

戦略的創造研究推進事業(SORST)

研究終了報告書

遺伝子発現の特異的抑制による
神経難病の新しい治療法の開発

研究期間 : 平成13年4月 1日
平成18年3月31日

研究代表者

金 澤 一 郎

国立精神・神経センター 総長

東京大学名誉教授

1. 研究実施の概要

神経系に主たる病巣をもち、原因不明で、根本的な治療法がない、いわゆる『神経難病』の中には、遺伝性を示すものがいくつかある。舞踏運動と精神障害を主とするハンチントン病はその代表であり、成人期に発病し、線条体細胞が選択的に脱落し、優性遺伝することで知られる。その他にもアルツハイマー病、パーキンソン病、脊髄小脳変性症あるいは筋萎縮性側索硬化症などのように、一部の症例に遺伝性を示すものがある疾患も少なくない。

これら遺伝性の疾患の多くは、DNA異常すなわち遺伝子異常によってもたらされるが、これまではDNAの一塩基置換やDNA鎖の一部の欠失などが最もポピュラーな形式であった。けれども、興味深いことに100年を越える遺伝学の長い歴史の中で、これまで知られずに来た新しい形式の遺伝子異常があることが15年ほど前に明らかになった。それは、正常人にもある程度の長さ存在する三塩基の繰り返し配列(トリプレットリピート)が、ある限度を超えて伸長したために疾患になるという新しい形式の遺伝子異常である。

このような異常な伸長を示すトリプレットリピートにはCTGやGGAなどいくつかあるが、その中で最も多いものに、CAG(グルタミンに対応するコドン)のリピートが異常に伸長する、いわゆる「CAGリピート病」と呼ばれる一群がある。例えば、ハンチントン病や遺伝性脊髄小脳変性症としてのマシヤド・ジョセフ病やDRPLAなど10種類以上の疾患がこれに属する。正常範囲に収まっているCAGリピートは、ヒトのゲノムにはかなり多いことが分かっている、その多くはDNAの鎖の蛋白質に翻訳される部分、すなわちエクソンのオープンリーディングフレーム(ORF)内に存在する。言い換えれば、我々ヒトではある程度の長さのグルタミン鎖をもつ蛋白質が数多く発現していることになる。CAGリピート病では、従って「異常に長いグルタミン鎖を持つ蛋白質」を作る遺伝子が発現していることになる。事実、ハンチントン病を含む多くのCAGリピート病では、こうした異常な蛋白質(ハンチントン病の場合、この蛋白質をハンチンチンと呼ぶ)が脳をはじめとする多くの臓器に存在することが証明されている。

さらに、このような異常に長いグルタミン鎖をもつ蛋白質、例えばハンチンチンは β シートを形成して互いに凝集する性質を持っており、同時に他の無関係な蛋白質をも巻き込んで凝集体あるいは封入体を形成することがわかっている。実際、1996年以降、ハンチントン病のモデル動物においても、あるいは患者の脳においても、細胞内や核内に封入体が見出されることが明らかになってきた。この封入体の存在そのものが、神経細胞死に直結するかどうかについては議論があるが、少なくともCAGリピート病のマーカーであることには疑問の余地はない。

ハンチントン病においては、大脳基底核の線条体の神経細胞が選択的に変性・脱落するけれども、その選択性が何によるのであるかは明らかでなかった。これに対して我々は、SORSTに先立つCREST研究において、ハンチントン病で死亡した患者の凍結脳を用いて単一神経細胞の発現遺伝子解析技術による世界初の予備的な研究を行い、残存する線条体細胞では正常ハンチンチンに

比して異常なハンチンチンの発現量がわずかではあるが相対的に多いことを見出した。このような状態が長年にわたって続くことによって線条体細胞に選択的な細胞死がもたらされることが示唆された。

以上の事実を総合すると、ハンチントン病の根本的な治療法として、異常遺伝子の発現を抑制することを基本とした方法があることが強く示唆されたのである。そこで、我々のSORSTにおける基本構想の根幹には、ハンチントン病遺伝子の発現を特異的に抑制することを据えることにした。そのための方法として、目的とする遺伝子だけを抑制するという観点から言えば、特異性を確保することが重要であり、そのためにはアンチセンス鎖を用いたRNAレベルでの抑制法がある。しかし、これは不安定な一本鎖RNAを用いるものであり、実験レベルでは有効であってもRNAseにより生体内では直ちに破壊されてしまう。

そこで我々が考えたのが、植物や下等動物の遺伝子発現抑制に有効とされる『二重鎖RNAを用いるRNA干渉法(RNAi)』である。これなら特異性は十分に確保されているし、生体内での安定性もある。ただし、アンチセンス法の場合のような長いRNA鎖を哺乳動物に用いたのでは、多くの遺伝子の発現を非特異的に抑制してしまうとされていた。これに対して Elbashir らは 2001 年に、20~25塩基対からなる短い二重鎖RNA(short or small inhibitory RNA:siRNA)を用いることにより、極めて特異的に目的とする遺伝子の発現を抑制することができることを報告した。

この報告を受けて、これまでの計画を多少変更することにした。すなわち、ハンチントン病遺伝子の塩基配列についてコンピュータでBLASTサーチを行い、連続する21個の塩基対の中で、ハンチンチン遺伝子に極めて特異的な(他の遺伝子には認めないという意味)ユニークな塩基配列をいくつかをまず見出した。それらは、5'端の非翻訳領域あるいはCAGリピートに比較的近い翻訳領域などからであった。これらの二重鎖RNAを合成して、その効果を調べる実験に供した。

これらのsiRNAの効果をみるために、まず培養細胞レベルでの効果を見ることから始めた(in vitro effect)。そのために我々は、GFP(green fluorescent protein)遺伝子をハンチンチン遺伝子のエクソン1につないだコンストラクトをあらかじめCOS7細胞あるいはNeuro2A細胞などトランスフェクトして実験を行った。この培養細胞を用いることにより、蛍光顕微鏡下でGFPを観察することができれば、そこにはハンチンチン遺伝子が発現しているとみなせる。この培養細胞に様々な濃度のsiRNAを直接適用することにより、遺伝子抑制効果を検討した。

その結果、用いたsiRNAのうち、非翻訳領域に対するものはある程度効果を認めたものの効果は比較的弱いものであった。それに対して、CAGリピート部の近傍領域に対するsiRNAは、わずか5nmolの濃度で明らかな抑制効果を認め、40nmolではほぼ90%のハンチンチン遺伝子発現抑制が可能であった。なお、間接的にGFPの蛍光の強さを指標にするのではなく、ハンチンチン遺伝子そのもののmRNAの発現量をライトサイクラーにて直接測定した場合にも、同様の結果を得ることができた。またこの抑制効果は、 β -actin やGAPDH遺伝子などには抑

制効果がないことを確かめてあり、ハンチンチン遺伝子に対して特異的であると考えられた。我々はこの siRNA の塩基配列とそのハンチンチン遺伝子発現抑制効果について、Nature 誌に投稿したが、一般的な話題ではないというコメントにより受領されなかったので、同年中の報告の必要性から Proc. Japan Acad. (2003) に発表するとともに、特許を出願した。

次のステップとして、丸ごとの動物としてのマウスに対する我々の siRNA の効果 (in vivo effect) を検討した。ハンチントン病モデルマウスとしては、英国のベイツ嬢が作成し、米国のジャクソン研究所で販売しているモデルマウス (R6/2) を購入して繁殖させた。このマウスは、ヒトのハンチンチン遺伝子の CAG リピート領域を含むエクソン 1 のみを導入発現させたトランスジェニックマウスであり、CAG のリピート数が 150 個程度にまで極端に伸長している。このマウスは通常は 9 週ごろから体重減少、体幹や四肢の振戦などで発症し、15 週までに痙攣や無動状態を呈して死亡する。生後 2 日目のマウスの脳内に、我々が開発した siRNA をトランスフェクタミンとともに 40nmol 程度注入しておいた R6/2 マウスでは、処理していないマウスに比して体重減少が軽度であり、1ヶ月程度寿命が延長し、オープンフィールドテストにおける運動量減少も軽度に留まった。

このように臨床的に効果があった個体の脳を病理形態学的に検索したところ、線条体の萎縮は軽度にとどまり、脳室の拡大もその程度が明らかに軽度であった。これらの個体の脳では、神経細胞内封入体の頻度や程度も、siRNA 処理を受けなかったマウスに比べて、siRNA 注入マウス脳では明らかに軽いものであった。さらに、ハンチンチン遺伝子の発現の程度をこの遺伝子の mRNA 量で測定したところ、siRNA 処理によって明らかに減少しており、ハンチンチン遺伝子の発現抑制が明らかであった。この結果は、Science に投稿したが、またも一般的な話題ではないとされ、次いで投稿した Nature Medicine には、ハンチントン病ではない別の CAG リピート病のモデルに対する siRNA 治療を試みた論文が同誌に 2ヶ月前に載ったばかりであることを主たる理由にして受領されなかった。そこで我が国の神経科学領域の国際誌である Neuroscience Research に投稿して受領され、すでに発行されている (2005)。

その後、siRNA と塩基配列上は類似しながらも、分子内にヘアピン構造を有する shRNA (small hairpin RNA) の方が siRNA よりも効果が強いという報告がなされるようになった。そこで、shRNA の効果を siRNA 効果のそれと比較するために、siRNA を用いた in vivo 実験とほとんど同一のプロトコールで研究を行った。その結果、確かに効果は shRNA の方が強いことを確認したが、その効果は定性的にほとんど同じであることが分かった。それだけでなく、この事実は siRNA を用いた実験の再確認にもなったと考えており、現在論文として投稿する予定である。

この 5 年間、ハンチントン病の原因遺伝子発現抑制を目指して SORST 研究を進めてきた。臨床応用の入り口まで今一歩というところで終了することになったが、この計画段階で「RNAi など実現不可能」と言われたことを思い出すと、よくここまで来たものだ、という思いである。これからの研究は、SORST での共同研究者達が引き継いでくれることになっているので、大いに期待している。

2. 研究構想

研究開始時には、もう少し大きい目標を掲げていた。すなわち、このSORST開始前に行っていたCRESTでの研究成果の中に、新しいナトリウムイオンチャンネルの発見も含まれていたため、そのチャンネル異常によって起こりうる神経難病として「てんかん」を含めた計画を構想していた。また、二重鎖RNAの脳への導入時を考慮して、RNAに塩基性ペプチドを結合させた新規分子を構想していた。

しかし、チャンネルにまで実際には手を伸ばす余裕がないことが分かったので、ハンチントン病のテーマに集中することにした。また、予備的にRNAと塩基性ペプチドとの結合を行って成功したものの、残念ながら肝心のRNAの作用が失われることを見出すこととなり、ドラッグデリバリーシステムの問題は後に考慮することとし、まずはハンチントン病遺伝子の発現抑制を可能にするであろう二重鎖RNA (siRNA) の効果を明確にすることを最優先とした。

3. 研究内容

1) 本研究の背景

①ハンチントン病の病態は可逆性であると考えられること

日系アメリカ人である Ai Yamamoto を第一著者として2000年に Cell に掲載された論文がある。これは、テトラサイクリンを投与することによって、ある特定の遺伝子に発現停止を起こさせる、いわゆる Tet-Off と呼ばれる方法を用いてハンチントン病遺伝子をノックアウトした実験である。ある一定の条件時に遺伝子をノックアウトするところから、コンディショナル・ノックアウト法といわれる方法の一つである。その結果、異常ハンチンチン遺伝子の発現をオフにした後には、線条体の体積が正常に近づき、線条体のグリオーシスの程度が減り、線条体細胞表面に発現しているドパミンD2受容体量が正常に近づいた、という。これらの結果は、もちろん同一動物から得た知見ではないものの、異常なハンチンチンの発現を抑制してやれば、ハンチントン病も臨床的によくなるのではないかと、という希望を持たせるに十分な結果であった。

②二重鎖RNAによって遺伝子発現を抑制することができる

私は最もストレートに、異常なハンチンチンの発現をあるレベル以下にまで抑制することこそが、根本的な治療であると考えた。特異性を維持しながらそれを実現する方法として、まずRNAの機能を抑制するアンチセンス法がある。しかしながら、一本鎖RNAを用いるこのアンチセンス法は、実験レベルでは有効であってもRNAseにより生体内では直ちに破壊されてしまうという致命的な欠陥がある。色々考えている頃、世の中では盛んに二重鎖であるRNAによるRNAi (RNA interference) 法が話題になってきた。私自身は、それは植物かショウジョウバエの世界の話であろうと思っていたところ、当時東大医科学研究所教授の勝木元也氏 (現在は、岡崎の基礎生物学研究所長) から、そうではなく哺乳類でもうまく行くかも知れないという話を伺った。しかも二本鎖であるからRNAとはいえ安定性も

よく、従って我々の目的には特異性、確実性、効率などから考え、RNAi を用いることがもっとも適切であろうと考えた。このような筋道を考えていたのは2000年のはじめ頃のことである。その当時は、今ほどRNAi は注目されてはいなかった。ところが、2001年に Elbashir を第一著者とする Tuschl のグループから出された Nature 論文によって、哺乳動物においてはsiRNA (small inhibitory RNA: 小さい抑制性の二重鎖RNA) でなければならないことが明らかとなり、逆に哺乳動物でもこのRNAiが働くことが分かったことで世界中が注目することとなった。すなわち、これまで哺乳動物に対してRNAi の研究がうまく行かなかったのは、それまでに一般的に用いられていた大きい二重鎖RNAを用いた場合は、フェージなどの侵入と受け取ってしまって非特異的な反応が起こってあらゆる遺伝子がシャットダウンしてしまう。従って、哺乳動物の場合は特異的にある遺伝子だけを抑制するには21mer程度のsiRNAでなければならない、というのである。現在ではさらに進んで、小さいヘアピン構造をとるいわゆるshRNA (small hairpin RNA)の方が効率が良いということも言われている

2) 特異的siRNAの作成

2001年に我々は、Elbashir の新知見に基づいてsiRNAを作成することにした。まず、公開されているデータベースのBLASTを検索することにした(高木利久先生と村上大勇君による)。ハンチンチン遺伝子の中で連続する21merのユニークな塩基配列を求めて検索をかけて9個選択し、さらに、そのうちで極めてユニークな配列、つまりハンチンチン以外の遺伝子にはほとんどないような配列2種類を候補としてはCAGリピートの直前で選び出す事ができた。その内の1個は5'UTRにあり(siRNA-5'UTRと名づけた)他のORF内の配列(siRNA-HDExon1と名づけた)であった(図1)。後に述べるように、この2種類のうちではsiRNA-HDExon1が極めて効率よくハンチンチン遺伝子発現を抑制することが分かったが、ハンチンチン遺伝子のmRNAの二次構造上にプロットしてみると、抑制効力の低いsiRNA-5'UTRはヘアピン構造とは無関係であったが、抑制効力の高いsiRNA-HDExon1はヘアピンをほぼ完全に覆うような位置にあった(図2)

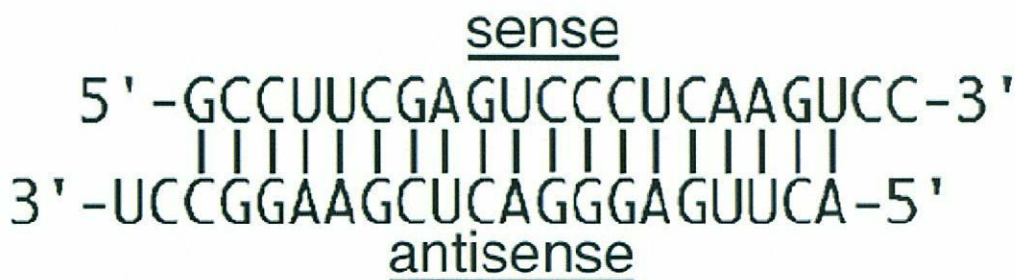


図1 我々がハンチンチン遺伝子発現の抑制を目指して作ったsiRNA (siRNA-HDExon-1)の塩基配列。(Liu et al, Proc Japan Acad,2004)

siRNA-HDexon1のターゲットとなるエクソンを含む HD遺伝子に対応するmRNAの二次構造

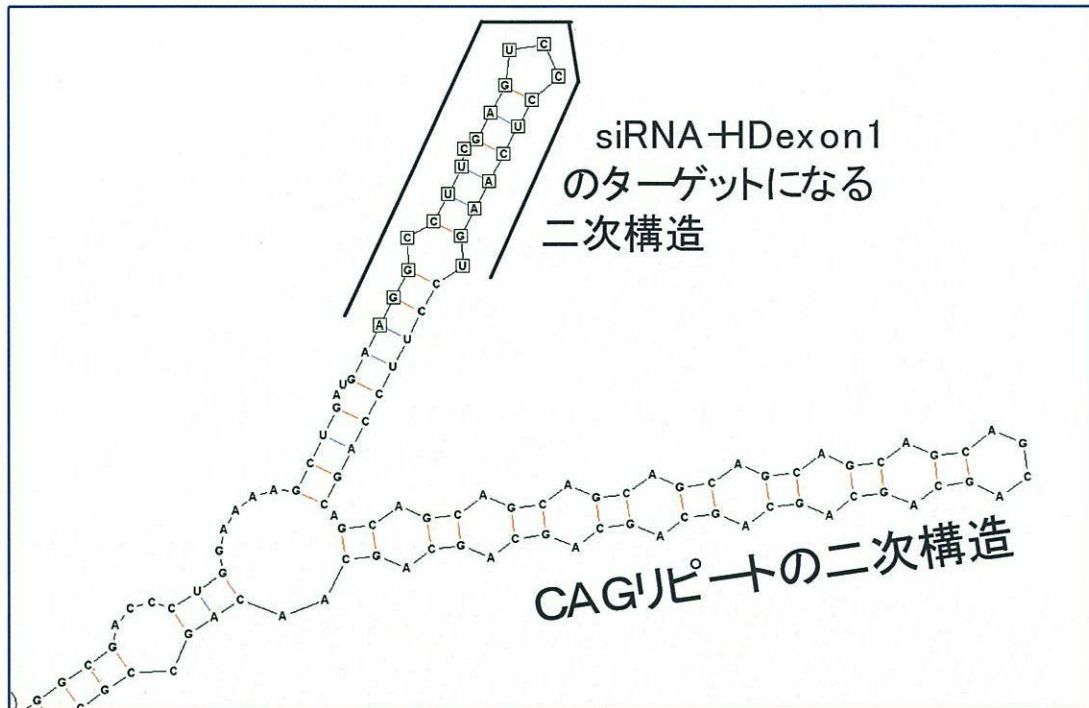


図2 我々が作成した siRNA である siRNA-HDExon1 がターゲットとする、ハンチンチン遺伝子の mRNA の二次構造での位置。ハンチンチン遺伝子の ORF の開始点のすぐ近くである (Lie et al, 未発表)。

3) 培養細胞に対する特異的 siRNA の効果

これらの siRNA を培養細胞に導入してその効果を確認した。培養細胞としては、COS7 細胞 (サル由来) または SH-SY5Y 細胞 (ヒト由来) などを用いたが siRNA の効果は本質的には同じであった。細胞には、あらかじめ正常範囲の長さの CAG リピートあるいは異常に長い CAG リピートのいずれかを持つハンチンチン遺伝子のエクソン1を蛍光蛋白である GFP 遺伝子と繋いだコンストラクトを導入してある。効果は、蛍光の強さ (すなわちハンチンチン蛋白発現) あるいは内因性ハンチンチンのライトサイクラーによる定量的 PCR によって抑制効果を確認した。なお、siRNA は様々な量を細胞に投与したが、数 nmol 付近の濃度からハンチンチン遺伝子の発現抑制効果が始まり 40 nmol ではほぼ完全な抑制効果であった (図3)。なお、担体のみや無関係配列の siRNA を用いたのでは抑制されなかった。ハンチンチン遺伝子に対する発現抑制効果は siRNA-HDExon1 が最も強く、

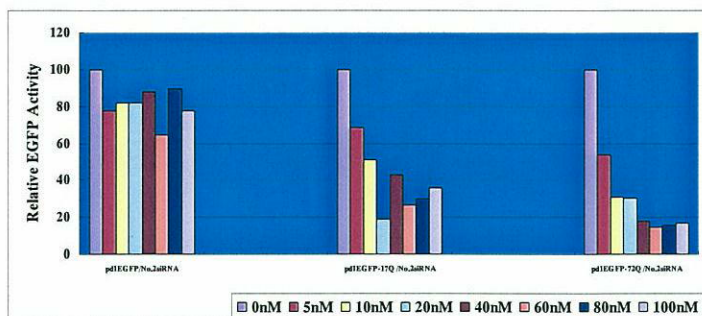


図3 左はGFPのみを含みハンチンチン遺伝子を含まない細胞。真ん中は正常のサイズのCAGリピートを持つ細胞。右は異常に長いCAGリピートを持つ細胞 (Lie et al, Proc Japan Acad, 2004)。

siRNA-HDExon1 の最終濃度

siRNA-5' UTR の効果はわずかであった。一方、siRNA-HDExon1 による処理後にハンチンチン、 β -actinおよびGAPDHの各遺伝子発現をライトサイクラーによるRT-PCRで定量したところ、ハンチンチン遺伝子のみが選択的に抑制されていることが判り、選択性も確保された(図4)。

siRNA-HDExon1 によるハンチンチンの発現抑制は特異的である

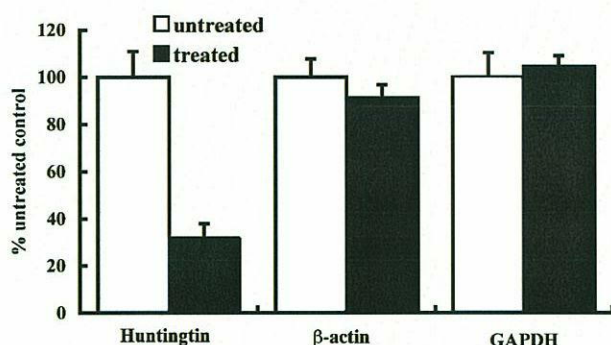


図4 siRNA-HDExon1 が特異的作用を持つことを示す実験。白カラムは siRNA-HDExon1 で処理しない場合、黒は処理した場合の、それぞれの遺伝子の発現量をRT-PCRで検討したもの。抑制が見られるのは左端のハンチンチンだけであり、真ん中の β アクチンや右端のGAPDHには影響がないことを示す (Liu et al, Proc Japan Acad, 2004)。

4)ハンチントン病モデルマウスに対する特異的siRNAの効果

次に我々は、Bates氏が作成し、米国のJacksonラボラトリーから購入することができる、著しく伸長したCAGリピート(144個)をもつヒトのハンチンチン遺伝子が発現しているハンチントン病モデルトランスジェニックマウス(R6/2)を購入し、飼育した。このハンチントン病モデルマウス用いて siRNA-HDExon1 の動物個体での効果を検討した。このモデル動物は、通常は生後7~8週目あたりから四肢の振るえがはじまり、歩行もやや不安定になり、徐々に進行する。尾を持って吊り下げると10~15秒以内に四肢を丸めるという反応を示す。この反応はハンチントン病モデルマウスにのみ見られる特有な現象ではないが、少なくとも発症の程度を示す指標にはなる(図5)。また、このモデルマウスは大体その頃から体重が増

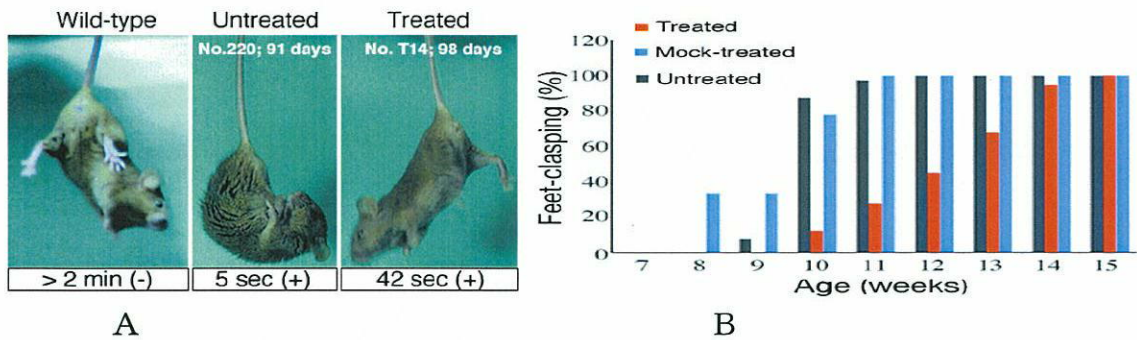


図5 尾吊り上げ試験の結果

尾をもって吊り下げると(A)、正常マウス(左)では2分以上にわたって騒ぎまくるが、このモデルは10秒以内に手足を縮めて丸くなる(中央)。siRNA-HDExon1 処理を受けたマウス(右)は40秒以上経っても普通のまま。右グラフ(B)はその定量結果である。

加しなくなり、10週くらいからは減少に転じてくる(図6)。あまり著明とはいえないが、統計的にはsiRNA処理後の群では体重減少の程度は未処理の群のそれに比して少ない。

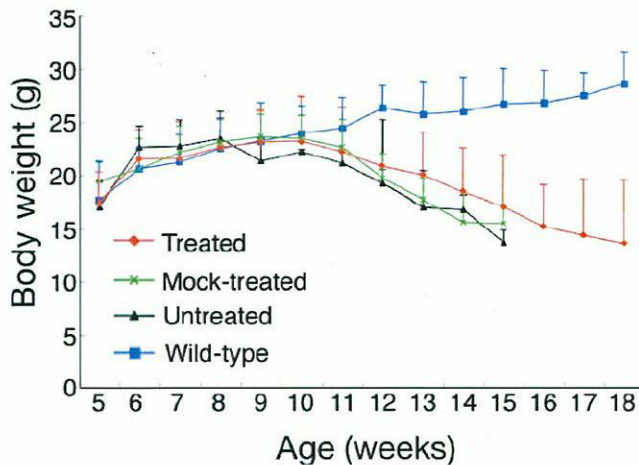


図6 体重の変化

R6/2トランスジェニックマウスは、何もしないでいると(黒)生後8週目辺りから体重減少が見られる。生後2日目に脳内に siRNA を注入した場合(赤)には、野生型(青)に比して体重減少はあるが、程度は軽い(Wang et al, Neurosci Res, 2005)。

また、発症したR6/2マウスは、次第に行動量が減少してくる。このことはオープンフィールドでの行動軌跡を調べると一目瞭然である(図7)。未処理のマウスでは週を経るごとに次第に行動量が減少して行くのが良くわかる。しかし、siRNA処理後の群では行動量の減少は緩やかであり、正常のマウスに近い。また、6~8週時点で、回転する水平の太い棒に乗せられたマウスがどのくらいその棒に乗っているかを調べるロタロッドテストを行うと、siRNA処理後の群では未処理マウスに比して有意に長い時間乗っている、という結果であった(図8)。つまり、運動機能が改善しているということになる。siRNA処理を受けていないR6/2マウスは、ほとんど全て15~16週までに死亡する。それに対して、生後2日目に、

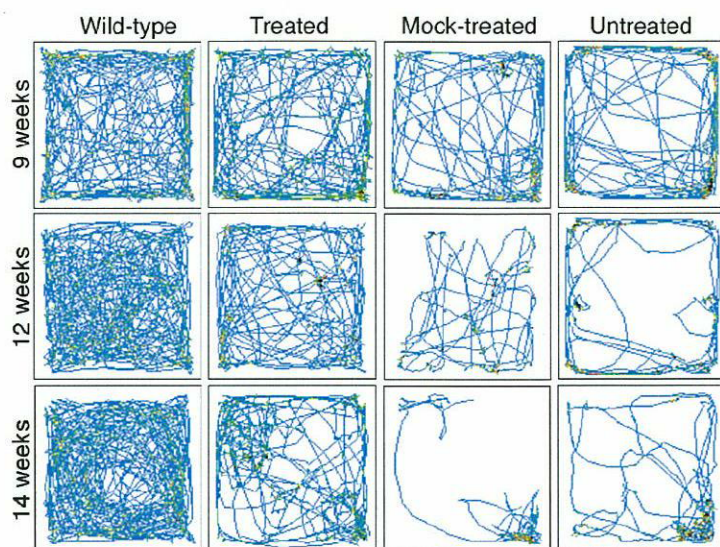


図7 オープンフィールドでのマウスの行動軌跡。
正常マウスに比して、R6/2(右側2列)の動きは
少なくなるが、siRNA-HDExon1 処理を受けた
マウスの動きは良い。(Wang et al, Neurosci
Res,2005)。

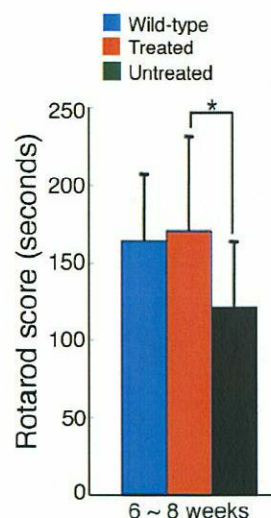


図8 ロタロッドによる成績は、siRNA 処理で成績は良くなる。

siRNAを脳内に注入されたマウスは、12週令頃から、延命効果が明らかになってきて、Kaplan-Meier 生存曲線を見ると siRNA-HDExon1 の注入によって明らかに1ヶ月近く生存が延長した(図9)。R6/2マウスは15週頃に屠殺し、まず形態学

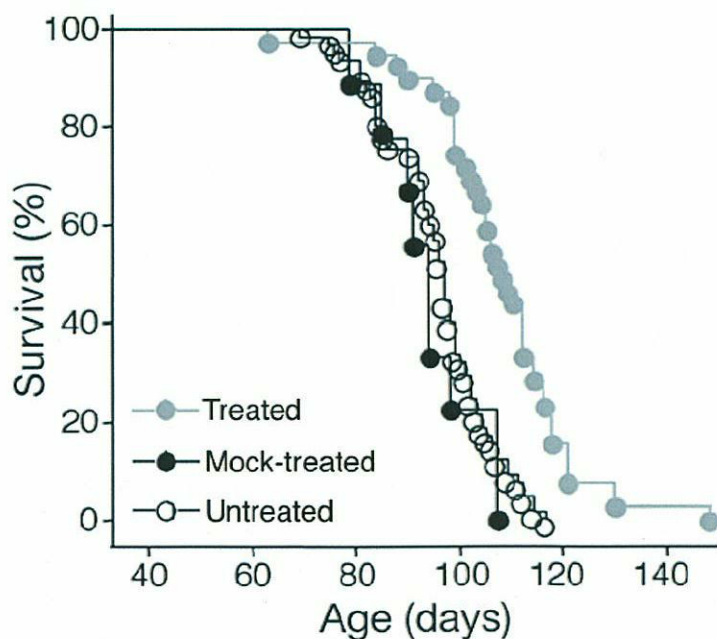
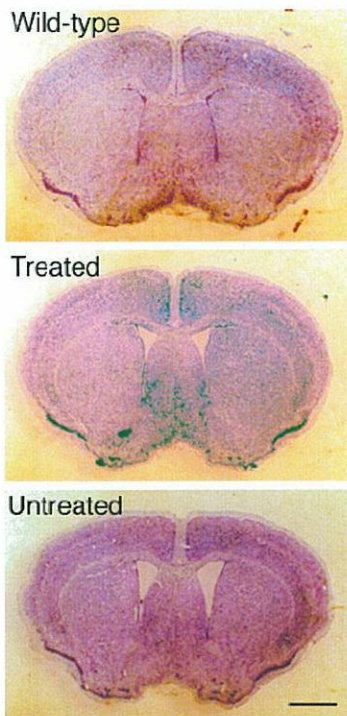


図9 生存曲線

このR6/2トランスジェニックマウスは何もしないで自然経過に任せた場合(白丸)あるいは siRNA を溶かす溶液だけを脳内に注入した場合(黒丸)には15~16週頃まで全部が死ぬ。しかし生後2日目に脳に siRNA-HDExon1 を注入した場合(灰丸)には20週ごろまで生存するものもいて、明らかに延命効果がある (Wang et al, Neurosci Res,2005)



的に脳を見ると(図10)、正常マウスでは脳室はほとんどスリット状に狭くなっている(上段)けれども、それに対して、R6/2マウスでは明らかに線条体の萎縮によって脳室が開大していることが分かる(下段)。それに対して siRNA-HDExon1 を生後直ぐに注入されたマウスでは(中段)、完全に正常ではないが、少なくとも正常との中間程度にとどまっている。やはり siRNA-HDExon1 は病気の進展を抑制する効果があったと考えざるを得ない。

図10 各グループのマウスの線条体が見えるレベルでの前額断写真。説明は本文(Wang et al, Neurosci Res, 2005)。

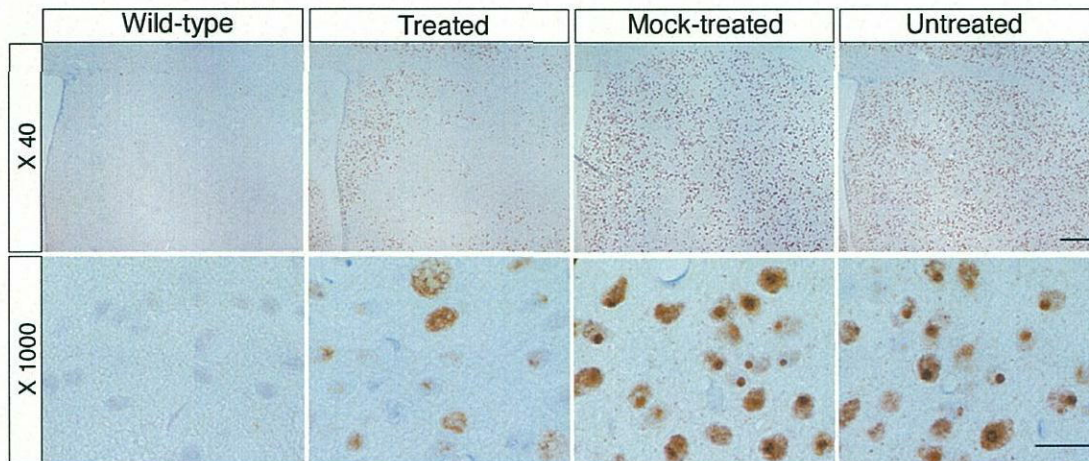


図11 siRNA 処理によって線条体の封入体形成が著しく減少することを示した免疫組織化学的写真。8週令のマウス脳切片を変異ハンチンチンに対する特異抗体によって染色したもの。Mock 処理および未処理のR6/2では、線条体の多くの神経細胞は染色されるが、siRNA-HDExon1 で処理されたマウスでは極めて少数である。(Wang et al, Neurosci Res, 2005)。

ところで、これらのモデルマウスでは、もともと神経細胞死あるいは脱落などはあまり強いものではないとされている。しかし、CAGリピート病の疾患マーカーとして、神経細胞核内に異常ハンチンチンを中心とする蛋白の凝集による封

入体が形成され、これらの封入体は抗ハンチンチン特異抗体でよく染まる(図11右側の2列)。それに対して siRNA-HDExon1 を生後2日目に脳内に注入しておいたマウスでは(図11の左から2列目)、封入体形成も少なく、抗ハンチンチン抗体で染まる構造物も少ない。

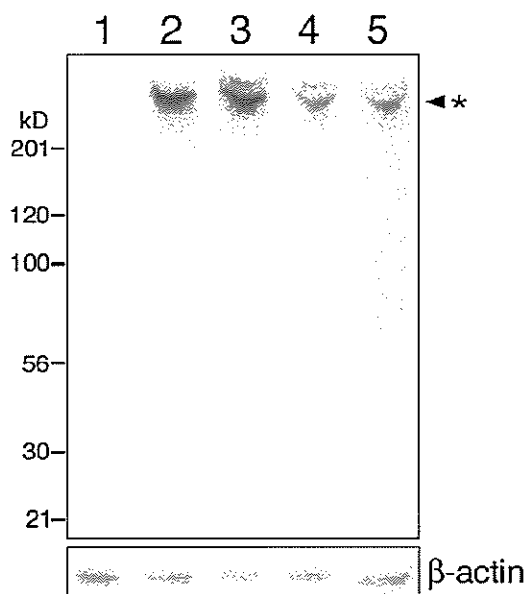


図12 R6/2マウス脳のウェスタン解析。
siRNAによって、実際に異常ハンチンチン蛋白質の産生が抑制されたのかどうかを直接的に調べた実験である。レーン1は、全く正常なマウス脳である。レーン2と3は、siRNA 処理を受けていないR6/2マウス脳で、レーン4と5は生後2日目に脳内に siRNA-HDExon1 の導入を受けたR6/2マウス脳である。ハンチンチン蛋白質の分量は大きいので、★の部分に見えるが siRNA 処理を受けたマウスでは受けなかったマウスよりも明らかにハンチンチン蛋白質は少ない。(Wang et al, Neurosci Res,2005)。

すなわち、siRNA- HDExon1の注入は線条体萎縮に伴う脳室拡大を抑制し、線条体での核内封入体の形成も抑制していることも明らかになった。最後に、これまではハンチンチン遺伝子の発現を siRNA-HDExon1 が抑制したことを間接的に示してきたが、ここでハンチンチン蛋白質そのものを見た実験結果を示すことにしよう(図12)。この図のレーン2, 3とレーン4, 5とを比較すると、siRNA-HDExon1 処理を受けたレーンの方が、明らかにバンドの大きさや濃さが低いことがわかる。このように siRNA-HDExon1 はハンチンチン遺伝子を完全に抑制したわけではないが、動物個体でもハンチンチン遺伝子発現抑制効果を持っていると考えることができる結果であった

興味深いことは、siRNA- HDExon1 の脳内注入は、生後2日目に1回行なっただけであるにもかかわらず、その効果が10週間以上継続したように見えることである。ここに示してはいないが、脳に導入した siRNA-HDExon1 そのものは2週間以上脳内にとどまっていなかったことを確かめてある。従って、なぜこのように効果が長く続いたのか、そのメカニズムは分からない。もう一つの大きな問題は、脳にいかにして siRNA を効果的に到達させるか、というドラッグ・デリバリーについてであり、今後の大きな課題である。

なお、siRNA-HDExon1 は、異常なハンチンチン遺伝子だけでなく、正常のハンチンチン遺伝子の発現をも抑制するものである。従って、実際に臨床応用することを考えると、正常ハンチンチンを抑制した時に何が起きるかを良くチェックして

おかなければならない。現在考えられている正常ハンチンチンの機能は、大脳皮質一線条体グルタミン系に含有される脳由来神経栄養因子 Brain Derived Neurotrophic Factor: BDNF)が、軸索輸送されるのを助けているということであり、それが欠如すると線条体細胞の生命が危うくなるとではないか、と考えられている。もしこれが事実であるとするれば、siRNA を投与する際にBDNFも同時に投与するなどの工夫が必要かも知れない。それよりも、このようなストーリーは基礎的な研究レベルを越えて臨床的研究レベルに到達した場合には、異常ハンチンチンの発現を0にするなどと言うことを考える必要性は全くないのであって、もしかしたら10～20%抑制するだけで十分な「臨床的効果」が得られるかも知れないと考えている。ここでいう「臨床的効果」とは、ハンチントン病の発症年齢を著しく遅くし、多少の舞踏運動があっても日常生活にはほとんど支障がなく、知的活動もほとんど問題なく、精神的にも安定している状態、を維持できる効果をいう。なにも、舞踏運動を完全に押さえ込むことや、次世代の子供達が全く発症しないことを目標とするならば、これはかなりキツイ話になる。家族の人達と一緒に生活しつつ、最後まで尊厳を保ちながら天寿を全うしてもらうのが、臨床医的治療の目標なのではないか、と考えている。この世からハンチントン病を抹殺しようとするとかかなりやっかいな問題を生むことになる。うまくつきあえる相手程度にまでに押さえ込むことを目標としてはどうか、というのが私の考えである。

4. 研究実施体制

(1) 体制

国立精神・神経センターグループだけと考えてよい。

(ただし、3年目に代表者が当センターに移動するに当たって、1年間だけ東大神経内科にも小さなグループを残した。また、初めの2年間はRNAと塩基性ペプチドの結合化合物作成を諦めきれずに試みていたために、外部の研究者と共同研究を行っていたが残念ながら実りがないことが判明して、整理した)

(2) メンバー表

氏名	所属	役職	研究項目	参加期間
金澤一郎	NCNP	総長	総括	H13.4 ~ H18.3
和田圭司	NCNP NIN	部長	研究指導	H14.4 ~ H18.3
村田美穂	NCNP MH	部長	症状評価	H13.4 ~ H18.3
北條浩彦	NCNP NIN	室長	in vitro	H15.4 ~ H18.3
劉万兆	SORST	研究員	in vitro	H13.6 ~ H18.3
王玉来	SORST	研究員	in vivo	H15.4 ~ H17.12
桜井省花子	SORST	研究員	delivery	H16.10 ~ H18.3
堤悦子	SORST	事務員		H14.4 ~ H18.3

(註) NCNP:国立精神・神経センター、NIN:神経研究所、MH:武蔵病院

5. 研究機関中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等
なし

(2) 招聘した研究者等
なし

6. 主な研究成果

(1) 論文発表 (和文 4 件、欧文 33 件)

- 1) Kanazawa I: How do neurons die in neurodegenerative disease? Trends in Molecular Medicine, 7:339-344, 2001
- 2) Shoji M, Iwakami N, Takeuchi S, Waragai M, Suzuki M, Kanazawa I, Lippa CF, Ono S, Okazawa H: JNK activation is associated with intracellular β -amyloid accumulation. Mol Brain Res, 85: 221-233, 2001
- 3) Ishiguro H, Yamada K, Sawada H, Nishi K, Ichino N, Sawada M, Kurosawa Y, Matsushita N, Kobayashi K, Goto J, Hashida H, Masuda N, Kanazawa I, Nagatsu T: Age-dependent and tissue-specific CAG repeat instability occurs in mouse knock-in for a mutant huntington's disease gene. J Neuroscience Res, 65:289-297, 2001
- 4) 金澤一郎: ハンチントン病研究から学んだこと(会長講演)。臨床神経学、41:1029-1035, 2001
- 5) Kanazawa I: Molecular pathology of dentatorubral-pallidoluysian atrophy. In "Glutamine Repeats and Neurodegenerative Diseases; Molecular Aspects" eds. Harper P & Perutz M, Oxford University Press, New York, pp.249-260, 2001
- 6) Song J, Mangold M, Suske G, Geltinger C, Kanazawa I, Sun K, Yokoyama KK: Characterization and promoter analysis of the mouse gene for transcription factor Sp4. Gene, 264:19-27, 2001
- 7) Iwata A, Miura S, Kanazawa I, Sawada M, Nukina N: α -synuclein forms a complex with transcription factor Elk-1. J Neurochem, 77: 239-252, 2001
- 8) Ichikawa Y, Goto J, Hattori M, Toyada A, Ishii K, Jeong SY, Hashida H, Masuda N, Ogata K, Kasai F, Hirai M, Maciel P, Roulean GA, Sakaki Y, Kanazawa I: The genomic structure and expression of MJD, the Machado-Joseph disease gene. J Hum Genet, 46:413-422, 2001
- 9) Nakamura K, Jeong SY, Uchihara T, Anno M, Nagashima K, Nagashima T, Ikeda S, Kanazawa I: SCA17, a novel autosomal dominant

- cerebellar ataxia caused by an expanded polyglutamine in TATA-binding protein. *Hum Mol Genet*, 10:1441-1448,2001
- 10) Okamoto T, Jeong SY, Takahashi Y, Baughman KW, Ogata K, Goto J, Kanazawa I: Expression of the $\alpha 1D$ subunit of the L-type voltage gated calcium channel in human liver. *Intern J Mol Med*, 8:413-417, 2001
 - 11) Ohye T, Ichinose H, Yoshizawa T, Kanazawa I, Nagatsu T: A new splicing variant for human tyrosine hydrolase in the adrenal medulla. *Neurosci Lett*, 312:157-160,2001
 - 12) Hashida S, Goto J, Suzuki T, Jeong SY, Masuda N, Ooie T, Tachiiri Y, Tsuchiya H, Kanazawa I: Single cell analysis of CAG repeat in brains of dentatorubral-pallidoluysonian atrophy (DRPLA). *J Neurol Sci*, 190: 78-93,2001
 - 13) 尾形克久、高橋祐二、鄭善容、後藤順、金澤一郎: 痛覚と電位依存性ナトリウムチャンネル。脳科学、23:845-852,2001
 - 14) Hazeki N, Tukamoto T, Yazawa I, Koyama M, Hattori S, Someki I, Iwatsubo T, Nakamura K, Goto J, Kanazawa I: Ultrastructure of nuclear aggregates formed by expanded polyglutamine. *Biochem Biophys Res Commun*, 294: 429-440,2002
 - 15) Harada T, Harada C, Kohsaka S, Wada E, Yoshida S, Ohno S, Mamada H, Tanaka K, Parada LF and Wada K; Microglia-Muller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration. *J of Neurosci*, 22:9228-9236, 2002
 - 16) Tachikawa M, Nagai Y, Nakamura K, Kobayashi K, Fujiwara T, Han HJ, Nakabayashi Y, Ichikawa Y, Goto J, Kanazawa I, Nakamura Y, Toda T: Identification of CAG repeat-containing genes expressed in human brain as candidate genes for autosomal dominant spinocerebellar ataxias and other neurodegenerative disease. *J Hum Genet*, 47: 275-278, 2002
 - 17) Yoshida H, Yoshizawa T, Shibasaki F, Shoji S, Kanazawa I: Chemical chaperones reduce aggregate formation and cell death caused by the truncated Machado-Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch. *Neurobiol Dis*, 10:88-99,2002
 - 18) Okazawa H, Rich T, Chang A, Lin X, Waragai M, Kajikawa M, Enokido Y, Komuro A, Kato S, Shibata M, Hatanaka H, Mouradian M, Sudol M, Kanazawa I: Interaction between mutant ataxin-1 and PQBP-1 affects transcription and cell death. *Neuron* 34:701-713,2002
 - 19) 金澤一郎: ハンチントン病の高次脳機能障害。Cognition and Dementia,2:17-22,2003

- 20) Takahashi Y, Jeong SY, Ogata K, Goto J, Hashida H, Isahara K, Uchiyama Y and Kanazawa I; Human skeletal muscle calcium channel $\alpha 1S$ is expressed in the basal ganglia: distinctive expression pattern among L-type Ca^{2+} channels. *Neurosci Res* 45:129-137, 2003
- 21) Kawahara Y, Ito K, Sun H, Kanazawa I and Kwak S; Low editing efficiency of GluR2 mRNA is in white matter of normal human brain. *European J of Neurosci*, 18:1-11, 2003
- 22) Iwata A, Maruyama M, akagi T, Hashikawa T, Kanazawa I, Tsuji S and Nukina N; Alpha-synuclein degradation by serine protease neurosin: implication for pathogenesis of synucleinopathies. *Hum Mol Genet* 12:2615-2635, 2003
- 23) Li M, Ishikawa K, Toru S, Tomimitsu H, Takashima M, Goto J, Takiyama Y, Sasaki H, Imoto I, Inazawa J, Toda T, Kanazawa I, Mizusawa H: Physical map and haplotype analysis of 16q-linked autosomal dominant cerebellar ataxia (ADCA) type III in Japan. *J Hum Genet*, 18:111-118, 2003
- 24) Kawahara Y, Kwak S, Sun H, Ito K, Hashida H, Aizawa H, Jeong SY, Kanazawa I: Human spinal motoneurons express low relative abundance of GluR2 mRNA: an implication for excitotoxicity in ALS. *J Neurochem*, 85:680-689, 2003
- 25) Takahashi Y, Jeong SY, Ogata K, Goto J, Hashida H, Isahara K, Uchida Y, Kanazawa I: Human skeletal muscle calcium channel $\alpha 1S$ is expressed in the basal ganglia: distinctive expression pattern among L-type Ca^{++} channels. *Neurosci Res*, 45:129-137, 2003
- 26) Yazawa I, Hazeki N, Nakase H, Kanazawa I, Tanaka M: Histone H3 is aberrantly phosphorylated in glutamine-repeat disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 302:144-149, 2003
- 27) Liu W, Goto J, Wang YL, Murata M, Wada K, Kanazawa I: Specific inhibition of Huntington's disease gene expression by siRNAs in cultured cells. *Proceedings of Japan Academy* 79 SerB: 293-298, 2003
- 28) Hoshino M, Tagawa K, Okuda T, Murata M, Oyanagi K, Arai N, Mizutani T, Kanazawa I, Wanker EE, Okazawa H: Histone deacetylase activity is retained in primary neurons expressing mutant huntingtin protein. *J Neurochem*, 87:257-267, 2003
- 29) 尾方克久: 悪性高熱症とセントラルコア病: リアノジン受容体チャネロパチー神経研究の進歩 47:305-314, 2003
- 30) Hazeki N, Kanazawa I: Solubilization of aggregates formed by expanded polyglutamine tract expression in cultured cells. *Methods in Molecular Biology*, 277:129-137, 2004

- 31) Kawahara Y, Ito K, Sun H, Ito M, Kanazawa I, Kwak S: GluR2, an alternative splicing isoform of GluR4, is abundantly expressed in the adult human brain. *Mol Brain Res*, 127:150-155, 2004
- 32) Hoshino M, Tagawa K, Okuda T, Murata M, Oyanagi K, Arai N, Mizutani T, Kanazawa I, Wanker EE, Okazawa H: Histone deacetylase activity is retained in primary neurons expressing mutant huntingtin protein. *J Neurochem*, 87:257-267, 2004
- 33) Kawahara Y, Ito K, Sun H, Aizawa H, Kanazawa I and Swak S; RNA editing and death of motor neurons. *Nature* 427:6977, 2004
- 34) Matubuchi S, Wada Y, Okuda T, Hara Y, Qi ML, Hoshino M, Nakagawa M, Kanazawa I, Okazawa H: Polyglutamine tract-binding preotein-1 dysfunction induces cell death of neurons through mitochondrial stress. *J Neurochem*, 95:858-870, 2005
- 35) Yung long Qi, Hoshino M, Wada Y, Marubuchi S, Yoshimura N, Kanazawa I, Shinomiya K, Okazawa H: PQBP-1 is expressed predominantly in the central nervous system during development. *Eur J Neurosci*, 22:1277-1286, 2005
- 36) Sun H, Kawahara Y, Ito K, Kanazawa I, Kwak S: Expression profile of AMPA receptor subunit mRNA in single adult rat brain and spinal cord neurons in situ. *Neurosci Res*, 52:228-234, 2005
- 37) Wang YL, Liu W, Wada E, Murata M, Wada K, Kanazawa I: Clinico-pathological rescue of a model mouse of Huntington's disease by siRNA. *Neurosci Res*, 53:241-249, 2005

(2) 口頭発表

① 招待、口頭講演 (国内 10 件、海外 6 件)

- 1) Kanazawa I: Plenary Review Lecture on Gene Expression in Huntington's Disease, The 19 International Workshop on Huntington's Disease, Copenhagen, Denmark, 26th August, 2001
- 2) Kanazawa I: Huntington's Disease, Meeting of Korean Neurology, Seoul National University Hospital, 10/26, 2001
- 3) Liu W, Goto J, Wang YL, Murata M, Wada K, Kanazawa I: Toward the use of dsRNA interference (RNAi) as a potential therapeutic tool for Huntington's disease: siRNA targeting the huntingtin exon 1 efficiently suppressed the exogenous huntingtin expression, Ad Hoc Workshop on Huntington's Disease, Cambridge, Boston, Massachusetts, USA, 11th August, 2002
- 4) Murata M, Horiuchi M, Kanazawa I: Long-Term clinical effects of Zonisamide; a new drug for Parkinson's disease, The 6th Inter-

- national Conference on AD/PD 2003, Seville, Italy, 11th May, 2003
- 5) Murata M, Hasegawa K, Kanazawa I: Randomized, double-blind study of zonisamide with placebo in advanced Parkinson's disease, The 8th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Rome, Italy, 2nd June, 2004
 - 6) Murata M: Genome-wide microsatellite association studies for sporadic Parkinson's disease by using the pooled DNA method, The 8th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Rome, Italy, 2nd June, 2004
 - 7) 金澤一郎: ハンチントン病研究から学んだこと(会長講演)第42回日本神経学会総会、東京、5月11日、2001
 - 8) 鄭善容、後藤順、金澤一郎: 新規ナトリウムチャネルの単離および単一神経細胞における発現分布の解析、平成13年度生理学研究所研究会、岡崎国立共同研究機構、岡崎、5月24~25日、2001
 - 9) 村田美穂、堀内美恵子、金澤一郎: ゾニサミドの作用機序に基づく新規抗パーキンソン病薬の探索、第43回日本神経科学学会総会、札幌ロイトン、5月31日、2002
 - 10) 後藤 順: siRNAによるハンチントン遺伝子発現の抑制、第44回日本神経科学学会総会、横浜、5月14日、2003
 - 11) 村田美穂: ゾニサミドの作用機序に基づく新規抗パーキンソン病薬の探索、第44回日本神経科学学会総会、横浜、5月16日、2003
 - 12) 村田美穂: マイクロサテライト多型による弧発性パーキンソン病のゲノムワイド関連解析、第45回日本神経科学学会総会、東京、5月13日、2004
 - 13) 村田美穂、抗パーキンソン作用薬としての Zonisamide の使用実態調査、第45回日本神経科学学会総会、東京、5月13日、2004
 - 14) 村田美穂、金澤一郎: 多数の候補遺伝子 SNP タイピングによる弧発性パーキンソン病の関連解析、第45回日本神経科学学会総会、東京、5月13日、2004
 - 15) 岡澤均、金澤一郎: ハンチントン病におけるヒストン脱アセチル化酵素変化の検討、第45回日本神経科学学会総会、東京、5月13日、2004
 - 16) 岡澤均、金澤一郎: 変異型ハンチンチン(mhtt)による Hsp70 の小脳神経細胞に特異的な発現誘導、第45回日本神経科学学会総会、東京、5月13日、2004

②ポスター発表 (国内 9件、海外 9件)

- 1) Miho M et al: Beneficial effects on Zonisamide on Parkinson's disease, The XIV International Congress on Parkinson's Disease, Helsinki, Finland, 10/26, 2001
- 2) Takahashi Y et al: Human skeletal muscle calcium channel $\alpha 1S$ is expressed in the basal ganglia: distinctive expression pattern among

- L-type Ca⁺⁺ channels, Society for Neuroscience, San Diego, USA, November, 2001
- 3) Haseki N et al: Ultra-structural and biochemical analysis of intranuclear inclusions in Huntington's disease mouse model. Society for Neuroscience, San Diego, USA, 11/, 2001
 - 4) Murata M et al: Zonisamide increases dopamine synthesis by inducing TH mRNA, The 7th International Congress of Parkinson's Disease And Movement Disorders, Miami, USA, 11/11, 2002
 - 5) Murata M et al: Zonisamide—A New Drug for Parkinson's Disease 1. Long-Term Clinical Effects, 55th Annual Meeting, American Academy of Neurology, Honolulu, Hawaii, 4/2, 2003
 - 6) Goto J et al: Suppression of Huntingtin gene expression by siRNA: A possible therapeutic tool for Huntington's disease, The 55th Annual Meeting, American Academy of Neurology, Honolulu, Hawaii, 4/2, 2003
 - 7) Murata M, Horiuchi E, Tsuji S, Kanazawa I: Long-term clinical effects of Zonisamide; a new drug for parkinson's disease. 6th International Conference AD/PD, 2003 (Seville) 5.11, 2003
 - 8) Liu W, Wang YL et al: Rescue the HD model mouse by RNAi technology: silence the huntingtin expression in vitro and in vivo, The 34th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, USA, 8/23, 2004
 - 9) Liu W, Wang YL et al: RNAi treatments at early development stages yield significant beneficial effects in Huntington's disease model mice, The 35th annual meeting of the Society for Neuroscience, Washington DC, USA, 9/26, 2005
 - 10) 村田美穂ら: 抗てんかん薬 zonisamide の抗パーキンソン作用、第42回日本神経学会総会、東京、5/11, 2001
 - 11) 高橋祐二ら: 電位依存性カルシウムチャンネル α 1S の中枢神経系における発現の検討、第42回日本神経学会総会、東京、5/11, 2001
 - 12) 尾方克久ら: 神経系に発現するナトリウムチャンネル各分子種の分布、第42回日本神経学会総会、東京、5/11, 2001
 - 13) 高橋祐二ら: 神経系における電位依存カルシウムチャンネルの部位別発現カタログ、第44回日本神経化学・第24回日本神経科学合同大会、京都、9/26, 2001
 - 14) 尾方克久ら: 神経系に発現するナトリウムチャンネル各分子種の分布、第44回日本神経化学・第24回日本神経科学合同大会、京都、9/26, 2001
 - 15) 高橋祐二ら: 神経系における電位依存性カルシウムチャンネルの発現プロフィール、第43回日本神経科学学会総会、札幌ロイトン、5/29, 2002

- 16)尾方克久ら:悪性高熱およびコア構造を認めるミオパチーの家系で同定したリアノジン受容体 1(RYR1)の新規点変異、第 43 回日本神経科学会総会、札幌ロイトン、5/31、2002
- 17)後藤順ら:中枢神経系のチャネル分子の体系的解析、第 25 回日本神経科学大会、東京ビッグサイト、7/8、2002
- 18)高橋祐二ら:神経系における電位依存性カルシウムチャネル $\alpha 1$ 、 β サブユニットの発現パターン、第 25 回日本神経科学大会、東京ビッグサイト、7/7、2002

(3)特許出願 (国内 1 件、海外 1 件)

①国内

特許出願人:金澤一郎、劉 万兆、王 玉来、和田圭司、後藤順、村田美穂

発明者所属:国立精神・神経センター及び東京大学神経内科

発明の名称:ハンチントン病遺伝子の発現抑制

特許出願日:2003 年 5 月 14 日、

特許出願整理番号: B05P02

②海外

特許出願人:Kanazawa I, Liu W, Wang YL, Wada K, Goto J, Murata M: National

発明者所属:Center of Neurology and Psychiatry, University of Tokyo

発明の名称:Suppression of Huntington's Disease Gene Expression.

特許出願国:アメリカ、カナダ、オーストラリア、

特許出願日:2004年4月30日、

特許出願整理番号: B05-01US(PCT)

7. 結び

当初はともかくとして、2～3年目以降の我々のSORST計画は、かなり具体的な目標に向けた一筋の計画であり、下手をすると、成果が全くないこともあり得た計画であった。具体的に言えば、「モデルマウスで我々の作成した siRNA が効果を示さなければ、全く成果がないに等しかった」のである。その点から言って、効果を見出すことができ、臨床応用への足がかりを得たことは大変嬉しく思っている。まだまだ多くの遣り残したことがあることは承知しているが、とにかく次の一歩に進むことができることが嬉しい。JSTの関係各位に心からお礼申し上げたい。