

RNAi の基礎と医療への応用

横田隆徳

東京医科歯科大学神経内科

1. RNAi の基礎

RNAi とは 2 本鎖 RNA(dsRNA)によって引き起こされる配列特異的でしかも強力な遺伝子発現抑制の現象であり、今バイオロジーの分野で特に注目されているトピックスと 1 つである。生体内に導入された dsRNA は、RNaseIII ファミリーに属する Dicer と呼ばれる酵素により、3'末端側に 2 塩基の突出をもつ 21 塩基の dsRNA である siRNA(short interfering RNA)にプロセッシングされる。siRNA は RNA-ヌクレアーゼ複合体である RISC(RNA induced silencing complex)によって 2 本鎖がときほぐされアンチセンス鎖がとりこまれて、そのアンチセンス鎖に相補的な配列をもつ RNA を中央で選択的に分解する。しかし、RNAi が発見された当初は、ほ乳類細胞に 30 塩基以上の長い dsRNA が導入されると、抗ウイルス反応であるインターフェロン反応が誘発されて細胞が死んでしまうため、ほ乳類での RNAi の応用は難しいと考えられていた。2001 年に Tuschel らのグループによって siRNA を直接細胞内に導入することによって、インターフェロン反応を回避できることが可能となった。現在、siRNA は分子生物学の有用なツールとして急速に浸透して発展している。今回、有効な siRNA 配列のデザインの方法、in vitro 実験でのコントロールの置き方、siRNA 発現 DNA ベクターの作製法やその問題点などを説明する。

2. siRNA の特異性

がん遺伝子や遺伝性疾患を siRNA で治療しようとした場合、変異遺伝子のみを選択的に発現抑制して、野生型には作用しないことが望ましい。5'側は基質との結合より RISC との関わりから基質を切断するルーラー（物差し）効果があるといわ、3'側よりの mismatches ほうがより失活効果が強いとの報告がされ、5'端から 9-13 塩基目に mismatches をデザインすると変異遺伝子の識別が最もよいと考えられている。さらに、mismatches の位置だけでなく、置換塩基の種類によってもその効果が異なることがわかってきている。

siRNA を臨床応用する際にも、ライブラリーを用いた遺伝子探索をする際にも、off-target 効果、すなわち、ターゲットとした遺伝子以外に、別の遺伝子の発現を抑えてしまういわゆる交叉反応が報告されている。最近 19 塩基中 15 塩基以上で、最低では 11 塩基のホモロジーのある遺伝子において影響があったと報告された。さらに稀ではあるが、アンチセンス配列でもその影響がでる場合もありうるという。今後この OFF-Target 効果の評価とその回避は重要な問題である。

3. 疾患への応用

RNAi の本来の生理学的役割の 1 つとして細胞に感染したウイルスの蛋白合成を阻害する作用が考えられ、siRNA の発見以来、ウイルス RNA を標的とした研究が急速に進んでいる。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 について紹介する。1 本鎖 RNA ウイルスでは、ウイルス複製時に特に翻訳領域において変異を起こし易く、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。