

機関番号：82611

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890312

研究課題名（和文）

ハンチントン病RNAi治療を目指したSNP識別アレル特異的RNAi技術の開発

研究課題名（英文）Establishment of tailor-made RNAi knockdown technique against triplet repeat disease-causing alleles

研究代表者

高橋 理貴（TAKAHASHI MASAKI）

（独）国立精神・神経医療研究センター神経研究所・神経薬理研究部・流動研究員

研究者番号：00549529

研究成果の概要（和文）：ハンチントン病の病因遺伝子に存在するSNP（一塩基多型）を目印として、RNA干渉と呼ばれる技術を用いたハンチントン病原因対立遺伝子の特異的発現抑制技術を確立した。また目印となるSNPを約6時間で特定できる迅速SNP診断技術も開発した。これらのSNPを指標とした遺伝子治療・診断技術はハンチントン病や種々の優性遺伝性疾患に対する個人化医療の実現に大きく貢献できるのもだと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We present determination of the coding SNP (cSNP) haplotypes of triplet repeat disease-causing alleles by a novel pull-down method, and demonstrate disease-allele specific RNAi targeting such cSNP sites in the mutant *Huntingtin* alleles, each of which possesses a different cSNP haplotype. Thus, our procedures allow for allele-specific RNAi against disease-causing alleles by using appropriate siRNAs as the disease-linked cSNP haplotype demands. Therefore, our current progress paves the way to the achievement of a tailor-made RNAi treatment for triplet repeat diseases and other diseases using cSNPs as RNAi targets.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010年度	960,000	288,000	1,248,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,030,000	609,000	2,639,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医化学一般

キーワード：発現制御、RNAi治療、SNP、脳神経疾患、対立遺伝子、トリプレットリピート病

1. 研究開始当初の背景

トリプレットリピート病は疾患原因遺伝子の転写配列内に存在する三塩基繰り返し配列が異常伸長することで発症する遺伝性の神経変性疾患であり、未だに根治療法が存在しない。該疾患の代表的疾病であるハンチントン病は、優性遺伝性の疾患原因遺伝子であるハンチンチン遺伝子の転写配列内に存在するCAG繰り返し配列が異常し、伸長ポリ

グルタミン鎖を有するタンパク質が合成され、細胞内に凝集・蓄積することで神経細胞の変性・脱落が起きると考えられている。そのため病因タンパク質の除去もしくは疾患原因遺伝子の特異的発現抑制が根治に直結すると考えられる。根本的治療を目指す遺伝子治療の研究分野では、RNAi技術を用いた病因遺伝子特異的発現抑制による治療法の確立が期待されている。

しかし、ハンチントン病のような優性遺伝性疾患患者の細胞内では、病因となる変異型遺伝子だけでなく正常な機能を有する正常型遺伝子の2つの対立遺伝子が発現しているため、これを識別し変異型遺伝子のみを発現抑制しなければならない。しかし、病因となる繰り返し配列は変異型だけでなく正常型遺伝子にも存在する。そのため、対立遺伝子を識別するための新たな目印と、それを指標とした変異型対立遺伝子特異的な発現抑制技術の確立が必須である。

2. 研究の目的

本研究はハンチントン病 RNAi 治療の実現を目指し「SNP 識別対立遺伝子特異的 RNAi 誘導技術の確立」を目的とする治療技術開発研究である。これを遂行・達成するため以下の2点の研究課題に取り組んだ。

(1) 対立遺伝子間でヘテロ接合な SNP (一塩基多型) を新たな目印として、これを標的とした対立遺伝子特異的 RNAi 誘導技術の確立を目的とした研究に取り組んだ。

(2) 該技術では患者間で異なる変異型対立遺伝子上の SNP を特定することが必須となるが、従来法では技術的・時間的問題により診断法としての実用化は困難である。そこで、簡便かつ迅速に SNP を特定可能な新規 SNP 診断法の開発研究についても取り組んだ。

3. 研究の方法

上記目的達成のため、以下の方法によって実験を行った。

(1) 対立遺伝子間でヘテロ接合な SNP を指標とした対立遺伝子特異的 RNAi 誘導技術の確立

①ハンチントン病の原因遺伝子であるハンチンチン遺伝子に存在するヘテロ接合度の高い4つの SNP を選定し、SNP 周囲の配列を挿入したレポーター対立遺伝子発現プラスミドを構築した (下図参照)。

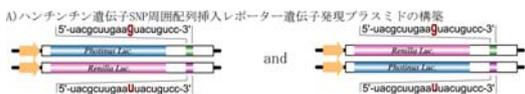


図1. レポーターアレル発現プラスミドの構築

②上記のプラスミドと共に各 SNP に対し設計した6~8個の siRNA をヒト由来株化細胞 (HeLa 細胞) に導入した。

③2種のレポーター遺伝子の活性比から SNP を識別した対立遺伝子特異的な RNAi ノックダウンがどのくらい起こったかを評価した。

また発現抑制の指標となる SNP 塩基がどちらの対立遺伝子に存在しても対応できるよ

うに、ヘテロ接合度の高い複数(4~6)の SNP の両塩基に対して特異的かつ効果的な siRNA をそれぞれ選定した。

④選定した siRNA を用いて、ハンチントン病患者由来株化細胞内で発現する内在性変異型ハンチンチン遺伝子に対する発現抑制の効果を mRNA の発現量およびタンパク質の発現量で評価した。

(2) 変異型ハンチンチン対立遺伝子の優先的回収法の開発による新規 SNP 診断法の開発

①ハンチントン病患者由来株化細胞を用いて全 RNA 抽出、cDNA 合成を行った。

②正常型と変異型のハンチンチン遺伝子が混在する cDNA サンプルに対して、ハンチンチン遺伝子転写配列内においてヘテロ接合度の高い SNP 部位あるいは CAG 反復配列に相同な約 20 塩基のビオチン化合成オリゴ RNA プローブをハイブリさせた。

③これを核酸やタンパク質、界面活性剤を含むブロッキング液で前処理を施したアビジン粒子によって回収した。

下図に該手法の簡略図を示した。

④ハンチンチン遺伝子における CAG 反復配列を含むエクソン1を PCR 法により増幅後、電気泳動法により反復配列の長い変異型と反復配列の短い正常型の存在比が変化することを確認した。

⑤任意の SNP に対して TaqMan プローブを用いた SNP タイピングを行い、タイピング検出結果の「偏り」から変異型および正常型のハプロタイプを決定した。

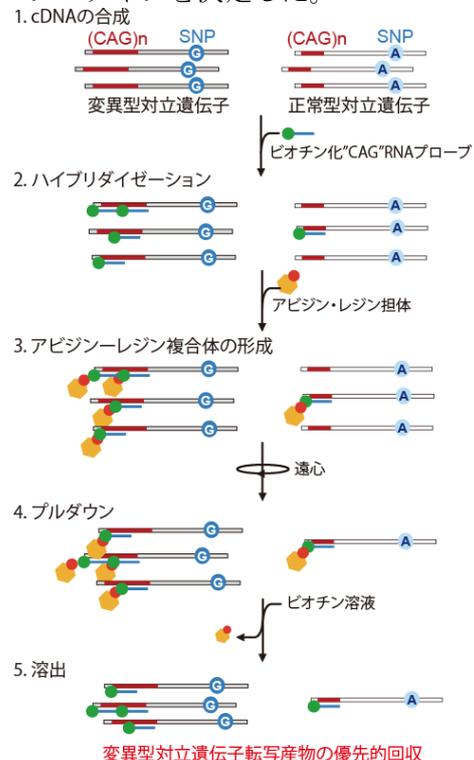


図2. 新規プルダウン法の概略図

4. 研究成果

ハンチントン病 RNAi 治療の実現を目指し「SNP 識別対立遺伝子特異的 RNAi 誘導技術の確立」を目的とし、以下に示す研究成果を上げることができた。これらの成果によって、SNP を指標としたテーラーメイドな RNAi 治療の実現に大きく貢献できたと考えられる。

(1) 対立遺伝子間でヘテロ接合な SNP を指標とした対立遺伝子特異的 RNAi 誘導技術の確立

①ハンチンチン遺伝子転写配列内に存在するヘテロ接合度の高い4つの SNP の両アレルに対し各々4~6つの siRNA を設計し、独自のレポーターアッセイ系を用いて性能評価を行った(研究方法参照)。その結果、4つの SNP の両アレルに対し特異的かつ効果的な siRNA を選定することができた。

②選定した siRNA の実利的な対立遺伝子特異的発現抑制効果を検討するために、ハンチントン病患者由来株化細胞を用いた実証実験を行った。

ハンチントン病患者の SNP タイプに適合する siRNA を選び、株化細胞に導入した結果、研究代表者らが設計・選定した siRNA は、内在性の変異型対立遺伝子に対し強い発現抑制効果を示し、また、正常型対立遺伝子の発現には影響しないことがタンパクレベルの実験で明らかとなった(図3)。

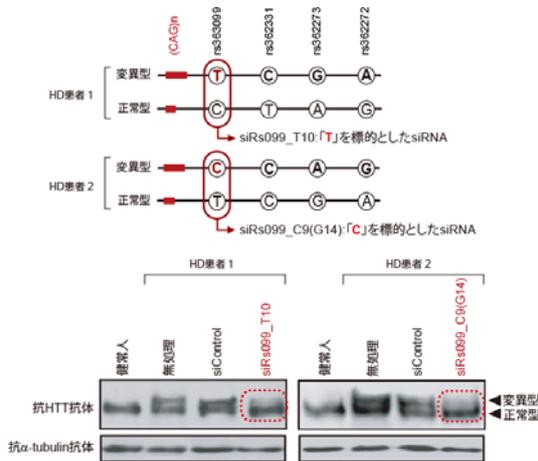


図3. 患者毎の SNP タイプに合わせた内在性変異型ハンチンチン遺伝子のテーラーメイド RNAi ノックダウン効果

また、対立遺伝子特異的 RNAi 誘導技術が他の優性遺伝性疾患(原因対立遺伝子)に対しても治療技術として有効か否を検証した結果、僅か一塩基の違いを識別可能な RNAi 誘導分子の配列的一般特性を明らかにし(研究業績:産業財産権②)、疾患毎の病態を表す生化学的指標を改善させたことから、優性遺伝性疾患に対する治療戦略として非常に

有効であることを示した(研究業績:産業財産権①)。

(2) 変異型ハンチンチン対立遺伝子の優先的回収法の開発による新規 SNP 診断法の開発

①前記「3. 研究の方法」に示した新規プルダウン法を、様々な条件検討とプロトコルの最適化によって開発した(研究業績:産業財産権③)。その結果、変異型ハンチンチン遺伝子の優先的回収が可能となり(図4A)、回収した遺伝子産物に対し既存の SNP タイピングを行うことで、簡便且つ迅速に SNP 診断ができるようになった(図4B,C)。

②該技術は長鎖繰り返し配列を標的としているため、同様な繰り返し配列を有する他のリピート病原因遺伝子に対しても応用可能か否かを検証した。その結果、同じ繰り返し配列を有していれば、他の遺伝子であっても一度の処理で同時に、繰り返し配列の長さ依存的回収が可能なが分かった。

③繰り返し配列の長さに依存した該技術が、何回繰り返し配列が違えば優先的に回収可能なのかを標識オリゴDNAを用いた実験により評価した。その結果、およそ5回の繰り返し配列の差があれば、長い繰り返し配列を持つ遺伝子を優先的に可能であることが明らかとなった。

以上の①~③の結果より、研究代表者らが開発した技術は簡便で汎用性が高く、僅かな繰り返し配列数の違いでも繰り返し配列の長さ依存的に優先的回収が可能であるため、様々なリピート病の変異型対立遺伝子に対する SNP 診断等に有効な技術であると考えられる。

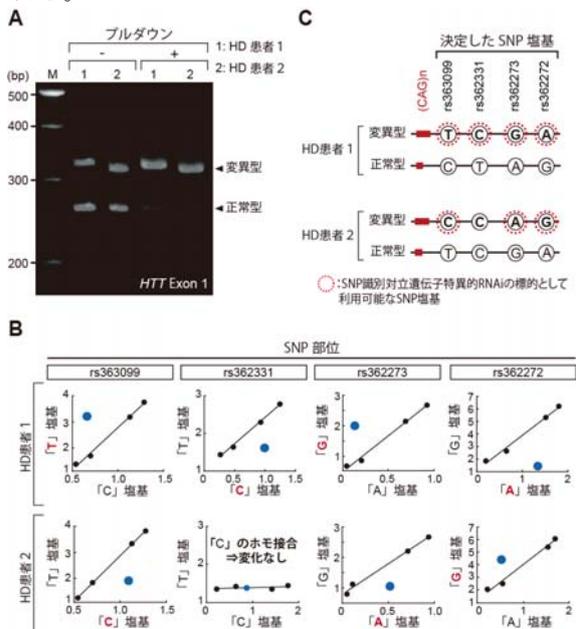


図4. 長鎖繰り返し配列を有する変異型遺伝子に対する新規 SNP 診断法

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Takahashi M, Watanabe S, Murata M, Furuya H, Kanazawa I, Wada K, Hohjoh H: "Tailor-made RNAi knockdown against triplet repeat disease-causing alleles" *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Dec;107(50):21731-21736. 査読有。

[学会発表] (計2件)

- ①分子生物学会(2010/12/7-10, 神戸国際展示場)

「新規プルダウン法を用いたリピート病原因対立遺伝子の優先的回収法と SNP を指標とした病因対立遺伝子の特異的 RNAi ノックダウン」

高橋 理貴、渡邊 莊子、村田 美穂、古谷 博和、金澤 一郎、和田 圭司、北條 浩彦

- ②ASHG (2010/11/2-6, ワシントンコンベンションセンター)、

「Identification of triplet repeat disease-causing alleles by a novel pull-down method and disease-causing allele-specific silencing by RNAi」

Takahashi M, Watanabe S, Murata M, Furuya H, Kanazawa I, Wada K, Hohjoh H:

[図書] (計1件)

- ①高橋理貴、北條浩彦 (2011) トリプレット・リピート病原因遺伝子に対するテーラメイド RNAi ノックダウン。「mTOR シグナル」 実験医学、29: 931-934.

[産業財産権]

○出願状況 (計3件)

①

名称: 「優性変異遺伝子発現抑制剤」

発明者: 北條浩彦、高橋理貴

権利者: 独立行政法人国立精神・神経医療研究センター

種類: 特許

番号: 特願 2010-222847

出願年月日: 2010年9月30日

国内外の別: 国内

②

名称: 「優性アレル発現抑制剤」

発明者: 北條浩彦、高橋理貴

権利者: 独立行政法人国立精神・神経医療研究センター

種類: 特許

番号: 特願 2010-139925

出願年月日: 2010年6月18日

国内外の別: 国内

③

名称: 「長鎖繰返し配列を含有する遺伝子又は遺伝子産物の選択的又は優先的回収方法」

発明者: 北條浩彦、高橋理貴

権利者: 独立行政法人国立精神・神経医療研究センター

種類: 特許

番号: 特願 2009-283653

出願年月日: 2009年12月15日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

[その他]

本研究成果はプレスリリースされ、産経新聞や他数誌で掲載された。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 理貴 (TAKAHASHI MASAKI)

(独) 国立精神・神経医療研究センター神経研究所・神経薬理研究部・流動研究員

研究者番号: 00549529