

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

ハンチントン病の根本的治療の実現をめざした最新 RNAi  
誘導技術を基盤とする先端的治療法の開発と確立

(H18-こころ-一般-021)

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 北條 浩彦

平成19(2007)年 3月

# 目 次

I. 総括研究報告書	_____	1
ハンチントン病の根本的治療の 実現をめざした最新 RNAi 誘導 技術を基盤とする先端的治療法 の開発と確立に関する研究 北條 浩彦		
II. 分担研究報告書	_____	8
ハンチントン病における発症機序 の解明と実践的治療に向けた shRNA 誘導技術の開発に関する 研究 和田 圭司		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	_____	13
IV. 研究成果の刊行物・印刷	_____	15

ハンチントン病の根本的治療の実現をめざした最新 RNAi 誘導技術を基盤とする  
先端的治療法の開発と確立（H18-こころ-一般-021）

主任研究者 北條 浩彦 国立精神・神経センター神経研究所 室長

本研究は、これまで有効な治療法がなかった難治性の神経変性疾患、ハンチントン病に対して、その根本的治療法の開発を目標としている。ハンチントン病は、病因タンパク質の不溶化・凝集がその神経変性の本態であると考えられている。したがって、治療戦略的には、病因遺伝子産物の除去または特異的発現抑制、神経機能不全の修復、変性ニューロンの再生が根本的治療に直結すると考えられる。我々はこれに基づき、次世代の先端医療技術として注目されている RNA interference (RNAi)法を利用し、病因(異常型)ハンチンチン遺伝子の発現抑制による根本的治療法の開発を目指している。本年度(初年度)は、先ず最新の RNAi 誘導技術の導入として、従来の RNA ポリメラーゼ III による short hairpin RNA (shRNA: 細胞内で発現後、Dicer によってプロセスされ RNAi のメディエーターとなる small interfering RNA (siRNA)になる) 発現系から、RNA ポリメラーゼ II プロモーターによる shRNA 発現プラスミドを構築、それらを用いた RNAi 誘導システムを確立した。さらに、テトラサイクリンによって shRNA を発現誘導する shRNA 発現プラスミドも構築した。In vivo RNAi 誘導の検討としては、ハンチントン病モデルマウスの脳内に shRNA 発現ベクターを導入し、その効果を検討した。その結果、疾患モデルマウスの病的症状の発症遅延と明らかな延命効果が観察された。また、若年発症のハンチントン病と関連が報告されている脱ユビキチン酵素 UCH-L1 変異についても、その変異と異常型ハンチンチンの凝集体形成そして細胞死との関連を、細胞生物学的手法を用いて解析した。その結果、それらの間には有意な関連性が観察されなかった。

分担研究者 和田 圭司  
国立精神・神経センター  
神経研究所  
疾病研究第4部 部長

A. 研究の目的

本研究は、これまで有効な治療法がなかった難治性の神経変性疾患、ハンチントン病に対

して、次世代の先端医療技術として注目されている RNA interference (RNAi)法を利用し、その根本的治療の開発を目指している。ハンチントン病を含む神経変性疾患は、病因タンパク質の不溶化・凝集が神経変性の本態であると考えられている。したがって、治療戦略的には、病因遺伝子産物の除去または特異的発現抑制、神経機能不全の修復、変性ニューロンの再生が根本的治療の道を開くこと考えられる。ハンチン

トン病はすでに原因遺伝子(ハンチンチン遺伝子)とその病因変異が明らかにされている。したがって、変異型のハンチンチン遺伝子を特異的に発現抑制することが、ハンチントン病の根本的治療に直結すると考えられる。我々はこれに基づき、次世代の先端医療技術として注目されている RNA interference (RNAi)法を導入し、病因ハンチンチン遺伝子をターゲットとする small interfering RNA (siRNA: RNAi を誘導する小さな二本鎖 RNA) を設計し、その RNAi 誘導効果や発現システムの開発、そしてハンチントン病モデル動物を使った実践的な治療効果の検討を行ってきた。これらの成果は、RNAi の治療の有効性を強く示唆し、そして治療効果向上に向けての問題・課題も提示した。

現在、RNAi 技術の格段な進歩・発展が進み、我々が RNAi 技術を導入した時よりもはるかに高い RNAi 誘導技術が確立されている。これらの最新 RNAi 誘導技術を導入し、さらに効果の高い治療法・予防法を開発することは、根本的治療の確立をめざす本研究の目的に合致する取り組みであり、重要である。よって本研究は、現在の新しい RNAi 誘導技術を積極的に取り入れ、病因遺伝子である異常型ハンチンチン遺伝子そして病因関連(感受性)遺伝子の特異的発現抑制をとおしてハンチントン病の根本的治療の開発そして確立をめざす。ハンチントン病にかかわる病因関連(感受性)遺伝子については、異常型ハンチンチンによる凝集体形成やそれに伴う細胞死の分子機序の解明から新たな病因関連(感受性)遺伝子の発見つなると期待される。治療戦略的観点から見ても、それらは治療に直結する新規のターゲット遺伝子となる。よって、ハンチントン病に関連する感受性遺伝子の探索についても本研究で取り組んだ。

## B. 研究方法

### 1) RNAポリメラーゼIIプロモーターを搭載

する pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR プラスミドベクター(インビトロジェン社)を用いて、RNAポリメラーゼIIによって転写される short hairpin RNA (shRNA: 細胞内で発現後、Dicer 酵素によってプロセスされ siRNA となる)発現システムの構築を行った。ハンチンチン遺伝子を強くノックダウンする合成 siRNA の配列を基に、様々なタイプの shRNA を発現する合成オリゴDNA(センス鎖とアンチセンス鎖オリゴDNA)を設計し、アニーリング後、そのオリゴDNA二量体をベクター内に挿入した。

- 2) 上記1) で構築した shRNA 発現プラスミドを基に、ゲートウェイ・システム(インビトロジェン社)を用いて、shRNA をさらにテトラサイクリンで発現誘導可能な pT-Rex-DEST30 発現プラスミド内にサブクローニングした。
- 3) 上記1)、2)で構築した発現プラスミドは、追跡マーカーとして GFP 遺伝子がコードされている。ハンチンチン遺伝子の RNAi ノックダウン効果を検証するために、ハンチンチン遺伝子エキソン1と DsRed-monomer 遺伝子が連結した融合遺伝子をもつ発現プラスミドを構築した。
- 4) 構築した発現プラスミド DNA は、リポフェクタミン 2000 トランスフェクション試薬(インビトロジェン社)を用いたりポフェクションによってマウス Neuro2a 細胞、ヒト T-Rex-293 細胞に導入し、その後、蛍光顕微鏡観察、RT-リアルタイム PCR、ウエスタンブロット法を用いて RNAi によるノックダウン効果を検証した。
- 5) テトラサイクリンによる shRNA 発現誘導の場合、ヒト T-Rex-293 細胞を用い、細胞はテトラサイクリン・フリーの培養液中で生育させた。誘導時には、1  $\mu$ g/ml テトラサイクリンによって shRNA の発現を誘導した。

- 6) ハンチントン病疾患モデル動物を用いた治療効果の検討として、shRNA 発現プラスミドベクター(RNA ポリメラーゼⅢプロモーター搭載)を R6/2 疾患モデルマウス脳内に投与し、行動的評価と延命効果 について検討した。
- 7) ハンチントン病疾患感受性遺伝子候補として、UCH-L1 遺伝子変異と異常型ハンチンチン遺伝子による凝集体形成そして細胞死との関連について検討をおこなった。

### C. 研究結果

- 1) 従来のU6やH1プロモーターに代表されるRNAポリメラーゼⅢプロモーター制御によるshRNA発現システムから、発現制御が可能となるRNAポリメラーゼⅡプロモーターによるshRNA発現システムの構築を行った。まず、Cytomegalovirus (CMV) プロモーターを搭載したpcDNA6.2-GW/EmGFP-miR 発現プラスミドを用いて、合成siRNAを用いた以前の研究から得られた最も効率よくハンチンチン遺伝子をノックダウンするsiRNAの配列を基にshRNAの鋳型となるオリゴDNAを設計し、その発現プラスミド内に挿入した。いくつかのタイプの異なるshRNA発現ベクターを構築し、ハンチンチン-DsRed 融合遺伝子をコードした発現プラスミドと共に培養細胞内にトランスフェクションした。その結果、設計したshRNAごとにRNAiのノックダウン効果が異なることが観察された。
- 2) さらに、上記1)で構築したプラスミドを基に、テトラサイクリンによって発現誘導できるshRNA発現プラスミドも構築した。この発現プラスミドを用いて、変異型ハンチンチン-DsRed 融合タンパク質が発現している細胞内に、テトラサイクリンによってshRNAを誘導すると、異常型ハンチン

ンチン-DsRed 融合タンパク質の凝集塊が誘導していない細胞に比べて小さくなることが観察された。

- 3) 疾患モデルマウス脳内へ、ハンチンチン遺伝子をターゲットとするshRNA発現ベクターを導入することによって病的症状の発症時期の遅延、穏やかな体重減少、運動機能の維持、そして明らかな延命効果が観察された。
- 4) 異常型ハンチンチン遺伝子による凝集体形成とUCH-L1遺伝子変異との関連を細胞生物学的解析によって検討したが、凝集体形成とUCH-L1遺伝子変異との間に顕著な関連は観察されなかった。

### (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・指針ならびに米国国立衛生研究所(NIH)の基準を守り、動物が受ける苦痛を最小限にとどめた。ヒト標本を用いた研究は実施しなかった。

### D. 考察

最新RNAi誘導技術として、従来のRNAポリメラーゼⅢプロモーターによるshRNA発現システムからRNAポリメラーゼⅡプロモーターによるshRNA発現システムを構築した。従来のRNAポリメラーゼⅢによるshRNA発現は、発現コントロールの制御ができず、かつ細胞内に大量のshRNAを発現させてしまう。それに対して、RNAポリメラーゼⅡによる発現誘導システムは、内在性のマイクロRNAとほぼ同じプロセスを経て目的遺伝子のノックダウンが誘導される。この利点は、RNAiを誘導する細胞に対して負担の少ないRNAiを誘導できると考えられる。さらに、RNAポリメラーゼⅡプロモーターを別のプロ

モーターに変えることで、組織特異的 RNAi や薬剤誘導型 RNAi に容易に変換することができる。事実、今回、CMVプロモーターからテトラサイクリン誘導型のプロモーターへの変換とテトラサイクリンによる RNAi 誘導を実証した。この成果は、RNAi 誘導のコントロールを示唆し、RNAi 治療における RNA ポリメラーゼ II プロモーターの応用の可能性を示す結果となった。さらに、この新しい誘導システムに着手して間もなく、従来の RNA ポリメラーゼ III システムから発現した多量の shRNA によるトランスジェニックマウスの死亡例が報告された (Nature 441:537-41, 2006)。この様な個体死を回避するためにも新しい RNA ポリメラーゼ II プロモーターによる shRNA 誘導システムの利用は重要であると考えられる。今後は、この新しい RNAi 誘導システムの安全性について検討していかなければならないと考える。

今回、RNA ポリメラーゼ II プロモーターを搭載した shRNA 発現ベクターとして、複数の発現ベクターを構築した。それらが発現する shRNA は、二次構造に多少の違いがあるものの、プロセスされて生じるガイド siRNA は同じ配列になるように設計されていた。ところが、誘導された RNAi 活性は、それぞれ異なるノックダウン効率を示した。つまり、発現した shRNA の二次構造の違いが、RNAi 誘導とそのノックダウン効率に影響することが考えられる。従って、RNA ポリメラーゼ II プロモーターによる RNAi 誘導システムの場合、発現させる shRNA の構造が重要なポイントになること考えられる。

ハンチンチン遺伝子に対して強いノックダウン効果をもつ siRNA 配列を基に設計された shRNA 発現ベクター (RNA ポリメラーゼ III 搭載) を用いて、それを疾患モデルマウス脳内へ直接投与することによって病的症状の緩和そして延命効果が観察された。これらの結果は、

siRNA だけを投与した以前の結果と一致するものであり、RNAi 治療の有効性を強く示唆した。今後は、上記の RNA ポリメラーゼ II プロモーター搭載の shRNA 発現ベクターも含め、より治療効果の高い誘導システムの構築とその安全性について検討する予定である。

## E. 結論

1) 最新 RNAi 誘導技術の導入として、RNA ポリメラーゼ II プロモーターを搭載した shRNA 発現ベクターを構築し、それを用いてハンチンチン遺伝子の発現を抑制する新しい RNAi 誘導システムを完成させた。

2) テトラサイクリンによって shRNA の発現をコントロールし RNAi ノックダウンを制御する shRNA 発現プラスミドを構築した。そして、それを用いた RNAi 誘導制御を実証した。

3) shRNA 発現ベクター (RNA ポリメラーゼ III プロモーター搭載) の脳内投与による RNAi 誘導によって、疾患モデルマウスの病的症状の発症遅延と延命効果を観察した。

4) UCH-L1 遺伝子変異と異常型ハンチンチンによる凝集体形成そして細胞死との間に有意な関連性は観察されなかった。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Tamura Y., Kunugi H., Ohashi J. and Hohjoh H. Epigenetic aberration of the human REELIN gene in psychiatric disorders. *Mol Psychiatry*, (in press) 2007.

Hohjoh H. and Fukushima T. Expression profile analysis of microRNA (miRNA) in mouse central nervous system using

- a new miRNA detection system that examines hybridization signals at every step of washing. *Gene*, (in press) 2006.
- Ohashi J., Naka I., Toyoda A., Takasu M., Tokunaga K., Ishida T., Sakaki Y., and Hohjoh H. Estimation of the species-specific mutation rates of the DRB1 locus in human and chimpanzee. *Tissue Antigens*, **68**: 427-431, 2006.
- Sakai T. and Hohjoh H. Gene silencing analyses against amyloid precursor protein (APP) gene family by RNA interference. *Cell Biol Int*, **30**: 952-956, 2006.
- Kawashima M., Tamiya G., Oka A., Hohjoh H., Juli T., Ebisawa T., Honda Y., Inoko H., and Tokunaga K. Genome-wide association analysis of human narcolepsy and a new resistance gene. *Am J Hum Genet*, **79**: 252-263, 2006.
- 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*, **2**: 154-160, 2006.
- Sano, Y., Furuta, A., Setsuie, R., Kikuchi, H., Wang, Y.L., Sakurai, M., Kwon, J., Noda, M., Wada, K. Photoreceptor cell apoptosis in the retinal degeneration of Uchl3 deficient mice. *Am. J. Pathol.*, **169**: 132-141, 2006.
- Sun, Y.J., Nishikawa, K., Yuda, H., Wang, Y.L., Osaka, H., Fukazawa, N., Naito, A., Kudo, Y., Wada, K., Aoki, S. Solo/Trio8, a membrane-associated short isoform of Trio, modulates endosome dynamics and neurite elongation. *Mol. Cell. Biol.*, **26**: 6923-6935, 2006.
- Sato, A., Arimura, Y., Manago, Y., Nishikawa, K., Aoki, K., Wada, E., Suzuki, Y., Osaka, H., Setsuie, R., Sakurai, M., Amano, T., Aoki, S., Wada, K. Noda, M. Parkin potentiates ATP-induced currents due to activation of P2X receptors in PC12 cells. *J. Cell. Physiol.*, **209**: 172-182, 2006. 2006 Jul 6; [Epub ahead of print]
- Kabuta, T., Suzuki, Y., Wada, K. Your manuscript entitled "Degradation of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1 proteins by macroautophagy and the proteasome. *J. Biol. Chem.*, **281**: 30524-30533, 2006.
- Setsuie, R., Wang, Y.L., Mochizuki, H., Osaka, H., Hayakawa, H., Ichihara, N., Li, H., Furuta, A., Sano, Y., Sun, Y.J., Kowan, J., Kabuta, T., Yoshimi, K., Aoki, S., Mizuno, Y., Noda, M., Wada, K. Dopaminergic neuronal loss in transgenic mice expressing the Parkinson's disease-associated UCH-L1 I93M mutant. *Neurochem. Int.*, 2006 Sep 6; [Epub ahead of print]
- Nishimoto, M., Furuta, A., Aoki, S., Kudo, Y., Miyakawa, H., Wada, K. PACAP/PAC1 autocrine system promotes proliferation and astrogenesis in neural progenitor cells. *Glia*, **55**: 317-327, 2007.

## 2. 総説

北條浩彦. 二本鎖RNAワールドの開扉/ノ

- ーベル医学生理学賞2006に寄せて。  
医学のあゆみ, 219: 854-855, 2006.
- 北條浩彦. 神経・筋疾患治療へのRNAi応用.  
神経治療学, 23: 31-36, 2006.
- 北條浩彦. マイクロRNAの特徴と病態関連性.  
「エピジェネティクス医科学」実験医学, 24: 179-185, 2006.
- 北條浩彦. RNAi効果の評価法. バイオテクノロジージャーナル, 6: 51-57, 2006.
- 和田圭司. Huntington病のsiRNAによる治療研究.  
医学のあゆみ, 219: 269-273, 2006.
3. 著書
- 北條浩彦. 「RNAi実験なるほどQ&A」(編集: 程久美子, 北條浩彦) 2006.
4. 学会発表  
(国際発表)
- Ohnishi Y., Yoshida M., Tamura Y., Tokunaga K., Kimura H., and Hohjoh H. "Assessment of allele-specific gene silencing by siRNA duplexes and short hairpin RNAs with wild and mutant-type reporter alleles" 56<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, New Orleans, Louisiana, USA., 2006.
- Ohnishi Y., Tokunaga K., and Hohjoh H. "Evaluation assay system for siRNA duplexes conferring allele-specific gene silencing" 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress, Kyoto, JAPAN., 2006.
- Goto A., Wang YL., Setsuie R., Osaka H., Kabuta T., Sakurai M., Sawa A., Ishiura S., Wada K. "The role of gapdh in sciatic nerve of gracile axonal dystrophy mouse" 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress, Kyoto, Japan, 6.20, 2006.
- Sano Y., Furuta A., Setsuie R., Wada K. "Photoreceptor cell apoptosis in the retinal degeneration of Uchl3 deficient mice" 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress, Kyoto, Japan, 6.20, 2006.
- Liu W., Wang Y., Wada K., Murata M., Mochizuki H., Wada K., Kanazawa I. "Rescue of Huntington's disease in model mice by RNAi: shRNA treatments at early development stages yield significantly beneficial effects" 5<sup>th</sup> Forum of European Neuroscience, Vienna, Austria, 7.9, 2006.
- Aoki S., Sun Y., Nishikawa K., Yuda H., Osaka H., Wang Y., Fukazawa N., Wada K. "Solo/trio8, A membrane-associated short isoform of trio modulates endosome dynamics and neurite elongation" The American Society for Cell Biology 46<sup>th</sup> Annual Meeting. San Diego, California, U.S., 12.10, 2006.
- (国内発表)
- 内藤幸男, 望月秀樹, 安田徹, 水野美邦, 古坂道弘, 池田進, 清水裕彦, 安達智宏, 鈴木淳市, 藤原悟, 岡田知子, 西川香里, 青木俊介, 和田圭司: 中性子散乱法によるユビキチン加水分解酵素(UCH-L1)の水溶液構造とパーキンソン病, 第47回日本神経学会総会, 東京, 5.11, 2006.



佐野野衣、古田晶子、節家理恵子、和田圭司：  
UCH-L3 遺伝子欠損マウスにおける網膜  
変性の機序，第47回日本神経病理学会総  
会学術研究会，岡山，5.26，2006.

和田圭司：脳蛋白質の代謝異常と疾患．小  
型・収束型中性子小角錯乱装置  
(MF-SANS)による水溶液中におけるタンパ  
ク質構造解析とその応用，高エネルギー加  
速器研究機構研究会、茨城，6.28，2006.

櫻井省花子，圖子田康，関口正幸，和田圭  
司:Ubiquitin C-terminal hydrolase (UCH)  
-L1 欠損 gad マウスの行動とシナプス可塑  
性の異常 .Alteration of behavior and  
impairment of synaptic plasticity in  
Ubiquitin C-terminal hydrolase (UCH) -  
L1- deficient gad mice. 第29回日本神経  
科学学会大会，京都，7.19，2006.

株田智弘，鈴木泰行，和田圭司:Degradation  
of amyotrophic lateral sclerosis-linked  
mutant SOD1 proteins by macroautophagy.  
日本分子生物学会 2006 フォーラム『分子  
生物学の未来』，愛知，12.8，2006.

H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)  
特になし。

ハンチントン病における発症機序の解明と実践的治療に向けた shRNA 誘導技術の開発

分担研究者 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その発症機序と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。その達成にむけてハンチントン病に焦点を当て、凝集体形成や細胞死の分子機序の解明、モデル動物を用いた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。ハンチントン病の発症分子機序に関しては、UCH-L1 の S18Y 多型の関与が報告されていたが、本研究によってUCH-L1 は huntingtin タンパク質の凝集や分解、huntingtin 遺伝子による細胞死には直接関与していない可能性が示唆された。また、ハンチントン病原因遺伝子に対して開発した siRNA をもとに shRNA 発現ベクターを構築し、その投与によって疾患モデル動物の病態の進行を siRNA よりもより強く抑制することを見いだした。

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の発症メカニズムの解明と根本的治療法を開発することをめざす。現在知られている神経変性疾患の病態形成には、神経細胞死が大きく関与しているが、最近、神経細胞死だけではなく神経細胞機能不全という状態が発症を左右している事もわかってきた。神経細胞機能不全は可逆的な状態にあると考えられており、またその原因として病因タンパク質の不溶化・凝集が想定されている。したがって、神経変性疾患の治療には、神経細胞死に対する再生医療に加え、原因遺伝子産物の除去、特異的発現抑制による神経機能不全の修復が根本的治療の道を開くと考えられる。

神経変性疾患の一つであるハンチントン病は、huntingtin 遺伝子のエクソン1でCAG反復

が異常伸長する。その結果、遺伝子産物である huntingtin タンパク質は、異常に長いポリグルタミン鎖(PolyQ)を含み、選択的に大脳基底核の線条体ニューロンの細胞死を誘導する。ハンチントン病はこれまで、細胞死の機序と有効な治療方法がみつかっていない。我々はこれまで、脱ユビキチン化酵素 UCH-L1 の研究も行ってきたが、最近、若年発症のハンチントン病患者においてUCH-L1 の S18Y 多型とハンチントン病発症との関連性が報告された。そこで、本研究では huntingtin 遺伝子誘導による細胞死とUCH-L1 S18Y 変異との関連を調べることにした。また、我々は神経細胞の変性防止に関して、RNAiを用いた変異遺伝子の発現抑制技術を細胞レベルやハンチントン病モデルマウスで開発し、shRNA 発現ベクターの有効性を示してきた。本研究ではこれらの成果を

もとに、実践的な治療に近づけるよう、神経細胞の変性防止を小型モデル動物で確立することを目標とした。具体的には、ハンチントン病における神経細胞死のメカニズムの解明をめざし、また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 の手法によって標的分子特異的な治療の確立に着手した。

## B. 研究方法

### (1)ハンチントン病における細胞死のメカニズム解明

huntingtin 遺伝子 (Q22-Q151)、UCH-L1 (WT,S18Y)、それぞれの発現プラスミドベクターを培養細胞へトランスフェクションした。その後、Western blot 解析でタンパク量を測定し、ATP assay、LTP assay を行い、細胞死検定を行った。

### (2)ハンチントン病の治療法開発

huntingtin 遺伝子(Q22-Q151)と shRNA 発現プラスミドベクターをトランスフェクション試薬である Lipofectamin 2000 と混合し、培養細胞にトランスフェクションした。その後、Western blot 解析でタンパク量を測定した。

生後2日のハンチントン病モデルマウス (B6CBA-TgN(Hd exon1)<sup>62Gpb/J</sup>)に shRNA 発現プラスミドベクター200 ng を含む ExGen500 溶液5マイクロリットルを注入し、一定期間の後、行動学的評価と寿命の検討を行った。

### (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)ハンチントン病における細胞死のメカニズム解明

若年発症をおこすハンチントン病患者では UCH-L1 の S18Y 多型の保有者が多いことから、我々は huntingtin 遺伝子による細胞死と S18Y の関連性を調べた。S18Y 存在下では、Wild-Type (WT)に比べ huntingtin タンパク質の凝集体形成に変化は見られず、huntingtin タンパク質量の劇的な変化も観察されなかった。また、ATP assay、LTP assay により、huntingtin の polyQ の長さ依存的に細胞死が引き起こされることがわかったが、WT、S18Y による差は観察されなかった。

### (2)ハンチントン病の治療法開発

ハンチントン病原因遺伝子である huntingtin に特異的な siRNA の直接投与が、疾患モデル動物の延命に効果があることが報告されている。本研究では、その siRNA を元に shRNA 発現ベクターを構築し、培養細胞や出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。培養細胞に shRNA 発現ベクターを導入した 48 時間後では、対照群に比べ正常 huntingtin タンパク質量は変化せず、異常 huntingtin タンパク質量が減少した。一方、導入120時間後では、正常 huntingtin タンパク質、異常 huntingtin タンパク質が共に減少した細胞群が観察された。また、shRNA を脳内に投与された疾患モデルマウスは、対照群に比べ、発症時期の遅延、緩やかな体重減少、運動機能の回復、生存期間の延長が観察された。

## 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では、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。数多くの孤発例についてはその病因の特定はいまだなされていないが、家族性疾患の成果を

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の開発も展望できると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唆されており、conformation 病の概念の確立とともにアポトーシスに加え、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、神経変性疾患の分子機序を明らかにし、よりヒトに近いモデル動物を用いて先端的かつ臨床応用が十分可能な治療方法を開発することである。その達成にむけてハンチントン病に焦点を当て、その発症機序を培養細胞で調べ、また、有効な治療法を培養細胞やハンチントン病モデルマウス (B6CBA-TgN (Hd exon1) 62Gpb/J) を用いて検討を行った。

神経変性疾患に認められる種々のユビキチン陽性封入体に UCH-L1 が存在することから、UCH-L1 は様々な神経変性疾患との関連が示唆されている。また、S18Y 多型がハンチントン病やアルツハイマー病の感受性因子であるという報告もある。今回の我々の研究では、WT、S18Y 存在下で異常型 huntingtin タンパク質の凝集体形成や huntingtin タンパク質量については変化が観察されなかった。また、polyQ 依存的な細胞死においても WT、S18Y 存在下で差異が見られなかった。UCH-L1 は、huntingtin タンパク質の凝集や分解、huntingtin 遺伝子による細胞死に直接的に関与していない可能性が考えられる。UCH-L1 は、神経発生、アポトーシス、神経伝達などの制御に関与しており、これらは UCH-L1 の多機能性、すなわち脱ユビキチン化酵素、ユビキチンリガーゼ、ユビキチンキャリアタンパク質としての能性が密接に関与している。今後は、UCH-L1 の多機能性に基づく解析の手法等に改良を加えていく予定である。

ハンチントン病の治療法開発については、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 を開発できたのに続き、当該 siRNA を元に shRNA 発現ベクターを構築し、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的治療に RNAi 法は極めて有望であると考えられる。しかし、一部の細胞群では、shRNA 投与により正常型 huntingtin タンパク質量が減少することが観察された。正常 huntingtin タンパク質は正常発達に必須で、成長後の正常脳では大脳皮質一線条体系に含まれる脳由来神経栄養因子 (BDNF) の軸索輸送に関わっていると考えられている。正常 huntingtin 遺伝子を抑制した場合の副作用や、それがどの程度正常 huntingtin 遺伝子を抑制した場合に起きるかなどはまだ不明のままである。今後、RNAi 法を実践的な治療法に近づける為には、正常 huntingtin 遺伝子抑制時の基礎的データの収集は重要であり、さらに、よりヒト病態に近い臨床像を呈することが予想される中型動物や小型霊長類で将来疾患モデルを作出する基盤を築きあげ、先端的治療法の開発に向けて応用することをめざすことが必要であると考えられる。これらの研究は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。

## E. 結論

UCH-L1 は huntingtin タンパク質の凝集や分解、huntingtin 遺伝子による細胞死には直接関与していない可能性が示唆された。ハンチントン病原因遺伝子に対する shRNA 発現ベクターを構築し、疾患モデル動物個体においてその効果を確認した。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Sano, Y., Furuta, A., Setsuie, R., Kikuchi, H., Wang, Y.L., Sakurai, M., Kwon, J., Noda, M., Wada, K: Photoreceptor cell apoptosis in the retinal degeneration of Uchl3 deficient mice. *Am. J. Pathol.*, **169**, 132-141, 2006.

Sun, Y.J., Nishikawa, K., Yuda, H., Wang, Y.L., Osaka, H., Fukazawa, N., Naito, A., Kudo, Y., Wada, K., Aoki, S: Solo/Trio8, a membrane-associated short isoform of Trio, modulates endosome dynamics and neurite elongation. *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 6923-6935, 2006.

Sato, A., Arimura, Y., Manago, Y., Nishikawa, K., Aoki, K., Wada, E., Suzuki, Y., Osaka, H., Setsuie, R., Sakurai, M., Amano, T., Aoki, S., Wada, K. Noda, M: Parkin potentiates ATP-induced currents due to activation of P2X receptors in PC12 cells. *J. Cell. Physiol.*, **209**, 172-182, 2006.

Kabuta, T., Suzuki, Y, Wada, K: Your manuscript entitled "Degradation of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1 proteins by macroautophagy and the proteasome. *J. Biol. Chem.*, **281**, 30524-30533, 2006.

Setsuie, R., Wang, Y.L., Mochizuki, H., Osaka, H., Hayakawa, H., Ichihara, N., Li, H., Furuta, A., Sano, Y., Sun, Y.J., Kowan, J., Kabuta, T., Yoshimi, K., Aoki, S., Mizuno, Y., Noda, M., Wada, K: Dopaminergic neuronal loss in transgenic mice expressing the Parkinson's disease-associated UCH-L1 I93M mutant. *Neurochem. Int.*, 2006 Sep 6; [Epub ahead of print].

Nishimoto, M., Furuta, A., Aoki, S., Kudo, Y.,

Miyakawa, H., Wada, K: PACAP/PAC1 autocrine system promotes proliferation and astrogenesis in neural progenitor cells. *Glia*, **55**, 317-327, 2007.

### 2. 総説

和田圭司. Huntington 病の siRNA による治療研究. *医学のあゆみ*, **219**: 269-273, 2006.

### 3. 学会発表

(特別講演・シンポジウム)

和田圭司: 神経変性疾患の根本的治療法の開発をめざして. 国立精神・神経センター神経研究所における研究活動. 1 平成18年度政策創薬総合研究推進事業. 第27回創薬等ヒューマンサイエンス基礎研究講習会, 東京, 6.13, 2006.

(国際学会)

Goto A, Wang YL, Setsuie R, Osaka H, Kabuta T, Sakurai M, Sawa A, Ishiura S, Wada K: The role of gapdh in sciatic nerve of gracile axonal dystrophy mouse. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan, 6.20, 2006.

Sano Y, Furuta A, Setsuie R, Wada K: Photoreceptor cell apoptosis in the retinal degeneration of Uchl3 deficient mice. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan, 6.20, 2006.

Liu W, Wang Y, Wada K, Murata M, Mochizuki H, Wada K, Kanazawa I: Rescue of Huntington's disease in model mice by RNAi: shRNA treatments at early development

stages yield significantly beneficial effects. 5<sup>th</sup> Forum of European Neuroscience, Vienna, Austria, 7.9, 2006.

Aoki S, Sun Y, Nishikawa K, Yuda H, Osaka H, Wang Y, Fukazawa N, Wada K: Solo/trio8, A membrane-associated short isoform of trio modulates endosome dynamics and neurite elongation. The American Society for Cell Biology 46<sup>th</sup> Annual Meeting. San Diego, California, U.S, 12.10, 2006.

(国内学会)

内藤幸男, 望月秀樹, 安田徹, 水野美邦, 古坂道弘, 池田進, 清水裕彦, 安達智宏, 鈴木淳市, 藤原悟, 岡田知子, 西川香里, 青木俊介, 和田圭司: 中性子散乱法によるユビキチン加水分解酵素(UCH-L1)の水溶液構造とパーキンソン病, 第47回日本神経学会総会, 東京, 5.11, 2006.

佐野野衣, 古田晶子, 節家理恵子, 和田圭司: UCH-L3 遺伝子欠損マウスにおける網膜変性の機序, 第47回日本神経病理学会総会学術研究会, 岡山, 5.26, 2006.

和田圭司: 脳蛋白質の代謝異常と疾患. 小型・収束型中性子小角錯乱装置(MF-SANS)による水溶液中におけるタンパク質構造解析とその応用, 高エネルギー加速器研究機構研究会, 茨城, 6.28, 2006.

櫻井省花子, 圖子田康, 関口正幸, 和田圭司: Ubiquitin C-terminal hydrolase (UCH) -L1 欠損 gad マウスの行動とシナプス可塑性の異常. Alteration of behavior and impairment of synaptic plasticity in Ubiquitin C-terminal hydrolase (UCH) - L1- deficient gad mice. 第29回日本神経科学学会大会, 京都, 7.19, 2006.

株田智弘, 鈴木泰行, 和田圭司: Degradation of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant

SOD1 proteins by macroautophagy. 日本分子生物学会 2006 フォーラム『分子生物学の未来』, 愛知, 12.8, 2006.

H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 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
北條浩彦	巻頭ガイド 第2章 第6章 用語解説 その他	程久美子 北條浩彦	RNAi実験 なるほどQ&A	羊土社	東京	2006	60-68 115-131

## 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
Ohnishi Y., Tokunaga K., Kaneko K., and <u>Hohjoh H.</u>	Assessment of allele-specific gene silencing by RNA interference with mutant and wild-type reporter alleles.	<i>J. RNAi Gene silencing</i>	2	154-160.	2006
Sakai T. and <u>Hohjoh H.</u>	Gene silencing analyses against amyloid precursor protein (APP) gene family by RNA interference.	<i>Cell Biol Int</i>	30	952-956.	2006
Ohashi J., Naka I., Toyoda A., Takasu M., Tokunaga K., Ishida T., Sakaki Y., and <u>Hohjoh H.</u>	Estimation of the species-specific mutation rates of the DRB1 locus in human and chimpanzee.	<i>Tissue Antigens</i>	68	427-431.	2006
Kawashima M., Tamiya G., Oka A., <u>Hohjoh H.</u> , Juli T., Ebisawa T., Honda Y., Inoko H., and Tokunaga K.	Genome-wide association analysis of human narcolepsy and a new resistance gene.	<i>Am J Hum Genet</i>	79	252-263.	2006
<u>Hohjoh H.</u> and Fukushima T.	Expression profile analysis of microRNA (miRNA) in mouse central nervous system using a new miRNA detection system that examines hybridization signals at every step of washing.	<i>Gene</i>		In press	2006
Tamura Y., Kunugi H., Ohashi J. and <u>Hohjoh H.</u>	Epigenetic aberration of the human REELIN gene in psychiatric disorders.	<i>Mol Psychiatry</i>		In press	2007
Sano, Y., Furuta, A., Setsuie, R., Kikuchi, H., Wang, Y.L., Sakurai, M., Kwon, J., Noda, M., <u>Wada, K.</u>	Photoreceptor cell apoptosis in the retinal degeneration of Uchl3 deficient mice.	<i>Am. J. Pathol.</i>	169	132-141.	2006

Sun, Y.J., Nishikawa, K., Yuda, H., Wang, Y.L., Osaka, H., Fukazawa, N., Naito, A., Kudo, Y., <u>Wada, K.</u> , Aoki, S.	Solo/Trio8, a membrane-associated short isoform of Trio, modulates endosome dynamics and neurite elongation.	<i>Mol. Cell. Biol.</i>	26	6923-6935.	2006
Sato, A., Arimura, Y., Manago, Y., Nishikawa, K., Aoki, K., Wada, E., Suzuki, Y., Osaka, H., Setsuie, R., Sakurai, M., Amano, T., Aoki, S., <u>Wada, K.</u> , Noda, M.	Parkin potentiates ATP-induced currents due to activation of P2X receptors in PC12 cells.	<i>J. Cell. Physiol.</i>	209	172-182.	2006
Kabuta, T., Suzuki, Y., <u>Wada, K.</u>	Your manuscript entitled "Degradation of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1 proteins by macroautophagy and the proteasome.	<i>J. Biol. Chem.</i>	281	30524-30533.	2006
Setsuie, R., Wang, Y.L., Mochizuki, H., Osaka, H., Hayakawa, H., Ichihara, N., Li, H., Furuta, A., Sano, Y., Sun, Y.J., Kowan, J., Kabuta, T., Yoshimi, K., Aoki, S., Mizuno, Y., Noda, M., <u>Wada, K.</u>	Dopaminergic neuronal loss in transgenic mice expressing the Parkinson's disease-associated UCH-L1 I93M mutant.	<i>Neurochem. Int.</i>		Epub ahead of print	2006
Nishimoto, M., Furuta, A., Aoki, S., Kudo, Y., Miyakawa, H., <u>Wada, K.</u>	PACAP/PAC1 autocrine system promotes proliferation and astrogenesis in neural progenitor cells.	<i>Glia</i>	55	317-327	2007
北條 浩彦	二本鎖RNAワールドの開扉/ノーベル医学生理学賞2006に寄せて。	医学のあゆみ	219	854-855.	2006
北條 浩彦	神経・筋疾患治療へのRNAi応用。	神経治療学	23	31-36.	2006
北條 浩彦	マイクロRNAの特徴と病態関連性。「エピジェネティクス医科学」	実験医学	24	179-185.	2006
和田 圭司	Huntington病のsiRNAによる治療研究	医学のあゆみ	219	269-273	2006



## 研究成果の刊行物・印刷

## NEW METHODS AND TECHNOLOGIES

## Assessment of allele-specific gene silencing by RNA interference with mutant and wild-type reporter alleles

Yusuke Ohnishi<sup>1,2</sup>, Katsushi Tokunaga<sup>2</sup>, Kiyotoshi Kaneko<sup>1</sup> and Hirohiko Hohjoh<sup>1,\*</sup><sup>1</sup>National Institute of Neuroscience, NCNP, 4-1-1 Ogawahigashi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan; <sup>2</sup>Department of Human Genetics, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

\*Correspondence to: Hirohiko Hohjoh, Email: hohjohh@ncnp.go.jp, Tel: +81 42 342 2711, ext 5951, Fax: +81 42 346 1755

*Journal of RNAi and Gene Silencing* (2006), 2(1), 154-160

© Copyright Yusuke Ohnishi et al

(Received 06 February 2006; Accepted 13 February 2006; Available online 28 February 2006; Published 28 February 2006)

## ABSTRACT

Allele-specific gene silencing by RNA interference (RNAi) is therapeutically useful for specifically suppressing the expression of alleles associated with disease. To realize such allele-specific RNAi (ASP-RNAi), the design and assessment of small interfering RNA (siRNA) duplexes conferring ASP-RNAi is vital, but is also difficult. Here, we show ASP-RNAi against the Swedish- and London-type amyloid precursor protein (*APP*) variants related to familial Alzheimer's disease using two reporter alleles encoding the *Photinus* and *Renilla* luciferase genes and carrying mutant and wild-type allelic sequences in their 3'-untranslated regions. We examined the effects of siRNA duplexes against the mutant alleles in allele-specific gene silencing and off-target silencing against the wild-type allele under heterozygous conditions, which were generated by cotransfecting the reporter alleles and siRNA duplexes into cultured human cells. Consistently, the siRNA duplexes determined to confer ASP-RNAi also inhibited the expression of the *bona fide* mutant *APP* and the production of either amyloid  $\beta$  40- or 42-peptide in Cos-7 cells expressing both the full-length Swedish- and wild-type *APP* alleles. The present data suggest that the system with reporter alleles may permit the preclinical assessment of siRNA duplexes conferring ASP-RNAi, and thus contribute to the design and selection of the most suitable of such siRNA duplexes.

**KEYWORDS:** RNAi, allele-specific gene silencing, amyloid precursor protein, Swedish mutation, London mutation, reporter allele

## INTRODUCTION

RNA interference (RNAi) is a powerful tool for suppressing the expression of a gene of interest (Dykxhoorn et al, 2003; Meister and Tuschl, 2004; Mello and Conte, 2004). In mammals, RNAi can be induced by direct introduction of synthetic small interfering RNA (siRNA) duplexes into cells or generation of siRNA duplexes using short-hairpin RNA expression vectors and its application is expanding to various fields of science; therapeutic use of RNAi in medical science and pharmacogenesis is particularly promising (Caplen, 2004; Dykxhoorn et al, 2003; Hannon and Rossi, 2004; Karagiannis and El-Osta, 2005; Wood et al, 2003). Allele-specific gene silencing by RNAi (allele-specific RNAi: ASP-RNAi) is an advanced application of

RNAi techniques, by which the expression of an allele of interest can be inhibited (Victor et al, 2002). Accordingly, ASP-RNAi is thought to be therapeutically useful, i.e., it can specifically suppress the expression of alleles causing disease without inhibiting the expression of corresponding wild-type alleles. To realize and control such ASP-RNAi, the following issues must be addressed: selection of competent siRNA duplexes that strongly induce ASP-RNAi; and qualitative and quantitative evaluation of allele-specific gene silencing.

In this article, we describe an easy assay system for assessment of ASP-RNAi with mutant and wild-type reporter alleles encoding the *Photinus* and *Renilla luciferase* genes. Using the amyloid precursor protein

(*APP*) variants (the Swedish- and London-type variants) related to familial Alzheimer's disease (Goate et al, 1991; Mullan et al, 1992) as model mutant alleles, we determined the effects of siRNA duplexes against the mutant *APP* on allele-specific silencing as well as off-target silencing against the wild-type allele. The siRNA duplexes having the potential to specifically suppress the expression of the mutant reporter allele consistently inhibited the expression of the *bona fide* mutant *APP* as well as amyloid  $\beta$  40- and 42-peptides in Cos-7 cells expressing both the full-length Swedish- and wild-type *APP* alleles. These observations suggest that the present system could permit the selection of siRNA duplexes having the potential to confer ASP-RNAi.

## MATERIALS AND METHODS

### Preparation of oligonucleotides

DNA and RNA oligonucleotides were obtained from INVITROGEN and TAKARA, respectively. For preparation of duplexes, sense- and antisense-stranded oligonucleotides (20  $\mu$ M each) were mixed and annealed as described previously (Hohjoh, 2002). The sequences of synthesized oligonucleotides are shown in Tables 1 and 2. Non-silencing siRNA duplex (siControl; Qiagen) was used as a negative control.

### Cell culture

HeLa, T98G and Cos-7 cells were grown at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium (Wako) supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma), 100 U/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin (Sigma) in 5% CO<sub>2</sub>-humidified chamber. T98G cells (Registry No. IFO50295) were obtained from the Health Science Research Resources Bank.

### Construction of reporter and expression plasmids

In order to construct plasmids carrying reporter alleles, the phRL-TK (Promega) and pGL3-TK (Ohnishi et al., 2005) plasmids encoding the *Renilla* and *Photinus* luciferase genes, respectively, both of which were driven by the same herpes simplex virus thymidine kinase (TK) promoter, were digested with Xba I and Not I, and were

subjected to ligation with synthetic oligonucleotide duplexes corresponding to the Swedish-, London- and wild-type *APP* alleles (sequences of the oligonucleotides used are indicated in Table 1). The resultant plasmids carry allelic *APP* sequences in the 3'-untranslated regions (UTRs) of the luciferase genes (Figure 1A). Expression plasmids, pAPP695<sub>WT</sub> and pAPP695<sub>SWE</sub> encoding full-length cDNAs of the wild- and Swedish-type *APP* alleles, respectively, were kindly provided by Dr Tanahashi (Tanahashi and Tabira, 2001).

### Transfection and reporter assay

The day before transfection, cells were trypsinized, diluted with fresh medium without antibiotics, and seeded into 24-well culture plates (approximately  $0.5 \times 10^5$  cells/well). Cotransfection of synthetic siRNA duplexes with reporter plasmids was carried out using Lipofectamine 2000 transfection reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions, and to each well, 0.24  $\mu$ g (40 nM) of siRNA duplexes, 0.2  $\mu$ g of pGL3-TK-backbone plasmid, 0.05  $\mu$ g of phRL-TK-backbone plasmid and 0.1  $\mu$ g of pSV- $\beta$ -Galactosidase control vector (Promega) were applied. Twenty-four hours after transfection, cell lysate was prepared and expression levels of luciferase and  $\beta$ -Galactosidase were examined by the Dual-Luciferase reporter assay system (Promega) and Beta-Glo assay system (Promega), respectively, according to the manufacturer's instructions. In the case of transfection of siRNA duplexes and expression plasmids (pAPP695<sub>WT</sub> and pAPP695<sub>SWE</sub>) into Cos-7 cells, 0.4  $\mu$ g of each plasmid and 0.24  $\mu$ g of siRNA duplexes were applied. Forty-eight hours after transfection, culture media was collected and cell lysate was prepared.

### Western blotting and ELISA

Culture media and cell lysate prepared from transfected Cos-7 cells were examined by western blotting as described previously (Lesne et al., 2003). Equal amounts of proteins were separated by SDS-PAGE and electrophoretically blotted onto PVDF membranes (Millipore). Membranes were blocked for 1 h in blocking solution (5 % (v/v) fat-free milk and 0.05 % (v/v) Tween-20 in PBS) and

Table 1. Synthetic DNA oligonucleotides

Name	Sequence (5'—————3')
ssAPPwt(Sw)	CTAGCATGCAGGAGATCTCTGAAGTGAAGATGGATGCAGAAATCCGACA
asAPPwt(Sw)	GGCCTGTCGGAATTCTGCATCCATCTTCACTTCAGAGATCTCCTGCATG
ssAPP(K670N-M671L)	CTAGCATGCAGGAGATCTCTGAAGTGAATCTGGATGCAGAAATCCGACA
asAPP(K670N-M671L)	GGCCTGTCGGAATTCTGCATCCAGATTCACTTCAGAGATCTCCTGCATG
ssAPPwt(Lo)	CTAGCATGCTGTTCATAGCGACAGTGTTCGTCATCACCTTGGTGATGCTGA
asAPPwt(Lo)	GGCCTCAGCATACCAAGGTGATGACGATCACTGTCGCTATGACAGCATG
ssAPP(V717I)	CTAGCATGCTGTTCATAGCGACAGTGTTCATCACCTTGGTGATGCTGA
asAPP(V717I)	GGCCTCAGCATACCAAGGTGATGATGATCACTGTCGCTATGACAGCATG
ssAPP(V717F)	CTAGCATGCTGTTCATAGCGACAGTGTTCATCACCTTGGTGATGCTGA
asAPP(V717F)	GGCCTCAGCATACCAAGGTGATGAAGATCACTGTCGCTATGACAGCATG
ssAPP(V717G)	CTAGCATGCTGTTCATAGCGACAGTGTTCGTCATCACCTTGGTGATGCTGA
asAPP(V717G)	GGCCTCAGCATACCAAGGTGATGCCGATCACTGTCGCTATGACAGCATG

**Table 2.** Synthetic siRNAs used in this study. Sense- and antisense-stranded siRNA elements are indicated by ‘-ss’ and ‘-as’, respectively.

siRNAs against the Swedish <i>APP</i> mutant	
Name	Sequence (5'-----3')
si(T7/C8)-ss	AGUGAAUCUGGAUGCAGAAUUU
si(T7/C8)-as	AUUCUGCAUCCAGAUUCACUUU
si(T8/C9)-ss	AAGUGAAUCUGGAUGCAGAAUU
si(T8/C9)-as	UUCUGCAUCCAGAUUCACUUUU
si(T9/C10)-ss	GAAGUGAAUCUGGAUGCAGAAU
si(T9/C10)-as	UCUGCAUCCAGAUUCACUUCUU
si(T10/C11)-ss	UGAAGUGAAUCUGGAUGCAGUU
si(T10/C11)-as	CUGCAUCCAGAUUCACUUCAAU
si(T11/C12)-ss	CUGAAGUGAAUCUGGAUGCAGUU
si(T11/C12)-as	UGCAUCCAGAUUCACUUCAGUU
si(T12/C13)-ss	UCUGAAGUGAAUCUGGAUGC UU
si(T12/C13)-as	GCAUCCAGAUUCACUUCAGAAU
siRNAs against the London <i>APP</i> mutants	
Name	Sequence (5'-----3')
si(A8)-ss	AGUGAUCAUCAUACCCUUGUU
si(A8)-as	CAAGGUGAUGAUGAUCACUUU
si(A9)-ss	CAGUGAUCAUCAUACCCUUUU
si(A9)-as	AAGGUGAUGAUGAUCACUGUU
si(A10)-ss	ACAGUGAUCAUCAUACCCUUU
si(A10)-as	AGGUGAUGAUGAUCACUGUUU
si(A11)-ss	GACAGUGAUCAUCAUACCCUU
si(A11)-as	GGUGAUGAUGAUCACUGUCUU
si(A12)-ss	CGACAGUGAUCAUCAUCACUU
si(A12)-as	GUGAUGAUGAUCACUGUCGUU
si(T8)-ss	AGUGAUCUUCAUACCCUUGUU
si(T8)-as	CAAGGUGAUGAAGAUACUUU
si(T9)-ss	CAGUGAUCUUCAUACCCUUUU
si(T9)-as	AAGGUGAUGAAGAUACUGUU
si(T10)-ss	ACAGUGAUCUUCAUACCCUUU
si(T10)-as	AGGUGAUGAAGAUACUGUUU
si(T11)-ss	GACAGUGAUCUUCAUACCCUU
si(T11)-as	GGUGAUGAAGAUACUGUCUU
si(T12)-ss	CGACAGUGAUCUUCAUCACUU
si(T12)-as	GUGAUGAAGAUACACUGUCGUU
si(G8)-ss	GUGAUCGGCAUACCCUUGGUU
si(G8)-as	CCAAGGUGAUGCCGAUCACUU
si(G9)-ss	AGUGAUCGGCAUACCCUUGUU
si(G9)-as	CAAGGUGAUGCCGAUCACUUU
si(G10)-ss	CAGUGAUCGGCAUACCCUUUU
si(G10)-as	AAGGUGAUGCCGAUCACUGUU
si(G11)-ss	ACAGUGAUCGGCAUACCCUUU
si(G11)-as	AGGUGAUGCCGAUCACUGUUU
si(G12)-ss	GACAGUGAUCGGCAUACCCUU
si(G12)-as	GGUGAUGCCGAUCACUGUCUU

were incubated with anti-APP antibody 22C11 (Chemicon) or anti- $\alpha$ -tubulin antibody DM1A (Sigma) followed by washing in PBS and further incubation with horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Antigen-antibody complexes were visualized using ECL chemiluminescent reagent (Amersham). Levels of A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 production in culture media were examined by human/rat  $\beta$  amyloid 40 and 42 ELISA kits (Wako) according to the manufacturer's instructions.

### RT-PCR

Total RNA extraction, including treatment with DNase I (Ambion) twice followed by reverse transcription, were carried out as described previously (Sago et al., 2004). The resultant cDNAs were examined by real-time (RT)-PCR using the ABI PRISM 7300 sequence detection system (Applied Biosystems) with a SYBER green PCR master mix (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. PCR primers used were as follows:

For detection of the *Renilla luciferase* transcript:

renilla-F; 5'-GTTCTTTTCCAACGCTATTG-3'  
renilla-R; 5'-GAAGCTCTTGATGTACTTAC-3'

For detection of the *Photinus luciferase* transcript:

photinus-F; 5'-TTTGATATGTGGATTTCGAG-3'  
photinus-R; 5'-ATCGTATTTGTCAATCAGAG-3'

### RESULTS

#### Assessment of siRNAs in heterozygous model system

In this study, the Swedish- and London-type mutants of the *APP* gene, which are involved in familial Alzheimer's disease, were used as model mutant alleles. The Swedish- and London-type *APP* mutants carry double and single nucleotide substitutions, respectively, which are followed by amino acid substitutions (K670N-M671L in the Swedish *APP*; V717L, V717F or V717G in the London *APP*) (Goate et al, 1991; Mullan et al, 1992). The resultant amino acid sequences in the Swedish and London-type APPs are preferably digested by  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretase, respectively, resulting in accumulation of A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 peptides, which are the key factors of Alzheimer's disease (Cai et al, 1993; Citron et al, 1992; Mattson, 2004; Suzuki et al, 1994).

Mutant and wild-type reporter alleles were constructed as described in Materials and Methods. The resultant reporter alleles (Figure 1A), synthetic siRNA duplex against the mutant allele and the  $\beta$ -galactosidase gene (control) were cotransfected into human cells. Note that the transfected cells are artificially heterozygous with the mutant and wild-type *APP* reporter alleles; thus, the effects of test siRNA duplexes on suppression of both the mutant and wild-type alleles can be simultaneously examined.

#### ASP-RNAi against the Swedish-type APP allele

When the *Renilla* and *Photinus luciferase* genes were regarded as the Swedish and wild-type reporter alleles, respectively, the effects of the si(T7/C8) - si(T12/C13) duplexes against the Swedish mutant on allele-specific gene silencing were examined in HeLa cells. The results