

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19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 北條 浩彦

平成20(2008)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 \_\_\_\_\_ 9

ハンチントン病における発症機序の解  
明と治療に向けたターゲットタンパク質と  
しての UCH-L1 の機能解析に関する  
研究  
和田 圭司

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表 \_\_\_\_\_ 14

## IV. 研究成果の刊行物・印刷 \_\_\_\_\_ 16

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、難治性の神経変性疾患であるハンチントン病の根本的治療を目指し、RNA interference (RNAi)法を基盤とした治療法の開発を行なう。ハンチントン病は、病因タンパク質である異常型ハンチンチンの不溶化・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な発現抑制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 RNAi を利用し、病因(変異型)ハンチンチン遺伝子の発現抑制による根本的治療の実現を目指す。昨年度までの成果により、治療戦略としての RNAi の有効性が強く示唆された。しかしながら、この有効な技術を実際の治療に応用するためにはまだまだ多くの課題を解決しなければならない。とりわけ変異型ハンチンチン遺伝子を特異的に抑制する新しい RNAi 誘導技術の確立とヒトに近いモデル動物を用いた研究開発が急務であると考えられる。そこで我々は、対立遺伝子特異的 RNAi 誘導法の確立と霊長類実験動物であるコモン・マーモセットを用いた研究開発を本年度の中心課題として取組んだ。その成果として、1) 対立遺伝子特異的 RNAi 誘導の評価システム（特許出願中）を用いた解析から、ハンチンチン対立遺伝子の配列を識別する siRNA (RNAi を誘導する小さな RNA 二量体) を設計することに成功し、2) コモン・マーモセットハンチンチン遺伝子の全長を含む転写産物のクローニングにも成功した。また、ハンチントン病の発症分子機序に関する研究から、脱ユビキチン化酵素である UCH-L1 がハンチンチンタンパク質の発現量を変化させる可能性も示唆した。

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

いる RNA interference (RNAi)法を駆使し、その根本的治療法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、病因タンパク質である異常型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、病因タンパク質の除去または特異的な遺伝子発現抑制、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であるハンチンチン遺伝子と

#### A. 研究の目的

本研究は、いま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

その病因変異が明らかにされている。したがって、変異型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 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、その効果を検討してきた。その結果、RNAi の治療方法としての有効性が強く示唆され、そして実際の治療に向けての今後の課題も提示された。それらの課題は、1) 変異型ハンチンチン遺伝子特異的な RNAi 誘導の必要性と、2) ヒトに近いモデル動物を使った治療法の研究開発の必要性である。前者 1) は、今までに設計された siRNA が、正常型と変異型のハンチンチン遺伝子の両方をターゲットにしてしまうためであり、安全な治療のためには変異型だけを特異的にノックダウンする siRNA の設計そして RNAi 誘導の確立が必要である。後者 2) は、治療の安全性をより正確に評価するためには、マウス・ラットを使った検討よりも、よりヒトに近い霊長類実験動物を用いた研究開発が必要である。これらの課題に対して、本年度は、対立遺伝子特異的 RNAi 誘導の評価システムを使ってハンチンチン対立遺伝子を特異的に識別する siRNA の設計と評価を試みた。そして、霊長類実験動物であるコモン・マーモセットを用いた研究開発をスタートさせた。また、ハンチントン病の分子発症機序に関連して、脱ユビキチン化酵素である UCH-L1 の働きに着目し、異常型ハンチンチンの凝集体形成と UCH-L1 の作用についても検討した。

## B. 研究方法

### 1) 対立遺伝子特異的 RNAi 誘導のためのター

ゲット候補となるハンチンチン遺伝子コーディング領域内の一塩基多型 (SNP) を選択し、その SNP 部位を含む配列をオリゴ DNA 合成した (それぞれの対立遺伝子 (アリル) について合成した)。合成オリゴ DNA は、レポーター遺伝子である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の 3'非翻訳領域 (3'UTR) に挿入し、レポーター対立遺伝子を構築した。

2) SNP 部位を含む領域の配列を基に、SNP 部位を含む複数の siRNA 二量体を設計し、化学合成した。

3) 上記 1) と 2) で構築した発現プラスミドと siRNA 二量体、そしてコントロールの  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を含む発現ベクターをヒト 293 細胞に共トランスフェクションした。

4) 24 時間後、細胞抽出液を調整し、発現したホタル、ウミシイタケルシフェラーゼと  $\beta$ ガラクトシダーゼの活性を測定した。その結果を基に、テストした siRNA 二量体のターゲット対立遺伝子配列に対する抑制効果と、もう片方の対立遺伝子配列に対する影響を解析した。設計した全ての siRNA 二量体について同様の解析を行い、対立遺伝子間で最も大きな差を示す siRNA 二量体を決定した。

5) 様々なヒト培養細胞を用いてターゲット候補の SNP 部位について、TaqMan プローブを使ったアリルタイピングを行なった。

6) コモン・マーモセットのハンチンチン遺伝子転写産物をクローニングするために、ヒトとマウスのハンチンチン遺伝子を比較して、その中で比較的よく保存された領域を絞り込み PCR 用のオリゴ DNA プライマーを設計した。

7) コモン・マーモセットの脳組織から全 RNA を抽出し、オリゴ (dT) プライマーと逆転

写酵素を用いて cDNA を合成した。次に cDNA を鋳型に、上記 6) で設計した PCR プライマーを用いて PCR 反応を行い、得られた PCR 産物をプラスミドにクローニングした。クローン化された PCR 産物は塩基配列決定を行ない、ハンチンチン遺伝子由来であることを確認した。

- 8) 上記 6)、7) と同様の方法で、コモン・マーモセットハンチンチン遺伝子の全コーディング領域を含むクローニングを行なった (現在解析継続中)。
- 9) 上記 7) の解析から単離された 5'末端領域を含むコモン・マーモセットハンチンチン遺伝子の一部と GFP 遺伝子とを融合したレポーター遺伝子を構築した。
- 10) 上記 9) で用いたハンチンチン遺伝子配列を基に siRNA 二量体を設計し、化学合成した。
- 11) 上記 9) で構築した GFP 融合レポーター遺伝子と、上記 10) で設計した siRNA 二量体を哺乳動物細胞内に導入し、siRNA の RNAi 誘導による GFP 融合レポーター遺伝子の発現抑制を解析した。
- 12) 培養細胞 (HeLa 細胞) を用いてハンチンチンタンパク質の UCH-L1 による挙動変化を観察した。ハンチンチン遺伝子 (Q22 あるいは Q151 を含む)、UCH-L1 (WT) 遺伝子をそれぞれ持つ発現プラスミドベクターを用いて HeLa 細胞内にトランスフェクションし、一過性のタンパク質合成を行った。その後、Western blot 解析によってハンチンチンタンパク質の発現量を調べた。

### C. 研究結果

- 1) 対立遺伝子特異的 RNAi 誘導を実現するためにハンチンチン遺伝子転写産物内の 3 箇所の一塩基多型 (SNP) 部位を選び、それ

ぞれの SNP 部位を構成する対立遺伝子をターゲットとする siRNA を設計し、その効果を我々が確立したアッセイ系 (特許出願中) を用いて評価した。選んだ SNP 部位は、データベースから比較的ヘテロ接合体頻度の高いものを選んだ。レポーター対立遺伝子を用いた評価の結果、一つの SNP 部位の対立遺伝子に対して、それらを識別し、それぞれの対立遺伝子をノックダウンさせることができる siRNA を選定することができた。

- 2) その他の SNP 部位については、ターゲット対立遺伝子と非ターゲット対立遺伝子との間で識別が弱く、顕著な対立遺伝子特異的 RNAi を誘導させることができなかった。
- 3) 内在性ハンチンチン対立遺伝子転写産物を用いた評価検討のため、様々なヒト培養細胞から抽出した RNA を用いて cDNA を合成し、それらを鋳型に、解析した SNP 部位のタイピングを行った。その結果、多くの培養細胞は、どちらかの対立遺伝子のホモ接合体であることが分かった。
- 4) コモン・マーモセットハンチンチン遺伝子を単離するために、コモン・マーモセット脳組織から全 RNA を抽出し、オリゴ d(T) プライマーを用いて cDNA を合成した。そして、ヒトとマウスハンチンチン遺伝子の保存された配列を基に PCR プライマーを設計し、PCR 法によって増幅産物を得た。得られた PCR 産物は塩基配列決定により、目的のハンチンチン遺伝子であることが確認された。
- 5) 上記 4) と同じ解析戦略で、コモン・マーモセットハンチンチン遺伝子の全 Open reading frame (ORF) をカバーするクローンの単離を試みた。その結果、約 10k b にもおよぶ PCR 増幅産物が得られ、プラスミドベクターにクローニング後、その塩基

配列決定を現在行なっている（現在解析進行中）。

- 6) 上記4) で得られたコモン・マーモセット 5'末端領域のハンチンチン遺伝子と GFP レポーター遺伝子を連結した GFP 融合遺伝子と、そのハンチンチン遺伝子の塩基配列情報を基に設計した siRNA 二量体をマウス N2a 細胞内に共トランスフェクションし、GFP を指標に RNAi ノックダウン効果を調べた。その結果、強い RNAi ノックダウンを誘導する siRNA を設計することができた。
- 7) コモン・マーモセットハンチンチン遺伝子産物に対する基礎的データを蓄積する目的で、現在市販されているヒトハンチンチンタンパク質に対する抗体（3種類の抗体）とのクロス反応も検討した。その結果、テストした全ての抗体でコモン・マーモセットハンチンチンとのクロス反応が観察された。
- 8) 上記7) と関連して、市販のヒトハンチンチン遺伝子に対する TaqMan プローブの有効性についても検討した。その結果、コモン・マーモセットのハンチンチン遺伝子転写産物についても検出できることが確認された。
- 9) 伸長したポリグルタミンを含むハンチンチンタンパク質の発現が UCH-L1 の存在の有無によって変化するかを検討した。その結果、ハンチンチンタンパク質量が UCH-L1 の存在によって減少することが観察された。

#### (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・指針ならびに米国立衛生研究所 (N I H) 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

従来のハンチンチン遺伝子をターゲットとする RNAi 誘導は、正常型、異常型両方のハンチンチン遺伝子を抑制する RNAi 誘導である。正常型ハンチンチン遺伝子の生体内での詳細な機能はまだ不明であるが、ハンチンチン遺伝子をノックアウトさせたマウスは胎生致死となり、コンディショナル・ノックアウトマウスでも神経細胞にアポトーシスが誘導されることが知られている。これらの事実から正常型ハンチンチン遺伝子の生体内での重要な機能が推察される。従って、RNAi を用いた安全な治療法を確立するためには、従来の RNAi 誘導（正常型、異常型両方をターゲット）ではなく、異常型ハンチンチン遺伝子だけを特異的にノックダウンする新しい RNAi 誘導法の確立が必要である。我々は、この課題に取り組み、ハンチンチン対立遺伝子を識別し、特異的なノックダウンを誘導する siRNA 二量体の設計に成功した。

異常型ハンチンチン遺伝子の病因となる変異はエキソン1内にコードされた長い CAG リピートであり、その部分を RNAi のターゲットにしても、短い CAG リピートを持った正常型遺伝子までもが抑制されてしまう。そこで我々は、新しい識別部位として一塩基多型 (SNP) 部位に着目し、SNP 部位を構成する二つの対立遺伝子に対してそれぞれを特異的にノックダウンする siRNA の設計を試みた。我々が既に確立した簡便な対立遺伝子特異的 RNAi 評価方法を用いて設計した siRNA をスクリーニングした結果、それぞれの対立遺伝子に対して特異的なノックダウンを誘導する siRNA 二量体を選定することができた。このことから、ハ

ハンチンチン遺伝子のターゲット SNP 部位を調べることで、正常型ハンチンチン遺伝子を抑制しないで異常型ハンチンチン遺伝子だけを特異的に抑制する新しい RNAi 治療の可能性が開かれた。しかしながら、ターゲット SNP 部位がホモ接合体であった場合、この方法が使えないという欠点もあり、それを補うためにハンチンチン遺伝子内の別の SNP 部位に対して同様の siRNA スクリーニングが必要である。また、今回注目した SNP 部位の患者群におけるヘテロ接合体頻度を調べる必要がある。前者とあわせて来年度の研究課題である。

RNAi 治療の実現に向けて、安全面でのもう一つの課題は、ヒトに近い実験動物を用いた研究開発の必要性である。従来の疾患モデル動物の主なものは齧歯目のマウス、ラットなどであり、治療効果や安全性をより正確に検討するためにはヒトと同じ霊長類目の実験動物を用いた研究開発が必要である。本年度は、霊長類実験動物であるコモン・マーモセットを用いた研究を本格的にスタートさせ、まず、本研究課題の対象遺伝子であるハンチンチン遺伝子の単離・同定を試みた。ゲノム情報がほとんど分かっていないコモン・マーモセットから目的の遺伝子をクローニングするために、ヒトとマウスのハンチンチン遺伝子を比べ進化的に保存された配列を基に PCR のプライマーを設計し、それらを用いた RT-PCR 法によってコモン・マーモセットハンチンチン cDNA のクローニングを行なった。このクローニング戦略によって、ハンチンチン遺伝子転写産物の 5'末端領域と全 Open reading frame (ORF) をカバーするクローンの単離に成功した。後者については全長 10 kb にもおよび、現在塩基配列決定中である。得られた 5'末端領域の塩基配列からは、ヒトハンチンチン遺伝子との高い相同性が観察された。病因と関連する CAG リピート付近の配列については、CAG リピートが短くそ

の下流の CCG リピートも短くなっていた。さらに今回得られた配列データや調製サンプルを基に、コモン・マーモセットハンチンチン遺伝子産物の検出に必要な PCR プライマーや抗体の特定も行なった。これらのツールそして得られた遺伝子情報は、今後の研究開発の推進に大きく貢献すると考えられる。

UCH-L1 は、ユビキチン-プロテアソーム系のタンパク質分解システムに関与する酵素であり様々な神経変性疾患との関連が指摘されている。本研究の解析で UCH-L1 がハンチンチンタンパク質の減少に関わる可能性が示された。このことから、UCH-L1 によるハンチンチンタンパク質の分解の亢進、またはタンパク質合成阻害の可能性が考えられ、その可能性については今後の研究課題である。

## E. 結論

1) ハンチンチン遺伝子内の SNP 部位をターゲットとする新しい対立遺伝子特異的 RNAi 誘導の可能性を検討し、それぞれの対立遺伝子に対して特異的な RNAi ノックダウンを誘導する siRNA 二量体を選定した。この対立遺伝子特異的 RNAi 誘導法を応用することによって、正常型ハンチンチン遺伝子の発現はそのまま（影響しないで）、異常型ハンチンチン遺伝子だけを特異的に発現抑制させる RNAi 治療が可能になると考えられる。

2) 霊長類モデル動物作出のための基礎データとして、コモン・マーモセットハンチンチン遺伝子の単離と同定を行い、完全な ORF をコードすると思われる約 10 kb の cDNA クローンの単離に成功した。このクローンは、現在塩基配列決定中である。その他、5'末端領域のクローンの単離と塩基配列決定を完了した。

3) コモン・マーモセットハンチンチン遺伝子(一部)の塩基配列情報そしてコモン・マーモセ

ットの調製試料を基に、コモン・マーモセットハンチンチン遺伝子産物検出用のPCRプライマーの設計、そして抗体を特定した。

4) UCH-L1 がユビキチン-プロテアソーム系のタンパク質分解システムと共に、ハンチンチンタンパク質量の調節に関与している可能性を示唆した。

## 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*, 12: 593-600, 2007.

Tamura Y., Kunugi H., Ohashi J. and Hohjoh H. The possible association between epigenetic aberration in DNA methylation in RELN and psychiatric disorders. *Mol Psychiatry*, 12: 519, 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*, 391: 39-44, 2007.

Hohjoh H., and Fukushima T., Marked change in microRNA expression during neuronal differentiation of human teratocarcinoma NTera2D1 and mouse embryonal carcinoma P19 cells. *BBRC*, 362: 360-367, 2007.

Yamauchi, R., Wada, E., Kamichi, S.,

Yamada, D., Maeno, H., Delawary, M., Nakazawa, T., Yamamoto, T., Wada, K. Neurotensin type2 receptor is involved in fear memory in mice. *J. Neurochem.*, 102, 1669-1676, 2007.

Hirayama, K., Aoki, S., Nishikawa, K., Matsumoto, T., Wada, K. Identification of novel chemical inhibitors for ubiquitin C-terminal hydrolase-L3 by virtual screening. *Bioorgan. Med. Chem* 15, 6810-6818, 2007.

Ohashi, H., Nishikawa, K., Ayukawa, K., Hara, Y., Nishimoto, M., Kudo, Y., Abe, T., Aoki, S., Wada, K. Alpha 1-adrenoceptor agonists protect against stress-induced death of neural progenitor cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 573, 20-28, 2007.

Sakurai, M., Sekiguchi, M., Zushida, K., Yamada, K., Nagamine, S., Kabuta, T. Wada, K. Reduction of memory in passive avoidance learning, exploratory behavior and synaptic plasticity in mice with a spontaneous deletion in the ubiquitin C-terminal hydrolase L1 gene. *Eur. J. Neurosci.*, 27, 691-701, 2008.

Kabuta, T., Setsuie, R., Mitsui, T., Kinugawa, A., Sakurai, M., Aoki, S., Uchida, K., Wada, K. Aberrant molecular properties shared by carbonyl-modified UCH-L1 and familial Parkinson's disease-associated mutant UCH-L1. *Hum. Mol. Genet.*, 2008. in press

### 2. 著書

北條浩彦. 「リアルタイム PCR 実験ガイド」  
(編集: 北條浩彦) 2007.



### 3. 学会発表

#### (特別講演・シンポジウム)

和田圭司：変異 SOD1 タンパク質のマクロオートファージによる分解. 第48回日本神経学会総会、名古屋、5.16, 2007

和田圭司：神経変性疾患の根本的治療をめざして. 第15回J・K・Wフォーラム、東京、9.22, 2007

和田圭司：脱ユビキチン化酵素と神経変性. 第12回パーキンソン病フォーラム－基礎と臨床. 京都、9.29, 2007

青木俊介、平山和徳、和田圭司：UCH-L1ファミリー分子群を標的とした *in silico* ドッキング・シミュレーションによる新規作用薬剤の同定. 東京、第15回日本精神・行動遺伝医学会、11.17, 2007

#### (国際発表)

Ohnishi Y., Toyoda A., Sakaki, Y., Tokunaga K., and Hohjoh H. "Sequence analysis of small non-coding RNAs present in preimplantation mouse embryos" 57<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, San Diego, California, USA., October 23-27, 2007.

Hohjoh H., Ohnishi Y., Tamura Y., Yoshida M., and Tokunaga K. "Assay system for evaluation of allele-specific gene silencing by RNA interference (RNAi)" 57<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, San Diego, California, USA., October 23-27, 2007.

Ohnishi Y., Tamura Y., Yoshida M., Tokunaga K., and Hohjoh H. "Assessment system for allele-specific gene silencing by RNA interference

with mutant and wild-type reporter alleles" RNAi Europe, Barcelona, Spain, 9.20, 2007.

Amano T, Wada E, Noda M, Wada K, Sekiguchi M: Neurotensin receptor type-1 suppresses the long-term potentiation in the basolateral nucleus of amygdala through the modulation of dopamine D<sub>2</sub> receptor. Synapses: From Molecules to Circuits & Behaviour. Cold Spring Harbor Laboratory. U.S.A, April 19, 2007.

#### (国内発表)

大西悠亮、豊田敦、十時泰、徳永勝士、榊佳之、北條浩彦。「マウス初期胚におけるマイクロRNAの変化」第30回日本分子生物学会、横浜、12.11、2007.

和田圭司、鈴木泰行、株田智弘：変異 SOD1 タンパク質のマクロオートファージによる分解. 第48回日本神経学会総会、名古屋、5.16, 2007

青木俊介、株田千華、和田圭司：G-蛋白共役型受容体 (GPCR) を標的とした神経系前駆細胞の細胞表面マーカーの探索. 神経組織の成長・再生・移植研究会第22回学術集会、岡山、5.26, 2007

宮島萌子、尾崎眞、和田圭司、関口正幸：Propofol による扁桃体抑制性神経伝達の二相性修飾作用. Biphasic actions of propofol on inhibitory neurotransmission in the mouse amygdale. 日本麻酔科学会第54回学術集会、札幌、5.31-6.2 2007

Hirayama K, Aoki S, Nishikawa K, Matsumoto T, Wada K: Identification of novel UCH-L1-potentiating compounds by *in silico* drug screening. Neuro 2007.

Yokohama, 9. 10, 2007.

Amano T, Wada E, Noda M, Wada K, Sekiguchi M: The LTP regulation system by D2 receptor and neurotensin receptor type-1 in the basolateral amygdala. Neuro 2007. Yokohama, 9. 11, 2007.

Nishimoto M, Furuta A, Wada K: The functional regulatory mechanism in reactive astrocytes via VIP/VPAC2 system. Neuro2007. Yokohama, 9. 12, 2007.

平山和徳、青木俊介、西川香里、松本隆、和田圭司 : Virtual screening による UCH-L3 の新規阻害剤同定. 第 35 回構造活性相関シンポジウム、京都、11.15, 2007

平山和徳、青木俊介、西川香里、松本隆、和田圭司: virtual screening による UCH-Lファミリー活性調節剤探索研究. 内閣府第 2 回ナノバイオテクノロジー連携群成果報告会. 12.5, 2007

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  
治療に向けたターゲットタンパク質としての UCH-L1 の機能解析

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 部長  
紺谷 千穂 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第四部

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。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、本研究により、UCH-L1 は、さらに huntingtin タンパク質の発現量を変化させる働きを持つ可能性が示唆された。

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て、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、異常に長いグルタミントラック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、その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 の研究を行ってきたが、最近、若年発症のハンチントン病においてその UCH-L1 の S18Y 多型とハンチントン病発症との関連が報告された。我々は神経細胞の変性防止について、siRNA を用いた変異遺伝子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を用いて開発し、さらに shRNA 発現ベクターの有効性も示してきた。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ている。具体的には、まず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、そして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に着手する。

## 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

培養細胞 (HeLa 細胞) を用いて huntingtin タンパク質の UCH-L1 による挙動変化を観察した。実験では huntingtin 遺伝子 (Q22 あるいは Q151 を含む)、UCH-L1 (WT) 遺伝子をそれぞれ持つ発現プラスミドベクターを使用してトランスフェクションを行い、HeLa 細胞内で transient なタンパク質合成を行った。その後、Western blot 解析により huntingtin タンパク質の発現レベルの検討を行った。

## 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

伸長したポリグルタミンを含む Huntingtin の発現が UCH-L1 の存在によって変化するかを調査した。今回の実験から huntingtin の発現レベルが UCH-L1 の存在によって減少することが明らかとなった。Huntingtin の発現によりポリユビキチン量が増加することが言われているが、今回の実験でもポリユビキチン量は huntingtin タンパク質に比例して減少していた。

## 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。数多くの孤発例については病因の特定に未だ至っていないが、家族性の成果を進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の開発も展望できると期待が高まっている。病因に関しては国内外の研究から、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、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使い、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査した。

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性が示唆されている。今回の実験から UCH-L1 が huntingtin タンパク質レベルを減少させることが明らかとなった。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、これらには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機能が密接に関与している。以上のような UCH-L1 の持つ多機能性から、今回の結果について次の2つの考察が考えられる。1つは huntingtin タンパク質分解の亢進。もう1つはタンパク質合成の阻害である。

ハンチントン病を含む多くの神経変性疾患では異常タンパク質の蓄積とそれによる細胞死が観察される。それらの現象は細胞内にあるタンパク質管理機構の障害によるものと考えられている。

UCH-L1 はモノユビキチンを安定化する働きを持ち、また UCH-L1 を発現させた細胞では

ロテアソーム阻害時にポリユビキチンの蓄積が増加するという報告がある。これらのことから UCH-L1 は、ユビキチン-プロテアソーム系のタンパク質分解システムに深く関与していることが示唆される。すなわち、UCH-L1 が発現した細胞ではより積極的に細胞内の不要なタンパク質を分解しているのではないかと予想される。

もう1つの原因であるタンパク質合成阻害については、その制御が転写レベルで起こっているのか翻訳レベルで起こっているのかはまだ分からないが、これらの機能に関与するタンパク質の中にはユビキチン-プロテアソーム系によって分解されるタンパク質も多く含まれていることから、それらが UCH-L1 によって分解されることが原因になっているかもしれない。Huntingtin タンパク質の合成を阻害する新しいターゲットとして UCH-L1 に注目することで、新しいハンチントン病の治療法開発に結び付けられるのではないかと考えられる。

前年度の報告でハンチントン病の治療法に関して、培養細胞内で発現抑制効果のあるハンチンチン遺伝子特異的 siRNA を開発し、当該 siRNA を元にさらに 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観察した。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。

しかし、shRNA 投与で一部の細胞群の正常 huntingtin タンパク質量が減少した。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。正常 huntingtin 遺伝子を抑制した場合の副作用、またそれがどの程度正常 huntingtin 遺伝子を抑制した時に起きる

現象なのかはまだ不明である。shRNA 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データ収集が必要不可欠であり、今後は UCH-L1 による作用も視野に入れながら解析を続けていく予定である。

さらに今後、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をめざしていく。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と考える。

## E. 結論

UCH-L1 は huntingtin タンパク質量を調節できる可能性が示唆された。その機序はおそらくユビキチン-プロテアソーム系などのタンパク質分解経路の活性化が原因と予想される。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Yamauchi, R., Wada, E., Kamichi, S., Yamada, D., Maeno, H., Delawary, M., Nakazawa, T., Yamamoto, T., Wada, K. Neurotensin type2 receptor is involved in fear memory in mice. *J. Neurochem.*, 102, 1669-1676, 2007.

Hirayama, K., Aoki, S., Nishikawa, K., Matsumoto, T., Wada, K. Identification

- of novel chemical inhibitors for ubiquitin C-terminal hydrolase-L3 by virtual screening. *Bioorgan. Med. Chem* 15, 6810-6818, 2007.
- Ohashi, H., Nishikawa, K., Ayukawa, K., Hara, Y., Nishimoto, M., Kudo, Y., Abe, T., Aoki, S., Wada, K. Alpha 1-adrenoceptor agonists protect against stress-induced death of neural progenitor cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 573, 20-28, 2007.
- Sakurai, M., Sekiguchi, M., Zushida, K., Yamada, K., Nagamine, S., Kabuta, T., Wada, K. Reduction of memory in passive avoidance learning, exploratory behavior and synaptic plasticity in mice with a spontaneous deletion in the ubiquitin C-terminal hydrolase L1 gene. *Eur. J. Neurosci.*, 27, 691-701, 2008.
- Kabuta, T., Setsuie, R., Mitsui, T., Kinugawa, A., Sakurai, M., Aoki, S., Uchida, K., Wada, K. Aberrant molecular properties shared by carbonyl-modified UCH-L1 and familial Parkinson's disease-associated mutant UCH-L1. *Hum. Mol. Genet.*, in press, 2008.
2. 学会発表  
(特別講演・シンポジウム)
- 和田圭司：変異 SOD1 タンパク質のマクロオートファジーによる分解. 第 48 回日本神経学会総会、名古屋、5. 16, 2007
- 和田圭司：神経変性疾患の根本的治療をめざして. 第 15 回 J・K・W フォーラム、東京、9. 22, 2007
- 和田圭司：脱ユビキチン化酵素と神経変性. 第 12 回パーキンソン病フォーラム—基礎と臨床. 京都、9. 29, 2007
- 青木俊介, 平山和徳、和田圭司：UCH-L ファミリー分子群を標的とした in silico ドッキング・シミュレーションによる新規作用薬剤の同定. 東京、第 15 回日本精神・行動遺伝医学会、11. 17, 2007
- (国際学会)
- Amano T, Wada E, Noda M, Wada K, Sekiguchi M: Neurotensin receptor type-1 suppresses the long-term potentiation in the basolateral nucleus of amygdala through the modulation of dopamine D<sub>2</sub> receptor. *Synapses: From Molecules to Circuits & Behaviour*. Cold Spring Harbor Laboratory. U.S.A, April 19, 2007.
- (国内学会)
- 和田圭司、鈴木泰行、株田智弘：変異 SOD1 タンパク質のマクロオートファジーによる分解. 第 48 回日本神経学会総会、名古屋、5. 16, 2007
- 青木俊介、株田千華、和田圭司：G-蛋白共役型受容体 (GPCR) を標的とした神経系前駆細胞の細胞表面マーカーの探索. 神経組織の成長・再生・移植研究会第 22 回学術集会、岡山、5. 26, 2007
- 宮島萌子、尾崎眞、和田圭司、関口正幸：Propofol による扁桃体抑制性神経伝達の二相性修飾作用. *Biphasic actions of propofol on inhibitory neurotransmission in the mouse amygdale*. 日本麻酔科学会第 54 回学術集会、札幌、5. 31-6. 2 2007
- Hirayama K, Aoki S, Nishikawa K, Matsumoto T, Wada K: Identification of novel UCH-L1-potentiating compounds

by in silico drug screening. Neuro 2007.  
Yokohama, 9. 10, 2007.

Amano T, Wada E, Noda M, Wada K,  
Sekiguchi M: The LTP regulation  
system by D2 receptor and neurotensin  
receptor type-1 in the basolateral  
amygdala. Neuro 2007. Yokohama, 9.  
11, 2007.

Nishimoto M, Furuta A, Wada K: The  
functional regulatory mechanism in  
reactive astrocytes via VIP/VPAC2  
system. Neuro2007. Yokohama, 9. 12,  
2007.

平山和徳、青木俊介、西川香里、松本隆、和  
田圭司: Virtual screening による UCH-L3  
の新規阻害剤同定. 第 35 回構造活性相  
関シンポジウム、京都、11. 15, 2007

平山和徳、青木俊介、西川香里、松本隆、和  
田圭司: virtual screening による UCH-L  
ファミリー活性調節剤探索研究. 内閣府  
第 2 回ナノバイオテクノロジー連携群成  
果報告会. 12. 5, 2007

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	序 基本編[1] 基本編[2] 実践編[2] 実践編[4-2] その他	北條浩彦	リアルタイム PCR実験ガイド	羊土社	東京	2007	20-27 28-38 114-122 149-156

## 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
Tamura Y., Kunugi H., Ohashi J. and Hohjoh H.	Epigenetic aberration of the human REELIN gene in psychiatric disorders.	<i>Mol Psychiatry</i>	12	593-600	2007
Tamura Y., Kunugi H., Ohashi J. and Hohjoh H.	The possible association between epigenetic aberration in DNA methylation in RELN and psychiatric disorders.	<i>Mol Psychiatry</i>	12	519	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.	<i>Gene</i>	391	39-44	2007
Hohjoh H. and Fukushima T.	Marked change in microRNA expression during neuronal differentiation of human teratocarcinoma NTera2D1 and mouse embryonal carcinoma P19 cells.	<i>BBRC</i>	362	360-367	2007
Yamauchi, R., Wada, E., Kamichi, S., Yamada, D., Maeno, H., Delawary, M., Nakazawa, T., Yamamoto, T., and Wada, K.	Neurotensin type2 receptor is involved in fear memory in mice.	<i>J. Neurochem.</i>	102	1669-1676	2007
Hirayama, K., Aoki, S., Nishikawa, K., Matsumoto, T., and Wada, K.	Identification of novel chemical inhibitors for ubiquitin C-terminal hydrolase-L3 by virtual screening.	<i>Bioorgan. Med. Chem</i>	15	6810-6818	2007



Ohashi, H., Nishikawa, K., Ayukawa, K., Hara, Y., Nishimoto, M., Kudo, Y., Abe, T., Aoki, S., and <u>Wada, K.</u>	Alpha 1-adrenoceptor agonists protect against stress-induced death of neural progenitor cells.	<i>Eur. J. Pharmacol.</i>	573	20-28	2007
Sakurai, M., Sekiguchi, M., Zushida, K., Yamada, K., Nagamine, S., Kabuta, T. and <u>Wada, K.</u>	Reduction of memory in passive avoidance learning, exploratory behavior and synaptic plasticity in mice with a spontaneous deletion in the ubiquitin C-terminal hydrolase L1 gene.	<i>Eur. J. Neurosci.</i>	27	691-701	2008
Kabuta, T., Setsuie, R., Mitsui, T., Kinugawa, A., Sakurai, M., Aoki, S., Uchida, K., and <u>Wada, K.</u>	Aberrant molecular properties shared by carbonyl-modified UCH-L1 and familial Parkinson's disease-associated mutant UCH-L1.	<i>Hum. Mol. Genet.</i>		In press	2008

## 研究成果の刊行物・印刷

# 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

Hirohiko Hohjoh<sup>a,\*</sup>, Tatsunobu Fukushima<sup>b</sup>

<sup>a</sup> National Institute of Neuroscience, NCNP, 4-1-1 Ogawahigashi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan

<sup>b</sup> Yokohama Research Laboratories, Mitsubishi Rayon Co., LTD. 10-1, Daikoku-cho, Tsurumi-ku, Yokohama 230-0053, Japan

Received 14 June 2006; received in revised form 13 November 2006; accepted 22 November 2006

Available online 8 December 2006

Received by N. Okada

## Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are small noncoding RNAs, with a length of 19 to 23 nucleotides, which appear to be involved in the regulation of gene expression by inhibiting the translation of messenger RNA. Expression profile analysis of miRNAs is necessary to understand their complex role in the regulation of gene expression during the development and differentiation of cells and in various tissues. We describe here a detection system for miRNA expression profiles, using a new type of DNA chip and fluorescent labeled cellular RNAs, which allows real-time detection of hybridization signals at every step of washing and results in highly reproducible miRNA expression profiles. Using the system, we investigated the expression profiles of miRNA in the mouse central nervous system (CNS), namely the spinal cord, medulla oblongata, pons, cerebellum, midbrain, diencephalons, and cerebral hemispheres. The results indicated that although the CNS subregions expressed similar miRNA genes, the expression levels of the miRNAs varied among the subregions, suggesting that the CNS subregions specialized for different functions possess different expression profiles of miRNAs.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** MicroRNA; DNA microarray; Expression profile; Fluorescence; Real-time detection; Central nervous system

## 1. Introduction

MicroRNAs (miRNAs) are small noncoding RNAs, with a typical length of 19 to 23 nt, which are processed from longer transcripts (primary miRNAs), forming stem-loop structures by digestion with a microprocessor complex containing Drosha and Pasha in the nucleus and Dicer in the cytoplasm (Lee et al., 2003; Bartel, 2004; Denli et al., 2004). After Dicer processing, the resultant miRNA duplexes undergo strand selection, and the single-stranded mature miRNA elements are incorporated into

the RNA-induced silencing complex (RISC) and function as mediators (Hutvagner and Zamore, 2002). It is thought that miRNAs play an important role in the regulation of gene expression, by inhibiting translation of messenger RNAs (mRNAs), which are partially complementary to the miRNAs, during development, differentiation and proliferation (Doench et al., 2003; Krichevsky et al., 2003; Zeng et al., 2003; Liu et al., 2004; Cheng et al., 2005). In addition, recent studies have further suggested significant association of miRNA with various cancers (Calin et al., 2002; Eis et al., 2005; He et al., 2005; Johnson et al., 2005).

Hundreds of miRNA genes have been found in plants and animals (Lagos-Quintana et al., 2002; Krichevsky et al., 2003; Bartel, 2004). They appear to be expressed by RNA polymerase II (Lee et al., 2004), and tissue-specific expression of miRNA has also been detected (Lagos-Quintana et al., 2002; Babak et al., 2004; Liu et al., 2004). Comprehensive analysis of miRNA expression is necessary to understand the complex

*Abbreviations:* RNA, ribonucleic acid; miRNA, microRNA; DNA, deoxyribonucleic acid; RISC, RNA-induced silencing complex; CNS, central nervous system; mRNA, messenger RNA; cDNA, complementary DNA; nt, nucleotide; PCR, polymerase chain reaction; RT, reverse transcription; AVE(nc), average intensity; SD(nc), standard deviation; BI, background intensity; a.u., arbitrary units; NTC, no template control.

\* Corresponding author. Tel.: +81 42 342 2711x5951; fax: +81 42 346 1755.

E-mail address: [hohjohh@ncnp.go.jp](mailto:hohjohh@ncnp.go.jp) (H. Hohjoh).

0378-1119/\$ - see front matter © 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.gene.2006.11.018

regulation of gene expression involving miRNAs and is also helpful in the characterization of miRNAs. However, although expression profile analyses of miRNAs using conventional DNA arrays have been performed (Krichevsky et al., 2003; Babak et al., 2004; Liu et al., 2004; Miska et al., 2004), the shortness of miRNA, at ~22 nt, appears to make such analyses difficult. To address this problem, we used a new type of DNA chip to make a microarray specific to miRNAs and to establish a detection system for the expression profiles of miRNAs. The system allows real-time detection of hybridization signals at every step of washing and results in highly reproducible miRNA expression profiles.

Using this system for detection of miRNAs, we investigated miRNA expression profiles in the mouse central nervous system (CNS), which is composed of seven subregions specialized for different functions. The results suggested differences in expression of miRNAs among the CNS subregions.

## 2. Materials and methods

### 2.1. DNA chip

Synthetic DNA oligonucleotides were installed as probes onto Genopal® (Mitsubishi Rayon), which is composed of plastic hollow fibers: oligonucleotide DNA probes are attached to a gel within the three-dimensional space of each hollow fiber. MiRNAs targeted for detection in this study are shown in Supplementary Table S1.

### 2.2. Preparation of small-sized RNAs and fluorescent labeling

Total RNAs extracted from BALB/c mice frontal cortex, cerebellum, hippocampus, thalamus, hypothalamus, brainstem, pons, and spinal cord were purchased from Clontech. In addition, total RNAs were also isolated from mouse cerebri and cerebelli (ICR mouse strain). For preparation of cellular miRNAs, small-sized RNAs containing miRNAs were isolated from total RNA using the RNeasy MinElute Cleanup kit (Qiagen) according to the user-developed protocol for purifying miRNA from cells (Qiagen web site). Small-sized RNAs were also prepared from various mouse tissues (ICR mouse strain) using the mirVana™ miRNA Isolation kit (Ambion) according to the manufacturer's instructions. The isolated RNAs (~1 µg) were subjected to direct labeling with the fluorescent analogs of Cy3 and Cy5 using the ULYSIS Alexa Fluor 546 and 647 nucleic acid labeling kits (Molecular Probes), respectively, according to the manufacturer's instructions; in this paper, 'Cy3' and 'Cy5' represent the Alexa Fluor 546 and 647 fluorescent dyes, respectively. After labeling, the labeled RNAs were purified from free fluorescent substrates using Micro Bio-Spin P30 columns (BioRad) according to the manufacturer's instructions, and used in hybridization.

### 2.3. Hybridization, washing and signal detection

Hybridization was carried out in 100 µl of hybridization buffer [6×SSC, 0.2% SDS and 1 µg of heat-denatured labeled

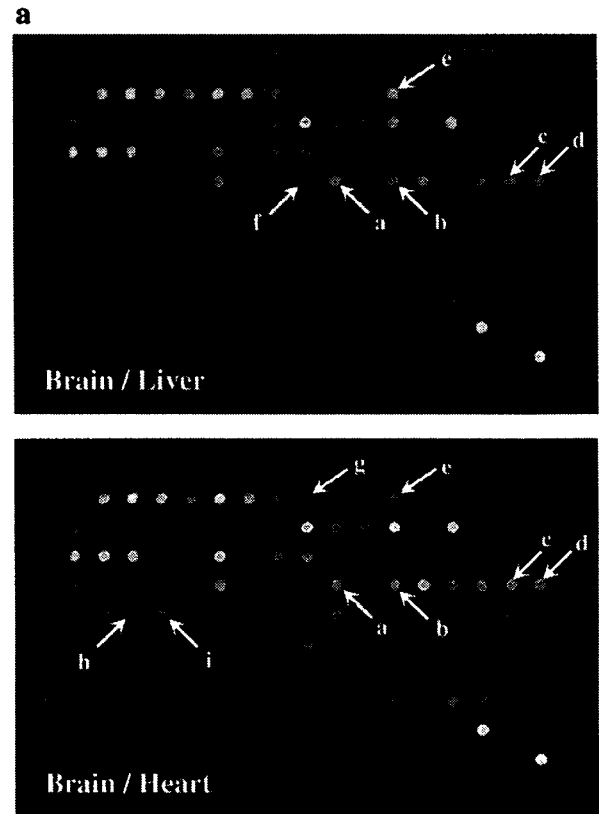


Fig. 1. Properties of the system for detection of miRNAs with a new DNA chip. (a) Merged image of miRNA expression profiles with different tissues. RNA was extracted from mouse brain, liver and heart, labeled with Cy3 or Cy5 fluorescent substrates and subjected to hybridization using a new DNA chip. After washing (detailed in B), hybridization signals were examined using a DNA chip image analyzer with the chip soaking in 2×SSC. Examined tissues are indicated. On the merged images, brain signals and liver (upper panel) or heart (lower panel) signals are represented in green and red, respectively. Arrow a indicates the tissue-specific signal of miR-124a; b, miR-125; c, miR-128a; d, miR-128b; e, miR-9; f, miR-122a; g, miR-1; h, miR-133a; and i, miR-133b. (b) Profiles of hybridization signals during washing. Hybridization of Cy3-labeled mouse liver and brain RNAs to DNA chips was performed and the chips then washed in 2×SSC containing 0.2% SDS at 40 °C, 42 °C, 45 °C, and 50 °C for 20 min each. Hybridization signals were examined at every step of washing: after each step of washing, the DNA chips were rinsed in 2×SSC at room temperature and then subjected to examination of hybridization signals while wet. After detection of the signals, further washing was performed. Hybridization signal intensities were indicated by arbitrary intensity units (a.u.).

RNAs] at 42 °C overnight using a hybridization chamber specific for Genopal® chips (Mitsubishi Rayon). After hybridization, the DNA chips were washed in 2×SSC containing 0.2% SDS at 37 °C, 40–42 °C, 45 °C and 50 °C for 15–20 min each, and hybridization signals were examined at every step of washing using a DNA chip image analyzer (Mitsubishi Rayon) according to the manufacturer's instructions. Before signal detection, DNA chips were briefly rinsed in 2×SSC at room temperature, hybridization signals were examined with the chips soaking in 2×SSC and then further washing was carried out. A positive signal, namely, the presence of miRNA, was judged as follows: Based on the signal intensities of negative control spots, the average intensity [AVE(nc)] and