

機関番号：82611

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390251

研究課題名 (和文)

一塩基変異を認識し神経疾患原因遺伝子だけを特異的に抑制する RNAi 技術の確立

研究課題名 (英文)

Establishment of a novel RNAi knockdown targeting nucleotide variations in neurodegenerative disease-causing alleles.

研究代表者

北條 浩彦 (HOHJOH HIROHIKO)

(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・室長

研究者番号：60238722

研究成果の概要 (和文)：

本研究は、疾患原因遺伝子上の変異を目印に、正常遺伝子には影響しないで、その変異を持った病因対立遺伝子だけを特異的に発現阻害する次世代の対立遺伝子特異的 RNAi ノックダウン技術の確立を行った。本研究の成果により、プリオン病に関連する変異型プリオン遺伝子やハンチントン病の原因遺伝子、変異型ハンチンチン遺伝子に対して疾患原因遺伝子特異的な RNAi ノックダウンを誘導する siRNA を設計することに成功した。

研究成果の概要 (英文)：

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 specifically inhibited. Thus, ASP-RNAi is therapeutically useful for specifically inhibiting the expression of disease-causing alleles without suppressing the expression of corresponding wild-type alleles. To achieve ASP-RNAi, it is vital to design small interfering RNAs (siRNAs) conferring allele discrimination. We developed an easy assay system with reporter alleles. Using our assay system, we successfully designed and selected competent siRNAs conferring ASP-RNAi against mutant *Prion Protein (PRNP)* and *Huntingtin (HTT)* genes.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 平成20年度 | 6,200,000 | 1,860,000 | 8,060,000 |
| 平成21年度 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |
| 平成22年度 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 12,700,000 | 3,810,000 | 16,510,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：臨床神経分子遺伝学、RNAi

1. 研究開始当初の背景

RNAi は、簡便で優れた遺伝子発現の抑制技術であり、すでに基礎研究の分野では一般的なツールとなっている。さらに医療分野においても RNAi を用いた治療薬の登場が期待されている。しかしながら、これら従来の RNAi

はターゲット遺伝子に対してその発現を強力にノックダウンするように設計され使用されている。そのため正常型対立遺伝子、変異型対立遺伝子の区別なく目的の遺伝子は強力に抑制されていた。

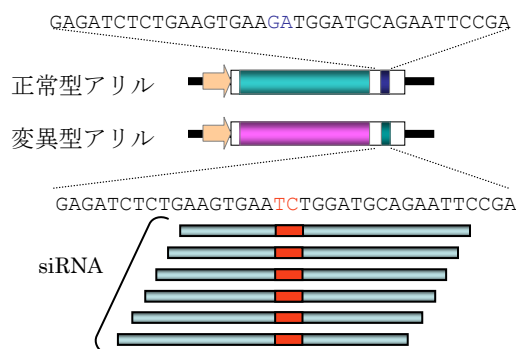
2. 研究の目的

前項で記したような対立遺伝子を区別しない強力な RNAi 抑制が必ずしも有用とはかぎらない。医療応用の場合、正常型対立遺伝子の RNAi ノックダウンによる副作用を考えると、正常遺伝子はそのままで病因となる変異型対立遺伝子だけを特異的にノックダウンすることが重要になる。そこで本研究は、疾患原因遺伝子上の変異を目印に、その変異を持った原因（対立）遺伝子だけを特異的にノックダウン（正常型遺伝子には影響しない）する次世代の RNAi 誘導技術の確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子、ウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子の 3' UTR に正常型、変異型の対立遺伝子オリゴ DNA 配列を挿入しレポーター対立遺伝子を構築する。変異型対立遺伝子の配列に対して設計した合成 siRNA とレポーター対立遺伝子を共にヒト培養細胞内に導入し、レポーター対立遺伝子の活性比から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する(図1)。

図1 レポーター対立遺伝子の構築



(2) 上記の方法から評価された対立遺伝子特異的 RNAi ノックダウンを誘導できる siRNA を使って、内在性のターゲット対立遺伝子または完全長の cDNA を持った発現ベクターを用いて、実際の mRNA に対して同様の特異的発現抑制が誘導されるか否かを解析する。RT-qPCR、ウエスタンブロット法を用いて確認する。

4. 研究成果

(1) プリオン病に関連するプリオン遺伝子変異そして家族性アルツハイマー病に関わる APP 遺伝子の変異をターゲットに対立遺伝子特異的 RNAi ノックダウンを誘導する siRNA

の設計そして評価スクリーニングを行なった。その結果、疾患原因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 を同定することができた。また、この一連の解析から対立遺伝子の識別を増強させる構造的修飾について新しい知見を得ることができた。

(2) 代表的なトリプレットリピート病であるハンチントン病の原因遺伝子、変異型ハンチンチン遺伝子を対象に解析を行った。トリプレットリピート病は繰返し配列の異常伸長が原因で発症するため、病因となる繰返し配列自身を RNAi のターゲットにすることは難しい。そこでハンチンチン遺伝子内の一塩基多型 (SNP) を新たなターゲットとして、変異型ハンチンチン遺伝子を特異的に RNAi ノックダウンする戦略を試みた。解析の結果、SNP を識別し、疾患原因遺伝子を特異的に RNAi ノックダウンする siRNA の設計に成功した。さらに、変異型ハンチンチン遺伝子上の SNP のタイピングやそのハプロタイプをすみやかに判定する新しい技術も確立した。これらの成果は、テーラーメイド RNAi 治療の実現に大きく貢献すると考えられる。

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 11 件)

1. Takahashi M., Watanabe S., Murata M., Furuya H., Kanazawa I., Wada K., and Hohjoh H. (2010) Tailor-made RNAi knockdown against triplet repeat disease-causing alleles. *Proc Natl Acad Sci USA*, **107**: 21731-21736. (査読有り)
2. Ohnishi Y., Totoki Y., Toyoda A., Watanabe T., Yamamoto Y., Tokunaga K., Sakaki Y., Sasaki H., and Hohjoh H. (2010) Small RNA class transition from siRNA/piRNA to miRNA during pre-implantation mouse development. *Nucl. Acids Res.*, **38**: 5141-5151. (査読有り)
3. Hohjoh H. (2010) Allele-specific silencing by RNA interference. In RNA interference. *Methods Mol. Biol.*, **623**: 67-79. (査読無し)
4. Eda A., Tamura Y., Yoshida M., and Hohjoh H. (2009) Systematic gene regulation involving miRNAs during neuronal differentiation of mouse P19 embryonic carcinoma cell. *BBRC*, **388**: 648-653. (査読有り)
5. Kitamura K., Ito Y., Yanazawa M.,

- Ohsawa M., Suzuki-Migishima R., Umeki Y., Hohjoh H., Yanagawa Y., Shinba T., Itoh M., Nakamura K., and Goto Y. (2009) Three human ARX mutations cause the lissencephaly-like and mental retardation with epilepsy-like pleiotropic phenotypes in mice. *Hum. Mol. Genet.*, **18**: 3708-3724. (査読有り)
6. Hohjoh H., Akari H., Fujiwara Y., Tamura Y., Hirai H., and Wada K. (2009) Molecular cloning and characterization of the common marmoset huntingtin gene. *Gene*, **432**: 60-66. (査読有り)
7. Tamura Y., Yoshida M., Ohnishi Y., and Hohjoh H. (2009) Variation of gene silencing involving endogenous microRNA in mammalian cells. *Mol Biol Rep*, **36**: 1413-1420. (査読有り)
8. Doi Y., Oki S., Ozawa T., Hohjoh H., Miyake S., and Yamamura T. (2008) Orphan nuclear receptor NR4A2 expressed in T cells from multiple sclerosis mediates production of inflammatory cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA*, **105**: 8381-8386. (査読有り)
9. Ohnishi Y., Tamura Y., Yoshida M., Tokunaga K., and Hohjoh H. (2008) Enhancement of allele discrimination by introduction of nucleotide mismatches into siRNA in allele-specific gene silencing by RNAi. *PLoS ONE* **3**(5): e2248. (査読有り)
10. 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ーメイド RNAi ノックダウン. *実験医学*, **29**: 931-934. (査読無し)
11. 佐々木裕之 & 北條浩彦. (2009) 機能性小分子 RNA の大規模シークエンス. *実験医学*, **27**: 14-19. (査読無し)
- [学会発表] (計 16 件)
1. Eda A., Fukushima T., and Hohjoh H. "Detection system for microRNAs using a fibrous DNA chip" 3rd Annual Biomarker Assay Development, San Diego, California, USA. January 31-February 2, 2011.
2. Takahashi M., Watanabe S., Murata M., Furuya H., Kanazawa I., Wada K., and Hohjoh H. "Identification of triplet repeat disease-causing alleles by a novel pull-down method and disease-causing allele-specific silencing by RNAi" 60th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Washington DC, DC, USA. November 2-6 (November 3), 2010.
3. Eda A., Tamura Y., Yoshida M. and Hohjoh H. "Systematic gene regulation pathway involving functional small RNAs during neuronal differentiation of mouse embryonic carcinoma cell" 59th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Honolulu, Hawaii, USA., October 20-24 (October 23), 2009.
4. Eda A., Tamura Y., Yoshida M. and Hohjoh H. "Gene regulation involving functional small RNAs during neuronal differentiation of mouse P19 embryonic carcinoma cell" RNAi Europe, Berlin, Germany, September 17-18, 2009.
5. 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 11-15 (November 12), 2008.
6. 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 11-15 (November 12), 2008.
7. 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, July 28-August 3 (August 1), 2008.
8. Takahashi M., Watanabe S., Murata M., Furuya H., Kanazawa I., Wada K., and Hohjoh H. (2010) 「Identification of triplet repeat disease-causing alleles by a novel pull-down method and disease-causing allele-specific silencing by RNAi」第 33 回日本分子生物学会大会、神戸、12.10.10.
9. 枝垂希子、福島達伸、北條浩彦. (2010) 「加齢に伴うマウス脳組織で発現するマイクロ RNA (miRNA) の発現プロファイル解析」第 33 回日本分子生物学会大会、神戸、12.9.10.
10. 枝垂希子、田村美子、吉田満史子、北條浩彦. (2009) 「Systematic gene regulation

involving miRNAs during neuronal differentiation of mouse P19 embryonic carcinoma cell」第 32 回日本分子生物学会大会、横浜、12.12.09.

11. 大西悠亮、十時泰、豊田敦、渡部聡朗、山本耕裕、徳永勝士、榊佳之、佐々木裕之、北條浩彦。(2009)「マウス初期胚に存在する機能性 small RNA の解析」第 82 回日本生化学学会大会、神戸、10.23.09.
12. 大西悠亮、徳永勝士、北條浩彦。(2009)「RNAi を用いたアレル特異的発現抑制の評価方法の確立と応用」第 54 回日本人類遺伝学会、東京、9.23.09.
13. 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。(2008)「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. 9.08.
14. 田村美子、北條浩彦。(2008)「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、12.10.08.
15. 北條浩彦、田村美子。(2008)「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、9.28.08.
16. 北條浩彦、藤原優子、明里宏文、田村美子、和田圭司。(2008)「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、7.10.08.

〔図書〕(計 2 件)

1. 北條浩彦:「フォーカストアレイによるマイクロ RNA 発現解析」. バイオチップ実用化ハンドブック、監修:金子周一、堀池靖浩、エヌ・ティー・エス、pp251-256、2010.
2. 北條浩彦:リアルタイム PCR 実験ガイド、編集:北條浩彦、羊土社、pp20-38、pp114-122、pp149-156、2008.

〔産業財産権〕

○出願状況(計 3 件)

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:財団法人ヒューマンサイエンス振興財団
種類:特願
番号:2009-283653
出願年月日:2009 年 12 月 15 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:独立行政法人国立精神・神経医療研

究センター
種類:特願
番号:2010-139925
出願年月日:2010 年 6 月 18 日
国内外の別:国内

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:特願
番号:2010-222847
出願年月日:2010 年 9 月 30 日
国内外の別:国内

○取得状況(計 2 件)

名称:改良された siRNA 分子およびこれを用いた遺伝子発現の抑制法
発明者:北條浩彦
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:2004264481
取得年月日:2010 年 3 月 25 日
国内外の別:オーストラリア

名称:改良された siRNA 分子およびこれを用いた遺伝子発現の抑制法
発明者:北條浩彦
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:4572299
取得年月日:2010 年 8 月 27 日
国内外の別:日本国

〔その他〕

特になし。

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北條 浩彦 (HOHJOH HIROHIKO)
(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・室長
研究者番号:60238722