

Fig. 5 – Flow chart of the biochemical analyses.

genizer (AS ONE, Osaka, Japan). After incubating the homogenate on ice for 10 min, the homogenate was centrifuged at $20,000\times g$ for 20 min at 4°C . The resultant precipitate was rehomogenized in the same fashion, and the supernatants were pooled. After ultracentrifugation at $436,000\times g$ for 15 min at 4°C , the resultant precipitate was homogenized in 20 volumes in 1% Sarkosyl (sodium *N*-dodecanoylsarcosinate; Wako, Osaka, Japan) with a motor-driven Teflon homogenizer, followed by incubation for 1 h at RT with stirring every 10 min. The homogenate was ultracentrifuged, and the resultant precipitate was rehomogenized in the same fashion. The insoluble precipitate was resuspended in sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer [62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% glycerol, and 5% 2-mercaptoethanol], and subjected to Western blotting (Fig. 5).

4.4. SDS-PAGE and Western blotting

The protein concentration of the TBS-soluble fraction was determined by BCA assay (Thermo Scientific, Rockford, IL). The TBS-soluble and -insoluble samples dissolved in SDS sample buffer [62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% glycerol, and 5% 2-mercaptoethanol] were subjected to 4–20% (for A β) or 7.5% (for tau) polyacrylamide gel electrophoresis using Tris/tricine (for A β) or Tris/glycine (for tau) buffer. In the analysis of TBS-insoluble samples, the volume of each sample was

responsible for 0.3 mg (on the blots of Fig. 2), 0.08 mg (on the blot of Supplemental Fig. 1B), and 0.75 mg (on the blots of Supplemental Fig. 2) tissue wet weight, except 32-c (0.02 mg) on the blots of Supplemental Fig. 2. The separated proteins were electrotransferred onto nitrocellulose membrane (pore size $0.22\ \mu\text{m}$, GE Osmonics Labstore, Minnetonka, MN). In the detection of A β at the picogram scale, the blot was boiled in boiling buffer (8.1 mM Na_2HPO_4 , 1.5 mM KH_2PO_4 , 137 mM NaCl, and 2.7 mM KCl, pH 7.4) for 5 min (Ida et al., 1996). The blot was incubated in 5% skim milk in PBS-T (PBS buffer containing 0.05% Tween 20) for 1 h at 4°C (for A β) or RT (for tau). After washing the blot with PBS-T, the proteins were probed with primary antibodies followed by an HRP-conjugated secondary antibody in PBS-T. Bound antibodies were visualized using Amersham ECL™ Western Blotting Detection Regents (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, England). In the analysis of A β , synthetic A β 1–40, A β 1–42, and pyroglutamate A β (N3pE-A β 3–42) (Peptide Institute Ltd., Osaka, Japan) were used as controls and internal standards.

4.5. Histological analysis

Brain samples were immersion-fixed in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, and cut into $4\text{-}\mu\text{m}$ -thick sections. For immunohistochemistry, the sections were deparaffinized in 0.5% periodic acid for 15 min at RT followed by autoclaving for 5 min at 121°C and then incubated by free floating (overnight at 4°C) with each of the following primary antibodies: 2B11 (1:200), HT7 (1:200), AT8 (1:200), and anti-human amyloid β (N) (1:50). Following brief washing, the sections were sequentially incubated with biotinylated goat anti-mouse IgG (1:400) or anti-rabbit IgG (1:400) for 1 h at RT and then with streptavidin–biotin–horseradish peroxidase complex (DAKO, Glostrup, Denmark) for 1 h at RT. Immunoreactive elements were visualized by treating the sections with 3–3' diaminobenzidine tetroxide (Dojin Kagaku, Kumamoto, Japan). The sections were then counterstained with hematoxylin. For double immunohistochemistry, the deparaffinized sections were stained with 1% Sudan Black B to avoid autofluorescence. The sections were incubated by free floating (overnight at 4°C) in solutions containing antibodies directed against tau [2B11 (1:100), AT8 (1:100)], GFAP (1:500), or Olig2 (1:200). The sections were then incubated with AlexaFluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG (1:500; Invitrogen, Carlsbad, CA), AlexaFluor 555-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:500; Invitrogen), and DAPI nuclear stain (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) for 1 h at RT. All the sections were examined using a Digital Eclipse C1 confocal microscope (Nikon, Kanagawa, Japan). In some sections, we performed Gallyas silver staining. For the counting of tau-immunoreactive glial cells, three unselected areas, from the superficial layer to the deep layer with the width of $445\ \mu\text{m}$ per area, were analyzed in superior temporal cortices. In the analysis of the hippocampus, the pyramidal layers from CA1 to CA4 were analyzed.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Tomohiro Miyasaka for helpful comments and suggestions. This study was supported by a Grant-

in-Aid for Scientific Research on Priority Areas “Research on Pathomechanisms of Brain Disorders” from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (1700220004).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.brainres.2009.12.005.

REFERENCES

- Bons, N., Mestre, N., Petter, A., 1991. Senile plaques and neurofibrillary changes in the brain of an aged lemurian primate, *Microcebus murinus*. *Neurobiol. Aging* 13, 99–105.
- Bons, N., Jallageas, V., Silhol, S., Mestre-Frances, N., Petter, A., Delacourte, A., 1995. Immunocytochemical characterization of Tau proteins during cerebral aging of the lemurian primate *Microcebus murinus*. *C. R. Acad. Sci., III, Sci. Vie* 318, 741–747.
- Bons, N., Rieger, F., Prudhomme, D., Fisher, A., Krause, K.H., 2006. *Microcebus murinus*: a useful primate model for human cerebral aging and Alzheimer’s disease? *Genes Brain Behav.* 5, 120–130.
- Braak, H., Braak, E., 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82, 239–259.
- Braak, H., Braak, E., Strothjohann, M., 1994. Abnormally phosphorylated tau protein related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads in the cerebral cortex of sheep. *Neurosci. Lett.* 171, 1–4.
- Cork, L.C., Powers, R.E., Selkoe, D.J., Davies, P., Geyer, J.J., Price, D.L., 1988. Neurofibrillary tangles and senile plaques in aged bears. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 47, 629–641.
- Cork, L.C., Masters, C., Beyreuther, K., Price, D.L., 1990. Development of senile plaques: relationships of neuronal abnormalities and amyloid deposits. *Am. J. Pathol.* 137, 1383–1392.
- Cummings, B.J., Su, J.H., Cotman, C.W., White, R., Russell, M.J., 1993. β -Amyloid accumulation in aged canine brain: a model of early plaque formation in Alzheimer’s disease. *Neurobiol. Aging* 14, 547–560.
- Cummings, B.J., Head, E., Ruehl, W., Milgram, N.W., Cotman, C.W., 1996a. The canine as an animal model of human aging and dementia. *Neurobiol. Aging* 17, 259–268.
- Cummings, B.J., Satou, T., Head, E., Milgram, N.W., Cole, G.M., Savage, M.J., Podlisy, M.B., Selkoe, D.J., Siman, R., Greenberg, B.D., Cotman, C.W., 1996b. Diffuse plaques contain C-terminal $A\beta_{42}$ and not $A\beta_{40}$: evidence from cats and dogs. *Neurobiol. Aging* 17, 653–659.
- Czasch, S., Paul, S., Baumgärtner, W., 2006. A comparison of immunohistochemical and silver staining methods for the detection of diffuse plaques in the aged canine brain. *Neurobiol. Aging* 27, 293–305.
- Delacourte, A., Sautière, P.E., Watzet, A., Mourton-Gilles, C., Petter, A., Bons, A., 1995. Biochemical characterization of tau proteins during cerebral aging of the lemurian primate *Microcebus murinus*. *C. R. Acad. Sci., III Sci. Vie* 318, 85–89.
- Duyckaerts, C., Potier, M.C., Delatour, B., 2008. Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol.* 115, 5–38.
- Flament, S., Delacourte, A., Hémon, B., Défossez, A., 1989. Characterization of two pathological tau protein, variants in Alzheimer brain cortices. *J. Neurol. Sci.* 92, 133–141.
- Frank, S., Clavaguera, F., Tolnay, M., 2008. Tauopathy models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol.* 115, 39–53.
- Gearing, M., Rebeck, G.W., Hyman, B.T., Tigges, J., Mirra, S.S., 1994. Neuropathology and apolipoprotein E profile of aged chimpanzees: implications for Alzheimer’s disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 9382–9386.
- Gearing, M., Tigges, J., Mori, H., Mirra, S.S., 1996. $A\beta_{40}$ is a major form of β -amyloid in nonhuman primates. *Neurobiol. Aging* 17, 903–908.
- Gearing, M., Tigges, J., Mori, H., Mirra, S.S., 1997. β -amyloid ($A\beta$) deposition in the brains of aged orangutans. *Neurobiol. Aging* 18, 139–146.
- Geula, C., Wu, C.K., Saroff, D., Lorenzo, A., Yuan, M., Yankner, B.A., 1998. Aging renders the brain vulnerable to amyloid β -protein neurotoxicity. *Nat. Med.* 4, 827–831.
- Geula, C., Nagykerly, N., Wu, C.K., 2002. Amyloid- β deposits in the cerebral cortex of the aged common marmoset (*Callithrix jacchus*): incidence and chemical composition. *Acta Neuropathol.* 103, 48–58.
- Giannakopoulos, P., Silhol, S., Jallageas, V., Mallet, J., Bons, N., Bouras, C., Delaère, P., 1997. Quantitative analysis of tau protein-immunoreactive accumulations and β amyloid protein deposits in the cerebral cortex of the mouse lemur, *Microcebus murinus*. *Acta Neuropathol.* 94, 131–139.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y.C., Zaidi, M.S., Wisniewski, H.M., 1986. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J. Biol. Chem.* 261, 6084–6089.
- Hardy, J.A., Higgins, G.A., 1992. Alzheimer’s disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184–185.
- Härtig, W., Klein, C., Brauer, K., Schüppel, K.F., Arendt, T., Brückner, G., Bigl, V., 2000. Abnormally phosphorylated protein tau in the cortex of aged individuals of various mammalian orders. *Acta Neuropathol.* 100, 305–312.
- Härtig, W., Klein, C., Brauer, K., Schüppel, K.F., Arendt, T., Bigl, V., Brückner, G., 2001. Hyperphosphorylated protein tau is restricted to neurons devoid of perineuronal nets in the cortex of aged bison. *Neurobiol. Aging* 22, 25–33.
- Head, E., Moffat, K., Das, P., Sarsoza, F., Poon, W.W., Landsberg, C., Cotman, C.W., Murphy, M.P., 2005. β -amyloid deposition and tau phosphorylation in clinically characterized aged cats. *Neurobiol. Aging* 26, 749–763.
- Hosoda, R., Saido, T.C., Otvos, L., Arai, T., Mann, D.M.A., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Iwatsubo, T., 1998. Quantification of modified amyloid β peptides in Alzheimer disease and Down syndrome brains. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57, 1089–1095.
- Ida, N., Hartmann, T., Pantel, J., Schröder, J., Zerfass, R., Förstl, H., Sandbrink, R., Masters, C.L., Beyreuther, K., 1996. Analysis of heterogeneous $\beta A4$ peptides in human cerebrospinal fluid and blood by a newly developed sensitive Western blot assay. *J. Biol. Chem.* 271, 22908–22914.
- Ihara, Y., Nukina, N., Miura, R., Ogawara, M., 1986. Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer’s disease. *J. Biochem.* 99, 1807–1810.
- Iwatsubo, T., Saido, T.C., Mann, D.M.N., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., 1996. Full-length amyloid- $\beta(1-42(43))$ and amino-terminally modified and truncated amyloid- $\beta 42(43)$ deposit in diffuse plaques. *Am. J. Pathol.* 149, 1823–1830.
- Jeganathan, S., Hascher, A., Chinnathambi, S., Biernat, J., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E., 2008. Proline-directed pseudo-phosphorylation at AT8 and PHF1 epitopes induces a compaction of the paperclip folding of Tau and generates a pathological (MC-1) conformation. *J. Biol. Chem.* 283, 32066–32076.
- Kawarabayashi, T., Younkin, L.H., Saido, T.C., Shoji, M., Ashe, K.H., Younkin, S.G., 2001. Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid β protein in the Tg2576 transgenic

- mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 21, 372–381.
- Kiatipattanasakul, W., Nakayama, H., Yongsiri, S., Chotiapisitkul, S., Nakamura, S., Kojima, H., Doi, K., 2000. Abnormal neuronal and glial argyrophilic fibrillary structures in the brain of an aged albino cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Acta Neuropathol.* 100, 580–586.
- Kimura, N., Tanemura, K., Nakamura, S., Takashima, A., Ono, F., Sakakibara, I., Ishii, Y., Kyuwa, S., Yoshikawa, Y., 2003. Age-related changes of Alzheimer's disease-associated proteins in cynomolgus monkey brains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310, 303–311.
- Kimura, N., Imamura, O., Ono, F., Terao, K., 2007. Aging attenuates dynactin–dynein interaction: down-regulation of dynein causes accumulation of endogenous tau and amyloid precursor protein in human neuroblastoma cells. *J. Neurosci. Res.* 85, 2909–2916.
- Kuo, Y.M., Beach, T.G., Sue, L.I., Scott, S., Layne, K.J., Kokjohn, T.A., Kalback, W.M., Luehrs, D.C., Vishnivetskaya, T.A., Abramowski, D., Sturchler-Pierrat, C., Staufenbiel, M., Weller, R.O., Roher, A.E., 2001. The evolution of A β peptide burden in the APP23 transgenic mice: implications for A β deposition in Alzheimer disease. *Mol. Med.* 7, 609–618.
- Lee, V.M., Balin, B.J., Otvos, L., Trojanowski, J.Q., 1991. A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal tau. *Science* 251, 675–678.
- Lee, V.M., Wang, L.J., Trojanowski, J.Q., 1999. Purification of paired helical filament tau and normal tau from human brain tissue. *Methods Enzymol.* 309, 81–89.
- Lemere, C.A., Beierschmitt, A., Iglesias, M., Spooner, E.T., Bloom, J.K., Leverone, J.F., Zheng, J.B., Seabrook, T.J., Louard, D., Li, D., Selkoe, D.J., Palmour, R.M., Ervin, F.R., 2004. Alzheimer's disease A β vaccine reduces central nervous system A β levels in a non-human primate, the Caribbean velvet. *Am. J. Pathol.* 165, 283–297.
- Lemere, C.A., Oh, J., Stanish, H.A., Peng, Y., Pepivani, I., Fagan, A.M., Yamaguchi, H., Westmoreland, S.V., Mansfield, K.G., 2008. Cerebral amyloid-beta protein accumulation with aging in cotton-top-tamarins: a model of early Alzheimer's disease? *Rejuvenation Res.* 11, 321–332.
- Leung, E., Guo, L., Bu, J., Maloof, M., Khoury, J.E., Geula, C., 2009. Microglia activation mediates fibrillar amyloid- β toxicity in the aged primate cortex. *Neurobiol. Aging* (electronic publication ahead of print).
- Martins, I.C., Kuperstein, I., Wilkinson, H., Maes, E., Vanbrabant, M., Jonckheere, W., Van Gelder, P., Hartmann, D., D'hooge, R., De Strooper, B., Schymkowitz, J., Rousseau, F., 2008. Lipids revert inert A β amyloid fibrils to neurotoxic protofibrils that affect learning in mice. *EMBO J.* 27, 224–233.
- Miyasaka, T., Morishima-Kawashima, M., Ravid, R., Kamphorst, W., Nagashima, K., Ihara, Y., 2001. Selective deposition of mutant tau in the FTDP-17 brain affected by the P301L mutation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 60, 872–884.
- Mori, H., Takio, K., Ogawara, M., Selkoe, D.J., 1992. Mass spectrometry of purified amyloid β protein in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 267, 17082–17086.
- Nakamura, S., Tamaoka, A., Sawamura, N., Shoji, S., Nakayama, H., Ono, F., Sakakibara, I., Yoshikawa, Y., Mori, H., Goto, N., Doi, K., 1995. Carboxyl end-specific monoclonal antibodies to amyloid β protein (A β) subtypes (A β 40 and A β 42(43)) differentiate A β in senile plaques and amyloid angiopathy in brains of aged cynomolgus monkeys. *Neurosci. Lett.* 201, 151–154.
- Nakamura, S., Nakayama, H., Kiatipattanasakul, W., Uetsuka, K., Uchida, K., Goto, N., 1996a. Senile plaques in very aged cats. *Acta Neuropathol.* 91, 437–439.
- Nakamura, S., Kiatipattanasakul, W., Nakayama, H., Ono, F., Sakakibara, I., Yoshikawa, Y., Goto, N., Doi, K., 1996b. Immunohistochemical characteristics of the constituents of senile plaques and amyloid angiopathy in aged cynomolgus monkeys. *J. Med. Primatol.* 25, 294–300.
- Nakamura, S., Nakayama, H., Goto, N., Ono, F., Sakakibara, I., Yoshikawa, Y., 1998. Histopathological studies of senile plaques and cerebral amyloidosis in cynomolgus monkeys. *J. Med. Primatol.* 27, 244–252.
- Näslund, J., Haroutunian, V., Mohs, R., Davis, K.L., Davies, P., Greengard, P., Buxbaum, J.D., 2000. Correlation between elevated levels of amyloid β -peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA* 283, 1571–1577.
- Nelson, P.T., Greenberg, S.G., Saper, C.B., 1994. Neurofibrillary tangles in the cerebral cortex of sheep. *Neurosci. Lett.* 170, 187–190.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y., LaFerla, F.M., 2003. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles. *Neuron* 39, 409–421.
- Palazzi, X., Switzer, R., Geroge, C., 2006. Natural occurrence of amyloid-A β deposits in the brain of young common marmosets (*Callithrix jacchus*): a morphological and immunohistochemical evaluation. *Vet. Pathol.* 43, 777–779.
- Papaioannou, N., Tooten, P.C.J., van Ederen, A.M., Bohl, J.R.E., Rofina, J., Tsangaris, T., Gruys, E., 2001. Immunohistochemical investigation of the brain of aged dog. I. Detection of neurofibrillary tangles and of 4-hydroxyphenol protein, an oxidative damage product, in senile plaques. *Amyloid* 8, 11–21.
- Podlisny, M.B., Tolan, D.R., Selkoe, D.J., 1991. Homology of the amyloid beta protein precursor in monkey and human supports a primate model for beta amyloidosis in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 138, 1423–1435.
- Pugliese, M., Mascort, J., Mahy, N., Ferrer, I., 2006. Diffuse beta-amyloid plaques and hyperphosphorylated tau are unrelated processes in aged dogs with behavioral deficits. *Acta Neuropathol.* 112, 175–183.
- Ridley, R.M., Baker, H.F., Windle, C.P., Cummings, R.M., 2006. Very long term studies of the shedding of β -amyloidosis in primates. *J. Neural Transm.* 113, 1243–1251.
- Roertgen, K.E., Parisi, J.E., Clark, H.B., Barnes, D.L., O'Brien, T.D., Johnson, K.H., 1996. A β -Associated cerebral angiopathy and senile plaques with neurofibrillary tangles and cerebral hemorrhage in an aged wolverine (*Gulo gulo*). *Neurobiol. Aging* 17, 243–247.
- Roher, A.E., Lowenson, J.D., Clarke, S., Wolkow, C., Wang, R., Cotter, R.J., Reardon, I.M., Zürcher-Neely, H.A., Heinrichson, R.L., Ball, M.J., Greenberg, B.D., 1993. Structural alterations in the peptide backbone of β -amyloid core protein may account for its deposition and stability in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 268, 3072–3083.
- Rosen, R.F., Farberg, A.S., Gearing, M., Dooyema, J., Long, P.M., Anderson, D.C., Davis-Turak, J., Coppola, G., Geschwind, D.H., Paré, J.F., Duong, T.Q., Hopkins, W.D., Preuss, T.M., Walker, L.C., 2008. Tauopathy with paired helical filaments in an aged chimpanzee. *J. Comp. Neurol.* 509, 259–270.
- Saido, T.C., Iwatsubo, T., Mann, D.M.A., Shimada, H., Ihara, Y., Kawashima, S., 1995. Dominant and differential deposition of distinct β -amyloid peptide species, A β _{N3(pE)}, in senile plaques. *Neuron* 14, 457–466.
- Saido, T.C., Yamao-Harigaya, W., Iwatsubo, T., Kawashima, S., 1996. Amino- and carboxyl-terminal heterogeneity of β -amyloid peptides deposited in human brain. *Neurosci. Lett.* 215, 173–176.
- Sawamura, N., Tamaoka, A., Shoji, S., Koo, E.H., Walker, L.C., Mori, H., 1997. Characterization of amyloid β protein species in cerebral amyloid angiopathy of a squirrel monkey by immunocytochemistry and enzyme-linked immunosorbent assay. *Brain Res.* 764, 225–229.
- Schultz, C., Dehghani, F., Hubbard, G.B., Thal, D.R., Struckhoff, G., Braak, E., Braak, H., 2000a. Filamentous tau pathology in nerve cells, astrocytes, and oligodendrocytes of aged baboons. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 59, 39–52.

- Schultz, C., Hubbard, G.B., Rüb, U., Braak, E., Braak, H., 2000b. Age-related progression of tau pathology in brains of baboons. *Neurobiol. Aging* 21, 905–912.
- Schwab, C., DeMaggio, A.J., Ghoshal, N., Binder, L.I., Kuret, J., McGeer, P.L., 2000. Casein kinase 1 delta is associated with pathological accumulation of tau in several neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Aging* 21, 503–510.
- Selkoe, D.J., Bell, D.S., Podlisny, M.B., Price, D.L., Cork, L.C., 1987. Conservation of brain amyloid proteins in aged mammals and human with Alzheimer's disease. *Science* 235, 873–877.
- Sheng, J.G., Mrak, R.E., Griffin, W.S.T., 1997. Glial-neuronal interactions in Alzheimer disease: progressive association of IL-1 α ⁺ microglia and S100 β ⁺ astrocytes with neurofibrillary tangle stages. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 285–290.
- Tekirian, T.L., Saido, T.C., Markesbery, W.R., Russell, M.J., Wekstein, D.R., Patel, E., Geddes, J.W., 1998. N-terminal heterogeneity of parenchymal and cerebrovascular A β deposits. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57, 76–94.
- Uchihara, T., 2007. Silver diagnosis in neuropathology: principles, practice and revised interpretation. *Acta Neuropathol.* 113, 483–499.
- Uno, H., Alsum, P.B., Dong, S., Richardson, R., Zimbric, M.L., Thieme, C.S., Houser, W.D., 1996. Cerebral amyloid angiopathy and plaques, and visceral amyloidosis in aged macaques. *Neurobiol. Aging* 17, 275–281.
- Von Bergen, M., Friedhoff, P., Biernat, J., Heberle, J., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E., 2000. Assembly of τ protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif (³⁰⁶VQIVYK³¹¹) forming beta structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 5129–5134.
- Walker, L.C., Kitt, C.A., Schwam, E., Buckwald, B., Garcia, F., Sepinwall, J., Price, D.L., 1987. Senile plaques in aged squirrel monkeys. *Neurobiol. Aging* 8, 291–296.
- Walker, L.C., Masters, C., Beyreuther, K., Price, D.L., 1990. Amyloid in the brains of aged squirrel monkeys. *Acta Neuropathol.* 80, 381–387.
- Wegiel, J., Wisniewski, H.M., Sołtysiak, Z., 1998. Region- and cell-type-specific pattern of tau phosphorylation in dog brain. *Brain Res.* 802, 259–266.
- Wisniewski, H.M., Ghetti, B., Terry, R.D., 1973. Neuritic (senile) plaques and filamentous changes in aged rhesus monkeys. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 32, 566–584.

2) 神経筋疾患の RNAi 治療の展望

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 久保寺隆行

同 脳神経病態学 仁科 一隆

同 教授 横田 隆徳

key words RNA interference (RNAi), small interfering RNA (siRNA), short-hairpin RNA (shRNA), viral vector, non-viral vector

要 旨

small interfering RNA (siRNA) の遺伝子発現抑制効果は非常に高く、遺伝性疾患・ウイルス性疾患においてその変異遺伝子、病原遺伝子自体を siRNA で治療する究極の遺伝子治療を目指した基礎研究が進行している。神経疾患に対しては、優性遺伝形式を示す神経変性疾患を中心にウイルスベクター、非ウイルスベクターを用いた *in vivo* での投与実験が試みられており、その有効性を示す報告も増えつつある。しかしながら同時に、副作用を含めた問題点や発現抑制効率の低さといった課題も存在する。今後、これらの課題を克服し、siRNA が近い将来、難治性神経疾患における治療法の新しい選択肢となることが非常に期待される。

動 向

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これまで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 を生体内に人工的に誘導するには化学合成 siRNA (small interfering RNA) や siRNA 発現ベクターをツールとして利用し、さらにこれらを生体にデリバリーさせる方法として、siRNA の場合にはカチオニックリポソームやアテロコラーゲンなどの担体が、siRNA 発現ベクターの場合にはアデノ随伴ウイルスやアデノウイルス、レンチウイルスなどのウイルスベクターがある。

siRNA を用いた遺伝子治療の対象となる主要な疾患として、一般に変異蛋白が新たに病的機能を獲得する (gain of function) 優性遺伝性疾患があり、これらに対し siRNA で変異蛋白の発現を抑制することができれば、その発症機序のいかんに関わらず発症、進行を阻止することが期待できる¹⁾。神経疾患では、ポリグルタミン病、アミロイド前駆蛋白 (APP) や presenilin 1 (PS1) 遺伝子変異によるアルツハイマー病、superoxide dismutase (SOD1) 遺伝子変異による筋萎縮性側索硬化症 (ALS) など siRNA による治療が期待される神経変性疾患は多い。

神経系への導入に関しては、血液脳関門をいかにして通過させるか、という点が最大の障害であ

る。現時点では全身投与により神経系へデリバリーさせるのは困難で、脳内へ直接投与中心のアプローチが試みられている。ここでは、神経疾患に対して化学合成 siRNA, siRNA 発現ウイルスベクターを用いて RNAi を誘導する遺伝子治療の現状と問題点について各々概説する。

A. ウイルスベクターを用いた RNAi 遺伝子治療

神経疾患、特に神経変性疾患の治療には年単位の長期に渡る抑制効果が求められ、それにはウイルスベクターが有用である。非分裂細胞である神経細胞に対し遺伝子導入可能なウイルスベクターとして現在よく用いられているものにはアデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、レンチウイルスベクターがあげられる。アデノウイルスベクターは最も古くから用いられてきた方法で、感染する細胞の範囲が広く、発現効率も高いが、*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易いことが指摘されている。レンチウイルスベクターはレトロウイルスに属し、従来のレトロウイルスの弱点を補うために開発されたもので、分裂細胞だけでなく非分裂細胞にも感染し、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間発現させることが可能である。ただし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 siRNA 配列をデザインする必要がある。AAV ベクターは非病原性で安全性が高く、導入遺伝子の宿主ゲノムへの導入はほとんど起こらないが、アデノウイルスベクターと比較して、安定したより長期間の遺伝子発現が可能である。現在、脳神経系の遺伝子導入の臨床応用が最も期待されているベクターで、実際パーキンソン病を中心に臨床試

験が行われている。またここ数年、AAV ベクターの血清型と組織特異性の関係について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。特に新規血清型である 9 型は、マウスへの経静脈投与で血液脳関門を超え脳・脊髄に遺伝子導入可能であったとする報告もあり²⁾、神経疾患に対する遺伝子治療のベクターとして期待される。

1. siRNA 発現ベクター

ウイルスベクターを用い生体内に RNAi を誘導させるには、siRNA 発現 DNA ベクターの作製が必要となる。その発現システムは 2002 年に相次いで報告され、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^{3,4)} (図 1)。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センス鎖とアンチセンス鎖に相当する RNA が別々に転写され、細胞内で 2 本鎖を形成して siRNA を産生する。一方、ヘアピンタイプは microRNA (miRNA) のプロセス機構をヒントに考えられた siRNA 発現法で、センス鎖とアンチセンス鎖がループを介してつながる short-hairpin RNA (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 2)。その有効性は、プラスミドの細胞内濃度がより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。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

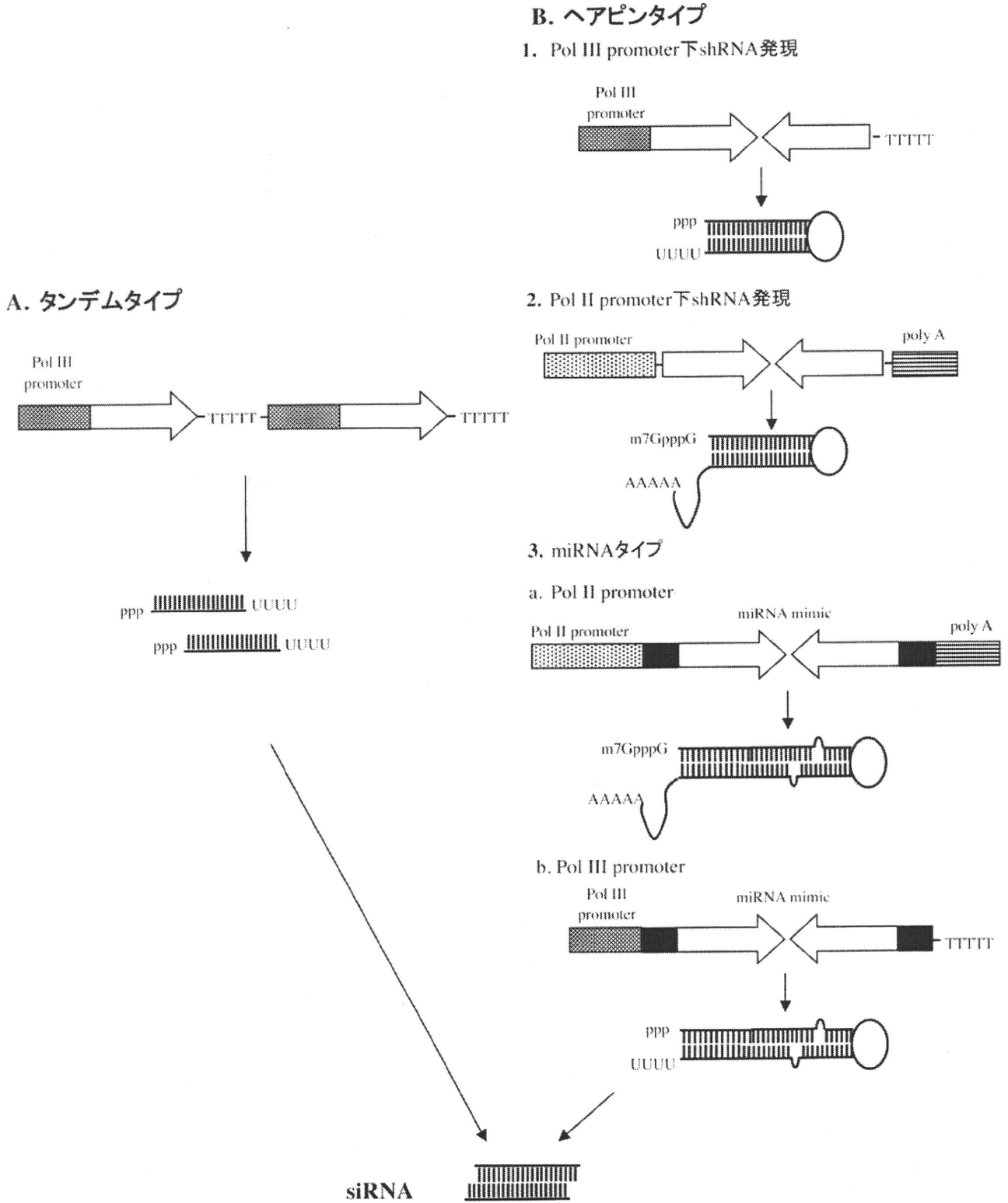


図1 siRNA発現ベクター

状態になっているため、標的遺伝子を組織・細胞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転写量が多い場合、shRNA毒

性の副作用を生じるおそれがある。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。

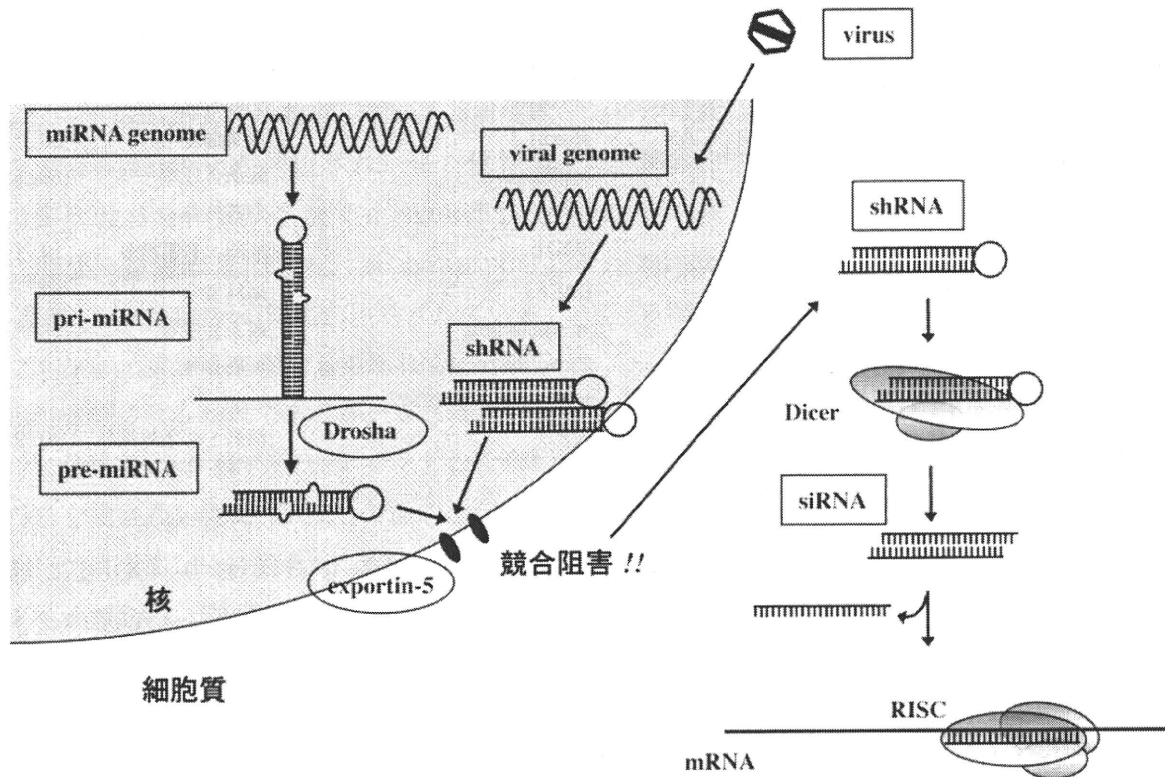


図2 細胞内における shRNA 機構と過剰 shRNA による miRNA プロセス障害

細胞内に shRNA 発現ウイルスベクターが導入されると、核内で転写された shRNA は exportin-5 により核から細胞質に移行し、細胞質で Dicer によって siRNA に切り出される。siRNA は一本鎖化され RISC 複合体へ取り込まれ、活性型 RISC は siRNA の配列に従って相補的な配列をもつ標的 mRNA を認識して切断する。核内に shRNA を過剰に発現させた場合、miRNA の前駆体である pre-miRNA の exportin-5 を介する核から細胞質への移行が競合的に阻害される結果、成熟 miRNA の発現が低下してしまう。

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⁶⁾。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⁷⁾ 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⁸⁾。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⁹⁾、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。

2. 神経疾患への応用

これまでに神経疾患に対する shRNA 発現ウイルスベクターを用いた遺伝子治療の *in vivo* における有用性を立証しようと、多くの研究者によって主にモデル動物を対象に投与実験が試みられてきた(表1)。主たる対象は優性遺伝性神経疾患で、特にポリグルタミン病は主要なターゲットとなっている。2004年に Xia らはポリグルタミン病の一つ SCA1 のモデルマウスに対し、ヒト ataxin-1 に対する shRNA 発現 AAV1 型ベクターの小脳への直接投与を行い、神経症状が軽減し、かつ病理学的にも小脳の分子層の構造が保たれていることを示し、神経疾患に対する shRNA 発現ウイルス

表1 神経疾患に対するshRNA発現ウイルスベクターの*in vivo*への応用例

疾患名	標的遺伝子	投与方法	文献	
遺伝性神経疾患	Spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1)	ataxin-1	小脳投与	7
	Spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3)	ataxin-3	線条体投与	26
	ハンチントン病	huntingtin	線条体投与	10, 11, 12
	家族性アルツハイマー病	APP	海馬投与	13
	家族性ALS	SOD1	筋肉・脊髄投与	14, 15, 16
孤発性神経疾患	アルツハイマー病	BACE1	海馬投与	17
	パーキンソン病	α -synuclein	線条体投与	18
	脳梗塞	transient receptor potential melastain 7 (TRPM7)	海馬投与	19
		PrP	海馬・線条体投与	20, 21

ベクターの*in vivo*での有用性を最初に証明した⁷⁾。

その後、ハンチントン病のモデルマウスにおいても huntingtin に対する shRNA 発現 AAV1 型ベクターの線条体内への直接投与で、huntingtin 遺伝子の発現を mRNA および蛋白レベルで抑制し、運動障害が改善したと報告された¹⁰⁾。さらに、変異 huntingtin 発現 AAV またはレンチウイルスベクターの線条体への局所投与により作製されたモデルラットに対し、shRNA 発現 AAV またはレンチウイルスベクターを同時投与することで線条体の神経変性を防ぐことができ、shRNA 発現ウイルスベクターでの変異 huntingtin の発現抑制が神経保護的に働くことが示された^{11,12)}。

アルツハイマー病では、家族性アルツハイマー病の原因遺伝子の一つであるアミロイド前駆蛋白 (APP) のスウェーデン型変異に対し、変異アレル特異的な shRNA をデザインし、その変異 APP 特異的 shRNA 発現 AAV5 ベクター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へ直接投与し、脳内の可溶性 A β 量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¹³⁾。

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に対しては、主に家族性 ALS の 10~20% を占める superoxide dismutase (SOD1) 遺伝子変異に対するアプ

ローチが試みられており、SOD1 に対する shRNA 発現レンチウイルス・AAV ベクターを 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の骨格筋に注入もしくは直接脊髄内に注入してその発症時期を遅延させたとの報告がなされた¹⁴⁻¹⁶⁾。骨格筋にベクターを投与した場合は、逆行性軸索輸送によって運動ニューロンに shRNA を導入することができる。

ほとんどのアルツハイマー病、パーキンソン病や ALS は家族歴のない孤発性で遺伝子異常は明らかでないが、それぞれの発症機序のキーとなる分子がわかれば、その発現を抑制することで治療が可能かもしれない。アルツハイマー病では A β がその発症に中心的役割を果たすと考えられており、アミロイド前駆蛋白から A β を切り出す酵素である β および γ セクレターゼは RNAi の標的遺伝子の候補と成り得る。この中で、 γ セクレターゼは Notch など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を生じるが、 β セクレターゼの本体といわれる BACE1 のノックアウトマウスは特別の異常を示さないため、有望な標的分子である。これまでに BACE1 に対する shRNA 発現レンチウイルスベクターをスウェーデン型変異 APP 過剰発現トランスジェニックマウスの海馬へ直接投与し、老人斑の沈着を減少させ行動異常も改善されたとの報告があ

る¹⁷⁾。

パーキンソン病では神経細胞脱落のみられる部位にレビー小体が形成されるが、その主要構成成分として α -synuclein が同定され、また優性遺伝性の家族性パーキンソン病で α -synuclein 遺伝子に変異、重複が見出され、 α -synuclein の凝集・蓄積と神経細胞死の関係が注目されている。そこで、 α -synuclein を標的とした RNAi 治療の可能性が検討されるわけであるが、 α -synuclein はさらに BACE1 と同様にノックアウトしても明瞭な異常を呈さないため、RNAi の標的遺伝子の候補としては望ましい特徴を有している。これまでに α -synuclein に対する shRNA 発現レンチウイルスベクターのラット線状体への局注で α -synuclein を抑制できることが示された¹⁸⁾。パーキンソン病モデル動物への投与で症状が改善されるのか、今後の進展が待たれる。その他にも、脳梗塞やプリオン病といった疾患に対して shRNA 発現ウイルスベクターの投与で症状が改善したとの報告がある¹⁹⁻²¹⁾。

3. 生体内における問題点

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つの異なる機序の副作用が予想されている。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 siRNA/shRNA により標的遺伝子以外の遺伝子の発現も抑制してしまう off-target 効果と、優性遺伝性疾患に対する治療の中で変異アレルのみでなく正常アレルの発現も損なわれてしまう変異遺伝子非特異的な発現抑制の問題、第3は発現させた shRNA 自身による副作用で、これには過剰な shRNA による細胞毒性の問題がある。ここでは siRNA/shRNA 固有の問題点である off-target 効果と変異遺伝子特異的な発現抑制、shRNA 毒性に関して紹介する。

a. 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 塩基と短いため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大きな問題となる。

Jackson²²⁾ らの検討では、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、さらに、センス鎖の直接効果によっても非標的遺伝子の抑制が生じることが示された。また、バイオインフォマティクス解析により off-target 効果を受ける遺伝子群は 3' 側の非翻訳領域 (UTR) 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²³⁾。これは標的遺伝子の 3' 側の UTR に結合しその発現を抑制する miRNA の作用機序に類似しており、siRNA のアンチセンス鎖の 5' から 2 塩基目 ~ 7 (8) 塩基目の 6 (7) 塩基 (miRNA のシード領域に相当) (図 3) 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 にこのシード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、siRNA のような短い配列の BLAST による相同性検索では見落としが多いという重大な欠点がある。最近、off-target 効果を最小とするために短い配列の相同性検索を高速かつ確実に実行できるプログラムが開発されウェブサイトが公開されている²⁴⁾。

b. 変異遺伝子特異的な発現抑制

優性遺伝性疾患を siRNA で治療しようとした場合、対立する 2 つのアレルを両方とも抑制してしまえば正常アレルのもつ野生型蛋白の機能喪失から新たな症状を引き起こす可能性があるため、疾患の発症に対して優性に働く変異アレルのみを選択的に発現抑制し、正常アレルには作用しない

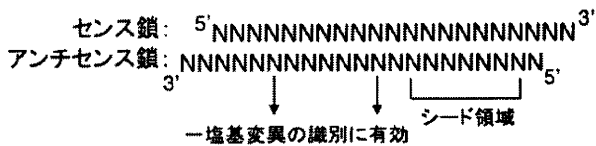


図3 siRNA 配列上の重要なヌクレオチドの位置

ことが望ましい。

siRNAと基質RNAとの特異性について、変異が1塩基のみの違いである点変異の場合には正常アレルと変異アレルの配列の差を認識して変異アレルのみを切断できるsiRNAの作製は可能である。現在のところ、1塩基対のミスマッチを識別させるにはミスマッチがシード領域中に位置していない場合に比較的良好な識別効果が得られ、アンチセンス鎖の5'から10および16塩基目の位置で、特にプリン:プリンミスマッチが最も効果的であると報告された²⁵⁾(図3)。さらにポリグルタミン病のように、繰り返し配列の長さかわることが変異でも、繰り返し配列数に関連する polymorphrism (SNP) やRNAの2次構造の違いを用いて変異アレル特異的な抑制が可能ながあり、SCA3とハチントン病でその効果が示された²⁶⁻²⁸⁾。

しかし、すべてのポリグルタミン病に関連するSNPが明らかになっているわけではなく、加えてpresenilin 1 (PS1) 遺伝子変異による家族性アルツハイマー病やsuperoxide disumutase 1 (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。これに対し、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蛋白を補おうという、いかなる遺伝子変異に対しても特異的で有効なRNAi法が考案され、最近その*in vivo*におけ

る有効性が証明された²⁹⁾。

c. 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³⁰⁾。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。この組織障害の機序として、ほ乳動物においては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ている³⁰⁾(図2)。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shRNA発現AAV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^{9,31)}。

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、ベクター投与量を下げることによって細胞毒性なく有効な至適投与量を見出すことができる場合がある³²⁾。また、あえてshRNA発現効率の悪いPol-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^{9,33)}。

B. 非ウイルスベクターを用いたRNAi遺伝子治療

非ウイルスベクターを用いたデリバリー方法は、ウイルスベクターと比較して一般的にデリバ

リー担体自体の毒性がない点で安全と言えるが、その有効性や持続性が劣ることが多い。したがってウイルスベクターと同等の効果を得るためには複数回の投与を要することもあり、経済性の面での問題もある。特に神経疾患を標的としたデリバリーの場合、血液脳関門をどのように通過させるか、という点が最大の障害となっている。神経細胞および神経細胞よりもアプローチしやすい脳血管内皮細胞への非ウイルスベクターを用いたデリバリー方法について概説する。

1. 直接投与する方法

実際の *in vivo* における siRNA の有用性を確かめる目的で、直接脳内に siRNA を注入する報告がなされている。最近の報告では siRNA にコレステロールを結合させたものを投与する³⁴⁾ ことや、カチオニックリポソームにトランスフェリンを結合させたものをベクターとして用いる³⁵⁾ ことでオリゴデンドロサイトにおける標的遺伝子発現抑制効果を上昇させている。臨床上これらの方法は実用性に欠けるが、実際に siRNA をデリバリーすることができれば、標的遺伝子の発現抑制効果が *in vivo* でも認められることを示しており、重要である。神経細胞に対しては、サルの中脳黒質に化学修飾した siRNA を投与することで、標的遺伝子である α -synuclein の発現を抑制するという研究が最近報告されている³⁶⁾。

血液脳関門で守られている神経細胞やオリゴデンドロサイトとは異なり、脳血管内皮細胞は全身投与でアクセスが比較的容易であるという利点がある。また脳血管内皮細胞は多発性硬化症などの免疫性神経疾患、脳血管障害を中心とした神経疾患における病態形成の場として、重要な役割を果たしていることが知られている。脳血管内皮細胞への siRNA デリバリーが可能になればこれらの疾患の治療法として応用が期待され、臨床上有用である。今までに報告されたのはハイドロダイナ

ミクス法と呼ばれる大量の溶媒とともに高い圧力で細胞内に siRNA を導入させる方法のみであり³⁷⁻³⁹⁾、臨床における実用性は少ない。今後各種非ウイルスベクターを用いた新規デリバリー方法の開発が望まれる。

2. 脳室内に投与する方法

全身投与して血液脳関門を通過するよりも、脳室内に投与して脳脊髄液関門を通過するほうが、脳室が閉鎖空間であるため薬物濃度を高い状態で維持できるなど様々な点で利点がある。そこで siRNA の脳室内投与についても研究が進められている。

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いての標的遺伝子の発現を 50% 程度抑制した報告があり⁴⁰⁾、注目されている。siRNA をカチオニックリポソームに導入して同様に長期脳室内持続注入して、脊髄や後根神経節、視床下部等において有効に導入に成功したという報告もある^{41,42)}。また、最近、HDL をベクターとして脳室内投与で有効に神経細胞に siRNA を導入した報告がなされた。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あるが⁴³⁾、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. 抗体やペプチドを利用して全身投与する方法

現在のところ、非ウイルスベクターを用いた siRNA のデリバリー方法の中で、静脈注射により血液脳関門を越えて中枢神経系に到達したという報告はほとんどない。血液脳関門を通過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⁴⁴⁾。

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研究されてきたが⁴⁵⁾、最近重要な報告がされた。狂犬病ウイルスの糖蛋白からデザインした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SOD1に対するsiRNAとで複合体を作製させた。この複合体を静脈投与することで血液脳関門を越えて、脳内のSOD1の発現を50%程度抑制した⁴⁶⁾。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osis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、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。

むすび

siRNAの有効性は高く神経疾患への応用を目的とした研究が急速に展開されている。ウイルスベクターを用いた方法は実際に*in vivo*での有効性を示した報告も多いが、同時に副作用を含めたいくつかの問題点も挙げられている。非ウイルスベクターを用いた方法の標的遺伝子発現抑制率は50%程度にとどまっており、ウイルスベクターと比較した際にその有効性は大きく劣るのが現状である。今後、これらの課題が克服され、siRNAが近い将来、難治性疾患における治療法の新しい選択肢となることが非常に期待される。

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: 42826-30.

- 2) Foust KD, Nurre E, Montgomery CL, et al. Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nat Biotechnol.* 2009; 27: 59-65.
- 3) Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science.* 2002; 296: 550-3.
- 4) Lee NS, Dohjima T, Bauer G, et al. Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nat Biotechnol.* 2002; 20: 500-5.
- 5) Miyagishi M, Sumimoto H, Miyoshi H, et al. Optimization of an siRNA-expression system with an improved hairpin and its significant suppressive effects in mammalian cells. *J Gene Med.* 2004; 6: 715-23.
- 6) Boudreau RL, Monteys AM, Davidson BL. Minimizing variables among hairpin-based RNAi vectors reveals the potency of shRNAs. *RNA.* 2008; 14: 1834-44.
- 7) Xia H, Mao Q, Paulson HL, Davidson BL. siRNA-mediated gene silencing *in vitro* and *in vivo*. *Nat Biotechnol.* 2002; 20: 1006-10.
- 8) Ely A, Naidoo T, Mufamadi S, et al. Expressed anti-HBV primary microRNA shuttles inhibit viral replication efficiently *in vitro* and *in vivo*. *Mol Ther.* 2008; 16: 1105-12.
- 9) McBride JL, Boudreau RL, Harper SQ, 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.* 2008; 105: 5868-73.
- 10) Harper SQ, Staber PD, He X, et al. RNA interference improves motor and neuropathological abnormalities in a Huntington's disease mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102: 5820-5.
- 11) Drouot V, Perrin V, Hassig R, et al. Sustained effects of nonallele-specific Huntingtin silencing. *Ann Neurol.* 2009; 65: 276-85.
- 12) Franich NR, Fitzsimons HL, Fong DM, et al. AAV vector-mediated RNAi of mutant huntingtin expression is neuroprotective in a novel genetic rat model of Huntington's disease. *Mol Ther.*

- 2008; 16: 947-56.
- 13) Rodriguez-Lebron E, Gouvion CM, Moore SA, et al. Allele-specific RNAi mitigates phenotypic progression in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Mol Ther*. 2009; 17: 1563-73.
 - 14) Miller TM, Kaspar BK, Kops GJ, et al. Virus-delivered small RNA silencing sustains strength in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 2005; 57: 773-6.
 - 15) 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.
 - 16) 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.
 - 17) Singer O, Marr RA, Rockenstein E, et al. Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model. *Nat Neurosci*. 2005; 8: 1343-9.
 - 18) Sapru MK, Yates JW, Hogan S, et al. Silencing of human alpha-synuclein in vitro and in rat brain using lentiviral-mediated RNAi. *Exp Neurol*. 2006; 198: 382-90.
 - 19) Sun HS, Jackson MF, Martin LJ, et al. Suppression of hippocampal TRPM7 protein prevents delayed neuronal death in brain ischemia. *Nat Neurosci*. 2009; 12: 1300-7.
 - 20) Pfeifer A, Eigenbrod S, Al-Khadra S, et al. Lentivector-mediated RNAi efficiently suppresses prion protein and prolongs survival of scrapie-infected mice. *J Clin Invest*. 2006; 116: 3204-10.
 - 21) White MD, Farmer M, Mirabile I, et al. Single treatment with RNAi against prion protein rescues early neuronal dysfunction and prolongs survival in mice with prion disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105: 10238-43.
 - 22) Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, et al. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol*. 2003; 21: 635-7.
 - 23) Birmingham A, Anderson EM, Reynolds A, et al. 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nat Methods*. 2006; 3: 199-204.
 - 24) Naito Y, Yoshimura J, Morishita S, et al. siDirect 2.0: updated software for designing functional siRNA with reduced seed-dependent off-target effect. *BMC Bioinformatics*. 2009; 10: 392.
 - 25) Schwarz DS, Ding H, Kennington L, et al. Designing siRNA that distinguish between genes that differ by a single nucleotide. *PLoS Genet*. 2006; 2: e140.
 - 26) Alves S, Nascimento-Ferreira I, Auregan G, et al. Allele-specific RNA silencing of mutant ataxin-3 mediates neuroprotection in a rat model of Machado-Joseph disease. *PLoS One*. 2008; 3: e3341.
 - 27) Plister EL, Kennington L, Straubhaar J, et al. Five siRNAs targeting three SNPs may provide therapy for three-quarters of Huntington's disease patients. *Curr Biol*. 2009; 19: 774-8.
 - 28) Li Y, Yokota T, Matsumura R, et al. Sequence-dependent and independent inhibition specific for mutant ataxin-3 by small interfering RNA. *Ann Neurol*. 2004; 56: 124-9.
 - 29) Kubodera T, Yamada H, Anzai M, et al. *In Vivo* Application of an RNAi Strategy for the Selective Suppression of a Mutant Allele. *Hum Gene Ther*. 2010 Jul 22. [Epub ahead of print]
 - 30) Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, et al. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature*. 2006; 441: 537-41.
 - 31) Ehlerl EM, Eggers R, Niclou SP, et al. Cellular toxicity following application of adeno-associated viral vector-mediated RNA interference in the nervous system. *BMC Neurosci*. 2010; 11: 20.
 - 32) Ulusoy A, Sahin G, Bjorklund T, et al. Dose optimization for long-term rAAV-mediated RNA interference in the nigrostriatal projection neurons. *Mol Ther*. 2009; 17: 1574-84.
 - 33) Giering JC, Grimm D, Storm TA, et al. Expression of shRNA from a tissue-specific pol II promoter is an effective and safe RNAi therapeutic. *Mol Ther*. 2008; 16: 1630-6.
 - 34) Chen Q, Butler D, Querbes W, et al. Lipophilic siRNAs mediate efficient gene silencing in oligodendrocytes with direct CNS delivery. *J Control Release*. 2010; 144: 227-32.
 - 35) Querbes W, Ge P, Zhang W, et al. Direct CNS delivery of siRNA mediates robust silencing in

- oligodendrocytes. *Oligonucleotides*. 2009; 19: 23-9.
- 36) McCormack AL, Mak SK, Henderson JM, et al. α -synuclein suppression by targeted small interfering RNA in the primate substantia nigra. *PLoS One*. 2010; 5: e12122.
- 37) Hino T, Yokota T, Ito S, et al. In vivo delivery of small interfering RNA targeting brain capillary endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 340: 263-7.
- 38) Campbell M, Kiang AS, Kenna PF, et al. RNAi-mediated reversible opening of the blood-brain barrier. *J Gene Med*. 2008; 10: 930-47.
- 39) Fuest C, Bankstahl M, Winter P, et al. *In vivo* down-regulation of mouse brain capillary P-glycoprotein: a preliminary investigation. *Neurosci Lett*. 2009; 464: 47-51.
- 40) 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 U S A*. 2004; 101: 17270-5.
- 41) 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*. 2006; 406: 240-3.
- 42) 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*. 2005; 1: 1-8.
- 43) Yoshitaka Uno, Wenying Piao, Kazutaka Nishina, et al. HDL Facilitates *In Vivo* Delivery of a-Tocopherol-Conjugated siRNA to the Brain. *Hum Gene Ther*. 2010; in press.
- 44) 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*. 2004; 10: 3667-77.
- 45) 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*. 2004; 24: 10040-6.
- 46) Kumar P, Wu H, McBride JL, et al. Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature*. 2007; 448: 39-43.

