

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：82611

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670428

研究課題名(和文) iPS細胞とRNAiを用いた新規解析戦略の確立とそれを用いたHTT遺伝子機能探索

研究課題名(英文) Establishment of a new method using pluripotent stem cells and RNA interference and examination of the Htt gene by the method

研究代表者

北條 浩彦 (Hohjoh, Hirohiko)

国立研究開発法人国立精神・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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ハンチンチン(Htt)遺伝子の機能や役割についてはよく分かっていない。本研究は、多能性幹細胞とRNAiを組み合わせた新しいアプローチによって、その解明につながるデータの取得を目指した。Httを抑制するsiRNA・shRNAの設計を完了し、アデノ随伴ウイルス(AAV)を用いたshRNA発現AAVの構築も完了した。そしてshRNA発現AAVをマウスES細胞に感染させHttのノックダウンを試みたが、導入効率の低さが原因で目的を達成することができなかった。従来法による導入も試みたが、強力な抑制を誘導することができなかった。今後はCRISPR/Cas9を採用した新規戦略で目的達成を目指したいと考えている。

研究成果の概要(英文)：The role and function of huntingtin (Htt) in cells has been poorly understood. In this study we attempted to obtain novel findings to lead to the elucidation of the Htt functions by a new approach using pluripotent stem cells and a RNA interference (RNAi) technique. Optimal small interfering RNAs (siRNAs) and short hairpin RNAs (shRNAs) against Htt have been successfully designed and shRNA-expression adeno-associated viruses (AAVs) have been constructed. Transmission of the constructed shRNA-expression AAV to mouse ES cells for suppressing the endogenous Htt genes was carried out, but resulted in a failure with a pretty low efficiency of AAV infection. A conventional method with synthetic siRNAs and a transfection reagent was also performed; however, the results could not indicate any marked suppression of the target Htt. Accordingly, the research project was unexpectedly difficult; but, it might be achieved if a recent genome-editing technique such as a CRISPR/Cas9 system were used.

研究分野：分子生命科学

キーワード：神経変性疾患 ハンチントン病 ハンチンチン遺伝子 RNAi shRNA AAV

1. 研究開始当初の背景

ハンチンチン (HTT) 遺伝子は、ハンチントン病 (HD) の責任遺伝子である。そのエクソン 1 にある CAG 繰返し配列が異常伸長した変異型 HTT 遺伝子は、HD の疾患原因遺伝子となる。この変異型 HTT に関する研究は、現在でも (世界中で) 精力的に進められている。では、正常の CAG 繰返し配列をもった正常型 HTT 遺伝子は、生体内、細胞内でどのような役割・機能を持っているのだろうか? 正常型 HTT に関する研究も行われているが、残念ながら、未だ明確な答えが得られていない。唯一明らかなのは、Htt 遺伝子のノックアウト (KO) マウスを作出すると、8.5 日胚までに胚性致死になるという事実である (Nasir et al., Cell, 1995; Duyao et al., Science, 1995; Zeitlin et al., Nat Genet, 1995)。

2. 研究の目的

ハンチンチン (Htt) 遺伝子のノックアウトマウスは 8.5 日胚までに胚性致死となるが、その Htt 遺伝子の胚発生過程における役割や細胞内の機能については未だよく分かっていない。本研究は、多能性幹細胞 (iPS 細胞など) と RNAi ノックダウン法を組合せた新しいアプローチによって、今まで不明であった Htt 遺伝子の胚発生過程の役割や細胞内機能について、その解明につながる新しいデータの取得を試みる。

3. 研究の方法

HTT 遺伝子を特異的に RNAi ノックダウンする siRNA の設計と評価を行う。その後、細胞内で恒常的な RNAi ノックダウンを実行するために、shRNA の設計そして shRNA 発現アデノ随伴ウイルス (AAV) を構築する。

健常人から樹立した iPS 細胞に HTT ノックダウンを誘導する shRNA 発現 AAV またはネガティブコントロール AAV を感染させ、

その後、分化誘導刺激をおこなう。細胞分化過程そして完全に分化した細胞集団からタンパク質、核酸のサンプルを調製し、それらを用いて網羅的な発現プロファイル解析をおこなう。二つのグループ間で発現に差のあるタンパク質、遺伝子を抽出し、それらを基に HTT ノックダウンによって影響を受ける細胞分化系譜を推定する。そして、免疫組織化学的方法などを用いて確認する。

4. 研究成果

HTT 遺伝子を特異的に RNAi ノックダウンする siRNA の設計と評価を行い、強い RNAi 活性を持った siRNA を設計することができた。その後、shRNA の設計そして shRNA 発現アデノ随伴ウイルスの構築も順調に進め、完了することができた。

多能性幹細胞については、健常人由来 iPS 細胞は樹立できていたが、まずは多能性幹細胞の培養技術の習得と練習を兼ねてマウス ES 細胞を用いた培養を行い、iPS 細胞培養に向けての準備を行った。その過程で、iPS 細胞を用いた場合の培養と細胞の維持・管理に多額の費用がかかることが試算され、マウス ES 細胞を用いた実験をそのまま先行させることにした。

構築した shRNA 発現 AAV をマウス ES 細胞に感染させたところ、感染効率 (遺伝子導入効率) が非常に低いことが分かった。様々な条件で検討を重ねたが、結局、この低導入効率は改善されなかった。そこで、従来法に立ち返り合成 siRNA をトランスフェクション試薬によって直接導入する方法を試みた。トランスフェクション後、RT-qPCR 法による Htt 遺伝子の発現量を調べた結果、ある程度の発現抑制は観察されたが、目的とする強力な発現抑制を示す結果は得られなかった。

当初の計画・予想よりも極めて困難な研究であることが分かった。しかし、近年のゲノム編集技術の目覚ましい発展により、新たな

打開策の道もみえてきたと考えている。本研究期間中に高効率のCRISPR/Cas9システムが確立され、その利用が可能になった。早速、このCRISPR/Cas9システムを取り入れ、内在性Htt遺伝子ノックアウトのためにガイドRNAの設計と選定を行っている。今後、有望なガイドRNAが選定されれば、多少遺伝子導入効率(トランスフェクション効率)が悪くても目的とする内在性Htt遺伝子をノックアウトしたES細胞株を樹立できると考えている。これらの成果については今後発表していきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件)

1. Raveney B., Oki S., Hohjoh H., Nakamura M., Sato W., Murata M., and Yamamura T. (2015) Eomesodermin-expressing T helper cells are essential for chronic neuroinflammation. **Nat Commun**, **6**: 8437.
2. Adachi N., Numakawa T., Nakajima S., Fukuoka M., Odaka H., Katanuma Y., Ooshima Y., Hohjoh H., and Kunugi H. (2015) Glucocorticoid affects dendritic transport of BDNF-containing vesicles. **Sci Rep**, **5**: 12684.
3. 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.
4. 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.
5. Fukuoka M., Yoshida M., Eda A., Takahashi M., and *Hohjoh H. (2014) Gene silencing mediated by endogenous microRNAs under heat stress conditions in mammalian cells. **PLoS ONE**, **9(7)**: e103130.
6. 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.
7. 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.
8. *Hohjoh H. (2013) Disease-causing allele-specific silencing by RNA interference. **Pharmaceuticals**, **6**: 522-535.
9. 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.
10. *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.**

[学会発表](計 11 件)

1. Fukuoka M, and Hohjoh H. Difference in plasma circulating free microRNAs between young and aged mice: A possible contribution of miR-1 on myogenic differentiation under a low temperature condition. 65th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, San Diego, CA, USA, Oct.9, 2015.
2. 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.
3. 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.
4. Fukuoka M, Yoshida M, Eda A, Takahashi M, and Hohjoh H. Gene silencing mediated by endogenous miRNAs under heat stress conditions in mammalian cells. 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, San Diego, CA, USA, Oct.20, 2014.
5. 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. 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, San Diego, CA, USA, Oct.19, 2014.
6. 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.
7. 福岡聖之、北條浩彦. (2015)「若年および老齢マウスの血中 miRNA の解析：若年マウス高発現 miRNA の筋分化への関与」第 38 回日本分子生物学会大会、神戸、12.1.2015.
8. 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.
9. 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.
10. 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.

11. 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、江良択実.(2013) 「進行性骨化性線維異形成症の iPS 細胞を用いたアレル特異的 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.

〔図書〕(計 10 件)

1. 北條浩彦: ずくなしのミニブレップ. 実験医学 33: 3161-3165, 2015.
2. 北條浩彦: ずくなしのトランスフォーメーション法. 実験医学 33: 1456-1460, 2015.
3. 北條浩彦: RNA 干渉(RNAi). 医学のあゆみ 249: 389, 2014.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.

9. 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.
10. 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.

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称: シナプス形成増強剤及び神経変性疾患治療剤

発明者: 北條浩彦 & 高橋理貴

権利者: 国立精神・神経医療研究センター

種類: 特許

番号: 特願 2015-248219

出願年月日: 2015 年 12 月 21 日

国内外の別: 国内

○取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者: 北條浩彦 (Hohjoh Hirohiko)

国立研究開発法人

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