

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15～17年度 総合研究報告書

主任研究者 和田 圭司  
平成18(2006)年3月

## 目 次

I. 総合研究報告書		
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
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	—————	14
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	—————	21
III. 研究成果の刊行物・印刷	—————	25

## I. 総合研究報告書

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、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3年間で、ハンチントン病については RNAi 法による原因遺伝子の発現抑制が神経変性疾患の治療に直結することをハンチントン病モデルマウスで見いだし、パーキンソン病に関しては加齢依存的に黒質ドーパミン産生ニューロンが脱落する新規パーキンソン病モデルマウスを開発した。さらにユビキチン-プロテオソーム系とリソソーム系の機能的コミュニケーションの存在を明らかにした。また、胎仔・成体神経幹細胞に選択的にあるいは高発現する G 蛋白質共役型受容体を同定し当該 GPCR の多くが神経幹細胞の増殖性あるいは接着性、運動性を制御していることを示した。

分担研究者 北條浩彦 国立精神・神経センター  
神経研究所  
遺伝子工学研究部

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。本研究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(GPCR)の解析を通して神経幹細胞の増殖、運

#### 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(標的分子特異的遺伝子発現制御法、神経機能不全修復法、神経再生療法)を動物モデルを用いて開発し確立することをめざす。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

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。

## 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。UCH-L1 発現トランスジェニックマウスにおける UCH-L1 蛋白質の性状ならびに UCH-L1 導入培養細胞における UCH-L1、パーキンソン病関連蛋白質の性状については western blot 法などで解析した。UCH-L1 の水溶液中の構造解析は中性子小角散乱法を使用した。

### (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。さらに siRNA をもとに開発した shRNA 発現プラスミド 200 ng を同様に生後2日のハンチントン病モデルマウスに ExGen500 溶液として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寿命の検討を行った。

### (3) 神経幹細胞に関する研究

胎生 14 日マウスの終脳、あるいは成体マウス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。さらに、当該特異的リガンドを生体脳室内へ持

続投与した際の増殖、分化、運動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、平成15年8月27日に特許出願を行った。また UCH-L1 の当該変異が中脳における UCH-L1 の不溶性亢進を誘導し、さらに細胞を用いた実験からリソソーム系で UCH-L1 の蓄積が生じることを見出した。この結果はユビキチン系とリソソーム系の連関を示すものであったが、我々は UCH-L1 の不溶性亢進がパーキンソン病関連蛋白質の蓄積に寄与することもついで見いだすことに成功した。また、水溶液中における UCH-L1 の構造解析を行い、発症度と UCH-L1 構造の間に相関性があることを世界で初めて見いだした。

### (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である huntingtin に特異的な siRNA を開発し、生直後のマウス脳内への直接投与がモデル動物の延命に効果があることを見出した。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。さらに当該 siRNA を元に shRNA 発現ベクターを開発し同様に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の有無を検討した。shRNA を発現ベクター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、延命に関しては siRNA 処置マウスよりもさらに延命した。

### (3) 神経幹細胞に関する研究

胎仔神経幹細胞に最も高発現する GPCR 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。また、成体脳由来培養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行い、成体神経幹細胞に高発現する GPCR を同定した。当該 GPCR に作用するリガンドの脳内注入により神経幹細胞の運動性、増殖性を解析したところいくつかのリガンドで効果を認めた。

### 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か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まだ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。さらに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見出したが、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報告した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。さらに、当該モデルマウスを用いて I93M UCH-L1 の不溶性亢進がリソソーム系で生じ、パーキンソン病関連蛋白質の蓄積に寄与することを見出した。この意義は特に大きく、UCH-L1 から見たパーキンソン病発症の分子機序が明らかにされたことを意味する。

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。ついで当該 siRNA を元に shRNA を開発し、その脳内直接投与がハンチントン病モデルマウスの延命に siRNA よりもより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、胎生神経幹細胞にはエンドセリンがそ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。また成体神経幹細胞に発現する GPCR のいくつかが生体においても神経幹細胞の運動性あるいは増殖性を制御す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

計画通りに研究が進展し、これまで着実に成果をあげることが出来た。具体的には、標的分子特異的遺伝子発現制御法としてハンチントン病原因遺伝子特異的 RNAi 法を確立しその治療効果をモデルマウスで確立した。神経機能不全修復法については新規に開発したパーキンソン病モデルを用いて UCH-L1 がもたらす発症機序の根幹のメカニズムを解明した。神経再生療法については神経幹細胞の動態制御を行う GPCR 作用薬の同定に成功した。以上いずれも根本的治療の実現を将来可能にする基礎となる成果であった。

## F. 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.
- 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 b- and g-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]

- 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.
- 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.* **73**, 29-35, 2005
- Wang, Y.L., Liu, W., Wada, E., Murata, M., Wada, K. Kanazawa, I., Clinico-pathological rescue of a model mouse of Huntington's disease by siRNA. *Neurosci. Res.*, **53**, 241-249, 2005
- Wang, Y.L., Liu, W., Sun, Y.J., Kwon, J., Setsuie, R., Osaka, H., Noda, M., Aoki, S., Yoshikawa, Y., Wada, K. Overexpression of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 arrests spermatogenesis in transgenic mice. *Mol. Reprod. Dev.*, **73**, 40-49, 2006
- Naito S, Mochizuki H, Yasuda T, Mizuno Y, Furusaka M, Ikeda S, Adachi T, Shimizu HM, Suzuki J, Fujiwara S, Okada T, Nishikawa K, Aoki S, Wada K. Characterization of multimetric variants of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 in water by small-angle neutron scattering. *Biochem Biophys Res Commun.* **339**, 717-725, 2006
- Sakurai, M., Ayukawa, K., Setsuie, R., Nishikawa, K., Hara, Y., Ohashi, H., Nishimoto, M., Abe, T., Kudo, Y., Sekiguchi, M., Sato, Y., Aoki, S., Noda, M., Wada, K. Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 regulates the morphology of neural progenitor cells and modulates their differentiation. *J. Cell Sci.*, **119**(Pt1), 162-171, 2006
- Kwon, J., Sekiguchi, S., Wang, Y.L., Setsuie, R., Yoshikawa, Y. and Wada, K. The region-specific functions of two ubiquitin C-terminal hydrolase isozymes along the epididymis. *Exp. Anim.*, **55**(1), 35-43, 2006
- 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.

Ohnishi Y., Tokunaga K., Kaneko K., and Hohjoh H. Assessment of allele-specific gene silencing by RNA interference with mutant and wild-type reporter alleles. *J. RNAi Gene silencing*, (in press), 2006

## 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

amper-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.

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, Setsuie 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, OhashiH, 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." 54<sup>th</sup> 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" 54<sup>th</sup> 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." 54<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Toronto, Ontario, CANADA.
- Noda M, Kosai Y, Kido MA, Tanaka T, Wada K. "AMPA-type of glutamate receptors in microglia" Gordon Research Conference on Glial Biology: Functional Interaction between Glia & Neuron. Ventura, California, USA. March 16, 2005
- Noda, M., Kariura, Y., Kosai, Y., Pannasch, U., Wang, L., Kettenmann, H., Nishikawa, K., Okada, T., Aoki, S., Wada, K. "Anti-inflammatory effects of kinins via microglia in the central nervous system" 1<sup>st</sup> International Conference Exploring the Future of Local Vascular and Inflammatory Mediators. Lund, Sweden. May 28, 2005
- Wang, B., Pannasch, U., Hatano, Y., Aoki, S., Kettenmann, H., Wada, K., Noda, M. "Characters of KCNQ channels in microglia." The Fifth Japan-Korea Joint Symposium of Brain Sciences, and Cardiac and Smooth Muscles. Kitakyushu, Japan. July 23, 2005
- Noda, M., Kariura, Y., Pannasch, U., Wang, L., Ifuku, M., Nolte, C., Nishikawa, K., Wang, B., Aoki, S., Kettenmann, H., Wada, K. "Anti-inflammatory effects of BK in microglia" The Fifth Japan-Korea Joint Symposium of Brain Sciences, and Cardiac and Smooth Muscles. Kitakyushu, Japan. July 24, 2005
- Wada, K., Yamauchi, R., Sakurai, M., Furuta, A., Wada, E., Sekiguchi, M., Aoki, S., "Novel therapeutic targets in glia-neuron interaction: G-Protein coupled receptors and deubiquitinating enzymes" International Society for Neurochemistry jointly with the European Society for Neurochemistry. 20<sup>th</sup> Biennial Meeting. August 22, 2005
- Skiguchi, M., Zushida, K., Yoshida, M., Kamichi, S., Yuko Santo-Yamada, Kumanogo, H., Yokosuka, H., Sahara, Y., Nakamura, S., Yuasa, S., and Wada, K., "Deficit of dystrophin facilitates mouse defensive behavior" Society for Neuroscience 35<sup>th</sup> Annual Meeting, Washington DC, November 12-16, 2005
- Zushida, K., Wada, K., and Sekiguchi, M., "A potentiator of AMPA receptors, PEPA, accelerates the decay of conditioned fear

responses in mice” Society for Neuroscience 35<sup>th</sup> Annual Meeting, Washington DC, November 12-16, 2005

- Noda, M., Sato, A., Manago, Y., Nishikawa, K., Amano, T., Aoki, K., Wada, E., Osaka, H., Setsuie, R., Sakurai, M., Aoki, S., Wada, K., “A possible role of parkin in neurotransmission; potentiation of P2X receptor channels.” Society for Neuroscience 35<sup>th</sup> Annual Meeting, Washington DC, November 12-16, 2005
- Noda, M., Ifuku, M., Farber, K., Seike, T., Wang, B., Kettenmann, H., Wada, K. “Protective effects of kinins via microglia in the brain” Asian Symposium for Pharmaceutical Science in JSPS Asian Core Program. Fukuoka, Japan. January 26, 2006
- Noda, M., Ifuku, M., Farber, K., Kettenmann, H., Wada, K. “Kinin-induced microglial migration and anti-inflammatory effects in the central nervous system” 37<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society for Neurochemistry. Portland, USA. March 12-13, 2006
- Ohnishi Y., Tokunaga K., Kaneko K., and Hohjoh H. (2005) “Evaluation system for siRNA duplexes conferring allele-specific gene silencing.” 55<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Salt Lake City, Utah, USA.
- Kawashima M., Tamiya G., Hohjoh H., Juji T., Ebisawa T., Honda Y., Inoko H., Tokunaga K. (2005) “A new resistant gene candidate for human narcolepsy identified by a genome-wide association study” 55<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Salt Lake City, Utah, USA.

(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: ブ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.
- 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。
- 関口正幸、圖子田 康、吉田瑞子、上地さり、山田  
祐子、佐原資謹、和田圭司:「Dystrophin のマウ  
ス中枢における機能についての研究」第46回  
日本神経学会総会、鹿児島 2005.5.25
- 和田圭一郎、山田正典、安田徹、平井幸彦、小坂  
仁、望月秀樹、島田隆、和田圭司、水野美邦:  
「AAVベクターを用いたUCHL-1過剰発現系  
における神経細胞死の検討」第46回日本神  
経学会総会、鹿児島 2005.5.25
- 安田徹、仁平友子、和田圭一郎、和田圭司、水野  
美邦、望月秀樹:「UCH-L1 transgenic マウスに  
おける  $\alpha$ -synuclein の過剰発現」第46回日  
本神経学会総会、鹿児島 2005.5.26
- Wang, Y., Setsuie, R., Mochizuki, H., Osaka, H.,  
Hayakawa, H., Ichihara, N., Noda, M., Mizuno,  
Y., Aoki, S., and Wada, K., “UCH-L1I93M Tg  
mice is an useful model of Parkinson’s disease”  
第28回日本神経科学学会大会、パシフィコ横  
浜 2005.7.26
- Sakurai, M., Ayukawa, K., Setsuie, R., Nishikawa,  
K., Aoki, S., Noda, M., Wada, K., “UCH-L1  
Regulates the Morphology of Neural Progenitor  
Cells and Modulates their Differentiation” 第2  
8回日本神経科学学会大会、パシフィコ横浜  
2005.7.26
- Sekiguchi, M., Zushida, K., Yoshida, M., Kamichi,  
S., Santo-Yamada, Y., Kumanogo, H.,  
Yokosuka, M., Sahara, Y., Nakamura, S., and  
Wada, K., “Deficit of dystrophin facilitates  
mouse defensive behavior” 第28回日本神経科  
学大会、横浜 2005.7.28
- Zushida, K., Wada, K., and Sekiguchi, M., “A  
potentiator of AMPA receptors, PEPA,  
accelerates the extinction of fear memory  
through AMPA receptors” 第28回日本神経科  
学大会、横浜 2005.7.27
- Aoki, S., Nishikawa, K., Sun, YJ, Wang, YL., Osaka,  
H., Wada, K., “Solo, a membrane-associated  
Trio isoform, regulates early endosomes in  
Purkinje neurons” 第28回日本神経科学大  
会、横浜 2005.7.27
- 和田圭司:「たんぱく質分解の破綻と神経疾患 ユ  
ビキチン代謝異常と神経変性」第35回 新潟  
神経学夏期セミナー 2005.8.4
- 有村由貴子、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、野田百美。  
「P2X 受容体反応に及ぼすパーキンソン病原  
因遺伝子パーキンおよび alpha-シヌクレインの  
影響」生理学研究所研究会:「生理機能制御  
および病態におけるプリン作動性シグナリング  
の役割とその分子機構」於 岡崎生理学研  
究所 2005.9.1
- 王 冰、パナシユ・ウルリケ、波田野佳子、青木俊介、  
ケテンマン・ヘルマト、和田圭司、野田百美  
“Expression and function of KCNQ channels in  
microglia” 第48回日本神経化学学会(福岡)大  
会 2005.9.28
- 安田徹、仁平友子、和田圭一郎、和田圭司、水野  
美邦、望月秀樹 “Analysis for functional  
interaction between alfa-synuclein and UCH-L1  
proteins in vivo” 第48回日本神経化学学会(福  
岡)大会 2005.9.28
- 野田百美、真子 好正、佐藤あゆみ、西川香里、天  
野大樹、青木公三子、和田恵津子、小坂仁、  
節家理恵子、櫻井省花子、王 玉来、青木俊  
介、和田圭司 “A possible role of parkin and  
ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 in  
neurotransmission; potentiation of P2X  
receptor channels” 第48回日本神経化学会  
(福岡)大会 2005.9.28
- Naito, S., Mochizuki, H., Yasuda, T., Mizuno, Y.,  
Furusaka, M., Ikeda, S., M Hirohiko Shimizu,  
Adachi, T., Suzuki, J., Fujiwara, S., Okada, T.,

- Nishikawa, K., Aoki, S., Wada, K.,  
 “Characterization of multimetric variants related to Parkinson’s disease of Ubiquitin carboxyl-Terminal hydrolase L1 in water by small - Angle neutron scattering” 第78回日本生化学会大会、神戸 2005.10.19-22
- 井 福 正 隆、Katrin Farber、王 冰、Helmut Kettenmann、和田圭司、野田百美。「ブラジキニン B<sub>1</sub> 受容体を介したミクログリアの運動性・移動性増加とその要因解析」第10回グリア研究会、大阪 2005.10.22
- 和田圭司：「神経変性と脱ユビキチン化酵素」“The ubiquitin system and neural cell function: Functional role of a deubiquitinating isozyme, UCH-L1, in neurogenesis and neurodegeneration.” 蛋白質研究所セミナー「脳神経疾患の最前線」大阪 2005.11.25
- 和田圭司：「パーキンソン病とユビキチンシステムーUCH-L1 の役割ー」第21回 Wako ワークショップ「神経疾患その病態解明と治療法の開発」2005.11.30
- 西川香里、青木俊介、孫 英傑、王 玉来、小坂仁、和田圭司 “Modulation of neurite elongation by Purkinje neuron-specific guanine nucleotide exchange factor” 「小脳プルキニエ細胞特異的に発現するグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF)の神経突起伸長に関する機能解析」第28回日本分子生物学会年会 2005.12.7
- 後藤章子、王玉来、節家理恵子、小坂仁、櫻井省花子、株田智弘、澤 明、石浦章一、和田圭司：Gracile Axonal Dystrophy (GAD) マウス坐骨神経のプロテオーム解析 “Role of Ubiquitin Carboxy Terminal Hydrolase - L1 in sciatic nerve” 第28回日本分子生物学会年会 2005.12.8
- 大橋洋輝、君和田友美、西川香里、青木俊介、和田圭司：成熟個体脳由来の神経系前駆細胞におけるG蛋白質共役型受容体の発現解析
- “Expression profile of G-protein coupled receptor genes on adult mouse brain-derived neural progenitor cells.” 第28回日本分子生物学会年会 2005.12.9
- Amano, T., Wada, E., Noda, M. Wada, K., Sekiguchi, M. “Enhancement of amygdala LTP in neurotensin receptor type-1 knockout mice; participation of the dopamine system” 第4回ニューロサイエンスワークショップ in 九州 於福岡 2005.12.9
- 井福正隆、Katrin Farber、王冰、和田圭司、Helmut Kettenmann、野田百美。「ブラジキニン B<sub>1</sub> 受容体を介したミクログリアの遊走性増加および化学走性とそのメカニズム解明」第126年会日本薬学会 於仙台 2006.3.28
- 田村美子、功刀浩、金子清俊、北條浩彦。(2005) 「ヒト RELN 遺伝子の DNA メチル化と遺伝子発現レベルの解析」第28回日本分子生物学会、福岡。
- 大西悠亮、徳永勝士、徳永勝士、金子清俊、北條浩彦。(2005) 「対立遺伝子特異的 RNAi 効果をヘテロ接合体下で評価するアッセイ系の確立」第28回日本分子生物学会、福岡。
- 山本真央、高須美和、徳永勝士、数藤由美子、平井百樹、北條浩彦、功刀浩、上野美華子、南光進一郎。(2005) 「均衡型染色体転座部位における双極性障害疾患感受性遺伝子探索」第28回日本分子生物学会、福岡。
- G. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得  
 (出願中)  
 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

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

特許出願番号: 2005-116177

発明者: 北條浩彦

発明の名称: 「対立遺伝子に対する特異的 RNAi の評価方法」

出願人: 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団とプロメガ株式会社との共同出願

出願日: 平成17年4月13日

(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



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)を用いた遺伝子機能阻害（ノックダウン）方法によるハンチントン病根本的治療の実現を目指して、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強力に誘導する siRNA 二量体（RNAi を誘導する短い二本鎖 RNA 分子）を設計し、*Huntingtin* 遺伝子機能阻害による細胞への影響をまず検討した。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顕著な減少が観察された。この結果は、正常 *Huntingtin* の機能が細胞にとって重要であることを示している。したがって、RNAi 技術を用いて変異型 *Huntingtin* 遺伝子をノックダウンさせる場合、正常型 *Huntingtin* 遺伝子に影響の少ない RNAi 誘導法であることが望まれる。つまり、正常型、異常型遺伝子を区別して発現抑制させる対立遺伝子（アリル）特異的 RNAi 誘導法が有用であると考えられる。しかしながら、その実現のためには、正確なアリル特異的発現抑制を評価する方法の確立が不可欠であった。そこで我々は、レポーター遺伝子を利用した新しいアリル特異的 RNAi 活性の評価法の開発を試み、その確立を実現させた。

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、変異型 *Huntingtin* による異常機能獲得ばかりでなく、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も、正常型 *Huntingtin* の機能について解析する必要があると考える。さらに、今日遺伝子機能阻害方法として確立している

RNA interference (RNAi) を利用したハンチントン病の根本的治療法 (RNAi 治療) の開発にも関連して、変異型 *Huntingtin* 遺伝子の RNAi ノックダウンだけでなく、正常型遺伝子への影響も検討する必要があると考える。以上のことから我々は、RNAi 技術を用いた遺伝子機能阻害法によって正常型 *Huntingtin* 遺伝子の発現を抑制し、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

### I. RNAi 技術による正常型 *Huntingtin* 遺伝子の機能阻害

#### 1) *Huntingtin* 遺伝子をターゲットとする RNAi 誘導

マウス *Huntingtin* 遺伝子のエクソン 1 をターゲットとする二つの siRNA (siHd1, siHd2) を設計し合成した。合成した siRNA をマウス神経芽細胞腫由来 Neuro2A 細胞に導入し、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、ウエスタンブロット解析による *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。

### II. 対立遺伝子特異的 RNAi 活性の評価方法の確立

ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子とウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子をそれぞれコードした発現プラスミドを利用してレポーターアリルを構築した。まず、変異アリル、正常アリルに相当するオリゴ DNA を合成し、それらをそれぞれのレポーター遺伝子の 3' 非翻訳領域に挿入して変異レポーターアリルそして正常レポーターアリルを構築した。

変異アリルをターゲットとする合成 siRNA を作製し、正常、変異レポーターアリルをそれぞれ含んだプラスミド DNA とベクター・ガラクトシダーゼ遺伝子を含んだ発現プラスミド DNA (コントロールとして用いた) をリポフェクタミン 2000 試薬 (Invitrogen 社) を用いたリポフェクションによってヒト HeLa 細胞に導入し、24 時間後、細胞抽出液を調製した。

得られた細胞抽出液を用いて、発現した両ルシフェラーゼ活性そしてコントロールのベクター・ガラクトシダーゼ活性を測定した。そして、ベクター・ガラクトシダーゼの活性値を基に両ルシフェラーゼの活性量 (発現量) を正常化し、テストした siRNA の変異アリルに対するノックダウン効果と正常アリルに対する影響を評価した。

本研究では評価システムの確立を第一の目標とした。そこで、様々な検討を容易に行うために、すでに十分研究されている amyloid precursor protein (APP) 遺伝子の Swedish 型変異 (アミノ酸変化を伴う 2 塩基変異) と London 型変異 (アミノ酸変化を伴う 1 塩基変異) をモデル変異アリルとしてシステムの確立を試みた。

## C. 研究結果

### 1) 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* 遺伝子を~85%発現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%の発現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。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、siHD による RNAi 誘導後、24 時間で、内在性 *Huntingtin* タンパク質の量が顕著に減少することも観察された。

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。

### 2) レポーター遺伝子を用いた対立遺伝子特異的 RNAi 活性の評価法

Swedish 型変異に対する siRNA の効果を検討した結果 (図 1)、設計した一つの siRNA [siAPP(T12/C13)] を除いて変異アリルに対する発現抑制が観察された。一方、それらの siRNA の正常型アリルに対する影響は、ほとんど影響を与えないものから中程度(40%程)の発現抑制を誘導するものと様々な影響が観察され

た。

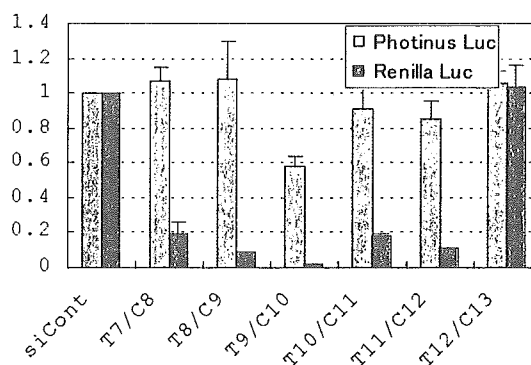


図 1 (正常型:P. Luc ; 変異型:R. Luc)

London 型変異をモデル変異アリルとして解析した結果、V717I, V717F タイプの London 型変異をターゲットとする siRNA では、変異型アリルを 60~70%ノックダウンする siRNA が観察されたが、V717G タイプの London 型変異をターゲットとする siRNA では、極わずかししか発現抑制が誘導されなかった。Swedish 型変異の結果と比べて、全体的に変異アリルと正常アリルとの間に大きな発現量の差を生じさせる、すなわち、アリル特異的な発現抑制効果は観察されなかった。

我々はさらに、改良型 siRNA を用いて、アリル特異的 RNAi 誘導が改善されるか否かについても検討した。今回テストした改良型 siRNA は、Fork-siRNA で、センス鎖の 3' 末端に mismatches を導入しアンチセンス鎖とのアニーリングを阻害した siRNA 二量体である。この Fork 型 siRNA は従来型の siRNA と比べて RNAi を強く誘導することが知られている。この Fork-siRNA を用いて Swedish 型, London 型変異アリルに対する発現抑制効果の亢進、そして、正常型アリルに対するオフターゲット効果の減少が誘導されるか否かを調べた。その結果、Swedish 型変異アリルでは全体的にアリル特異的 RNAi 活性が高まり、さらに、従来型の siRNA では RNAi 活性を誘導することができなかった siAPP(T12/C13)においても、Fork 型にすること

でアシル特異的 RNAi 活性が誘導された。

London 型変異アシルに対しても、Fork 型 siRNA を用いることで、アシル特異的 RNAi 活性の改善が観察されたが、その程度は Swedish 型変異と比べて小さく、また、変異のタイプによって異なっていた。

### 3) 全長 cDNA を用いた対立遺伝子特異的 RNAi 活性

正常型そして Swedish 型の完全長 cDNA を持った APP 発現プラスミドと、上記で解析した Swedish 型変異に対する siRNA を Cos-7 細胞に導入し同様の解析を行った。ウエスタンブロット法、ELISA 法を用いて解析した結果、レポーターアシルを用いて評価した結果とほぼ同様の結果が得られた。さらに、正常型、Swedish 型の両方が発現するヘテロの条件下で、アシル特異性を示す siRNA は、APP タンパク質の発現量に変化を与えずにベータ・アミロイドの産生を減少させることが観察された。

## D. 考察

内在性 *Huntingtin* 遺伝子をノックダウンする siHdl 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ことが予想される。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(ストレス環境下)で培養すると、その細胞の増殖が減少した。この結果から、*Huntingtin* 遺伝子が、抗ストレス機能に関っている可能性が考えられる。

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、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必要がある。

RNAi を用いた上記の *Huntingtin* 遺伝子ノックダウンによる細胞への影響から、正常型 *Huntingtin* 遺伝子をノックダウンした場合、細胞増殖の減少が観察されることが分かった。この結果は、正常型 *Huntingtin* の機能が細胞の生存に重要であることを示唆している。したがって、RNAi 技術を用いて変異型 *Huntingtin* 遺伝子をノックダウンする場合、正常型 *huntingtin* 遺伝子には影響しない RNAi 誘導法でなければならないと考える。つまり、正常型、異常型遺伝子を識別して発現抑制させる対立遺伝子(アシル)特異的 RNAi 誘導法でなければならない。しかしながら、その実現のためには、異常型、正常型アシルを識別する siRNA の設計が必要であり、さらにその siRNA を用いたアシル特異的 RNAi 活性の評価法の確立が不可欠である。そこで我々は、レポーター遺伝子を利用した新しいアシル特異的 RNAi 活性の評価方法の開発を試み、その確立を実現させた。この新しい方法は、従来解析が不可能であった正常型/変異型アシルがヘテロで存在する条件下で、変異型アシルに対する RNAi 発現抑制効果と正常型アシルに与える影響を同時に評価することができる。この新規の方法によって、変異型アシル特異的ノックダウンを可能にする siRNA の設計、そしてその効果の容易な判定が可能になった。

以上のように、本研究期間内における我々の研究成果は、RNAi 治療の根幹となる変異型 *Huntingtin* 遺伝子特異的 RNAi 誘導に向けて大きく貢献したと考える。

## E. 結論

RNAi を用いた正常型 *Huntingtin* 遺伝子ノ