

＜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 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ばあい、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⁵⁾。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⁶⁾、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⁷⁾。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⁸⁾。

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⁹⁾。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
