

厚生労働科学研究費補助金
(こころの健康科学研究事業)

神経変性疾患の根本的治療の実現を
めざした新規モデル動物での
先端的治療法の開発と確立に関する研究
(H15—こころ—023)

平成15年度総括・分担研究報告書

主任研究者 和田 圭司
平成16(2004)年3月

目 次

I. 総括研究報告書		
神経変性疾患の根本的治療の実現 をめざした新規モデル動物での 先端的治療法の開発と確立に 関する研究 和田圭司	_____	1
II. 分担研究報告書		
ハンチントン病の遺伝子発現制御 に関する研究 北條浩彦	_____	7
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	_____	1 0
IV. 研究成果の刊行物・印刷	_____	1 1

神経変性疾患の根本的治療の実現をめざした新規モデル動物での
先端的治療法の開発と確立（H15—こころ—023）

主任研究者 和田 圭司 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第四部長

本研究は有効な治療法の乏しい難治性神経変性疾患に対してよりヒト病態に近いモデル動物を提供し、その解析を通して先端的かつ臨床応用が十分可能な治療法を開発することを目標とする。その達成にむけて今回はこれまで研究が続けてきたパーキンソン病とハンチントン病に焦点を当て、申請した3年間の研究期間中に、モデル動物で原因遺伝子産物の除去による蛋白質の凝集・不溶化防止と蛋白質分解系の適正な活性化を通じた神経機能不全の補正を行う。さらに病態時の神経幹細胞の動態解明とその動員法を確立しニューロンの潜在的修復・再生能を利用した再生治療の基盤技術を具体化する。研究1年目の今年度はハンチントン病原因遺伝子に対する siRNA を数種開発し、モデル動物を用いてその効果を検討した。またパーキンソン病では自家開発した新規モデルについて遺伝子の網羅的解析を行い発症前から変動する遺伝子を同定した。さらに、神経幹細胞機能を制御する G 蛋白質共役型受容体リガンドを同定した。

分担研究者 北條浩彦 国立精神・神経センター
神経研究所
疾病研究第3部

功してきた。また、ハンチントン病モデルマウスを米国より導入し、さらに既存モデルよりも優れた点を多々有する新規パーキンソン病モデルマウス（193M UCH-L1 発現マウス）を自家開発した。本申請ではこれらの成果をもとに、神経細胞の変性防止と再生を小型モデル動物で確立することを目標とする。具体的には、神経細胞の変性防止については治療用核酸・蛋白質の導入や化合物を用いた structure based knockdown などの手法で標的分子特異的治療の確立をめざすとともに、神経幹細胞に高発現する G 蛋白質共役型受容体の解析を通して神経幹細胞の増殖、運動性、ニューロンへの分化性を制御する新技術を開発する。今年度はハンチントン病原因遺伝子に対する siRNA を数種開発し、モデル動物の延命に効果があるかどうかの検討に着手するなど計画を上回る成果を上げた。またパーキンソン病では自家開

A. 研究目的

本研究では、これまで難治性とされていた神経変性疾患（パーキンソン病とハンチントン病など）の根本的治療法を開発することをめざす。神経変性疾患では蛋白質の不溶化・凝集が細胞変性の本態と考えられており、そのため原因遺伝子産物の除去、神経機能不全の修復、変性ニューロンの再生が根本治療への扉を開くと考えられる。我々はこれまでに siRNA を用いた変異遺伝子の発現抑制技術ならびに神経幹細胞からニューロンへの効果的分化促進技術を細胞レベルで開発し、また protein transduction domain である TAT 配列を付加した治療用蛋白質の動物脳内導入に成

発した新規モデルについて遺伝子の網羅的解析を行い発症前から変動する遺伝子を約 20 種類同定した。

B. 研究方法

(1) パーキンソン病モデルを用いた研究

UCH-L1 蛋白質の性状については大腸菌発現系を利用し、UCH-L1 蛋白を発現・精製し、円二色偏光法、western blot 法などで解析した。UCH-L1 発現トランスジェニックマウスの表現型の解析は行動科学的、病理組織学的に行った。UCH-L1 の hydrolase 活性の測定はユビキチン-AMC を基質に、水解時に産生される AMC 量を測定し、酵素活性を算出した。mRNA の網羅的解析は Affimetrix 社の Gene Chip を用いて行った。

(2) ハンチントン病モデルを用いた研究

siRNA の効果持続性について培養神経細胞を用いて検討した。さらに、生後 2 日のハンチントン病モデルマウスに siRNA を含むリポフェクタミン溶液 5 マイクロリットルを注入し、一定期間の後行動学的評価と病理学的検討を行った。

(3) 神経幹細胞に関する研究

胎生 14 日マウスの終脳から神経上皮細胞を得て培養を行った。これらの神経上皮細胞培養系における GPCR 遺伝子の発現レベルを SYBR green を用いた定量的 PCR 法にて解析した。また GPCR に対する特異的リガンドを神経上皮細胞の培養系へ添加することで増殖ならびに分化への影響を特異的分子マーカーを用いて解析した。

(倫理面への配慮)

動物を使用する研究計画はすべて国立精神・神経センター神経研究所動物実験倫理問題検討委員会で審議され承認を受けた。実際の動物使用に当たっては国の法律・指針並びに米国 NIH の基準を守り動物が受ける苦痛を最小限に留めた。ヒト標本を用いた研究は実施しなかった。

C. 研究結果

(1) パーキンソン病モデルを用いた研究

UCH-L1 における I93M 変異がパーキンソン病家系で報告されたことに関し我々は独自に I93M UCH-L1 が野生型 UCH-L1 に比べ凝集性が高いことを突き止めた。また I93M UCH-L1 発現トランスジェニックマウスを作製したところ、臨床的に動作の緩慢性を有し、神経病理学的に黒質 TH 陽性ニューロンの脱落と線状体ドーパミン含量の低下を見出した。これらの所見は我々の作成したマウスが既存のパーキンソン病モデル動物に比べ優れた点を多々有している新規モデルであることを示すもので、昨年 8 月 27 日に特許出願を行った。さらに、特許出願したモデルマウスを用いてパーキンソン病発症と密接に関連している遺伝子群を約 20 種同定した。

(2) ハンチントン病モデルを用いた研究

哺乳動物神経細胞(マウス海馬神経細胞と神経細胞に分化させた P19 細胞)内に、ルシフェラーゼ・レポーター遺伝子とそのルシフェラーゼ遺伝子に対する合成 siRNA を導入し RNAi を誘導したところ、標的であるルシフェラーゼ遺伝子の発現が少なくとも 3 週間にわたって強く抑制(80%以上の発現抑制)することを発見した。また、培養細胞においてハンチントン病原因遺伝子発現に対して抑制効果のある siRNA を見出した。同じ siRNA を用いて脳内直接投与においてハンチントン病モデルマウスの延命に効果があるかどうかを検討中である。

(3) 神経幹細胞に関する研究

神経幹細胞に高発現する G 蛋白質共役型受容体の解析を通して神経幹細胞の増殖、運動性、ニューロンへの分化を促進するリガンドを数種同定した。さらに現在個体投与においてその薬理作用を解析中である。また、神経再生の分子マーカーとして抗小胞型グルタミン酸トランスポーター抗体、同 GABA トランスポーター抗体などを開

発し、成体脳における幹細胞移植や内在性幹細胞賦活による特定神経回路再生をモニタリングする技術も構築中である。

D. 考察

パーキンソン病、ハンチントン病など神経変性疾患については近年の分子遺伝学的解析から家族性疾患を中心にいくつもの病因遺伝子が同定された。数多くの孤発性については病因の特定はいまだなされていないが家族性の成果を発展させることで、対症療法の高度化だけでなく根本的治療法開発も展望できるとの期待が高まっている。成因に関しては国内外における研究から、蛋白質の構造変化、凝集、蓄積と神経細胞死・神経変性との関連が示されており conformation 病の概念確立とともに、アポトーシスに加えて神経細胞機能不全も神経変性の主因として位置づけられるようになってきた。このような世界の潮流の中で我々の最終到達目標は、現時点では有効な治療法の乏しい難治性神経変性疾患に対してよりヒト病態に近いモデル動物を提供し、その解析を通して先端的かつ臨床応用が十分可能な治療法を開発することである。その達成にむけこれまで研究を続けてきたパーキンソン病とハンチントン病に焦点を当て、ハンチントン病モデルマウス (B6CBA-TgN(Hd exon1)62Gpb/J) や我々が独自に開発した I93M UCH-L1 Tg マウスを導入した。具体的には申請した3年間の研究期間中に、マウス個体レベルで原因遺伝子産物の除去による蛋白質の凝集・不溶化防止と蛋白質分解系の適正な活性化を通じた神経機能不全の補正を行う。さらに病態時の神経幹細胞の動態解明とその動員法を確立しニューロンの潜在的修復・再生能を利用した再生治療の基盤技術を具体化する。またそれらの成果を元に、よりヒト病態に近い臨床像を呈することが予想されるモデルとして中型動物や小型霊長類で将来モデルを作製する基盤を築き、先端的治療法開発に向けて応用することをめざす。

これらの研究はパーキンソン病、ハンチントン病の根本的治療法開発をめざす上で必須のものであり、その研究計画の達成は他の神経変性疾患にも応用可能な治療技術を提供し広く神経難病の克服に貢献する。

我々は独自に I93M UCH-L1 が野生型 UCH-L1 に比べ凝集性が高いことを突き止め I93M UCH-L1 発現トランスジェニックマウスを作製したところ、既存のパーキンソン病モデル動物に比べ優れた点を多々有している新規モデルであることを見出した。平成 15 年 8 月 27 日に特許出願を行ったが今後データの蓄積を重ね国際特許出願をめざす。その意味で当該モデルマウスを用いてパーキンソン病発症と密接に関連している遺伝子群を約 20 種同定出来た意味は大きい。以前に酸化ストレスに脆弱な黒質ニューロンとの関連性で UCH-L1 が酸化修飾を受け hydrolase 活性が低下することを見出したがその成果と合わせ現在パーキンソン病発症の分子カスケードの全容解明をめざして研究を展開している。本研究事業については計画以上に研究が進展しているがハンチントン病について特に大きな成果を上げた。培養細胞において発現抑制効果のあるハンチントン病遺伝子特異的 siRNA が開発できたのに続き、当該 siRNA の脳内直接投与においてハンチントン病モデルマウスの延命に効果のあることを見出しつつある。今回開発した有効な siRNA については2件の特許出願を行うことが出来た。また再生医療に関しても、神経幹細胞に高発現する G 蛋白質共役型受容体の解析を通して神経幹細胞の増殖、運動性、ニューロンへの分化を促進するリガンドを数種同定し、現在個体投与においてその薬理作用を解析中である。GPCR はゲノム上に数千個コードされる最大のファミリー分子群であり、創薬の上でも効率の良い有効なターゲット分子群であると考えられている。市販薬の約 60% がこれら GPCR ファミリー分子群のいずれかに作用することでその薬理効果を発揮しているこ

とが知られており、GPCR は薬理学上最も重要な
つ創薬の上でも効率の良い有効なターゲット分
子群であると考えられている。近年、GPCR から
MAP キナーゼ・PI3 キナーゼへいたるシグナル
伝達系が神経幹細胞の増殖を促進しうることが
発見された。これらの知見から、損傷を受けた中
枢神経系を GPCR 作用薬により修復を目指す新
しい治療方法開発の可能性が考えられる。これま
で、神経幹細胞・神経前駆細胞における GPCR
ファミリー分子群の発現を網羅的に解析した研
究は無かった。今回得られた結果は GPCR を利
用した神経幹細胞・神経前駆細胞の増殖・分化制
御系を開発する上で有用な情報を提供すると思
われる

E. 結論

ハンチントン病原因遺伝子に対する siRNA を
開発し、培養細胞においてその効果を確認した。
新規パーキンソン病モデルマウスを開発し遺伝
子の網羅的解析から発症前において変動する遺
伝子を同定した。神経幹細胞の機能を制御する G
蛋白質共役型受容体リガンドを同定した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Nishikawa, K., Li, H., Kawamura, R., Osaka, H.,
Wang, Y.L., Hara, Y., Hirokawa, T., Manago,
Y., Amano, T, Noda, M., Aoki, S. and Wada, K.
Alterations of structure and hydrolase activity of
parkinsonism-associated human ubiquitin
carboxyl-terminal hydrolase L1 variants.,
Biochem. Biophys. Res. Comm., 304,
176-183, 2003.
Ogawa, M., Sigeto, H., Yamamoto, T., Oya, Y.,
Wada, K., Nishikawa, T. and Kawai, M. D-

cycloserine for the treatment of ataxia in
spinocerebellar degeneration. **J. Neurol. Sci.**,
210, 53-56, 2003

Osaka, H., Wang, Y.L., Takada, K., Takizawa, S.,
Setsuie, R., Li, H., Sato, Y., Nishikawa, K.,
Sun, Y.J., Sakurai, M., Harada, T., Hara, Y.,
Kimura, I., Chiba, S., Namikawa, K., Kiyama,
H., Noda, M., Aoki, S. and Wada, K. Ubiquitin
carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and
stabilizes monoubiquitin in neurons. **Hum.
Mol. Genet.**, 12, 1945-1958, 2003

Sekiguchi, S., Yoshikawa, Y., Tanaka, S., Kwon, J.,
Ishii, Y., Kyuwa, S., Wada, K., Nakamura, S.
and Takahashi, K. Immunohistochemical
analysis of protein gene product 9.5, a ubiquitin
carboxy-terminal hydrolase, during placental and
embryonic development in the mouse. **Exp.
Anim.**, 52, 365-369, 2003

Harada, C., Harada, T., Quah, H.M.A., Maekawa, F.,
Yoshida, K., Ohno S., Wada, K., Parada, L.F.,
Tanaka, K. Potential role of glial cell line-
derived neurotrophic factor receptors in Muller
glial cells during light-induced retinal
degeneration. **Neuroscience**, 122, 229-235,
2003.

Liu, W., Goto, J., Wang, Y.L., Murata, M., Wada,
K. and Kanazawa, I. Specific inhibition of
Huntington's disease gene expression by
siRNAs in cultured cells. **Proc. Japan Acad.**,
79, SerB, 293-298, 2003

Harada, T., Harada, C., Wang, Y.L., Osaka, H.,
Amanai, K., Tanaka, K., Takizawa, K., Setsuie,
R., Sakurai, M., Sato, Y., Noda, M. and Wada,
K. Role of ubiquitin carboxy terminal
hydrolase-L1 in neural cell apoptosis induced by
ischemic retinal injury *in vivo*. **Am. J.
Pathol.**, 164, 59-64, 2004

Castegna, A., Thongboonkerd, V., Klein, J., Lynn,

- B., Wang, Y.L., Osaka, H., Wada, K. and Butterfield, D.A. Proteomic Analysis of the Brain Proteins in the Gracile Axonal Dystrophy (gad) Mouse, a Syndrome That Emanates from Dysfunctional Ubiquitin Carboxyl-Terminal Hydrolase L-1, Reveals Oxidation of Key Proteins. *J. Neurochem.*, 88, 1540-1546, 2004
- Omi K., Tokunaga K., and Hohjoh H. (2004) Long-lasting RNAi activity in mammalian neurons. *FEBS letters* 558: 89-95.
- Hohjoh H. (2004) Enhancement of RNAi activity by improved siRNA duplexes. *FEBS letters* 557: 193-198.
2. 学会発表
(国際学会)
- Wada, K.: Pathophysiological role of ubiquitin C-terminal hydrolase L1 in neurodegeneration. Symposium on the Ubiquitin-proteasome System and Neurological Diseases, 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, Niigata, 9.26, 2003
- Hara, Y., Nishimoto, M., Ayukawa, K., Ohashi, H., Kudo, Y., Abe, T., Aoki, S., Wada, K., Analysis of expression profiles of G-protein coupled receptor genes in embryonic neural stem cells. 33rd Annual Meeting of Society for Neuroscience, New Orleans, LA, 11.8, 2003.
- Noda, M., Amano, T., Aoki, S., Wada, K., KCN channels in glial cells, 33rd Annual Meeting of Society for Neuroscience, New Orleans, LA, 11.8, 2003.
- Kaplan, M.P., Wood, M.A., Kurihara, L.J., Wada, K., Sekiguchi, M., Takada, K., Abel, T., A role for ubiquitin C-terminal hydrolase 3 (UCH-L3) in learning and memory, 33rd Annual Meeting of Society for Neuroscience, New Orleans, LA, 11.10, 2003.
- Yang, Y., Joshi, I., Sekiguchi, M., Wada, K., Wang, L., Prbing determinants of the time course of ampar-EPSCs at the calyx of held synapses, 33rd Annual Meeting of Society for Neuroscience, New Orleans, LA, 11.12, 2003.
- Noda, M. Kariura, Y., Wang, B. Wada, K. Function of bradykinin receptors in microglia, Sixth European Meeting on Glial Cell Function in Health and Disease, Berlin, Germany, 9.5, 2003.
- Noda, M. Kariura, Y., Kosai, Y., Pannasch, U., Wang, L., Kettenmann, H., Nishikawa, K., Okada, S., Aoki, S., Wada, K. Inflammation in the CNS: The role of bradykinin in glial cells. Symposium on the Mechanism of Neuron-microglia Interaction. The 6th Biennial Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry, Hong Kong, 2.7, 2004.
- (国内学会)
- 坂本光伸、吉田瑞子、櫻井省花子、山田祐子、滝澤修一、野田百美、和田圭司、関口正幸: mdx マウスにおける高次脳機能及びシナプス可塑性の研究、第44回日本神経学会総会、横浜、5.16, 2003
- 和田圭司: 精神神経難病の克服と脳の健やかさをめざして、九州大学生体防御医学研究所セミナー、7.11, 2003
- 原 洋子、西本美香、鮎川幸一、工藤佳久、青木俊介、和田圭司: 神経幹細胞におけるG蛋白質共役型受容体の発現プロファイルの解析、第26回日本神経科学大会、名古屋、7.24, 2003.
- 西本美香、原 洋子、鮎川幸一、大橋洋輝、工藤佳久、阿部俊昭、青木俊介、和田圭司: 胎児由来神経幹細胞におけるG蛋白質共役型受容体の網羅的解析、第46回日本神経化学会大会ミニシンポジウム「神経再生」、新潟、

9.24, 2003.

和田圭司: 精神神経疾患と生命工学的創薬、国立精神・神経センター神経研究所・早稲田大学大学院理工学研究科合同シンポジウム「システムとしての脳のはたらきを探る」、10.1, 2003

大橋洋輝、原 洋子、西本美香、鮎川幸一、青木俊介、阿部俊昭、工藤佳久、和田圭司: G 蛋白質共役型受容体を利用した新しい神経幹細胞の増殖・分化制御系の開発、第 8 回グリア研究会、名古屋、10.25, 2003.

野田百美、狩浦幸弘、末吉歩美、王 泳、小佐井有紀、西川香里、岡田知子、青木俊介、和田圭司: プラジキニンの脳内作用：ミクログリアにおける役割、第 8 回グリア研究会、名古屋、10.25, 2003.

和田圭司: パーキンソン病と脱ユビキチン化酵素 UCH-L1、慶應ニューロサイエンス研究会、11.22, 2003

和田圭司: 機能性精神障害モデル動物の開発と reverse pharmacology による創薬、生理研研究会「機能性精神障害の分子生物学的基盤：統合失調症と双極性障害の病態解明をめざして」、岡崎、1.24, 2004

小見和也、徳永勝士、北條浩彦. (2003) “Long-term effect of RNA interference (RNAi) on mammalian neurons” 第 26 回日本分子生物学会、神戸.

左合典子、小見和也、田村美子、功刀浩、豊岡照彦、徳永勝士、北條浩彦. (2003) 「マウス筋芽細胞由来株 C2C12 細胞における RNA interference」第 26 回日本分子生物学会、神戸.

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

特許出願番号：2003-303370

発明の名称：ユビキチン C 末端水解酵素発現マ

ウス

発明者：和田圭司他 4 名

特許出願人：国立精神・神経センター、科学技術振興事業団

出願年月日：平成 15 年 8 月 27 日

特許出願番号：2003-136477

発明の名称：ハンチントン病遺伝子の発現抑制

発明者：和田圭司他 5 名

特許出願人：科学技術振興事業団

出願年月日：平成 15 年 5 月 15 日

特許出願番号：2003-427970

発明の名称：改良された siRNA 分子およびこれを用いた遺伝子発現の抑制法

発明者：北條浩彦

特許出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

出願年月日：平成 15 年 12 月 24 日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ハンチントン病の遺伝子発現制御に関する研究

分担研究者 北條 浩彦 国立精神・神経センター神経研究所 室長

研究要旨：RNA interference (RNAi)による遺伝子ノックダウン方法を用いて、ハンチントン病原因遺伝子である *Huntingtin* 遺伝子の発現抑制を試みた。その結果、マウス内在性 *Huntingtin* 遺伝子に対して～85%発現抑制を誘導する siRNA 二量体 (RNAi を誘導する短い二本鎖 RNA 分子) を設計することができた。さらに、哺乳動物神経細胞内に RNAi が成立するとその効果が長期にわたって持続することも明らかにした。

分担研究者 北條浩彦
国立精神・神経センター
神経研究所 室長

と考えられる。そこで我々は、近年注目されている遺伝子ノックダウン方法、RNA interference (RNAi, RNA 干渉)を用いて正常型 *Huntingtin* の発現を抑制し、その機能喪失が神経細胞に与える影響について解析を行った。

A. 研究の目的

ハンチントン病 (MIM143100) の原因遺伝子である *Huntingtin* 遺伝子の機能については、未だ不明の点が多い。*Huntingtin* 遺伝子のノックアウトマウスは胎生致死となり、コンディショナル・ノックアウトマウスでも神経細胞にアポトーシスが誘導され異常な神経症状を示すことが知られている。また、神経培養細胞を用いた研究からも、正常型 *Huntingtin* がアポトーシス誘導を抑制することも報告されている。これらの報告は、異常型 *Huntingtin* による機能異常ばかりでなく、正常型 *Huntingtin* の機能喪失も病態と深く関係している可能性を示唆している。複雑なハンチントン病の発病メカニズムそして病態像を明らかにするためには、正常型 *Huntingtin* の機能についても詳細に解析する必要がある

B. 研究方法

1) 哺乳動物神経細胞における RNAi 誘導とその活性

マウス胎児 (E17) より単離した海馬神経初代培養細胞そして神経細胞に分化させた EC 細胞 (P19 細胞) に、ルシフェラーゼ・レポーター遺伝子を含む発現プラスミドとそのルシフェラーゼ遺伝子に対する合成 siRNA を共トランスフェクションし、その後、ルシフェラーゼの活性を測定して哺乳動物神経細胞における RNAi 活性とその効果を調べた。

2) RNAi による *Huntingtin* 遺伝子ノックダウン

マウス *Huntingtin* 遺伝子のエクソン 1 を標的とする二つの siRNA (siHd1, siHd2) を設計

計し合成した。合成した siRNA をマウス神経芽細胞腫由来 Neuro2A 細胞に導入し、24-36 時間後に全 RNA を回収し、RT-リアルタイム PCR 法によって *Huntingtin* mRNA の発現量を定量した。

さらに、*Huntingtin* 遺伝子ノックダウンにおける影響についても、RNAi 誘導後、Neuro2A 細胞を通常培養条件（血清あり）下または分化誘導条件（血清なし）下で培養し、その後、MTT アッセイ法を用いて細胞数の変化を観察した。

C. 研究結果

1) 神経細胞における RNAi 活性

哺乳動物神経細胞（マウス海馬神経細胞と神経細胞に分化させた P19 細胞）内に、ルシフェラーゼ・レポーター遺伝子とそのルシフェラーゼ遺伝子に対する合成 siRNA を導入し RNAi を誘導したところ、標的であるルシフェラーゼ遺伝子の発現が少なくとも 3 週間にわたって強く抑制（80%以上の発現抑制）することを発見した。これに対し、未分化状態の P19 細胞に同様の RNAi 誘導を行ったところ、その RNAi 効果は一時的で、細胞分裂に伴って RNAi 活性は減少し、5 日間ほどで活性がなくなった。

2) RNAi による *Huntingtin* 遺伝子ノックダウン

Neuro2A 細胞に *Huntingtin* 遺伝子をターゲットとする siRNA (siHd1, siHd2) を導入し RNAi を誘導したところ、siHd1 が *Huntingtin* 遺伝子発現を~85%抑制することが示された。また、ターゲット配列が異なる siHd2 を用いた場合には、~50%の抑制効果が観察された。これらの siRNA を用いた *Huntingtin* 遺伝子発現抑制効果は、低い siRNA 濃度(20nM)においても観察された。

siHd1 を用いて *Huntingtin* 遺伝子をノックダウンし、通常の培養条件下で細胞を育てた場合、Neuro2A 細胞の形態、細胞数に変化は観察されなかった。ところが、siHd1 導入後、分化誘導条件下で Neuro2A 細胞を培養したところ、その生細胞の数の顕著な減少が観察された。

D. 考察

哺乳動物神経細胞において、RNAi 活性が長期間持続することを明らかにした。この結果は、神経細胞が最終分化を終了し、細胞分裂を停止していることと強く関連していると思われる。つまり、合成 siRNA の導入によって成立した活性型 RNA-induced silencing complex (RISC 複合体)の数が、細胞分裂に伴う（一細胞当たりの）減少を受けずにいるためと考えられる。また、神経細胞内における活性型 RISC 複合体の安定性が比較的高い可能性も考えられる。これらの結果は、個体を用いた *in vivo* RNAi 誘導実験において、特に脳組織内での RNAi 誘導において、その効果が長期間持続する可能性を示唆している。

内在性 *Huntingtin* 遺伝子をノックダウンする siRNA (siHd1, siHd2) を作製した。それらの siRNA によって誘導される RNAi 活性の違いは、すでに他の哺乳動物 RNAi で報告されている現象と同じであり、siRNA の配列、ターゲット mRNA の二次構造、そしてそれらに結合するタンパク質などが影響している可能性が考えられる。

Neuro2A 細胞を、siHd1 を用いて内在性の *Huntingtin* 遺伝子をノックダウンし、その後分化誘導（血清なし）条件下におくと、その生細胞数が減少する。この結果は、*Huntingtin* 遺伝子のノックダウンと低栄養状態が細胞死を誘導する可能性を示唆するもので、そのメカニズムについて、現在、詳細な解析

を進めている。

E. 結論

1) 哺乳動物神経細胞内に一旦 RNAi が成立するとその効果は長期にわたって持続することを明らかにした。

2) 内在性 *Huntingtin* 遺伝子の発現を RNAi によって強力にノックダウンする合成 siRNA、siHd1、を作製することができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Omi K., Tokunaga K., and Hohjoh H. (2004) Long-lasting RNAi activity in mammalian neurons. *FEBS letters* **558**: 89-95.

Hohjoh H. (2004) Enhancement of RNAi activity by improved siRNA duplexes. *FEBS letters* **557**: 193-198.

2. 総説

小見和也 & 北條浩彦. (2004). 神経細胞の RNAi と応用. *医学のあゆみ*, **208**: 659-663.

北條浩彦. (2004). RNAi-その基礎と応用、はじめに. *医学のあゆみ*, **208**: 647-648.

北條浩彦. (2004). 哺乳類細胞での RNA 干渉. *バイオインダストリー*, **21**: 44-51.

3. 学会発表

小見和也、徳永勝士、北條浩彦. (2003) “Long-term effect of RNA interference (RNAi) on mammalian neurons” 第 26 回日本分子生物学会、神戸.

左合典子、小見和也、田村美子、功刀浩、豊岡

照彦、徳永勝士、北條浩彦. (2003) 「マウス筋芽細胞由来株 C2C12 細胞における RNA interference」 第 26 回日本分子生物学会、神戸.

G. 知的財産権の出願

1. 特許出願

特許出願番号：2003-427970

発明の名称：改良された siRNA 分子およびこれを用いた遺伝子発現の抑制法

発明者：北條浩彦

特許出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

出願年月日：平成 15 年 12 月 24 日

【先の出願（特願 2003-294504；出願日、平成 15 年 8 月 18 日）に基づく優先権主張】

別紙 5

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nishikawa, K., Li, H., Kawamura, R., Osaka, H., Wang, Y.L., Hara, H., Hirokawa, T., Manago, M., Amano, J, Noda, M., Aoki, S. and Wada, K.	Alterations of structure and hydrolase activity of parkinsonism-associated human ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 variants.	Biochem. Biophys. Res. Comm.	304	176-183	2003
Osaka, H., Wang, Y.L., Takada, K., Takizawa, S., Setsuie, R., Li, H., Sato, Y., Nishikawa, K., Sun, Y.J., Sakurai, M., Harada, T., Hara, Y., Kimura, I., Chiba, S., Namikawa, K., Kiyama, H., Noda, M., Aoki, S. and Wada, K.	Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neurons.	Hum. Mol. Genet.	12	1945-1958	2003
Harada, T., Harada, C., Wang, Y.L., Osaka, H., Amanai, K., Tanaka, K., Takizawa, K., Setsuie, R., Sakurai, M., Sato, Y., Noda, M. and Wada, K.	Role of ubiquitin carboxy terminal hydrolase-L1 in neural cell apoptosis induced by ischemic retinal injury <i>in vivo</i> .	Am. J. Pathol.	164	59-64	2004
Castegna, A., Thongboonkerd, V., Klein, J., Lynn, B., Wang, Y.L., Osaka, H., Wada, K. and Butterfield, D.A.	Proteomic Analysis of the Brain Proteins in the Gracile Axonal Dystrophy (gad) Mouse, a Syndrome That Emanates from Dysfunctional Ubiquitin Carboxyl-Terminal Hydrolase L-1, Reveals Oxidation of Key Proteins.	J. Neurochem.	88	1540-1546	2004
Liu, W., Goto, J., Wang, Y.L., Murata, M., Wada, K. and Kanazawa, I.	Specific inhibition of Huntington's disease gene expression by siRNAs in cultured cells.	Proc. J. Acad.	79, SerB	293-298	2003
Hohjoh H.	Enhancement of RNAi activity by improved siRNA duplexes.	FEBS Lett.	557	193-198	2004
Omi K., Tokunaga K., and Hohjoh H.	Long-lasting RNAi activity in mammalian neurons.	FEBS Lett.	558	89-95	2004

20030722

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。