

1. RNAi を用いたウイルス複製抑制

横田 隆徳

東京医科歯科大学 脳神経機能病態

RNA interference (RNAi) は2本鎖 RNAi によって誘導される配列特異的な遺伝子発現抑制である。その中間産物である Short interfering RNA (siRNA) は哺乳動物細胞においても、インターフェロン反応などの副反応なく目的の遺伝子を切断でき、治験段階に入っているアンチセンス核酸やライボザイムより、有効性、配列特異性いずれもはるかに優れている。その核酸医薬として臨床応用は特にウイルス性疾患において進行している。OFF-Target 効果やデリバリー方法などまだまだ解決すべき問題点も多いが、siRNA の高い可能性から種々の方面において医療分野への応用が急速に進展していくことは間違いのないものと思われる。

1. RNAi とは

今日までのウイルス増殖抑制の方法はワクチンかウイルス蛋白やウイルス特異酵素をターゲットとした創薬であった。ここ数年、ウイルスゲノム複製に関わる転写、翻訳を核酸レベルで直接抑制しようという試みが、アンチセンス核酸、ライボザイム、DNA エンザイムなどで行われていたが、十分な抑制効果は得られなかった。最近、新しい遺伝子発現抑制 (gene silencing) として、これらをはるかに凌ぐ効果を持つ RNA interference (RNAi) が注目されている。

長い2本鎖 RNAi 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 RNA である short interference RNA (siRNA) に分解される。siRNA はアンチセンス鎖のみがとくほぐされて、ヘリケースなどの蛋白質から成る RNA 蛋白質複合体である RISC 複

合体 (RNA-induced silencing complex) に取り込まれ、アンチセンス鎖に相補的な配列を持つターゲット RNA をその中央で分解する。しかし、哺乳動物における2本鎖 RNA の導入は PKR や 2' 5' oligosynthetase の活性化による非特異的な翻訳抑制や RNA の分解が生じ、ホストの細胞の死んでしまうため、分子生物学的手法としても遺伝子治療の方法としても RNAi の利用の大きな妨げになっていた。しかし、2000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、siRNA の配列に特異的な遺伝子発現抑制が可能となった¹⁾。さらに、siRNA 配列を短い 9mer のループ配列でつないだ stem 型のパンドロミックな siRNA 配列を 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た²⁾。また、近年、加えて siRNA の新たな遺伝子発現抑制機構として siRNA を介した DNA の主にプロモーター領域の CpG アイランドをターゲットにメチル化が転写抑制を起こすことも明らかになっている³⁾。

RNAi 機構は酵母からヒトに至るまで多くの生物種で保存されていて、その生物学的な意義としてはウイルスなどに対する防御機構として進化してきたという仮説が提唱されている。siRNA の発見以来、すぐにいくつかのウイルスにおいて、細胞内でのウイルス遺伝子の切断やウイルス遺伝子複製モデルにおいて siRNA が有効であるとの報告が相次いでいる。現在まで、エイズウイルス (HIV)⁴⁾、C 型⁵⁻⁸⁾・B 型^{9,10)} 肝炎ウイルス、ポリオウイルス¹¹⁾、インフルエンザウイルス^{12,13)}、ウエストナイルウイルス¹³⁾ SARS ウイルス、ウエストナイルウイルスを含むの多くウイルスで

連絡先

〒113-8519 東京都文京区湯島 1-5-45

TEL : 03-5803-5234

FAX : 03-5803-0169

E-mail : tak-yokota.nuro@tmd.ac.jp

有効な siRNA の報告がある．ここでは，我々が作製した C 型肝炎ウイルス（HCV）に対する siRNA について⁵⁾ 紹介する．

2. siRNA ターゲットサイトの選択

HCV 遺伝子は 9600 塩基からなるプラス 1 本鎖 RNA で，5' と 3' 非翻訳領域（UTR）に挟まれた ORF からなる．5' 側の 341 塩基の UTR は複雑な RNA 構造の IRES（internal ribosome entry site）（一部コアタンパクコード領域に及ぶ）を含み，HCV RNA はキャップ非依存的にこの 5' IRES により翻訳される．3' UTR にはポリ U 配列と 98 塩基からなる 3'X 領域が存在している．ORF は 5' から C, E1, E2, p7 の構造蛋白，NS2, NS3, NS4A, NS5A, NS5B の非構造蛋白を含む 3010 のアミノ酸からなる 1 本の大きなポリプロテインをコードしている（図 1 上）．

HCV は 1 本鎖 RNA ウイルスであるがゆえ，プルーフリーディング機能がなく，ウイルス複製時に特に ORF 領域において RNA ポリメラーゼの読み違いによる変異を起こし易い．HCV 遺伝子が同定されて以来，様々な遺伝子型が報告されてきたが，現在では分子進化学的に遺伝的に距離

をもつ 6 つの遺伝子型に分類，整理されている．また，同一個体内においても遺伝子配列の異なったウイルス集団が存在して quasispecies と呼ばれている．

Quasispecies の問題から，もし siRNA にその配列上ターゲットサイトとのミスマッチ変異が生じた場合，特にその変異部位が 19 nt のうち 5' から 9-13 塩基目付近であると，たとえ 1 塩基でも大きく切断効率を下げる場合があることが報告されている¹⁴⁾．実際に HIV で siRNA の効果が HIV に生じた点変異で著しく減弱すること報告されている¹⁵⁾．そこで我々は HCV の遺伝子型に関わらず 92-98% 配列が保存されている 5'UTR IRES に siRNA のターゲットを絞ってデザインした（図 1 下）．siRNA の至適配列については，一定の法則がわかっている．siRNA が RISC に取り込まれる際にアンチセンス鎖がとりこまれるために，アンチセンス鎖の 5' 末端の内部エネルギーが低いことが望ましく 5' 末端が A または U であるなどが重要とされる¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾．

3. HCV に対する siRNA の効果

HCV は通常の培養細胞には感染せず，感染培養細胞がないことが，HCV 研究の大きな妨げとなっていたが，1999 年

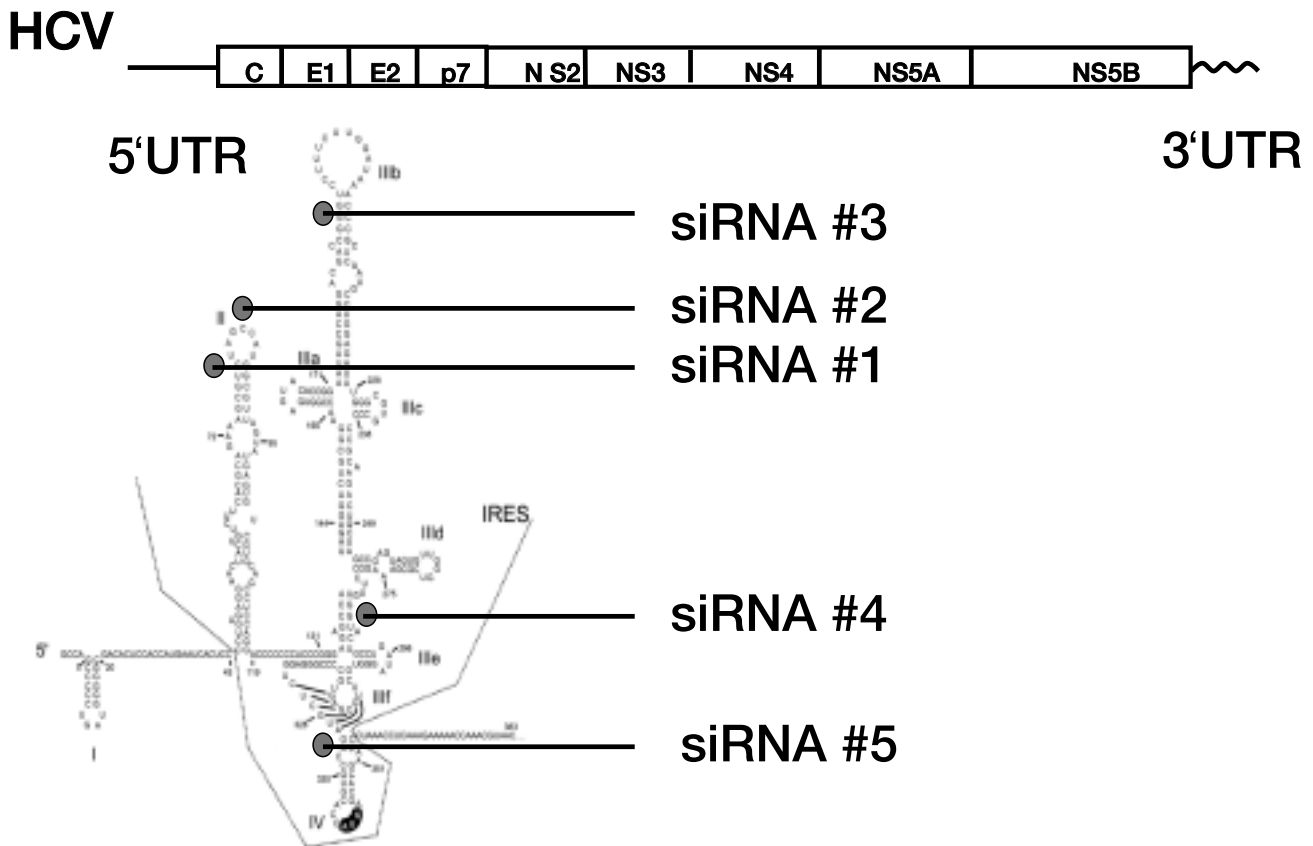


図 1 (上) HCV の遺伝子構造と
(下) HCV 5'UTR IRES の RNA の 2 次構造と siRNA のターゲット部位

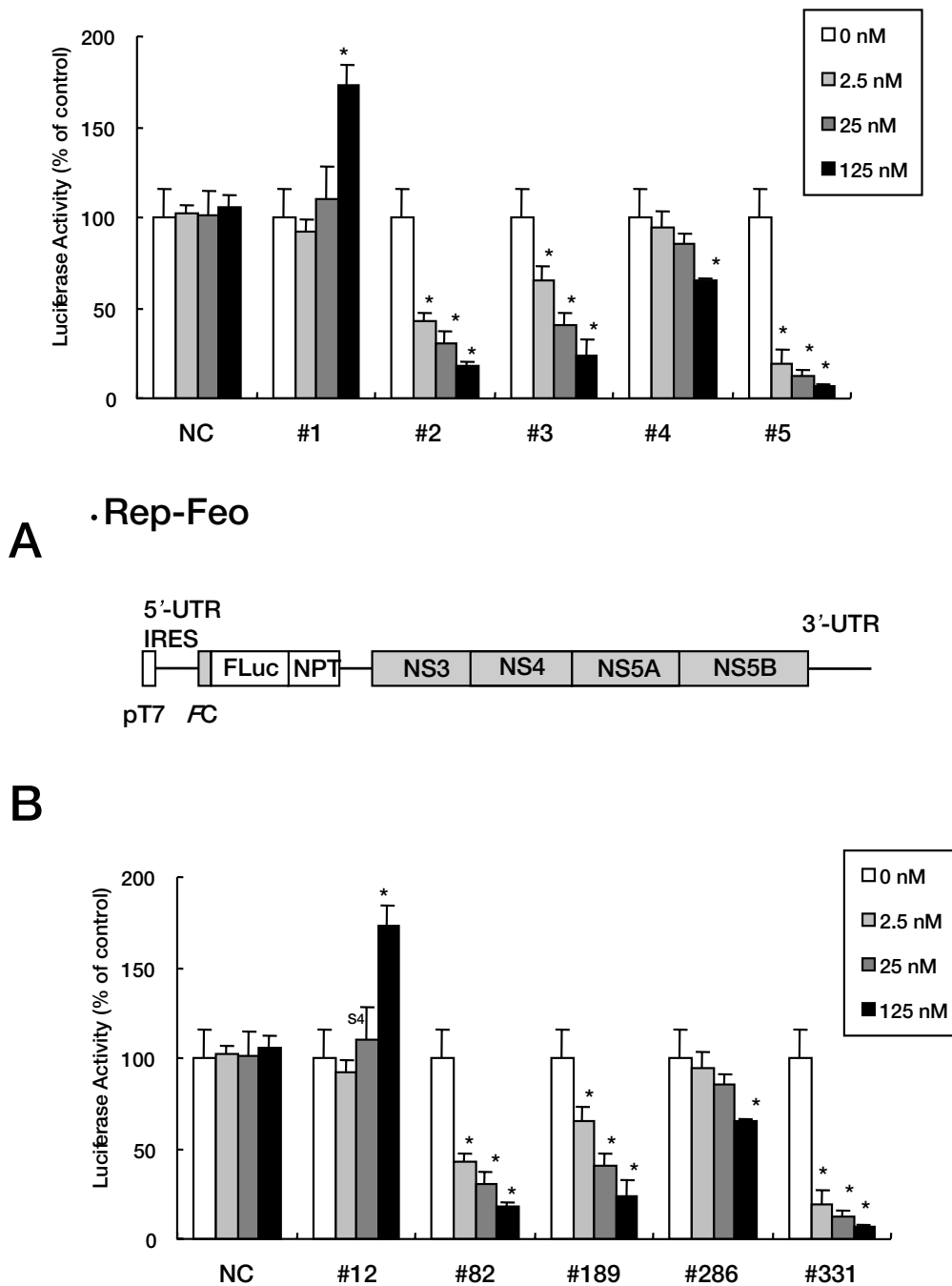


図2 合成 siRNA の HCV レプリコン (Rep-Feo) へのルシフェラーゼ活性抑制効果 (文献 5 から転載)

に Bartenschlagar らによりヒト肝細胞癌株 Huh-7 細胞を用いて HCV の自己増殖を可能にした HCV レプリコンが報告された。HCV ゲノムの構造蛋白をコードする部分をネオマイシン耐性遺伝子に置換した構造で、ヒト肝細胞癌株 Huh-7 細胞に導入して、HCV の複製機構を介して獲得したネオマイシン耐性によって安定増殖クローンが選択され、さらにレポーター遺伝子としてネオマイシン耐性遺伝子にルシフェラーゼ遺伝子を融合させて、HCV 遺伝子複製効率

をルシフェラーゼ活性によって簡便に評価できるようになった。

図 2 に我々の 5' UTR IRES に対してデザインした siRNA の効果を示す。上記 HCV レプリコン (Rep-Feo) システムにおいて siRNA331 が最も有効に発現を抑制した。コントロールに比較して 125 nM の siRNA 濃度では 97% のルシフェラーゼ活性の抑制が達せられ、2.5 nM の非常に低濃度 siRNA でも約 80% の抑制が見られた。この結果

は HCV レプリコン RNA のノザンブロットや非構造タンパクのウエスタンブロットでも確かめられた (図3)。この siRNA の効果は従来の機能性核酸試薬であるアンチセンスオリゴDNA, リボザイムと効果の比較しても圧倒的に低濃度でより高い抑制活性であった。

また, ウイルス遺伝子そのものを標的とするのではなく, ウイルス増殖に必要な宿主側の内在性遺伝子を標的にする方法も考えられている。HIV 感染における TSG101¹⁹⁾ や NF κ B p65²⁰⁾ サブユニットなどを siRNA で発現を抑制し, HIV ウイルス増殖を抑制したとの報告もある。

さらに, CD4 や CCR5 などの HIV-1 感染におけるリンパ球側に内在するウイルス受容体を標的としてその発現を抑

制する方法も成果があり注目されている²¹⁾。CD34+ 造血幹細胞に CCR5 に対する siRNA をレンチウイルスで安定発現させたところ, 正常に分化して *in vitro* でマクロファージに *in vivo* で T リンパ球になり, その両者ともに HIV ウイルスに抵抗性になったとの報告がされ, 今後の臨床応用に期待が持たれている²²⁾。

4. HCV に対する siRNA 発現ウイルスベクターの *in vivo* 効果

siRNA をウイルスベクターで細胞内に発現するためには siRNA 発現 DNA ベクターの作製が必要である。我々は Pol III 系のプロモーターであるヒト U6 プロモーターの下流に

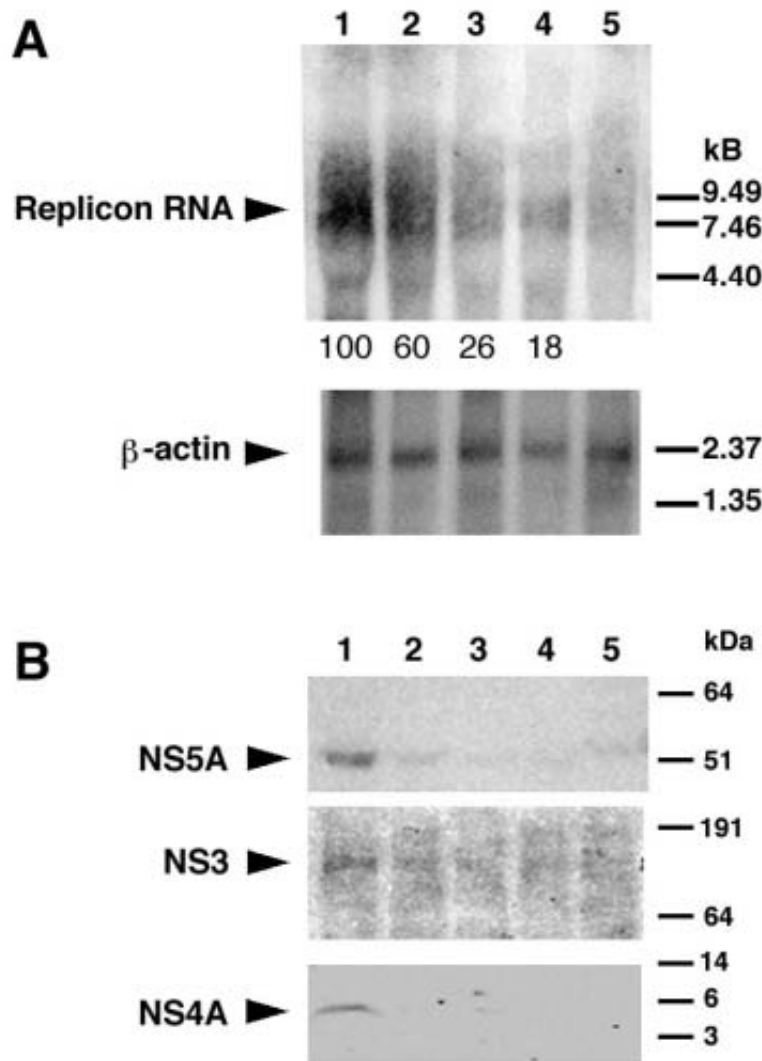


図3 siRNA331 の HCV レプリコン RNA, 非構造タンパクへの発現抑制効果 (文献 5 から転載)

(A) レプリコン配列全長に対するプローブを用いたノザンブロット

(B) NS5B に対するプローブや抗体を用いたウエスタンブロット

lane 1, mock; lane 2 siRNA 331 2.5 nM; lane 2 siRNA 331 25 nM; lane 2 siRNA 331 125 nM; no transfection

ステムループタイプの siRNA 発現ベクター配列を挿入してその効果を検索した。ステムループタイプでは複製に際してセンスやアンチセンス配列に高頻度に変異が入ることが知られており、それを防ぐため複数のミスマッチ変異をセンス鎖に導入した²³⁾。これによって、HCV ゲノム切断効率は下がらず、より安定な siRNA 発現ベクターが完成した。さらにこれをアデノウイルスベクターに導入することによって、HCV レプリコンのルシフェラーゼ活性を測定感度以下にすることに成功し、これを用いて肝臓に HCV ゲノムが発現するトランスジェニックマウスにおいて、*in vivo* での HCV 遺伝子発現抑制に成功している (論文投稿中)。さらに、現在、サルでの C 型肝炎モデルにおいてその効果を検証中である。

5. siRNA の *in vivo* へのデリバリー

siRNA は細胞質で RISC に取り込まれて切断活性を発揮することより、siRNA のデリバリーは細胞膜さえ越えればよく、遺伝子治療によく使われる発現 DNA ベクターのように核にアクセスする必要がない。McCaffrey²⁴⁾ らはマウスの尾静脈から 10-50 (g の合成 siRNA を体重の 5-10 % の大量の PBS 溶液で 5-7 秒の短時間で注入するハイドロダイナミックス導入法で、マウスの肝細胞に siRNA の導入に成功した。この方法によって腎臓、脾臓、肺、すい臓にも有効な siRNA の導入が可能である²⁵⁾。このハイドロダイナミックス導入法で導入された Fas²⁶⁾ や caspase 8²⁷⁾ に対する合成 siRNA で、マウスに誘発された激症肝炎による死亡率を低下させとの報告がされた。このハイドロダイナミックス導入法をそのまま臨床応用することは難しいが、siRNA が *in vivo* で有効に作用することを示した重要な報告である。最近、siRNA のセンス鎖の 3' 末端にコレステロールを結合させることにより、通常の方法の静脈注射でも肝臓と腸管への導入が可能でありことが示された²⁸⁾。その他、肝臓への有効なカチオニックリポソームベクターが次々と開発されており²⁹⁾³⁰⁾、期待できる。

長期の抑制効果にはウイルスベクターが必要となる。ステムループタイプアピニン型 siRNA 発現ベクターコンストラクトをアデノウイルス³¹⁾ やレンチウイルス³²⁾、レトロウイルス³³⁾、アデノ随伴ウイルス³⁴⁾ 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。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^{35,36)}。

6. おわりに

siRNA による臨床応用には siRNA のデリバリーと off-target が大きな問題点であろう。肝臓は siRNA のデリバリーの面では最も良い臓器の 1 つと考えられ、特にウイルス

性肝炎は siRNA のターゲットの疾患として今後の発展に大いに期待が持たれる。

文 献

- 1) Elbashir S., Harborth, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. : Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494-498, 2001.
- 2) BrummelkampTR, Bernards R, Agami R. : A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 29: 550-553, 2002.
- 3) Kawasaki H, Taira K. : Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells. *Nature*. 431: 211-217. 2004.
- 4) Kitabwalla MN, Ruprecht RM. : RNA interference--a new weapon against HIV and beyond. *Engl. J. Med.*, 347: 1364-1367, 2002.
- 5) Yokota T, Sakamoto N, Enomoto N, et al. Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO Rep* 4: 602-8, 2003.
- 6) Randel G, Grakoui A, Rice CM. Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 235-340, 2003.
- 7) Kapadia SB, Brideau-Andersen A, Chisari FV. Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100: 2014-8, 2003.
- 8) Wilson JA, Jayasena S, Khvorova A, et al. RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100: 2783-8, 2003.
- 9) Shlomai A, Shaul Y. : Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference. *Hepatology* 37: 764-770, 2003.
- 10) Giladi H, Ketzinel-Gilad M, Rivkin L, Felig Y, Nussbaum O, Galun E. : Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus replication in mice. *Mol. Ther.*, 8: 769-776, 2003.
- 11) Gitlin, L, Karelsky S, Andino, R. : Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature*, 418: 430-434, 2002.
- 12) Ge Q, McManus MT, Nguyen T, Shen CH, Sharp PA, Eisen, HN, Chen J. : RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 100: 2718-2723. 2003
- 13) McCown M, Diamond MS, Pecosz A. : The utility of siRNA transcripts produced by RNA polymerase I in down regulating viral gene expression and replication of negative- and positive-strand RNA viruses. *Virology*, 313: 514-524, 2003.
- 14) Amarzguoui, M., Holen, T., Babaie, E., & Prydz, H. Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA, *Nucleic Acids Res.*, 31: 589-595, 2003.
- 15) Boden, D. Oliver Pusch, Frederick Lee, Lynne Tucker, and Bharat Ramratnam Human Immunodeficiency

- Virus Type 1 Escape from RNA Interference. *J. Viol.* 77: 11531-11535, 2003.
- 16) Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell.* 115: 209-16, 2003.
 - 17) Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115: 199-208, 2003.
 - 18) Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A. : Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol.* 22: 326-330, 2004.
 - 19) Garrus, J.E., von Schwedler, U.K., Pornillos, O.W., Morham, S.G., Zavitz, K.H., Wang, H.E., Wettstein, D.A., Stray, K.M., Cote, M., Rich, R.L., Myszka, D.G., & Sundquist, W.I. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* 107: 55-65, 2001
 - 20) Surabhi RM, Gaynor RB. : RNA interference directed against viral and cellular targets inhibits human immunodeficiency Virus Type 1 replication. *J Virol.* 76: 12963-12973, 2002
 - 21) Arteaga HJ, Hinkula J, van Dijk-Hard I, Dilber MS, Wahren B, Christensson B, Mohamed AJ, Smith CI. : Choosing CCR5 or Rev siRNA in HIV-1. *Nat Biotechnol.* 21: 230-231, 2003.
 - 22) Qin XF, An DS, Chen IS, Baltimore, D. : Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 183-188, 2003
 - 23) Miyagishi M, Sumimoto H, Miyoshi H, Kawakami Y, Taira K. : Optimization of an siRNA-expression system with an improved hairpin and its significant suppressive effects in mammalian cells. *J Gene Med* 6: 715-723, 2004.
 - 24) McCaffrey AP, Meuse L, Pham, TT, Conklin D, Hannon G.J, Kay MA. : RNA interference in adult mice. *Nature* 418: 38-39, 2002.
 - 25) Lewis DL, Hagstrom JE, Loomis AG, Wolff JA, Herweijer H. Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nat Genet* 32: 107-108, 2002.
 - 26) Song E, Lee S-K, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar P, Lieberman J. : RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nature Med* 9: 347-351, 2003.
 - 27) Zender L, Hutker S, Liedtke C, Tillmann HL, Zender S, Mundt B, Waltemathe M, Gosling T, Flemming P, Malek NP, Trautwein C, Manns MP, Kuhnel F, Kubicka S. : Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100: 7797-802, 2003
 - 28) Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, Elbashir S, Geick A, Hadwiger P, Harborth J, John M, Kesavan V, Lavine G, Pandey RK, Racie T, Rajeev KG, Rohl I, Toudjarska I, Wang G, Wuschko S, Bumcrot D, Kotliansky V, Limmer S, Manoharan M, Vornlocher HP. : Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432: 173-8, 2004
 - 29) Yano J, Hirabayashi K, Nakagawa S, Yamaguchi T, Nogawa M, Kashimori I, Naito H, Kitagawa H, Ishiyama K, Ohgi T, Irimura T. : Antitumor activity of small interfering RNA/cationic liposome complex in mouse models of cancer. *Clin Cancer Res.* 10: 7721-6, 2004
 - 30) Spagnou S, Miller AD, Keller M. : Lipidic carriers of siRNA: differences in the formulation, cellular uptake, and delivery with plasmid DNA. *Biochemistry.* 43: 13348-56, 2004.
 - 31) Xia H, Mao Q, Paulson HL, Davidson BL : . siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. *Nat. Biotechnol.*, 20: 1006-1010, 2002.
 - 32) Qin XF, An DS, Chen IS, Baltimore D. : Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 183-188, 2003.
 - 33) Barton GM, Medzhitov R. : Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. *Proc. Natl .Acad. Sci. USA.* 99: 14943-14945, 2002.
 - 34) Hommel JD, Sears R., Georgescu D, Simmons DL, DiLeone RJ. : Local gene knockdown in the brain using viral-mediated RNA interference. *Nature Medicine* 9: 1539 - 1544, 2003.
 - 35) Nakai H, Fuess S, Storm TA, Muramatsu S, Nara Y, Kay MA. : Unrestricted hepatocyte transduction with adeno-associated virus serotype 8 vectors in mice. *J Virol.* 79: 214-24, 2005.
 - 36) Wang Z, Zhu T, Qiao C, Zhou L, Wang B, Zhang J, Chen C, Li J, Xiao X. : Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nat Biotechnol.* 23: 321-8, 2005.

Gene therapy of virus replication with RNAi

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 short interference RNA (siRNA) cleaves target RNA even in mammalian cells without adverse effects of long dsRNA such as an interferon response, and works much more efficiently than antisense oligonucleotide and ribozyme. The clinical application of siRNA has been tried especially for the viral diseases. 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.

