

prolonged-release implants for preventing vasospasm in humans. Symposium in honor of Bryce Weir. Chicago April 5, 2002 (invited lecture)

糟谷英俊、恩田英明、堀智勝:くも膜下出血後の低アルドステロン血漿。第30回日本脳卒中の外科学会。大阪 2001 3/14、15 抄録集 pp104

糟谷英俊、恩田英明、岡田芳和、堀智勝:ニカルジピンペレットを用いたスパズム治療の成績:付帯条件を満たす症例について。第17回スパズムシンポジウム 大阪 2001、3/14 抄録集 pp35(シンポジウム)

原嶋志保、恩田英明、糟谷英俊、岡田芳和、堀智勝:Subclavian steal syndrome の一例。第83回日本脳神経外科学会関東地方会。東京 2001、9/1

恩田英明、糟谷英明、米山琢、堀智勝:ゲノム全域を網羅した脳動脈瘤のゲノム解析。第2回日本分子脳神経外科学会 名古屋 2001、9/7、8 抄録集 pp49

米山琢、恩田英明、糟谷英俊、堀智勝:脳動脈瘤感受性候補遺伝子として FGF1 の関連解析による検討。第2回日本分子脳神経外科学会 名古屋 2001、9/7、8 抄録集 pp44

糟谷英俊:脳動脈瘤責任遺伝子の解明 第6回脳神経外科カンファレンス(徳島、香川) 徳島 2001 8/25(特別講演)

糟谷英俊、堀智勝:再発顔面痙攣の一例。

第4回脳神経減圧術研究会 岡山 2001、10/23、抄録集 pp24

糟谷英俊、恩田英明、岡田芳和、堀智勝:重症くも膜下出血の治療:ニカルジピンペレットを用いて。第60回日本脳神経外科学会総会 岡山 2001、10/24、25、26、抄録集 pp50

団志郎、糟谷英俊、恩田英明、堀智勝:くも膜下出血後の低アルドステロン血症。第60回日本脳神経外科学会総会 岡山 2001、10/24、25、26、抄録集 pp346

笹原篤、糟谷英俊、恩田英明、堀智勝:くも膜下出血急性期管理:DDG アナライザーを用いて。第60回日本脳神経外科学会総会 岡山 2001、10/24、25、26、抄録集 pp355

恩田英明、糟谷英俊、米山琢、堀智勝:脳動脈瘤原因遺伝子の同定:未破裂脳動脈瘤治療への応用の可能性。第60回日本脳神経外科学会総会 岡山 2001、10/24、25、26、抄録集 pp164

佐々木寿之、糟谷英俊、藍原康雄、恩田英明、堀智勝:MAPK inhibitor (FR167653)を用いたイヌくも膜下出血モデルにおける脳血管攣縮への効果。第60回日本脳神経外科学会総会 岡山 2001、10/24、25、26、抄録集 pp81

米山琢、恩田英明、糟谷英俊、堀智勝:脳動脈瘤感受性候補遺伝子として FGF1 の関連解析による検討。第60回日本脳神経外科学会総会 岡山 2001、10/24、25、26、抄

録集 pp360

糟谷英俊、恩田英明、米山琢、堀智勝:マッピング情報を利用した脳動脈瘤の責任遺伝子同定 平成13年度 特殊な脳血管障害の遺伝解析に関する研究 第2回班会議 大阪 2001 12/7

恩田英明、糟谷英俊、米山琢、高倉公朋、堀智勝:脳動脈瘤の遺伝解析。第27回遺伝医学研究会 東京 2002 3/8

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

脳動脈瘤感受性遺伝子同定にむけての実践的な連鎖不平衡マッピング法の確立

分担研究者 中島 敏晶 東京大学医科学研究所 助手

研究要旨

罹患同胞対連鎖解析にて同定された脳動脈瘤遺伝子座から、効率良く疾患感受性遺伝子を同定するにはヒトゲノムにおける連鎖不平衡を応用する方法が最も効率的であると考えられる。そのためにはヒトゲノムにおける連鎖不平衡の成り立ちを理解することが不可欠である。今回我々はヒトアンギオテンシノーゲン遺伝子における連鎖不平衡の解明をその第一段階として行った。18名の日本人、18名の西洋人のヒトアンギオテンシノーゲン遺伝子領域の塩基配列を詳細に比較することにより、44個のSNPからなるSNPマップを作成し、77人の日本人、88人の西洋人のタイピングデータを基に詳細な連鎖不平衡の検討をおこなった。本態性高血圧の疾患感受性変異であるC4072T(T235M)と他の43個のSNPとの連鎖不平衡の関係をD'および r^2 にて評価した結果、関連解析を念頭においた連鎖不平衡の評価には r^2 がより適切であると考えられた。また、日本人と西洋人を比較した場合、SNPの頻度やSNP間の連鎖不平衡のパターンが異なる例が多く認められ、日本人を対象とした検討が不可欠であると考えられた。今後、これらの知見をもとに脳動脈瘤と候補遺伝子との関連を効率よく進めていくことが可能であると考えられる。

A. 研究目的

くも膜下出血は重篤な疾患であり、その死亡率は昭和26年より一貫して漸増している。我々はゲノム全域での罹患同胞対連鎖解析法により、脳動脈瘤遺伝子座を5番、7番、14番染色体の各々約20cMのゲノム領域に絞り込んでいる。しかし、この領域には数百個の遺伝子が存在しており、これらの遺伝子と脳動脈瘤との関連を効率良く網羅的に調べるには、ヒトゲノムにおける連鎖不平衡を応用する方法が最も効率的であると考

えられる。

連鎖不平衡とは2つ(以上)の変異が連鎖している状態であり、異なった座位のSNPが強い連鎖不平衡にあれば患者・対照関連試験を行った場合に同じような疾患との関連が認められる。つまりあるゲノム領域のひとつのSNPと疾患の関連を調べれば、その変異と連鎖不平衡の関係にある複数のSNPと疾患の関連が明らかになることになり、連鎖不平衡を利用すれば効率良く膨大な数のSNPと疾患との関連を調べることができる。

この理論を応用したのが連鎖不平衡マッピング法である。しかし、ヒトの遺伝子における連鎖不平衡の成り立ちについては詳細な検討がほとんどなされておらず、理論が先行している点は否めない。また、連鎖不平衡の成り立ちは人種、民族により大きく異なることが予想され日本人での検討が不可欠である。

本研究では疾患感受性遺伝子の解明に不可欠な連鎖不平衡マッピング法を、より実践的なマッピング法として確立するためにヒトの遺伝子における連鎖不平衡の成り立ちを明らかにしようとするものである。そのモデル研究として、今回我々はヒトアンジオテンシノーゲン遺伝子における連鎖不平衡の解明を第一段階として行った。我々はこれまでに罹患同胞対連鎖解析、および患者・対照関連試験などの分子遺伝学的手法を駆使することにより、本態性高血圧症の疾患感受性遺伝子のひとつとしてアンジオテンシノーゲン遺伝子の関与を明らかにし、疾患と関連する遺伝子多型として、強い連鎖不平衡の関係にある M235T とプロモーター領域の多型(A-6G)を見出ししてきた。common disease の発症に関わるアンジオテンシノーゲン遺伝子内に存在する SNP 間の連鎖不平衡を詳細に検討することは、より実践的な連鎖不平衡マッピング法を確立するうえでのよいモデル研究になるものと考えられる。すでにアンジオテンシノーゲン遺伝子内の責任変異を明らかにしているため、どのように効率良く連鎖不平衡を利用すれば責任変異を明らかにできるのかを検討することが可能であるからである。さらにヒトアンジオテンシノーゲン遺伝子を含む 15kb にわたるゲノム領域の塩基配列を決定しており、その塩基配列を基にこの領域の詳細な SNP マップを作成し、SNP 間の連鎖不平衡の成り立

ちを詳細に検討する。

B. 研究方法

1) ヒトアンジオテンシノーゲン遺伝子領域における SNP マップの作成

我々がすでに決定したヒトアンジオテンシノーゲン遺伝子を含む 15kb にわたるゲノム領域の塩基配列を基に、この領域を解析するのに必要な PCR および sequence プライマーを作成する。

日本人18人、西洋人18人のゲノム DNA を PCR で増幅し、direct sequence 法にて塩基配列を決定する。その塩基配列を比較することにより詳細な SNP マップを作成する。

2) ヒトアンジオテンシノーゲン遺伝子領域における連鎖不平衡の検討

77 人の日本人、88 人の西洋人から採取された genomic DNA を用い、1) で同定された SNP の genotyping を行う。その typing データを基に連鎖不平衡の解析を行う。タイピングは SNP を含む領域を PCR にて増幅した後、自動シーケンス解析装置 (ABI PRISM377) を用い、直接シーケンス法にて行う。ハプロタイプ解析は maximum-likelihood 法に基づく ARLEQUIN プログラム (<http://anthropologie.unige.ch/arlequin>) を用い、SNP 間の連鎖不平衡は D (Lewontin and Kojima, 1960)、 $D'(D/D_{max})$ (Lewontin 1964)、 $r^2(D^2/p_1(1-p_1)p_2(1-p_2))$ 、およびカイ検定 (χ^2 値、 p 値) にて評価する。

C. 研究結果

日本人 18 人、西洋人 18 人のゲノム DNA を詳細に比較する事により、44 個の SNP からなる詳細な SNP マップを作成した (図1)。44 個の SNP のうち 35 個はトランジション、9 個はトランスバージョンによる塩基置換であった。

図1. アンジオテンシノーゲン遺伝子の exon-intron 構造 (A) とリピート配列 (B), および SNP マップ (C)

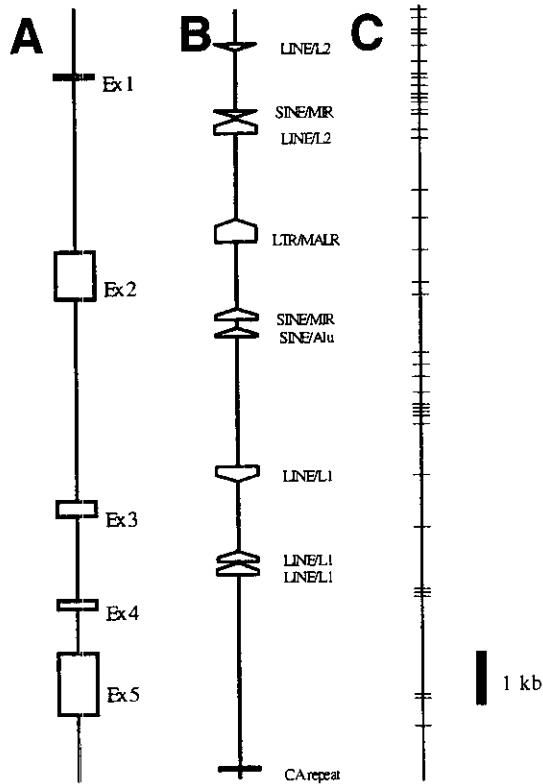
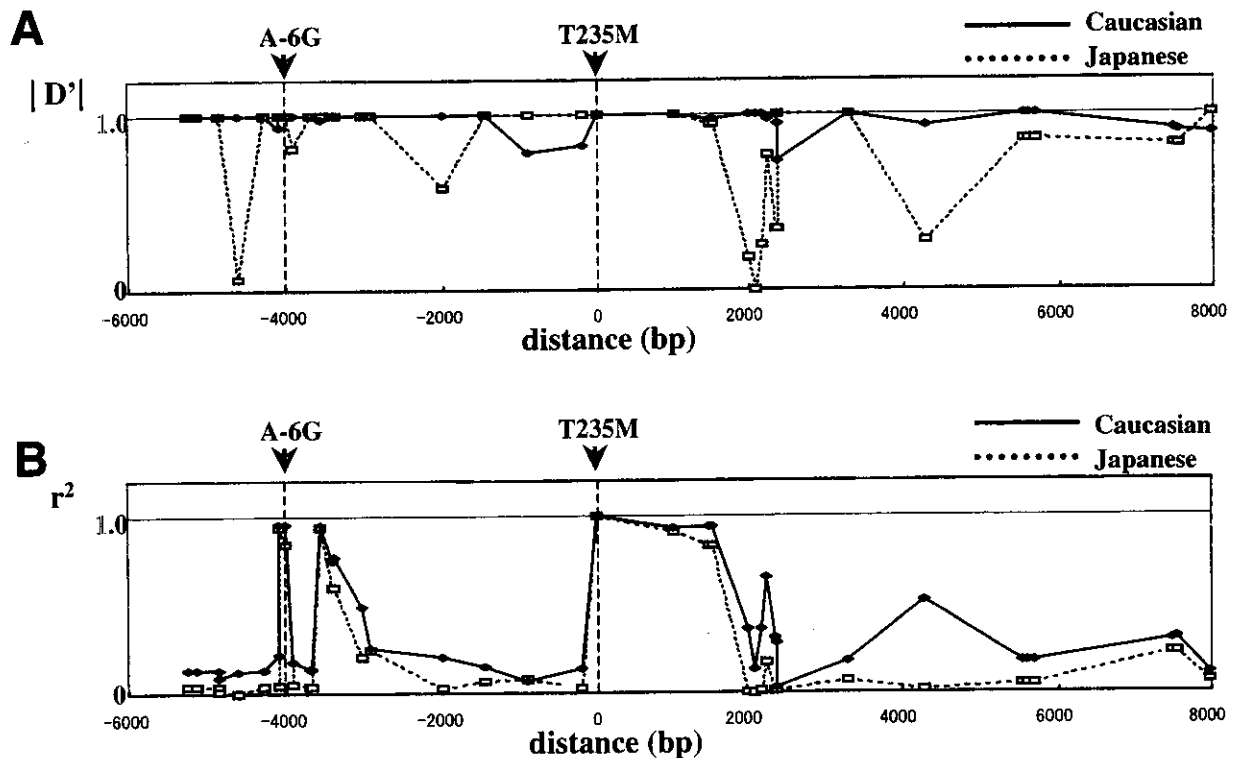


表1. 日本人、西洋人における 4 4 個の SNP 頻度

No.	SNP	Chimpanzee	frequency	
			Japanese	Caucasian
1	A-1178G	A	0.21	0.09
2	G-1074T	T	0.21	0.09
	T-829A	T	nd	0.02
3	G-792A	A	0.21	0.09
4	T-775C	T	0.07	0.06
5	C-532T	C	0.05	0.09
6	G-217A	G	0.21	0.09
7	A-20C	C	0.24	0.16
8	A-6G	A	0.13	0.58
9	C67T	C	0.14	0.58
10	C172T	C	0.35	0.12
11	G384A	G	0.22	0.1
12	G400A	G	0.22	0.1
13	G507A	G	0.13	0.56
14	A676G	G	0.2	0.63
15	A698G	G	0.2	0.63
16	A1035G	G	0.41	0.72
17	A1164G	G	0.38	0.83
18	C2079T	C	0.37	0.14
19	G2624A	G	0.45	0.1
20	A3189G	A	0.35	0.07
21	C3889T(T174M)	C	0.16	0.14
	T3965C(P199P)	T	nd	0.01
22	C4072T(T235M)	C	0.12	0.56
23	A5093C	A	0.13	0.55
24	C5343T	C	0.02	nd
25	G5556A	G	0.13	0.56
26	G5593A	G	0.13	0.56
27	A5878C	A	0.02	nd
28	A6066C	C	0.44	0.78
29	G6152A	G	0.25	0.09
30	C6233T	C	0.44	0.78
31	G6309A	G	0.34	0.65
32	C6420T	T	0.34	0.2
33	C6428G	C	0.34	0.2
34	G6442A	G	0.08	0.04
35	G7369A	G	0.32	0.12
36	C8357T	C	0.4	0.68
37	T9597C	T	0.33	0.12
38	G9669T	G	0.33	0.12
39	A9770G	A	0.34	0.12
40	C11535A	C	0.05	0.32
41	C11608T	C	0.05	0.33
42	G12058A	del	0.32	0.1

図2. 高血圧関連変異T235Mとアンジオテンシノーゲン遺伝子領域に存在するSNPとの連鎖不平衡係数D' (A)、 r^2 (B)

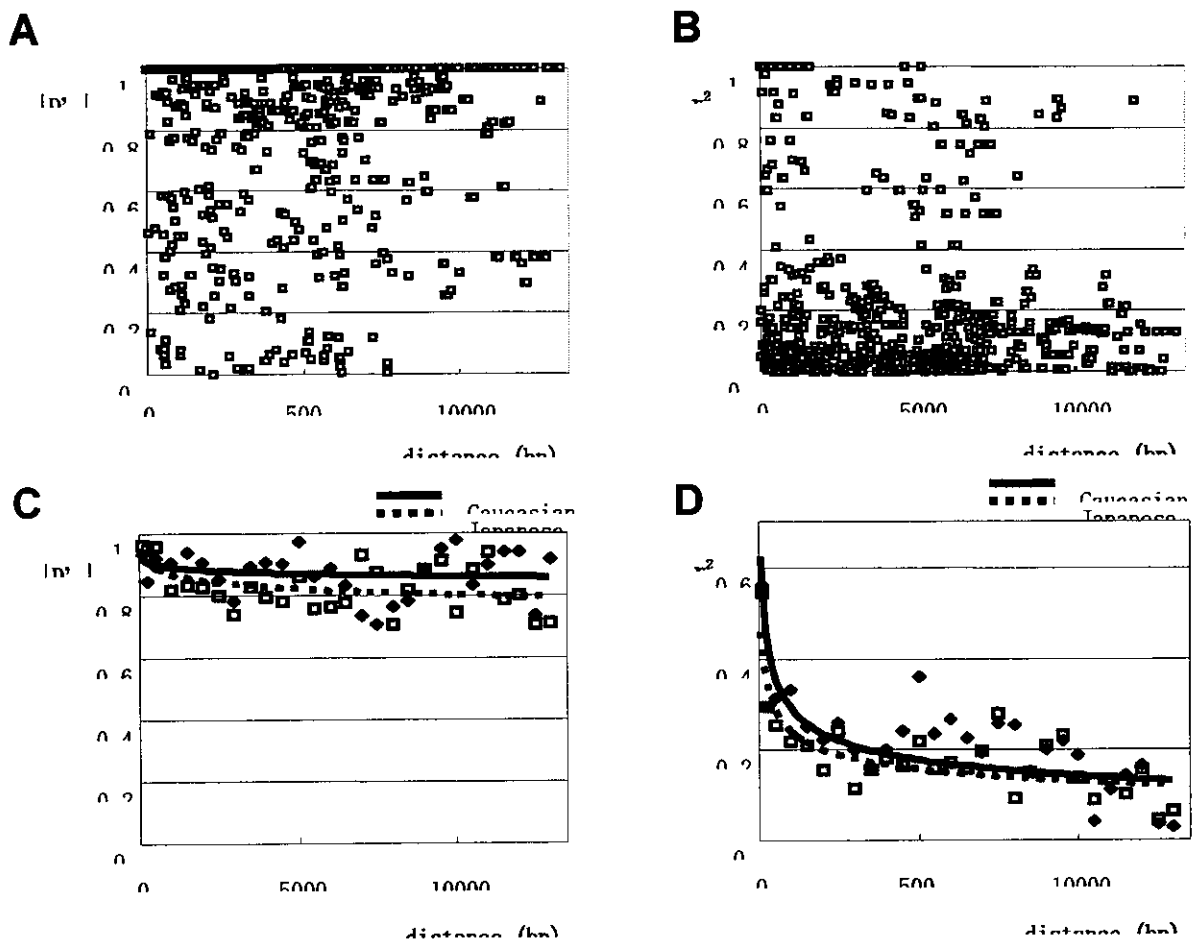


77人の日本人、88人の西洋人において、44個のSNPの遺伝子型を決定しアリル頻度を算出した(表1)。多くのSNPが日本人と西洋人において頻度が大きく異なり、特に本態性高血圧の疾患感受性変異であるA(-6)GおよびC4072T(T235M)においてFstが最も高い値を示していた。本態性高血圧の疾患感受性変異であるC4072T(T235M)と他の43個のSNPとの連鎖不平衡の関係をD'および r^2 にて評価した(図2)。D'で評価した場合、大多数のSNPがT235Mと強い連鎖不平衡の関係にあり、特に西洋人においてその傾向がより認められた。一方、 r^2 にて連鎖不平衡を評価した場合にはほとんどのSNPはT235Mと強い連

鎖不平衡の関係にはなく、これまでに報告されているA(-6)G、C172Tといった本態性高血圧との関連が示唆されているSNPを含んだ数個のSNPがT235Mと強い連鎖不平衡の関係にあることが示された。

SNP間の距離と連鎖不平衡の関係を図3に示す。連鎖不平衡の強さはSNP間の距離が大きくなるにつれて小さくなる傾向が認められたが、SNP間の距離が小さくても連鎖不平衡が認められなかったり、SNP間の距離が大きくても強い連鎖不平衡が認められない例も多く認められた。西洋人は日本人に比べ連鎖不平衡が保たれている傾向が認められた。

図3. SNP間の距離と連鎖不平衡係数D' (A, C)、 r^2 (B, D)の関係



D. 考察

本態性高血圧の疾患感受性変異である C4072T (T235M) と他の 43 個の SNP との連鎖不平衡の関係を D' および r^2 にて評価した結果、関連解析を念頭においた連鎖不平衡の評価には r^2 がより適切であると考えられた。また、日本人と西洋人を比較した場合、SNP の頻度や SNP 間の連鎖不平衡のパターンが異なる例が多く認められ、日本人を対象とした検討

が不可欠であると考えられた。

E. 結論

脳動脈瘤の疾患感受性遺伝子の同定に向け、ヒトアンジオテンシノーゲン遺伝子領域における詳細な連鎖不平衡の検討をおこなった。今後、この知見をもとに SNP と脳動脈瘤の関連を効率よく進めていくことが可能であると考えられる。

F. 研究発表

1) 論文発表

Nakajima T, Jorde LB, Ishigami T, Umemura S, Emi M, Lalouel JM, Inoue I (2002). Nucleotide diversity and haplotype structure of the human angiotensinogen gene in two populations. *Am J Hum Genet.* 70:108-23

Nakajima T, Inoue I, Cheng T, Lalouel JM (2002). Molecular cloning and functional analysis of a factor that binds to the proximal promoter of human angiotensinogen. *J Hum Genet.* 47:7-13

Furushima K, Shimo-Onoda K, Maeda S, Nobukuni T, Ikari K, Koga H, Komiya S, Nakajima T, Harata S, Inoue I (2002). Large-scale screening for candidate genes of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *J Bone Miner Res.* 17:128-37

Onda H, Kasuya H, Yoneyama T, Takakura K, Hori T, Takeda J, Nakajima T, Inoue I (2001). Genomewide-linkage and

haplotype-association studies map intracranial aneurysm to chromosome 7q11. *Am J Hum Genet.* 69:804-19

Iwasaki H, Shinohara Y, Ezura Y, Ishida R, Kodaira M, Kajita M, Nakajima T, Shiba T, Emi M (2001). Thirteen single-nucleotide polymorphisms in the human osteopontin gene identified by sequencing of the entire gene in Japanese individuals. *J Hum Genet.* 46:544-6

Nakazawa I, Nakajima T, Ishigami T, Umemura S, Emi M (2001). Linkage disequilibrium and haplotype analysis among eight novel single-nucleotide polymorphisms in the human tissue-type plasminogen activator (t-PA) gene. *J Hum Genet.* 46:367-71

Ota N, Nakajima T, Nakazawa I, Suzuki T, Hosoi T, Orimo H, Inoue S, Shirai Y, Emi M (2001). A nucleotide variant in the promoter region of the interleukin-6 gene associated with decreased bone mineral density. *J Hum Genet.* 46:267-72.

Nakazawa I, Nakajima T, Harada H, Ishigami

T, Umemura S, Emi M (2001). Human calcitonin receptor-like receptor for adrenomedullin: genomic structure, eight single-nucleotide polymorphisms, and haplotype analysis. *J Hum Genet.* 46:132-6.

Shinohara Y, Iwasaki H, Ota N, Nakajima T, Kodaira M, Kajita M, Shiba T, Emi M (2001). Novel single nucleotide polymorphisms of the human nuclear factor kappa-B 2 gene identified by sequencing the entire gene. *J Hum Genet.* 46:50-1.

Kajita M, Iwasaki H, Ota N, Shinohara Y, Kodaira M, Nakajima T, Emi M (2001). Novel single nucleotide polymorphisms of the human colony-stimulating factor 2 (CSF2) gene identified by sequencing the entire gene. *J Hum Genet.* 46:48-9.

Iwasaki H, Ota N, Nakajima T, Shinohara Y, Kodaira M, Kajita M, Emi M (2001). Five novel single-nucleotide polymorphisms of human interferon gamma identified by sequencing the entire gene. *J Hum Genet.* 46:32-4.

2)学会発表

1) A thorough linkage disequilibrium analysis within the human angiotensinogen gene (AGT) T. Nakajima¹, T. Ishigami², S. Umemura³, M. Emi⁴, J-M Lalouel², I. Inoue¹.

1)Division of Genetic Diagnosis, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan; 2) Department of Human Genetics, University of Utah Health Sciences Center, Salt Lake City, UT; 3)Internal

Medicine, Yokohama City University, Yokohama, Japan; 4) Department of Molecular Biology, Institute of Gerontology, Nippon Medical School, Kawasaki, Japan;

American Society of Human Genetics, October 12-16, 2001 San Diego, USA

2)霊長類におけるアンギオテンシノーゲン遺伝子の分子進化学的研究

中島敏晶(1)、斉藤成也(2)、早坂郁夫(3)、石田貴文(4)、井ノ上逸朗(1)

(1)東大・医科研・ゲノム情報応用診断、(2)国立遺伝研・進化遺伝、(3)

三和化学研究所・熊本霊長類パーク、(4)東大・理・人類生物学遺伝学研究室

日本分子生物学会、12月9日-12日、2001 横浜

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ヒト臍帯動脈からの平滑筋細胞培養と炎症反応に伴う遺伝子発現

分担研究者 佐藤 敬 弘前大学医学部・教授

研究要旨

本研究は脳動脈瘤の責任遺伝子を同定し、疾患メカニズムの解明を目指す。連鎖解析、アソシエーション・スタディによる疾患遺伝子同定は遺伝統計学に基づき、それ自体では機能に迫るものではない。脳動脈瘤発生のメカニズム解明にはどうしても実験系の確立が必要である。かつ同定できた遺伝子の遺伝型の差から機能の違い、しかもわずかな差、を検出する必要があるため、ヒト組織での実験系でなければ解析できないと予想される。現時点ではエラスチンの関与が想定されるものの、未だ確実な責任遺伝子ははっきりしない状況ではあるが、ヒト組織を準備しておく必要がある。ヒト脳動脈を実験材料とすることは不可能なので、代用となる組織として臍帯動脈から得た培養平滑筋細胞を用いる。遺伝型による機能変化を調べるので、数多くのサンプルが必要となるので、ルーチン作業として平滑筋細胞培養をおこない、これまで20人からの培養に成功している。

同時に、平滑筋、内皮細胞の生物学的な機能について、主に炎症反応に関連した遺伝子発現を検討することにより、アプローチしている。すなわち脳動脈瘤関連遺伝子同定に伴う機能変化に対応できるよう準備を進めている。

A. 研究目的

平滑筋細胞や内皮細胞におけるサイトカインや接着因子、増殖因子など種々の遺伝子の発現は血管壁と白血球や血小板との相互作用を制御することによって炎症や血栓形成の基盤となり、動脈硬化や血管障害の発生において重要な役割を果たしている。

α -Synuclein は神経細胞の核とシナプス前終末に局在するタンパクで、シナプス伝達、神経可塑性や細胞分化に関与すると考えられている。 α -Synuclein はまた、パーキンソン病で見られる Lewy 小体の主要な構成タンパクであり、多系統萎縮症におけるグリア細胞封入体の成分でもある。家族性のパーキンソン病において2種類の α -synuclein 遺伝子変異が報告されており、更に α -synuclein のトラン

スジェニック・マウスにおいてパーキンソン病と同様の病理学的変化が認められることから孤発性のパーキンソン病の原因遺伝子の一つとしても注目されている。

α -Synuclein はアルツハイマー病におけるアミロイドの non-amyloid β component (NAC) 前駆物質 (NACP) として最初に記載され、 α -synuclein はアミロイドのもう一つの成分である amyloid β と密接な関係にある。

Amyloid β はアルツハイマー病患者の血管でも検出され、NAC は脳アミロイド・アンギオパチーや正常脳の血管壁において陽性であることが知られている。従って、amyloid β の関連因子である α -synuclein が血管で発現している可能性は十分あり、血管障害における関与が推測される。以前のわれわれの検討では、

アストログリアにおける α -synuclein 発現が炎症性サイトカインによって転写レベルで制御されていることが明らかになった。この研究では、血管平滑筋細胞における α -synuclein 発現の意義とサイトカイン刺激や酸化ストレスなどによる調節の可能性を明らかにすることを目的に検討を行った。

B. 研究方法

B-1) 細胞培養

ヒト臍帯動脈平滑筋細胞 (HASMCs) と臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) はコラーゲン処理によって分離し、それぞれ 10%ウシ胎児血清を含む RPMI1640, Medium 199 を用いて培養した。細胞は低酸素下培養、種々のサイトカインや増殖因子による刺激、また、過酸化水素による酸化ストレス暴露などの処理を行った。

B-2). Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

α -Synuclein と glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の mRNA レベルを RT-PCR 法で半定量した。用いたプライマーは以下の通りであった。

α -synuclein-F :

5'-ACGACAGTGTGGTTAAAGG-3'

α -synuclein-R :

5'-AACATCTGTCAGCAGATCTC-3'

GAPDH-F :

5'-CCACCCATGGCAAATTCATGGCA-3'

GAPDH-R :

5'-AGACCACCTGGTGCTCAGTGTAGC-3'

α -Synuclein と GAPDH の増幅産物サイズはそれぞれ 490 bp と 598 bp であった。

B-3) Northern blotting

α -Synuclein の mRNA レベルを northern blot 法によっても分析した。即ち、RT-PCR による 490 bp の α -synuclein 増幅産物に P6 promoter を付加し、これを digoxigenin (DIG)

ラベルの RNA プローブの作製に使用した。抽出した細胞の RNA から poly(A)⁺ RNA を精製し、1%アガロースゲル電気泳動にて分離した後、ナイロン・メンブレンにプロットし、DIG ラベルした RNA プローブを用いてハイブリダイゼーションを行った。検出は DIG 検出キット(Roche)を用いて行った。

B-4) Western blotting

細胞内の α -synuclein タンパクの測定は western blotting によって行った。市販の cell lysis buffer を用いて細胞を溶解し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離した。次いでタンパクを PVDF 膜にブロッティングしたのち、抗 α -synuclein モノクローナル抗体と horseradish peroxidase で標識した抗マウス IgG を用いて α -synuclein を検出した。

B-5) 免疫蛍光染色

免疫蛍光染色法によって HUVECs と HASMCs 内の α -synuclein タンパクの形態学的同定を試みた。細胞を 10% ホルマリンで固定後、抗 α -synuclein モノクローナル抗体、ビオチン化抗マウス IgG, FITC 化ストレプトアビジンを用いて免疫蛍光染色し、LSM410 レーザー共焦点顕微鏡(Carl Zeiss)で観察した。

C. 研究結果

C-1) α -Synuclein mRNA

RT-PCR による HUVECs と HASMCs 中の α -synuclein mRNA 分析結果を図 1 a に示した。サイズが 490 bp の単一のバンドが RT-PCR で増幅され、両細胞とも非刺激状態で α -synuclein mRNA を発現していることが明らかになった。また、HUVECs と HASMCs を比較すると、前者においてより高い発現が観察された。

Northern blotting による α -synuclein mRNA の分析結果を図 1 b に示すした。同様に、 α -synuclein mRNA は HASMCs に比べ HUVECs においてより強く発現していた。

C-2) α -Synuclein タンパク

Western blottingによる α -synucleinタンパク検出の結果を図1cに示すした。HUVECs, HASMCs共に α -synucleinタンパクを発現しており,約19Kの単一のバンドが検出された。

mRNAの結果に一致して,タンパク発現量も前者の細胞において高値であった。なお,細胞培養液中には α -synucleinタンパクは検出されなかった。

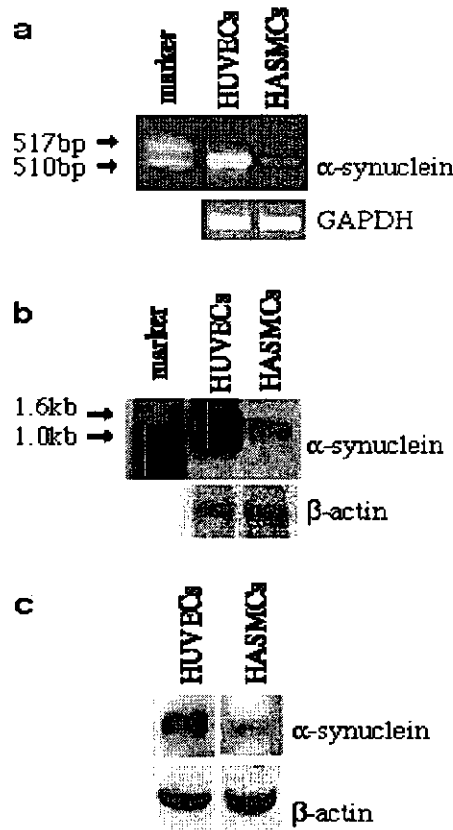


図1. 血管平滑筋細胞, 内皮細胞における α -synucleinのmRNAとタンパクの発現

- (a) RT-PCR 法による mRNA 発現の検討.
- (b) Northern blot 法による mRNA の検討.
- (c) Western blot 法によるタンパク発現.

C-3) サイトカイン, 低酸素, 酸化ストレスの影響

種々のサイトカインや増殖因子による刺激, 低酸素下での培養, 酸化ストレス暴露など様々な培養条件について検討を加えたが, α -synuclein 発現の変化は見出せなかつ

た。図2に過酸化水素で刺激した際の α -synuclein 発現の一例を示したが, mRNA, タンパク共に発現レベルの変化は見られなかった。

C-4) 免疫蛍光染色による α -synuclein の

細胞内局在

HUVECs および HASMCs の α -synuclein 免疫蛍光染色の結果を図 3 に示す。いずれの細胞も明確に染色され、蛍光は細胞質内、

特に核周囲に強く検出された。両細胞におけるタンパク発現の差はこの方法では明確でなかった。

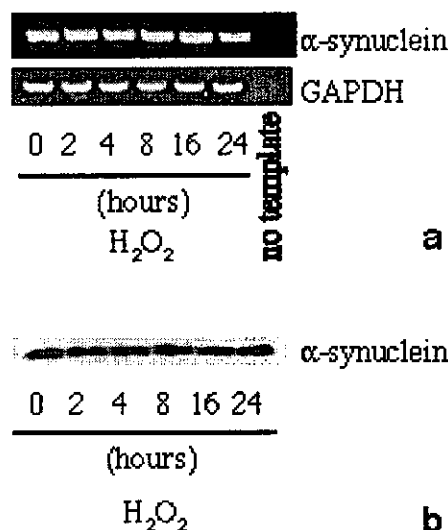


図 2. 血管平滑筋細胞 α -synuclein 発現に対する H_2O_2 の影響。細胞を $100 \mu M H_2O_2$ で 24 時間まで処理し、(a) RT-PCR 法で mRNA を、(b) western blotting でタンパクの発現を検討した。

D. 考察

本研究の結果、血管平滑筋細胞と内皮細胞において α -synuclein が発現していることが明らかになった。 α -Synuclein の生理的、臨床的意義はその発現のパターンから推測されて来たが、分子レベルでの検討はほとんど見られず、わずかに試験管内で phospholipase D を抑制することが報告されている。酸化処理による α -synuclein タンパクの変化は神経細胞内への沈着と細胞死を招くことが知られており、この傾向は家族性 Parkinson 病で見られる変異タンパクの場合特に著しい。 α -Synuclein はプロテアゾームで分解されるが、変異体はこの分解に対して抵抗性であるとの報告も見られる。

血管内皮細胞に amyloid β を過剰発現させると、酸化ストレスの亢進によって細胞障害が起こる。アミロイド沈着のもう一つの構成タンパクの前駆体である α -synuclein の血管細胞における意義は明らかではないが、それは通常の培養条件下で発現しており、なんらかの生理的役割を果たしている可能性も考えられる。 α -Synuclein が amyloid β の沈着を惹起するとの報告も見られることから、血管障害において α -synuclein 発現に変化があるか否かが次の重要な課題と考えられる。以前のわれわれの検討では、アストログリアにおける α -synuclein 発現が interleukin-1 刺激によって亢進することが明らかにされた。血管系細胞においても様々な可能性について検討を加えたが、

α -synuclein 発現を制御する明確な要因は現在まで見つかっていない。血管平滑筋細胞、内皮細胞における α -synuclein の調節機構を明らかにすることは血管障害のみなら

ず、神経変性における α -synuclein の役割の解明にもつながる可能性があると期待される。

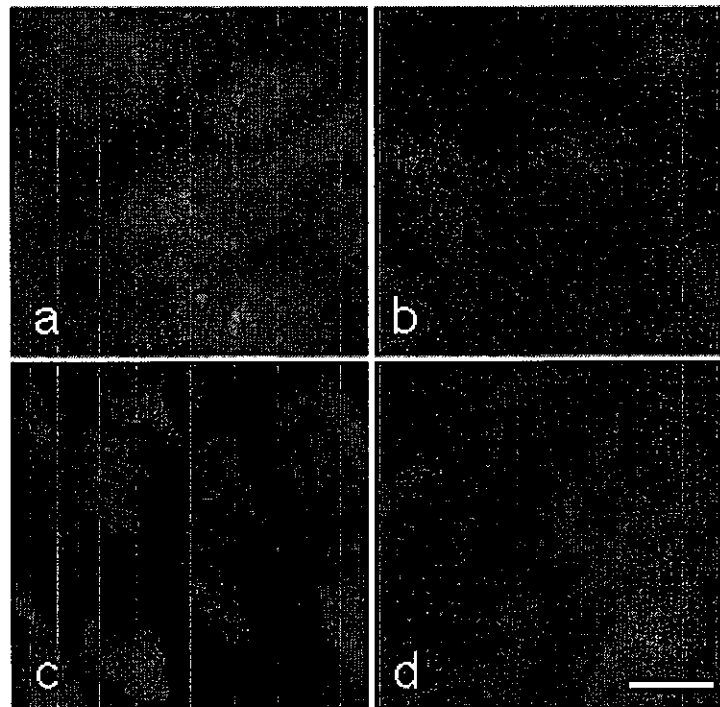


図3. 免疫蛍光染色による α -synuclein の細胞内局在の検討

- (a) HUVECs を固定後、抗 α -synuclein モノクローナル抗体、ビオチン化抗マウス IgG, FITC-ストレプトアビジンを用いて染色した。
- (b) 抗 α -synuclein 抗体の代わりに非免疫マウス IgG を用いて染色した HUVECs.
- (c) HASMCs を(a)と同様の方法で染色。
- (d) HASMCs を(b)と同様の方法で染色。

E. 結論

血管平滑筋細胞と血管内皮細胞は非刺激状態で(constitutively) α -synuclein を発現しており、それは血管においてなんらかの生理的役割を果たしていると考えられる。更に、動脈硬化やアミロイド・アンギオパチーにおける血管壁 α -synuclein 発現の変化について検討を進めている。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yoshida, H., Imaizumi, T., Fujimoto, K., Matsuo, N., Kimura, K., Cui, X., Matsumiya, T., Tanji, K., Shibata, T., Tamo, W., Kumagai, M., Satoh, K. 2001. Synergistic stimulation, by tumor necrosis factor- α and interferon- γ , of fractalkine expression in human astrocytes.

Neurosci. Lett. 30, 132-136.

Tamasawa, N., Murakami, H., Matsui, J., Imaizumi, T., Fujimoto, K., Yoshida, H., Satoh, K., Suda, T. 2001. An oxidized derivative of cholesterol increases the release of soluble vascular cell adhesion molecule-1 from human umbilical vein endothelial cells in culture. *Biochim. Biophys. Acta.* 1531, 178-187.

Matsumiya, T., Imaizumi, T., Yoshida, H., Kimura, H., Satoh, K. 2001. Cisplatin inhibits the expression of X-chromosome linked inhibitor of apoptosis protein in an oral carcinoma cell line. *Oral Oncol.* 37, 296-300.

Shimizu, M., Suzuki, S., Takaya, S., Satoh, K. 2001. Replacement of the canine inferior vena cava with a seeded graft. *Surg. Today.* 31, 421-427.

Tanji, K., Imaizumi, T., Yoshida, H., Mori, F., Yoshimoto, M., Satoh, K., Wakabayashi, K. 2001. Expression of α -synuclein in a human glioma cell line and its up-regulation by interleukin-1 β . *Neuroreport.* 12, 1909-1912.

Fujimoto, K., Imaizumi, T., Yoshida, H., Takanashi, S., Okumura, K., Satoh, K. 2001. Interferon- γ stimulates fractalkine expression in human bronchial epithelial cells and regulates mononuclear cell adherence. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* 25, 233-238.

Tanji, K., Mori, F., Nakajo, S., Imaizumi, T., Yoshida, H., Hirabayashi, T., Yoshimoto, M.,

Satoh, K., Takahashi, H., Wakabayashi, K. 2001. Expression of β -synuclein in normal human astrocytes. *Neuroreport.* 12, 2845-2848.

Matsumiya, T., Imaizumi, T., Fujimoto, K., Cui, X-F, Shibata, T., Tamo, W., Kumagai, M., Tanji, K., Yoshida, H., Kimura, H., Satoh, K. 2001. Soluble interleukin-6 receptor α inhibits the cytokine-induced fractalkine expression in human vascular endothelial cells. *Exp. Cell Res.* 269, 35-41.

Yoshida, H., Imaizumi, T., Kumagai, M., Kimura, K., Satoh, C., Hanada, N., Fujimoto, K., Nishi, N., Tanji, K., Matsumiya, T., Mori, F., Cui, X-F, Tamo, W., Shibata, T., Takanashi, S., Okumura, K., Nakamura, T., Wakabayashi, K., Kirashima, M., Sato, Y., Satoh, K. 2001. Interleukin-1 β stimulates galectin-9 expression in human astrocytes. *Neuroreport.* 12, 3755-3758.

Imaizumi, T., Aratani, S., Nakajima, T., Carlson, M., Matsumiya, T., Tanji, K., Ookawa, K., Yoshida, H., Tsuchida, S., McIntyre, T.M., Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., Satoh, K. 2002. Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) is induced in endothelial cells by LPS and regulates expression of COX-2. *Biochim. Biophys. Acta.* 292, 274-279.

2. 学会発表

第 42 回日本神経病理学会総会

【東京都】 2001. 5. 24-26

ヒト培養グリオーマ細胞における α -synuclein の

発現.

丹治邦和¹、今泉忠淳²、吉田秀見²、吉本 真³、
佐藤 敬²、若林孝一¹

¹弘前大学医学部附属脳神経血管病態研究施設分子病態部門

²弘前大学医学部附属脳神経血管病態研究施設脳血管病態学部門

³大正製薬医薬研究所

第 33 回日本動脈硬化学会総会

【東京都】 2001. 6. 7-8

オキシステロールによるメタロプロテイナーゼ
の活性化と可溶性細胞接着因子について.

村上 宏¹、玉澤直樹¹、松井 淳¹、大和一美¹、
須田俊宏¹、今泉忠淳²、吉田秀見²、佐藤 敬²

¹弘前大学医学部第 3 内科

²弘前大学医学部附属脳神経血管病態研究施設脳血管病態部門

第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学合同大会

【京都市】 2001. 9. 26-28

アストロサイトにおける α -および β -synuclein の

発現.

丹治邦和¹、森 文秋¹、中条茂男²、今泉忠淳³、
吉田秀見³、平林敬浩²、吉本 真⁴、佐藤 敬³、
高橋 均⁵、若林孝一¹

¹弘前大学医学部附属脳神経血管病態研究施設分子病態部門

²昭和大学薬学部生物化学研究室

³弘前大学医学部附属脳神経血管病態研究施設脳血管病態部門

⁴大正製薬医薬研究所

⁵新潟大学脳研究所病理学分野

第 74 回日本生化学会大会

【京都市】 2001. 10. 25-28

ヒト血管内皮細胞における galectin-9 の発現.

今泉忠淳¹、西 望²、積 正子³、中村隆範²、
平島光臣³、吉田秀見¹、佐藤 敬¹

¹弘前大学医学部附属脳神経血管病態研究施設脳血管病態部門

²香川医科大学内分内分泌内科学

³香川医科大学免疫病理学

別添 6

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
坂上 拓郎 井ノ上 逸朗	SNPs タイピング 技術の進歩と SNPs の今後		ゲノム医科 学がわかる	羊土社	東京	2001	108-114
糟谷 英俊 平沢 研一 竹下 幹彦 岡田 芳和 堀 智勝	クモ膜下出血急性 期患者管理：DDG アナライザーを用 いて	浅野孝雄、太 田富雄、その 他	脳血管攣縮 vol.16	中外医学社	東京	2001	101-105
糟谷 英俊 恩田 英明 竹下 幹彦 岡田 芳和 堀 智勝	新しいスパズム治 療：ニカルジピン ペレットの臨床効 果	浅野孝雄、太 田富雄、その 他	脳血管攣縮 vol.16	中外医学社	東京	2001	124-128

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Nakajima T, Jorde LB, Ishigami T, Umemura S, Emi M, Lalouel JM, Inoue I	Nucleotide diversity and haplotype structure of the human angiotensinogen gene in two populations	<i>Am. J. Hum. Genet.</i>	70	108-123	2002
井ノ上逸朗	多因子病の遺伝子解析の進め方	内分泌・糖尿病科	14	3-10	2002
Furushima K, Shimo-onoda K, Maeda S, Nobukuni T, Ikari K, Koga H, Komiya S, Nakajima T, Harata S, Inoue I	Large-scale screening for candidate genes of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine	<i>J. Bone Miner. Res.</i>	17	128-137	2002
Maeda S, Ishidou K, Koga K, Taketomi E, Ikari K, Komiya S,	Functional impact of human collagen α 2 (XI) gene polymorphism in pathogenesis	<i>J. Bone Miner. Res.</i>	16	948-957	2001

Takeda J, Inoue I	of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine				
井ノ上逸朗	SNP 解析の実際	血液・免疫・腫瘍	6	19-24	2001
Yabe I, Sasaki H, Yamashita I, Tashiro K, Tatei A, Suzuki Y, Kida H, Takiyama Y, Nishizawa M, Hokezu Y, Nagamatsu K, Oda T, Ohnishi A, Inoue I, Hata A	Predisposing chromosome of spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) in Japanese	<i>J. Med. Genet.</i>	38	328-333	2001
Onda H, Kasuya H, Yoneyama T, Takakura K, Hori T, Takeda J, Nakajima T, Inoue I	Genome-wide linkage and haplotype association studies map intracranial aneurysm to chromosome 7	<i>Am. J. Hum. Genet.</i>	69	804-819	2001
Nakajima T, Inoue I, Cheng T, Lalouel JM	Molecular cloning and functional analysis of a factor that binds to the proximal promoter of human angiotensinogen	<i>J. Hum. Genet.</i>	47	7-13	2001
Mori H, Ikegami H, Kawaguchi Y, Saino S, Yokoi N, Takeda J, Inoue I, Seino Y, Yasuda K, Hanafusa T, Yamagata K, Awata T, Kadowaki T, Hara K, Yamada N, Gotoda T, Iwasaki N, Iwamoto Y, Sanke T, Nanjo K, Oka Y, Matsutani A, Maeda E, Kasuga M	Association of the Pro12·Ala substitution in peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 both with resistance to development of diabetes and with impairment of insulin secretion and disease severity in individuals with type 2 diabetes mellitus	<i>Diabetes</i>	50	891-894	2001
Aihara Y, Onda H,	Assignment of SLC17A6 (alias	<i>Cytogenet. Cell</i>	92	167-169	2001

Teraoka H, Yokoyama Y, Seio Y, Kasuya H, Hori T, Tomura H, Inoue I, Kojima I, Takeda J	DNPI), the gene encoding brain/pancreatic islet-type Na ⁺ -dependent inorganic phosphate cotransporter to human chromosome 11p14.3	<i>Genet.</i>			
Nishigori H, Tomura H, Kanamori M, Yamada S, Kikuchi N, Sho K, Tonooka N, Onigata K, Inoue I, Kojima I, Yamagata K, Yang Q, Matsuzawa Y, Kohama T, Miki T, Seino S, Kim M, Choi H, Moore D, Takeda J	Mutations in the small heterodimer partner gene are associated with mild obesity in Japan	<i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i>	98	575-580	2001
Maeda S, Koga H, Matsunaga S, Numasawa T, Takeda J, Harata S, Sakkou T, Inoue I	Gender-specific haplotype association of collagen $\alpha 2$ (XI) gene in ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine	<i>J. Hum. Genet.</i>	46	1-4	2001
井ノ上逸朗	後縦靭帯骨化症とコラーゲン 11A2 遺伝子	整形・災害外科	44	1251-1253	2001
古島弘三、井ノ上逸朗	後縦靭帯骨化症の原因遺伝子解明に向けて	<i>BIO Clinica</i>	16	28-33	2001
井ノ上逸朗	罹患同胞対連鎖解析法による疾患遺伝子研究	アレルギー科	11	554-560	2001
井ノ上逸朗	クモ膜下出血の SNP 解析	日医大誌	68	422-425	2001
井ノ上逸朗	後縦靭帯骨化症の責任遺伝子解明に向けて	蛋白質 核酸 酵素	46	2289-2294	2001
坂上拓郎、井ノ上逸朗	SNP を用いた遺伝子解析の実際と展望	アレルギー・免疫	8	1100-1107	2001
Aihara Y, Kasuya H, Onda H, Hori T, Takeda J	Quantitative analysis of gene expression related to inflammation in canine spastic	<i>Stroke</i>	32	212-217	2001

	artery following subarachnoid hemorrhage				
Kasuya H, Onda H, Kawashima A, Sasahara A, Hori T	Identification of genes differentially expressed in canine vasospastic cerebral arteries after subarachnoid hemorrhage	<i>Acta Neurochir. (Suppl)</i>	77	13-16	2001
Kasuya H, Kawashima A, Sasahara A, Onda H, Hori T	Development of nicardipine prolonged-release implants for preventing vasospasm	<i>Acta Neurochir. (Suppl)</i>	77	217-220	2001
Kasuya H	Statistical techniques and vasospasm	<i>J. Neurosurgery</i>	96	381 (letter)	2002
Kasuya H, Onda H, Takeshita M, Okada Y, Hori T	Efficacy and safety of nicardipine prolonged-release implants for preventing vasospasm in humans	<i>Stroke</i>	33	1011-1015	2002
竹下幹彦、川俣貴一、糟谷英俊	中枢神経系の合併症	<i>Heart View</i>	5	618-624	2001
竹下幹彦、川俣貴一、糟谷英俊	髄膜炎の補助療法 ステロイドは有効か	化学療法の領域	17	1244-1249	2001
糟谷英俊、恩田英明、竹下幹彦、岡田芳和、氏家 弘、堀 智勝	未破裂無症候性脳動脈瘤の治療指針	脳卒中の外科	29	282-285	2001
糟谷英俊、堀 智勝	脳神経領域の突然死	<i>Cardiovascular Med-Surg.</i>	3	433-438	2001
糟谷英俊、恩田英明、川島明次、笹原 篤、岡田芳和、堀 智勝	ニカルジピンペレット (NP) の有効性と安全性	脳卒中の外科 (増刊号)	29 (suppl)	96-99	2001
Iwasaki H, Shinohara Y, Ezura Y, Ishida R, Kodaira M, Kajita M, Nakajima T, Shiba T, Emi M	Thirteen single-nucleotide polymorphisms in the human osteopontin gene identified by sequencing of the entire gene in Japanese individuals	<i>J. Hum. Genet.</i>	46	544-546	2001
Nakazawa I,	Linkage disequilibrium and	<i>J. Hum. Genet</i>	46	367-371	2001

Nakajima T, Ishigami T, Uemura S, Emi M	haplotype analysis among eight novel single-nucleotide polymorphisms in the human tissue-type plasminogen activator (t-PA) gene				
Ota N, Nakajima T, Nakazawa I, Suzuki T, Hosoi T, Orimo H, Inoue S, Shirai Y, Emi M	A nucleotide variant in the promotor region of the interleukin-6 gene associated with decreased bone mineral density	<i>J. Hum. Genet.</i>	46	267-272	2001
Nakazawa I, Nakajima T, Harada H, Ishigami T, Umemura S, Emi M	Human calcitonin receptor-like receptor for adrenomedullin: genomic structure, eight single-nucleotide polymorphisms, and haplotype analysis	<i>J. Hum. Genet.</i>	46	132-136	2001
Shinohara Y, Iwasaki H, Ota N, Nakajima T, Kodaira M, Kajita M, Shiba T, Emi M	Novel single nucleotide polymorphisms of the human nuclear factor kappa-B 2 gene identified by sequencing the entire gene	<i>J. Hum. Genet.</i>	46	50-51	2001
Kajita M, Iwasaki H, Ota N, Shinohara Y, Kodaira M, Nakajima T, Emi M	Novel single nucleotide polymorphisms of the human colony-stimulating factor 2 (CSA2) gene identified by sequencing the entire gene	<i>J. Hum. Genet.</i>	46	48-49	2001
Iwasaki H, Ota N, Nakajima T, Shinohara Y, Kodaira M, Kajita M, Emi M	Five novel single nucleotide polymorphisms of the human interferon gamma gene identified by sequencing the entire gene	<i>J. Hum. Genet.</i>	46	32-34	2001
Yoshida H, Imaizumi T, Fujimoto K, Matsuo N, Kimura K, Cui X,	Synergistic stimulation, by tumor necrosis factor- β and interferon- γ , of fractalkine	<i>Neurosci. Lett.</i>	303	132-136	2001