

家族性筋萎縮性側索硬化症のRNA干渉を用いた遺伝子治療*

横田 隆徳**

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

はじめに

RNA干渉 (RNAi) は2本鎖RNAによって配列特異的に遺伝子の発現が抑制される現象で、1998年にFireとMelloらによって報告され、2006年のノーベル医学生理学賞に選ばれた。RNAiはいかなる遺伝子に対してデザインできて、その標的遺伝子の発現抑制効果は他の核酸医薬であるアンチセンス核酸の 10^{3-7} 倍、リボザイムの 10^{2-6} (自験) 高いと言われている。しかもその配列特異性も高く1塩基の違いの認識も可能であり、医療分野における臨床応用についてはその発見当初から大きく期待されていた。siRNAを用いた遺伝子治療の研究はすでにウイルス性疾患、悪性腫瘍などで急速に進んでいる。ここでは、ALSへのsiRNAおよびshort hairpin RNA (shRNA)の核酸医薬としての開発の研究現状と問題点について概説する。

I. RNA干渉とは

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

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

* Gene Therapy with siRNA to Familial ALS.

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

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

II. 遺伝性神経変性疾患の RNAi による 遺伝子治療の基本概念

遺伝性疾患でゲノム遺伝子の変異が原因で発症する場合、遺伝子変異に起因する発症機序には変異のある遺伝子の遺伝子産物であるタンパクの本来のもつ機能の消失または低下する場合 (loss of function) と変異遺伝子や変異タンパクが新たに病的機能を獲得する場合 (gain of function) の2つがあることが知られている。遺伝子変異が常染色体にある場合、対立する2つのアレルの双方に遺伝子変異があ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ので、本来のタンパクの機能の影響は少ないか全くなく、変異アレルから発現した変異タンパクが何らかの正常と異なった機能 (gain of adverse function) や毒性 (gain of toxic function) を新たに獲得することにより疾患が発症することが想定されている。

SOD1 変異による筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS)、多くのポリグルタミン病、APP や PS1 遺伝子変異による Alzheimer 病、 α -synuclein 変異による Parkinson 病などの常染色体優性遺伝形式を示す主要な神経変性疾患の多くにおいて gain of toxic function がその発症機序と考えられている。このような疾患の治療を考える場合、変異したタンパクの発現を抑制する方法があれば、その機序の如何にかかわらず発症、進行を防止することが期待できるわけである。ただし、近年発見された家族性 ALS の遺伝子である angiogenin¹⁰⁾ は常染色体優性遺伝性だが、変異タンパクの活性低下が原因とされる haplo-type insufficiency がその機序として考えられ、

上記の戦略はあてはまらない。

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

以下に述べるように、siRNA の中枢神経へのデリバリーは容易でないため、まず RNAi という新しい戦略で本当に ALS が治療可能であるかどうかを検証する目的で、我々は siRNA を全身で発現させた siRNA トランスジェニックマウスを作製して、これを ALS のモデルマウスである G93A 変異 SOD1 トランスジェニックマウスと掛け合わせてその治療効果を検討した⁷⁾。siRNA トランスジェニックマウスのトランスジーンを Fig. 1A 示す。短い RNA の転写の能力に優れた Pol III 系の U6 プロモーターの下流に sense 配列とパリンドロミックな antisense 配列を 9塩基の hinge 配列で結合させた short hairpin 型の SOD1 に対する siRNA を過剰に発現するベクターを作製した。sense 配列には複製に際して配列を安定させるために mismatch mutation を挿入した。この shRNA 発現断片を ES 細胞に導入して、50 の ES 細胞クローンから Western blot によって ES 細胞の内因性の SOD1 タンパクの発現が最も抑制されたクローンを選択して、それを B6 マウスの blastocyst に microinjection してキメラマウスを作製した。これを B6 と交配させて F1: トランスジェニックマウスを作製した。このマウスは中枢神経において siRNA のアンチセンス鎖 (ガイド鎖) の発現を確認し、内因性 SOD1 の発現を 80% 以上抑制することに成功した。

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

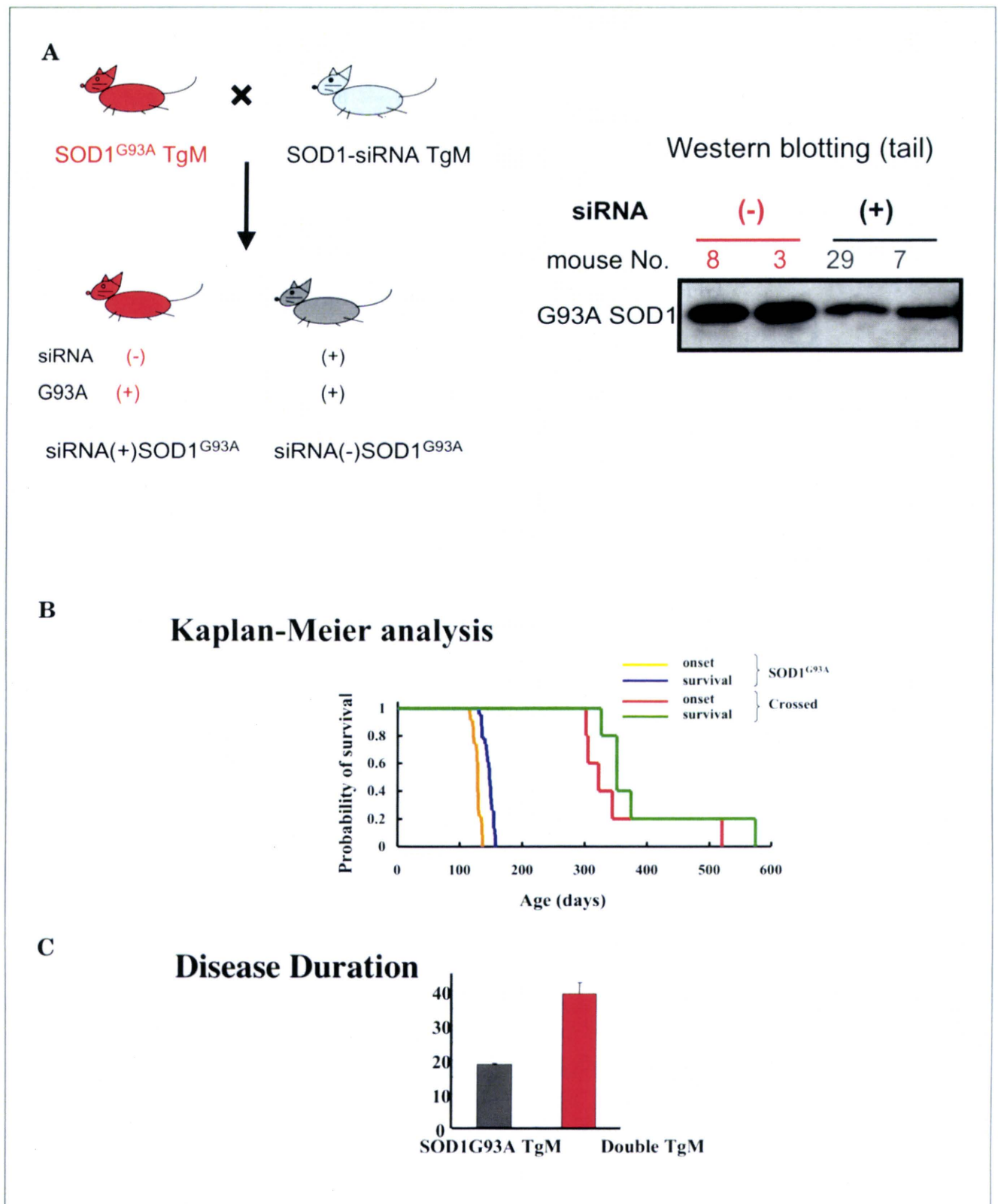


Fig. 1 Transgenic siRNA delayed the ALS phenotype in the mice model (ref 7, 8)

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

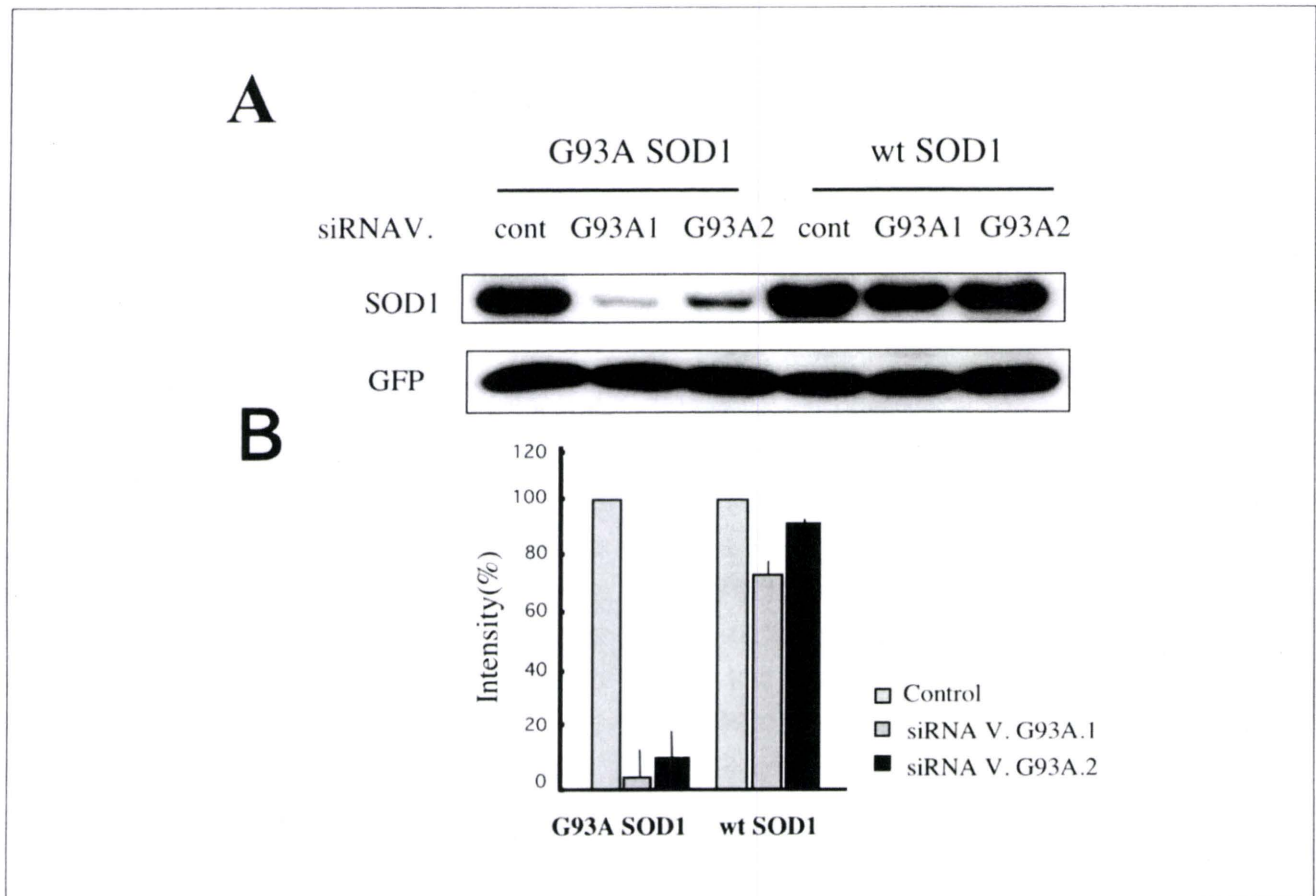


Fig. 2 siRNA specific for mutant SOD1 (ref 10)

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

IV. 変異遺伝子特異的なRNAi法

野生型SOD1はノックアウトしても明瞭な神経症状は示さないが、脂肪肝の副作用が知られており⁹⁾、例えばSCA6の場合、その原因遺伝子alphaカルシウム1Aチャンネルのノックアウトマウスは生後1~2週で死亡するなど、正常アレルの発現抑制は新たな症状をきたす可能性が高い。したがって、優性遺伝疾患の治療には、正常アレルの発現を損わずに、変異アレルの発現のみを抑制することが望ましい。SOA1変異のように1塩基の違いである点変異でも正常アレルと変異アレルの配列の差を認識して変異アレルのみを切断できるsiRNAのデザインはある程度は可能である。G93A SOD1の場合はsiRNAの配列の5'側から10から13番目の塩基に変異部位を置いた場合が最も野生型SOD1の切断効率が低下した¹⁰⁾。最近の

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

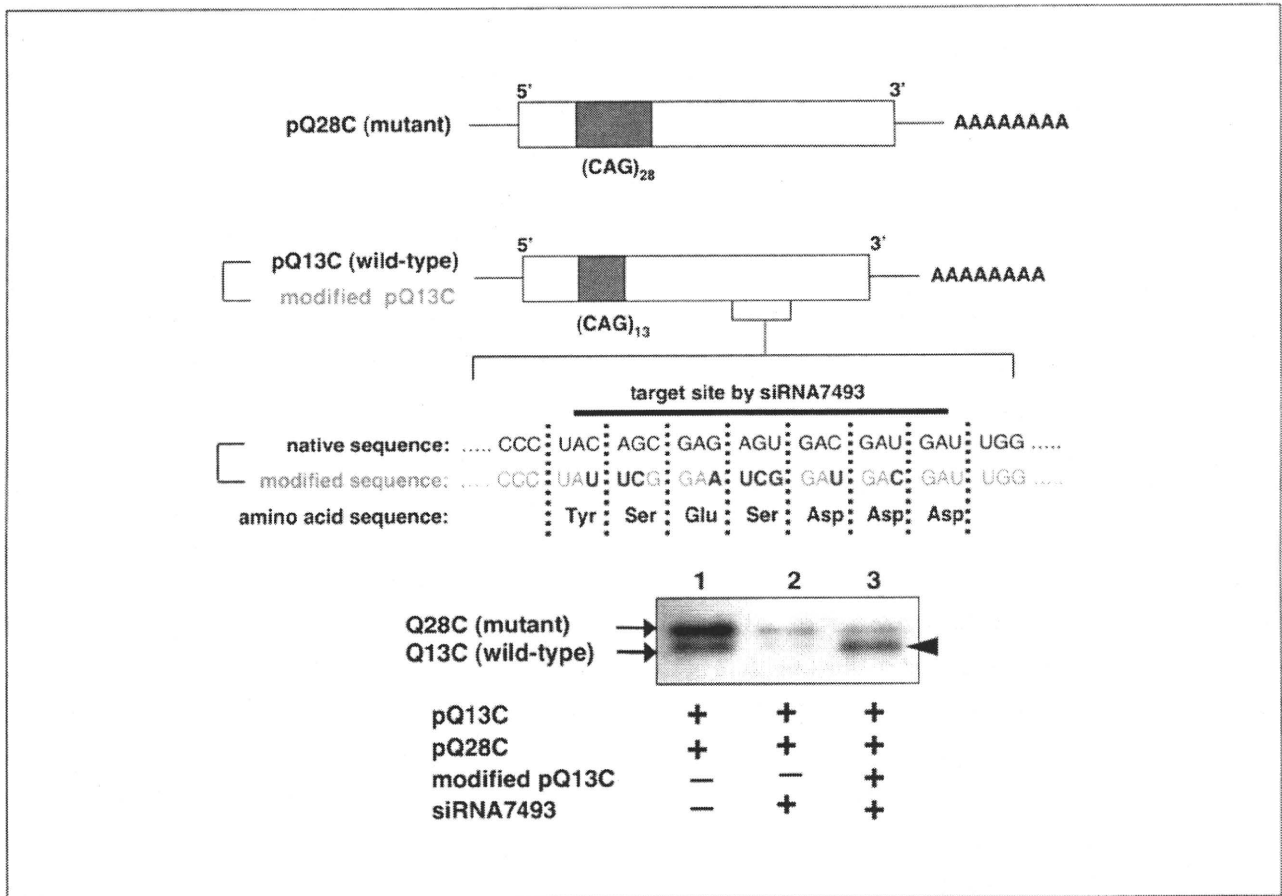


Fig. 3 Schema of mRNAs transcribed by expression plasmids of truncated CACNA1A

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

神経変性疾患の一つであるポリグルタミン病を対象に証明した¹²⁾ (Fig. 3).

V. siRNAのin vivoへのデリバリー

1. siRNA発現ウイルスベクター

ALSなどの神経変性疾患の治療にはRNAiの年単位の長期に渡る効果が必要であり、それにはウイルスベクターが必要となる。siRNA発現ベクターコンストラクトをアデノウイルスやレンチウイルス、レトロウイルス、アデノ随伴ウイルスなどのウイルスベクターに組み込んで作製したsiRNA発現ウイルスベクターを用いて、in vivoの細胞へのsiRNA導入の報告が次々とされている¹⁵⁾。

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

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

しかし、最近AAVを用いたshRNAの全身投与にて、遅発性の致命的な重篤な肝障害があるとの重要な報告がなされた²⁰⁾。この肝障害は導入したsiRNAの発現量に依存し、複数の異なる標的遺伝子に対するshRNAにおいて生じており、複数

のmicroRNA (miRNA) の低下を伴っていた。これは細胞内でshRNAと内因性のmiRNAの前駆体であるpre-miRNAが共通のプロセス機構であって、核から細胞質への移行タンパクであるexportin-5やAgo2をshRNAが競合することにより、miRNAの成熟化プロセスが障害されて成熟miRNAが低下するためと考察されている。我々もマウスにおいて同様の肝障害を経験しており、今後のshRNA発現ベクターを用いた遺伝子治療の問題になる可能性がある。

2. siRNA核酸の脳室内投与

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

3. 抗体や細胞導入シグナルペプチドを利用した新しいsiRNAのデリバリー

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

神経細胞へ導入するため細胞導入シグナルペプチドの利用も研究されてきたが²⁸⁾、ごく最近に重要な報告がされた。狂犬病ウイルスの糖タンパクからデザインした29アミノ酸からなるペプチドに9つのアルギニンを結合させ(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、脳内のSOD1の発現を50%程度抑制したという²⁹⁾。狂犬病ウイルスは脳血管内皮や神経細胞に発現しているニコチンアセチルコリン受容体の $\alpha 7$ サブユニットに結合して受容体介在性トランスサイトーシスによって脳内に運ばれ神経細胞にデリバリーしたと考えている。その明確な輸送経路や脳内局在が明らかになり、詳細な副作用の評価ができれば有効な投与量がsiRNA量で1~2mg/kgと比較的低容量であることから、今後の臨床応用へ将来性が期待される。

VI. off-target効果

siRNAは確かに標的遺伝子に対する配列特異性は高いが、用いるsiRNAが21塩基と短い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はsiRNAの発見当初からある大きな問題である。off-target効果には濃度依存性がみられるために、できるだけ投与量を最小限に抑える必要があることは言うまでもないが、理論的なoff-target回避方法が模索されている。

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

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

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

おわりに

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

文 献

- 1) Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E et al : TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436 : 740-744, 2005
- 2) Tomari Y, Zamore PD : Perspective : machines for RNAi. *Genes Dev* 19 : 517-529, 2005
- 3) Matranga C, Tomari Y, Shin C et al : Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* 123 : 607-620, 2005
- 4) Elbashir S, Harborth J, Lendeckel W et al : Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411 : 494-498, 2001
- 5) Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R : A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 29 : 550-553, 2002
- 6) Greenway MJ, Andersen PM, Russ C et al : ANG mutations segregate with familial and 'sporadic' amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 38 : 411-413, 2006
- 7) Saito Y, Yokota T, Mitani T et al : Transgenic small interfering RNA halts amyotrophic lateral sclerosis in a mouse model. *J Biol Chem* 280 : 42826-42830, 2005
- 8) Yokota T, Sasaguri H, Saito Y et al : Increase of disease duration of amyotrophic lateral sclerosis in a mouse model by transgenic small interfering RNA. *Arch Neurol* 64 : 145-146, 2007
- 9) Uchiyama S, Shimizu T, Shirasawa T : CuZn-SOD deficiency causes ApoB degradation and induces hepatic lipid accumulation by impaired lipoprotein secretion in mice. *J Biol Chem* 281 : 31713-31719, 2006
- 10) Yokota T, Miyagishi M, Hino T et al H : siRNA-based inhibition of superoxide dismutase expression ; potential use in familial Amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Com* 314 : 283-291, 2004
- 11) Schwartz DS, Ding H, Kennington L et al : Designing siRNA that distinguish between genes that differ by a single nucleotide. *PLoS Genetics* 446 : 864-865, 2006
- 12) Kubodera T, Yokota T, Ishikawa K, Mizusawa H : New RNAi strategy for selective suppression of a mutant allele in polyglutamine disease. *Oligonucleotides* 15 : 298-302, 2005
- 13) Singer O, Marr RA, Rockenstein E et al : Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model. *Nat Neurosci* 8 : 1343-1349, 2005
- 14) Li M, Ona VO, Guegan C et al : Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model. *Science* 288 : 335-339, 2000
- 15) Davidson BL, Harper SQ : Viral delivery of recombinant short hairpin RNAs. *Methods Enzymol* 392 : 145-173, 2005
- 16) Ralph GS, Radcliffe PA, Day DM et al : Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nat Med* 11 : 429-433, 2005
- 17) Raoul C, Abbas-Terki T, Bensadoun JC et al : Lentiviral-mediated silencing of SOD1 through RNA interference retards disease onset and progression in a mouse model of ALS. *Nat Med* 11 : 423-428, 2005
- 18) Miller TM, Kaspar BK, Kops GJ et al : Virus-delivered small RNA silencing sustains strength in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 57 : 773-776, 2005
- 19) Kaplitt MG, Feigin A, Tang C et al : Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease : an open label, phase I trial. *Lancet* 369 :

- 2056-2058, 2007
- 20) Grimm D, Streetz KL, Jopling CL et al : Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 441 : 537-541, 2006
 - 21) Thakker DR, Natt F, Husken D et al : Neurochemical and behavioral consequences of widespread gene knockdown in the adult mouse brain using nonviral RNA interference. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 : 17270-17275, 2004
 - 22) Guissouma H, Froidevaux MS, Hassani Z et al : In vivo siRNA delivery to the mouse hypothalamus confirms distinct roles of TR beta isoforms in regulating TRH transcription. *Neurosci Lett* 406 : 240-243, 2006
 - 23) Luo MC, Zhang DQ, Ma SW et al : An efficient intrathecal delivery of small interfering RNA to the spinal cord and peripheral neurons. *Mol Pain* 1 : 1-8, 2005
 - 24) Smith RA, Miller TM, Yamanaka K et al : Antisense oligonucleotide therapy for neurodegenerative disease. *J Clin Invest* 116 : 2290-2296, 2006
 - 25) Song E, Zhu P, Lee SK et al : Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat Biotechnol* 23 : 709-717, 2005
 - 26) MacNamara JO, Andrechek ER, Wang Y et al : Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. *Nat Biotechnol* 24 : 1005-1015, 2006
 - 27) Zhang Y, Zhang YF, Bryant J et al : Intravenous RNA interference gene therapy targeting the human epidermal growth factor receptor prolongs survival in intracranial brain cancer. *Clin Cancer Res* 10 : 3667-3677, 2004
 - 28) Davidson TJ, Harel S, Arboleda VA et al : Highly efficient small interfering RNA delivery to primary mammalian neurons induces MicroRNA-like effects before mRNA degradation. *J Neurosci* 24 : 10040-10046, 2004
 - 29) Kumar P, Wu H, McBride JL et al : Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature* 448 : 39-43, 2007
 - 30) Jackson AL, Bartz SR, Schelter J et al : Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 21 : 635-637, 2003
 - 31) Birmingham A, Anderson EM, Reynolds A et al : 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nat Methods* 3 : 199-204, 2006
 - 32) Jackson AL, Burchard J, Schelter J et al : Widespread siRNA "off-target" transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *RNA* 12 : 1179-1187, 2006
 - 33) Jackson AL, Burchard J, Leake D et al : Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing. *RNA* 12 : 1197-1205, 2006

Gene Therapy with siRNA to Familial ALS

Takanori YOKOTA

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

RNA interference (RNAi) is the process of sequence-specific, post-transcriptional gene silencing, initiated by double-stranded RNA (dsRNA). The gene silencing therapy with siRNA is a promising strategy to autosomal dominant diseases, such as familial ALS with SOD1. Transgenic siRNA markedly delayed ALS phenotype in the model mice, indicating the proof of principle of this strategy. There is a recent progress in the delivery of siRNA to the central nervous system. Especially adeno-associated virus is safe and long-lasting delivery method to neurons.

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

RNA干渉の神経系への臨床応用*

横田 隆徳**

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

はじめに

遺伝性神経変性疾患をはじめとして、変異遺伝子自体を short interfering RNA (siRNA) で治療するといった究極の遺伝子治療を旨とした基礎研究が進行している。RNA干渉 (RNAi) は2本鎖RNAによって配列特異的に遺伝子の発現が抑制される現象で、1998年にFireとMelloらによって報告され、2006年のノーベル医学生理学賞に選ばれた。細胞内に導入された2本鎖RNAはDicerと呼ばれるRNase III核酸分解酵素ファミリーによって21~24merの短い3'突出型の2本鎖の siRNAに分解される。siRNAはDicerの結合タンパクであるTRBP (human immunodeficiency virus transacting response RNA-binding protein) によってAgo2 (Ago2) にリクルートされ¹⁾、RLC (RISC-loading complex) を形成する²⁾。siRNAの2本鎖のうちパッセンジャー鎖 (センス鎖) はAgo2によりその中央部で切断されて取り除かれ、ガイド鎖 (アンチセンス鎖) のみの1本鎖化が起こる。1本鎖となったsiRNAは他のいくつかの蛋白質を伴ってRISC複合体 (RNA induced silencing complex) を構成する³⁾。このRISC複合体がガイド鎖に相補的な配列を持つ標的RNAにアクセスして、その中央で分解する³⁾。しかし、哺乳動物における2本鎖RNAの導

入はPKRやRIG-Iや2' 5' oligosynthetaseの活性化による非特異的な翻訳抑制やRNAの分解を引き起こし、ホストの細胞が死んでしまうため、分子生物学的手法としても遺伝子治療の方法としても大きな妨げになっていた。しかし、2001年に、RNAi機構の中間産物であるsiRNAを合成して用いることによってこれらの副反応が回避され、効率的で特異的な遺伝子発現抑制が可能となった⁴⁾。さらに、siRNA配列を短い9merのループ配列でつないだstem型のパリン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ェンとして用いられている⁵⁾。

I. 遺伝性神経変性疾患のRNAiによる
遺伝子治療の基本概念

遺伝性疾患でゲノム遺伝子の変異が原因で発症する場合、遺伝子変異に起因する発症機序には変異のある遺伝子の遺伝子産物であるタンパクの本来のもつ機能の消失または低下する場合 (loss of function) と変異遺伝子や変異タンパクが新たに病的機能を獲得する場合 (gain of function) の2つがあることが知られている。遺伝子変異が常染色体にある場合、対立する2つのアレルの双方に

* Clinical Application of siRNA to the Nervous System.

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

遺伝子変異があつてはじめて発症する常染色体劣性遺伝形式の疾患の多くはloss of functionをその機序とし、一方のアリルのみで発症する常染色体優性遺伝形式の疾患の多くの場合はgain of functionであることが多い。常染色体優性遺伝の場合は野生型のアリルからは原則として正常個体の半分の量の正常のタンパクは発現しているので、本来のタンパクの機能の影響は少ないか全くなく、変異アリルから発現した変異タンパクが何らかの正常と異なった機能 (gain of adverse function) や毒性 (gain of toxic function) を新たに獲得することにより疾患が発症することが想定されている。SOD1変異による筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、多くのポリグルタミン病、APPやPS1遺伝子変異によるAlzheimer病、 α -synuclein変異によるParkinson病などの常染色体優性遺伝形式を示す主要な神経変性疾患の多くにおいてgain of toxic functionがその発症機序と考えられている。このような疾患の治療を考える場合、変異したタンパクの発現を抑制する方法があれば、その機序の如何にかかわらず発症、進行を防止することが期待できるわけである。我々はSOD1に対するsiRNAを過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製して、これをALSのモデルマウスであるG93A変異SOD1トランスジェニックマウスと掛け合わせ、中枢神経の変異SOD1タンパクの発現を80%以上抑制することに成功した⁶⁾。この効果により、6月齢の時点でALS症状の発症は完全に抑制されている。これらの結果はsiRNAという方法で遺伝性神経変性疾患が治療可能であることを理論的に示したと考えられる。

II. 変異遺伝子特異的なRNAi法

野生型SOD1はノックアウトしても明瞭な神経症状は示さないので副作用はない可能性が高いが、例えばSCA6の場合、その原因遺伝子alphaカルシウム1Aチャ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、正常アリルの発現抑制は新たな症状をきたす可能性が高い。したがって、優性遺伝疾患の治療には、正常アリルの発現を損わずに、変異アリルの発現のみを抑制することが望ましい。上述のように、1塩基置換の場合はsiRNAの配列の5'側から10

から13番目の塩基に変異部位を置いた場合が最も野生型SOD1の切断効率が低下する。家族性ALSの原因遺伝子であるSOD1の点変異G93Aなど、変異が1塩基の違いである点変異でも正常アリルと変異アリルの配列の差を認識して変異アリルのみを切断できるsiRNAの作製は可能である⁷⁾。同様の報告は捻転dystonia⁸⁾やfrontotemporal dementia⁹⁾で報告されている。

しかし、SOD1やPS1の点変異は100種類以上知られており、そのすべてに特異的で効率なsiRNAがデザインできるわけではない。我々はいかなる遺伝子変異に対しても特異的で有効な新しいRNAi法を考案した¹⁰⁾。それは、標的原因遺伝子に最も有効なshRNAで変異および野生型の両アリルを抑制して、同時にそのshRNAできないようにデザインし、かつアミノ酸は配列が不変であるcDNAで野生型タンパクを補うというものである。その*in vivo*での有効性をマウスの掛け合わせ実験により示した。

III. 孤発性神経変性疾患への応用

ほとんどのAlzheimer病、Parkinson病やALSは家族歴のない孤発性で遺伝子異常は明らかでないが、それぞれの発症機序のキーとなる分子がわかれば、その発現を抑制することで治療が可能かもしれない。たとえば、Alzheimer病の β セクレターゼは有望な標的分子である。Alzheimer病のモデル動物はA β のワクチン治療やその抗体の受動免疫により老人斑の生成を抑制し、認知障害も軽減し得たと報告されている。A β はアミロイド前駆タンパクAPPから β と γ セクレターゼによって切り出されて生成される。PS1などからなる γ セクレターゼはNotchなどの他の重要な分子も基質としているためその機能を抑制すると問題が出るが、 β セクレターゼの本体といわれるBACE1のノックアウトマウスは特別の異常を示さない。我々もBACE1に対するsiRNAを作製して、培養細胞系でA β 産生を抑制できることを示した (Fig. 1)。今後、広範な神経細胞にsiRNAを持続的に導入することが可能となれば、画期的な治療方法になるかも知れない。最近、BACE1に対するsiRNAを発現するレンチウイルスをスウェーデン型変異APPを過剰発現させたトランスジェニッ

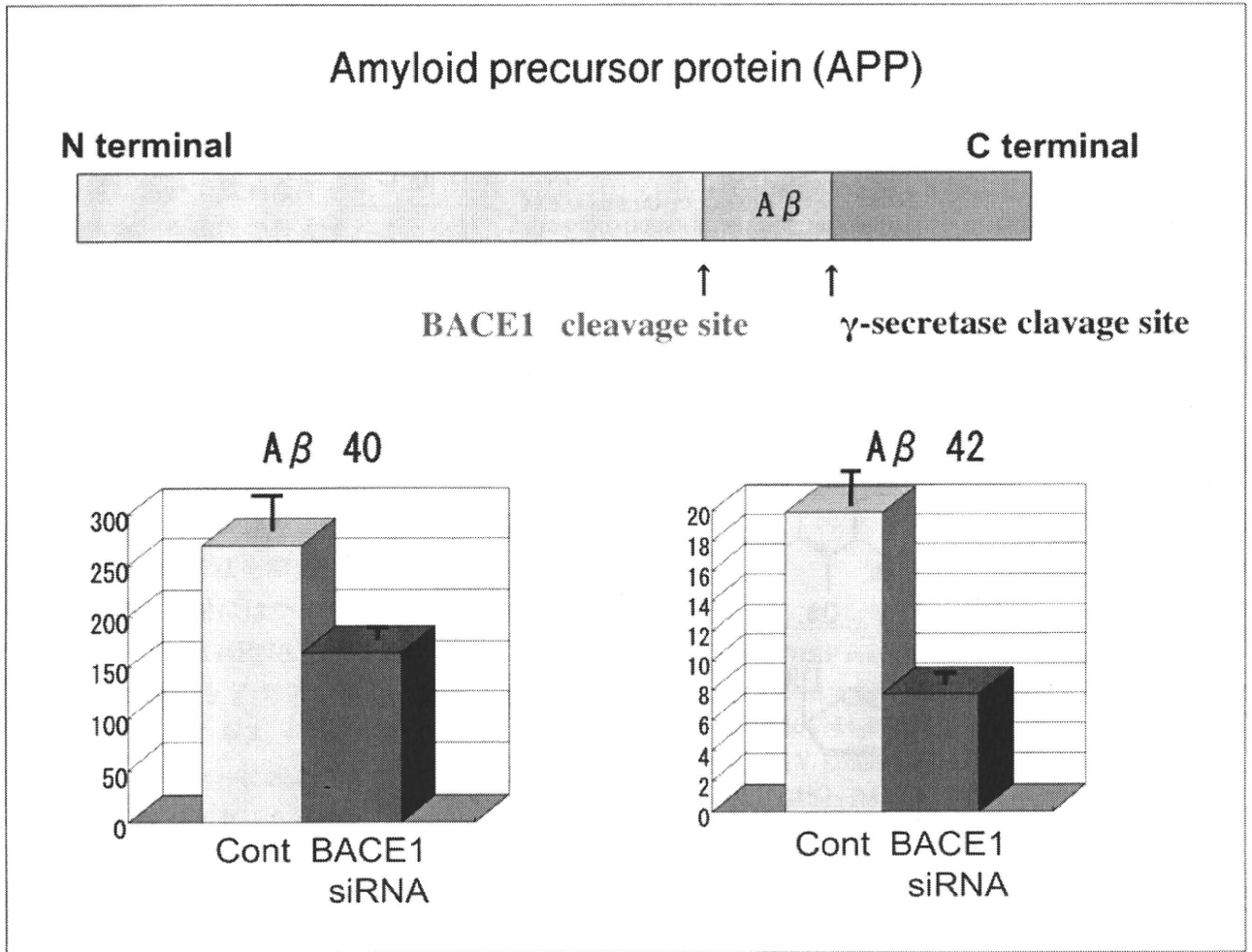


Fig. 1 siRNA intervention to sporadic Alzheimer disease

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

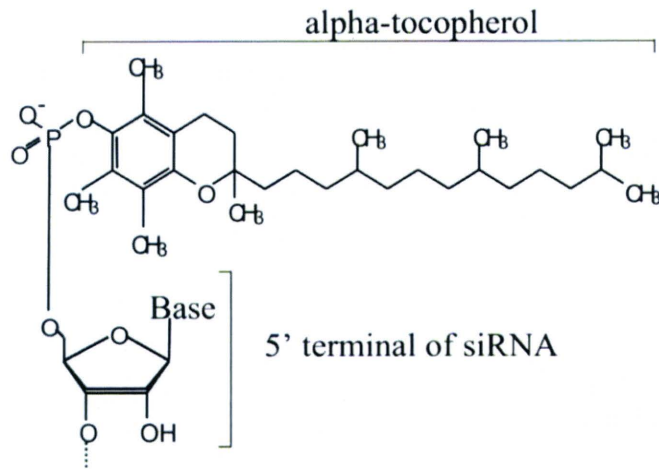
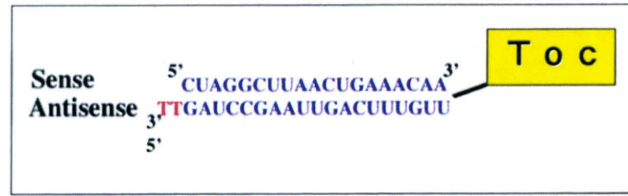
クマウスの海馬に直接注入して、老人斑の沈着を減少させ、認知機能障害を改善させたとの報告がなされた¹¹⁾。また、他の基質への影響なくγセクレターゼ機能を低下させる可能性のあるAPPアダプター分子X11aαとX11aβをターゲットとしたsiRNAでAβ産生を抑制できる可能性や、ミクログリアの活性化をcathepsin Bに対するsiRNAで抑制し、神経細胞毒性を軽減したとの報告もされている。

IV. siRNAの*in vivo*へのデリバリー

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

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

a



b

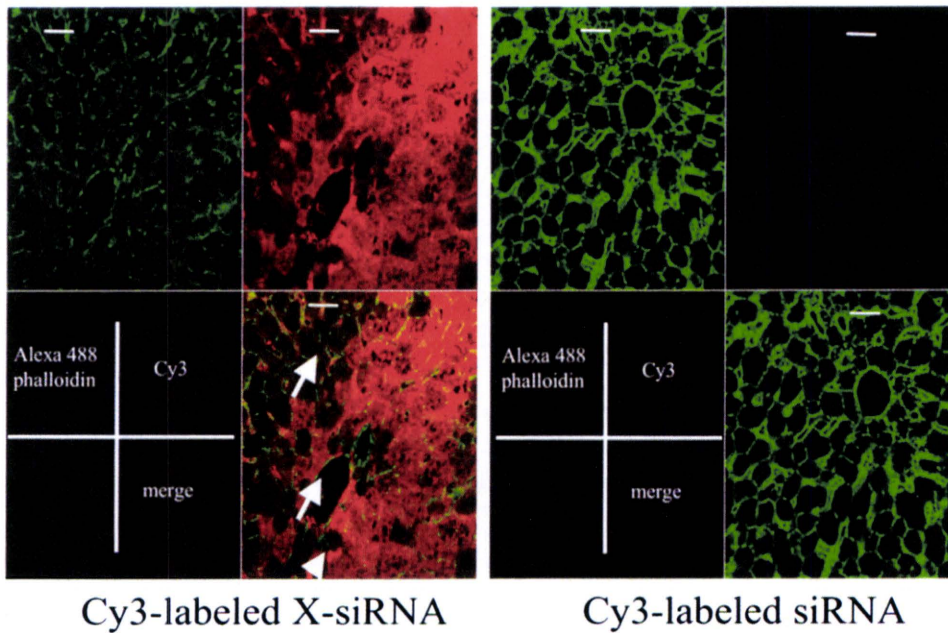


Fig. 2 Vitamin E-conjugated siRNA

a Chemical structure of vitamin E-conjugated siRNA

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

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

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

おわりに

RNA干渉の基礎研究は順調に進んでおり、最も大きな問題であるデリバリー方法にも急速な進歩がある。RNA干渉の基本特許は米国のバイオ

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

文 献

- 1) Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E et al : TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436 : 740-744, 2005
- 2) Tomari Y, Zamore PD : Perspective : machines for RNAi *Genes Dev* 19 : 517-529, 2005
- 3) Rand TA et al : Argonaute 2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* 123 : 621-629, 2005
- 4) Elbashir S, Harborth J, Lendeckel W et al : Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411 : 494-498, 2001
- 5) Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R : A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 29 : 550-553, 2002
- 6) Saito Y, Yokota T, Mitani T et al : Transgenic siRNA halted amyotrophic lateral sclerosis in a mouse model. *J Biol Chem* 280 : 42826-42830, 2005
- 7) Yokota T, Miyagishi M, Hino T et al : siRNA-based inhibition of superoxide dismutase expression ; potential use in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Com* 314 : 283-291, 2004
- 8) Gonzalez-Alegre P, Bode N et al : Silencing primary dystonia : lentiviral-mediated RNA interference therapy for DYT1 dystonia. *J Neurosci* 25 : 10502-10509, 2005
- 9) Miller VM, Xia H, Marrs GL et al : Allele-specific silencing of dominant disease genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 : 7195-7200, 2003
- 10) Kubodera T, Yokota T, Ishikawa K et al : New

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

Clinical Application of siRNA to the Nervous System

Takanori YOKOTA

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

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

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

MicroRNA と中枢神経系

横田 隆徳*

MicroRNA and Central Nervous System

Takanori Yokota*

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are 21-24 nucleotide (nt) duplex RNAs that participate in the translational regulation of messenger RNAs (mRNA). These miRNAs are created from precursor transcripts by subsequent processing steps that are mediated by Drosha and Dicer-members of the RNaseIII family. One of the two strands is incorporated into the active sites of a protein that belongs to the argonaute family of proteins, where it serves as a guide for complementary sequences in the 3'-UTR site of the target mRNAs.

miRNAs are expressed at high levels within the as well as mature developing brain. These miRNAs orchestrate the maintenance of adult neural cell traits, promote cellular homeostasis and dampen endogenous and exogenous stress responses, and modulate multiple parameters that are associated with synaptic plasticity. In this regard, the expression of a brain-specific miRNA (miR-124a) in nonneuronal cells enables the conversion of the overall gene-expression pattern to a neuronal one. Another brain-specific miRNA, namely, miR-134, modulates the development of dendritic spines-neuronal protrusions that connect with other neurons-and therefore probably controls neuronal transmission and plasticity. Recent evidence suggests that miRNAs may be a contributing factor cases of neurodegeneration, such as those in Alzheimer diseases and polyglutamine diseases. Research on miRNAs in the context of neurodegeneration has been rapidly advancing, and the goal of this review is to provide perspective for new data that may aid specialists in this field.

Key words : miRNA, non-coding RNA, Drosha, argonaute family, antagomir

はじめに

分子生物学の中心原理であるセントラルドグマとは、遺伝情報はゲノムにインプリントされており、それが転写された RNA を介して最終生理活性物質である蛋白質に翻訳されるというものである。この原理に基づいて、さまざまな生物でゲノムプロジェクトが進行した結果、驚くことに蛋白質をコードする遺伝子 (mRNA) の数は約 23,000 で、全ゲノムの 2% にすぎず、遺伝子の数もイネとヒトとではほとんど変わらないことが明らかになっ

た。その一方で、2005 年にゲノムの約 70% の領域が RNA に転写されているという報告がなされ、それまでにジャンク (がらくた) とされていたゲノム領域からも多数の転写産物がみつかったのである。興味深いことに、生物的複雑さの増大は、全ゲノム DNA に対する non-coding 領域の割合の増大と正の相関関係を示し、その割合はヒトにおいて最大になるという¹⁾。特に神経系においては、他臓器にも増してこの複雑さの増幅機構 'complex multiplier' がその機能形成に重要な役割を果たしていると想定されている。

一方、2本鎖の RNA の導入によって誘導される配列

* 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科, 脳神経機能病態学 (神経内科) [〒113-8519 東京都文京区湯島1-5-45] Department of Neurology and Neurological Science, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan

特異的な遺伝子発現抑制である RNA 干渉が発見され、この機構が進化的に保存された生体防御機構であり、遺伝子発現制御やゲノムの品質管理として機能していることがわかった。上記の non-coding RNA には膨大な数の 20~30 塩基長の「小さな RNA (small RNA)」があり、これまでの RNA 干渉および関連分子経路の解析から、これらの生体内の内因性の小さな RNA が重要な遺伝子発現抑制機構を果たしていることが判明し²⁾、総称して「RNA サイレンシング」と呼ばれている³⁾。

その後の small RNA の研究の進歩はめざましく、piRNA, rasiRNA, ta-siRNA や内因性 siRNA などさまざまな RNA サイレンシングに関わる small RNA が同定されている。本稿ではその中で最も研究が進んで、臨床応用への研究も始まった microRNA (miRNA) について、その基本知見と神経系との関わりについて概説したい。

I. miRNA の概念とその働き

miRNA は「ヘアピン構造をとる前駆体から Drosha, Dicer などの RNase によって切り出される 21~24 塩基 (主に 22 塩基) の RNA」と定義される。miRNA は Victor Ambros のグループが 1993 年に線虫 (*C. elegans*) が幼虫から成虫へと成長する過程において、時期特異的に発現するヘテロクロニック遺伝子 (heterochronic gene) の 1 つとして *lin-1* 遺伝子を同定し⁴⁾、同遺伝子は転写物の中に 22 塩基の non-coding RNA が *lin-14* の発現を制御していることを明らかにした。その後、Mello らのグループによって RNAi 経路を担う経路と *lin-1* との関連が示され、これらの小さな RNA が進化を通じて保存され、RNAi 同様に転写後遺伝子抑制に関わることを示されてきた。これらは miRNA と呼ばれ、すべての mRNA の 30% は miRNA の支配下にあり、生物の発生や細胞の機能制御に重要な働きを果たしていることが次々に示されている。

miRNA は標的 mRNA の 3'-UTR (非翻訳領域) に後述の Seed 配列の相補性を主たる認識機構として、直接結合してその遺伝子の発現を調節している。1 つの miRNA は 100 以上の非常に多くの mRNA を標的とするが、その抑制程度は 1.5~2 倍程度と比較的軽度であり 4 倍を超えることはほとんどない^{5,6)}。1 つの miRNA が多数の mRNA を標的にするのは、miRNA が少数の特定の遺伝子の発現を抑える以外に、その miRNA の実現したい表現型に好ましくない一群の遺伝子全般に作用して、表現型を制御している可能性が考えられてい

る^{7,8)}。例えば、神経細胞に特異的に発現する miR-124 の標的遺伝子は、グリアや表皮細胞などで特異的に転写される mRNA に多く存在して、逆に神経細胞で発現する mRNA にはほとんどみつからず (mutually exclusive expression)、その細胞の特異性を規定している可能性が考えられる⁷⁾。このように miRNA には大まかに 2 種類の働きがあり、1 つは特定のいくつかの標的遺伝子の発現を制御するものと、もう 1 つは多数の遺伝子に働いて、ある表現型の決定のノイズを消してその精度を上げる作用があると考えられている^{7,9)}。また、1 つの mRNA は数個の miRNA から制御を受け、それらの複数の miRNA は協調的に 1 つの標的 miRNA の発現を抑制している¹⁰⁾。さらに単一のプロモーターに複数の miRNA がコードされている場合があり、複数の miRNA がセットで発現する場合がある (polycistronic miRNA cluster)。さらに、miRNA 同士も互いにその発現を制御し合っており、また miRNA 自身の発現も転写因子とペアになって調節するシステムがあることが報告された。例えば、ドパミン神経細胞に発現する転写因子 Pitx3 は miR-133b の転写因子だが、miR-133b は Pitx3 mRNA の 3'-UTR に結合して negative feedback をしている¹¹⁾。

このように miRNA と標的 mRNA は「多対多」の関係であり、表現型の決定に上流に下流におそらく階層をなして複雑に発現調節をしているが、個々の抑制の程度は軽度で、標的遺伝子の個別の制御にも細胞全体の表現系の制御にも fine tuning を行っていると考えられる¹⁰⁾。

II. ゲノム上の pri-miRNA の存在様式

ゲノムもコードされた miRNA 遺伝子は長い一次転写分子である pri-miRNA (primary transcript なので pri-miRNA) として転写される。多くの pri-miRNA は mRNA として RNA ポリメラーゼ II によって転写されるため、5' 末端に CAP 構造と 3' 末端にポリ A テール配列を持つ (1 部例外的に RNA ポリメラーゼ III によって転写される¹²⁾)。ゲノム上、pri-miRNA はその約半数がイントロン領域 (1 部は 3' 非翻訳領域) に存在するが (intronic miRNA)、そのうち 80% はメッセンジャー RNA (mRNA) のイントロン領域に、残りの 20% は non-coding RNA のイントロン領域に見出されている¹³⁾ (Fig. 1)。Non-coding RNA にはエクソンやイントロンとの両領域にまたがる部位の遺伝子内にも見出されている。この長い non-coding RNA の多くは CAP 構造と 3' 末端にポリ A テール配列を持ち、mRNA-like non-

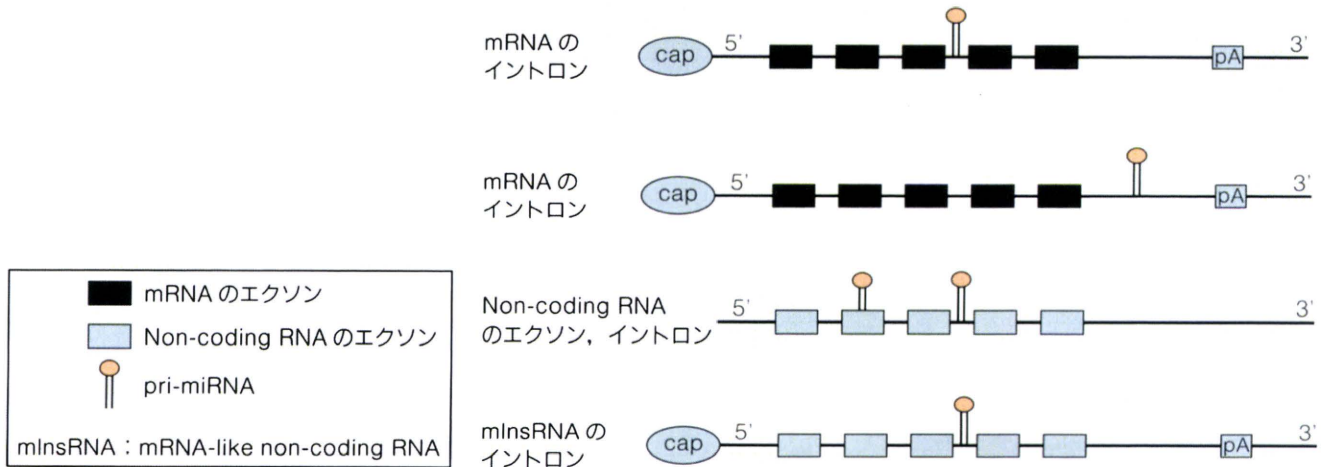


Fig. 1 ゲノム上の pri-miRNA の存在部位

coding RNA (mInsr RNA) と呼ばれる。一方、遺伝子間領域 (intergenic region) にも pri-miRNA は存在して、独自のプロモーターを持ち、3-4kb の non-coding RNA が一般的と推定されている¹⁴⁾。

一方、pri-miRNA 自体の発現制御のメカニズムも重要であるが、現在までのところ十分には解明されていない。異なる intergenic pri-miRNA の発現の promotor には共通の保存されたモチーフがあり、その発現の制御の機構の一端がうかがわれる¹⁵⁾。また、いくつかの pri-miRNA は CpG アイランド内に位置しており、脱メチル化や脱アセチル化酵素阻害によってその発現が上昇することからエピジェネティックな発現制御を受け、その病態ががん化やがん転移¹⁶⁾などと密接に関連している。

III. miRNA 生成のプロセス (Fig. 2 A)

miRNA のプロセスは3つの段階からなっている。まず、核内で転写された数 100 塩基の大きさの pri-miRNA はそのステム構造の基部に 11 塩基の部分で Drosha と DGCR8 (ショウジョウバエでは Drosha と Pasha) を含む 500~650 kDa の巨大な microProcessor 複合体によって切り出され(プロセッシング)、60~70 塩基の pre-miRNA が生成される (Fig. 2 B)。Intronic miRNA の場合、ホストの mRNA のスプライシングとの関係は、Drosha/DGCR8 による pre-miRNA の切り出しは mRNA のスプライシングに先行して行われ、mRNA のスプライシング自体に pre-miRNA の切り出しは影響しない¹⁷⁾。

pri-miRNA が mRNA のイントロン領域にコードされている場合、miRNA と蛋白質の両者が1つの遺伝子

から同一のプロモーターで発現するが、miRNA の配列はその蛋白の mRNA の 3' 非翻訳領域に相関のある場合とない場合があるという¹³⁾。ファミリー形成する miRNA (polycistronic miRNA cluster) では、そのホスト mRNA の機能には関係ない場合が多い。また、pri-miRNA のすべてが miRNA にプロセスされるわけではなく¹⁸⁾、pri-miRNA と miRNA 発現量は相関しないことが示されている¹⁹⁾。例えば、let-7 の pri-miRNA は RNA 結合蛋白である lin-28 によって Drosha の段階でその切り出しに制御を受けて、miRNA はホストの mRNA と独立して pri-miRNA からの切り出しの制御を受けている²⁰⁾。

一方で、最近イントロンそのものが pre-miRNA である場合が報告された。イントロン=pre-miRNA の場合は mirtron と呼ばれ、その場合はスプライシングされたイントロンがそのまま pre-miRNA として機能してその生成に Drosha は必要ない²¹⁾。

第2のステップとして pre-miRNA は exportin-5 によって認識され、RanGTP 依存的に核から細胞質に輸送される^{22,23)}。第3のステップとして、細胞質に出た pre-miRNA は Dicer によって 22 塩基程度の 2 本鎖 RNA に切断され、Dicer と TRBP (TAR RNA binding protein) の共同作用によって 5' 末端が自由エネルギー的により不安定な miRNA 鎖のみが最終的な agonaute を含む蛋白核酸複合体に取り込まれ、他方の miRNA 鎖は分解される²⁴⁾。siRNA を含む蛋白核酸複合体は、RISC (RNA-induced silencing complex) と呼ばれるが²⁵⁾、miRNA を含む場合は micro-ribonucleoprotein (miRNP)²⁶⁾ や miRNA-induced silencing complex (miRISC)²⁷⁾ と呼ばれている。

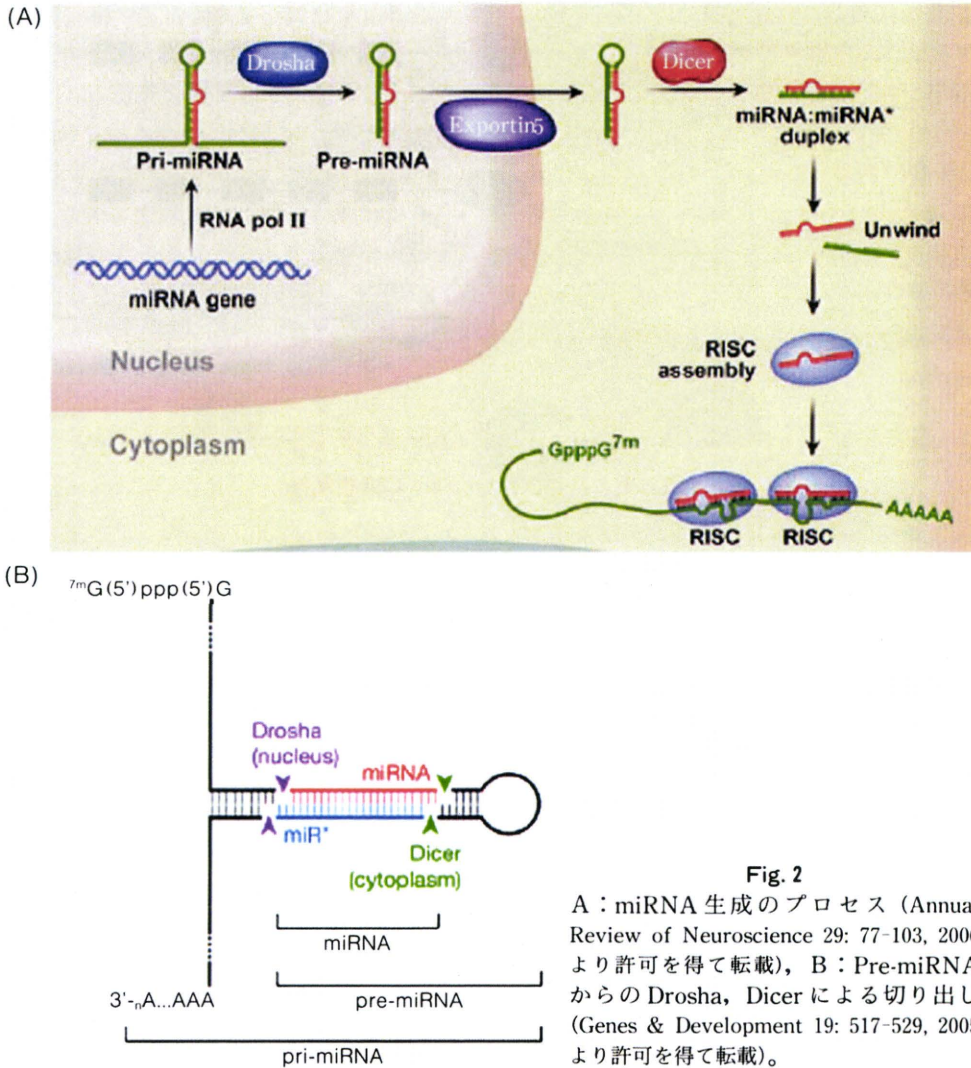


Fig. 2
 A : miRNA 生成のプロセス (Annual Review of Neuroscience 29: 77-103, 2006 より許可を得て転載), B : Pre-miRNA からの Drosha, Dicer による切り出し (Genes & Development 19: 517-529, 2005 より許可を得て転載)。

ショウジョウバエではこのプロセスは Dicer1 と Ago1 を含む RISC に限定され siRNA のプロセス機構と独立しているが、ヒトでは Dicer は 1 種類で siRNA と共通であり、miRNA は 4 つの Agonate ファミリーのいずれをも含む RISC にも取り込まれている²⁸⁾。そして、細胞内の翻訳抑制の場として、miRNA とその標的 mRNA、および argonaute 蛋白は細胞質内に GW182 や p54 などの他の構成分子とともに濃縮凝集して P-body (processing body) を形成する²⁹⁾。

IV. miRNA の遺伝子発現抑制機構

1. 標的の認識 (Fig. 3 A)

標的の認識には以下の 3 つの原則が判明している。最も重要な認識の原則は、RISC に取り込まれた miRNA の 5' 側から 2 塩基から 8 塩基までの 7 塩基の 'seed' と

呼ばれる部位が、標的 mRNA の 3'-UTR (稀に 5'-UTR) に完全に相補性にマッチすることである^{5,30)}。第 1 塩基の A と第 9 塩基に対応する標的 mRNA の配列が、A または U であると結合効率が上昇する。第 2 の原則は、miRNA-mRNA の中央部分に bulge か mismatches が必要ではない。これがあると、siRNA のように argonaute 依存性の RNA 切断が起ってしまう³¹⁾。第 3 の原則は miRNA の 3' 側の特に第 13~16 の 4 塩基が標的 mRNA に相補性があるとその結合効率が上昇する³²⁾。さらに加えて、seed 領域が標的 mRNA の 3'UTR に通常複数カ所存在して結合することができるのが有効に標的 RNA の発現を抑制する必要条件である可能性が指摘されている³⁰⁻³³⁾。

2. 翻訳抑制の機序 (Fig. 3 B)

miRNA の翻訳抑制の機序として、① argonaute,

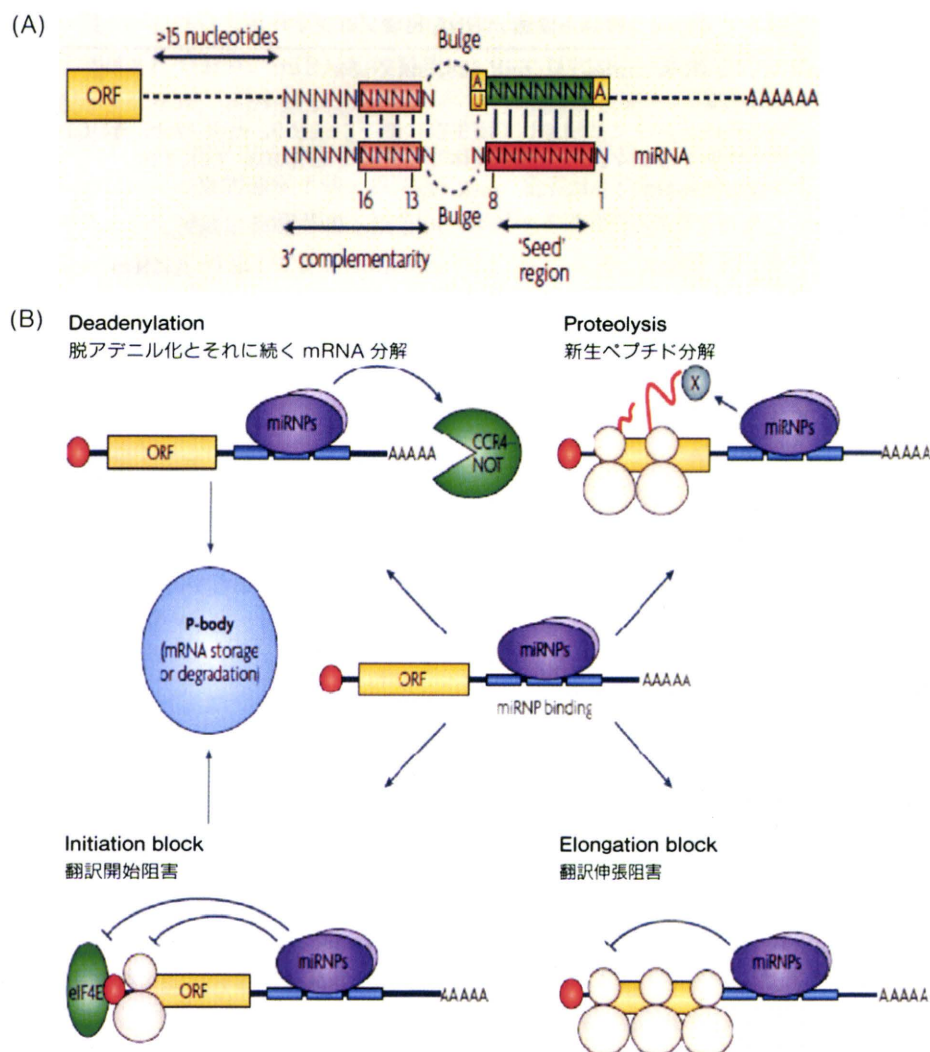


Fig. 3 miRNA の遺伝子発現抑制機構
(Nature Review Genetics 9: 102-114, 2008 より許可を得て転載)

GW182 と miRNA の複合体 (miRNP/miRISC) が CAP 構造への翻訳開始因子 eIF4E の結合を競合阻害することによる翻訳開始の阻害 (Fig. 3 B 左下)³⁴⁾。②ポリ A テールの脱アデニル化による除去とそれに引き続く mRNA の分解 (Fig. 3 B 上)³⁵⁾。③翻訳開始後の翻訳伸張阻害またはリボソームの脱落 (Fig. 3 B 右上)³⁶⁾。④翻訳されたばかりの新生ポリペプチドの分解 (Fig. 3 B 右下)³⁷⁾ などが考えられている。これらの複数の翻訳抑制の機序の相関関係は十分に解明されていないが、少なくともある一部の miRNA の標的においては、第 1 段階として miRNA は翻訳開始を阻害して、その後の経過で標的の mRNA を分解していると考えられている³⁸⁾。また、プロテオミク解析から翻訳段階で 3 分の 1 以上抑制された標的では、mRNA の検出可能な不安定化もみられ、より大きな抑制を受けた標的ではほとんどの場合、

mRNA の不安定化によって主に抑制される傾向にある⁶⁾。

認識の原則でも触れたように、この翻訳抑制の機序は標的 mRNA を切断する siRNA の機能と基本的に異なっていて、その差は siRNA の 2 本鎖が通常完全に相補であるのに対して、miRNA/miRNA の 2 本鎖部分が中央領域のミスマッチや G-U wobble 塩基対を含む配列上の差異によって振り分けられていると考えられている。ショウジョウバエでは siRNA 経路の RISC loading complex (RLC) 中の Dicer-2/R2D2 がミスマッチを含まない 2 本鎖を選択的に RISC にリクルートする機構が判明している³⁹⁾ が、ヒトではその機序は明らかでない。