

Table 神経系関連 miRNA 発現プロフィール

中枢神経特異的 miRNA	: miR-9, miR-124, miR-128, miR-134
中枢神経多量発現	: miR-125
時間的特異性	発生初期から徐々に増加して出生後に低下: miR-9, miR-125b, miR-181a 発生初期から徐々に増加して成体でも持続: miR-103, miR-128
部位特異的	神経細胞特異的: miR-124, miR-128 アストロサイト特異的: miR-23, miR-26, miR-29
中脳特異的	: miR-133b
海馬特異的	: miR-384 *

* アンチセンス鎖の転写物

V. miRNA と神経系

一般に、脳の miRNA は他の臓器に比較してその種類や発現量が多く、1,000 以上の miRNA が発現しているといわれる⁴⁰⁾。特に発生期の miRNA の発現が多く、かつ重要で、ゼブラフィッシュでは Dicer の変異で神経系の発生は大幅に障害されるが、miR-430 を補うことのみでその障害のかなりの部分が救済される^{41,42)}。このことは、単一の miRNA が神経系の発生期のトランスクリプトームにおいて多量の遺伝子の時間部位特異的な発現を協調的に制御していることを示している。また、pri-miRNA のプロセッシングを行っている DGCR-8 遺伝子の deletion で、学習能力の障害を含む多器官奇形を示す DiGeorge 症候群が発症することが知られている⁴³⁾。

発生の初期の脳に発現が豊富なものや後期に増加するものなど、時期特異的な発現にはさまざまなものがあることが知られている⁴⁴⁾。さらに部位特異的な発現として、中脳(黒質)特異的⁴⁵⁾や海馬中脳特異的な miRNA⁴⁶⁾の発現が報告されている (Table)。miR-134 など多くの miRNA はシナプスに発現している synapsin 1, ssynaptotagmin や、海馬神経細胞の樹状突起に局限して発現しているキナーゼである Limk1⁴⁰⁾などの転写物を標的にしており、シナプス伝達機能や記憶能力に重要な働きをしていると考えられている。

老年期を含む成熟した神経系にも miRNA は発現しており、神経細胞のホメオスタシス、内因性、外因性のストレス応答、シナプス可塑性に関わっていることが想定されている^{47,48)}。細胞レベルでは虚血、酸化ストレス、飢餓ストレスなどさまざまなストレスで特定の miRNA の発現が変化することが知られている⁴⁹⁻⁵¹⁾。miR-124 は哺乳動物の成熟した神経系に最も多く発現している miRNA で、脳に発現しているすべての miRNA の 25~48% を占めるといわれる⁵²⁾。

miR-124 は、単一の miRNA がその発現によって多く

の miRNA の発現を変化させ、細胞のプロファイル全体を制御していることを初めて示された miRNA である。miR-124 の発現により HeLa 細胞の 174 の遺伝子発現が低下して(その 76% はその 3'-UTR に miR-124 の seed 配列に相補の配列を有して直接抑制される)、HeLa 細胞の発現プロファイル脳のプロファイルに近づくことが示された⁵³⁾。

VI. miRNA と神経疾患

主に、老年期に進行性に神経細胞が変性する神経変性疾患の病態と miRNA が関係があるという知見が集積しつつある。細胞内で pre-miRNA を miRNA にプロセスする、RNase である Dicer をノックアウトすると胎生致死になるが⁵⁴⁾、ドパミン神経細胞に特異的に Dicer の発現をノックアウトすると、寿命の後半で進行性の細胞死が生じ Parkinson 病類似の病態になる¹¹⁾。Dicer の変異で SCA3 のショウジョウバエのモデルのポリグルタミン毒性が増強することが示された⁵⁵⁾。Cre-lox システムを用いたブルキンエ細胞特異的な Dicer のノックアウトマウスで、ブルキンエ細胞の脱落と運動失調の症状がみられた⁵⁶⁾。これらの実験事実は、miRNA は神経細胞の生存に必要で、その機能障害は神経変性の原因になりうることを示したものと見える。さらに、Dicer の下流の miRISC の異常と神経障害との関連も示唆されている。脆弱 X 症候群は X 染色体上の FMR1 遺伝子内の CGG 反復配列の伸長により発症する進行性の精神遅滞を呈する遺伝子性の疾患で、FMR1 蛋白 (FMRP) の機能喪失がその原因と考えられている。FMRP は RNA 結合蛋白で、RISC の構成因子として agonaute 蛋白と結合しており、RISC での miRNA/siRNA の翻訳抑制機能におそらく補助的な役割を果たしており、その変異による機能喪失で学習機能に障害が生じる⁵⁷⁾。

一方、孤発性の神経変性疾患での病態生理における miRNA の関与の実態についてはまだ明らかではない。

以下に示すように、いくつかの神経変性疾患でそのプロファイリングの変化が指摘されており、miRNA の発現量の変化が病態の危険因子となり、その他の危険因子と重なって発症や病態に関与する 'multiple hit hypothesis' が考え得る。また、miRNA の標的遺伝子側の病態として、Tourette 症候群において神経に発現する Slit and Trk-like 1 (SLITRK1) の mRNA の 3'-UTR の miRNA の結合部位に polymorphism が発見され、miRNA との結合の障害が病態と関連する機序が知られている⁵⁹⁾。

1. アルツハイマー病 (Alzheimer disease: AD)

Hébert ら⁵⁹⁾ は AD 脳の miRNA プロファイリングを検索して、正常対象脳と比較して A β の産生に関わる分子 (APP, BACE1, PSEN) を標的とする 7 つの miRNA の変化を見出した。その中で、彼らは AD 患者の約 30% では BACE1 蛋白質量は増加しているといわれる一方、BACE1 の mRNA 量は変化に乏しいことに注目し、AD 脳での miR-29a の発現量が約 30% 減少し、miR-29a/b-1 の発現量と BACE1 の蛋白質量に負の相関があることを報告した。同様に、Wang ら⁶⁰⁾ も AD 脳を MCI (mild cognitive impairment) 脳や正常脳でも老人斑のある非認知障害脳、老人斑のない非認知障害脳と比較して、老人斑の出現量に相関して発現量が低下して、かつび慢性レビー小体病 (diffuse Lewy body disease: DLB) 脳に変化のない miRNA として miR-107 を発見した。miR-107 は神経細胞に発現し、AD 脳で *in situ* hybridization にても発現低下が示された。miR-107 またはその paralog は BACE1 の mRNA の 3'-UTR を 4 カ所認識して、AD 脳で miR-107 の発現量は低下していた。

また、ヒト神経細胞の初代培養に対してアルミニウムや硫酸鉄で酸化ストレスをかけて発現する miR-9, miR-125b や miR-128 が AD 脳の海馬でも発現が増加していることが報告されている⁶¹⁾。miR-125b は synapsin I や synapsin II を標的にしており、AD 脳のシナプス障害との関連が疑われている⁶²⁾。

2. ポリグルタミン病

歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (dentato-rubropallido-luysian atrophy: DRPLA) の原因遺伝子の atrophin を標的とする miR-8 をショウジョウバエのモデルで機能喪失型変異 miR-8 を用いて解析すると、atrophin mRNA レベルは 2 倍に増加して、神経細胞死やその症状は増悪した⁶³⁾。同様に Lee ら⁶⁴⁾ は ataxin1 の長い 3'-UTR を認識する miR-19, miR-101, miR-130 が協調的に ataxin1 の発現を抑制することを示し、特に miR-101,

miR-130 はブルキンエ細胞で発現しており、ataxin1 の 3'-UTR の認識部位の変異によってポリグルタミン毒性が増強することからその病態に関与すると考えた。これらの結果は、内因性の miRNA によるポリグルタミンの発現量の 'fine tuning' によって、その毒性や症状が変化し得ることが示された。さらに SCA3 のショウジョウバエのモデルで遺伝的スクリーニングによって見出された miRNA bandam は、ポリグルタミン毒性をその下流で修飾しうるということが報告された⁶⁵⁾。

VII. miRNA を用いた治療

上述のように、いくつかの神経疾患において miRNA はそのプロファイルに変化があり、それが病態形成に関与している可能性があり、その異常な miRNA は治療の対象となる可能性がある。悪性腫瘍では、例えば Let-7 など、いくつかの miRNA は既に癌抑制遺伝子 (癌遺伝子) としてその役割はかなり明らかとなっており、治療上重要な標的遺伝子となっている⁶⁶⁾。

過剰な miRNA を抑制する方法として、標的の miRNA に相補的な 1 本鎖の合成 RNA が開発され 'antagonir' と呼ばれ、2'-O-メチルや LNA などのいくつかの異なる糖鎖骨格の修飾やコレステロールを結合させたものが報告されている^{67,68)}。最近、両端に short-hairpin 型の 2 本鎖 RNA を付加することにより miRNA 抑制効果を上昇させた報告は、miRNA-RISC-mRNA 相互作用の介入をその機序として想定しており興味深い⁶⁹⁾。Antagonir は静脈投与や腹腔内投与などの全身投与によって肝臓や心臓にはデリバリー可能であるが^{67,68,70)}、中枢神経へのデリバリーははまだ報告がなく、核酸医薬全般に言えることではあるが、特に中枢神経系へのデリバリーの問題がその臨床応用にとって大きな障害となっている。

一方、miRNA を細胞内に導入させる場合は、化学合成 miRNA や Drosha 基質としての化学合成 pre-miRNA が用いられている^{71,72)}。In vivo や長期の発現にはウイルスベクターなどを用いた発現型 miRNA が有用である。shRNA⁷³⁾ や pre-miRNA⁷⁴⁾ を Pol III プロモーターで発現させる方法が報告されているが、shRNA の発現量が多いと内因性 miRNA と exportin-5 の競合が生じて内因性 miRNA の成熟障害による毒性が懸念されている⁷⁵⁾。その点に考慮して、発現量の比較的少ない Pol II プロモーターで Drosha 基質の pre-miRNA を発現させる方法も報告されている^{76,77)}。Pol III プロモーターはエビキタスな発現だが、Pol II プロモーターを用いることに

より組織特異的な発現が可能となる利点もある⁷⁸⁾。

おわりに

哺乳動物,特に中神経系の複雑さの増幅機構 'complex multiplier' を担う主役の1つである機能核酸として,さまざまな non-coding RNA の存在が次々と明らかとなっている。その中でも miRNA の分子生物学的機構の解明は最も進んでおり,その制御機構は極めて複雑で,従来の概念と異質な巧みな体系を持っていることがおぼろげながらもみえてきた。その疾患の病的機序への関与の研究は始まったばかりであり,その役割や重要性,および治療の対象としての意義ははまだ明らかでない。しかし, non-coding RNA の果たす複雑さの増幅機構は,最も複雑で深淵な臓器である脳において必ずや中核的役割を果たしていることが予想される。さらに, miRNA の病態はヒトの神経疾患において重要な役割を果たしている可能性があり,その治療が現実のものとなる日はいずれ来ると思われる。

文 献

- 1) Mattick JS: RNA regulation: a new genetics? *Nature Rev Genet* **5**: 316-323, 2004
- 2) Neilson JR, Sharp PA: Small RNA regulators of gene expression. *Cell* **134**: 899-902, 2008
- 3) Tomari Y, Zamore PD: Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev* **19**: 517-529, 2005
- 4) Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V: The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**: 843-854, 1993
- 5) Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, et al: Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* **455**: 58-63, 2008
- 6) Baek D, Villén J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, et al: The impact of microRNAs on protein output. *Nature* **455**: 64-71, 2008
- 7) Stark A, Brennecke J, Bushati N, Russell RB, Cohen SM: Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution. *Cell* **123**: 1133-1146, 2005
- 8) Farh KK, Grimson A, Jan C, Lewis BP, Johnston WK, et al: The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science* **310**: 1817-1821, 2005
- 9) Seila AC, Sharp PA: Small RNAs tell big stories in Whistler. *Nat Cell Biol* **10**: 630-633, 2008
- 10) Bartel DP: MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**: 281-297, 2004
- 11) Kim J, Inoue K, Ishii J, Vanti WB, Voronov SV, et al: A MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science* **317**: 1220-1224, 2007
- 12) Borchert GM, Lanier W, Davidson BL: RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 1097-1101, 2006
- 13) Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A: Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* **14**: 1902-1910, 2004
- 14) Saini HK, Griffiths-Jones S, Enright AJ: Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 17719-17724, 2007
- 15) Zhou X, Ruan J, Wang G, Zhang W: Characterization and identification of microRNA core promoters in four model species. *PLoS Comput Biol* **3**: e37, 2007
- 16) Saito Y, Jones PA: Epigenetic activation of tumor suppressor microRNAs in human cancer cells. *Epigenetic activation of tumor suppressor microRNAs in human cancer cells. Cell Cycle* **5**: 2220-2222, 2006
- 17) Kim YK, Kim VN: Processing of intronic microRNAs. *EMBO J* **26**: 775-783, 2007
- 18) Thomson JM, Newman M, Parker JS, Morin-Kensicki EM, Wright T, et al: Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev* **20**: 2202-2207, 2006
- 19) Tang GQ, Maxwell ES: *Xenopus* microRNA genes are predominantly located within introns and are differentially expressed in adult frog tissues via post-transcriptional regulation. *Genome Res* **18**: 104-112, 2008
- 20) Viswanathan SR, Daley GQ, Gregory RI: Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science* **320**: 97-100, 2008
- 21) Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai EC: The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell* **130**: 89-100, 2007
- 22) Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U: Nuclear export of microRNA precursors. *Science* **303**: 95-98, 2004
- 23) Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D: Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* **10**: 185-191, 2004
- 24) Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, et al: TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* **436**: 740-744, 2005
- 25) Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ: An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional

- gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**: 293-296, 2000
- 26) Schwarz DS, Zamore PD: Why do miRNAs live in the miRNP? *Genes Dev* **16**: 1025-1031, 2002
 - 27) Tang G: siRNA and miRNA: an insight into RISCs. *Trends Biochem Sci* **30**: 106-114, 2005
 - 28) Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, et al: Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* **305**: 1437-1441, 2004
 - 29) Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, Closs EI, Filipowicz W: Stress-induced reversal of microRNA repression and mRNA P-body localization in human cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **71**: 513-521, 2006
 - 30) Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen S: Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* **3**: 404-418, 2005
 - 31) Lewis BP, Burge C, Bartel DP: Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* **120**: 15-20, 2005
 - 32) Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engle P, Lim LP, et al: MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* **27**: 91-105, 2007
 - 33) Nielsen CB, Shomron N, Sandberg R, Hornstein E, Kitzman J, et al: Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs. *RNA* **13**, 1894-1910, 2007
 - 34) Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E: GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 346-53, 2008
 - 35) Giraldez AJ, Mishima Y, Rihel J, Grocock RJ, Van Dongen S, et al: Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* **312**: 75-79, 2006
 - 36) Maroney PA, Yu Y, Fisher J, Nilsen T: Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nature Struct Mol Biol* **13**: 1102-1107, 2006
 - 37) Nottrott S, Simard MJ, Richter JD: Humanlet-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nature Struct Mol Biol* **13**: 1108-1114, 2006
 - 38) Mourelatos Z: Small RNAs: The seeds of silence. *Nature* **455**: 44-45, 2008
 - 39) Tomari Y, Du T, Zamore PD: Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs. *Cell* **130**: 299-308, 2007
 - 40) Berezikov E, Thummler F, van Laake LW, Kondova I, Bontrop R, et al: Diversity of microRNAs in human and chimpanzee brain. *Nat Genet* **38**: 1375-1377, 2006
 - 41) Giraldez AJ, Cinalli RM, Glasner ME, Enright AJ, Thomson JM, et al: MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science* **308**: 833-838, 2005
 - 42) Giraldez AJ, Mishima Y, Rihel J, Grocock RJ, Van Dongen S, et al: Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* **312**: 75-79, 2006
 - 43) Shiohama A, Sasaki T, Noda S, Minoshima S, Shimizu N: Molecular cloning and expression analysis of a novel gene DGCR8 located in the DiGeorge syndrome chromosomal region. *Biochem Biophys Res Commun* **304**: 184-190, 2003
 - 44) Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Townsend M, Yoshii A, Sestan N, et al: Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain. *Genome Biol* **5**: R68, 2004
 - 45) He X, Zhang Q, Liu Y, Pan X: Cloning and identification of novel MicroRNAs from rat hippocampus. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **39**: 708-714, 2007
 - 46) Schratt GM, Tuebing F, Nigh EA, Kane CG, Sabatini ME, Kiebler M, Greenberg ME: A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature* **439**: 283-289, 2006
 - 47) Conaco C, Otto S, Han JJ, Mandel G: Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 2422-2427, 2006
 - 48) Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, Moss E, Dmitrovsky E, et al: Expression profiling of mammalian microRNA uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol* **5**: R13, 2004
 - 49) Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, Closs EI, Filipowicz W: Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* **125**: 1111-1124, 2006
 - 50) Lukiw WJ, Pogue AI: Induction of specific micro RNA (miRNA) species by ROS-generating metal sulfates in primary human brain cells. *J Inorg Biochem* **101**: 1265-1269, 2007
 - 51) Sunkar R, Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK: Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends Plant Sci* **12**: 301-309, 2007
 - 52) Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T: Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* **12**: 735-739, 2002
 - 53) Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, Grimson A, Schelter JM, et al: Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* **433**: 769-773, 2005

- 54) Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, et al: Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* **35**: 215-217, 2003
- 55) Bilen J, Liu N, Burnett BG, Pittman RN, Bonini NM: MicroRNA pathways modulate polyglutamine-induced neurodegeneration. *Mol Cell* **24**: 157-163, 2006
- 56) Schaefer A, O'Carroll D, Tan CL, Hillman D, Sugimori M, et al: Cerebellar neurodegeneration in the absence of microRNAs. *J Exp Med* **2004**: 1553-1558, 2007
- 57) Schaeffer C, Beaulande M, Ehresmann C, Ehresmann B, Moine H: The RNA binding protein FMRP: new connections and missing links. *Biol Cell* **95**: 221-228, 2003
- 58) Abelson JF, Kwan KY, O'Roak BJ, Baek DY, Stillman AA, et al: Sequence variants in SLITRK1 are associated with Tourette's syndrome. *Science* **310**: 317-320, 2005
- 59) Hébert SS, Horré K, Nicolai L, Papadopoulou AS, Mandemakers W, et al: Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 6415-6420, 2008
- 60) Wang WX, Rajeev BW, Stromberg AJ, Ren N, Tang G, et al: The expression of microRNA miR-107 decreases early in Alzheimer's disease and may accelerate disease progression through regulation of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1. *J Neurosci* **28**: 1213-1223, 2008
- 61) Lukiw WJ: MicroRNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus. *Neuroreport* **18**: 297-300, 2007
- 62) Lukiw WJ, Pogue AI: Induction of specific micro RNA (miRNA) species by ROS-generating metal sulfates in primary human brain cells. *J Inorg Biochem* **101**: 1265-1269, 2007
- 63) Karres JS, Hilgers V, Carrera I, Treisman J, Cohen SM: The conserved microRNA miR-8 tunes atrophin levels to prevent neurodegeneration in *Drosophila*. *Cell* **131**: 136-145, 2007
- 64) Lee Y, Samaco RC, Gatchel JR, Thaller C, Orr HT, et al: miR-19, miR-101 and miR-130 co-regulate ATXN1 levels to potentially modulate SCA1 pathogenesis. *Nat Neurosci* **11**: 1137-1139, 2008
- 65) Bilen J, Liu N, Burnett BG, Pittman RN, Bonini NM: MicroRNA pathways modulate polyglutamine-induced neurodegeneration. *Mol Cell* **24**: 157-163, 2006
- 66) Soifer HS, Rossi JJ, Sætrom P: MicroRNAs in disease and potential therapeutic applications. *Mol Ther* **15**: 2070-2079, 2007
- 67) Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, et al: Silencing of microRNAs *in vivo* with 'antagomirs'. *Nature* **438**: 685-689, 2005
- 68) Elmén J, Lindow M, Schütz S, Lawrence M, Petri A, et al: LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature* **452**: 896-899, 2008
- 69) Vermeulen A, Robertson B, Dalby AB, Marshall WS, Karpilow J, et al: Double-stranded regions are essential design components of potent inhibitors of RISC function. *RNA* **13**: 723-730, 2007
- 70) Carè A, Catalucci D, Felicetti F, Bonci D, Addario A, et al: MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med* **13**: 613-618, 2007
- 71) Saetrom P, Snove O, Nedland M, Grunfeld TB, Lin Y, et al: Conserved microRNA characteristics in mammals. *Oligonucleotides* **16**: 115-144, 2006
- 72) Siolas D, Lerner C, Burchard J, Ge W, Linsley PS, et al: Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. *Nat Biotechnol* **23**: 227-231, 2005
- 73) Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R: Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell* **2**: 243-247, 2002
- 74) Zeng Y, Wagner EJ, Cullen BR: Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol Cell* **9**: 1327-1333, 2002
- 75) Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, Storm TA, Pandey K, et al: Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* **441**: 537-541, 2006
- 76) Giering JC, Grimm D, Storm TA, Kay MA: tissue-specific pol II promoter is an effective and safe RNAi therapeutic. *Mol Ther* **16**: 1630-1636, 2008
- 77) McBride JL, Boudreau RL, Harper SQ, Staber PD, Monteys AM, et al: Artificial miRNAs mitigate shRNA-mediated toxicity in the brain: implications for the therapeutic development of RNAi. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 5868-5873, 2008
- 78) Robson, T and Hirst, DG: Transcriptional targeting in cancer gene therapy. *J Biomed Biotechnol* **2003**: 110-137, 2003

＜シンポジウム 2—4＞ALS 治療法開発の将来

RNA 干渉による ALS の治療戦略

横田 隆徳

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

(臨床神経, 49 : 821—823, 2009)

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

1. はじめに

RNA 干渉 (RNA interference : RNAi) は 2 本鎖 RNA によって配列特異的に遺伝子の発現が抑制される現象で、配列特異性も高く 1 塩基の違いの認識も可能であり、医療分野におけるその臨床応用についてはその発見当初から大きく期待されていた。ここでは、ALS への核酸医薬としての short interfering RNA (siRNA) や発現型の short hairpin RNA (shRNA) の開発の研究現状と問題点について概説する。

2. 遺伝性神経変性疾患の RNAi による遺伝子治療の基本概念

SOD1 遺伝子変異による筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、多くのポリグルタミン病、APP や PSI 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にあい、変異したタンパクの発現を抑制する方法があれば、その機序の如何にかかわらず発症、進行を防止することが期待できるわけである。一方、同じ常染色体優性遺伝性の家族性 ALS でも ALS9 の angiogenin のばあいは点変異による機能低下が原因とされる haplotype insufficiency がその機序として考えられ、単なる変異遺伝子抑制の戦略はあてはまらなさそうである。さらに近年発見された常染色体優性遺伝性 ALS の遺伝子である TDP-43 や FUS の機序は gain of toxic function であるかは不明であり、今後の病態機序解明にともなう標的遺伝子の選定が待たれる。

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

RNAi という新しい戦略で本当に ALS が治療可能であるかどうかを検証する目的で、われわれは siRNA を全身で発現させた siRNA トランスジェニックマウスを作製して、これを ALS のモデルマウスである G93A 変異 SOD1 トランスジェニックマウスと掛け合わせてその治療効果を検討した¹⁾。この結果、ALS 症状の発症は 300 日以上抑制され、siRNAi という方法で家族性 ALS が治療可能であることを理論的に示したと考えられる。レンチウイルスによる SOD1 に対する shRNA 発現ベクターを変異 SOD1 トランスジェニックマウスの脊髄に直接注入したり、骨格筋に注入して運動ニューロンに逆行性にレンチウイルスを輸送して shRNA を発現させて G93A 変異 SOD1 トランスジェニックマウスの発症を遅延させたとの報告もなされた^{2,3)}。

4. 孤発性 ALS への応用

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

5. siRNA の in vivo へのデリバリー

ALSなどの神経変性疾患の治療にはRNAiの年単位の長期にわたる効果が必要であり、それにはウイルスベクターは有効である。shRNA発現コンストラクトをアデノウイルスやレンチウイルス、レトロウイルス、アデノ随伴ウイルスなどのウイルスベクターに組み込んで作製したshRNA発現ウイルスベクターをもちいて、in vivoの細胞へのsiRNA導入の報告がつつぎとされている。アデノ随伴ウイルスによる神経細胞への遺伝子導入はパーキンソン病を中心の患者さんで実際の臨床応用が始まっている²⁾。しかし、ALSのばあいは中枢神経広範なsiRNA導入が必要で、静脈投与などの全身投与による治療にはBBBを越える核酸医薬の開発が必要である。

化学修飾した合成siRNAを直接の脳室内に1~2週間持続注入することによって脳室の表層に近い海馬や大脳基底核にお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³⁾、SOD1に対するアンチセンス核酸を脳室に持続投与して変異SOD1トランスジェニックラットを治療したとの報告がされた⁴⁾。アンチセンス核酸の脳室投与による有効性については議論がある。われわれはsiRNAにvitamin Eを共有結合させた新しいsiRNAデリバリー方法を開発して、現在脳室投与による神経細胞へのデリバリーを試みている⁵⁾。

最近、狂犬病ウイルスの糖タンパクからデザインした29アミノ酸からなるペプチドに9つのアルギニンを結合させ(RVG-9R)、これとsiRNAとで複合体を作製して、静脈投与により脳血管関門を越えて、脳内神経細胞に到達して脳内のSOD1の発現を50%程度抑制したという⁶⁾。狂犬病ウイルスは脳血管内皮や神経細胞に発現しているニコチンアセチルコリン受容体の $\alpha 7$ サブユニットに結合して受容体介在性トランスサイトーシスによって神経細胞に到達したとされ、今後の臨床応用へ将来性が期待される。

おわりに

siRNAの核酸医薬としての臨床応用の研究には、shRNA毒性、Off-target効果など解決すべき課題はまだ多くあるが、任意の分子を標的にできて、かつその顕著な発現抑制効力と

には計り知れない潜在能力がある。それがゆえ、その基礎研究は爆発的に進んでおり、もっとも大きな問題である中枢神経へのデリバリー方法にも大きな進歩がありそうである。比較的近い将来にALSでの新しい治療法の開発にsiRNAの利用が突破口になることを期待している。

文 献

- 1) Saito Y, Yokota T, Mitani T, et al: Transgenic small interfering RNA halts amyotrophic lateral sclerosis in a mouse model. *J Biol Chem* 2005; 280: 42826—42830
- 2) Ralph GS, Radcliffe PA, Day DM, et al: Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nat Med* 2005; 11: 429—433
- 3) Raoul C, Abbas-Terki T, Bensadoun JC, et al: Lentiviral-mediated silencing of SOD1 through RNA interference retards disease onset and progression in a mouse model of ALS. *Nat Med* 2005; 11: 423—428
- 4) Li M, Ona VO, Guegan C, et al: Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model. *Science* 2000; 288: 335—339
- 5) Kaplitt MG, Feigin A, Tang C, et al: Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. *Lancet* 2007; 369: 2056—2058
- 6) Thakker DR, Natt F, Husken D, et al: Neurochemical and behavioral consequences of widespread gene knockdown in the adult mouse brain using nonviral RNA interference. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 17270—17275
- 7) Smith RA, Miller TM, Yamanaka K, et al: Antisense oligonucleotide therapy for neurodegenerative disease. *J Clin Invest* 2006; 116: 2290—2296
- 8) Nishina K, Unno T, Uno Y, et al: Efficient *In Vivo* delivery of siRNA to liver by conjugation of α -Tocopherol. *Mol Ther* 2008; 16: 734—740
- 9) Kumar P, Wu H, McBride JL, et al: Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature* 2007; 448: 39—43

Abstract**Gene therapy of ALS with RNA interference**

Takanori Yokota, M.D.

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

RNA interference (RNAi) is the process of sequence-specific, post-transcriptional gene silencing, initiated by double-stranded RNA (dsRNA). The gene therapy for familial ALS with siRNA had been started and showed promising results in the model mouse. There is a recent progress in the delivery of siRNA to the central nervous system. There are still important problems for application of gene therapy including off-target effect and gene delivery of siRNA, but a rapid progress can be expected because of the extremely high efficiency of siRNA.

(Clin Neurol, 49: 821—823, 2009)

Key words: small-interfering RNA, short-hairpin RNA, AAV, gene therapy, RNA interference

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 の場合にはカチオン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、脳内へ直接投与と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

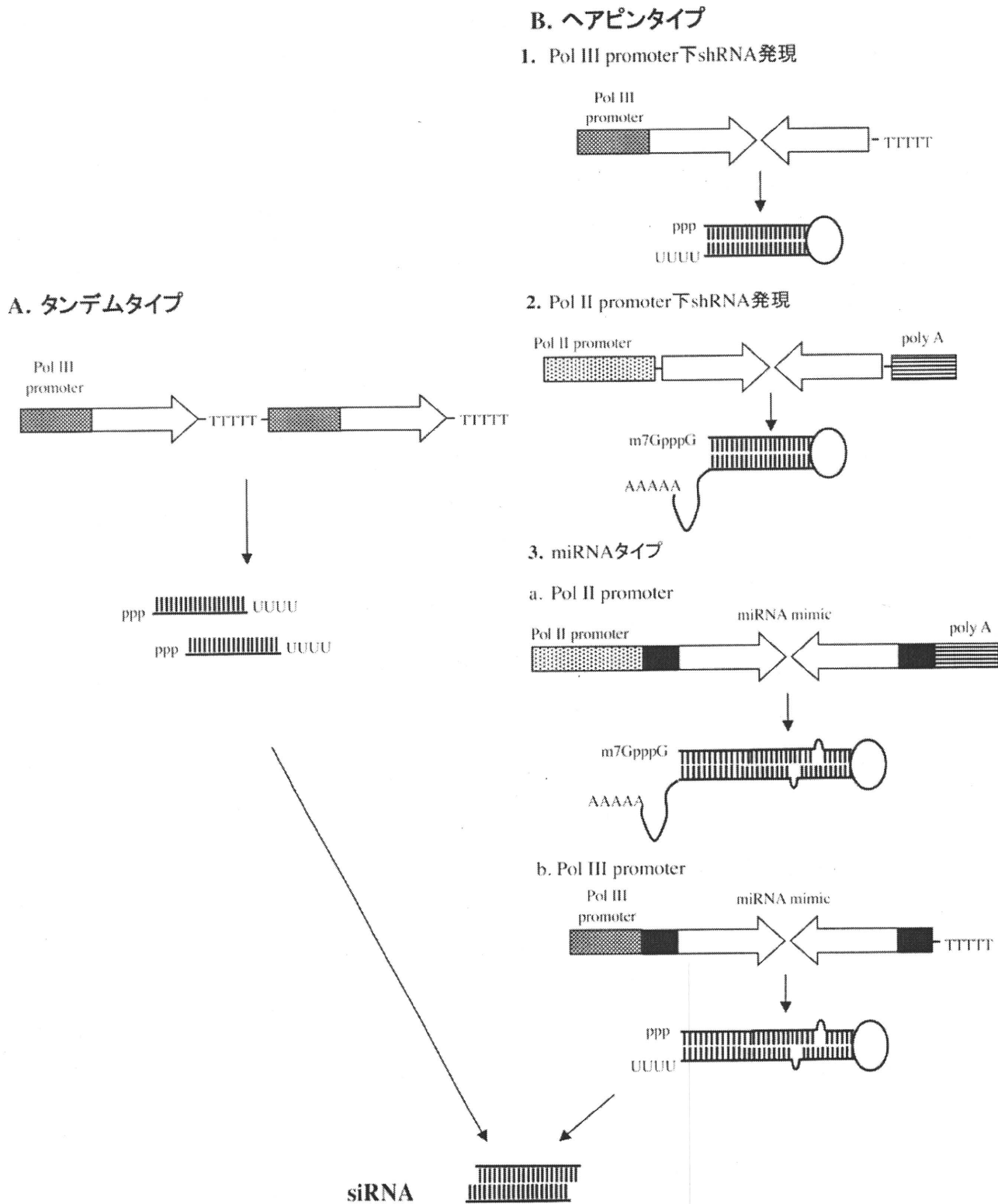


図1 siRNA発現ベクター

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。

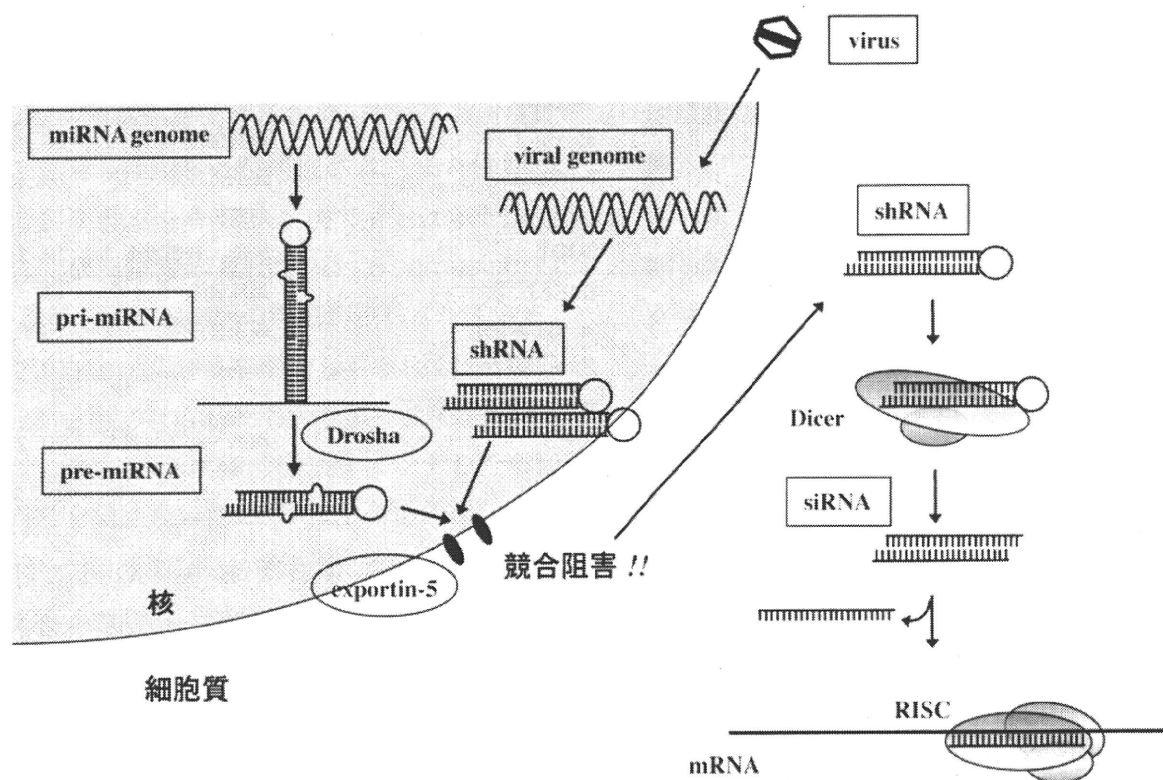


図2 細胞内におけるshRNA機構と過剰shRNAによるmiRNAプロセス障害

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 特異的な 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

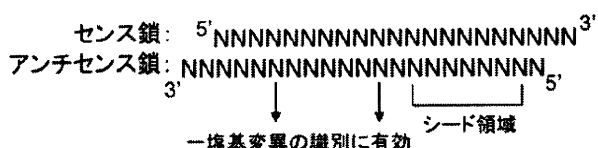


図3 siRNA配列上の重要なヌクレオチドの位置

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がかわることが変異でも、繰り返し配列数に関連する polymorphisms (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場合があり、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 dismutase 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でかつ効率の良い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を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) Drouet 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) Pfister 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) Ehlert 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, Wenyong Piao, Kazutaka Nishina, et al. HDL Facilitates *In Vivo* Delivery of α -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.

