

201027065B

厚生労働科学研究費補助金
障害者対策総合研究事業

神経・筋疾患の RNAi を用いた画期的治療法の開発

平成 20 年度～ 22 年度 総合研究報告書

研究代表者 水澤 英洋

平成 23(2011) 年 3 月

目 次

I. 総合研究報告

神経・筋疾患のRNAiを用いた画期的治療法の開発

水澤 英洋 ----- 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 9

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 13

I. 総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）
神経・筋疾患の RNAi を用いた画期的治療法の開発

平成20年度～22年度 総合研究報告書

研究代表者 水澤英洋 東京医科歯科大学 主任教授

研究要旨

1) 肝臓で産生される変異 transthyretin (TTR) が末梢神経に沈着して発症する家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) に対し、TTR に対する siRNA を肝臓への組織特異性の高いアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) 8 型を用いて FAP モデルマウス及びヒト肝細胞キメラマウスやカニクイザルへ投与を試み、TTR の発現を長期にかつ顕著に抑制することに成功し、shRNA の FAP への臨床応用に大きな可能性を明らかにした。2) すでに開発した shRNA 高発現トランスジェニックマウスの脳において、標的遺伝子の顕著な抑制下にあっても、長期間の遺伝子治療の副作用として懸念された microRNA の過剰飽和効果はないことを明らかにし、shRNA の神経変性疾患への臨床応用の原理的な安全性を示した。3) 血清中の内在性リポ蛋白をベクターとして short-interfering RNA (siRNA) を脳室内持続投与することで脳神経細胞における遺伝子発現を抑制する方法を開発した。4) 同様に内在性リポ蛋白をベクターとして siRNA を静脈投与することで脳血管内皮細胞における遺伝子発現を抑制する方法を開発し、Alzheimer 病、脳梗塞、多発性硬化症といった様々な神経疾患に対する新たな遺伝子治療として臨床応用しうる可能性を明らかにした。5) 遺伝性筋疾患の遺伝子治療のための基礎実験として、AAV9 型ベクターで新生児マウスの腹腔内に shRNA を投与する方法により、shRNA による肝毒性を回避して骨格筋で標的遺伝子を抑制でき、先天性筋疾患での遺伝子治療の可能性を示した。6) 孤発性 ALS の遺伝子治療のための基礎実験として、カニクイザルの頸髄前角細胞に AAV1 型ベクターで野生型 TDP-43 を過剰発現させ、進行性の前肢運動麻痺を発症させることに成功し、病理学的にブニナ小体様 cystatin-c 陽性顆粒蓄積像を確認した。

A. 目的

siRNA を用いて遺伝性の神経変性疾患、免疫性神経疾患、脳血管障害の siRNA/shRNA による遺伝子治療を行う。

B. 研究方法

1) AAV ベクター作製法：anti-TTR short hairpin RNA (shRNA) 発現ベクタープラスミド、パッケージングプラスミド、アデノヘルパープラスミドの3種類のプラスミドを HEK293 細胞にリン酸カルシウム法によってトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収、凍結・融解法によってベクター粒子を含む細胞溶解液を調整した。そこから塩析さらに iodexanol を用いた密度勾配超遠心法によって AAV ベクターを分離・精製した。ウイルス力価は、AAV ベクターより DNA を抽出し、TaqMan PCR 法にとりベクター粒子数を決定した。

2) 動物への AAV ベクター投与：FAP のモデルマウスである V30M TTR トランスジェニックマウス (TgM) 及び高置換ヒト肝細胞キメラマウス、カニクイザルに対し anti-TTR shRNA 発現 AAV ベクターを経静脈的に投与し、血液生化学に副作用の有無を判定するとともに経時的に血清変異 TTR を測定することと、肝臓組織の TTR mRNA の RT-PCR による定量により siRNA の有効性を評価した。3) shRNA TgM 作製：マウス ES 細胞に SOD1-siRNA 発現断片を導入し、クローンを選択した。高率に SOD1 タンパクの発現を抑制したクローンからキメラマウスを作製し B6 との掛け合わせにより F1 マウスを得た。大脳から small RNA を抽出して、各種 microRNA の Northern blotting、let-7a の標的分子 N-ras、N-myc mRNA の RT-PCR による定量などを行った。

また、V30M TTR TgM については山梨大学

前田秀一郎博士から分与いただき、ヒト肝細胞キメラマウスはフェニックスバイオから購入した。

4) 脳神経細胞への siRNA デリバリー：マウス BACE1 に対する siRNA を標的としたセンス鎖 27 塩基、アンチセンス鎖 29 塩基の siRNA を設計し、アンチセンス鎖 5' 端にトコフェロールを結合したもので、およひセンス鎖の 5' 端を Cy3 で蛍光標識したものを合成した。HDL はマウス血清より超遠心法による分画精製で得られたものを使用した。Toc-siBACE を HDL と会合させマウス第 3 脳室内に 7 日間持続投与し、その効果を検討した。

5) 脳血管内皮細胞への siRNA デリバリー：脳内では脳血管内皮細胞にのみ発現する organic anion transporter (OAT3) を標的遺伝子としたセンス鎖 21 塩基、アンチセンス鎖 23 塩基の siRNA を設計し、センス鎖の 3' 末端に cholesterol を共有結合させた (Chol-siOAT3)。Cy3 標識した Chol-siOAT3 (10mg/kg) を HDL に包含させてマウス尾静脈から 6 時間毎に 3 回投与し、24 時間後に脳を摘出して微小血管分画を分離し、脳血管内皮細胞で OAT3 遺伝子抑制効果を検証した。

6) 骨格筋への siRNA デリバリー：新生児マウス腹腔内に SOD1 を標的とした 1×10^{11} v.g. の shRNA 発現 AAV9 を投与して 4 週後、肝臓、心筋、骨格筋 (大腿四頭筋、ハムストリング) の病理検索と SOD1 のウェスタンブロット、RT-PCR、ノザンブロットを行いその効果を判定した。

7) ALS サルモデル作製：Flag で標識したヒト TDP-43 発現 AAV1 をカニクイザルに接種し、行動解析と、正中神経の末梢神経伝導検査をおこなった。さらに脊髄組織を病理組織学的に検索した。カニクイザル脊髄組織切片を作成し、anti-cystatin-c rabbit polyclonal antibody (DAKO) を用いて免疫組織化学的検索を行った。

(倫理面への配慮)

すべての動物実験は東京医科歯科大学動物実験委員会、医薬基盤研医学長類センターの審査と許可を得て行ない、動物の苦痛を除く最大限の努力をした。

C. 研究結果、D. 考察

1) siRNA 発現アデノ随伴ウイルスベクターを用いた FAP の遺伝子治療

(a) FAP モデルマウスへの投与

FAP の代表的変異である V30M トランスサイレチン (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。肝臓に対し組織特異性の高い AAV8 型を用い、V30M TTR TgM へ anti-TTR shRNA 発現 AAV8 型ベクターを 5×10^{11} v. g. /body, 5×10^{10} v. g. /body の用量で単回全身投与し、血液生化学で副作用を評価するとともに経時的に血清変異 TTR を測定した。

その結果、#172 shRNA/AAV8 の低用量では抑制効果は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 (図 1)。

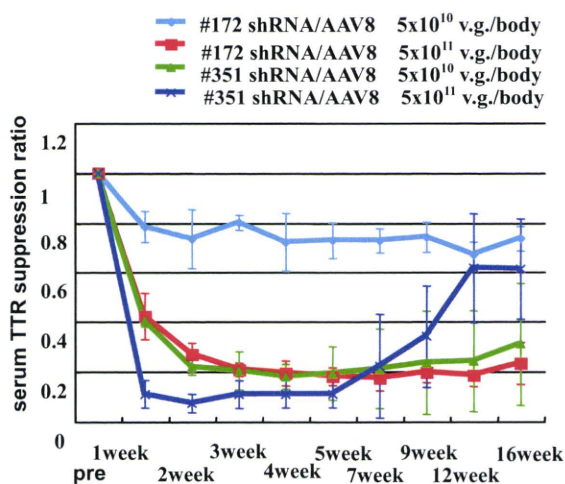


図 1 血清変異 TTR 分泌量 (治療前比)

これらの著明な TTR 発現抑制効果は投与後 3 週のマウス肝臓の TTR mRNA の定量によっても確認できている (data not shown)。

高容量で見られた 1 か月後の抑制効果減弱と肝障害は従来報告のある miRNA 過剰飽和効果に合致するものであったが、容量を

適切に調節することにより、安全に長期間の変異 TTR を著明に抑制することが可能であることを明確に示せた。

(b) ヒト肝細胞キメラマウスへの投与

shRNA 発現 AAV ベクターの有用性を FAP モデルマウスへの投与で示すことができた。続いて、この shRNA 発現 AAV ベクターのヒトにおける有効性を検証する目的で高置換ヒト肝細胞キメラマウスへの投与を試みた。

高置換ヒト肝細胞キメラマウスは免疫不全肝障害マウスにヒトの肝細胞を移植し、マウス肝臓の 70-90%以上が正常ヒト肝細胞に置き換えられたマウスである。

このキメラマウスに #351 shRNA/AAV8 を投与し有効性を血清 TTR の Western blotting で評価したところ、 5×10^{11} v. g. /body の投与量で強いヒト TTR の分泌抑制効果が得られた (図 2)。

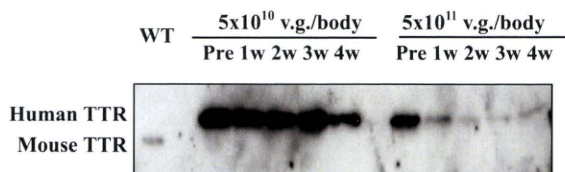


図 2 血清 TTR の WB
 5×10^{11} v. g. /body の投与量でヒト TTR の発現抑制効果が認められた。

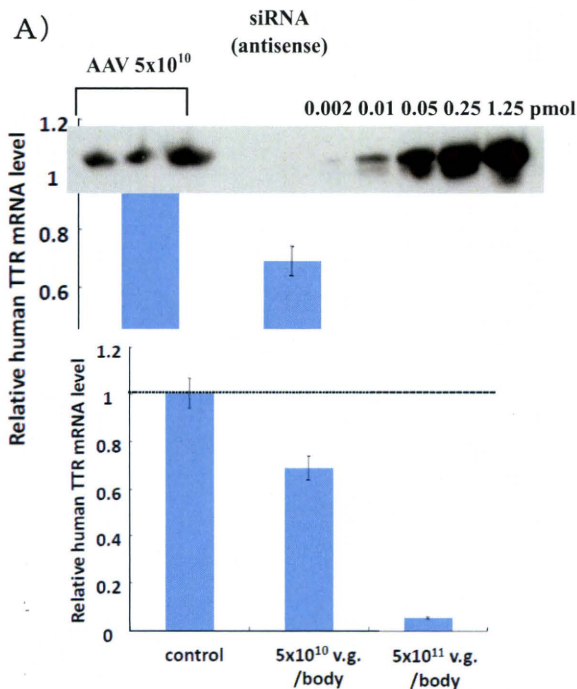
さらに、キメラマウスの肝臓にプロセスされた siRNA アンチセンス鎖が Northern blotting により確認され (図 3 A)、ヒト TTR mRNA の RT-PCR による定量によっても 5×10^{11} v. g. /body の投与量で 90% 以上の顕著な抑制効果が確認できた (図 3 B)。

ヒト肝細胞でマウス肝細胞と同じ有効性・siRNA 発現を得るためには約 10 量の AAV 量を必要で、AAV8 によるヒト U6 プロモーターの shRNA 発現効率の種差と考えられたが、肝逸脱酵素上昇や肝臓組織変化はなく、安全に有効なヒト TTR 遺伝子抑制効果が得られた。

(c) ヒト肝細胞キメラマウスへの投与

カニクイザル対し anti-TTR shRNA 発現 AAV8 型ベクターを $1.0-6.25 \times 10^{11}$ の用量で経静脈的に全身性に投与し、血清 TTR の顕

著な抑制効果が得られた (図 3 C)。副作用は高容量投与群で ALT の上昇が見られたが一過性であった。



C)

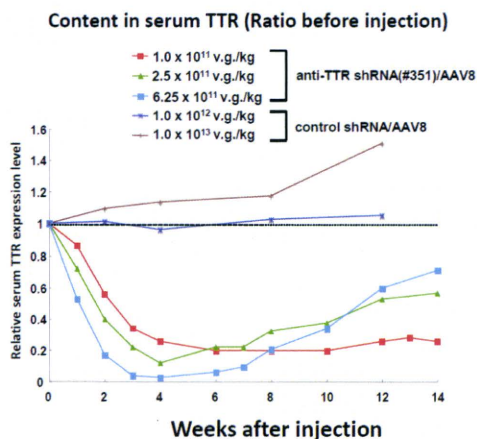


図 3 キメラマウス肝臓における anti-TTR siRNA 発現 (A) とヒト TTR mRNA 発現抑制 (B)、カニクイザルの血清変異 TTR 分泌量 (治療前比) (C)

2) 長期 shRNA 発現安全性の検討

変性疾患を shRNA で遺伝子治療するには shRNA の長期発現により、microRNA 過剰飽和による副作用が懸念されるので、すでに報告した SOD1 shRNA 高発現トランスジェニックマウスの脳において、microRNA の発現

を検討した。

shRNA TgM の大脳で 80%以上の SOD1 遺伝子発現抑制が認められたが、Let7a や miR-124a の microRNA 発現量やその標的分子 N-ras, N-myc の発現に変化がないことを明らかにした (図 4)。この事実は脳への shRNA の長期の発現によっても shRNA のプロセス機構を共有する microRNA の成熟に障害がなく、神経変性疾患における shRNA の臨床応用の安全性を示した。

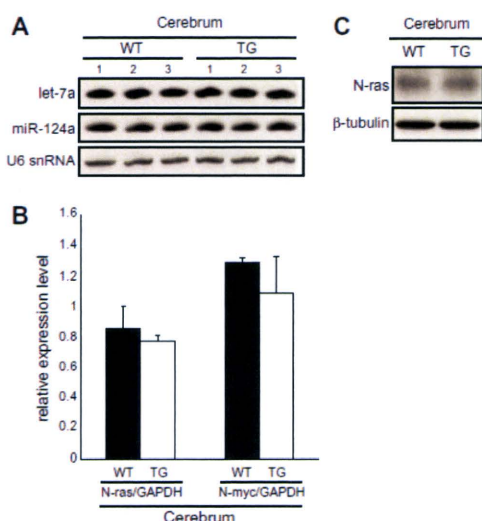


図 4 shRNA トランスジェニックマウスの内因性 microRNA 発現 (A), let-7a の標的分子 N-ras, N-myc mRNA (B), N-ras タンパクの発現量

3) 脳神経細胞への siRNA デリバリー方法の開発

我々はマウス第 3 脳室内に Toc-siRNA 単独または HDL と結合させた Toc-siRNA を核酸量として siRNA 2 mg/kg、1ul/hr の速度で浸透圧ポンプにより 7 日間持続投与した。Toc-siRNA を HDL と結合させることにより海馬神経細胞に広範かつ著明な siRNA の取り込みが認められた (図 5)

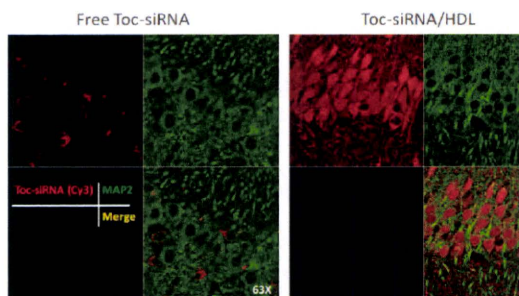


図 5 MAP2 でラベルした海馬 CA3 神経細胞の細胞質に Toc-siBACE/HDL (Cy3 赤) が見られた。

siRNA 取り込み陽性部位の qRT-PCR による評価では、コントロールに対して海馬において Toc-siBACE vs. Toc-siBACE/HDL, 6 vs. 36%、頭頂葉において 13 vs. 64%の BACE1 mRNA の遺伝子抑制が得られた。BACE1 タンパクは Toc-siBACE/HDL を投与したマウスの頭頂葉皮質において 52%の発現抑制が得られた (図 6)。

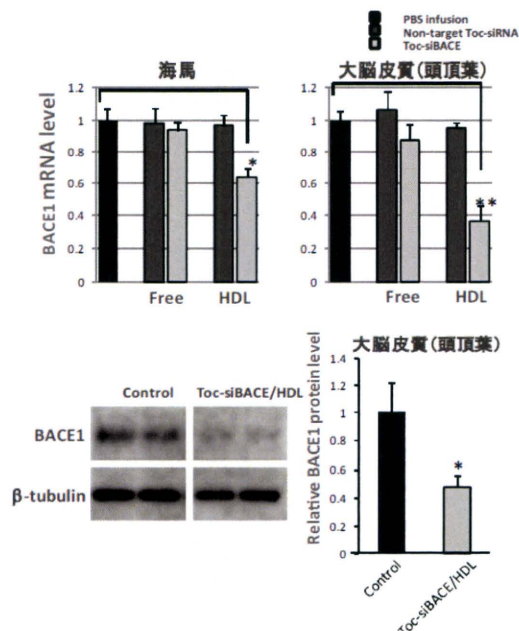


図 6 海馬、大脳皮質での Toc-siBACE/HDL 投与による BACE1 抑制効果。

今回の方法で得られた遺伝子抑制効果は最大で 60%程度であった。ウイルスベクターによる shRNA を用いた系では BACE1 の 40%の抑制により同様に AD 様病理変化を著明に改善させること、常染色体優性遺伝性家族性 AD で APP 遺伝子は 1 アリルの重複で発症することなどから、60%前後の遺伝子抑制効果は神経疾患の病理を改善することが期待できる。

4) 脳血管内皮細胞への siRNA デリバリー方法の開発

組織学的評価において、HDL 分画と混合して投与したときに脳血管内皮細胞にシグナルが強く観察された (図 7)。

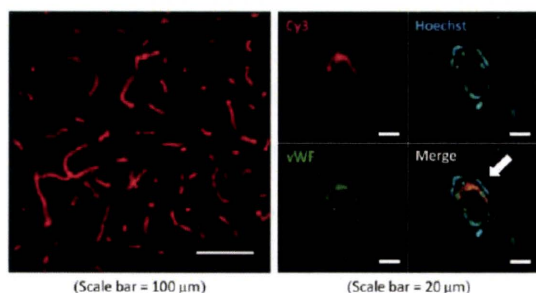


図7 Cy3 標識 Chol-siOAT3 (10 mg/kg) を HDL と混合して静脈内投与した 1 時間後における線条体の組織所見 von Willebrand (vWF) 因子抗体で示された脳血管内皮細胞の細胞質に一致した Cy3 シグナルを認めた。

Chol-siOAT3 を単独でまたは LDL と混合して投与した場合には有意な遺伝子発現抑制を認めなかったが、HDL と混合して投与した場合には Chol-siOAT3 の総投与量が 10mg/kg のときに 20~30%、30mg/kg のときに 50~60%という用量依存性の OAT3 mRNA の発現低下を認めた (図 8 a, b)。

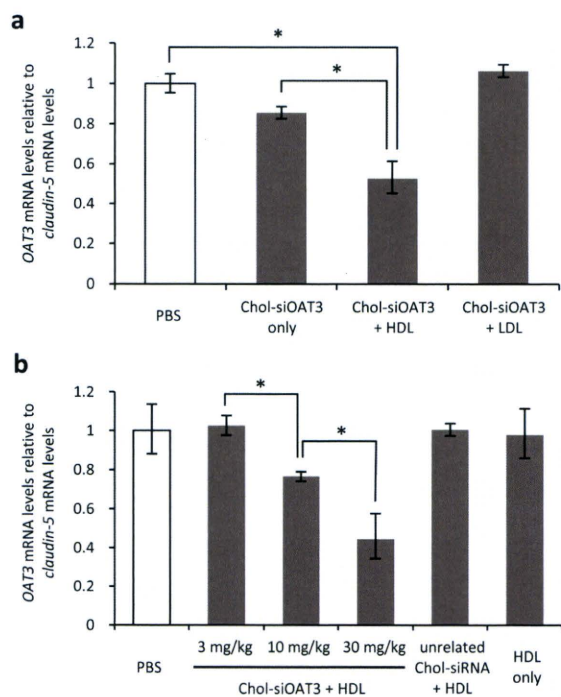


図8 Chol-siOAT3 (10 mg/kg) を単独でまたはリポ蛋白と混合して 12 時間おきに 3 回静脈内投与し、最終投与から 6 時間後に採取した全脳における OAT3 mRNA の RT-PCR (a) HDL と混合して投与した場合のみ、約 50% の OAT3 mRNA の reduction が見られた。(b) HDL と混合して投与した場合には容量依存性の効果が得られ、unrelated Chol-siRNA を HDL と混合して投与した場合には効果が得られなかった。

5) 骨格筋に対する標的遺伝子抑制方法の開発

成体マウスへ shRNA 発現 AAV9 を尾静脈から投与すると、投与 4 週後の肝臓では 90% 以上の SOD mRNA 抑制率を認めたが、骨格筋での抑制率は 30~40%にとどまり、さらに高濃度の AAV を投与すると重篤な肝機能障害が生じた。一方、新生児マウス腹腔内に AAV9 を投与して 4 週後、肝臓での SOD1 抑制率は低かったが、骨格筋 (ハムストリング) では RNA, タンパクレベルともに約 70% 抑制できた (図 9)。さらに副作用については、新生児マウス腹腔内投与では発育に異常なく、血清学および病理学的にも肝臓、心筋、骨格筋に異常を認めなかった。

SOD1-siRNA の発現を調べたところ、心筋と骨格筋では siRNA が発現していたのに対し、肝臓では siRNA の発現がほとんど認められなかった。肝臓で siRNA の発現が低い理由は生後肝臓が分裂してウイルスゲノムが希釈されることが考えられた。

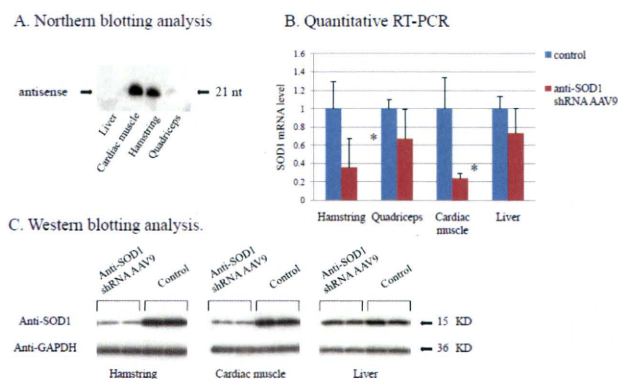


図9 AAV9-shRNA を新生児腹腔内投与行って 4 週後の解析 心筋と骨格筋で siRNA は発現しているが、肝臓での発現は著明に低下している (A)。siRNA が発現している心筋と骨格筋で抑制効率が高かった (B, C)。

本結果は shRNA 発現 AAV9 の全身投与で、心筋と骨格筋で標的遺伝子発現を有意に抑制ができた初めての成功例であり、今後はこの系を使って先天性筋疾患の治療法の確立を目指す。

6) ALS サルモデル作製

TDP-43 を過剰発現させた個体 (n=3) では、すべての個体で AAV 注入後約 2 週から注入側の前肢に進行性の麻痺を生じ始め、4 週

後には上腕は中等度の運動麻痺、手指は完全麻痺となった。末梢神経伝導検査において正中神経刺激の複合筋活動電位が誘発されなくなった。ALS患者の神経細胞では、プニナ小体と呼ばれる細胞内顆粒状病変が確認され、その構成因子がCysCである。そこで、CysC抗体を用いて検索を行ったところ、ヒトTDP-43を発現する脊髄前角神経細胞に一致してCysC陽性顆粒像が認められることが明らかとなった。プニナ小体はALSの神経病理学的なマーカーとされ、サルモデルにプニナ小体様のCysC陽性顆粒像が確認されたことから、本研究計画の成果によって我々が作出したヒトTDP-43発現カニクイザルは、非常に優れたALSモデル動物であると考えられた。

E. 結論

1) マウスモデルおよびヒト肝細胞においてshRNAによるin vivo有効を示し、FAPに対するshRNA遺伝子治療の有用性を明らかにした。

2) 神経変性疾患の治療で懸念される長期のshRNA発現によるmicroRNA過剰飽和効果が回避可能なことをshRNATgMを用いて示した。

3) 内在性リポ蛋白を用いたベクターとして用いて、脳室内投与によりToc-siRNAを中枢神経系へ、静脈内投与によりchol-siRNAを脳血管内皮細胞に標的遺伝子の抑制に成功した。

4) shRNAをAAV9に組み込み新生児マウスの腹腔内投与することで、骨格筋で標的遺伝子抑制に成功し、遺伝性筋疾患に対するshRNA遺伝子治療の可能性を示した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nishina K, Unno T, Uno Y, Kubodera T, Kanouchi T, Mizusawa H, Yokota T. Efficient In Vivo delivery of siRNA to liver by conjugation of α -Tocopherol. *Mol Ther* 16:734-740, 2008

2) Sakamoto N, Tanabe Y, Yokota T, Saito K, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y,

Tasaka M, Sakurai Y, Chen CH, Yano M, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Maekawa S, Enomoto N, Kohara M, Watanabe M. Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA. *J Gastro Hepatol* 23:1437-1447, 2008

3) Rossi D, Brambilla L, Valori CF, Roncoroni C, Crugnola A, Yokota T, Bredesen DE, Volterra A. Focal degeneration of astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Death Differ* 15: 1691-1700, 2008

4) Nishitoh H, Kadowaki H, Nagai A, Maruyama T, Yokota T, Fukutomi H, Noguchi T, Matsuzawa A, Takeda K, Ichijo H. ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress- and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1. *Gene Dev* 22: 1451-1464, 2008

5) Sasaguri H, Mitani T, Anzai M, Kubodera T, Saito Y, Yamada H, Mizusawa H, Yokota T. Difference in silencing efficiency among tissues and lack of oversaturation of microRNA pathway in short hairpin RNA transgenic mice. *FEBS Lett* 583: 213-218, 2009

6) Kubodera T, Yamada H, Anzai M, Ohira S, Yokota S, Hirai Y, Mochizuki H, Shimada T, Mitani T, Mizusawa H, Yokota T. In Vivo application of an RNAi strategy for the selective suppression of a mutant allele. *Hum Gene Ther* 22: 27-34, 2011

7) Mayra A, Tomimitsu H, Kubodera T, Kobayashi M, Piao W, Sunaga F, Hirai Y, Shimada T, Mizusawa H, Yokota T. Intraperitoneal AAV9-shRNA inhibits target expression in neonatal skeletal and cardiac muscles. *Biochem Biophys Res Commun* 405: 204-209, 2011

8) Uno Y, Piao W, Nishina K, Miyata K, Mizusawa H, Yokota T. HDL facilitates in vivo delivery of α -tocopherol-conjugated siRNA to the brain. *Hum Gene Ther*, 2011 (EPub)

9) Okabayashi S, Kimura N. LGI3 interacts with flotillin-1 to mediate APP trafficking and exosome formation. *Neuroreport* 21: 606-610, 2010

10) Oikawa N, Kimura N, Yanagisawa K.

Alzheimer-type tau pathology in advanced aged nonhuman primate brains harboring substantial amyloid deposition. *Brain Res* 1315: 137-149, 2010

11) 久保寺隆行, 横田隆徳, 水澤英洋. ALS の遺伝子治療. *Clinical Neuroscience* 26: 337-339, 2008

12) 久保寺隆行, 横田隆徳. 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. *Antisense* 12:37-47, 2008

13) 横田隆徳. 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. *神経治療学* 25:31-39, 2008

14) 横田隆徳. RNA 干渉の神経系への臨床応用. *神経治療学* 25:663-668, 2008

15) 横田隆徳. MicroRNA と中枢神経系. *Brain Nerve* 61:167-176, 2009

16) 横田隆徳. RNA 干渉による ALS の治療戦略. *臨床神経* 49:821-823, 2009

17) 久保寺隆行, 仁科一隆, 横田隆徳. 神経筋疾患の RNAi 治療の展望. *Annual Review 神経* 2011. 中外医学社, 42-52, 2011.

2. 学会発表

1) Yokota T, Nishinai K, Saito Y, Mitani T, Mizusawa H. Efficient In Vivo delivery of siRNA to liver by conjugation of α -Tocopherol. 11th American Society of Gene Therapy, 5.30, 2008, Boston, USA

2) Nishina K, Yoshida K, Uno Y, Kuwahara H, Piao W, Mizusawa H, Yokota T. Efficient in vivo delivery of cholesterol-conjugated siRNA to the liver using endogenous chylomicron remnant. The 13th Annual Meeting of the American Society of Gene and Cell Therapy. 5.20, 2010, Washington, USA

3) Yokota T. Chylomicron-mediated vitamin E-conjugated siRNA delivery from the intestine to the liver. *PacificChem* 2010. 12.16, 2010, Honolulu, USA

4) 横田隆徳, 水澤英洋. siRNA による神経疾患の遺伝子治療. 第 47 回日本神経学会総会. 5.11, 2006, 東京

5) 宇野 佳孝, 桑原 宏哉, 植山 真由美, 吉田 規恵, 仁科一隆, 坂本直哉, 水澤英洋, 横田隆徳. α トコフェロール結合による生体肝への siRNA デリバリー. 第 18 回アンチセンスシンポジウム. 11.17, 2008, 岐阜

6) 大平進嘉, 久保寺隆行, 村山祥子, 海野敏紀, 横田繁史, 平井幸彦, 島田 隆, 水上浩明, 明里宏文, 水澤英洋, 横田隆徳. shRNA 発現アデノ随伴ウイルスベクターによる遺伝子治療法の開発. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会. 12.10, 2008, 神戸

7) 横田隆徳. RNA 干渉を用いた遺伝子治療の現状. 第 82 回日本生化学会大会. 10.24, 2009, 神戸

8) 朴 文英, 宇野佳孝, 仁科一隆, 水澤英洋, 横田隆徳. 神経細胞への siRNA の in vivo デリバリー方法の開発. 第 51 回日本神経学会総会. 5.20, 2010, 東京

9) 桑原宏哉, 仁科一隆, 吉田規恵, 宇野佳孝, 朴 文英, 水澤英洋, 横田隆徳. リポ蛋白ベクターを用いた脳血管内皮細胞への siRNA の in vivo デリバリー法の開発. 第 51 回日本神経学会総会. 5.20, 2010, 東京

10) 久保寺隆行, 水澤英洋, 横田隆徳. siRNA 発現アデノ随伴ウイルスベクターを用いた FAP の遺伝子治療-カニクイザルでの検討. 第 51 回日本神経学会総会. 5.20, 2010, 東京

11) 仁科一隆, 吉田規恵, 桑原宏哉, 宇野佳孝, 朴 文英, 水澤英洋, 横田隆徳. 内在性リポ蛋白を用いたコレステロール結合 siRNA の肝臓へのデリバリー. 第 2 回日本 RNAi 研究会. 8.26, 2010, 広島

12) 桑原宏哉, 仁科一隆, 吉田規恵, 仁科智子, 朴 文英, 水澤英洋, 横田隆徳. 内在性リポ蛋白を用いた脳血管内皮細胞への siRNA の in vivo デリバリー法の開発. 第 2 回日本 RNAi 研究会. 8.26, 2010, 広島

13) 桑原宏哉, 仁科一隆, 吉田規恵, 仁科智子, 朴 文英, 水澤英洋, 横田隆徳. 内在性リポ蛋白を用いた脳血管内皮細胞への siRNA の in vivo デリバリー. 第 20 回アンチセンスシンポジウム. 12.2, 2010, 神戸

14) 吉田規恵, 仁科一隆, 桑原宏哉, 朴 文英, 宇野佳孝, 水澤英洋, 横田隆徳. 内在性リポ蛋白を用いた肝臓へのコレステロール結合 siRNA のデリバリー方法の検討. 第 20 回アンチセンスシンポジウム. 12.2, 2010, 神戸

15) 宇野 佳孝, 朴 文英, 仁科 一隆, 水澤

英洋、横田 隆徳 , HDL をベクターとした
中枢神経系への siRNA デリバリー. 第 20
回アンチセンスシンポジウム. 12. 3, 2010,
神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況

1) 特許出願中 :

Yokota T, et al. System for delivering nucleic acids for suppressing target gene by utilizing endogenous chylomicron. (米国特許出願番号 60/990, 79: PCT/JP2008/003523)

2) [知的財産] (特願2010-185501)

特許の名称 : 経大腸吸収用医薬組成物

発明人 : 横田隆徳、他

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
久保寺隆行, 仁科一隆, 横田隆徳	神経筋疾患のRNAi治療の展望	鈴木則宏 祖父江 元 荒木信夫 宇川義一 川原信隆	Annual Review 神経2011	中外医学社	日本	2011	42-52

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nishina K, Unno T, Uno Y, Kubodera T, Kanouchi T, Mizusawa H, Yokota T.	Efficient In Vivo delivery of siRNA to liver by conjugation of α -Tocopherol	Mol Ther	16	734-740	2008
Sakamoto N, Tanabe Y, Yokota T, Saito K, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Iitsui Y, Tasaka M, Sakurai Y, Chen CH, Yano M, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Maekawa S, Enomoto N, Kohara M, Watanabe M	Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA	J Gastro Hepatol	23	1437-1447	2008

Rossi D, Brambilla L, Valori CF, Roncoroni C, Crugnola A, Yokota T, Bredesen DE, Volterra A	Focal degeneration of astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis	Cell Death Differ	15	1691-1700	2008
Nishitoh H, Kadowaki H, Nagai A, Maruyama T, Yokota T, Fukutomi H, Noguchi T, Matsuzawa A, Takeda K, Ichijo H	ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress- and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1	Gene Dev	22	1451-1464	2008
Sasaguri H, Mitani T, Anzai M, Kubodera T, Saito Y, Yamada H, Mizusawa H, Yokota T	Difference in silencing efficiency among tissues and lack of oversaturation of microRNA pathway in short hairpin RNA transgenic mice	FEBS Lett	583	213-218	2009
Uno Y, Piao W, Nishina K, Miyata K, Mizusawa H, Yokota T	LDL facilitates in vivo delivery of a-tocopherol-conjugated siRNA to the brain	Hum Gene Ther	Epub		2011
Mayra A, Tomimitsu H, Kubodera T, Kobayashi M, Piao W, Sunaga F, Hirai Y, Shimada T, Mizusawa H, Yokota T	Intraperitoneal AAV9-shRNA inhibits target expression in neonatal skeletal and cardiac muscles	Biochem Biophys Res Commun	405	204-209	2011
Kubodera T, Yamada H, Anzai M, Ohira S, Yokota S, Hirai Y, Mochizuki H, Shimada T, Mitani T, Mizusawa H, Yokota T	In Vivo application of an RNAi strategy for the selective suppression of a mutant allele	Hum Gene Ther	22	27-34	2011

Okabayashi S, Kimura N	LGI3 interacts with flotillin-1 to mediate APP trafficking and exosome formation	Neuroreport	21	606-610	2010
Oikawa N, Kimura N, Yanagisawa K.	Alzheimer-type tau pathology in advanced aged nonhuman primate brains harboring substantial amyloid depositio	Brain Res	1315	137-149	2010
久保寺隆行, 横田隆徳, 水澤英洋	ALSの遺伝子治療	Clinical Neuroscience	26	337-339	2008
久保寺隆行, 横田隆徳	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	Antisense	12	37-47	2008
横田隆徳	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	神経治療学	25	31-39	2008
横田隆徳	RNA干渉の神経系への臨床応用	神経治療学	25	663-668	2008
横田隆徳	MicroRNAと中枢神経系	Brain Nerve	61	167-178	2009
横田隆徳	RNA干渉によるALSの治療戦略	臨床神経	49	821-823	2009

Ⅲ. 研究成果の刊行物・別刷

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

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

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

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

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

INTRODUCTION

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

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

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

RESULTS

Design of α -tocopherol-bound siRNA

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

The first two authors contributed equally to this work.

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

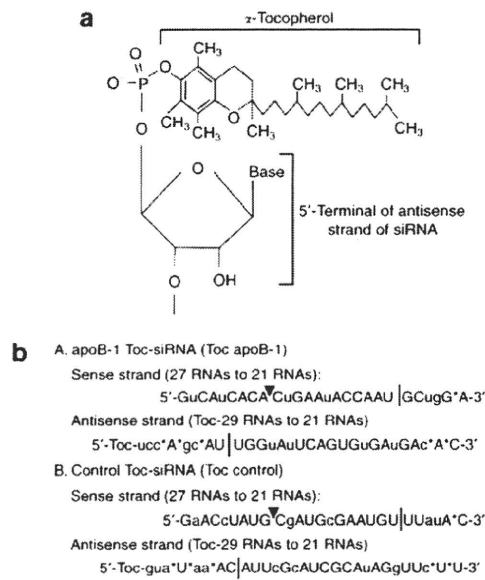


Figure 1 Design of α -tocopherol-bound short interfering RNA (siRNA). **(a)** Chemical structure of vitamin E (α -tocopherol)-bound siRNA. **(b)** Sequences and chemical modifications of α -tocopherol-bound siRNA for targeting *apoB* messenger RNA (apoB-1 Toc-siRNA) or for targeting unrelated gene (control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

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

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

Improved stability of siRNA with preserved cleaving efficiency by chemical modifications

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

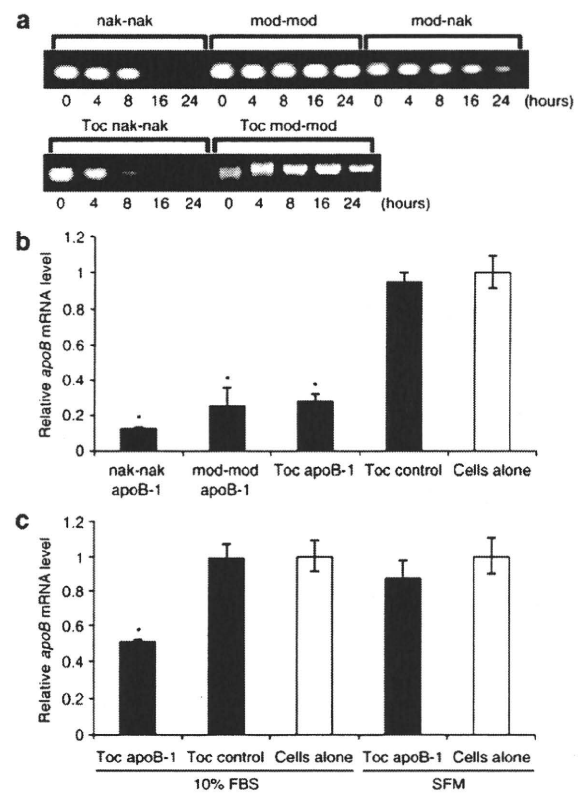


Figure 2 Improvement in stability and preservation of cleaving efficiency of short interfering RNA (siRNA) after chemical modification. **(a)** The stability of modified siRNA in the serum. The both-strands-naked siRNA (nak-nak), both-strands-modified siRNA (mod-mod), one-sense-strand-modified siRNA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

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

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

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

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

Effective delivery and processing of Toc-siRNA in mice liver

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

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

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

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

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

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

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

No side effects are produced by Toc-siRNA

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

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

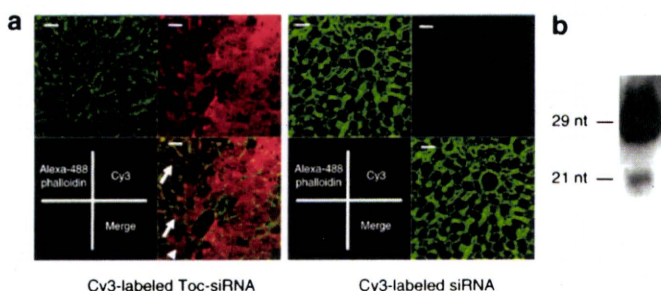


Figure 3 Targeted delivery of Toc-siRNA to mice livers after injection. (a) Confocal images of liver sections from mice injected intravenously with Cy3-labeled Toc-siRNA (left panel) and Cy3-labeled siRNA (right panel). Cy3 signal (red) was noted in hepatocytes (arrowhead) and nonparenchymal cells (arrows).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

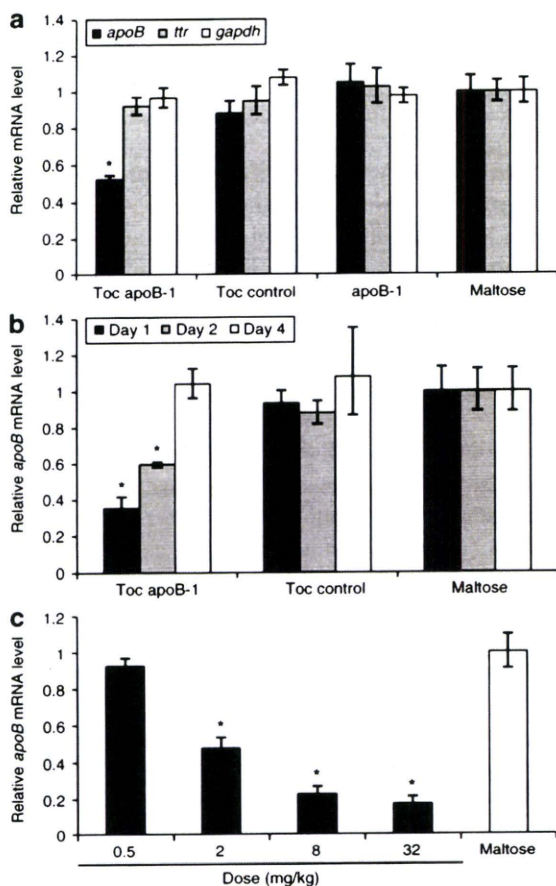


Figure 4 Toc-siRNA-mediated silencing of mouse *apoB* messenger RNA (mRNA) in liver is potent, specific, and dose-dependent. **(a)** The quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR) analyses of several endogenous mRNAs, *apoB*, *ttr*, and *gapdh* mRNAs in the liver (removed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

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

DISCUSSION

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

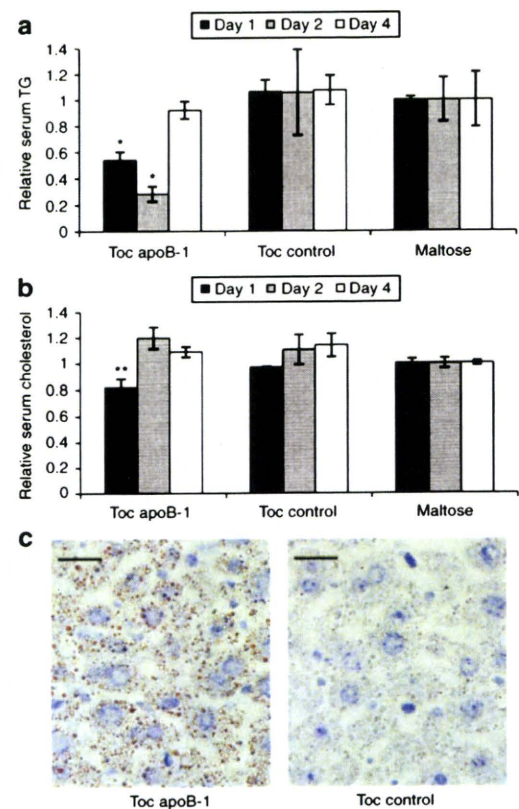


Figure 5 Phenotypic change in lipid metabolism caused by inhibition of liver *apoB* messenger RNA (mRNA). Decreased levels of **(a)** serum triglyceride (TG) and **(b)** cholesterol after knockdown of *apoB* mRNA by apoB-1 Toc-siRNA. Sera were collected from mice before the injections and at 24, 48,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

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