

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 遺伝子発現の特異的抑制による神経難病の新しい治療法の開発

2. 研究代表者： 金澤 一郎(国立精神・神経センター 総長)

3. 研究内容及び成果：

ハンチントン病は、大脳基底核の線条体の神経細胞が選択的に変性・脱落するが、その選択性が何によるかは明らかでなかった。これに対し研究代表者は、SORST に先立つ CREST 研究において、ハンチントン病で死亡した患者の凍結脳を用いて単一神経細胞の発現遺伝子解析技術による世界初の予備的な研究を行い、残存する線条体細胞では正常なハンチンチンタンパク質に比して異常なハンチンチンタンパク質の発現量がわずかではあるが相対的に多いことを見出した。このような状態が長年にわたって続くことによって線条体細胞に選択的な細胞死がもたらされることが示唆された。

本研究では、ハンチントン病遺伝子(ハンチンチン遺伝子)の塩基配列についてコンピュータで BLAST 検索を行い、連続する 21 個の塩基対の中でハンチンチン遺伝子に極めて特異的でユニークな塩基配列をいくつか見出した。それらは、5' 端の非翻訳領域あるいは CAG リピートに比較的近い翻訳領域などからであった。これらの二重鎖 RNA を合成して、その効果を調べる実験に供した。

これらの siRNA (small interfering RNA) の効果を見るために、まず培養細胞レベルでの効果を調べることから始めた (in vitro effect)。そのために本研究チームでは、GFP (green fluorescent protein) 遺伝子をハンチンチン遺伝子のエクソン 1 につないだコンストラクトをあらかじめ COS7 細胞あるいは Neuro 2A 細胞などにトランスフェクトして実験を行った。この培養細胞を用いることにより、蛍光顕微鏡下で GFP を観察することが出来れば、そこにはハンチンチン遺伝子が発現しているとみなせる。この培養細胞に様々な濃度の siRNA を直接投与することにより、遺伝子抑制効果を検討した。

その結果、用いた siRNA のうち、非翻訳領域に対するものはある程度効果を認めたものの、効果は比較的弱かった。それに対して、CAG リピート部の近傍領域に対する siRNA は、わずか 5 nmol の濃度で明らかな抑制効果を認め、40 nmol ではほぼ 90 % のハンチンチン遺伝子発現抑制効果が得られた。なお、間接的に GFP の蛍光の強さを指標にするのではなく、ハンチンチン遺伝子そのものの mRNA の発現量をライトサイクラーにて直接測定した場合にも、同様の結果を得ることが出来た。またこの抑制効果は、 β -actin や GAPDH 遺伝子などに対しては認められないことを確かめてあり、ハンチンチン遺伝子に対して特異的であると考えられる。本研究チームはこの siRNA の塩基配列とそのハンチンチン遺伝子発現抑制効果について、Nature 誌に投稿したが、一般的な話題ではないというコメントにより受領されなかったため、同年中の報告の必要性から Proc. Japan Acad. (2003) に発表するとともに特許を出願した。

次のステップとして、丸ごとの動物としてのマウスに対する、本研究チームで作製した siRNA の効果 (in vivo effect) を検討した。ハンチントン病モデルマウスとしては、英国のベイツが作成し、米国のジャクソン研究所で販売しているモデルマウス (R6/2) を購入して繁殖させた。このマウスは、ヒトのハンチンチン遺伝子の CAG リピート領域を含むエクソン1のみを導入発現させたトランスジェニックマウスであり、CAG のリピート数が 150 個程度にまで極端に伸長している。このマウスは通常は 9 週ごろから体重減少、体幹や四肢の振戦などが発症し、15 週までに痙攣や無動状態を呈して死亡する。生後 2 日目のマウスの脳内に、本研究チームで開発した siRNA をトランスフェクタミンとともに 40 nmol 程度注入しておいた R6/2 マウスでは、処理していないマウスに比して体重減少が軽度であり、1ヶ月程度寿命が延長し、オープンフィールドテストにおける運動量減少も軽度に留まった。

このように臨床的に効果があった個体の脳を病理形態学的に検索したところ、線条体の萎縮は軽度にとどまり、脳室の拡大も明らかに軽度であった。これらの個体の脳では、神経細胞内封入体の頻度や程度も、siRNA 処理を行わなかったマウスに比べて、明らかに軽いものであった。さらに、ハンチンチン遺伝子の発現の程度をこの遺伝子の mRNA 量で測定したところ、siRNA 処理によって明らかに減少しており、ハンチンチン遺伝子の発現抑制が明らかであった。この結果は Science に投稿したが、またも一般的な話題ではないとされ、次いで投稿した Nature Medicine にはハンチントン病ではない別の CAG リピート病のモデルに対する siRNA 治療を試みた論文が同誌に2ヶ月前に載ったばかりであることを主たる理由にして受領されなかった。そこで我が国の神経科学領域の国際誌である Neuroscience Research に投稿して受領され、既に発行されている(2005)。

その後、siRNA と塩基配列上は類似しながらも、分子内にヘアピン構造を有する shRNA (small hairpin RNA) の方が siRNA よりも効果が強いという報告がなされるようになった。そこで、shRNA の効果を siRNA 効果と比較するために、siRNA を用いた in vivo 実験とほとんど同一のプロトコルで研究を行った。その結果、確かに効果は shRNA の方が強いことを確認したが、その効果は定性的にはほとんど同じであることが分かった。それだけでなく、この事実は siRNA を用いた実験の再確認にもなったと考えており、現在論文として投稿する予定である。

4. 事後評価結果:

4-1 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

重篤な神経難病であるハンチントン病に対して、siRNA によるハンチンチン遺伝子の発現抑制を in vitro と マウスを用いた in vivo の実験系で示し、ハンチントン病治療法の一つの有力な治療法の基盤となる成果を出した。計画の核心である siRNA 法がハンチンチン遺伝子の発現抑制にある程度有効であることを示したことは十分に評価出来る。根本治療への可能性および、ヒトへの応用の可能性は、将来的な臨床応用にブレイクスルーを与える成果として評価される。

しかしながら、用量は一点のみの定性的な結果であること、生後 2 日目の投与が 10 週以上も効果を継続したように見える結果についてのメカニズムの解析や再現性を含めた検証が不足してい

ることなどは、大型研究費による研究としては不十分さが指摘される。この研究がスタートした時の研究環境では、本研究計画は新しいものであったが、現在ではこれらの方法論と技術は一般的な方法論と確立されているので、定性的な研究成果だけでは国際的なレベルはあまり高くない。また、当初計画のイオンチャンネル塩基多型と病態に関する研究が実施されていないことから、患者への応用に向けての条件付けが不十分であるといわざるを得ない。基礎的問題の解決も未完で、本研究のテーマである「治療法の開発」は見直しも立っていない。また、二重鎖 RNA-ペプチド化合物の作成が中止されたこと、など研究の遂行においても不十分な点が指摘される。

論文発表は十分ではないが、本研究に最も関連した論文は、Neuroscience Research 誌の Excellent Paper Award を受賞している。特許申請では、国内 1 件、国外 1 件の特許出願が行われており順調であると思われる。

本研究チームは大きな研究体制ではなかったため、途中で類似の研究グループとの連携を行っても良かったと考えられる。概ね適当な研究体制・遂行状況であったとの意見もあるが、設置した大型設備で今回の成果に直結したと言えないものがあり、費用対効果はあまりよくないとの意見もあった。

4-2 成果の戦略目標・科学技術への貢献

神経変性疾患につき、その原因遺伝子を標的とした siRNA 治療が哺乳動物モデルで可能であることを証明出来たことは意義がある。ハンチントン病に代表される CGA リピートに起因する他の神経難病の治療にも効果を期待させる基盤研究として、医学分野に貢献する可能性があり意義がある。一般的な疾患を対象とした類似研究と比較すると世界に先駆けた研究とはいえないが、siRNA を使用した神経変性の動物モデルでの治療成功例は、ALS モデルやアタキシン-3 などで報告されており、本研究とほぼ同時期の発表であることから世界的なレベルでも第一線にいるものと判断され、ハンチントン病モデルマウスを用いた研究では、本研究の発表が外国からの発表に先駆けたものであり評価出来る。

siRNA の Drug Delivery System (DDS) 課題とともに、本研究で得られた結果の確認、作用機構の解析など、臨床応用には多くの問題が指摘されるが、研究代表者はヒトの重篤例について siRNA の病変局所への投与の可能性を示唆しており、ヒトへの応用に向けたトランスレーショナル研究への発展が期待される。生後 2 日目に siRNA を脳内に注入することによって長期の効果が得られるという結果の有効性について確認がなされれば、他の神経変性疾患に関して大きな道が開かれる可能性もあり、後継者が発展させることに期待したい。

4-3 総合的評価および特記事項

siRNA を用いた原因遺伝子(ハンチンチン遺伝子)の発現抑制について一点のみの定性的な結果であることと、生後 2 日目の投与が 10 週以上も効果を継続したように見える結果についてのメカニズムや再現性を含めた検証が不足している点は残念である。また、この研究がスタートした時の研究環境では、本研究計画は新しいものであったが、現在ではこれらの方法論と技術はかなり一般的な方法論と確立されているので、定性的な研究成果では国際的なレベルはあまり高くない。

しかし、重篤な神経難病であるハンチントン病に対して、siRNA を用いたハンチンチン遺伝子の発現抑制により、マウスモデルにおいてある程度の治療効果を示したことは十分に評価出来る。根本治療への可能性やヒトへの応用の可能性は、将来的な臨床応用にブレイクスルーを与える成果として評価される。