

200/0/0/0

厚生科学研究費補助金

脳科学研究事業

神経回路網形成障害の分子機構に関する研究

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 大野耕策

平成 14 (2002) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告書

| | |
|-----------------------|---|
| 神経回路網形成障害に関する研究 | 1 |
| 大野耕策 | |

II. 分担研究報告

| | |
|--|----|
| 1. ニーマン・ピック病C型の細胞膜コレステロールの動態に関する研究 --- | 8 |
| 二宮治明 | |
| 2. 神経セロイドリポフスチン症の分子病態に関する研究 | 11 |
| 岡 明 | |
| 3. 神経回路網形成と樹状突起スパイン可塑性に関する行動学的研究 | 13 |
| 佐治真理 | |

| | |
|---------------------------|----|
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 18 |
|---------------------------|----|

| | |
|-----------------------|----|
| IV. 研究成果の刊行物・別刷 | 23 |
|-----------------------|----|

神経回路網形成障害の分子機構に関する研究

主任研究者 大野耕策 鳥取大学医学部教授

【研究要旨】

古典的には、遺伝性神経疾患は発病時期、臨床経過と神経症状によって診断されてきた。このことは脳で働く1つの遺伝子は、特有の神経回路網を障害し、特有の経過と神経症状を呈することを示している。多くの遺伝性神経疾患の遺伝的原因が解明されたが、1つの分子がどのような神経細胞のどのような機能に影響するのか明らかにされた例は少ない。本研究は発育期の神経変性または神経分化の異常により特有な神経症状（神経回路網障害）を示す疾患の分子機構の解明を目的とし、治療法の確立を目指すものである。小児期の神経遺伝病であるニーマン・ピック病C型、結節性硬化症を対象とすると同時に、動物発育期神経回路網形成に重要な分子のノックダウンによる行動・認知障害を示すラットの解析である。

ニーマン・ピック病C型については、昨年度、モデルマウスの脳では視床VPL/VPMと深部知覚の中継核である延髄後索核や後根に早期から軸索変性が出現し、感覚系優位な神経回路網障害がおこることを見出した。脂質の細胞内蓄積機構を解析する過程で、ニーマン・ピック病C型の原因蛋白質NPC1はリソソーム・後期エンドソームからの小胞輸送だけでなく、早期エンドソームから細胞膜への小胞輸送にも関与することを見だした。今年度、ニーマン・ピック病C型細胞の細胞膜コレステロールをガス壊そ菌毒素BC θ を用いて検討したところ、正常と異なりこの毒素と結合するコレステロールが細胞膜の小胞上に集積し、これまで全く知られていなかった形(membrane shedding)によって、この小胞が細胞外に放出されることを見だした。さらに、昨年度、DNAチップ法により、インターフェロンで誘導される一群の遺伝子発現が亢進し、STATsがモデルマウスの変性をおこす領域に強く発現することを見出していたが、今年度、このシグナル伝達の亢進は、ニーマン・ピック病C型細胞が培地中に放出する可溶性物質によることを明らかにした。この培地中の可溶性物質の精製と同定を行い、インターロイキン6が候補にあがり、現在モデルマウスおよび患者体液中で測定を急いでいる。

昨年度、結節性硬化症の遺伝子産物ハマルチンは培養神経細胞の分化に伴い核から細胞質に移行し、そのアンチセンスDNAによりハマルチンの発現を抑制すると神経突起の伸長が促進され、さらにRhoAの恒常的活性型変異体を発現させると突起の伸長が抑制され、ハマルチンの核・細胞質移行と神経細胞の分化と深く関係していることを見だした。今年度、ハマルチンと結合する分子をyeast two hybridで検討し、神経細胞の分化と関係するp75^{NTR} associated cell death excutor(NADE)がハマルチンと結合することを明らかにし、神経細胞分化におけるハマルチンの機能を明らかにする体制を整えた。

樹状突起のシナプス形成部位であるスパインの機能に重要な役割をするドレブリンAのアンチセンスノックダウンを行い、神経環境への適応障害、状況変化を認知できないことによる誤り試行がおこり、発達障害のモデルになることを明らかにした。

分担研究者

二宮治明・鳥取大学医学部・助教授
岡 明・鳥取大学医学部・助教授
佐治真理・北里大学医療衛生学部・教授

研究協力者

大原慎司・国立療養所中信松本病院・医長
渡部和彦・東京都神経科学総合研究所・副
参事研究員
難波栄二・鳥取大学遺伝子実験施設・助教
授
伊藤壽啓・鳥取大学農学部・教授

A. 研究目的

遺伝性神経疾患はそれぞれに特有な発病時期、経過、臨床症状によって診断されてきた。その背景には1つの遺伝的欠陥が、特定の神経回路網の成熟障害や変性と関係していると考えられる。1つの遺伝的欠陥がなぜ特定の神経回路網の成熟障害や変性とつながるのか明らかにされた例はほとんどない。それぞれの遺伝的欠陥での、発育期神経回路網形成障害の分子機構を明らかにしていくことは、個々の神経回路網の特異性を明らかにすると同時に、治療法確立に向けて重要であると考えている。3年計画のこの研究では、脂質蓄積を示し神経細胞が早期に変性するニーマン・ピック病C型と経細胞の発生分化をおこす結節性硬化症を取り上げ、その神経回路網形成障害の分子機構を明らかにすることで、治療法の開発をめざす。

分担研究者として、ニーマン・ピック病C型に欠損するNPC1の細胞内機能を明らかにし、分子薬理的治療法の開発を目標とする二宮、結節性硬化症やニーマン・ピ

ック病C型以外の遺伝性疾患の神経回路網形成障害の分子機構の解析をめざす岡、脳内神経回路網のHVJ-リソーム法により脳内へのアンチセンスDNAを導入し、特定の神経回路網の機能解析と治療法開発を目指す佐治を加えている。

また、モデルマウスの神経回路網障害をさらに神経病理学的に明らかにするため大原、モデルマウスの神経系培養細胞を分子病理学的に明らかにする渡部、分子遺伝学的な解明のために難波、NPCの軸索逆行性輸送を解析するために伊藤を研究協力者とした。

B. 研究方法

1. ニーマン・ピック病C型モデルマウスの神経回路網障害の検討

ニーマン・ピック病C型と同じ遺伝子に欠陥をもつマウス、3週齢、6週齢、9週齢について、脳組織切片を用い、神経細胞脱落領域、スフェロイドの分布、コレステロール蓄積部位、糖脂質蓄積部位について調べた(大野、研究協力者 大原)。

さらにモデルマウス神経系細胞株の樹立により、その神経細胞レベルでの異常の解析を目指した(研究協力者 渡部)

2. ニーマン・ピック病C型の原因蛋白質 NPC1 機能と欠損細胞における病態解析

ニーマン・ピック病C型では細胞内脂質小胞輸送の結果コレステロールやガングリオシッドの輸送に欠陥を来す、細胞表面のコレステロールの動態に異常があるかどうかは明かではない。これを明らかにする目的でCHO-npc(-)細胞でのBC θ 毒素の結合部位を検討する(分担研究者 二宮)。

3. ニーマン・ピック病C型における

JAK/STAT 系シグナル伝達系の異常の解析

NPC1 欠損細胞で発現蛋白質の違いをスクリーニングするため DNA チップ法により正常と患者細胞で発現量に違いのある mRNA をスクリーニングし、増加している mRNA について、細胞、組織レベルでの蛋白質の量をウエスタンブロットと免疫組織学的に調べた。これらの中で、インターフェロンで転写が促進される、STATs やインフルエンザ抵抗性遺伝子 MxA の発現が蛋白質レベルで増加していることが明らかになった。この背景を明らかにするとともに神経変性との関係を明らかにする(主任研究者 大野、分担研究者 二宮)。MxA 蛋白質の増加による影響を検討するために、神経系細胞株を用いてインフルエンザウイルスの感染・複製の効率の比較検討を行っている(研究協力者 伊藤)

4. 結節性硬化症の遺伝子産物ハマルチンと結合して働く蛋白質の同定と解析

Yeast Two Hybrid 法によって、ハマルチンの coiled-coiled domain と結合する分子群を同定し、これらがイースト内だけでなく培養細胞内で蛋白質レベルで結合していることを明らかにする(主任研究者 大野)。また結節性硬化症の変異の同定は日本で鳥取大学のみが継続しており、変異の検索は継続して行う(研究協力者 難波)。

5. 経セロイドリポフスチン症の遺伝子解析と診断法の確立

神経セロイドリポフスチン症は進行性神経変性疾患である。最近本疾患を引き起こすいくつかの遺伝子異常が明らかになった。日本人患者の遺伝子変異の特徴を明らかにするとともに、酵素測定による診断法を確立する(分担研究者 岡)。

6. 樹状突起のスパインに発現するドレブリン A(developmentally regulated brain protein A)のノックダウンラットの行動解析

樹状突起のスパインは神経回路の可塑性に重要な役割を果たしている可能性が高い。発育期ラット脳内のドレブリン A の発現をアンチセンス DNA でノックダウンし、その行動学的解析を行う。

C. 研究結果

1) ニーマン・ピック病神経回路網変性と その分子機構

① ニーマン・ピック病 C 型モデルマウスの神経変性はプルキンエ細胞だけでなく、視床 VPL/VPM も症状の進行と平行して脱落し、同時に、後根・後索・後索核も脱落し、感覚系神経回路が特異的に脱落することを見いだした。

② モデルマウスの脳でのプルキンエ細胞や視床 VPL/VPM 神経細胞の脱落とコレステロールやガングリオシッド GM1、GM2 の蓄積領域を検討したが、これらの脂質の蓄積が脱落していく神経細胞に特異的であると言う所見は得られなかった。興味あることに、ガングリオシッド GM1 と GM2 の脳内蓄積部位は異なり、また培養プルキンエ細胞レベルでも GM2 は各周囲のライソゾームに蓄積するのに対し、GM1 は樹状突起に染まりその蓄積部位が異なっていた。

③ ガングリオシッド GM1 の蓄積部位が早期エンドソームであることを明らかにし、ニーマン・ピック病 C 型に欠損する NPC1 はこれまで知られていたライソゾーム/後期エンドソームからの脂質小胞輸送だけでなく、早期エンドソームから細胞膜への小胞輸送に関与することを見

いだした。

- ④ 細胞表面のコレステロールの動態を明らかにする目的で CHO-npc(-)細胞での BCθ 毒素の結合部位を検討し、この毒素は NPC 細胞では細胞表面の小胞に存在し、さらに NPC1 細胞はこれまで全く知られなかった方法(membrane shedding)で、細胞表面のコレステロールを含む小胞を細胞外に放出することを見いだした(未発表)。
- ⑤ ニーマン・ピック病C型患者細胞と正常細胞の mRNA 発現パターンを DNA マイクロアレイで比較し、インターフェロンで誘導される一群の遺伝子の発現が亢進していることを見いだした。この背景に STAT/JAK シグナル伝達系が亢進し、これらは CHO-npc1(-)でも確認し、さらに STAT3 と 6 はモデルマウスの脳の特に変性するプルキンエ細胞や視床 VPL/VPM 細胞で発現が増加していることを見いだした。JAK/STAT 系シグナルの亢進は NPC 細胞が放出するサイトカインによっておこることを見だし、このサイトカインがプルキンエ細胞と感覚系回路網神経変性の原因であると考え、患者血清や髄液での測定とその機構を検討している(未発表)。

2) 結節性硬化症の原因分子ハマルチンと結合する蛋白質の解析と神経分化異常の背景

- ① Yeast Two Hybrid 法によって、ハマルチンの coiled-coiled domain と結合する分子群の中から、p75NTR associated cell death excutor(NADE)と menage a trios 1(MAT1) に注目した(未発表)。
- ② N-末に GFP を tagging した TSC1cDNA および C 末に Myc を tagging した NADE cDNA を COS7 細

胞内で発現させ、抗 myc 抗体を用いて NADE の局在を検討した。ハマルチンは細胞質にドット状に染色され、NADE は細胞質全体に存在し、merge では、この2つの蛋白質は adhesion plaque で共存していた(未発表)。

- ③ PC12 細胞のホモジネートを抗ハマルチン抗体による免疫沈降した蛋白質の中から NADE が検出された。以上からハマルチンと NADE は yeast レベルだけでなく、ほ乳類の細胞内でも蛋白質レベルで、結合・共存していることが明らかになった(未発表)。
- ④ NGF 刺激前後の PC12 細胞を抗 p75NTR 抗体で免疫沈降し、沈降物を電気泳動後、ハマルチン(Santa Cruz), ツベリン(Santa Cruz), NADE(Taka-Aki Sato 博士から分与を受けた)に対する抗体でこれら蛋白質の NGF 刺激前後の量的変化を検討した。この結果、ハマルチン、ツベリン、NADE 蛋白質ともに NGF 刺激前より p75NTR と結合し、NGF 刺激によって量的に増加することを確認した。このことは、p75NTR を介して、NADE とハマルチンが結合するだけでなく、TSC2 遺伝子産物のツベリンも結合していることが明らかになった(未発表)。
- ⑤ N末に GFP を tagging した MAT1 とハマルチン抗体を用いて、COS7 では MAT1 は主に核と細胞質にドット状に存在し、細胞質ではハマルチンの局在と一致していた。

3) 神経セロイドリポフスチン症の病態解明

- ① 神経セロイドリポフスチン症は進行性神経変性疾患である。本疾患の分子異常が明らかになり、これまで組織の電子顕微鏡的所見でしか診断ができなかったが、末梢血での診断を可能にした。

② 日本人症例は、ほとんどが CLN2 に欠陥があることが明らかになったが、日本人では CLN1-3 のいずれでもない症例が存在していることが明らかになった。

4) 発育期神経回路網形成障害の実験的研究

① ドレブリン A (developmentally regulated brain protein A) はラット新皮質、海馬、視床で豊富で、小脳で少なかった。9-10 週齢の雄ウイスターラット脳室内にドレブリン A のアンチセンス DNA を HVJ リポソーム法で導入すると、その発現は 4 日以内に著しく減少し、8 日目でも低下が続き、18 日にはもとのレベルまで戻った

② オープンフィールドテストで、ドレブリン A ノックダウンマウスは対照群と比較して、長い毛繕い行動、短い静止行動が有意に観察され、新規環境に適応しにくい傾向を示し、アンフェタミン投与で自発運動の異常な増強があり、モーリス水迷路試験で空間記憶形成が確認された直後のプローブテストで、有意に長い時間プラットホームを探し続ける行動異常を示した (未発表)。

D. 考察

1) ニーマン・ピック病神経回路網変性とその分子機構

ニーマン・ピック病 C 型で特徴的なブルキンエ細胞、後根・後索・後索核・視床 VPL/VPM に至る感覚系神経回路網の系統の変性と直接関与する可能性の高い分子を見いだすことが本研究の 1 つの大きな課題である。DNA マイクロアレイの結果から、インターフェロンで誘導される一連の遺伝子が発現亢進しており、この背景に JAK/STAT 系シグナル伝達系が活性化され、特に変性していく神経細胞で強い発現を認

めた。この JAK/STAT 系の亢進がニーマン・ピック病 C 型細胞が細胞外に放出する可溶性物質によることを確認し、この物質がインターロイキン 6 である可能性を確認しつつある。これらが患者体液や脳内でもぞうかしており、神経変性と関係していることが明らかになれば、治療の標的となる可能性が出てきた。

2) 結節性硬化症の原因分子ハマルチンと結合する蛋白質の解析と神経分化異常の背景

TNF 受容体ファミリーに属する p75^{NTR} は神経成長因子 NGF が結語することで神経細胞の死と生存を制御している。NADE はこの p75^{NTR} の細胞死を誘導する domain に結合し、NGF による神経細胞のアポトーシスを誘導する分子として同定された。また、核外移行シグナルを持つことから、我々が昨年観察した NGF による神経細胞分化に伴うハマルチンの核外移行と関係している可能性があると考え、神経細胞分化との関係をさらに明らかにしていく。MAT1 はサイクリン依存性キナーゼ CDK7 とサイクリン H とともに CDK 活性化キナーゼのサブユニットを構成し、細胞周期、DNA 転写や修復に関与するとされている。結節性硬化症の細胞周期異常 S 期の増加と関係する可能性のある分子としてさらに検討していく。

3) 神経セロイドリポフスチン症の病態解明

神経セロイドリポフスチン症はこれまで電子顕微鏡での細胞内蓄積物の構造でしか確定診断できなかった。酵素活性による診断の系を作成すると同時に、遺伝子変異を同定した。今後、これら遺伝子産物と神経変性の関係を明らかにしていく予定である。

4) 発育期神経回路網形成障害の実験的研究

③ 樹状突起スパインはシナプス可塑性に重要な役割を果たすことが知られ、ダウン症などの発達障害でその形成が悪いことが知られている。樹状突起スパインに蓄積するドレブリンAのアンチセンスノックダウンによって、新規環境への適応異常、ドーパミンへの過感受性、正常な空間記憶形成、状況変化を認知できないことからくる誤り試行への固執などの行動の異常が観察され、精神遅滞、自閉症や精神分裂病のモデルとなる可能性が期待できる。

E. 結論

小児期の神経変性疾患の中で、ニーマン・ピック病C型については、この疾患に欠損するNPC1分子の機能と欠損細胞での新たな知見を追加するとともに、モデルマウスでの脆弱神経回路網を同定し、神経変性に直接関与すると考えられる分子に到達した。今後、その分子の制御法の開発を目指す。

神経回路形成障害を示す結節性硬化症については、原因遺伝子の1つハマルチンと結合する蛋白質の中から、神経細胞の分化とアポトーシスに関与するNADEを介し、ツペリンとも結合することを見だし、結節性硬化症の神経細胞分化異常の背景を明らかにできる可能性が出てきた。また、MAT1は細胞周期進行に関与し、多くの臓器での腫瘍化の背景を明らかにできる可能性がある。

神経セロイドリポフスチノーシスは遺伝子が同定されて時間がたっており、診断と遺伝的分類を行っている。今後、神経変性機構に関わる分子機構を明らかにしていく必要がある。

発育期の神経回路網形成障害の実験的研究として、樹状突起スパインの機能に重要

なドレブリンAのノックダウンで、ラットに行動障害が観察された。発育期の高次機能の発達に重要な実験系になると期待される。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

論文発表

1. Sawamura N, Jian-Sheng Gong J-S, Garver WS, Heidenreich RA, Ninomiya H, Ohno K, Yanagisawa K, and Michikawa M: Site-specific phosphorylation of tau accompanied by activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) in brains of Niemann-Pick type C mice. *J Biol Chem* 276: 10314-10319, 2001
2. Higaki K, Ninomiya H, Sugimoto Y, Suzuki T, Niwa H, Pentchev P G, Vanier M T and Ohno K: Isolation of NPC1 deficient Chinese hamster ovary cell mutants by gene trap mutagenesis. *J Biochem (Tokyo)* 129: 875-880, 2001
3. Higaki K, Ninomiya H, Saji M, Maki H, Koike T, Ohno K. Protective effect of Neurotrophin against lipopolysaccharide-induced hypotension and lethality linked to suppression of inducible nitric oxide synthase induction. *Jpn J Pharmacol* 86: 329-335, 2001
4. Tsukamoto H, Yamamoto T, Nishigaki T, Sakai N, Nanba E, Ninomiya H, Ohno K, Inui K and Okada S: SSCP analysis by RT-PCR for the prenatal diagnosis of Niemann-Pick disease type C. *Prenat Diagn* 21: 55-57, 2001
5. Yamada A, Saji M, Ukita Y, Shinoda Y, Taniguchi M, Higaki K, Ninomiya H and Ohno K: Progressive cell loss in the

- ventral posterior lateral and medial nuclei of thalamus in Niemann-Pick disease type C mice brain. *Brain Dev* 23: 288-297, 2001
6. Tominaga L, Ogawa Y, Taniguchi M, Ohno K, Matsuda J, Oshima A, Suzuki Y, Nanba E. Galactonojirimycin derivatives restore mutant human b-galactosidase activities expressed in fibroblasts from enzyme-deficient knockout mouse. *Brain Dev* 23: 284-287, 2001
7. Millat G, Marcais C, Tomasetto C, Chikh K, Fensom A H, Harzer K, Wenger D A, Ohno K and Vanier M T: Niemann-Pick C1 disease: correlations between NPC1 mutations, levels of NPC1 protein and phenotypes emphasize the functional significance of the putative sterol-sensing domain and of the cysteine-rich luminal loop. *Am J Hum Genet* 68: 1373-1385, 2001
8. Watabe K, Ida H, Uehara K, Oyanagi K, Sakamoto T, Tanaka J, Garver W S, Miyawaki S, Ohno K and Eto Y: Establishment and characterization of immortalized Schwann cells from murine model of Niemann-Pick disease type C (*spm/spm*). *J Peripher Nerv Syst* 6: 85-94,
9. Taniguchi M, Shinoda Y, Ninomiya H, Vanier M T and Ohno K: Sites and temporal changes of gangliosides GM1/GM2 storage in the Niemann-Pick disease type C mouse brain. *Brain Dev* 23:414-421, 2001
10. Sugimoto Y, Ninomiya H, Ohsaki Y, Higaki K, Davies J P, Ioannou Y A and Ohno K: Accumulation of cholera toxin and GM1 ganglioside in the early endosome of Niemann-Pick C1-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 12391-12396, 2001
11. 大野耕策 Q&A -結節性硬化症とはどんな病気ですか-健康 29: 6-8, 2001

学会発表

1. 二宮治明、杉本優子、大崎雄樹、檜垣克美、大野耕策. Niemann-Pick 病C型での細胞小胞内脂質蓄積の機序. 日本生化学会シンポジウム「脂質の細胞内輸送システム研究の新しい展開」第74回日本生化学会大会、国立京都国際会館・京都、平成13年10月25日
2. 大野耕策、湯浅 勲、山下克子. 先天性グリコシル化異常症 (CDG症候群)。日本生化学会シンポジウム「イソプレノイド・ドリコール関連物質の生合成及び機能」第74回日本生化学会大会、国立京都国際会館・京都、平成13年10月27日

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
分担研究報告書

ニーマン・ピック病C型の細胞膜コレステロールの動態に関する研究

分担研究者 二宮 治明 鳥取大学医学部神経生物学助教授

研究要旨 Niemann-Pick disease type C (NPC)は、進行性の神経細胞変性を伴う致死性の小児のライソゾーム蓄積病である。NPC 細胞における細胞表面コレステロールの動態を明らかにすることを目的として、NPC1 欠損 CHO 細胞 (CHO^{npc1(-)}) における BC θ 毒素の結合部位、性質を解析し、以下の結果を得た。(1) NPC1 欠損細胞において BC θ は細胞表面のベジクルに結合する。(2) このベジクルは membrane shedding により形成され、細胞外へ排出される。これらの結果は、NPC1 欠損細胞がこれまでに全く知られていなかった方法 (membrane shedding) で細胞表面コレステロールを細胞外へ排出する事を示唆する。

A. 研究目的

NPC は、コレステロールと糖脂質の細胞小胞内蓄積を特徴とする、致死性の小児のライソゾーム蓄積病である。病理学的には、視床神経細胞や小脳 Purkinje 細胞をはじめとする種々の神経細胞が進行的に脱落し、臨床的には中枢神経症状が前景にたつ。主要原因遺伝子産物 NPC1 は、脂質小胞輸送に関わる膜蛋白質であるが、詳細な機能はいまだ不明である。我々の目的は、NPC1 の機能、脂質蓄積の機序、神経細胞死の機序を明らかにし、NPC の治療方法を見い出すことである。本研究では NPC 細胞における細胞表面コレステロールの動態を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

ガス壊疽菌毒素 θ -toxin は細胞膜表面コレステロールと特異的に結合する。 θ -toxin を無毒化しビオチン化した BC θ をプローブとして用い、NPC1 欠損 CHO 細胞

(CHO^{npc1(-)}) における細胞膜表面コレステロールの動態を検討した。

C. 研究結果

共焦点レーザー顕微鏡による観察では NPC1 human fibroblast 及び CHO^{npc1(-)} において BC θ により標識される細胞表面の構造物が正常細胞に比べ有意に多く見られた。この結合は細胞をリポ蛋白欠損血清で培養すると消失した。一方、progesterone により薬理的に細胞内コレステロールを蓄積させた正常細胞でも NPC 細胞と同様の結果が得られた。走査電顕ならびに透過電顕において、CHO^{npc1(-)} の細胞膜から数百 nm 径の vesicle が membrane shedding により形成され、細胞外へ排出されていること、この vesicle 上に BC θ が局在する事が判明した。BC θ の結合は、cyclodextrin 処理により消失し、1% NP-40 処理によっても消失したが 1% TritonX-100 処理には抵抗性だった。また sucrose density

gradient による fractionation の結果、結合した BC θ は floating low-density fraction に回収された。これらの結果は BC θ がいわゆるラフト画分に結合すること、従って、CHO^{npc1(-)} の vesicle はラフト画分を多く含む事を示唆する。また、NPC 細胞では溶血活性を保持した θ -toxin に対する感受性が低下しており、この細胞が毒素を active に細胞外へ排出する事を示唆する。

D. 考察

以上の結果から、NPC 細胞はコレステロールを細胞小胞内に蓄積することと並行して、ラフト画分を多く含みコレステロールに富む vesicle を membrane shedding により形成し、細胞表面コレステロールを細胞外へ排出することが示唆される。

E. 結論

NPC1 欠損細胞はこれまでに全く知られていなかった方法(membrane shedding) で細胞表面コレステロールを細胞外へ排出する。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hosokawa H, Ninomiya H, Kitamura Y, Fujiwara K and Masaki T. Vascular endothelial cells that express dystroglycan are involved in angiogenesis. *J Cell Sci* (in press)

Yamamoto T, Pipo JR, Heng J-H, Takeda H, Nanba E, Maegaki Y, Ninomiya H, Ohno K. Novel TSC1 and TSC2 mutations in Japanese patients with tuberous sclerosis complex. *Brain Dev*

(in press)

Sugimoto Y, Ninomiya H, Ohsaki Y, Higaki K, Davies JP, Ioannou Y.A and Ohno K. Accumulation of cholera toxin and GM1 ganglioside in the early endosome of Niemann-Pick C1-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 98:12391-12396.

Taniguchi M, Shinoda Y, Ninomiya H, Vanier MT and Ohno K. Sites and temporal changes of gangliosides GM1/GM2 storage in the Niemann-Pick disease type C mouse brain. *Brain Dev* 2001 23: 414-421.

Yamada A, Saji M, Ukita Y, Shinoda Y, Taniguchi M, Higaki K, Ninomiya H and Ohno K. Progressive cell loss in the ventral posterior lateral and medial nuclei of thalamus in Niemann-Pick disease type C mice brain. *Brain Dev* 2001 23: 288-97.

Higaki K, Ninomiya H, Saji M, Maki H, Koike T and Ohno K. Protective effect of neutropin against LPS-induced hypotension and lethality linked to suppression of iNOS induction. *Japan. J Pharmacol* 2001 86: 329-335.

Higaki K, Ninomiya H, Sugimoto Y, Suzuki T, Niwa H, Pentchev PG, Vanier MT and Ohno K. Isolation of NPC1-deficient Chinese hamster ovary cell mutants by gene trap mutagenesis. *J Biochem (Tokyo)* 2001 129: 875-880.

Yamamoto T, Pipo JR, Ninomiya H,

Ieshima A and Koeda T. Antley-Bixler syndrome and maternal virilization: a proposal of genetic heterogeneity. Clin Genet 2001 59: 451-453.

Sawamura N, Gong J-S, Garver WS, Ninomiya H, Ohno K, Yanagisawa K and Michikawa M. Site-specific phosphorylation of tau accompanied by activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) in brains of Niemann-Pick type C mice. J Biol Chem 2001 276: 10314-10319.

Tsukamoto H, Yamamoto T, Nishigaki T, Sakai N, Nanba E, Ninomiya H, Ohno K, Inui K and Okada S. SSCP analysis by RT-PCR for the prenatal diagnosis of Niemann-Pick disease type C. Prenat Diag 2001 21: 52-54.

Yamamoto T, Akaboshi S, Ninomiya H, and Nanba E. DEFECT 11 syndrome associated with agenesis of corpus callosum. J Med Genet 2000 38: E5.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
分担研究報告書

神経セロイドリポフスチン症の分子病態に関する研究

分担研究者 岡 明 鳥取大学医学部脳神経小児科助教授

研究要旨

致死的な進行性神経変性疾患である神経セロイドリポフスチン症（NCL）について、欠損酵素や遺伝子異常の解析を行い、病態の解明を試みた。小児期 NCL の主要なサブタイプである CLN1-3 について、分子レベルでの診断を行うシステムを作り解析したところ、本邦の小児期発症の NCL のほとんどは CLN2 であった。しかし、CLN1-3 のいずれでもないケースも存在した点が注目された。今後は、CLN2 中心に、その病態をさらに検討し、治療法の検討をする必要があると考えられる。

A. 研究目的

神経セロイドリポフスチン症（NCL）は、主として乳児から小児期に発症する進行性神経変性疾患群で、現在有効な治療がなく致死的な疾患である。ライソゾーム病の中では、比較的頻度が高く、何らかの有効な治療法の開発が重要な課題となっている。最近になり本疾患群の各サブタイプについて分子機序が次々に明らかにされ、病態解明と治療的試みへの期待が高まっている。本研究では本邦の NCL 患者において、欠損酵素や遺伝子異常の解析を行い、病態の解明をすることを目的とする。

B. 研究方法

小児期に発症し頻度が高いと考えられる Infantile type (CLN1)、Late infantile type (CLN2)、Juvenile type (CLN3) について、検討した。

臨床的に NCL と診断された患者について、線維芽細胞、リンパ芽球、末梢リンパ球にて、下記を行った。

CLN1: Palmitoyl protein

thioesterase (PPT) 酵素活性測定

CLN2: Pepinase 酵素活性測定、ウェスタンブロット、免疫組織科学、遺伝子解析 (Direct sequence)

CLN3: CLN3 gene の SSCP

(倫理面への配慮)

遺伝子解析についてはインフォームドコンセントの上で、実施した。

C. 研究結果

(1) CLN2: 培養細胞を用いた酵素活性・ウェスタンブロットにて、CLN2 の診断は可能であった。Pepinase 酵素活性は完全に欠損しており、蛋白の発現も著明に低下していた。診断確定例の 4 例にて遺伝子解析を行い、外国ですでに報告されている変異のうち頻度の多い 3670C→T の変異はホモ接合体 1 例とヘテロ 1 例（もう一つの allele は 3383C→T）で認めた。他の 2 症例においては、2 つの新規の変異を認めた。新規の遺伝子変異は、ミスセンス及びイントロ

ンの異常で、発現実験による確認はしていないが、コントロール群では同様の変異は認められなかった。

(2) CLN1 は、今回の検索では、責任酵素である PPT の酵素活性の欠損例は認められなかった。また、臨床的に Juvenile type とされながら、封入体が Infantile type と同じ GROD を示す患者では、PPT の酵素活性の低下が報告されてきている。しかし、我々の症例では、そうした例でも PPT の活性は正常であり、PPT 欠損による若年発症型 NCL とは異なっていた。

(3) CLN3 についても原因遺伝子の検討したが、SSCP にて異常は認められなかった。

F. 考察

CLN1-3 について、末梢血などの検体による診断が可能であった。その結果、本邦の小児期発症の NCL のほとんどは CLN2 であると考えられた。しかし、今回検索したケースの中には、CLN1、CLN2、CLN3 のいずれでもないケースも存在した。そうした症例については、最近明らかになってきている CLN5、CLN6 の遺伝子についても検討する必要があると考えられる。また今後は、CLN2 中心に、その病態をさらに検討し、細胞障害の機序を解析する必要があると考えられる。

E. 結論

本邦の小児期 NCL の主要なサブタイプである CLN1、CLN2、CLN3 について、分子レベルでの診断を行うシステムを作ることが出来た。その結果、本邦では主として CLN2 のサブタイプの患者が多いことが明らかになった。また、遺伝子異常としては、新規の変異を同定することが出来た。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kurachi Y, Oka A, Itoh M, Hayashi M, Takashima S. Distribution and development of CLN2 protein, the late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis gene product. *Acta Neuropathol(Berl)* 2001 102:20-6

2. 学会発表

倉地由季子、岡明、水口雅、伊藤雅之、後藤雄一、高嶋幸男 Classical late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis(LINCL)の遺伝子解析 第43回日本小児神経学会 平成13年6月8日

岡明、倉地由季子、伊藤雅之、山本至俊、難波栄二、高嶋幸男 Neuronal ceroid lipofuscinosis の病態の解析と診断 第43回日本小児神経学会 平成13年6月8日

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
分担研究報告書

神経回路網形成と樹状突起スパイン可塑性に関する行動学的研究
—ドレブリン発現全脳ノックダウンラットの精神分裂病様の認知障害—

分担研究者 佐治 真理 北里大学医療衛生学部教授

研究要旨

樹状突起スパイン低形成は精神分裂病患者において報告されてきた。樹状突起に特異的に集積しており突起伸長を制御していると考えられるアクチン結合蛋白質ドレブリンは、ある種の精神疾患における認知機能異常に関与しているかもしれない。認知機能に基づいた知覚—行動発現システム (sensorimotor gating) のためのシナプス機構におけるドレブリンの役割を明らかにするために、我々はドレブリンに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド (Dre-AS) とHVJ-リボソーム遺伝子導入法との併用によるドレブリン全脳ノックダウン処置をラットに施した。ドレブリン発現抑制が確認された Dre-AS /HVJ-リボソーム複合体脳室内投与の4日後にいくつかの行動課題をもちいて行動異常の解析を行った。その結果、ドレブリンノックダウンを施したラットは、新規環境に対する適応性の異常をもち、ドーパミンに対して過感受性であり、認知機能に基づく驚愕反応の先行刺激による抑制応答 (prepulse inhibition) に障害を呈した。更に、水迷路学習課題において、空間記憶は正常であるが、誤り試行を認知できないための異常な固執行動を呈した。このように、ドレブリン全脳ノックダウン動物は精神分裂病に酷似した行動異常を示した。

A. 研究目的

神経系の発達過程や行動あるいは環境の変化への応答において、樹状突起スパイン (棘) はその形態を変化させることでシナプス可塑性に重要な働きをしているものと考えられる。樹状突起スパイン可塑性と呼ぶべきこの形式のシナプス結合の刺激依存的变化は、認知や文脈記憶のようなある種の高次機能の背後にあると信じられる。けれども、その分子機構はいまだ未知である。脳特異的たんぱくドレブリン (developmentally regulated brain protein) は、哺乳動物において2つのアイソフォームをもつFアクチン結合たんぱく質である。embryo型ドレブリンEは発達初期に生体全体に発現するが、adult型ドレブリンAは大脳皮質、辺縁系、視床、線

条体などに神経特異的に発現する。培養細胞系において、ドレブリンAは樹状突起スパインに蓄積しており、スパインの形状を制御していることが示された。臨床的には、アルツハイマー病およびダウン症の脳においてドレブリンの異常減少が報告されている。これらの知見から、ドレブリンA発現の減少は文脈学習記憶に含まれる認知プロセスにおける機能不全を引き起こす可能性が考えられる。

この仮説を検証する目的で、我々はドレブリンAのアンチセンスオリゴヌクレオチド (Dre-AS) とHVJ-リボソーム遺伝子導入ベクターとの併用によりラットの全脳ドレブリンノックダウン (発現抑制) を行った。我々は i) Dre-AS の脳室への一回投与が脳内のドレブリン高発現領域のドレ

プリンたんぱく発現量を抑制制御するかどうか、ii) 全脳ドレブリン発現のアンチセンスノックダウンが空間記憶あるいは認知機能の低下もしくは不全を引き起こすかどうかをオープンフィールドテスト、水迷路学習課題および驚愕反応の prepulse inhibition (PPI) テストにより検討した。

B. 研究方法

2. リゴヌクレオチドを含む HVJ-リポソームベクターの作成

3種の脂質からなる脂質薄膜とアンチセンス配列、リバーズ配列をもつオリゴヌクレオチド (ODN) とをバッファー溶液中で強振動により混合すると、ODN を含有した脂質小胞 (リポソーム) が形成される。このリポソームとUV照射により不活性化されたセンダイウィールス (HVJ) を HVJ の細胞融合能を用いて融合させ、ODN 含有 HVJ-リポソーム複合体を形成させ、これを ODN 導入ベクターとする。この複合体は HVJ の細胞融合能を保持している。

2. ODN- HVJ- リポソームベクターの脳室内注入

先端 $40\ \mu\text{m}$ のガラス微小ピペットを用いて、脳定位的に両側脳室に総量 $30\ \mu\text{l}$ の ODN-HVJ- リポソームベクター ($1-3\ \mu\text{g}$ ODN) を注入する。

3. ウェスタンブロット解析

アンチセンス脳室内投与によるドレブリンの発現抑制は、大脳皮質、海馬、視床、小脳からの組織サンプルについて抗ドレブリン抗体を用いたウェスタンブロット解析により定量的に調べた。

4. 行動テスト

4-1 オープンフィールドテスト

オープンフィールドボックスに置いたラ

ットの行動を30分間ビデオカメラに記録し、この記録から総移動距離 (locomotor activity)、適応行動の指標である静止行動、探索行動、毛繕い行動のそれぞれの行動従事時間を計測する。

4-2 アンフェタミン誘導多動反応テスト

オープンフィールドボックスに置いたラットの行動を、アンフェタミン ($1\text{mg}/\text{kg}$, i.p.) 投与前30分、後90分の120分間ビデオカメラで記録する。この記録から、10分毎の総移動距離を計測し、多動反応を解析する。

4-3 水迷路学習テスト

a 隠されたプラットフォーム課題

円形プールに透明プラットフォームを沈め、プールに入れられたラットが周囲の視覚手がかりからプラットフォームを探し出して水から脱出するまでの時間 (escape latency) を計測する。この水迷路隠されたプラットフォーム課題では、試行回数につれて空間記憶形成により視覚手がかりからプラットフォームの位置を見つける時間が短縮することから、空間記憶機能が調べられる。

b 記憶形成直後のプローブテスト

上記の水迷路課題で空間記憶形成が完成した直後に、プラットフォームを取り除いたプールに60秒間泳がせ、プラットフォームのあったプールの4分の1領域 (target quadrant) に滞在した時間を計測する。空間記憶学習のできたラットはこのプラットフォームを探して target quadrant にしばらく滞在するが、探す対象が見つからないこと (誤り試行) を認知したラットは他の領域を探索しはじめるため target quadrant 滞在時間は約30秒となる。探す対象が見つからないこと (誤り試行) を認

知できないラットは、学習した位置を探し続けてさらに target quadrant 滞在時間は 30 秒より異常に長くなる。このテストにより、認知機能が調べられる。

4-4 驚愕反応の prepulse inhibition (PPI) テスト

120 dB の驚愕音刺激により引き起こされ驚愕反応の強さは荷重増加を計測することにより定量できる。この驚愕音刺激に 100 ミリ秒先行して正常音刺激 70-80 dB を与えると驚愕反応は著しく抑制される。この抑制現象は prepulse inhibition (PPI) と呼ばれ、音刺激状況のわずかな変化を認知できるかどうか (認知機能) のテストとして使用される。

5. 動物

実験動物には、約 80 匹の 9-10 週齢の雄ウィスターラットをが用いられた。すべての実験は動物の倫理的使用に関する日本および国際ガイドラインを遵守してなされ、動物数および動物の苦痛を最小限にするためのあらゆる努力がなされた。

C. 研究結果

1. レプリリン発現の脳領域特異性とアンチセンスによる発現抑制

プロットとその定量データから、ドレプリリン A の発現量は前脳の新皮質、海馬、視床で豊富である一方、同じ前脳の小脳では極めて少なかった。そこで、我々は前脳の 2 つのドレプリリン高発現領域である新皮質と海馬において、Dre-AS 脳室内注入後 4、8、18 日目でのアンチセンスによるドレプリリン発現抑制効果を調べた。両領域共に、ドレプリリン発現量は 4 日以内に著しく減少し、その減少レベルを 8 日目でも維持し、処置後 18 日以内に基のレベルにま

で回復した。定量解析から、ドレプリリン A レベルの最大発現抑制率は処置後 4 日において新皮質で 54%、海馬で 40% であった。その発現抑制は、処置後 18 日までに両領域ともゆっくりと基のレベルにまで回復した。プロットとその定量データから、ドレプリリン A 発現の減少は Dre-AS 処置群のみで見られ、ドレプリリン発現抑制効果がアンチセンスに特異的であることが示された。

2. 全脳ドレプリリンノックダウンによる新規環境への適応行動の変化

アンチセンスによるドレプリリン発現抑制と新規環境への適応行動との相関の有無を調べるために、アンチセンス処置後 4 日目でラットにオープンフィールドテストを行った。30 分のテスト期間の総運動量は、対照群 (BSS) におけるよりアンチセンス処置群 (Dre) において 90% 多かった。適応行動指標である、静止行動、探索行動、毛繕い行動に従事した時間の計測から、対照群 (BSS) と比較してアンチセンス処置群は、有為に長い毛繕い行動と短い静止行動を示し、新規環境に適応しにくい傾向を示した。

3. ドレプリリン A ノックダウンラットにおけるドーパミン過感受性

ドレプリリン A ノックダウンにより引き起こされた新規環境下での自発運動量の異常な増加がドーパミン感受性異常と関連するかどうかを、アンフェタミン誘導多動反応により調べた。アンチセンス処置群 (Dre) のみが、オープンフィールドでの初期 10 分間での自発運動量における異常な増強を示すとともに、アンフェタミン誘導運動反応において同程度の増加応答を示した。

4. 空間記憶へのドレプリリン A ノックダウ

ンの効果

空間記憶への全脳ドレブリンAノックダウンの効果調べるために、モーリス水迷路課題を用いた。アンチセンス処置群 (Dre群) を含めたすべての群において、ラットは5セッション (30試行) 以内でほぼ直接に隠されたプラットフォームに脱出することを学習し、空間記憶形成を完成させ、Dre群ラットが正常な空間記憶機能をもつことが示された。次に、誤り試行を認知できるかどうかを調べるために、水迷路課題最終日の空間記憶形成が確認された直後にプローブテストを行った。アンチセンス処置群ラットは他の対照群ラットより有為に長い時間プラットフォームがあったボールの4分の1の領域 (target quadrant) を探し続ける行動異常を示した。

5. ドレブリンAノックダウンラットに見られた一過性のPPI障害

全脳ドレブリンAノックダウンが認知機能低下を引き起こすかどうか、その障害が一過性であるかどうかを、アンチセンス処置後4日と18日で prepulse inhibition (PPI) テストを用いて調べた。Dre群ラットは処置後4日での70 dBの先行刺激の場合にのみ有為なPPIの不全を示した。けれども、80 dBの先行刺激では障害される傾向はあるが有為なPPI減少ではなかった。発現抑制が回復する処置後18日では、アンチセンス処置による70 dBの先行刺激でのPPI障害は見られなかった。

D. 考察

培養細胞を使ったドレブリンA in vitro ノックダウンにより樹状突起スパインの短縮がおこることが報告された。この知見は、ドレブリンAの樹状突起スパイン依存のシナプス可塑性における可能な役割を強く示唆している。樹状突起あるいはニューロピ

ルの低形成が精神分裂病患者の脳において報告された。ドレブリンAノックダウンラットにおいて見いだされた精神分裂病に似た行動異常や認知障害はアンチセンスによるドレブリン発現抑制により引き起こされた樹状突起スパインの低形成、低可塑性に起因するものかも知れない。

アクチン結合蛋白質であるドレブリンAは、アクチン、アクチニンと協同して樹状突起スパインのシナプス後部足場構造を構成していると考えられており、スパインのシナプス後部に集積して局在するグルタミン酸レセプターを介した興奮性神経伝達機能において重要な働きを担っているかも知れない。グルタミン酸機能とドーパミン機能は認知機能の背後にある sensorimotor gating 機構において互いに代償しあう作用をもつことから、グルタミン酸機能の低下がドーパミン機能亢進をもたらす。それゆえ、本研究において示されたドレブリンAノックダウンラットのドーパミン過感受性は、樹状突起スパインの萎縮に起因するグルタミン酸レセプター機能低下に関連しているかも知れない。

2つのドレブリンmRNAのアイソフォームは、alternative splicing によってひとつのドレブリン遺伝子から転写されてでてくる。胎生後期から新生児期に脳に特異的に現れるドレブリンAの発現は、splicing 部位選択の組織特異的かつ発達期依存的な調節に従っている。もし、いまだ未知であるこの splicing 調節因子が見いだされるならば、ドレブリンAとその発達依存的調節は精神分裂病の病因の発達期仮説 (two hit hypothesis) に分子的基礎を与えるかも知れない。

E. 結論

我々の研究は、全脳ドレブリンAノックダウンラットが、i) 新規環境への適応行動

の異常、ii) 正常な空間記憶形成の機能、iii) ドーパミンの過感受性、iv) 状況変化を認知できないことからくる誤り試行への固執傾向、v) 認知機能障害といった精神分裂病の症状によく似た行動異常を呈することを明らかにした。これらの知見から、このアンチセンスによる全脳ドレブリンAノックダウンをもつラットは、一過性に精神分裂病様症状を呈する新しい精神障害モデル動物であると結論できる。このモデル動物を用いた研究は、精神障害を伴うある種の神経疾患や、精神遅滞を伴う遺伝性疾患などの発症機序の理解にとって重要であろう。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

3. 学会発表

小林利佳、田中聡一、稲田 健、白尾智明、佐治真理 アンチセンスによるドレブリン発現全脳ノックダウンラットの認知障害 第24回日本神経科学会 2001年 9月 京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

分担研究者である佐治真理は、群馬大学医学部行動分析教室の白尾智明教授、関野祐子講師、北里大学医療系研究科大学院生小林利佳と連名で、「グルタミン酸レセプター機能亢進剤とその利用法」として本研究に使用したドレブリンAアンチセンスとその動物脳への使用による精神障害モデル動物を特許出願中である。

研究成果の刊行に関する一覧表

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 |
|---|---|--|-----|-------------|------|
| Sugimoto Y, Ninomiya H, Ohsaki Y, Higaki K, Davies JP, Ioannou Y.A and Ohno K | Accumulation of cholera toxin and GM1 ganglioside in the early endosome of Niemann-Pick C1-deficient cells | Proc Natl Acad Sci USA | 98 | 12391-12396 | 2001 |
| Higaki K, Ninomiya H, Sugimoto Y, Suzuki T, Niwa H, Pentchev PG, Vanier MT, Ohno K | Isolation of NPC1-deficient Chinese hamster ovary cell mutants by gene trap mutagenesis | J Biochem | 129 | 875-880 | 2001 |
| Taniguchi M, Shinoda Y, Ninomiya H, Vanier MT and Ohno K | Sites and temporal changes of gangliosides GM1/GM2 storage in the Niemann-Pick disease type C mouse brain | Brain Dev | 23 | 414-421 | 2001 |
| Yamada A, Saji M, Ukita Y, Shinoda Y, Taniguchi M, Higaki K, Ninomiya H and Ohno K | Progressive cell loss in the ventral posterior lateral and medial nuclei of thalamus in Niemann-Pick disease type C mice brain | Brain Dev | 23 | 288-297 | 2001 |
| Sawamura N, Gong J-S, Garver WS, Ninomiya H, Ohno K, Yanagisawa K and Michikawa M | Site-specific phosphorylation of tau accompanied by activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) in brains of Niemann-Pick type C mice | J Biol Chem | 276 | 10314-10319 | 2001 |
| Watabe K, Ida H, Uehara K, Oyanagi K, Sakamoto T, Tanaka J, Garver W S, Miyawaki S, Ohno K, and Eto Y | Establishment and characterization of immortalized Schwann cells from murine model of Niemann-Pick disease type C (spm/spm) | Journal of the Peripheral Nervous System | 16 | 85-94 | 2001 |
| Millat G, Marcais C, Tomasetto C, Chikh K, Fensom AH, Harzer K, Wenger DA, Ohno K and Vanier MT | Niemann-Pick C1 disease: correlations between NPC1 mutations, levels of NPC1 protein and phenotypes emphasize the functional significance of the putative sterol-sensing domain and of the cysteine-rich luminal loop | Am J Hum Gene | 68 | 1373-1385 | 2001 |
| Tsukamoto H, Yamamoto T, Nishigaki T, Sakai N, Nanba E, Ninomiya H, Ohno K, Inui K, and Okada S | SSCP analysis by RT-PCR for the prenatal diagnosis of Niemann-Pick disease type C | Prenat Diagn | 21 | 55-57 | 2001 |
| Tominaga L, Ogawa Y, Taniguchi M, Ohno K, Matsuda J, Ohima A, Suzuki Y, Nanaba E | Galactonojirimycin derivatives restore mutant human β -galactosidase activities expressed in fibroblasts from enzyme deficient knockout mouse | Brain Dev | 23 | 284-287 | 2001 |