

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16年度総括・分担研究報告書

主任研究者 和田 圭司
平成17(2005)年3月

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16年度総括・分担研究報告書

主任研究者 和田 圭司
平成17(2005)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	_____	8
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	_____	1 2
IV. 研究成果の刊行物・印刷	_____	1 5

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

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（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2年目の今年度は昨年度ハンチントン病原因遺伝子に対して開発した数種類の siRNA のうち一種がモデル動物の病態の進行を抑制することを見出した。またパーキンソン病では自家開発した新規モデルの解析から脱ユビキチン化酵素 UCH-L1 の凝集性増加が発症に深く関与することを見出した。さらに、神経幹細胞の運動性・接着性を制御する G 蛋白質共役型受容体リガンドとしてエンドセリンを同定した。

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7部

列を付加した治療用蛋白質の動物脳内導入に成功してきた。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（I93M 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 huntingtin に対する siRNA の有効性をモデル動物を用いて

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

検討し、またパーキンソン病では自家開発した新規モデルを用いて発症機序を解析した。さらに神経幹細胞を用いた再生医療実現のため、神経幹細胞で高発現する GPCR のリガンドの薬理作用を検討した。

B. 研究方法

(1) パーキンソン病モデルを用いた研究

UCH-L1 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。同マウスにおける UCH-L1 蛋白質の性状については western blot 法などで解析した。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

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。

またマウス内在性 huntingtin 遺伝子に対する siRNA 二量体 (RNAi を誘導する短い二本鎖 RNA 分子) を用いて内在性 huntingtin の発現抑制が細胞に与える影響を解析した。

(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、分化、運動、接着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にて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 発現マウスを作製したが、このトランスジェニックマウスを作製したところ、UCH-L1 の凝集性が中脳特異的に高まっていることを見出した。この結果は我々の作成したマウスがこれまでなかなか解析手段の無かった「パーキンソン病発症を規定する黒質特異的な脆弱性」の課題解決に極めて有用なモデルであることを示す。

(2) ハンチントン病モデルを用いた研究

ハンチントン病原因遺伝子である huntingtin に特異的な siRNA を開発し、生直後のマウス脳内に直接投与することでその治療効果を確認した。siRNA を脳内投与されたモデルマウスは対照に比べ発症時期が遅れ、延命するなど臨床的に進行が遅くなり、病理学的にも神経細胞死が抑制され huntingtin 陽性の凝集体の形成が少なくなった。

マウス由来 Neuro2a 細胞を用いた内在性 huntingtin 遺伝子の発現抑制では通常培養下の細胞では形態、細胞数に有意な変化は見られなかったものの、無血清条件下では生細胞の数に顕著な減少が観察された。

(3) 神経幹細胞に関する研究

神経幹細胞に最も高発現する G 蛋白質共役型受容体の一つとしてエンドセリン B 受容体を同定した。リガンドであるエンドセリンの添加により神経幹細胞はその運動性、接着性が高まった。

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、対症療法的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。今年度当該モデルマウスを用いて I93M UCH-L1 の凝集性が中脳特異的に高まっていることをさらに見出した意義は大きい。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パーキンソン病発症にいたる黒質ドーパミンニューロンの脆弱性の全容解明が展開できるようになった。

他方、ハンチントン病についても大きな成果を上げることができた。すなわち、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 huntingtin 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た。ハンチントン病に限らず gain of toxicity で発症する神経変性疾患の根本治療に RNAi 法は極めて有望であると考えられる。また今回内在性 huntingtin に与える影響を解析した際に細胞の生存性の定価が認められたが、この結果は導入される siRNA 量の厳密な制御が RNAi 法による治療では必要であることを示唆するものと考えられる。

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たが、今回エンドセリンが幹細胞の運動性と接着性の両面を制御する分子であることを世界で初めて見出した。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か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。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、モデル動物個体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 UCH-L1 の凝集性が in vivo でも高まっていることを見出した。神経幹細胞の運動性・接着性を制御する 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

- Bonin, M., Poths, S., Osaka, H., Wang, Y.L., Wada, K. and Riess, O. Microarray expression analysis of gad mice implicates involvement of Parkinson's disease associated UCH-L1 in multiple metabolic pathways. **Mol Brain Res**, 126, 88-97, 2004.
- Kwon, J., Wang, Y.L., Setsuie, R., Sekiguchi, S., Sakurai, M., Sato, Y., Lee, W.W., Ishii, Y., Kyuwa, S., Noda, M., Wada, K. and Yoshikawa, Y. Developmental regulation of ubiquitin C-terminal hydrolase isozyme expression during spermatogenesis in mice. **Biol. Reprod.**, 71, 515-521, 2004
- Wang, Y.L., Takeda, A., Osaka, H., Hara, Y., Furuta, A., Setsuie, R., Sun, Y.J., Kwon, J., Sato, Y., Sakurai, M., Noda, M., Yoshikawa, Y. and Wada, K. Accumulation of β - and γ -synucleins in the ubiquitin C-terminal hydrolase L1 deficient gad mouse. **Brain Res**, 1019, 1-9, 2004
- Kwon, J., Wang, Y.L., Setsuie, R., Sekiguchi, S., Sato, Y., Sakurai, M., Noda, M., Aoki, S., Yoshikawa, Y. and Wada, K. Two closely related ubiquitin C-terminal hydrolase isozymes function as reciprocal modulators of germ cell apoptosis in cryptorchid testes. **Am. J. Pathol.**, 165, 1367-1374, 2004.
- Mi, W., Beirowski, B., Gillingwater, T.H., Adalbert, R., Wagner, D., Grumme, D., Osaka, H., Conforti, L., Arnhold, S., Addicks, K., Wada, K., Ribchester, R.R. and Coleman, M.P. The slow Wallerian degeneration gene, WldS, inhibits axonal spheroid pathology in gracile axonal dystrophy mice. **Brain.**, 128, 405-416, 2005 Jan 11; [Epub ahead of print]
- Kwon, J., Mochida, K., Wang, Y.L., Sekiguchi, S., Sankai, T., Aoki, S., Ogura A., Yoshikawa, Y. and Wada, K. Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 is essential for the early apoptotic wave of germinal cells and for sperm quality control during spermatogenesis. **Biol. Reprod.** In press
- Ohnishi Y., Tokunaga K., and Hohjoh H. (2005) Influence of assembly of siRNA elements into RNA-induced silencing complex by fork-siRNA duplex carrying nucleotide mismatches at the 3'- or 5'-end of the sense-stranded siRNA element. **BBRC**, 329: 516-521.
- Tamura Y., Sakasegawa Y., Omi K., Kishida H., Asada T., Kimura H., Tokunaga K., Hachiya

N.S., Kaneko K., and Hohjoh H. (2005) Association study of the chemokine, CXC motif, ligand 1 (CXCL1) gene with sporadic Alzheimer's disease in a Japanese population. *Neurosci. Letters*, (in press).

Sago N., Omi K., Tamura Y., Kunugi H., Toyo-ka T., Tokunaga K., and Hohjoh H. (2004) RNAi induction and activation in mammalian muscle cells where Dicer and eIF2C translation initiation factors are barely expressed. *BBRC*, **319**: 50-57.

2. 学会発表 (国際学会)

Liu W, Wang YL, Wada E, Murata M, Wada K, Kanazawa I. Rescue of the HD model mouse by siRNA technology: Silencing the huntingtin expression in vitro and in vivo. 34th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 10. 24, 2004, San Diego, USA.

Amano T, Aoki S, Setsue R, Sakurai M, Noda M, Wada K. Identification of a novel regulatory mechanism of norepinephrine transporter activity by IP3 receptor-Ca²⁺-CaM pathway. 34th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 10. 24, 2004, San Diego, USA.

Hattori S, Hashimoto R, Miyakawa M, Maeno H, Wada K, Kunugi H. Enriched environment influences depression-related behaviors and hippocampal neurogenesis in mice. 34th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 10. 24, 2004, San Diego, USA.

Nishimoto M, Ohashi H, Hara Y, Ayukawa K, Kudo Y, Abe T, Aoki S, Wada K. Identification of novel regulatory mechanisms of neural progenitor cells via G-protein coupled receptors 34th Annual Meeting, 10. 26, 2004, San Diego, USA.

Noda M, Kosai Y, Kido MA, Tanaka T., Sekiguchi M, Wada K., Membrane translocation of GluR2 subunit of AMPA-type of glutamate receptors and inhibition of glutamate-induced currents in activated microglia. 34th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 10. 27, 2004, San Diego, USA.

Ohnishi Y., Omi K., Tamura Y., Tokunaga K., Kaneko K., and Hohjoh H. (2005) "Evaluation system for siRNA duplexes conferring allele-specific gene silencing." Diverse role RNA in gene regulation, Keystone Symposia, Breckenridge, Colorado, USA.

Omi K., Tokunaga K., and Hohjoh H. (2004) "RNAi induction in mammalian neurons and muscle cells." 54th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Toronto, Ontario, CANADA

Tamura Y., Kunugi H., Kanako K., and Hohjoh H. (2004) Analyses of epigenetic DNA methylation in the human genome 54th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Toronto, Ontario, CANADA.

Kawashima M., Ikuta T., Tamiya G., Hohjoh H., Juji T., Honda Y., Inoko H, and Tokunaga K. (2004) Fine mapping of candidate regions for human narcolepsy with high density markers. 54th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Toronto, Ontario, CANADA.

(国内学会)

和田圭一郎、山田正典、安田 徹、小坂 仁、望月秀樹、和田圭司、島田 隆、水野美邦、AAV ベクターを用いた UCH-L1 過剰発現系におけるラット黒質神経細胞の検討、第 45 回日本神経学会総会、東京、5.13, 2004
関口正幸、吉田瑞子、佐藤栄一、山田祐子、上地さり、山田一之、和田圭司、Dystrophin の中

- 中枢神経系における役割についての研究、第45回日本神経学会総会、東京、5.14, 2004
- 和田圭司、パーキンソン病の病態と治療をめぐって、2004世界脳週間講演会、小平、5.22, 2004
- Nishimoto M, Ohashi H, Hara Y, Ayukawa K, Kudo Y, Abe T, Aoki S, Wada K. Identification of novel regulatory mechanisms of neural progenitor cells via G-protein coupled receptors. 第57回日本細胞生物学会大会、大阪、5.27, 2004
- 小佐井有紀、城戸瑞穂、田中輝男、和田圭司、野田百美、Membrane translocation of GluR2 and inhibition of glutamate-induced inward currents in activated microglia 第81回日本生理学会大会、札幌、6.2, 2004
- 佐藤あゆみ、真子好正、西川香里、青木公三子、和田恵津子、青木俊介、和田圭司、野田百美、パーキンソン病原因遺伝子 parkin による ATP 受容体反応の機能制御 第47回日本神経化学会、第27回日本神経科学学会合同大会、大阪、9.21, 2004
- 服部聡子、橋本亮太、宮川 剛、前野浩巳、和田圭司、功刀 浩、モデル動物を用いた環境因子の気分障害（うつ病）に対する効果、第47回日本神経化学会、第27回日本神経科学学会合同大会、大阪、9.22, 2004
- 和田圭司、扁桃体機能障害と神経ペプチド、第66回千里神経懇話会、大阪、10.1, 2004
- 小佐井有紀、城戸瑞穂、田中輝男、和田圭司、野田百美、活性化ミクログリアにおける GluR2 の膜局在化とグルタミン酸誘発電流の抑制、第9回グリア研究会、福岡、11.20, 2004
- 佐藤あゆみ、真子好正、西川香里、青木公三子、和田恵津子、青木俊介、和田圭司、野田百美、パーキンソン病原因遺伝子 parkin による ATP 受容体反応の増強、第4回神経科学合同セミナー、熊本、11.29, 2004
- 野田百美、佐藤あゆみ、西川香里、青木公三子、和田恵津子、青木俊介、和田圭司 parkin による ATP 受容体反応の増強、第15回日本病態生理学会大会、1.22, 2005
- 小見和也、徳永勝士、北條浩彦. (2004) 「RNAi による遺伝子発現ノックダウンを用いた神経疾患関連遺伝子の機能解析」 第27回日本分子生物学会、神戸.
- 大西悠亮、小見和也、田村美子、徳永勝士、金子清俊、北條浩彦. (2004) 「対立遺伝子特異的 RNAi 効果の簡易評価システム」第27回日本分子生物学会、神戸.
- 田村美子、功刀浩、金子清俊、北條浩彦. (2004) 「メチル化によるエピジェネティックなヒトゲノム修飾に関する研究」 第27回日本分子生物学会、神戸.
- 小見和也、左合典子、豊岡照彦、徳永勝士、北條浩彦. (2004) 「哺乳動物細胞での RNAi 効果の持続性に関する研究」 第49回日本人類遺伝学会、東京.
- 川嶋実苗、生田智樹、田宮元、北條浩彦、十字猛夫、本多裕、猪子英俊、徳永勝士. (2004) 「ゲノムワイド関連分析より検出したヒトナルコレプシー候補領域 fine mapping」 第49回日本人類遺伝学会、東京.
- H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得
（審査請求中）
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

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
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

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技術を用いて、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行った。マウス内在性 *Huntingtin* 遺伝子に対して約 85% の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) を用いて RNAi を誘導したところ、誘導した細胞において細胞増殖の減少が観察された。また、DNA マイクロアレイを用いた発現プロファイル解析から、ハンチンチン遺伝子の発現抑制によっていくつかの遺伝子の発現減少・増加の変化も観察された。

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

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において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* がアポトーシスを抑制することが報告されている。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、その機能喪失が細胞に与える影響について解析を行った。

B. 研究方法

1) 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 をターゲットとする siRNA (siHd1)を用いて、マウス神経芽細胞腫由来 Neuro2a 細胞にその siRNA を導入し、RNAi を誘導した。siRNA 導入 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。また、ウエスタンプロット解析による *Huntingtin* タンパク質

の発現量も解析した。

2) *Huntingtin* 遺伝子ノックダウンによる細胞増殖への影響

RNAi による *Huntingtin* 遺伝子ノックダウンの影響について、RNAi 誘導後、Neuro2a 細胞を通常培養条件下（血清あり）または血清を除いた条件下で培養し、その後、MTT アッセイ法を用いて細胞数の変化を調べた。

3) *Huntingtin* 遺伝子ノックダウンによるその他の遺伝子発現への影響

2) と同様に RNAi を用いて *Huntingtin* 遺伝子をノックダウンし、RNAi 誘導後 24 時間と 48 時間目に全 RNA を抽出し、DNA マイクロチップを用いた発現プロファイル解析を行った。

C. 研究結果

Neuro2a 細胞に siHd1 siRNA を導入し RNAi を誘導したところ、*Huntingtin* 遺伝子の発現が約 85% 抑制された。さらに、マウス *Huntingtin* 抗体を用いたウエスタンブロット解析から、RNAi 誘導後 24 時間で、内在性 *Huntingtin* タンパク質が顕著に減少することも明らかになった。

siHd1 siRNA 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観察した場合、細胞の形態、細胞数に有意な変化は見られなかった。しかしながら、siHd1 導入後、無血清条件下で細胞を培養したところ、その生細胞の数に顕著な減少が観察された。

siHd1 siRNA を用いて Neuro2a 細胞に RNAi を誘導し、誘導後 24 時間と 48 時間の全 RNA を用いた発現プロファイル解析から、*Kayopherin beta 1*, *Lanp* 遺伝子の発現減少、そして *Mitogen activated protein kinase 1* 遺

伝子の発現上昇の傾向が観察された。

D. 考察

内在性 *Huntingtin* 遺伝子をノックダウンする siHd1 siRNA を用いて RNAi を誘導すると、24 時間以内に *Huntingtin* mRNA の減少とそれに伴う *Huntingtin* タンパク質の減少が観察された。このことから、内在性 *Huntingtin* タンパク質の半減期が比較的短いと予想される。また、内在性 *Huntingtin* 遺伝子をノックダウンした細胞を無血清条件下で培養すると、その細胞増殖が減少した。この減少が細胞死によるものなのか否かは今後検討するが、*Huntingtin* タンパク質は、血清の無いストレス環境下において、抗ストレス反応に関わる働きを持つと考えられる。

RNAi による内在性 *Huntingtin* 遺伝子の発現抑制と並行して、*Kayopherin beta 1*, *Lanp* 遺伝子の発現減少、そして *Mitogen activated protein kinase 1* 遺伝子の発現上昇の傾向が観察された。これらの遺伝子発現変化と *Huntingtin* 遺伝子ノックダウンとの関連は興味深く、今後、RT-PCR 法などを用いた別法による確認を行い、そして、細胞分化や抗ストレス機能などとの関連について検討する予定である。

E. 結論

1) 内在性 *Huntingtin* 遺伝子を RNAi を用いてノックダウンした時、ターゲット mRNA の減少に伴った内在性 *Huntingtin* タンパク質の減少が観察された。

2) 内在性 *Huntingtin* 遺伝子をノックダウンした細胞は、無血清培養下でその増殖が減少した。

3) 内在性 *Huntingtin* 遺伝子のノックダウンに伴って、他の遺伝子の発現変化も観察された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohnishi Y., Tokunaga K., and Hohjoh H. (2005) Influence of assembly of siRNA elements into RNA-induced silencing complex by fork-siRNA duplex carrying nucleotide mismatches at the 3'- or 5'-end of the sense-stranded siRNA element. *BBRC*, **329**: 516-521.
- 2) Tamura Y., Sakasegawa Y., Omi K., Kishida H., Asada T., Kimura H., Tokunaga K., Hachiya N.S., Kaneko K., and Hohjoh H. (2005) Association study of the chemokine, CXC motif, ligand 1 (CXCL1) gene with sporadic Alzheimer's disease in a Japanese population. *Neurosci. Letters*, (in press).
- 3) Sago N., Omi K., Tamura Y., Kunugi H., Toyo-ka T., Tokunaga K., and Hohjoh H. (2004) RNAi induction and activation in mammalian muscle cells where Dicer and eIF2C translation initiation factors are barely expressed. *BBRC*, **319**: 50-57.

2. 国際学会

- 1) Ohnishi Y., Omi K., Tamura Y., Tokunaga K., Kaneko K., and Hohjoh H. (2005) "Evaluation system for siRNA duplexes conferring allele-specific gene silencing." Diverse role RNA in gene regulation, Keystone Symposia, Breckenridge, Colorado, USA.
- 2) Omi K., Tokunaga K., and Hohjoh H. (2004) "RNAi induction in mammalian neurons and muscle cells." 54th Annual

Meeting of the American Society of Human Genetics, Toronto, Ontario, CANADA

- 3) Tamura Y., Kunugi H., Kanako K., and Hohjoh H. (2004) Analyses of epigenetic DNA methylation in the human genome 54th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Toronto, Ontario, CANADA.
- 4) Kawashima M., Ikuta T., Tamiya G., Hohjoh H., Juji T., Honda Y., Inoko H., and Tokunaga K. (2004) Fine mapping of candidate regions for human narcolepsy with high density markers. 54th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Toronto, Ontario, CANADA.

3. 国内学会

- 1) 小見和也、徳永勝士、北條浩彦. (2004) 「RNAi による遺伝子発現ノックダウンを用いた神経疾患関連遺伝子の機能解析」第27回日本分子生物学会、神戸.
- 2) 大西悠亮、小見和也、田村美子、徳永勝士、金子清俊、北條浩彦. (2004) 「対立遺伝子特異的 RNAi 効果の簡易評価システム」第27回日本分子生物学会、神戸.
- 3) 田村美子、功刀浩、金子清俊、北條浩彦. (2004) 「メチル化によるエピジェネティックなヒトゲノム修飾に関する研究」第27回日本分子生物学会、神戸.
- 4) 小見和也、左合典子、豊岡照彦、徳永勝士、北條浩彦. (2004) 「哺乳動物細胞での RNAi 効果の持続性に関する研究」第49回日本人類遺伝学会、東京.
- 5) 川嶋実苗、生田智樹、田宮元、北條浩彦、十字猛夫、本多裕、猪子英俊、徳永勝士. (2004) 「ゲノムワイド関連分析より検出したヒトナルコレプシー候補領域 fine

mapping」 第49回日本人類遺伝学会、
東京。

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
Bonin, M., Poths, S., Osaka, H., Wang, Y.L., Wada, K. and Riess, O.	Microarray expression analysis of gad mice implicates involvement of Parkinson's disease associated UCH-L1 in multiple metabolic pathways.	Mol. Brain Res.	126	88-97	2004
Wang, Y.L., Takeda, A., Osaka, H., Hara, Y., Furuta, A., Setsuie, R., Sun, Y.J., Kwon, J., Sato, Y., Sakurai, M., Noda, M., Yoshikawa, Y. and Wada, K.	Accumulation of β - and γ -synucleins in the ubiquitin C-terminal hydrolase L1 deficient gad mouse.	Brain Res.	1019	1-9	2004
Kwon, J., Wang, Y.L., Setsuie, R., Sekiguchi, S., Sato, Y., Sakurai, M., Noda, M., Aoki, S., Yoshikawa, Y. and Wada, K.	Two closely related ubiquitin C-terminal hydrolase isozymes function as reciprocal modulators of germ cell apoptosis in cryptorchid testes.	Am. J. Pathol.	165	1367-1374	2004
Mi, W., Beirowski, B., Gillingwater, T.H., Adalbert, R., Wagner, D., Grumme, D., Osaka, H., Conforti, L., Arnhold, S., Addicks, K., Wada, K., Ribchester, R.R. and Coleman, M.P.	The slow Wallerian degeneration gene, WldS, inhibits axonal spheroid pathology in gracile axonal dystrophy mice.	Brain	128	405-416	2005
Manago, Y., Kanahori, Y., Shimada, A., Sato, A., Amano, T., Sato, Y., Setsuie, R., Sakurai, M., Aoki, S., Wang, Y.L., Osaka, H., Wada, K. and Noda, M.	Potentiation of ATP-induced currents due to the activation of P2X receptors by ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1.	J. Neurochem.	92	1061-1072	2005
Ohnishi Y., Tokunaga K., and Hohjoh H	Influence of assembly of siRNA elements into RNA-induced silencing complex by fork-siRNA duplex carrying nucleotide mismatches at the 3'- or 5'-end of the sense-stranded siRNA element.	BBRC	329	516-521	2005

Tamura Y., Sakasegawa Y., Omi K., Kishida H., Asada T., Kimura H., Tokunaga K., Hachiya N.S., Kaneko K., and Hohjoh H.	Association study of the chemokine, CXC motif, ligand 1 (CXCL1) gene with sporadic Alzheimer's disease in a Japanese population.	Neurosci Lett.		印刷中	2005
Sago N., Omi K., Tamura Y., Kunugi H., Toyo-ka T., Tokunaga K., and Hohjoh H.	RNAi induction and activation in mammalian muscle cells where Dicer and eIF2C translation initiation factors are barely expressed.	BBRC	319	50-57	2004

研究成果の刊行物・印刷



Short communication

Microarray expression analysis of *gad* mice implicates involvement of Parkinson's disease associated UCH-L1 in multiple metabolic pathwaysM. Bonin^a, S. Poths^a, H. Osaka^b, Y.-L. Wang^b, K. Wada^b, O. Riess^{a,*}^aDepartment of Medical Genetics, University of Tübingen, Calwerstrasse 7, 72076 Tübingen, Germany^bDepartment of Degenerative Neurological Diseases, National Institute of Neuroscience, NCNP, 4-1-1 Ogawahigashi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan

Accepted 9 March 2004

Abstract

Parkinson's disease (PD) is thought to be caused by environmental and genetic factors. Mutations in four genes, α -synuclein, *parkin*, *DJ-1*, and *UCH-L1*, have been identified in autosomal inherited forms of PD. The pathogenetic cause for the loss of neuronal cells in PD patients, however, remains to be determined. Due to the rarity of mutations in humans with PD, the analysis of animal models might help to further gain insights into the pathogenesis of familial PD. For UCH-L1, deficiency has been described in *gad* mice leading to axonal degeneration and formation of spheroid bodies in nerve terminals. Here, we investigated the gene expression pattern of the brain of 3-month-old Uch-11-deficient gracile axonal dystrophy (*gad*) mice by microarray analysis. A total of 146 genes were differentially regulated by at least a 1.4-fold change with 103 being up-regulated and 43 being down-regulated compared with age and sex matched wildtype littermate mice. The gene products with altered expression are involved in protein degradation, cell cycle, vesicle transport, cellular structure, signal transduction, and transcription regulation. Most of the genes were modestly regulated, which is in agreement that severe alteration of these pathways might be lethal. Among the genes most significantly down-regulated is the brain-derived neurotrophic factor which might be one aspect of the pathogenesis in *gad* mice. Interestingly, several subunits of the transcription factor CCAAT/enhancer binding protein are up-regulated, which plays a central role in most altered pathways.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Theme: Disorders of the nervous system

Topic: Genetic models

Keywords: Ubiquitin; UCH-L1; Parkinson's disease; α -Synuclein; Protein degradation; Microarray chip analysis; Expression

1. Introduction

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder in humans afflicting 1–2% of the population over 60 [6]. The leading clinical symptoms are mainly caused by loss of dopaminergic neurons of the SN. The cause of the neuronal cell death is not known yet but it is thought that genetic factors might be involved in a significant portion of the patients. In agreement with this assertion, increased concordance rates for PD were found in monozygotic twins (75%) vs. dizygotic twins (22%) [35]. Furthermore, numerous families with autosomal dominant

inheritance of PD have been described [10,31,43]. Subsequently, mutations in the α -synuclein gene causing a rare autosomal dominant form of PD [18,36] have been described.

α -Synuclein is degraded by the ubiquitin–proteasome pathway [2,40]. Ubiquitin, a highly conserved 76 amino acid protein, is ligated through its C-terminus to the lysine side chains of proteins targeted for degradation by the 26S proteasome [4]. This process is catalyzed by a series of enzymes, called E1, E2, and E3. Mutations in one of the several hundreds of E3 ubiquitin ligases, which has been named parkin, cause an autosomal recessive form of early onset PD [17,26]. Parkin serves also as an E3 ligase [38] for a protein that interacts with α -synuclein and has been designated synphilin 1 [3]. Subsequently, we identified a mutation in synphilin-1 in PD patients [28]. An altered ubiquitin–proteasomal protein degradation pathway might therefore be

* Corresponding author. Tel.: +49-7071-29-76458; fax: +49-7071-29-5171.

E-mail address: olaf.riess@med.uni-tuebingen.de (O. Riess).

a key event in the pathogenesis of PD [19]. Efficient targeting for degradation by the 26S proteasome requires polyubiquitination. In addition to the isopeptide linkages made to lysines, the ubiquitin C-terminus can also form peptide bonds to α -linked polyubiquitin or ubiquitin followed by a C-terminal peptide extension [34]. This step is catalyzed by a family of Ubiquitin C-terminal hydrolases which are tissue-specific and likely to target distinct substrates. Of these, UCH-L1 is highly expressed in the brain [5,41] and has recently been implicated in PD by the identification of a missense mutation in autosomal dominant PD with reduced penetrance [20]. This I93M mutation was shown to decrease the hydrolytic activity in vitro significantly [20,32]. Although other genetic studies did not find the I93M mutation in further families, a S18Y polymorphism in UCH-L1 was found to be linked to a decreased susceptibility to PD [27,42]. Subsequently, Peter Lansbury's group has shown that the UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities indicating that UCH-L1 has an ubiquitin-ubiquitin ligase activity [23]. Inhibitors of the proteasomal pathway in cultured neurons by ubiquitin aldehyde which is a UCH inhibitor cause the formation of protein aggregates and cell death [30]. Most interestingly, UCH-L1 is also part of the Lewy bodies [25].

Although evidence for an altered ubiquitin-proteasomal protein degradation pathway as the cause of PD is striking, the cause of the selective degeneration of dopaminergic neurons in PD patients has not been elucidated. We thought to gain insight into the complex metabolic pattern of neurons by investigating UCH-L1-deficient gracile axonal dystrophy (*gad*) mice using microarray expression analyses. The *gad* mouse is an autosomal recessive spontaneous neurological mutant that was identified in 1984 [37]. Our positional cloning approach successfully identified that the *gad* mutation is caused by an intragenic deletion of the *Uch-l1* gene including exons 7 and 8 [37]. Subsequent studies have shown that the mutant lacks the expression of UCH-L1 protein [33,37]. Pathologically, the *gad* mouse displays dying-back type of axonal degeneration of the gracile tract. Most interestingly, *gad* mice develop accumulation of amyloid precursor protein (APP) in form of ubiquitin-positive deposits along the sensory and motor nervous systems staining [13], another indication that the *gad* mutation affects protein turnover. Therefore, direct involvement of an altered ubiquitin system in neurodegeneration has been indicated by this model.

2. Methods

2.1. Mice

Three-month-old male homozygous *Uch-l1* deficient (*gad*) mice and their age and sex matched wildtype littermate mice (CBA/RFM) were analyzed in the microarray analysis. Mice were maintained and propagated at National Institute of

Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry (Japan). Experiments using these mice were approved by the Animal Investigation Committee of the Institute.

2.2. Brain tissue preparation and RNA analysis

Mice were killed by cervical dislocation, brains were quickly removed, immersed briefly in ice-cold saline, and whole brains were frozen on dry ice and stored at -80°C . Total RNA was extracted from mouse whole brain including olfactory bulb, cerebellum and brain stem by using RNeasy kits (Qiagen). The RNA quality was controlled by Lab-on-Chip-System Bioanalyser 2100 (Agilent).

2.3. Microarray analysis

Double-stranded cDNA was synthesized from the total RNA of one whole brain using a Superscript choice kit (Invitrogen) with a T7-(dT)₂₄ primer incorporating a T7 RNA polymerase promoter (Metabion). cRNA was prepared and biotin labeled by in vitro transcription (Enzo Biochemical). Labeled RNA was fragmented by incubation at 94°C for 35 min in the presence of 40 mM Tris-OAc (pH 8.1), 100 mM KOAc, and 30 mM MgOAc. Labeled, fragmented cRNA (15 μg) was hybridized for 16 h at 45°C to a MG-U74A mouse genome array (Affymetrix). After hybridization, gene chips were automatically washed and stained with streptavidin-phycoerythrin using a fluidics station. The probe arrays were scanned at 3- μm resolution using a Genechip System confocal scanner made for Affymetrix by Agilent.

Affymetrix Microarray Suite software (version 5.0), MicroDB and Data Mining Tool were used to scan and analyze the relative abundance of each gene based on the intensity of the signal from each probe set. Analysis parameters used by the software were set to values corresponding to moderate stringency (statistical difference threshold=30, statistical ratio threshold=1.5). Output from the microarray analysis was merged with the Unigene or GenBank descriptor and saved as an Excel data spreadsheet.

Each cRNA generated from a brain was hybridized on one microarray separately. We ran three arrays analyzing three *gad* mice vs. two controls allowing a total of six comparisons (3×2 matrix). For each comparison, the analysis using the Affymetrix software generates a "difference call" of no change, marginal increase/decrease, or increase/decrease, respectively. Only those genes which were found in at least six of six comparisons similarly adjusted were defined as stringent differentially expressed genes. Genes which were found in five of six comparisons similarly adjusted were defined as moderate differentially expressed genes. The magnitude and direction of expression changes were estimated as Signal Log Ratio (SLR). The log scale used is base 2, making it intuitive to interpret the Signal Log Ratios in terms of multiples of two. Thus, an SLR of 1.0 indicates an increase of the transcript level by two-fold and -1.0 indicates a two-fold decrease. An SLR

Table 1a
List of stringent differentially regulated genes

GenBank ID	slr—Average	slr—S.D.	Gene-information
<i>RNA-metabolism (3)</i>			
AA791742	1.09	0.28	ARP2 actin-related protein 2 homolog (yeast)
AA690583	0.87	0.34	splicing factor proline/glutamine rich (polypyrimidine tract binding protein associated)
AI843586	0.72	0.21	splicing factor, arginine/serine rich 9 (25 kDa)
<i>Vesicle-transport-proteins (3)</i>			
U60150	0.8	0.24	vesicle-associated membrane protein 2
AB025218	0.71	0.11	coated vesicle membrane protein
D12713	0.68	0.15	SEC23A (<i>S. cerevisiae</i>)
<i>Cellular structure proteins (4)</i>			
AF067180	1	0.16	kinesin family member 5C
AB023656	0.6	0.21	kinesin heavy chain member 1B
M21041	0.73	0.21	microtubule-associated protein 2
M18775	-0.69	0.22	microtubule-associated protein tau
<i>Channel-proteins (4)</i>			
X78874	0.81	0.19	chloride channel 3
X16645	0.74	0.28	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 2 polypeptide
U14419	0.67	0.14	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit beta 2
U16959	0.65	0.15	FK506 binding protein 5 (51 kDa)
<i>Defense (2)</i>			
X06454	0.73	0.24	complement component 4 (within H-2S)
X66295	0.53	0.11	complement component 1, q subcomponent, c polypeptide
<i>Ca-metabolism (2)</i>			
X87142	0.83	0.33	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha
AI842328	0.82	0.58	calmodulin 3
<i>Growth factors (1)</i>			
X55573	-0.73	0.23	brain-derived neurotrophic factor
<i>Chaperones (1)</i>			
M20567	0.97	0.31	heat shock protein, 70 kDa 2
<i>Signal transduction (13)</i>			
U50413	1.53	0.92	phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 1 (p85 alpha)
AF022992	1.04	0.13	period homolog 1 (<i>Drosophila</i>)
AI838022	0.89	0.31	ADP-ribosylation factor 3
AI849333	0.75	0.17	cerebellar postnatal development protein 1
X84239	0.74	0.14	RAB5B, member RAS oncogene family
AW125157	0.7	0.1	F-box and WD-40 domain protein 1B
AB005654	0.7	0.14	mitogen-activated protein kinase kinase 7
M97516	0.69	0.11	
AA822412	0.68	0.27	RIKEN cDNA 2610313E07 gene

Table 1a (continued)

GenBank ID	slr—Average	slr—S.D.	Gene-information
<i>Signal transduction (13)</i>			
AF001871	0.66	0.13	pleckstrin homology, Sec7 and coiled/coil domains 3
D87902	0.62	0.17	ADP-ribosylation factor 5
AI840130	-0.56	0.15	Src activating and signaling molecule
AV280750	-0.56	0.14	mitogen-activated protein kinase 10
<i>Protein degradation (10)</i>			
AW125800	1.18	0.35	ESTs, weakly similar to ubiquitin specific protease 8; putative deubiquitinating enzyme [<i>Mus musculus</i>] [<i>M. musculus</i>]
L21768	0.83	0.13	epidermal growth factor receptor pathway substrate 15
X57349	0.65	0.11	transferrin receptor
AW050342	0.5	0.09	ubiquitin specific protease 21
AI849361	-0.54	0.12	RIKEN cDNA 1700056017 gene
AI838853	-0.59	0.08	ubiquitin carboxyl-terminal esterase L5
AI839363	-0.65	0.17	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6 48-kDa
AI846787	-0.67	0.22	Vhh-interacting deubiquitinating enzyme 1
AI842835	-0.7	0.09	RIKEN cDNA 1500004006 gene
AI839225	-0.86	0.17	leucine aminopeptidase 3
<i>Membrane-transport (4)</i>			
AF064748	1.56	0.7	plasma membrane associated protein, S3-12
M22998	1.13	0.27	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1
M75135	0.89	0.32	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3
AI843448	0.84	0.36	microsomal glutathione S-transferase 3
<i>Transcription-regulation (12)</i>			
M36514	1.19	0.26	zinc finger protein 26
AB021491	0.92	0.32	staphylococcal nuclease domain containing 1
M61007	0.96	0.23	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta
M62362	0.81	0.04	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha
AI850638	0.65	0.13	thyrotroph embryonic factor
U47543	0.62	0.23	Ngfi-A binding protein 2
X61800	0.51	0.14	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta
U16322	-0.56	0.1	transcription factor 4
AF034745	-0.63	0.17	ligand of numb-protein × 1
Z67747	-0.65	0.13	zinc finger protein 62
AI843959	-0.66	0.25	RIKEN cDNA 5730403B10 gene
X94127	-0.94	0.14	SRY-box containing gene 2
<i>Others and non-classified (21)</i>			
AI851703	1.31	0.47	expressed sequence AW049671
AW227650	1.25	0.26	RIKEN cDNA 0610038P07 gene
AI877157	1.21	0.41	transmembrane 4 superfamily member 9
AF058799	1.14	0.31	3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, gamma polypeptide