 28) Hornung, V., Guenther-Biller, M., Bourquin, G., Ablasser, A., Schlee, M., Uematsu, S., Noronha, A., Manoharan, M., Akira, S., Fougereolles, A., Endres, S., Hartmann, G. *Nat. Med.*, 11, 263-270 (2005)
- 29) Judge, A., Sood, V., Shaw, J.R., Fang, D., McClintock, K., MacLaclan, I. *Nat. Biotech.*, 23, 457-462 (2005)
- 30) Bridge, A.J., Pebernard, A., Ducraux, A., Nicoulaz, A.L., Iggo, R. *Nat. Genet.*, 34, 263-264 (2003)
- 31) Robbins, M.A., Li, M., Leung, I., Li, H., Boyer, D.V., Song, Y., Behlke, M.A., Rossi, J.J. *Nat. Biotech.*, 24, 566-571 (2006)
- 32) Akira, S., Takeda, K. *Nat. Rev. Immunol.*, 4, 499-511 (2004)
- 33) Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., Fujita, T. *Nat. Immunol.*, 5, 730-737 (2004)
- 34) Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzozka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K.K., Schlee, M., Endres, S., Hartmann, G. *Science.*, 314, 994-997 (2006)
- 35) Grimm, D., Streetz, K.L., Jupling, C.L., Storm, T.A., Pendey, K., Davis, C.R., Marion, P., Salazar, F., Kay, M.A. *Nature.* 25, 537-541 (2006)

RNA干渉の神経系への臨床応用*

横田 隆徳**

Key Words : siRNA, RNAi, neurodegenerative disease, delivery, vitamin E

はじめに

遺伝性神経変性疾患をはじめとして、変異遺伝子自体を short interfering RNA (siRNA) で治療するといった究極の遺伝子治療を旨とした基礎研究が進行している。RNA干渉 (RNAi) は2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2本鎖RNAはDicerと呼ばれるRNase III核酸分解酵素ファミリーによって21~24merの短い3'突出型の2本鎖のsiRNAに分解される。siRNAはDicerの結合タンパクであるTRBP (human immunodeficiency virus transacting response RNA-binding protein) によってAgonate 2 (Ago2) にリクルートされ¹⁾、RLC (RISC-loading complex) を形成する²⁾。siRNAの2本鎖のうちパッセンジャー鎖 (センス鎖) はAgo2によりその中央部で切断されて取り除かれ、ガイド鎖 (アンチセンス鎖) のみの1本鎖化が起こる。1本鎖となったsiRNAは他のいくつかの蛋白質を伴ってRISC複合体 (RNA induced silencing complex) を構成する³⁾。このRISC複合体がガイド鎖に相補的な配列を持つ標的RNAにアクセスして、その中央で分解する³⁾。しかし、哺乳動物における2本鎖RNAの導

入はPKRやRIG-Iや2' 5' oligosynthetaseの活性化による非特異的な翻訳抑制やRNAの分解を引き起こし、ホストの細胞が死んでしまうため、分子生物学的手法としても遺伝子治療の方法としても大きな妨げになっていた。しかし、2001年に、RNAi機構の中間産物であるsiRNAを合成して用いることによってこれらの副反応が回避され、効率的で特異的な遺伝子発現抑制が可能となった⁴⁾。さらに、siRNA配列を短い9merのループ配列でつないだstem型のパリンドロミックな配列であるshRNAをpol III系のプロモーター下に挿入したsiRNA発現DNAプラスミドも、ウイルスベクターやトランスジェニックマウスのトランスジェンとして用いられている⁵⁾。

I. 遺伝性神経変性疾患のRNAiによる
遺伝子治療の基本概念

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の本来のもつ機能の消失または低下する場合 (loss of function) と変異遺伝子や変異タンパクが新たに病的機能を獲得する場合 (gain of function) の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

* Clinical Application of siRNA to the Nervous System.

** 東京医科歯科大学脳神経病態学 Takanori YOKOTA : Department of Neurology and Neurological Science, Tokyo Medical and Dental University

遺伝子変異があつてはじめて発症する常染色体劣性遺伝形式の疾患の多くはloss of functionをその機序とし、一方のアリ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のタンパクは発現しているの、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)、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。我々は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、中枢神経の変異SOD1タンパクの発現を80%以上抑制することに成功した⁹⁾。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。これらの結果はsiRNAという方法で遺伝性神経変性疾患が治療可能であることを理論的に示したと考えられる。

II. 変異遺伝子特異的なRNAi法

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alphaカルシウム1Aチャネルのノックアウトマウスは生後1~2週で死亡することが知られており、正常アリルの発現抑制は新たな症状をきたす可能性が高い。したがって、優性遺伝疾患の治療には、正常アリルの発現を損わずに、変異アリルの発現のみを抑制することが望ましい。上述のように、1塩基置換の場合はsiRNAの配列の5'側から10

から13番目の塩基に変異部位を置いた場合が最も野生型SOD1の切断効率が低下する。家族性ALSの原因遺伝子であるSOD1の点変異G93Aなど、変異が1塩基の違いである点変異でも正常アリルと変異アリルの配列の差を認識して変異アリルのみを切断できるsiRNAの作製は可能である⁷⁾。同様の報告は捻転dystonia⁸⁾やfrontotemporal dementia⁹⁾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なsiRNAがデザインできるわけではない。我々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法を考案した¹⁰⁾。それは、標的原因遺伝子に最も有効なshRNAで変異および野生型の両アリルを抑制して、同時にそのshRNAでできないようにデザインし、かつアミノ酸は配列が不変であるcDNAで野生型タンパクを補うというものである。その*in vivo*での有効性をマウスの掛け合わせ実験により示した。

III. 孤発性神経変性疾患への応用

ほとんどのAlzheimer病、Parkinson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。たとえば、Alzheimer病の β セクレターゼは有望な標的分子である。Alzheimer病のモデル動物は $A\beta$ 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、認知障害も軽減し得たと報告されている。 $A\beta$ 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な異常を示さない。我々もBACE1に対するsiRNAを作製して、培養細胞系で $A\beta$ 産生を抑制できることを示した (Fig. 1)。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知れない。最近、BACE1に対するsiRNAを発現するレンチウイルスをスウェーデン型変異APPを過剰発現させたトランスジェニック

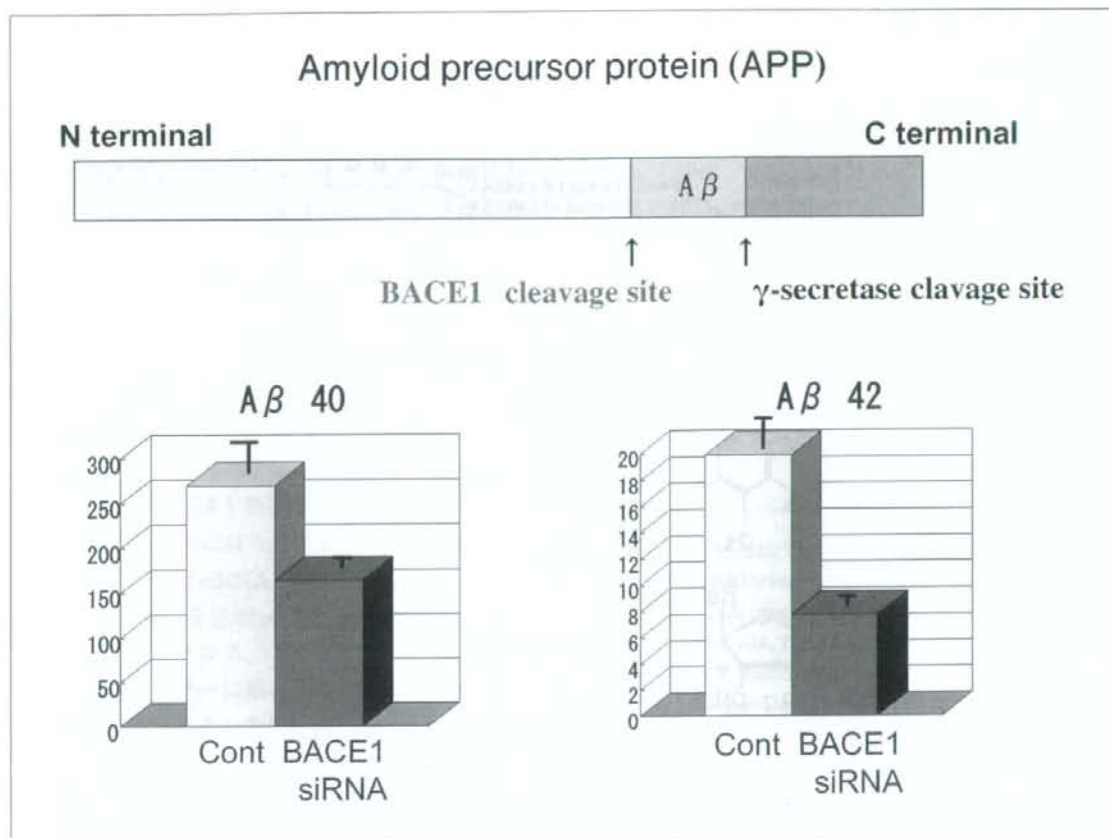


Fig. 1 siRNA intervention to sporadic Alzheimer disease

The siRNA to BACE1 suppressed the secretion of Aβ from APP-stably transfected culture cells to the medium.

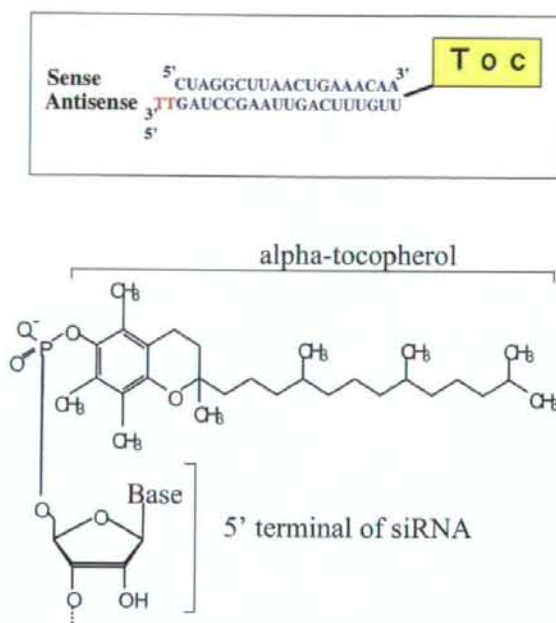
クマウスの海馬に直接注入して、老人斑の沈着を減少させ、認知機能障害を改善させたとの報告がなされた¹¹⁾。また、他の基質への影響なくγセクレターゼ機能を低下させる可能性のあるAPPアダプター分子X11aαとX11aβをターゲットとしたsiRNAでAβ産生を抑制できる可能性や、ミクログリアの活性化をcathepsin Bに対するsiRNAで抑制し、神経細胞毒性を軽減したとの報告もされている。

IV. siRNAの*in vivo*へのデリバリー

通常静脈内の全身投与方法で、合成siRNAを疎水性でプラスに荷電したカチオンリポソームに包み込むことにより、特になん細胞において比較的容易に合成siRNAを導入させることが可能である。ただ、近年siRNA/カチオンリポ

ソーム複合体は1型インターフェロンやTNFαやIL-6などのサイトカインを誘導することが判明して、副作用や非特異的な発現抑制効果の原因になりうる可能性が問題になっている^{12,13)}。siRNA/カチオンリポソーム複合体が細胞に導入される際に、複合体がまず細胞のエンドゾームに取り込まれ、エンドゾーム内に発現しているtoll-like受容体を介してインターフェロン誘導がされることが判明している。siRNA/カチオンリポソーム複合体によるインターフェロンは配列依存적であり、その明確な法則は明らかでないが、これを回避する方法として、siRNAへの種々の化学修飾が試みられている¹⁴⁾。我々は、従来のカチオンリポソームではこれらが化学合成脂質であり、その化学的(疎水性)な特性によって*in vivo*のデリバリーをしようとした場合、化学合成脂質は

a



b

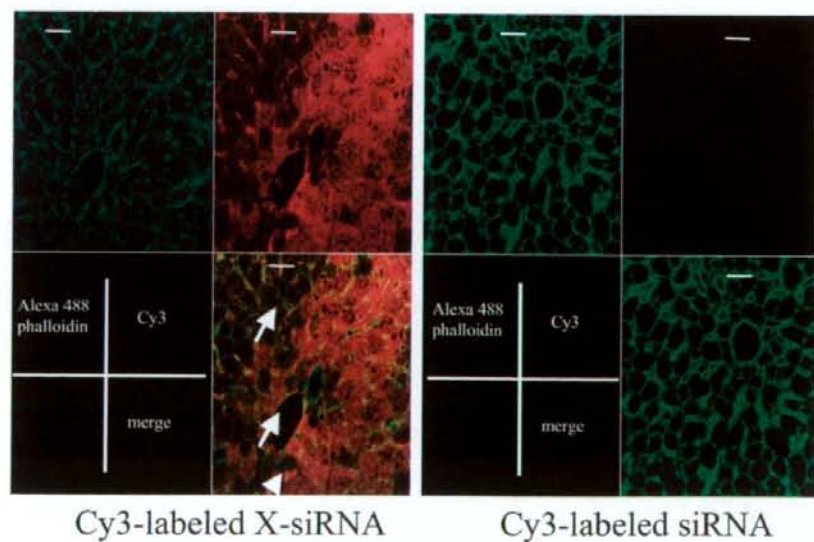


Fig. 2 Vitamin E-conjugated siRNA

a Chemical structure of vitamin E-conjugated siRNA

b Confocal imaging of liver after intravenous administration of Cy3-labelled vitamin E-conjugated siRNA (red).

生体から外来性物質として認識され、副作用の原因となる点に問題があると考えた。そこで、デリバリーのリガンドとして内因性の分子を用いて、生体内の生理学的な経路を利用することにした。この趣旨において最適なキャリアーは生体内に必須であるが、生体内で合成することができないビタミンEが有望で、大量投与でも副作用のないビタミンEを選択した。我々はsiRNAのアンチセンス鎖の5'末端に活性基を漬したビタミンE¹⁶⁾を直接共有結合させた。この新規のベクターを用いて、静脈投与による全身投与にて肝臓の内因性遺伝子を有効な抑制に成功した (Fig. 2)。現在この有効性の生理学的な経路を応用して中枢神経への新しいデリバリー方法を開発している。

長期の抑制効果にはウイルスベクターが必要となる。ヘアピン型siRNA発現ベクターコンストラクト (shRNA) をアデノウイルスやレンチウイルス、レトロウイルス、アデノ随伴ウイルスなどのウイルスベクターに組み込んで作製したsiRNA発現ウイルスベクターを用いて、*in vivo*の細胞へのsiRNA導入の報告が次々とされている¹⁶⁾。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。しかし、最近、AAV-8を用いたshRNAの全身投与にて、遅発性の致死的な重篤な肝障害があると報告された¹⁷⁾。この肝障害は導入したsiRNAの発現量に依存し、複数の異なる標的遺伝子に対するshRNAにおいて生じており、複数のmicroRNA (miRNA) の低下を伴っていた。これは細胞内でshRNAと内因性のmiRNAの前駆体であるpre-miRNAが共通のプロセス機構であって、核から細胞質への移行タンパクであるexportin-5をshRNAが競合することにより、miRNAの成熟化プロセスが障害されて成熟miRNAが低下するためと考察されている。我々もマウスにおいて同様の肝障害を経験しており、今後のshRNA発現ベクターを用いた遺伝子治療の問題になる可能性がある。

おわりに

RNA干渉の基礎研究は順調に進んでおり、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。RNA干渉の基本特許は米国のバイオ

ベンチャー企業のアルナイラム (Alnylam) 社が保有しており、siRNAの製剤化に各国におけるRNA干渉の基本特許の扱いが決定しておらず、一般製薬会社がこの分野に進出する大きな障害になっていた。2008年6月に武田薬品は、siRNAの基本特許と販売権をアルナイラム社から1億ドルで購入し、その半月後に協和発酵もアルナイラム社の抗ウイルスsiRNAの販売権を獲得するなど、いよいよ日本においても本格的にsiRNAの製剤化が始まった。この流れが加速して近い将来に、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。

文 献

- 1) Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E et al: TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436: 740-744, 2005
- 2) Tomari Y, Zamore PD: Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev* 19: 517-529, 2005
- 3) Rand TA et al: Argonaute 2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* 123: 621-629, 2005
- 4) Elbashir S, Harborth J, Lendeckel W et al: Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494-498, 2001
- 5) Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R: A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 29: 550-553, 2002
- 6) Saito Y, Yokota T, Mitani T et al: Transgenic siRNA halted amyotrophic lateral sclerosis in a mouse model. *J Biol Chem* 280: 42826-42830, 2005
- 7) 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
- 8) Gonzalez-Alegre P, Bode N et al: Silencing primary dystonia: lentiviral-mediated RNA interference therapy for DYT1 dystonia. *J Neurosci* 25: 10502-10509, 2005
- 9) Miller VM, Xia H, Marrs GL et al: Allele-specific silencing of dominant disease genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 7195-7200, 2003
- 10) Kubodera T, Yokota T, Ishikawa K et al: New

- RNAi strategy for selective suppression of mutant allele in polyglutamine disease. *Oligonucleotides* 15 : 298-302, 2005
- 11) Singer O, Marr RA, Rockenstein E et al : Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model. *Nat Neurosci* 8 : 1343-1349, 2005
 - 12) Judge AD, Sood V, Shaw JR et al : Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol* 23 : 457-462, 2005
 - 13) Yokota T, Iijima S, Kubodera T et al : Efficient regulation of viral replication by siRNA in a non-human primate surrogate model for hepatitis C. *Biochem Biophys Res Com* 361 : 294-300, 2007
 - 14) Morrissey DV, Lockridge JA, Shaw L et al : Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat Biotechnol* 23 : 1002-1007, 2005
 - 15) Nishina K, Unno T, Uno Y et al : Efficient *In Vivo* delivery of siRNA to liver by conjugation of α -tocopherol. *Mol Ther* 16 : 734-740, 2008
 - 16) Davidson BL, Harper SQ : Viral delivery of recombinant short hairpin RNAs. *Methods Enzymol* 392 : 145-173, 2005
 - 17) Grimm D, Streetz KL, Jopling CL et al : Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 441 : 537-541, 2006

Clinical Application of siRNA to the Nervous System

Takanori YOKOTA

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

RNA interference (RNAi) is the process of sequence-specific, post-transcriptional gene silencing, initiated by double-stranded RNA (dsRNA). The gene therapy for familial neurodegenerative diseases with siRNA has been started and showed promising results in the model mice. There is a recent progress in the delivery of

siRNA to the central nervous system, such as our vitamin E-conjugated siRNA. There are still important problems for application of gene therapy including off-target or immunostimulatory effects of siRNA and miRNA suppression, but a rapid progress can be expected because of its extremely high efficiency of siRNA.

家族性筋萎縮性側索硬化症のRNA干渉を用いた遺伝子治療*

横田 隆徳**

Key Words : siRNA, shRNA, SOD1, gene therapy, RNAi

はじめに

RNA干渉 (RNAi) は2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。RNAiはいかなる遺伝子に対してデザインできて、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^{3-7} 倍、リボザイムの 10^{2-5} (自験) 高いと言われている。しかもその配列特異性も高く1塩基の違いの認識も可能であり、医療分野における臨床応用についてはその発見当初から大きく期待されていた。siRNAを用いた遺伝子治療の研究はすでにウイルス性疾患、悪性腫瘍などで急速に進んでいる。ここでは、ALSへのsiRNAおよびshort hairpin RNA (shRNA)の核酸医薬としての開発の研究現状と問題点について概説する。

I. RNA干渉とは

長い2本鎖RNAによって誘導される遺伝子発現抑制であるRNAi現象は植物から昆虫、哺乳動物にいたるまで広く保存して観察され、元来真核細胞に備わった抗ウイルス機構として知られていた。細胞内に導入された2本鎖RNAはDicerと呼ばれるRNase III核酸分解酵素ファミリーによ

て21~24merの短い3'突出型の2本鎖のsiRNAに分解される。siRNAはDicerの結合タンパクであるTRBP (human immunodeficiency virus transacting response RNA-binding protein) によってAgonaute2 (Ago2) にリクルートされ¹⁾、RLC (RISC-loading complex) を形成する²⁾。siRNAの2本鎖のうちパッセンジャー鎖 (センス鎖) はAgo2によりその中央部で切断されて取り除かれ、ガイド鎖 (アンチセンス鎖) のみの1本鎖化が起こる。1本鎖となったsiRNAは他のいくつかのタンパク質を伴ってRNAタンパク質複合体であるRISC複合体 (RNA induced silencing complex) を構成する³⁾。このRISC複合体がガイド鎖に相補的な配列を持つ標的RNAにアクセスして、その中央で分解する³⁾。しかし、哺乳動物における2本鎖RNAの導入はPKRやRIG-Iや2'5' oligosynthetaseの活性化による非特異的な翻訳抑制やRNAの分解を引き起こし、ホストの細胞が死んでしまうため、分子生物学的手法としても遺伝子治療の方法としても大きな妨げになっていた。しかし、2001年に、RNAi機構の中間産物であるsiRNAを合成して用いることによってこれらの副反応が回避され、効率的で特異的な遺伝子発現抑制が可能となった⁴⁾。さらに、siRNA配列を短い9merのループ配列でつないだstem型の

* Gene Therapy with siRNA to Familial ALS.

** 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科脳神経機能病態 (神経内科) Takanori Yokota : Department of Neurology and Neurological Science, Tokyo Medical and Dental University

パリンドロミックな配列である shRNA を pol III 系のプロモーター下に挿入した siRNA 発現 DNA プラスミドも開発され、ウイルスベクターやトランスジェニックマウスのトランスジーンとして定常的な長期の発現に用いられている⁹⁾。

II. 遺伝性神経変性疾患の RNAi による 遺伝子治療の基本概念

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の本来のもつ機能の消失または低下する場合 (loss of function) と変異遺伝子や変異タンパクが新たに病的機能を獲得する場合 (gain of function) の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つ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タンパクは発現しているため、本来のタンパクの機能の影響は少ないか全くなく、変異アレ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 (amyotrophic lateral sclerosis: 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。ただし、近年発見された家族性 ALS の遺伝子である angiogenin¹⁰⁾ は常染色体優性遺伝性だが、変異タンパクの活性低下が原因とされる haplotype insufficiency がその機序として考えられ、

上記の戦略はあてはまらない。

III. SOD1 による家族性 ALS モデルマウスを用いた RNAi による遺伝子治療

以下に述べるように、siRNA の中枢神経へのデリバリーは容易でないため、まず RNAi という新しい戦略で本当に ALS が治療可能であるかどうかを検証する目的で、我々は siRNA を全身で発現させた siRNA 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てその治療効果を検討した⁷⁾。siRNA トランスジェニックマウスのトランスジーンを Fig. 1A 示す。短い RNA の転写の能力に優れた Pol III 系の U6 プロモーターの下流に sense 配列とパリンドロミックな antisense 配列を 9塩基の hinge 配列で結合させた short hairpin 型の SOD1 に対する siRNA を過剰に発現するベクターを作製した。sense 配列には複製に際して配列を安定させるために mismatch mutation を挿入した。この shRNA 発現断片を ES 細胞に導入して、50 の ES 細胞クローンから Western blot によって ES 細胞の内因性の SOD1 タンパクの発現が最も抑制されたクローンを選択して、それを B6 マウスの blastocyst に microinjection してキメラマウスを作製した。これを B6 と交配させて F1 トランスジェニックマウスを作製した。このマウスは中枢神経において siRNA のアンチセンス鎖 (ガイド鎖) の発現を確認し、内因性 SOD1 の発現を 80% 以上抑制することに成功した。

この SOD1 siRNA トランスジェニックマウスを G93A 変異 SOD1 トランスジェニックマウスと掛け合わせ、中枢神経の変異 SOD1 タンパクの発現を 80% 以上抑制することに成功した (Fig. 1B)。G93A 変異 SOD1 トランスジェニックマウスは全例 160 日以内に死亡するが、この siRNA 効果により、掛け合わせマウスの ALS 症状の発症は 500 日以上抑制され、発症後の病勢の進行も 2 倍以上に遅延していた^{7,8)} (Fig. 1C)。これらの結果は siRNA という方法で家族性 ALS が治療可能であることを理論的に示したと考えられる。