

Fig. 1 Transgenic siRNA delayed the ALS phenotype in the mice model (ref 7, 8)

By crossing siRNA-overexpressing transgenic mouse with SOD1^{G93A} transgenic mouse, mutant SOD1 protein was reduced to express by about 80% (A). All SOD1^{G93A} transgenic mouse died of muscle weakness before 160 days old, but crossed mice survive even more than 500 days old (B), and the duration of the disease was prolonged (C).

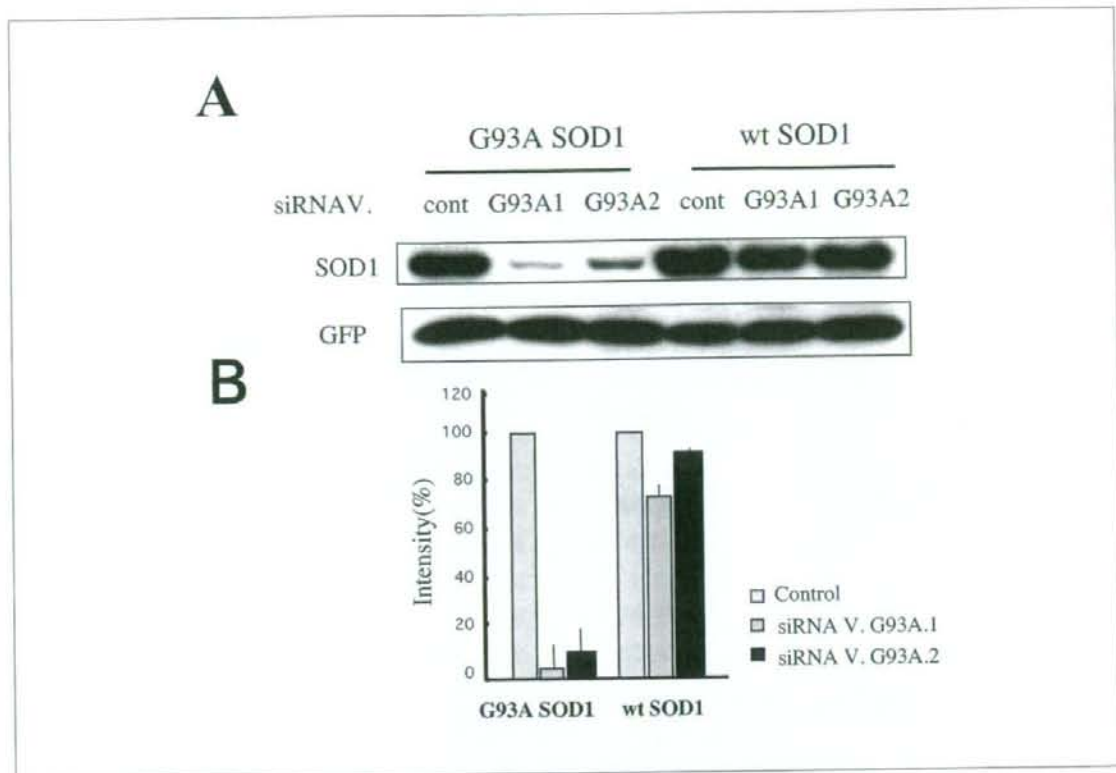


Fig. 2 siRNA specific for mutant SOD1 (ref 10)

Effect of siRNA G93A.1 and 2, on G93A and wild-type SOD1 proteins expressed in 293T cells as detected by Western blotting (A). B shows the percentages of band intensity with siRNAG93A.1 with respect to that with each mock transfection. siRNA G93A. 2 is more specific for cleaving G93A SOD1 RNA. Values are the mean and SEM.

IV. 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が、脂肪肝の副作用が知られており⁹⁾、例えばSCA6の場合、その原因遺伝子alphaカルシウム1Aチャンネルのノックアウトマウスは生後1~2週で死亡するなど、正常アレ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、正常アレルの発現を損わずに、変異アレルの発現のみを抑制することが望ましい。SOA1変異のように1塩基の違いである点変異でも正常アレルと変異アレルの配列の差を認識して変異アレルのみを切断できるsiRNAのデザインはある程度は可能である。G93A SOD1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の切断効率が低下した¹⁰⁾。最近の

バイオインフォマティクス解析ではガイド鎖の5'から10塩基目および16塩基目で、特にプリン:プリン (GA) ミスマッチが最も効果的と報告されている¹¹⁾。実際に我々が作製したG93A SOD1の点変異 (G>C) を認識して変異アレルを選択的に切断して正常アレルにはほとんど影響しないsiRNAの例を示す (Fig. 2)¹⁰⁾。しかし、SOD1遺伝子変異による家族性筋萎縮性側索硬化症などではその点変異が100種類以上知られており、そのすべての変異に対し特異的かつ効率の良いsiRNAをデザインすることは困難である。そこで、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。それは、野生型および変異型、両者のアレルの発現を効率の良いsiRNAで抑制すると同時にそのsiRNAで切断されないようにエンジニアした野生型遺伝子で野生型タンパクを補おうという方法で、その有効性を

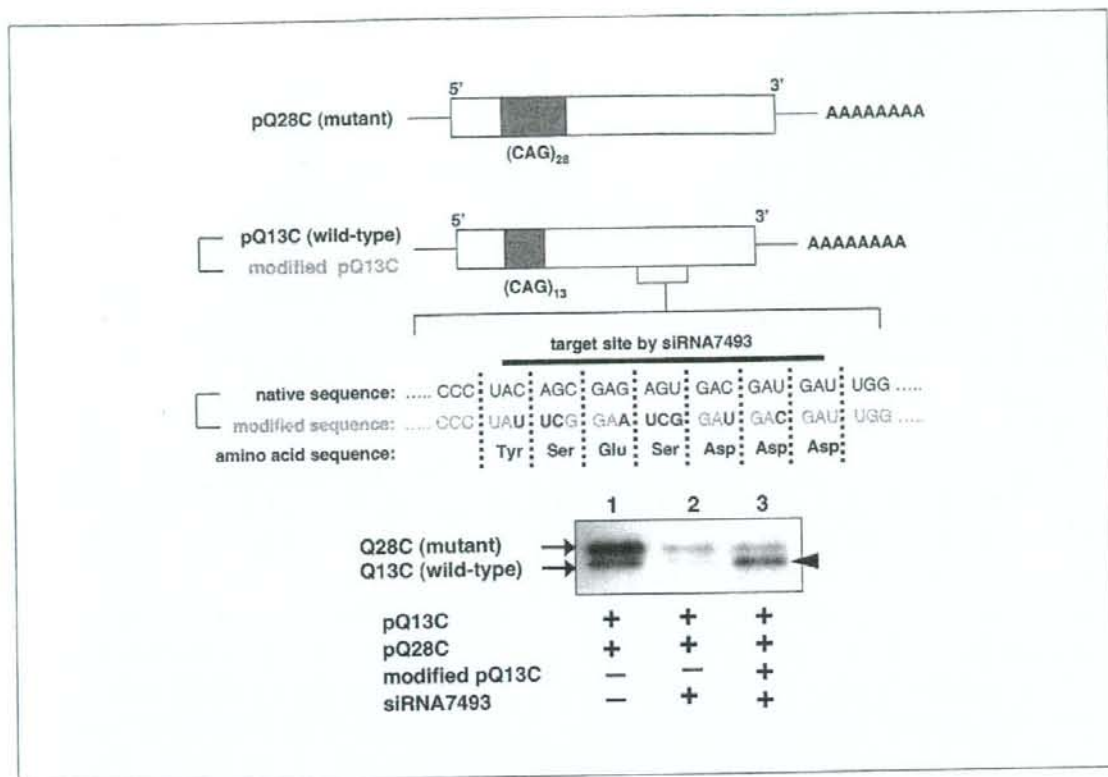


Fig. 3 Schema of mRNAs transcribed by expression plasmids of truncated CACNA1A RNA sequence around the target site of siRNA7493 is shown in the lower part of the panel. The bold bar indicates the targeted sequence by siRNA7493. Blue characters are RNA nucleotides that are mutated from the wild-type. There is no change in amino acid sequences expressed by pQ13C and modified pQ13C.

神経変性疾患の一つであるポリグルタミン病を対象に証明した¹⁵⁾ (Fig. 3).

V. siRNAのin vivoへのデリバリー

1. siRNA発現ウイルスベクター

ALSなどの神経変性疾患の治療にはRNAiの年単位の長期に渡る効果が必要であり、それにはウイルスベクターが必要となる。siRNA発現ベクターコンストラクト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¹⁵⁾。

特にレンチウイルスとアデノ随伴ウイルスは神経細胞にも高効率に導入できてしかも長期の遺伝子発現効果が期待できるため有望である。レンチウイルスによるSOD1に対するshRNA発現ベク

ターを変異SOD1トランスジェニックマウスの脊髄に直接注入したり、骨格筋に注入して運動ニューロンに逆行性にレンチウイルスを輸送してshRNAを発現させてG93A変異SOD1トランスジェニックマウスの発症を遅延させたとの報告もなされた^{16, 17)}。同様にアデノ随伴ウイルスによりshRNA発現ベクターを骨格筋に注入して、当該筋肉の筋力低下を抑制したとの報告もされた¹⁸⁾。アデノ随伴ウイルスはParkinson病を中心にすでに患者さんで実際の臨床応用が始まっており¹⁹⁾、shRNA発現AAVを用いた中枢神経への遺伝子治療は現実の段階に入ってきた。

しかし、最近AAV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の重要な報告がなされた²⁰⁾。この肝障害は導入したsiRNAの発現量に依存し、複数の異なった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やAgo2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。

2. siRNA核酸の脳室内投与

化学修飾した合成siRNAを直接の脳室内に1~2週間持続注入することによって脳室の表層に近い海馬や大脳基底核においての標的遺伝子の発現を50%程度抑制したとの報告がなされ²¹⁾、注目されている。siRNAをカチオンリポソームに包埋して同様に長期脳室内持続注入して、脊髄、後根神経節や視床下部などにおいて有効に導入に成功したとの報告もある^{22, 23)}。SOD1に対するアンチセンス核酸を脳室に持続投与して変異SOD1トランスジェニックラットを治療したとの報告もされたが²⁴⁾、アンチセンス核酸の脳室投与による有効性については議論がある。

3. 抗体や細胞導入シグナルペプチドを利用した新しいsiRNAのデリバリー

siRNAのデリバリー方法として抗体²⁵⁾やRNAアプタマー²⁶⁾をsiRNA結合させて、導入細胞の受容体を介したsiRNAの新しいデリバリーも報告されている。しかし、これらのいずれの方法でも静脈注射でsiRNAが脳血管関門を越えて中枢神経系にデリバリーすることは容易でない。血液脳関門を通過するようにするためにトランスフェリン受容体に対するモノクローナル抗体や、神経細胞に導入するためにインスリンに対するモノクローナル抗体を結合させたペグ化免疫リポソームを作成して、全身投与することにより神経細胞へ導入させようとする試みも始まっている²⁷⁾。

神経細胞へ導入するため細胞導入シグナルペプチドの利用も研究されてきたが²⁸⁾、ごく最近に重要な報告がされた。狂犬病ウイルスの糖タンパクからデザインした29アミノ酸からなるペプチドに9つのアルギニン結合させ(RVG-9R)、これとsiRNAとで複合体を作製して、静脈投与

により脳血管関門を越えて、脳内のSOD1の発現を50%程度抑制したという²⁹⁾。狂犬病ウイルスは脳血管内皮や神経細胞に発現しているニコチンアセチルコリン受容体の $\alpha 7$ サブユニットに結合して受容体介在性トランスサイトシスによって脳内に運ばれ神経細胞にデリバリーしたと考えている。その明確な輸送経路や脳内局在が明らかになり、詳細な副作用の評価ができれば有効な投与量がsiRNA量で1~2mg/kgと比較的低容量であることから、今後の臨床応用へ将来性が期待される。

VI. off-target効果

siRNAは確かに標的遺伝子に対する配列特異性は高いが、用いるsiRNAが21塩基と短い部分に部分的に相同性のある別の遺伝子の発現まで抑制されてしまう可能性がある。この現象はoff-target効果と呼ばれており、siRNAを臨床応用する際にはsiRNAの発見当初からある大きな問題である。off-target効果には濃度依存性がみられるために、できるだけ投与量を最小限に抑える必要があることは言うまでもないが、理論的なoff-target回避方法が模索されている。

Jacksonら³⁰⁾の検討では、通常19塩基中15塩基以上で、最低では11塩基の相同性のある遺伝子において影響があったと報告された。また、最近のバイオインフォマティクス解析でoff-target効果を受ける遺伝子群は3'側の非翻訳領域に相同性を多く認める傾向があることが明らかとなった^{31, 32)}。これは標的遺伝子の3'側の非翻訳領域に結合しその発現を抑制するmicroRNAの作用機序に類似しており、siRNAのガイド鎖の5'から2塩基目~8塩基目の7塩基(microRNAのseed領域に相当)(Fig. 1)が3'側のUTRに相同性をもつ遺伝子に影響を及ぼすことによる。

off-target効果を回避するには、ホモロジー検索で3'側UTRにこのseed領域の塩基配列に相同性をもつ遺伝子が存在しないsiRNA配列を選択することが望ましい。しかし、seed領域は7塩基と短いため、この配列だけでsiRNAに特異性および有効性を保たせるのは非常に困難である。最近、off-target効果を回避する新たな手法としてガイド鎖のseed領域のヌクレオチドに対する化学修飾の有用性が報告された³³⁾。とりわけ、5'か

ら2塩基目の2'-O-メチル化がoff-target効果の抑制に効果的とされる。これは、結晶構造の解析からこの部位の修飾によりRISCとmRNAとの結合が不安定となるために、target遺伝子の抑制効果は保ちつつoff-target遺伝子の発現抑制がなくなると考えられている。

おわりに

siRNAの核酸医薬としての臨床応用の研究には、shRNA毒性、off-target効果など解決すべき課題はまだ多くあるが、その潜在能力は計り知れないものがある。それがゆえ、その基礎研究は爆発的に進んでおり、最も大きな問題である中枢神経へのデリバリー方法にも大きな進歩がある。Parkinson病でAAVによる遺伝子治療はヒトで始まっており、AAVによるshRNAを用いたSOD1変異家族性ALSの遺伝子治療は現実性がある。さらに、非ウイルス性ベクターの進歩から比較的近い将来にALSでの新しい治療法の開発にsiRNAの利用が突破口になることを期待している。

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) Matranga C, Tomari Y, Shin C et al : Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* 123 : 607-620, 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) Greenway MJ, Andersen PM, Russ C et al : ANG mutations segregate with familial and 'sporadic' amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 38 : 411-413, 2006
- 7) Saito Y, Yokota T, Mitani T et al : Transgenic small interfering RNA halts amyotrophic lateral sclerosis in a mouse model. *J Biol Chem* 280 : 42826-42830, 2005
- 8) Yokota T, Sasaguri H, Saito Y et al : Increase of disease duration of amyotrophic lateral sclerosis in a mouse model by transgenic small interfering RNA. *Arch Neurol* 64 : 145-146, 2007
- 9) Uchiyama S, Shimizu T, Shirasawa T : CuZn-SOD deficiency causes ApoB degradation and induces hepatic lipid accumulation by impaired lipoprotein secretion in mice. *J Biol Chem* 281 : 31713-31719, 2006
- 10) 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
- 11) Schwartz DS, Ding H, Kennington L et al : Designing siRNA that distinguish between genes that differ by a single nucleotide. *PLoS Genetics* 446 : 864-865, 2006
- 12) Kubodera T, Yokota T, Ishikawa K, Mizusawa H : New RNAi strategy for selective suppression of a mutant allele in polyglutamine disease. *Oligonucleotides* 15 : 298-302, 2005
- 13) 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
- 14) Li M, Ona VO, Guegan C et al : Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model. *Science* 288 : 335-339, 2000
- 15) Davidson BL, Harper SQ : Viral delivery of recombinant short hairpin RNAs. *Methods Enzymol* 392 : 145-173, 2005
- 16) Ralph GS, Radcliffe PA, Day DM et al : Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nat Med* 11 : 429-433, 2005
- 17) Raoul C, Abbas-Terki T, Bensadoun JC et al : Lentiviral-mediated silencing of SOD1 through RNA interference retards disease onset and progression in a mouse model of ALS. *Nat Med* 11 : 423-428, 2005
- 18) Miller TM, Kaspar BK, Kops GJ et al : Virus-delivered small RNA silencing sustains strength in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 57 : 773-776, 2005
- 19) Kaplitt MG, Feigin A, Tang C et al : Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease : an open label, phase I trial. *Lancet* 369 :

2056-2058, 2007

- 20) 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
- 21) Thakker DR, Natt F, Husken D et al : Neurochemical and behavioral consequences of widespread gene knockdown in the adult mouse brain using nonviral RNA interference. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 : 17270-17275, 2004
- 22) Guissouma H, Froidevaux MS, Hassani Z et al : In vivo siRNA delivery to the mouse hypothalamus confirms distinct roles of TR beta isoforms in regulating TRH transcription. *Neurosci Lett* 406 : 240-243, 2006
- 23) Luo MC, Zhang DQ, Ma SW et al : An efficient intrathecal delivery of small interfering RNA to the spinal cord and peripheral neurons. *Mol Pain* 1 : 1-8, 2005
- 24) Smith RA, Miller TM, Yamanaka K et al : Antisense oligonucleotide therapy for neurodegenerative disease. *J Clin Invest* 116 : 2290-2296, 2006
- 25) Song E, Zhu P, Lee SK et al : Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat Biotechnol* 23 : 709-717, 2005
- 26) MacNamara JO, Andrechek ER, Wang Y et al : Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. *Nat Biotechnol* 24 : 1005-1015, 2006
- 27) Zhang Y, Zhang YF, Bryant J et al : Intravenous RNA interference gene therapy targeting the human epidermal growth factor receptor prolongs survival in intracranial brain cancer. *Clin Cancer Res* 10 : 3667-3677, 2004
- 28) Davidson TJ, Harel S, Arboleda VA et al : Highly efficient small interfering RNA delivery to primary mammalian neurons induces MicroRNA-like effects before mRNA degradation. *J Neurosci* 24 : 10040-10046, 2004
- 29) Kumar P, Wu H, McBride JL et al : Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature* 448 : 39-43, 2007
- 30) Jackson AL, Bartz SR, Schelter J et al : Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 21 : 635-637, 2003
- 31) Birmingham A, Anderson EM, Reynolds A et al : 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nat Methods* 3 : 199-204, 2006
- 32) Jackson AL, Burchard J, Schelter J et al : Widespread siRNA "off-target" transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *RNA* 12 : 1179-1187, 2006
- 33) Jackson AL, Burchard J, Leake D et al : Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing. *RNA* 12 : 1197-1205, 2006

Gene Therapy with siRNA to Familial ALS

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 silencing therapy with siRNA is a promising strategy to autosomal dominant diseases, such as familial ALS with SOD1. Transgenic siRNA markedly delayed ALS phenotype in the model mice, indicating the proof of principle of this strategy. There is a recent progress in the delivery of siRNA to the central nervous system. Especially adeno-associated virus is safe and long-lasting delivery method to neurons.

There are still important problems for application of gene therapy including off-target effect and short-hairpin RNA toxicity including processing impairment of microRNA. Moreover, non-viral delivery of siRNA is needed to develop actual application of siRNA gene therapy, and there is a rapid progress in field, using receptor-mediated transfer with antibody and aptamers. There are still important problems including off-target effect and gene delivery of siRNA, but it is not a fairy tale to apply gene therapy with siRNA to familial ALS patients.