

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390226

研究課題名(和文) 遺伝子量補正型RNAi誘導法の確立とそれに基づくパーキンソン病新規治療法の開発

研究課題名(英文) Research toward the development of a novel treatment for Parkinson disease by a moderate gene silencing with RNA interference.

研究代表者

北條 浩彦 (HOHJOH, HIROHIKO)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所神経薬理研究部・室長

研究者番号：60238722

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：-シヌクレイン(SNCA)はパーキンソン病(PD)の重要な関連遺伝子であり、その遺伝子変異だけでなく過剰な遺伝子発現もPDの発病に関与している。本研究は、SNCAが過剰発現するPDに対して、中程度のRNAiノックダウン(ExCont-RNAiと名付ける)がその過剰発現を正常レベルに戻すことができることを証明した。さらに、PDモデルショウジョウバエを用いた治療効果の検討からPDモデルショウジョウバエの運動機能の改善も観察した。今回の研究成果は、ExCont-RNAiがSNCAの過剰発現によるPDに対して有望な治療戦略に成りえることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：The alpha-synuclein (SNCA) gene is a responsible gene for Parkinson's disease (PD); and not only nucleotide variations but also overexpression of SNCA appears to be involved in PD. A specific inhibition against mutant SNCA genes carrying nucleotide variations may be feasible by an allele-specific RNAi; however, there is no method for restoring the SNCA overexpression to a normal level. In this study we showed that an atypical RNAi using siRNAs that confer a moderate level of gene silencing was capable of controlling overexpressed SNCA genes to return to a normal level; named 'expression-control RNAi' (ExCont-RNAi). To further assess its therapeutic effects, PD-model flies that carried the human SNCA gene underwent an ExCont-RNAi treatment. The treated PD-flies demonstrated a significant improvement in their motor function. Our current findings suggested that ExCont-RNAi might be capable of becoming a novel therapeutic procedure for PD with the SNCA overexpression.

研究分野：分子生命科学

キーワード：RNAi パーキンソン病 -シヌクレイン 多重重複変異 ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病(PD)の原因遺伝子または感受性遺伝子の探索は国内外で精力的に行われていた。そして、 α -シヌクレイン遺伝子をはじめ多くの疾患原因(関連)遺伝子とその変異が見つかった。本研究で注目する α -シヌクレインは、PD患者脳内でしばしば観察されるレビー小体と呼ばれる封入体の主要な構成タンパク質として知られていた。そして、その遺伝子内には疾患と関連する塩基変異の他に遺伝子自身が重複する変異も見つかった。この様な遺伝子の重複は、PDの他にアルツハイマー病(APP遺伝子重複)でも見つかった。

2. 研究の目的

パーキンソン病(PD)のkey遺伝子である α -シヌクレイン遺伝子は、その塩基配列変化(変異)だけでなく、遺伝子の増幅(多重重複変異)もPDの発症に関与している。本研究は、その様な α -シヌクレイン遺伝子の多重重複変異に起因するPDに対して、遺伝子の発現量を正常化するRNAiノックダウン法を開発し、それを用いた新しい治療戦略(治療法)の道を開くことを目的とした。

3. 研究の方法

遺伝子発現量補正型RNAi誘導のためのsiRNAの設計とその評価:

評価には正確な定量が要求されるため、以前、対立遺伝子特異的RNAi研究で開発したルシフェラーゼレポーター遺伝子を用いたアッセイ系を基に評価システムを構築した。具体的には、ターゲットとなる α -シヌクレイン遺伝子の様々な(領域)配列を含むオリゴDNAを合成し、それらをルシフェラーゼ遺伝子の3'UTRに挿入したレポーター遺伝子を構築した。そして、それらのターゲット配列に対して様々なsiRNAを設計・合成し、構築したレポーター遺伝子と共にヒト培養細胞(HeLa細胞)に導入してRNAiを誘導した(コントロールとしてウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子発現ベクターも一緒に導入する)。そして、ルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現量を指標に、どれだけのRNAiノックダウンを誘導できるsiRNAであるかを量的に評価した。

上記に加え、ショウジョウバエモデルを使った遺伝子発現量補正型RNAiによる治療効果の検討を行うために、まず、ショウジョウバエS2細胞を用いて同様の合成siRNAの評価実験を行った。

PD患者線維芽細胞を用いた遺伝子発現量補正型RNAiの効果の検討:

α -シヌクレイン遺伝子重複を有するPD患

者の線維芽細胞を用いて、上記評価で有能と判定したsiRNAを導入し、過剰発現する α -シヌクレイン遺伝子が正常化するかが、そして、その他の遺伝子に対するオフターゲット効果について検討を行った。

ショウジョウバエモデルの作出と表現型解析:

P因子(トランスポゾン)を使ってヒト α -シヌクレイン遺伝子(cDNA)をショウジョウバエゲノムに導入した(従来法に従って作業を行った)。得られたトランスジェニックショウジョウバエについて表現型解析を行った。導入されたヒト α -シヌクレイン遺伝子の発現量をRT-qPCR法やウエスタンブロット法を用いて解析し、次に行動試験(クライミングテスト)そして寿命について解析を行った。

ショウジョウバエモデルを用いた遺伝子発現量補正型RNAiによる治療効果の検討:

上記で設計したsiRNAまたはそれに基づくshRNA発現DNA断片(p因子による導入)をショウジョウバエモデルに導入した。導入後、RT-qPCR法、ウエスタンブロット法を用いて α -シヌクレイン遺伝子発現量の変化を解析した。発現量の減少が確認されたショウジョウバエモデルは、さらに、行動試験を実施し、行動障害の改善そして延命が認められるか否かを検討した。

4. 研究成果

過剰発現する α -シヌクレイン遺伝子の発現量を補正するRNAiノックダウンのために、siRNAの設計と評価を(ヒトHeLa細胞を用いて)行い、目的とする中程度の発現抑制を誘導する(複数の)siRNAを決定した。さらに、それらのsiRNAをショウジョウバエS2細胞にも導入して評価を行った。その結果、ほとんどのsiRNAでヒト細胞よりも強い発現抑制が観察された。ショウジョウバエ細胞でも遺伝子発現量補正型RNAiを誘導するために、ショウジョウバエRNAiに特化したsiRNAさらにshRNAの設計を行い、目的とするsiRNAそしてshRNAを得ることができた。

上記で評価したsiRNAを用いて α -シヌクレイン遺伝子の多重重複変異を有するPD患者線維芽細胞に遺伝子発現量補正型RNAiを誘導した。その結果、 α -シヌクレイン遺伝子の発現量の正常化を実現することができた。さらに、 α -シヌクレイン遺伝子以外の遺伝子に対するオフターゲット効果についてDNAマイクロアレイによる解析を行ない、オフターゲット効果がほとんど無いことも観察した。

PD モデルシヨウジヨウバエを使った実験については、ヒト α -シヌクレイン遺伝子を発現する PD モデルシヨウジヨウバエと shRNA を発現するシヨウジヨウバエを交配し、F1 モデルシヨウジヨウバエに α -シヌクレイン遺伝子発現量補正型 RNAi を誘導することに成功した。そして、その結果、 α -シヌクレイン遺伝子の発現量（または、発現抑制の程度）と PD モデルシヨウジヨウバエの運動能力との間に有意な相関が観察された。

今回の研究成果をまとめると、遺伝子発現量補正型 RNAi ノックダウン(ExCont-RNAi と名付ける)が α -シヌクレイン遺伝子の過剰発現に起因する PD に対して有望な治療戦略に成りえることが示唆された。

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 13 件)

1. Takahashi M., Suzuki M., Fukuoka M., Fujikake N., Watanabe S., Murata M., Wada K., Nagai Y., and *Hohjoh H. (2015) Normalization of overexpressed alpha-synuclein causing Parkinson's disease by a moderate gene silencing with RNA interference. **Mol Ther Nucleic Acids**, **4**: e241. (査読有り) doi: 10.1038/mtna.2015.14.
2. Takahashi M. and *Hohjoh H. (2014) A novel measurement of allele discrimination for assessment of allele-specific silencing by RNA interference. **Mol Biol Rep**, **41**: 7115-7120. (査読有り) doi: 10.1007/s11033-014-3586-7.
3. Fukuoka M., Yoshida M., Eda A., Takahashi M., *Hohjoh H. (2014) Gene silencing mediated by endogenous microRNAs under heat stress conditions in mammalian cells. **PLoS ONE**, **9(7)**: e103130. (査読有り) doi: 10.1371/journal.pone.0103130.
4. Araki W., Minegishi S., Motoki K., Kume H., Hohjoh H., Araki YM., and Tamaoka A. (2014) Disease-associated mutations of TDP-43 promote turnover of the protein through the proteasomal pathway. **Mol Neurobiol**, **50**: 1049-1058. (査読有り) doi: 10.1007/s12035-014-8644-6.
5. Takahashi M., Chiyo T., Okada T., and *Hohjoh H. (2013) Specific inhibition of tumor cells by oncogenic *EGFR* specific silencing by RNA interference. **PLoS ONE**, **8(8)**: e73214. (査読有り) doi: 10.1371/journal.pone.0073214.
6. *Hohjoh H. (2013) Disease-causing allele-specific silencing by RNA interference. **Pharmaceuticals**, **6**: 522-535. (査読有り) doi: 10.3390/ph6040522.
7. Kabuta T., Mitsui T., Takahashi M., Fujiwara Y., Kabuta C., Konya C., Tsuchiya Y., Hatanaka Y., Uchida K., Hohjoh H., and Wada K. (2013) Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1) acts as novel potentiator of cyclin-dependent kinases to enhance cell proliferation, independent of its hydrolase activity. **J Biol Chem**, **288**: 12615-12626. (査読有り) doi: 10.1074/jbc.M112.435701.
8. *Hohjoh H. (2013) MicroRNA expression during neuronal differentiation of human teratocarcinoma Ntera2D1 and mouse embryonic carcinoma P19 cells. In MicroRNA Protocols. **Methods Mol Biol**, **936**: 257-269.
9. Shin M., Ohte S., Fukuda T., Sasanuma H., Yoneyama K., Kokabu S., Miyamoto A., Tsukamoto S., Hohjoh H., Jimi E., and Katagiri T. (2013) Identification of a novel bone morphogenetic protein (BMP)-inducible transcript, BMP-inducible transcript-1, by utilizing the conserved BMP-responsive elements in the Id genes. **J Bone Miner Metab**, **31**: 34-43. (査読有り) doi: 10.1007/s00774-012-0381-1.
10. Takahashi M., Eda A., Fukushima T., and *Hohjoh H. (2012) Reduction of type IV collagen by upregulated *miR-29* in normal elderly mouse and *klotho*-deficient, senescence-model mouse. **PLoS ONE**, **7(11)**: e48974. (査読有り) doi: 10.1371/journal.pone.0048974.
11. Hamasaki M., Hashizume Y., Yamada Y., Katayama T., Hohjoh H., Fusaki N., Nakashima Y., Furuya H., Haga N., Takami Y., and Era T. (2012) Pathogenic mutation of ALK2 inhibits iPS cell reprogramming and maintenance: mechanisms of reprogramming and strategy for drug identification. **Stem Cells**, **30**: 2437-2449. (査読有り) doi: 10.1002/stem.1221.

12. Takahashi M., Katagiri T., Furuya H., and Hohjoh H. (2012) Disease-causing allele specific silencing against the *ALK2* mutants, *R206H* and *G356D*, in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. **Gene Therapy**, **19**: 781-785. (査読有り) doi: 10.1038/gt.2011.193.
 13. Ohnishi Y., Totoki Y., Toyoda A., Watanabe T., Yamamoto Y., Tokunaga K., Sakaki Y., Sasaki H., and Hohjoh H. (2012) Active role of small non-coding RNAs derived from SINE/B1 retrotransposon during early mouse development. **Mol Biol Rep**, **39**: 903-909. (査読有り) doi: 10.1007/s11033-011-0815-1.
- [学会発表](計 13 件)
1. Furuya H, Arahata H, Watanabe A, Ohyagi Y, Hohjoh H., Maeda N, Iwaki T, and Fujii N. Long-term clinical outcome of SCA8 in Japanese. 8th International Conference on Unstable Microsatellites and Human Disease, Guanacaste, Costa Rica, Jan. 17, 2015.
 2. Takahashi M, Nakamura Y, and Hohjoh H. Application of atypical RNAi for human diseases. Joint Australia and Japan RNA (jajRNA) meeting, Sydney, Australia, Nov. 3, 2014.
 3. Fukuoka M, Yoshida M, Eda A, Takahashi M, and Hohjoh H. Gene silencing mediated by endogenous miRNAs under heat stress conditions in mammalian cells. 64rd Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, San Diego, CA, USA, Oct.20, 2014.
 4. Takahashi M, Fukuoka M, and Hohjoh H. Early drug responses that are followed by an acquired drug resistance in non-small cell lung cancer cells exposed to gefitinib. 64rd Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, San Diego, CA, USA, Oct.19, 2014.
 5. Takahashi M, Suzuki M, Fujikake N, Murata M, Wada K, Nagai Y. and Hohjoh H. A corrective gene silencing by RNA interference to control over-expressed SNCA. 63rd Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Boston, MA, USA, Oct.23, 2013.
 6. Takahashi M, Chiyo T, Okada T, and Hohjoh H. Oncogenic EGFR allele specific inhibition by RNA interference for cancer therapy lacking adverse effects. 62nd Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, San Francisco, California, USA, Nov.7, 2012.
 7. Hohjoh H., Takahashi M., Ohnishi Y., Katagiri T., and Furuya H. Disease-causing allele specific inhibition by RNA interference. 8th Annual Meeting the Oligonucleotide Therapeutics Society, Boston Massachusetts, USA. Oct. 30, 2012.
 8. Takahashi M., Watanabe S., Murata M., Furuya H., Kanazawa I., Wada K., and Hohjoh H. Allele-specific silencing by RNA interference against disease-causing alleles. Nucleic Acid Therapeutics: From base pairs to bedsides, Keystone Symposia, Eldorado Hotel & Spa, Santa Fe, New Mexico, USA, Jan. 11, 2012.
 9. 福岡聖之、吉田満史子、枝垂希子、高橋理貴、北條浩彦。(2014)「熱ストレス下におけるマイクロ RNA の遺伝子発現制御に関する解析」第 37 回日本分子生物学会大会、横浜、11.26.2014.
 10. 北條浩彦、高橋理貴、枝垂希子、福島達伸。(2014)「老化モデルマウスおよび正常加齢マウスにおける miR-29 の発現上昇とそれに伴うコラーゲンタイプ IV の発現低下」第 59 回日本人類遺伝学会大会、東京、11.21.2014.
 11. 高橋理貴、鈴木マリ、藤掛伸宏、村田美穂、和田圭司、永井義隆、北條浩彦。(2013)「野生型 α -シヌクレイン過剰発現に対する遺伝子発現量補正型 RNAi 誘導法の確立と有効性評価」第 36 回日本分子生物学会大会、神戸、12.3.2013.
 12. 古谷博和、菅原三和、渡邊暁博、荒畑創、笹ヶ迫直一、藤井直樹、高橋理貴、北條浩彦、江良沢実。(2013)「進行性骨化性線維異形成症の iPS 細胞を用いたアレール特異的 RNAi(ASP-RNAi)と薬剤スクリーニング」第 54 回日本神経学会学術大会総会、東京国際フォーラム(東京)、6.1.2013.
 13. 高橋理貴、枝垂希子、福島達伸、北條浩彦。(2012)「老化モデルマウスおよび正常加齢マウスにおける miR-29 の発現上昇とこれを介したコラーゲンタイプ IV の発現低下」第 35 回日本分子生物学会大会、福岡、12.11.2012.

〔図書〕(計 11 件)

1. 北條浩彦 : RNA 干渉(RNAi) . 医学のあゆみ 249: 389, 2014.
2. 北條浩彦 : 序章 . 原理からよくわかるリアルタイム PCR 完全実験ガイド(編集 : 北條浩彦)、羊土社、東京、pp3, 2013.
3. 北條浩彦 : 基本編 1、リアルタイム PCR の原理 . 原理からよくわかるリアルタイム PCR 完全実験ガイド(編集 : 北條浩彦)、羊土社、東京、pp14-21, 2013.
4. 北條浩彦 : 基本編 2、リアルタイム PCR の定量法 . 原理からよくわかるリアルタイム PCR 完全実験ガイド(編集 : 北條浩彦)、羊土社、東京、pp22-30, 2013.
5. 北條浩彦 : 基本編 10、プライマー/プローブの設計の手順 . 原理からよくわかるリアルタイム PCR 完全実験ガイド(編集 : 北條浩彦)、羊土社、東京、pp72-74, 2013.
6. 北條浩彦 : 実践編第 II 章 7、マイクロ RNA(miRNA)の cDNA 合成 . 原理からよくわかるリアルタイム PCR 完全実験ガイド(編集 : 北條浩彦)、羊土社、東京、pp129-133, 2013.
7. 高橋理貴 & 北條浩彦 : 実践編第 II 章 8、新規バイオマーカーを探す(加齢老化と関連する miRNA を例に) . 原理からよくわかるリアルタイム PCR 完全実験ガイド(編集 : 北條浩彦)、羊土社、東京、pp134-140, 2013.
8. 高橋理貴 & 北條浩彦 : 実践編第 III 章 12、SNP ハプロタイプを判定する(ハンチンチン遺伝子を例に) . 原理からよくわかるリアルタイム PCR 完全実験ガイド(編集 : 北條浩彦)、羊土社、東京、pp167-174, 2013.
9. 北條浩彦 : 次世代編 1、デジタル PCR の原理と応用 . 原理からよくわかるリアルタイム PCR 完全実験ガイド(編集 : 北條浩彦)、羊土社、東京、pp214-221, 2013.
10. 程久美子 & 北條浩彦 : RNAi の原理 . 遺伝子導入実験プロトコール(編集 : 仲嶋一範、北村義浩、竹内恒成)、羊土社、東京、pp40-43, 2012.
11. 北條浩彦 : siRNA, dsRNA の取扱いと導入の基本 . 遺伝子導入実験プロトコール(編集 : 仲嶋一範、北村義浩、竹内恒成)、羊土社、東京、pp55-58, 2012.

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称 : 「進行型免疫性脱髄疾患治療剤」
発明者 : 山村 隆、大木伸司、北條浩彦
権利者 : 国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター

種類 : 特願

番号 : 2014-135630

出願年月日 : 2014 年 7 月 1 日

国内外の別 : 国内

○取得状況(計 3 件)

名称 : 「siRNA, この siRNA を発現する組換えベクター、NR4A2 遺伝子発現抑制剤、IL-17 遺伝子発現抑制剤、および、CD4 陽性・・・」
発明者 : 大木伸司、北條浩彦、三宅幸子、山村 隆

権利者 : 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

種類 : 特許

番号 : 5098033

出願年月日 :

取得年月日 : 2012 年 10 月 5 日

国内外の別 : 国内

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 : 国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター

種類 : 特許

番号 : US 8,946,185 B2

出願年月日 : 2011 年 6 月 17 日

取得年月日 : 2015 年 3 月 3 日

国内外の別 : 国外

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又は優先的回収方法」

発明者 : 北條浩彦、高橋理貴

権利者 : 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

種類 : 特許

番号 : 5716217

出願年月日 : 2009 年 12 月 15 日

取得年月日 : 2015 年 3 月 27 日

国内外の別 : 国内

6 . 研究組織

(1)研究代表者

北條 浩彦 (HOHJOH HIROHIKO)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所神経薬理研究部・室長

研究者番号 : 60238722

(2)研究分担者

永井 義隆 (NAGAI YOSHITAKA)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・疾病研究第 4 部・室長

研究者番号 : 60335354