

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tao O, Shimazaki T, Okada Y, Naka H, Khoda K, Yuzaki M, Mizusawa H, Okano H	Efficient Generation of Mature Cerebellar Purkinje Cells From Mouse Embryonic Stem Cells	J. Neuroscience Research	88	234-247	2010
Kobayashi Z, Tsuchiya K, Takahashi M, Yokota O, Taki K, Ishizu H, Arai T, Akiyama H, Mizusawa H	Case Report Morel's laminar sclerosis showing apraxia of speech: Distribution of cortical lesions in an autopsy case	2009 Japanese Society of Neuropathology	30	76-83	2010
Tetsumi T, Ishikawa K, Tsukui K, Kitamura K, Mizusawa H	The effect of 3,4-diaminopyridine on the patients with hereditary pure cerebellar ataxia.	J. Neurol. Sci.	292(1-2)	81-84	2010
Nishida Y, Ito S, Ohtsuki S, Yamamoto N, Takahashi T, Iwata N, Jishage K, Yamada H, Sasaguri H, Yokota S, Piao W, Tomimitsu H, Saido T C, Yanagisawa K, Terasaki T, Mizusawa H, Yokota T	Depletion of Vitamin E Increases Amyloid $\beta$ Accumulation by Decreasing Its Clearances from Brain and Blood in a Mouse Model of Alzheimer Disease	Journal of Biological Chemistry	284(48)	33400-33408	2009
Kimura N, Inoue M, Okabayashi S, Ono F, Negishi T	Dynein dysfunction induces endocytic pathology accompanied by an increase in Rab GTPases: a potential mechanism underlying age-dependent endocytic dysfunction.	J Biol Chem	284(45)	31291-31302	2009

著 書

著者氏名	書 籍 名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	出 版 社 名	ページ	出版年
北村聖, 楠 進	臨床病態学	1.脳・神経系疾患, II 主な疾病と診療, 5.神経変性疾患, 4. 脊髄小脳変性症. 臨床病態学	水澤英洋	スーヴェルヒロ カワ	121-126	2009
北村聖, 楠 進	臨床病態学	1.脳・神経系疾患, II 主な疾病と診療, 5.神経変性疾患, 5. 脊髄小脳変性症. 臨床病態学	水澤英洋	スーヴェルヒロ カワ	126-128	2009
北村聖, 楠 進	臨床病態学	1.脳・神経系疾患, II 主な疾病と診療, 5.神経変性疾患, 6. 脊髄小脳変性症. 臨床病態学	水澤英洋	スーヴェルヒロ カワ	128-130	2009
高久史磨, 尾形悦郎, 黒川 清, 矢崎義雄・監修	2009 今日の治療指針 私はこう治療している。 新臨床内科学	ハンチントン病	水澤英洋	医学書院	686-689	2009
貫和敏博, 堀 正二, 永井良三, 西元寺克禮, 沖田 極, 春日雅人, 松本俊夫, 池田康夫, 押味和夫, 伊藤貞嘉, 水澤英洋, 小田 紘, 山本一彦, 相澤好治・編集	新臨床内科学	神経疾患	水澤英洋	医学書院	1684-1688	2009
小林祥泰, 水澤英洋・編集	神経疾患最新の治療			医学書院	1-1882	2009
Medical Practice 編集委 員会	臨床検査ガイド 2009 ～2010	抗アセチルコリン受容体抗体	尾崎 心, 横手裕明, 水澤英洋	南江堂	1-391	2009
Medical Practice 編集委 員会	臨床検査ガイド 2009 ～2010	脱髄性多発ニューロパチー(抗 GM1 IgG 抗体, 抗 GQ1b IgG 抗体 9	小林正樹, 水澤英洋	文光堂	701-702	2009

著者氏名	書籍名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	出版社名	ページ	出版年
(NPO)全国SCD・MSA友会の編	脊髄小脳変性症・多系統萎縮症 Q&A 156	I 脊髄小脳変性症. II 多系統萎縮症. V 遺伝子検査(Q59,60) VI. 医師との関係	金澤一郎, 水澤英洋, 服部孝道, 祖父江元, 辻省次, 中島健二, やまざきたけし, 山崎昌子, 小林庸子, 中村典央, 大戸優子, 齋藤亮二, 春木初枝, 並木玲子, 大槻洋子, 吉村 治, 吉田芳夫, 江見澤洋	特定非営利活動法人 全国脊髄小脳変性症・多系統萎縮症友の会(NPO)全国SCD・MSA友の会	14-28・29-32・60-61・65-67	2009
水野美邦	パーキンソン病診療 Q&A110	パーキンソン病のように見える脊髄小脳変性症	水澤英洋	中外医学社	81-82	2009
小川 聡, 小澤敬也, 祖父江元	内科学書 改訂第7版	大脳の変性疾患	水澤英洋	中山書店	295-305	2009
日本語版監修: 福井次矢, 黒川 清	ハリソン内科学 第3版	失調性障害	翻訳: 水澤英洋	メデイカル・サイエンス・インターナショナル	2662-2669	2009
山口 徹, 北原光夫, 福井次矢: 総編集	Today's Therapy 2010 今日の治療指針 2010年版 Vol.52	Kennedy-Alter-Sung 病(球脊髄性筋萎縮症) spinal and bulbar muscular atrophy	水澤英洋	医学書院	759	2010
水澤英洋: 監修 太田貞司, 三苫 博, 山本則子: 編集	あったか介護・看護のため の用語集	序文(水澤英洋)	水澤英洋: 監修	昭林社	ix	2010
金澤一郎, 永井良三: 総編集	今日の診断指針 第6版	脊髄小脳変性症	水澤英洋	医学書院	602-605	2010

# 研究成果の刊行に関する一覧表

## 総説

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
三條伸夫, 水澤英洋	プレセニリンは SERCA ポンプ活性の調節因子であり、SERCA ポンプ活性は $\alpha$ セレクターゼ調節作用を有する	Cognition and Dementia メデイカルレビュー社	8(1)	50-51	2009
常深泰司, 水澤英洋	ポリグルタミン病における神経変性機序：最近の研究動向	細胞工学 秀潤社 東京	28(5)	443-447	2009
常深泰司, 水澤英洋	最新の進展状況－脊髄小脳変性症治療の進展[第一部]	難病と在宅ケア 日本プランニングセンター 千葉	15(1)	7-10	2009
水澤英洋	パーキンソン病 パーキンソン病の歴史的な流れ	日本臨床	67(4)	7-11	2009
赤座実穂, 常深泰司, 三條伸夫, 脇本浩明, 小林大輔, 水澤英洋	左三叉神経障害にて発症したと思われる悪性リンパ腫の 1 例	臨床神経学	49(7)	432-436	2009
水澤英洋	わが国におけるプリオン病の現状と対策	東京都医師会雑誌	62(5)	18-22	2009
文村優一, 水澤英洋	蛋白分解酵素に対する感受性を有する異常プリオンをともなった新規疾患	Brain & Nerve	17(2)	8-9	2009
三木一徳, 水澤英洋	ALS 患者から生成された Induced Pluripotent Stem Cells (iPS 細胞) は運動ニューロンに分化可能である	Brain & Nerve	17(2)	10-11	2009
久保寺隆行, 水澤英洋	ハイリクス薬による副作用とバイタルサイン－神経系副作用	薬局	60(10)	58-64	2009
大林正人, 水澤英洋	多系統萎縮症の排尿障害対応策	難病と在宅ケア	15(6)	7-10	2009
常深泰司, 水澤英洋	特集脊髄小脳変性症治療の進展「第一部」－最新の進展状況	難病と在宅ケア	15(1)	7-10	2009

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
日詰正樹, 水澤英洋	変異型クロイツフェルトヤコブ病に対する遺伝性危険因子の全ゲノム関連解析	Brain & Nerve	17(3)	10-11	2009
山田正仁, 野崎一朗, 浜口 毅, 篠原もえ子, 北本哲之, 中村好一, 佐藤猛, 水澤英洋	プリオン病サーベイランスの現状と成果	臨床神経学	49(11)	939-942	2009
伊藤陽子, 水澤英洋	歩行障害の神経学的メカニズム	日本医事新報	4481	79-80	2010

## IV. 研究成果の刊行物・別刷

## RNAiを用いた神経疾患の遺伝子治療\*

横田 隆徳\*\*

**Key Words** : siRNA, shRNA, AAV, gene therapy, RNAi

### はじめに

RNA干渉 (RNA interference : 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ある。細胞内に導入させた2本鎖RNAはDicerの結合タンパクであるhuman immunodeficiency virus transacting response RNA-binding protein (TRBP) によってAgonate2 (Ago2) にリクルートされ<sup>1)</sup>, RISC-loading complex (RLC) を形成する<sup>2)</sup>。Short interfering RNA (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<sup>3)</sup>。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<sup>3)</sup>。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'oligoadenylate synthetase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<sup>4)</sup>。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δρο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ーンとして用いられている<sup>5)</sup>。

siRNAは配列特異性も高く1塩基の違いの認識も可能であり, 医療分野におけるその臨床応用についてはその発見当初から大きく期待されている。ここでは, 神経疾患への核酸医薬としてのsiRNAや発現型のshort hairpin RNA (shRNA) の開発の研究現状について概説する。

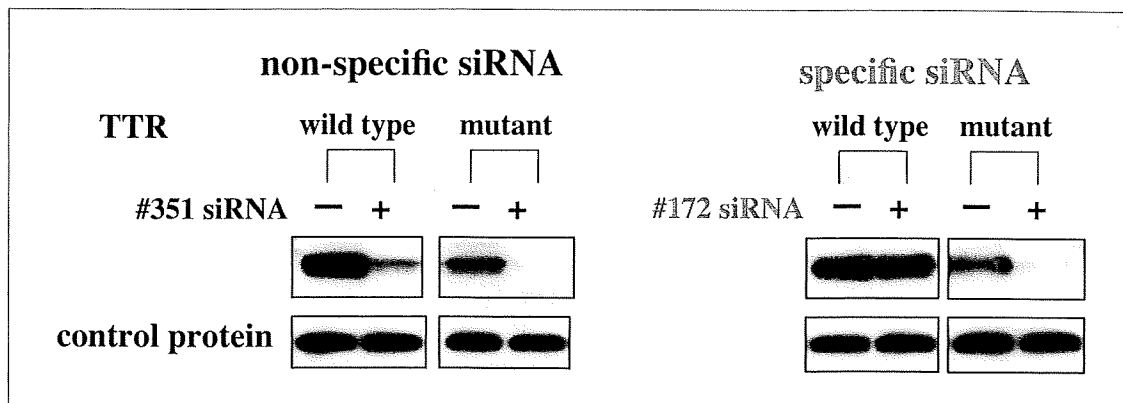
### 1. 遺伝性神経変性疾患のRNAiによる遺伝子治療の基本概念

SOD1遺伝子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,  $\alpha$ -synuclein変異によるParkinson病, 変異transthyretin (TTR) による家族性アミロイドポリニューロパチー (familial

\* Gene Therapy of Neurological Diseases with RNA Interference.

\*\* 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





**Fig. 1A**

**Fig. 1** Successful reduction of mutant TTR of V30M TTR transgenic mouse using siRNA-expressing AAV8

Effect of siRNA using culture cells (HEK293T) by Western blotting (A). siRNA-expressing AAV8 ( $5 \times 10^{11}$  v.g./kg,  $5 \times 10^{10}$  v.g./kg) was intravenously injected from the tail vein. Liver V30M TTR mRNA inhibited to express by RT-PCR (B). Serum V30M TTR was reduced for more than 16 weeks (C).

amyloid polyneuropathy : FAP) 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。一方、同じ常染色体優性遺伝性の家族性 ALS でも ALS9 の angiogenin の場合は点変異による機能低下が原因とされる haplotype insufficiency がその機序として考えられ、単なる変異遺伝子抑制の戦略はあてはまらなさそうである<sup>9)</sup>。

## 2. SOD1 による家族性 ALS や FAP のモデルマウスを用いた RNAi による遺伝子治療

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<sup>7)</sup>。この結果、ALS 症状の発症は 300 日以上抑制され、siRNAi 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。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ている<sup>8,9)</sup>。

FAP は肝臓で産生される異常 TTR が血中に分泌され異常アミロイドとなって末梢神経に沈着する神経難病である。肝臓移植で疾患進行の停止、自律神経症状の改善が可能であることは確立しており、肝臓で産生される異常 TTR の発現を抑制することができれば根本治療になる可能性が高い。我々は FAP の代表的変異である V30M TTR 変異に対し特異的な shRNA (#172)、及び変異に対しては非特異的であるが抑制効率の優れた shRNA (#351) の 2 種類の shRNA をデザインした (Fig. 1A)。この siRNA を肝臓に対し組織特異性の高いアデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus : AAV) 8 型をベクターとして用いて、変異型 V30M TTR 過剰発現トランスジェニックマウスに対して、静脈投与によって FAP の肝臓の V30M TTR の抑制が可能であるかを検討した。その結果、肝臓の V30M TTR mRNA は特異的に 90% 以上発現が抑制された (Fig. 1B)。さらに、血中に分泌された V30M TTR を定量すると #172 shRNA/AAV8 の低用量では抑制効果は



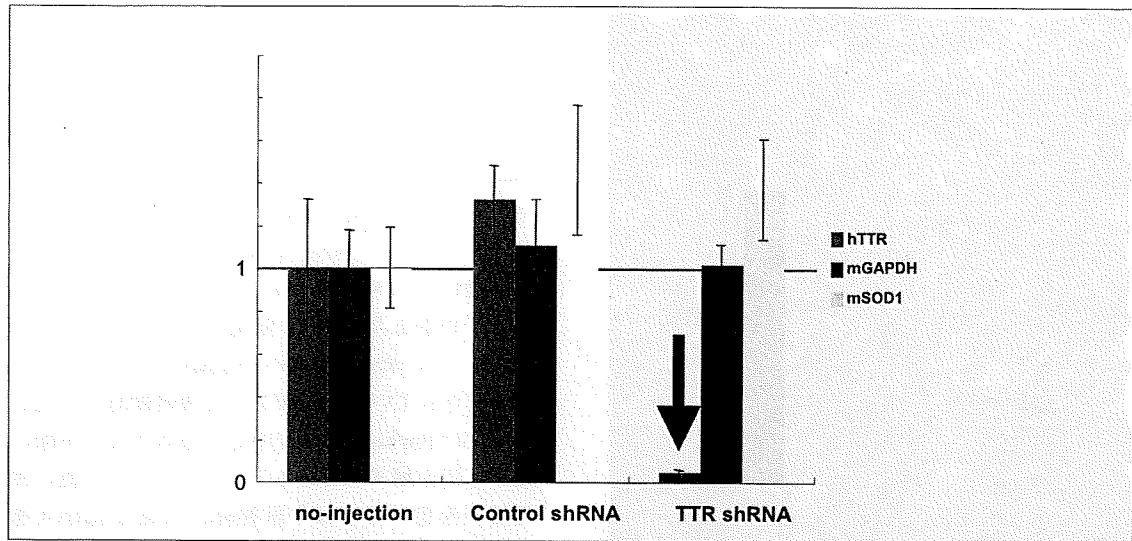


Fig. 1B

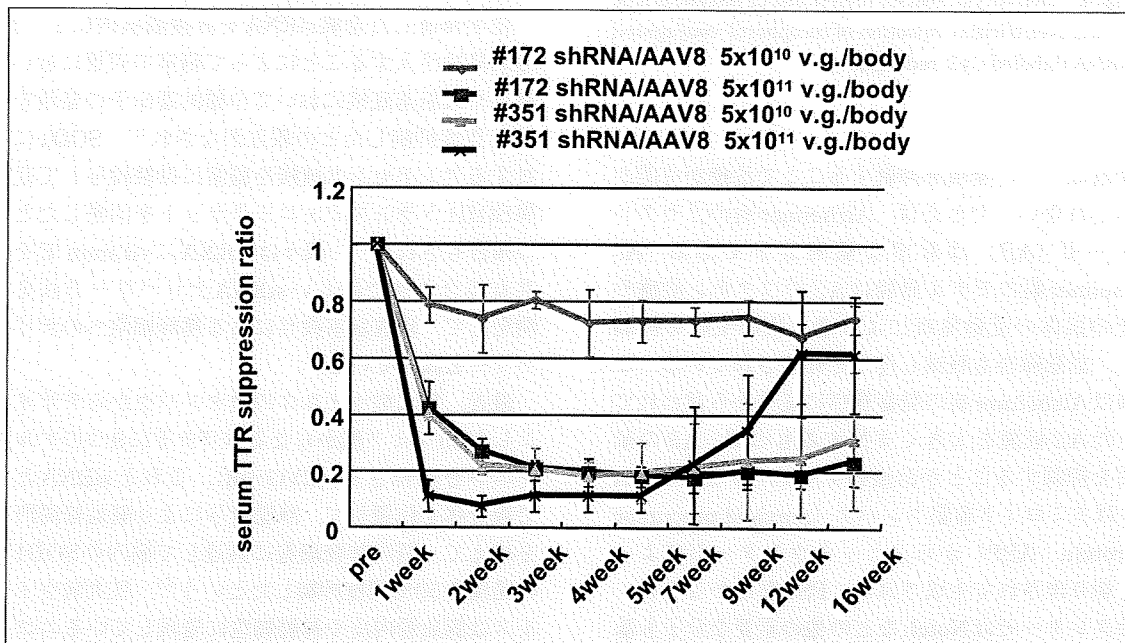


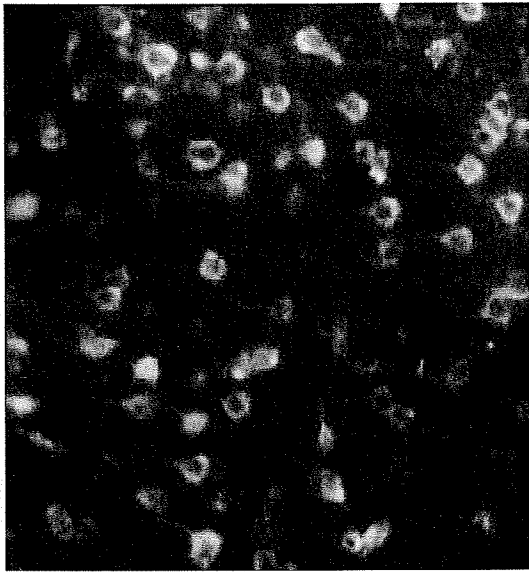
Fig. 1C

得られなかったが高用量で最大80%以上の血清変異TTR抑制効果が得られ、その効果は約4ヶ月もの長期間持続した。#351 shRNA/AAV8の高用量では90%の抑制効果が得られたが、投与2週後より一過性に肝機能障害を認め抑制効果も5週後より次第に減弱していった。低用量では副作用なく#172 shRNA/AAV8の高用量とほぼ同等の効

果が得られた (Fig. 1C)。この結果はFAPが siRNA AAV8を用いた遺伝子治療が可能である可能性を示している。

### 3. 孤発性ALS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



**Fig. 2** Delivery of siRNA to neurons of temporal lobe by intraventricular injection of tocopherol-conjugated siRNA (labeled Cy3, red signal)

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 $\beta$ セクレターゼ ( $A\beta$ ) 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。これはAlzheimer病の発症機序に由来から言われてきた $A\beta$ 仮説を大きく支持するもので、 $A\beta$ の産生を抑制することが治療のターゲットとなる。 $A\beta$ はアミロイド前駆タンパク (amyloid precursor protein: APP) から $\beta$ と $\gamma$ 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 $\gamma$ 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、 $\beta$ セクレターゼの本体といわれるBACE1のノックアウトマウスは特別の異常を示さない。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<sup>10)</sup>。また、細胞死の最終経路であるアポトーシスの実行分子であるcaspase阻害剤の投与がSOD1変異ALSモデ

ルマウスの病態の進行の遅延効果も報告されている<sup>11)</sup>。

#### 4. siRNAの*in vivo*へのデリバリー

神経変性疾患の治療には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は有効である。shRNA発現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shRNA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。AAVによる神経細胞への遺伝子導入はParkinson病を中心の患者さんで実際の臨床応用が始まっている<sup>12)</sup>。しかし、その他の神経変性疾患の場合は中枢神経に広範なsiRNA導入が必要で、静脈投与などの全身投与による治療にはBBBを越える核酸医薬の開発が必要である。

化学修飾した合成siRNAを直接脳室内に1~2週間持続注入する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<sup>13)</sup>、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<sup>14)</sup>。我々はsiRNAにvitamin Eを共有結合させた新しいsiRNAデリバリー方法を開発して、現在脳室投与による神経細胞へのデリバリーを試みている<sup>15)</sup>。

最近、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、脳内神経細胞に到達して脳内のSOD1の発現を50%程度抑制したという<sup>16)</sup>。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神経細胞に到達したとされ、今後の臨床応用への将来性が期待される。

#### 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、任意の分子を標的にできて、かつその顕著な発現抑制効力には計り知れな

い潜在能力がある。それゆえ、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りそうである。比較的近い将来に神経変性疾患での新しい治療法の開発において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 19 (5) : 517-29, 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 R 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) 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
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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
- 14) Smith RA, Miller TM, Yamanaka K et al : Antisense oligonucleotide therapy for neurodegenerative disease. *J Clin Invest* 116 : 2290-2296, 2006
- 15) Nishina K, Unno T, Uno Y et al : Efficient *In Vivo* delivery of siRNA to liver by conjugation of  $\alpha$ -Tocopherol. *Mol Ther* 16 : 734-740, 2008
- 16) Kumar P, Wu H, McBride JL et al : Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature* 448 : 39-43, 2007

# Gene Therapy of Neurological Diseases with RNA Interference

Takanori YOKOTA

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

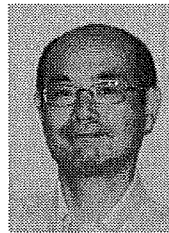
RNA interference (RNAi) is the process of sequence-specific, post-transcriptional gene silencing, initiated by double-stranded RNA (dsRNA). The gene therapy for familial ALS with siRNA had been started and showed promising results in the model mouse. There is a recent progress in

the delivery of siRNA to the central nervous system. There are still important problems for application of gene therapy including off-target effect and gene delivery of siRNA, but a rapid progress can be expected because of the extremely high efficiency of siRNA.

## 6 神経変性疾患に対する siRNAを用いた遺伝子治療

よこた たかのり  
**横田 隆徳**

東京医科歯科大学 医歯学総合研究科  
 脳神経機能病態 (神経内科)



横田 隆徳  
 1990年東京医科歯科大学大学院卒業。神経内科医。98-2000年米国バーナム研究所に留学、神経変性疾患の遺伝子治療の研究を開始させた。一般神経内科臨床で神経疾患患者の診療、医学部学生の教育の傍ら、遺伝子治療の研究にポストドク、大学院生と格闘している。

Key words : RNAi, siRNA, gain of function, デリバリー

### Abstract

遺伝性神経変性疾患においてその変異遺伝子自体を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。さらに孤発性神経変性疾患においてもその機序の解明に伴い、判明したキーとなる分子をターゲットとしたsiRNAによる治療戦略も始まった。モデルマウスを用いた治療実験では良好な結果が得られている。神経細胞へのデリバリーの方法やoff-target効果, short hairpin RNA(shRNA)毒性など、まだまだ解決すべき問題点も多いが、siRNAの高い抑制効果からその神経変性疾患への応用が急速に進展していくことは間違いないものと思われる。

### はじめに

RNA 干渉 (RNAi) は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高く、しかもその配列特異性は1塩基の違いの認識も可能であり、医療分野におけるその臨床応用については発見当初から大きく期待されていた。本稿ではsiRNAを用いた神経変性疾患への遺伝子治療の研究について概説したい。

### 1. 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ってはじめて発症する常染色体劣性遺伝形式の疾患の多くはloss of functionをその機序とし、一方のアレルのみで発症する常染色体優性遺伝形式の疾患の多くの場合はgain of functionであることが多い。常染色体優性遺伝の場合は野生型のアレルからは原則として正常個体の半分の量の正常の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

Gene therapy to neurodegenerative diseases by siRNA : Takanori Yokota, Department of Neurology and Neurological Science, Tokyo Medical and Dental University

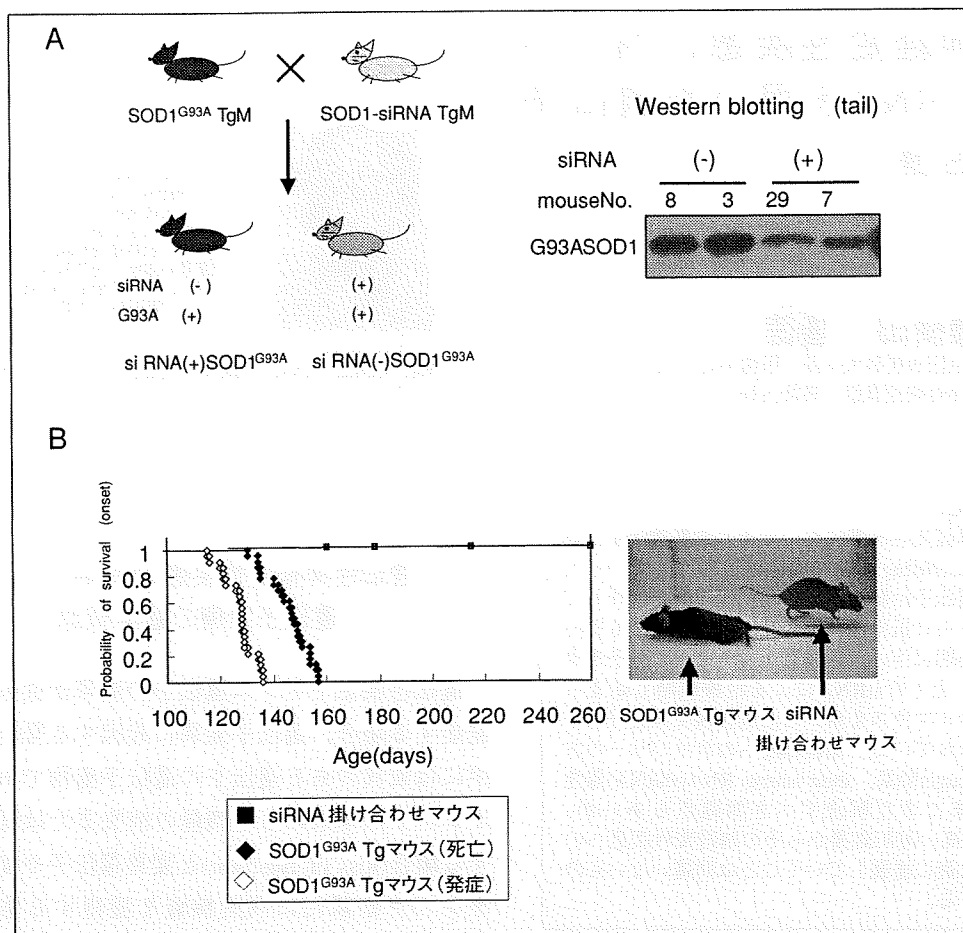


図1 SOD1G93A トランスジェニックマウスの遺伝子治療

SOD1に対するsiRNAを過剰発現させたトランスジェニックマウスをALSのモデルマウスであるG93A変異SOD1トランスジェニックマウスと掛け合わせることで、変異SOD1タンパクの発現を80%以上抑制することに成功した(A)。6月齢の時点でALS症状の発症は完全に抑制されている(B)。(文献1より改変転載)

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、 $\alpha$ -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(図1A)<sup>1)</sup>。この効果により、6月齢の時点でALS症状の発症は完全に抑制されている(図1B)。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。

## 2. 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チャン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、正常アリの発現を損わずに、変異アリの発現のみを抑制することが望ましい。siRNA配列上特定の部位において、変異が1塩基の違いでも正常アリと変異アリの配列の差を認識して変異アリのみを切断できるsiRNAの作製は可能である。

図2に家族性ALSの原因遺伝子であるSOD1の点変異G93Aを選択的に切断して正常配列にはほとんど影響しないsiRNAの例を示す<sup>2)</sup>。同様の報告は捻転dystonia<sup>3)</sup>やfrontotemporal dementia<sup>4)</sup>で報告されている。また、ポリグルタミン病の様に、繰り返し配列の長さがかわることが変異でも、繰り返し配列数に関連するpolymorphismを用いて変異アリの特異的な抑制が可能ながある。<sup>5)</sup>

しかし、SOD1やP S1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<sup>6)</sup>(図3)、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の抑制して、同時にそのshRNAできれ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ている。

## 3. 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Aβ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。Aβ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ため、βセクレターゼであるBACE1に対するsiRNAを発現するレンチウイルスを変異APPを過剰発現させたトランスジェニックマウスの海馬に直接注入して、老人斑の沈着を現象させ、認知機能障害を改善させたとの報告がなされた<sup>7)</sup>。

## 4. siRNAの*in vivo*へのデリバリー

全身投与方法では、カチオニックリポソームや、コレステロール結合siRNAが一般的だが、これらの方法では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困難である。

最近、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



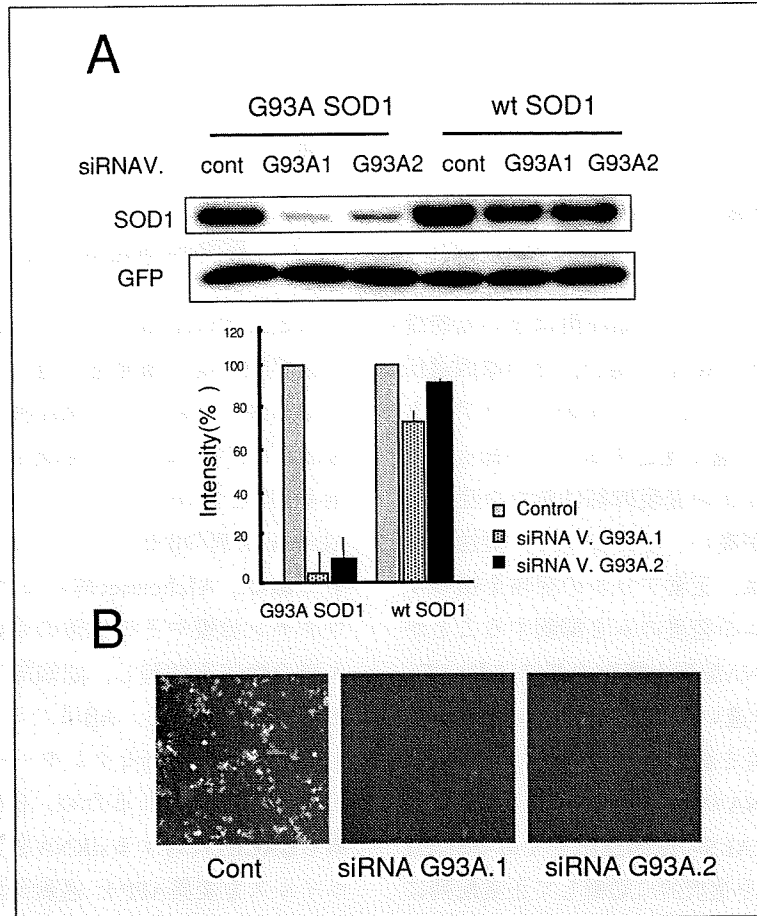


図2 変異SOD1に特異的に作用するsiRNA

A) 293T細胞にG93A または野生型SOD1発現ベクターとsiRNAG93A1, 2を共発現させ、野生型及び変異SOD1の発現をウエスタンブロットした。siRNAG93A1, 2を共にG93ASOD1の発現を著明に抑制して、野生型SOD1の発現はほとんど抑制しなかった。  
B) GFPをタグにSOD1の発現を蛍光顕微鏡にて撮影。(文献2より改変転載)

がなされ<sup>8)</sup>、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<sup>9), 10)</sup>。また、神経細胞へ導入のため細胞導入シグナルペプチドの利用も注目されている<sup>11)</sup> さらに、血液脳関門を通過するよう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を、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<sup>12)</sup>。我々は、siRNAのアンチセンスセンス鎖の5'末端に活性基を漬したビタミンE<sup>13)</sup>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、現在この方法を応用して中枢神経への新しいデリバリー方法を開発中である。

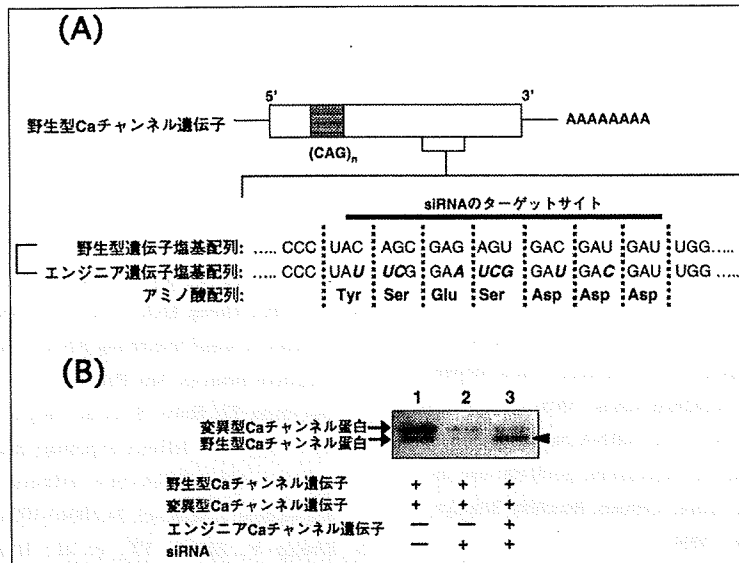


図3 いかなる変異に対しても変異7ル特異的なRNAi法  
SCA6の原因遺伝子はalpha1Aカルシウムチャンネル遺伝子内のCAGリピートの異常伸長だが変異7ル特異的なsiRNAを設計することは不可能である。そこで、非特異的なsiRNAによって変異型と野生型、両者のmRNAの発現を抑制し、そのsiRNAで切断されないようにエンジニアしたcDNAを利用して野生型タンパクを戻す方法によって、変異7ル特異的な遺伝子発現抑制が可能となる。(文献6より改変転載)

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*の神経細胞へのsiRNA導入の報告が次々とされている<sup>14)</sup>。

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<sup>15)</sup>や神経障害<sup>16)</sup>があるとの重要な報告された。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、神経変性疾患においてもsiRNAの利用が新しい突破口になると期待している。

文献

- 1) Saito Y, Yokota T, *et al.*: Transgenic small interfering RNA halts amyotrophic lateral sclerosis in a mouse model. *J Biol Chem* 280:42826-42830, 2005.
- 2) Yokota T, Miyagishi M, *et al.*: siRNA-based inhibition of superoxide dismutase expression; potential use in familial Amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Com* 314:283-291, 2004.
- 3) Gonzalez-Alegre P, *et al.*: Silencing primary dystonia: lentiviral-mediated RNA interference therapy for DYT1 dystonia. *J Neurosci*. 25:10502-10509, 2005.
- 4) Miller VM, Xia H, *et al.*: Allele-specific silencing of dominant disease genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;100:7195-200, 2003.
- 5) Li Y, Yokota T, *et al.*: Sequence-dependent and independent inhibition specific for mutant ataxin-3 by small interfering RNA. *Ann Neurol*. 56:124-129, 2004.
- 6) Kubodera, T., Yokota, T., *et al.*: New RNAi Strategy for Selective Suppression of Mutant Allele in Polyglutamine Disease : Oligonucleotides 15:298-302, 2005.
- 7) Singer, O., Marr, R.A., Rockenstein, E., *et al.*: Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model. *Nat Neurosci* 8:1343-1349, 2005.
- 8) Thakker DR, Natt F, Husken D, Maier R, Muller M, van der Putten H, Hoyer D, Cryan JF: 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.
- 9) Guissouma H, Froidevaux MS, *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.
- 10) Luo MC, Zhang DQ, *et al.*: An efficient intrathecal delivery of small interfering RNA to the spinal cord and peripheral neurons. *Mol Pain* 1:1-8, 2005.
- 11) Davidson TJ, Harel S, *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.
- 12) Zhang Y, Zhang YF, *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
- 13) Nishina K, Unno T, *et al.*: Efficient *In Vivo* delivery of siRNA to liver by conjugation of  $\alpha$ -Tocopherol. *Mol Ther* 16:734-740, 2008
- 14) Davidson BL, Harper SQ.: Viral delivery of recombinant short hairpin RNAs. *Methods Enzymol* 392:145-173, 2005.
- 15) Grimm D, Streetz KL, *et al.*: Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 441:537-541, 2006.
- 16) McBride JL, Boudreau RL, *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.

<BIO Information>

第19回日本病態生理学会

下記の日程で第19回日本病態生理学会を開催いたします。

会期：2009年1月24日（土）・25日（日）

代表者：西田 育弘（防衛医科大学校教授）

会場：所沢市民文化センター

連絡先：第19回日本病態生理学会大会事務局

TEL：04-2995-1483 FAX：04-2996-5188

常設事務局URL：http://gakkai.umin.ac.jp/gakkai/gakkai/2002/A00907.htm E-mail：physiol@gifu-u.ac.jp

バックナンバーを会場で販売する予定です。ぜひお立ち寄り下さい。

## ＜シンポジウム 2—4＞ALS 治療法開発の将来

# RNA 干渉による ALS の治療戦略

横田 隆徳

要旨：家族性 ALS におい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目ざした基礎研究が進行し、SOD1 変異による家族性 ALS モデルマウスをもちいた治療実験では良好な結果がえられている。神経細胞へのデリバリーの方法にも新しい進歩は報告されている。off-target 効果、short hairpin RNA (shRNA) 毒性など、まだまだ解決すべき問題点も多いが、siRNA の高い抑制効果から ALS への応用が急速に進展していくことはまちがいないものと思われる。

(臨床神経, 49 : 821—823, 2009)

Key words : siRNA, shRNA, AAV, 遺伝子治療, RNAi

### 1. はじめに

RNA 干渉 (RNA interference : 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、配列特異性も高く 1 塩基の違いの認識も可能であり、医療分野におけるその臨床応用についてはその発見当初から大きく期待されていた。ここでは、ALS への核酸医薬としての short interfering RNA (siRNA) や発現型の short hairpin RNA (shRNA) の開発の研究現状と問題点について概説する。

### 2. 遺伝性神経変性疾患の RNAi による遺伝子治療の基本概念

SOD1 遺伝子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、 $\alpha$ -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にあい、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。一方、同じ常染色体優性遺伝性の家族性 ALS でも ALS9 の angiogenin のばあいは点変異による機能低下が原因とされる haplotype insufficiency がその機序として考えられ、単なる変異遺伝子抑制の戦略はあてはまらなさそうである。さらに近年発見された常染色体優性遺伝性 ALS の遺伝子である TDP-43 や FUS の機序は gain of toxic function であるかは不明であり、今後の病態機序解明にともなう標的遺伝子の選定が待たれる。

### 3. SOD1 による家族性 ALS モデルマウスをもちいた RNAi による遺伝子治療

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、われわれは 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<sup>1)</sup>。この結果、ALS 症状の発症は 300 日以上抑制され、siRNAi 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。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<sup>2)3)</sup>。

### 4. 孤発性 ALS 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の発症機序は明らかでないが、その中核の分子機構の分子がわかれば、その発現を抑制することで治療が可能かもしれない。細胞死の最終経路であるアポトーシスの実行分子である caspase 阻害剤の投与が SOD1 変異 ALS モデルマウスの病態の進行の遅延効果が報告されているが<sup>4)</sup>、その効果は限られており、孤発性 ALS の発症機序におけるより上流の分子を標的にしたい。最近明らかになった孤発性 ALS の脊髄の神経細胞、グリア細胞の細胞質に凝集する TDP-43 とその病態生理にかかわる分子機構の解明は siRNA の標的分子同定の突破口になるかもしれない。

## 5. siRNA の in vivo へのデリバリー

ALS などの神経変性疾患の治療には RNAi の年単位の長期にわたる効果が必要であり、それにはウイルスベクターは有効である。shRNA 発現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 shRNA 発現ウイルスベクターをもちいて、in vivo の細胞への siRNA 導入の報告がつつぎとされている。アデノ随伴ウイルスによる神経細胞への遺伝子導入はパーキンソン病を中心の患者さんで実際の臨床応用が始まっている<sup>5)</sup>。しかし、ALS のばあいは中枢神経広範な siRNA 導入が必要で、静脈投与などの全身投与による治療には BBB を越える核酸医薬の開発が必要である。

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ける標的遺伝子の発現を 50% 程度抑制したとの報告がなされ<sup>6)</sup>、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がされた<sup>7)</sup>。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。われわれは siRNA に vitamin E を共有結合させた新しい siRNA デリバリー方法を開発して、現在脳室投与による神経細胞へのデリバリーを試みている<sup>8)</sup>。

最近、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 つのアルギニンを結合させ (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、脳内神経細胞に到達して脳内の SOD1 の発現を 50% 程度抑制したという<sup>9)</sup>。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ーシスによって神経細胞に到達したとされ、今後の臨床応用へ将来性が期待される。

## 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、任意の分子を標的にできて、かつその顕著な発現抑制効力と

には計り知れない潜在能力がある。それがゆえ、その基礎研究は爆発的に進んでおり、もっと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りそうである。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) 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—42830
- 2) 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—433
- 3) 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—428
- 4) Li M, Ona VO, Guegan C, et al: Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model. *Science* 2000; 288: 335—339
- 5) 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* 2007; 369: 2056—2058
- 6) 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* 2004; 101: 17270—17275
- 7) Smith RA, Miller TM, Yamanaka K, et al: Antisense oligonucleotide therapy for neurodegenerative disease. *J Clin Invest* 2006; 116: 2290—2296
- 8) Nishina K, Unno T, Uno Y, et al: Efficient *In Vivo* delivery of siRNA to liver by conjugation of  $\alpha$ -Tocopherol. *Mol Ther* 2008; 16: 734—740
- 9) Kumar P, Wu H, McBride JL, et al: Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature* 2007; 448: 39—43