

平成 22 年 6 月 8 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790610  
 研究課題名（和文） 変異遺伝子特異的な新規 RNA 干渉法の実用化を目指した *in vivo* 投与での検討  
 研究課題名（英文） *In Vivo* Application of an RNAi Strategy for the Selective Suppression of a Mutant Allele  
 研究代表者  
 久保寺 隆行（KUBODERA TAKAYUKI）  
 東京医科歯科大学・医学部附属病院・医員  
 研究者番号：40376801

研究成果の概要（和文）：我々が考案した、いかなる遺伝子変異に対しても変異アレル特異的に発現抑制が可能な新しい RNAi 法を、アデノ随伴ウイルスベクターを用い *in vivo* 投与することで目的の組織で変異型蛋白の発現を抑制しつつ野生型蛋白の発現を補うことに成功し、本方法が遺伝子治療の手法として実用的であることを証明した。

研究成果の概要（英文）：We previously proposed a strategy for selective suppression of mutant allele. We succeeded in mutant gene suppression in the target organ of mice, using *in vivo* administered adeno-associated viral vectors. Our method may prove useful for siRNA-based gene therapy for inherited diseases.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：(1)siRNA(2)遺伝子治療(3)トランスジェニックマウス(4)ALS(5)SOD1(6)AAV

## 1. 研究開始当初の背景

強力な遺伝子発現抑制方法である RNA 干渉 (RNAi) を用いた遺伝子治療は、常染色体優性遺伝性疾患において、根本的な治療法となる可能性がある。しかし、ここで野生型遺伝子の発現も抑制してしまえば逆に新たな症状を引き起こす可能性があるため、野生型アレルには影響せず変異型アレルのみを抑制す

ることが望ましい。その方法として我々はこれまで、いかなる遺伝子変異に対しても変異アレル特異的に発現抑制が可能な新しい RNAi 法を考案し、*in vivo* においても有効であることを示すことに成功した。

## 2. 研究の目的

本 RNAi 法の臨床応用を現実のものにするために、遺伝子治療の手法として実用的かつ有

用であることを証明する。この目的に際し、1つのベクター上に siRNA と siRNA が切断できないようデザインした野生型 cDNA をタンデムに配置した共導入カセットを作製、それをさらにウイルスベクター化し ALS モデルマウスへの in vivo デリバリーを試み、目的の組織で変異型蛋白の発現を抑制しつつ野生型蛋白の発現が補われ有効に機能するかを検証する。

### 3. 研究の方法

#### 1) siRNA が効かない野生型 SOD1 発現ベクターの作製

マウス SOD1 の中で siRNA の標的部位となる塩基配列を、そのコドンよりコードされるアミノ酸は変えないように、変換できる塩基をすべて置換し、siRNA 抵抗性マウス野生型 SOD1 発現ベクターを作製する。

#### 2) siRNA と siRNA 抵抗性野生型 SOD1 を共導入するためのベクターの構築

1つのベクター上にそれぞれ独自のプロモーター下にある抗 SOD1 siRNA と siRNA 抵抗性マウス野生型 SOD1 cDNA をタンデムに配置させた発現カセットを作製する。

#### 3) siRNA・siRNA 抵抗性マウス野生型 SOD1 共導入アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの作製

培養細胞系で有効性を確認した siRNA・siRNA 抵抗性マウス野生型 SOD1 共導入カセットを AAV ベクター化する。共導入カセットを挿入した AAV ベクタープラスミドを AAV ヘルパープラスミド、アデノウイルスヘルパープラスミドと共に 293 細胞にトランスフェクションにより一括導入して siRNA・siRNA 抵抗性マウス野生型 SOD1 共導入 AAV ベクターを作製する。

#### 4) AAVベクターのALSモデルマウスへの投与

作製した AAV ベクターを ALS のモデルマウスである G93A ヒト変異 SOD1 トランスジェニックマウスに投与する。尾静脈より経静脈的に投与し、投与 3 週間後に犠死、肝臓から蛋白を抽出し、SOD1 に対する抗体を用いウエスタンブロッティングを施行する。この際、ウエスタンブロッティング上でヒト SOD1 タンパクと内因性のマウス SOD1 タンパクとは移動度の違いで区別できる。

### 4. 研究成果

#### 1) siRNA・siRNA 抵抗性マウス野生型 SOD1 共導入アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの作製

作製した AAV ベクターを培養細胞にトランスダクションし、siRNA によって抑制された内因性 SOD1 の発現が siRNA 抵抗性野生型 SOD1 により補われていることを定量的 RT-PCR 及びウエスタンブロッティングにより確認した。

#### 2) siRNA・siRNA 抵抗性マウス野生型 SOD1 共導入 AAVベクターのALSモデルマウスへの投与

作製した AAV ベクターが培養細胞系で機能していることを in vitro で確認した後、ALS のモデルマウスである G93A ヒト変異 SOD1 トランスジェニックマウスに尾静脈より経静脈的に全身性に投与した。投与から 3 週間後に解剖を施行し、摘出した肝臓から蛋白を抽出、抽出した蛋白を用いたウエスタンブロッティングでヒト変異 SOD1 タンパクの発現を抑制したままマウス野生型 SOD1 タンパクを補えていることを確認した(図)。

本方法の in vivo デリバリーが可能であることを示し、遺伝子治療の手法として実用的かつ有用であることを証明した。

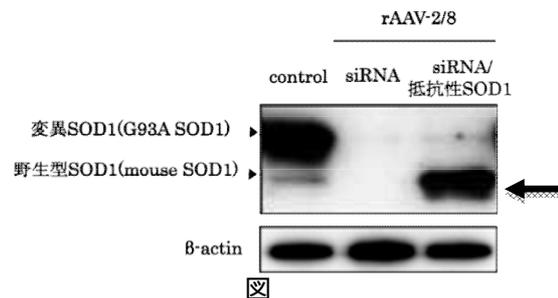


図  
siRNA・siRNA 抵抗性マウス野生型 SOD1 共導入 AAV ベクターの投与により、ヒト変異 SOD1 の発現は著明に抑制したまま、野生型マウス SOD1 蛋白の発現を補うことに成功した。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

1, sasaguri H, Mitani T, Anzai M, Kubodera T, Saito Y, Yamada H, Mizusawa H, Yokota T, Silencing efficiency differs among tissues and endogenous microRNA pathway is preserved in short hairpin RNA transgenic mice, FEBS Letters, 査読有, 583, 2009, 213-218

2, 久保寺隆行, 横田隆徳, ウイルスベクターを用いた shRNA による遺伝子治療の現状と問題点, Antisense, 査読無, 12, 2008, 37-47

3, 久保寺隆行, 横田隆徳, ALS の遺伝子治療, Clinical Neuroscience, 査読無, 2008, 337-339

[学会発表](計4件)

1, Kubodera T, Yamada H, Ito K, Anzai M, Mitani T, Mizusawa H, Yokota T, In vivo Application of a New RNAi Strategy for selective Suppression of a Mutant Allele to Any Mutation., ASGT 11<sup>th</sup> Annual Meeting, May 28-Jun 1, 2008, Boston, Massachusetts

2, 久保寺隆行, 山田宏美, 横田隆徳, 水澤英洋, 変異遺伝子特異的なRNA干渉法のin vivoへの応用, 第49回日本神経学会総会, 2008年, 5月15日-17日, 008年, 5月15日-17日, 横浜

3, 久保寺隆行, 大平進嘉, 横田隆徳, 水澤英洋, siRNA発現アデノ随伴ウイルスベクターを用いた家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)の遺伝子治療, 第50回日本神経学会総会, 2009年, 5月20日-22日, 仙台国際センター

4, Takayuki Kubodera, Shinga Ohira, Yuko Katakai, Hirofumi Akari, Yukihiro Hirai, Takashi Shimada, Hiroaki Mizukami, Keiya Ozawa, Hidehiro Mizusawa, Takanori Yokota, shRNA-Mediated Gene Silencing in Non-Human Primates with AAV8, 第15回日本遺伝子治療学会学術集会, 2009年, 7月9日-11日, 大阪大学コンベンションセンター  
〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ:

<http://www.tmd.ac.jp/med/nuero/study.html#b>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

久保寺 隆行 (KUBODERA TAKAYUKI)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・医員

研究者番号: 40376801

### (2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者  
なし