

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～20年度 総合研究報告書

研究代表者 北條 浩彦

平成21(2009)年 3月

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

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～20年度 総合研究報告書

研究代表者 北條 浩彦

平成21(2009)年 3月

目 次

I. 総合研究報告

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	----- 1
--	---------

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 疾患関連タンパク質の解析と shRNA 誘導技術の開発に関する 研究 和田 圭司	----- 16
---	----------

II. 研究成果の刊行に関する 一覧表	----- 26
------------------------	----------

III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 31
------------------	----------

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）

研究代表者 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、次世代の医療技術として期待されている RNA interference (RNAi)法を用いた新しい治療法の開発、そしてその実現のための研究開発を行なった。ハンチントン病は、病因遺伝子産物である変異型ハンチンチン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な発現抑制が根本的治療に直結すると考えられる。これに基づき、我々は、簡便な遺伝子ノックダウン方法である RNA interference (RNAi)法を用いて、病因(変異型)ハンチンチン遺伝子の発現を抑制し、根本的治療につなげる戦略で研究開発を行なった。本研究初期 (H18 年度) において、ハンチンチン遺伝子を強くノックダウンする siRNA (RNAi を誘導する小分子二本鎖 RNA) の設計と pol II プロモーターによってコントロールする RNAi 誘導システムの構築を完了させた。これら有用なツールを得ることができたが、実際に臨床応用で用いるためにはまだ多くの課題がある。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 誘導技術の確立そしてヒトに近いモデル動物を用いた RNAi の評価が必要であると考えられる。そこで我々は、H19-H20 年度にかけて対立遺伝子特異的 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中心に取組んだ。その結果、前者については、対立遺伝子特異的 RNAi 評価システム (特許出願中) を用いた研究によってハンチンチン対立遺伝子を識別する siRNA (RNAi を誘導する小さな RNA 二量体) の設計に成功し、後者については、コモンマーモセット・ハンチンチン遺伝子の全タンパク質をコードする領域[Open reading frame (ORF)]のクローニングに成功し、その塩基配列を決定した。そして、コモンマーモセット内在性ハンチンチン遺伝子とその遺伝子産物を検出する核酸プライマー、抗体の選定を完了させた。これらは病態モデル作出において有用なツールになると考えられる。また、ハンチントン病の発症分子機序と新しい治療戦略の探索に関する研究から、ユビキチン-プロテアソーム系に関わる脱ユビキチン化酵素である UCH-L1 そして近年注目されているオートファジーと関連する LC3-I がハンチンチンタンパク質の発現に影響している可能性も見出した。

研究分担者 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、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いる RNA interference (RNAi)法を利用し、その根本的治療の道を開くことを目標としている。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、特異的な遺伝子発現抑制、神経機能不全の修復そして変性ニューロンの再生などが根本的治療の道を開くと考えられる。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の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 法を利用し、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、その効果の検討そして長期抑制のための発現ベクターの構築を行った。

今日、RNAi は格段な進歩・発展が進み、RNAi 技術が様々な研究分野に応用され始めた時よりもはるかに高い RNAi 誘導技術が確立されている。日々進歩するこれらの最新 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を実現する上で重要である。本研究は、特に、正常

型ハンチンチン遺伝子の発現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ノックダウンする高度な対立遺伝子特異的 RNAi 誘導法の確立にも取り組んだ。

RNAi の治療方法としての有効性が強く示唆されても、その技術を実際の臨床応用に導入するためにはまだ多くの課題がある。特に RNAi を使用する新しい治療法の場合、その安全性を十分検討する必要がある。マウスモデルから得られるデータだけでなく、ヒトに近い霊長類モデル動物を使った治療効果の検討そして安全性の検討が必要であると考えられる。我々はこの点について、コモンマーモセットを用いた霊長類疾患モデルの作出を目標に、その基礎的データの取得そしてモデル動物作出のための発現ベクターの構築を行なった。

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タンパク質による凝集体形成やそれに伴う細胞死の分子メカニズムの解明から新しい病因関連(感受性)遺伝子・遺伝子産物の発見につながると期待される。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となる。よって、ハンチントン病に関連する感受性遺伝子・遺伝子産物の探索についても本研究で取り組んだ。

B. 研究方法

RNAポリメラーゼIIによる shRNA 発現システムの構築

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)を用いたリ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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ テトラサイクリンによって shRNA の発現を誘導した。

対立遺伝子特異的 RNAi 誘導

- 6) 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(アレル)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。

- 7) 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。
- 8) 上記6)と7)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 β -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。
- 9) 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 β -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。
- 10) さらに、siRNA に塩基置換を導入し、対立遺伝子の識別が増強するか否かを同様の評価システムを用いて評価した。
- 11) 被験者ゲノム DNA を用いて、ターゲット候補部位の SNP について、TaqMan プロブを用いたアレルタイピングを行なった。

コモンマーモセット・ハンチンチン遺伝子のクローニング

- 12) 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、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。

- 13) 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 12) 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。
- 14) 上記 12)、13) 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タンパク質コーディング領域のクローニングを行った。
- 15) 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。
- 16) 上記 15) 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。
- 17) 上記 15) で構築した GFP 融合レポーター遺伝子と、上記 16) 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。
- 18) 不死化したコモン・マーモセットリンパ球細胞を用いて、上記 16) で設計した siRNA による内在性ハンチンチン遺伝子のノックダウンを誘導し、その評価を RT-リアルタイム PCR 法とウェスタンブロット法を用いて評価した。

ハンチンチンタンパク質の発現に関与するタンパク質の解析

- 19) 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 存在下による変化を観察した。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 法によってハンチンチンタンパク質の発現量を調べた。

- 20) 培養細胞 (Cos 7 細胞) に伸長したポリグルタミン鎖を含むハンチンチンタンパク質を一過性に発現させ、その後免疫沈降を行った。そして、オートファジーに関連するタンパク質に対する様々な抗体を用いて Western blot 解析を行い、ハンチンチンタンパク質と結合するタンパク質の同定を試みた。

C. 研究結果

RNAポリメラーゼIIによる shRNA 発現システム

- 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。

対立遺伝子特異的 RNAi 誘導

- 3) 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。
- 4) 対立遺伝子の識別とノックダウン効果をさらに強めるために、siRNA に一塩基置換を導入しその効果を検討した。その結果、siRNA のシード部位に塩基置換を導入すると効果が高まることが確認された。
- 5) 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。
- 6) 患者さまのゲノム DNA を用いた SNP タイピング解析から、上記で選定した対立遺伝子を識別する siRNA を使った RNAi 治療の可能な患者さまが実際に存在すること

が確認された。

コモンマーモセット・ハンチンチン遺伝子解析

- 7) 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(dT) 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。
- 8) 上記 7) 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ニングの単離を試みた。その結果、約 10 kb 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、その全塩基配列決定行なった。
- 9) 上記 8) の塩基配列決定の結果、コモンマーモセットのハンチンチン遺伝子は、ヒト・ハンチンチン遺伝子と高い相同性を持つことが示された。この結果に基づき、市販されているヒト・ハンチンチン遺伝子産物を検出する抗体そして TaqMan プローブが、コモンマーモセット・ハンチンチン遺伝子産物を同様に検出できるか否かを検討した。その結果、その検出が可能であることが示された。
- 10) 上記 7) 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。

- 11) 上記 9・10) によって、コモンマーモセット不死化リンパ球細胞内で発現する内在性ハンチンチン遺伝子を RNAi でノックダウンし、その抑制効果を mRNA レベルそしてタンパク質レベルで検出することができた。

ハンチンチンタンパク質の発現に関与するタンパク質の解析

- 12) 伸長したポリグルタミン鎖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否かを検討した。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。
- 13) 伸長したポリグルタミン鎖を含む異常型ハンチンチンタンパク質に結合するタンパク質に注目して解析を行った。オートファジー関連因子を中心にスクリーニングを行った結果、microtubule associated protein 1A light chain3 (LC3-I) が異常型ハンチンチンタンパク質と結合していることが見出された。そして、この結合は通常のポリグルタミン鎖 (Q22) を含むハンチンチンタンパク質では確認されなかった。

(倫理面への配慮)

本研究では、患者ゲノム DNA を用いたハンチンチン遺伝子内の SNP タイピングを行なった。タイピングに先立ち、被験者サンプルの使用について国立精神・神経センター倫理審査委員会にて審査を受け、その承認を得てから解析を実施した。なお、解析する被験者サンプルは、既に単離され暗号化された被験者ゲノム DNA だけであり、新たに被験者からのサンプル調整は行なわなかった。

被験者に対する人権擁護に関しては、文部科学省、厚生労働省、経済産業省による「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成13年3月29日)に則って、本研究に参加していただく被験者(被験者サンプルも含めて)全ての人権擁護に最大限配慮した。

動物を使用する研究計画は、すべて、国立精神・神経センター神経研究所動物実験倫理問題検討委員会にて審議され承認を受けた。実際の動物使用に当たっては国の法律・指針ならびに米国立衛生研究所(NIH)の基準を守り、動物が受ける苦痛を最小限にとどめた。

D. 考察

RNAポリメラーゼIIによる shRNA 発現システム

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、本研究において、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 プロモーターの有用性を示す結果といえる。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)。この様な結果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 RNAi 誘導システムの確立は重要であると考えられる。

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したと考えられる。よって、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と考えられる。

対立遺伝子特異的 RNAi 誘導

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 誘導であった。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。実際の患者群においてもこの治療法を受けることができるターゲット SNP 部位がヘテロの患者さまがいることも確認できた。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、それを補うためにも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と考えられる。

霊長類病態モデル作出に向けた基盤研究

RNAi 治療の実現に向けて、安全面に関するもう一つの課題は、ヒトに近い実験動物を用いた研究開発の必要性である。本研究では、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、対象遺伝子であるハンチンチン遺伝子の単離・同定を行なった。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間で進化的に保存された配列を基に PCR 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の Open reading frame (ORF) 全体をカバーするクローンの単離に成功した。そしてその塩基配列決定から、ヒト・ハンチンチン遺伝子配列と高い相同性を持つことが明らかになった。この結果を基に既存(市販)のヒト・ハンチンチン遺伝子産物を検出する抗体や TaqMan プローブの応用の可能性を検討した結果、それらを応用できることが実証された。したがって、今後の研究開発に必要不可欠となる有用な検出ツールを選定できたことは大きな成果であると考えられる。

ハンチンチンタンパク質の発現に関与するタンパク質の解析

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。本研究の解析から UCH-L1 がハンチンチンタンパク質の発現量に関わる可能性が示唆された。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系の阻害の可能性が考えられる。これらの可能性については今後さらに検討する必要があると考える。

ユビキチン-プロテアソーム系と並んでタンパク質品質管理機構に関わるオートファジーについて、ハンチンチンタンパク質との関連

を調べた。その結果、マクロオートファジー関連因子である microtubule associated protein 1A light chain3 (LC3-I) が、異常型ハンチンチンタンパク質と結合していることを見出した。この結果から、伸長したポリグルタミン鎖を持つ異常型ハンチンチンタンパク質が、LC3-I のオートファゴソーム膜結合を阻害し、マクロオートファジーの機能を抑制している可能性が考えられる。

E. 結論

- 1) 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) 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新しい RNAi 治療の可能性が開かれた。
- 4) 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 をコードする約 10 kb の cDNA クローンの単離に成功した。そして、クローンの全塩基配列決定を行ない、ヒト・ハンチンチン遺伝子と高い相同性を持つことを明らかにした。
- 5) コモンマーモセット・ハンチンチン遺伝子

の塩基配列情報そしてコモンマーモセットの組織サンプルを用いて、コモンマーモセット・ハンチンチン遺伝子そして遺伝子産物を検出する TaqMan プローブ、PCR プライマーそして抗体を特定した。

6) 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の調節に関与している可能性を示した。

7) 異常型ハンチンチンタンパク質に結合するタンパク質のスクリーニングの結果、マクロオートファジー関連因子である LC3-I が結合していることを見出した。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

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.

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.

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.

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.*, **50**: 119-129, 2007.
- 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.
- 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.*, **17**: 1482-1496, 2008.

- Hohjoh H., Akari H., Fujiwara Y., Tamura Y., Hirai H., and Wada K. Molecular cloning and characterization of the common marmoset huntingtin gene. *Gene*, **432**: 60-66, 2009.
- Tamura Y., Yoshida M., Ohnishi Y., and Hohjoh H. Variation of gene silencing involving endogenous microRNA in mammalian cells. *Mol Biol Rep*, 2008 Aug 12. [Epub ahead of print]
- Doi Y., Oki S., Ozawa T., Hohjoh H., Miyake S., and Yamamura T. Orphan nuclear receptor NR4A2 expressed in T cells from multiple sclerosis mediates production of inflammatory cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA*, **105**: 8381-8386, 2008.
- Ohnishi Y., Tamura Y., Yoshida M., Tokunaga K., and Hohjoh H. Enhancement of allele discrimination by introduction of nucleotide mismatches into siRNA in allele-specific gene silencing by RNAi. *PLoS ONE* **3**(5): e2248., 2008.
- Kabuta, T., Furuta, A., Aoki, S., Furuta, K., Wada, K. Aberrant interaction between Parkinson's disease-associated mutant UCH-L1 and the lysosomal receptor for chaperone-mediated autophagy. *J. Biol. Chem.*, **283**: 23731-23738, 2008.
- Kabuta, T., Wada, K.: Insights into links between familial and sporadic Parkinson's disease: Physical relationship between UCH-L1 variants and chaperone-mediated autophagy. *Autophagy*, **4**:827-9, 2008.
2. 総説
 北條浩彦. 二本鎖RNAワールドの開扉/ノベル医学生理学賞 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.
 佐々木裕之 & 北條浩彦. 「機能性小分子 RNA の大規模シーケンス」 *実験医学*, **27**: 14-19., 2009.
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.
 北條浩彦. 「リアルタイム PCR 実験ガイド」(編集: 北條浩彦) 2007.
4. 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-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
- 節家理恵子, 古田晶子, 和田圭司: ユビキチンC末端加水分解酵素の機能. 神経組織の成長・再生・移植研究会第23学術集会. 千葉, 5.17, 2008.
- (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" 56th 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" 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th 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" 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" 5th 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 46th Annual Meeting. San Diego, California, U.S., 12.10, 2006.
- Ohnishi Y., Toyoda A., Sakaki, Y., Tokunaga K., and Hohjoh H. "Sequence analysis of small non-coding RNAs present in preimplantation mouse embryos" 57th 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)" 57th 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 D₂ receptor. Synapses: From Molecules to Circuits & Behaviour. Cold Spring Harbor Laboratory. U.S.A, April 19, 2007.

Hohjoh H., and Tamura Y. "Variation of gene silencing contributes in a variety of gene expression in mammalian cells" 58th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Philadelphia, Pennsylvania, USA., November 12, 2008.

Ohnishi Y., Toyoda A., Totoki Y., Watanabe T., Sasaki H., Tokunaga K., Sakaki Y., and Hohjoh H. "Sequence analysis of small RNAs present in preimplantation mouse embryos" 58th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Philadelphia, Pennsylvania, USA., November 12, 2008.

Tamura Y., Yoshida M., Ohnishi Y., and Hohjoh H. "Gene silencing involving endogenous miRNAs contributes in a variety of mammalian cells' gene expression" 13th Annual Meeting of the RNA Society, Berlin, Germany, August 1, 2008.

(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, 園子田康, 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.

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
- 大西悠亮、十時泰、豊田敦、渡部聡朗、佐々
木裕之、徳永勝士、榊佳之、北條浩彦。
「マウス初期胚に存在する機能性 small
RNA の解析」第31回日本分子生物学会
年会、神戸、12. 9, 2008.
- 田村美子、北條浩彦。「マイクロ RNA とタ
ーゲット遺伝子が関わる遺伝子発現の多
様化」第31回日本分子生物学会年会、
神戸、12. 10, 2008.
- 北條浩彦、田村美子。「マイクロ RNA とター
ゲット遺伝子が関わる遺伝子発現の多様
化」第53回日本人類遺伝学会、横浜、
9.28, 2008.
- 北條浩彦、藤原優子、明里宏文、田村美子、和
田圭司。「コモン・マーモセットハンチン
チン遺伝子のクローニングと解析」第31
回日本神経科学大会、東京、7.10, 2008.
- 株田智弘、節家理恵子、三井丈史、衣川亜衣子、
櫻井省花子、青木俊介、内田健康、和田
圭司：カルボニル化UCH-L1とパーキンソ
ン病関連変異型 I93M UCH-L1に共通した
異常な分子的性質。第31回日本神経科
学大会、東京、7. 9, 2008.
- 藤本陽平、古田晶子、松本隆、和田圭司：神経
疾患における LAMP-2 サブタイプ特異的
な発現調節機構。第31回日本神経科学
大会、東京、7. 11, 2008.
- Kabuta, T., Furuta, A., Aoki, S., Furuta, K.,
Wada, K: Aberrant interaction between
familial Parkinson's disease-
associated mutant UCH-L1 and the
lysosomal receptor for chaperone-
mediated autophagy. 第51回日本神経
化学学会大会、富山、9. 11, 2008.
- Konya, C., Kabuta, T., Kinugawa, A., Wada,
K: Decreased secretion of UCH-L1 and
SOD1 by the mutations associated with
neurodegenerative diseases. 第51回日
本神経化学学会大会、富山、9. 11, 2008.
- Nagamine, S., Kabuta, T., Yamamoto, K.,
Takahashi, A., Wada, K: The

de-ubiquitinating enzyme, UCH-L1, and lipid peroxidation. 第51回日本神経化学会大会, 富山, 9.11, 2008.

Nagamine, S., Kabuta, T., Yamamoto, K., Takahashi, A., Wada, K: The de-ubiquitinating enzyme, UCH-L1, and lipid peroxidation. 第51回日本神経化学会大会, 富山, 9.11, 2008.

Suzuki, M., Setsuie, R., Wada, K: Regulation of energy homeostasis by UCH-L1 and UCH-L3. 第51回日本神経化学会大会, 富山, 9.11, 2008.

Nagamine, S., Kabuta, T., Yamamoto, K., Takahashi, A., Wada, K: The de-ubiquitinating enzyme, UCH-L1, and lipid peroxidation. BMB2008, 兵庫, 12.10, 2008.

三井丈史, 株田智弘, 株田千華, 内田健康, 和田圭司: UCH-L1 による細胞増殖促進. BMB2008, 兵庫, 12.11, 2008.

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疾患関連タンパク質の解析と
shRNA 誘導技術の開発に関する研究

研究分担者 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
研究協力者 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・不溶化防止そして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試みた。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体の進行を siRNA よりもより強く抑制することを見いだした。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、野生型 UCH-L1 との比較実験の結果、UCH-L1-S18Y 多型は huntingtin タンパク質の凝集や分解、そして huntingtin 遺伝子による細胞死に直接関与していない可能性が示された。一方、野生型 UCH-L1 そのものが 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。さらに我々は、ハンチントン病の原因タンパク質である、伸長したポリグルタミン鎖を持つ huntingtin タンパク質と相互作用するタンパク質を調査し、オートファジー関連因子との結合を見出した。

A. 研究目的

本研究は、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を解明し、その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、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その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 タンパク質が、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。ハンチントン病の細胞死の機序はいまだ不明であり、有効な治療方法もまだ確立されていない。我々は、脱ユビキチン化酵素 UCH-L1 の研究も行っているが、近年、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の関連が報告された。そこで、異常型 huntingtin 遺伝子誘導による細胞死と UCH-L1 野生型および S18Y 多型との関連について検討した。さらに、神経変性疾患におけるオートファジーの重要性が多くの報告によってあきらかになってきている。そこで huntingtin タンパク質とオートファジーとの関係についても検討を行った。

我々は神経細胞の変性防止に関連して、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を用いて検討してきた。それに基づき、長期 RNAi 効果の期待できる shRNA 発現ベクターの有効性についても検討した。

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析

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にトランスフェクションした。その後、western blot 法を用いてタンパク質を解析し、さらに ATP assay, LDH assay によって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。さらに、生後2日のハンチントン病モデルマウス (B6CBA-TgN (Hd exon1) 62Gpb/J) に shRNA 発現プラスミドベクター200ng を含む ExGen500 溶液5

マイクロリットルを注入し、一定期間の後に行動学的評価と寿命の検討を行った。

(3)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。

(4)ハンチントン病原因タンパク質と相互作用するタンパク質の同定

培養細胞 (Cos 7 細胞) に伸長したポリグルタミンを含む huntingtin タンパク質を transient に発現させ、免疫沈降を行った。その後、オートファジーに関連するタンパク質に対する様々な抗体を用いた Western blot 解析により huntingtin タンパク質に結合するタンパク質の同定を行った。

(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析

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