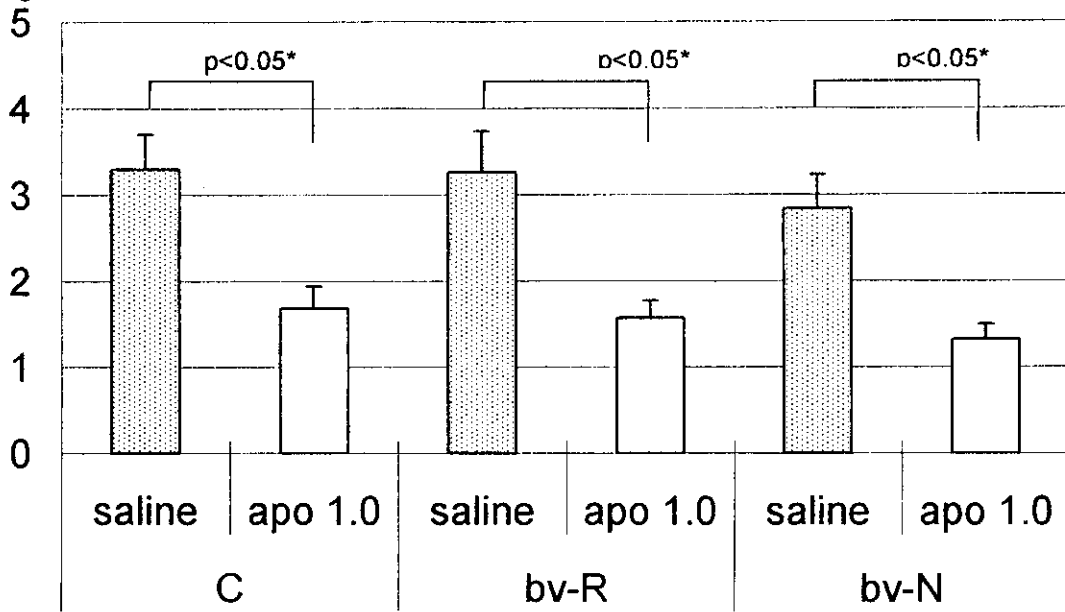


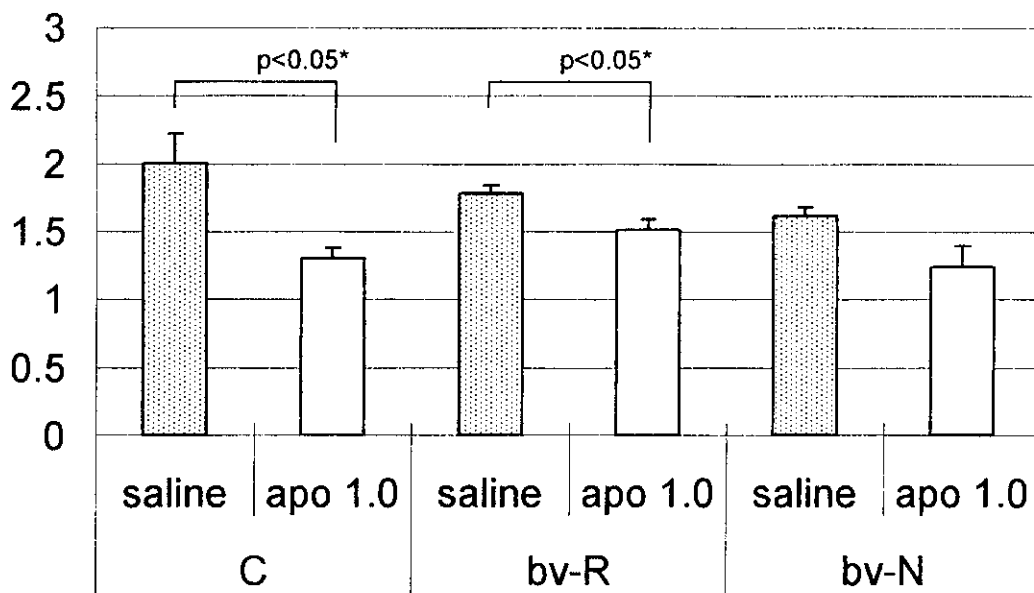
c. HVA

ng/mg brain



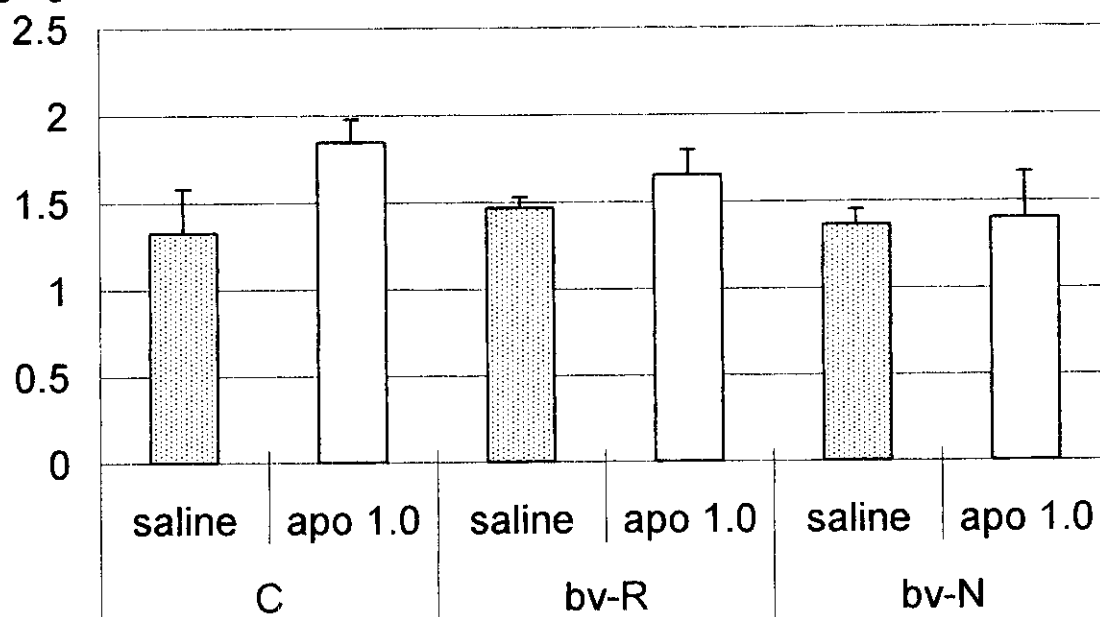
d. 3-MT

ng/mg brain



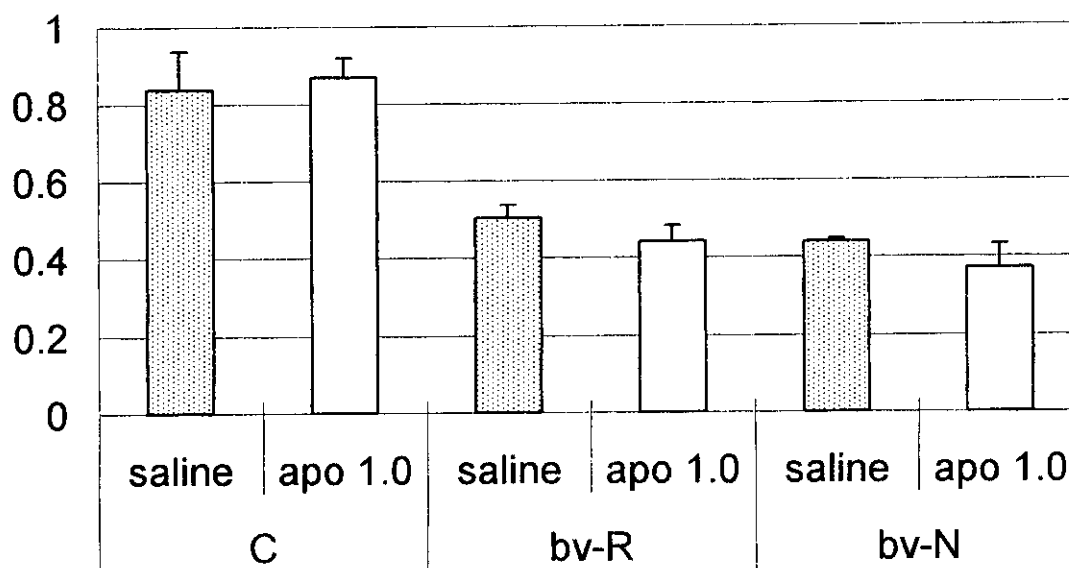
e. 5-HT

ng/mg brain

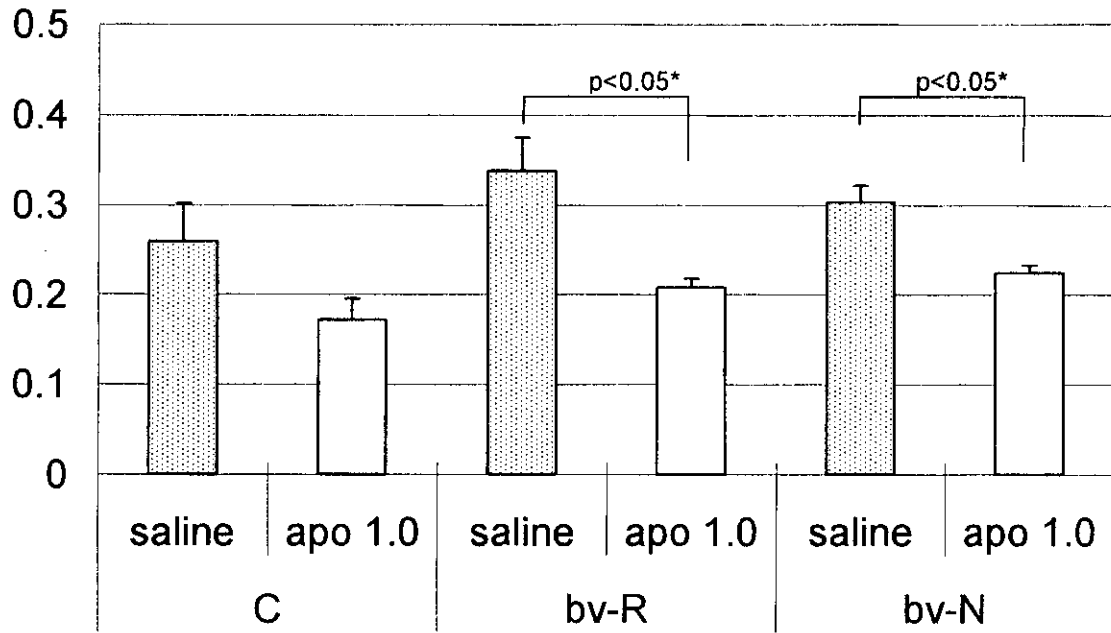


f. 5-HIAA

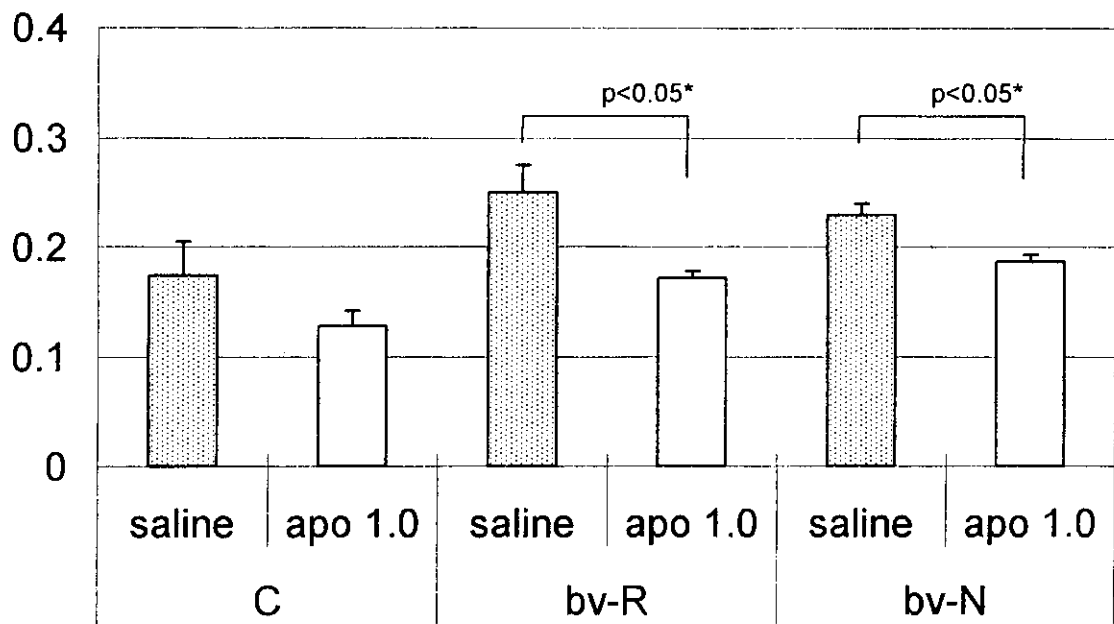
ng/mg brain



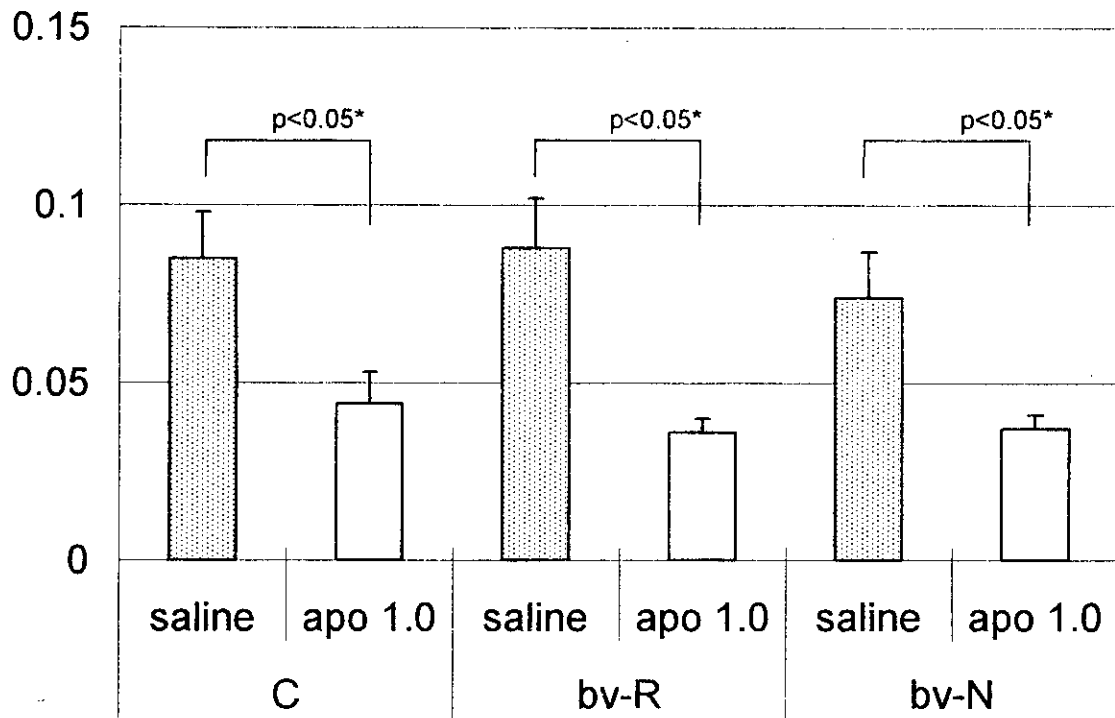
g. (DOPAC+HVA)/DA



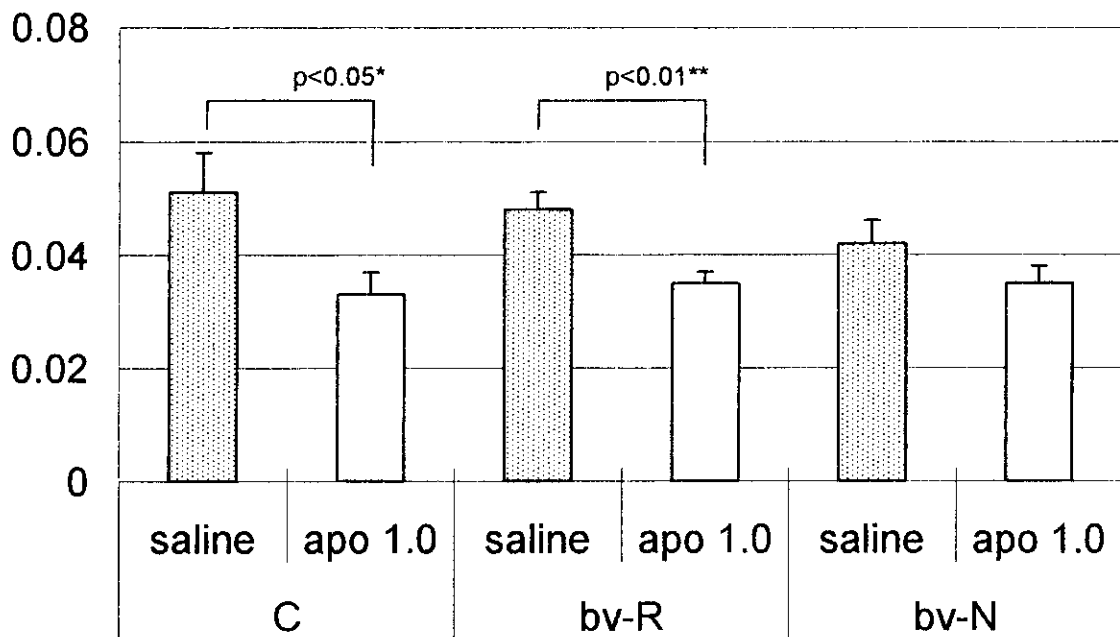
h. DOPAC/DA



i. HVA/DA



j. 3-MT/DA



k. 5-HIAA/5-HT

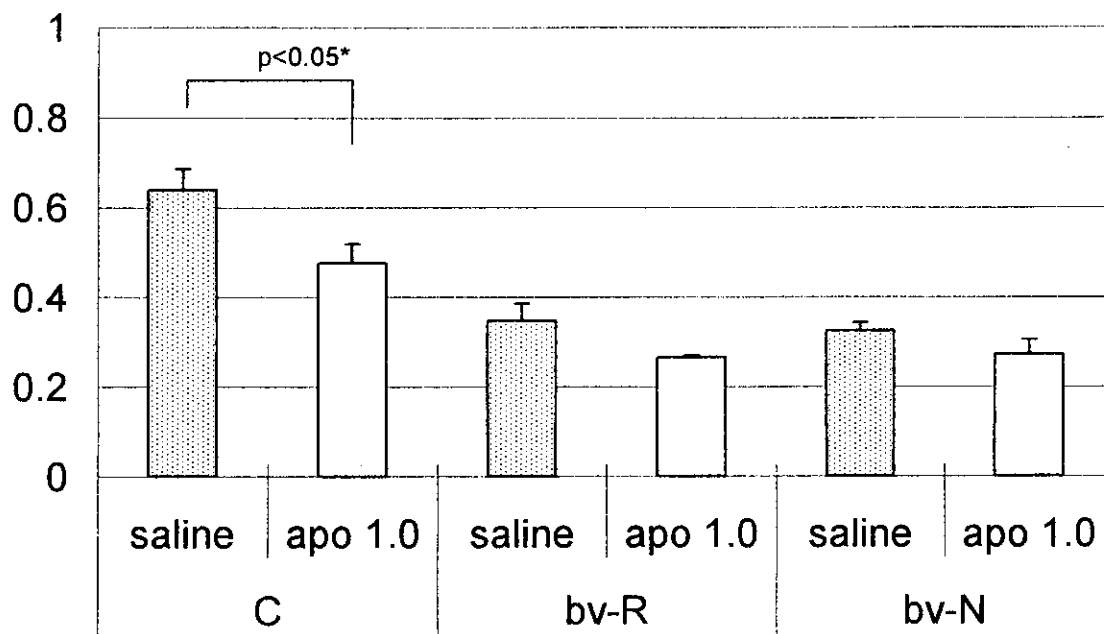
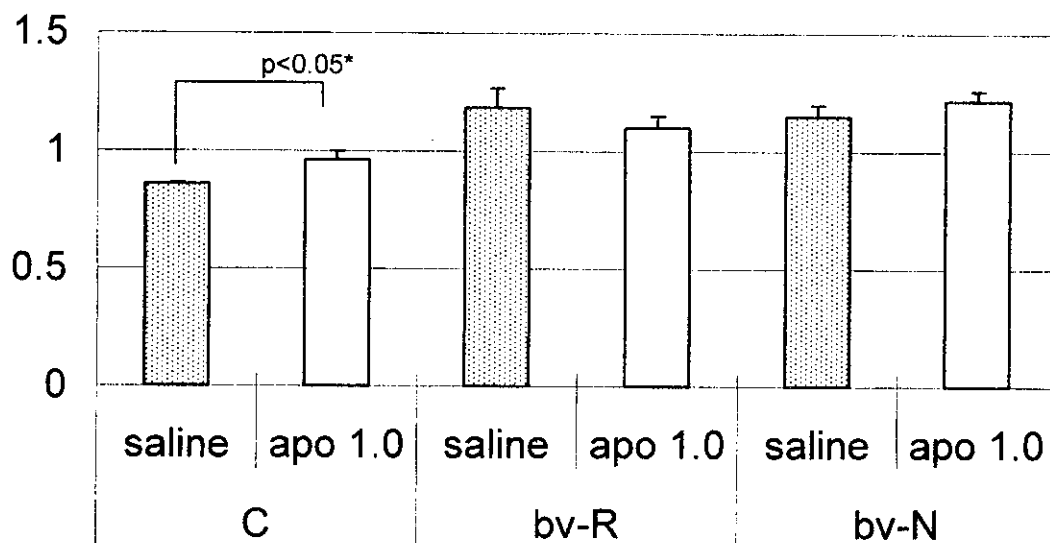


図7 mid brain 中の apomorphine 投与時におけるモノアミン変化

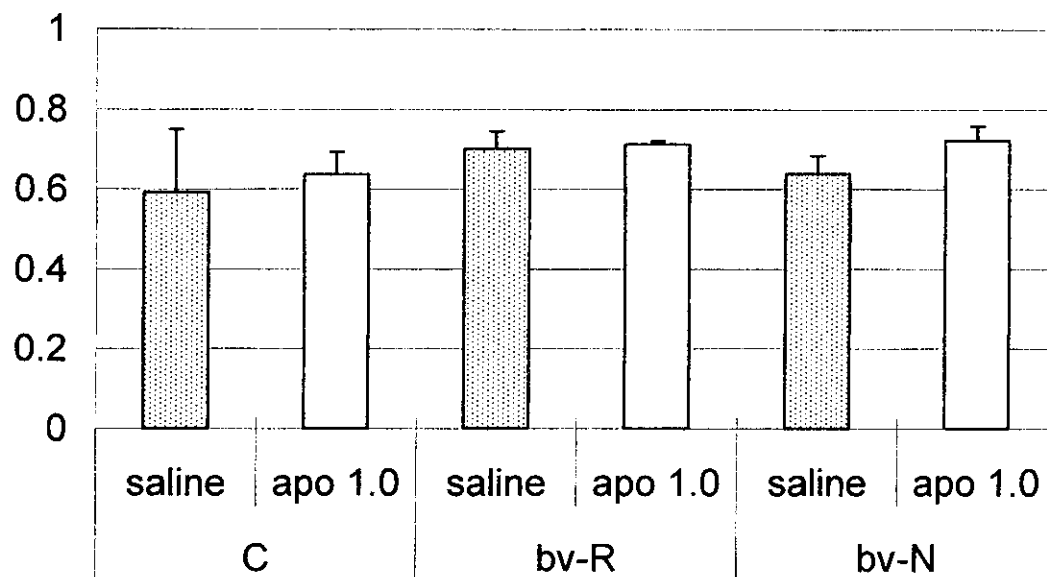
a. NE

ng/mg brain

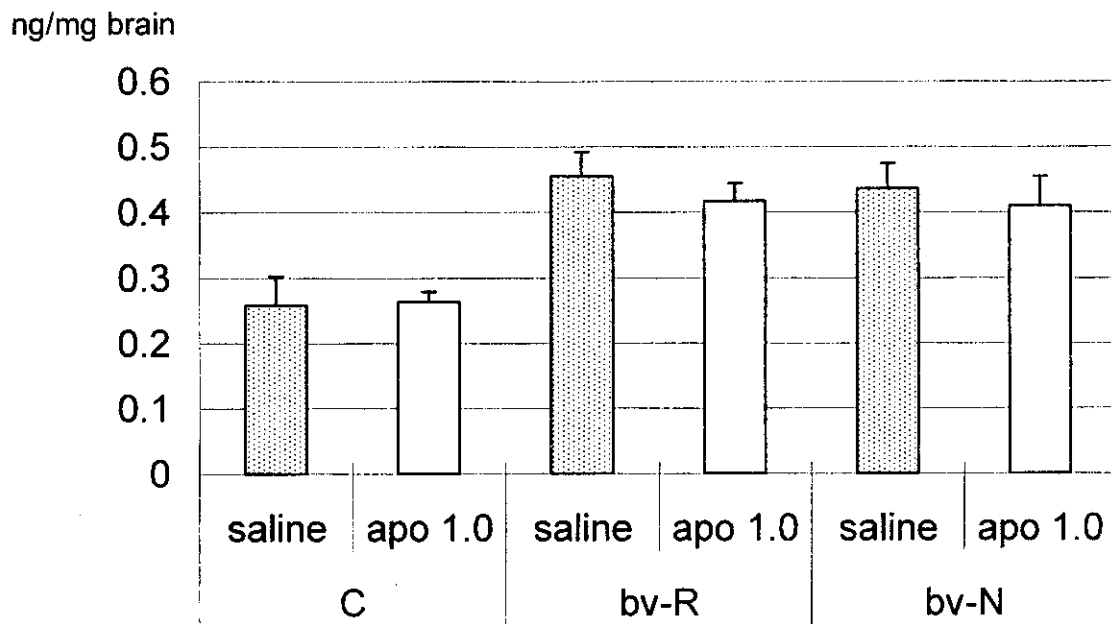


b. DA

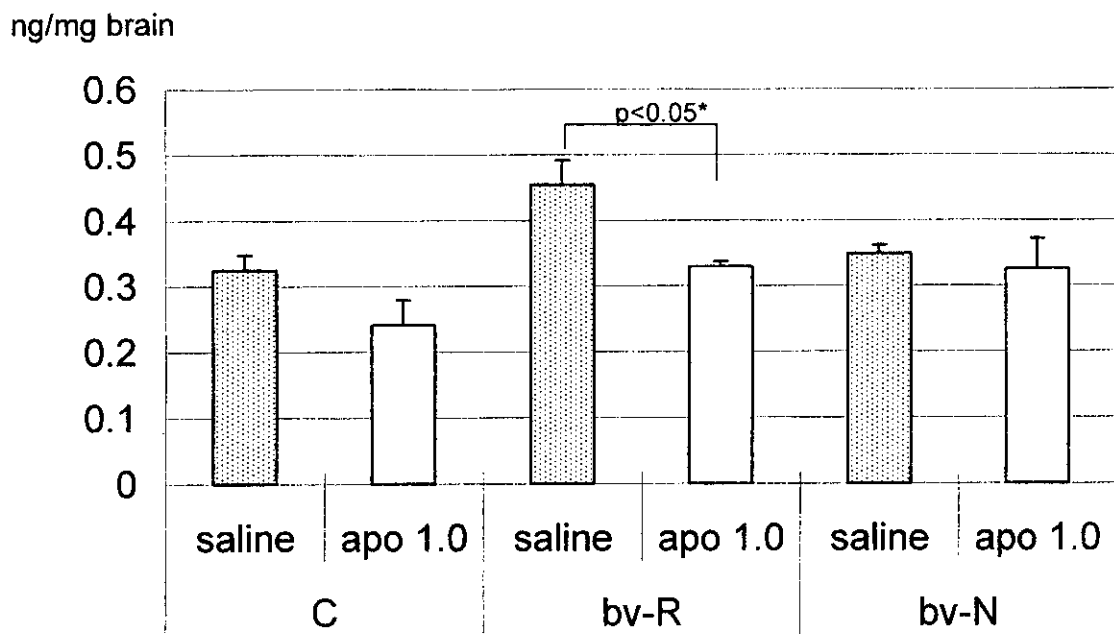
ng/mg brain



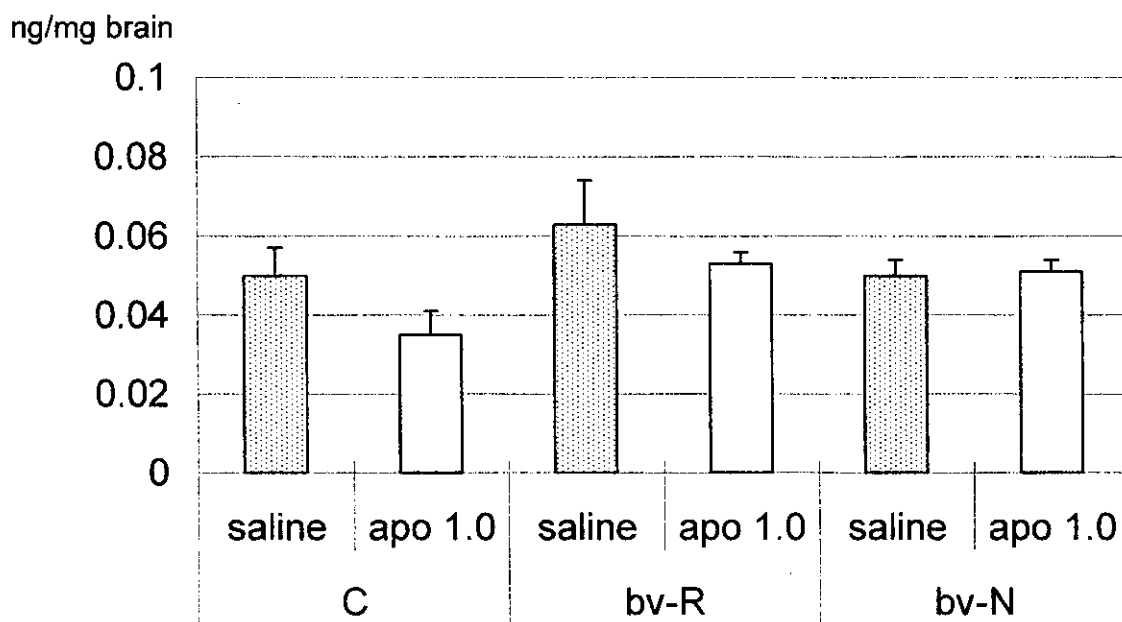
c. DOPAC



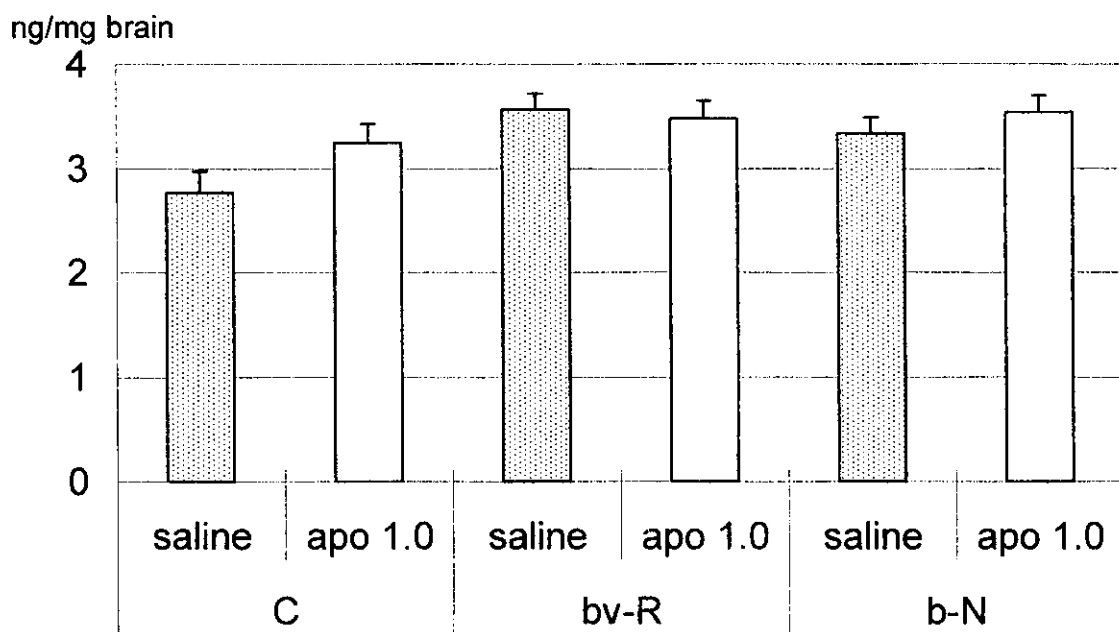
d. HVA



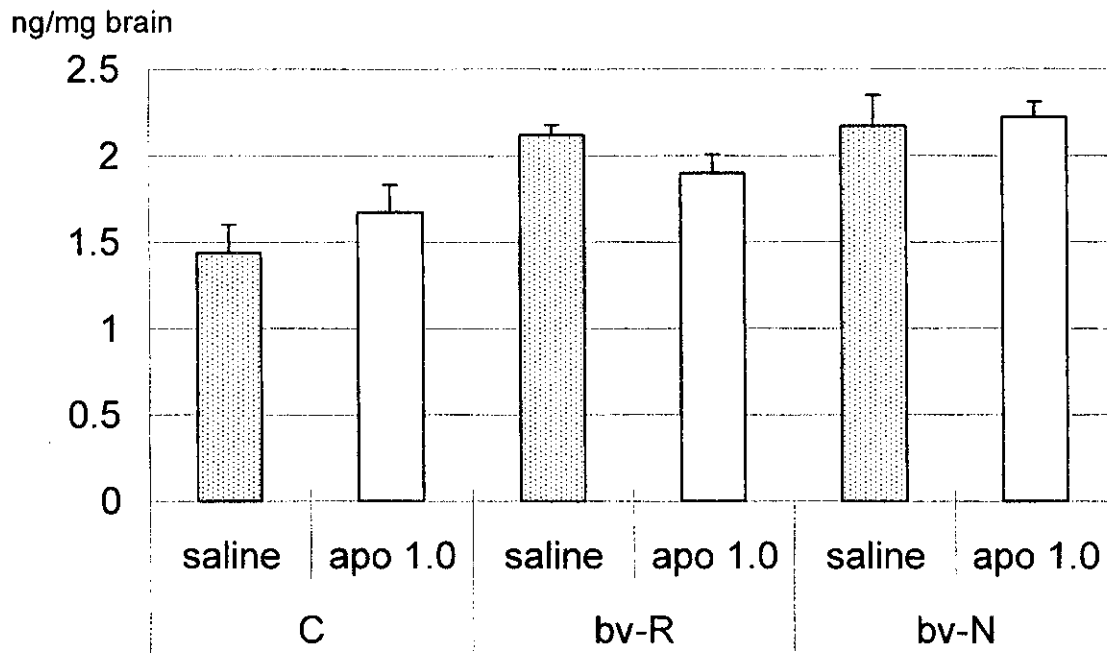
e. 3-MT



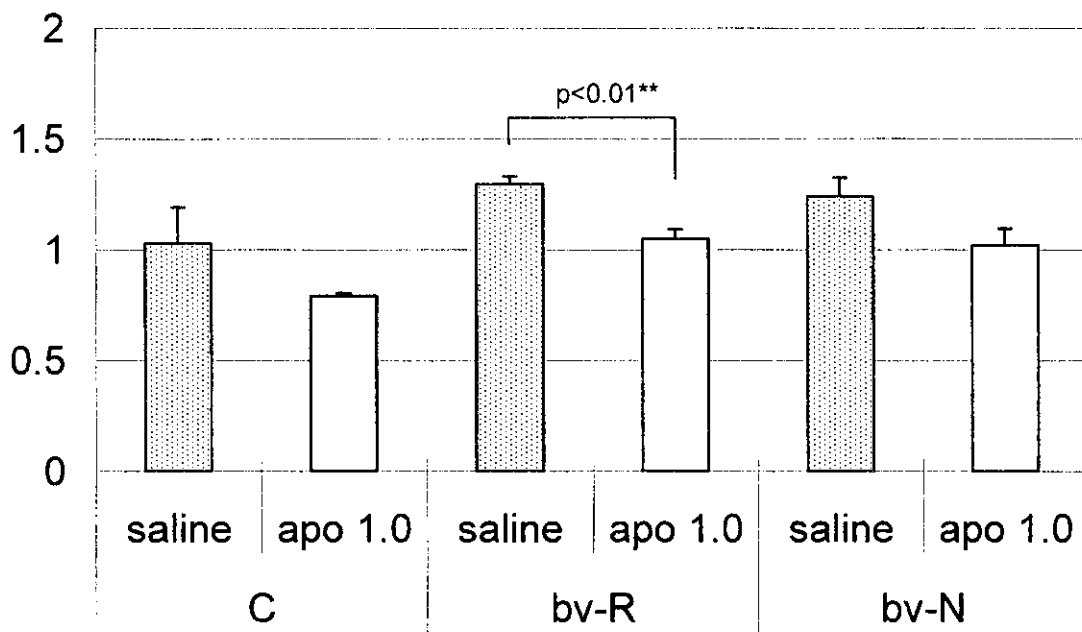
f. 5-HT



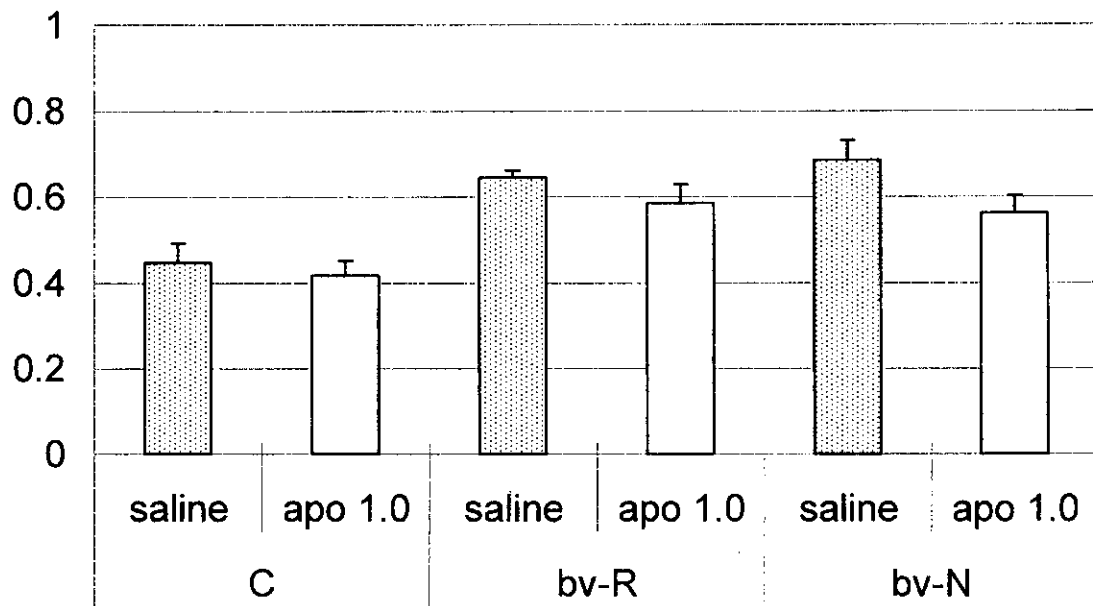
g. 5-HIAA



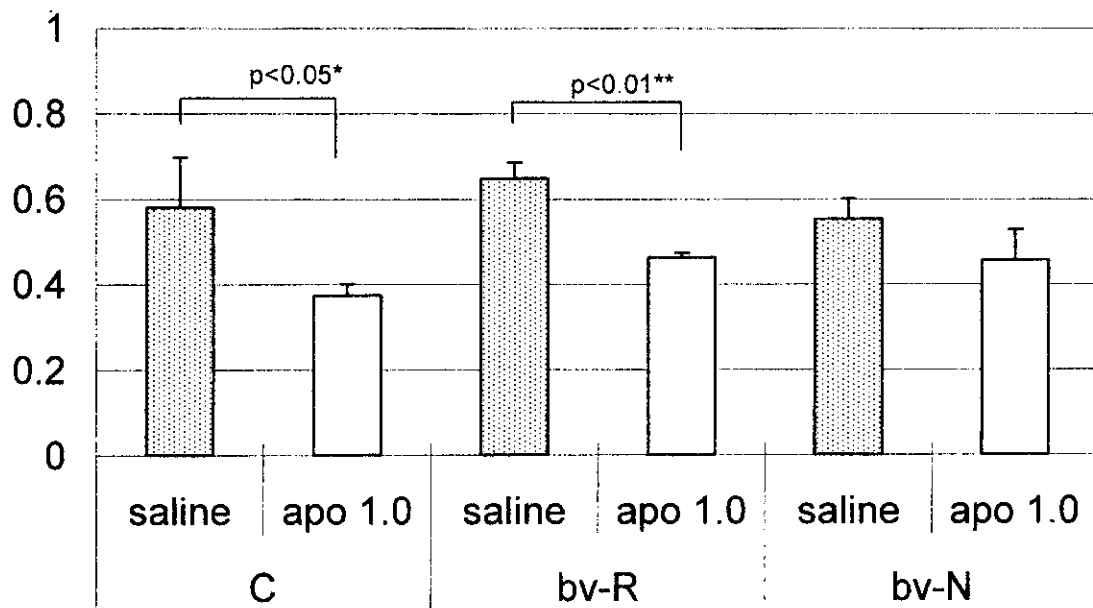
h. (DOPAC+HVA)/DA



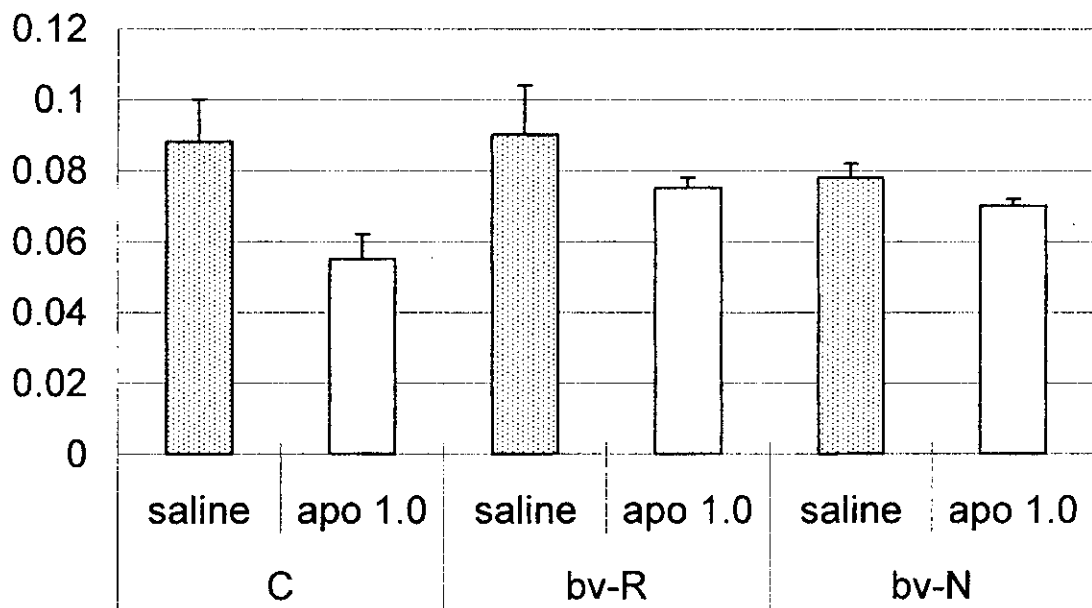
i. DOPAC/DA



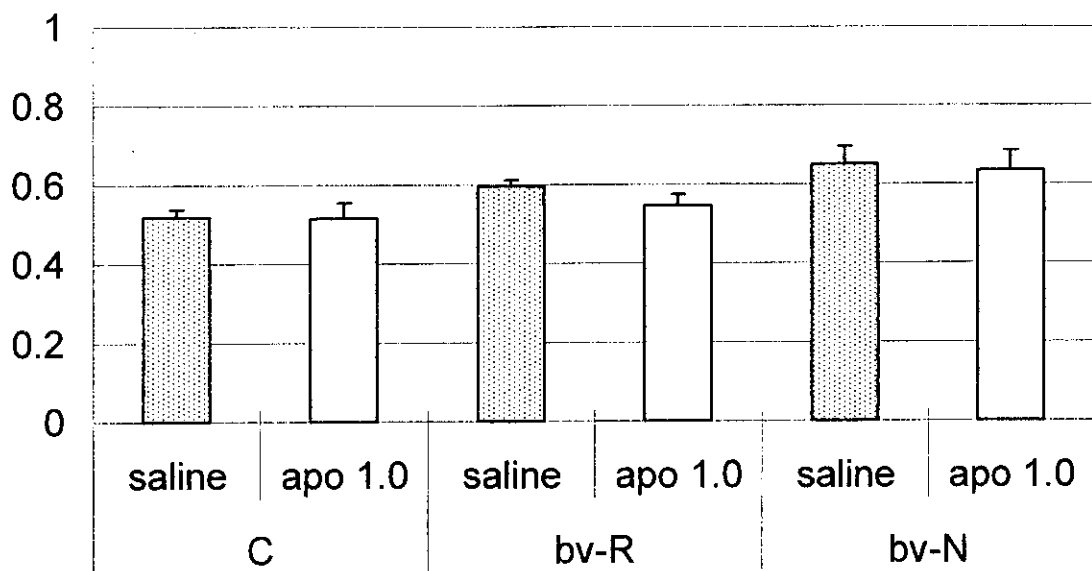
j. HVA/DA



k. 3-MT/DA



l. 5-HIAA/5-HT



II. 分担研究報告

3. 遺伝性難聴bvの原因遺伝子クローニング

難波栄二

厚生科学研究費補助金(感覚器障害研究事業)
分担研究報告書

遺伝性難聴 bv の原因遺伝子クローニング

分担研究者 難波栄二 鳥取大学遺伝子実験施設 助教授

研究要旨

遺伝性難聴モデルマウス Bronx waltzer mouse (bv) では行動の異常を呈することが明らかになってきた。その原因には脳内のモノアミンの代謝異常が関係することが推測されている。この分子病態を解明することは、行動異常の研究のみならず bv の原因遺伝子の解明に結びつく。

本年度は、この分子病態を解明するための方法として、リアルタイム PCR システムを確立し、脳の部位毎の多数遺伝子発現を正確に定量できるシステムを確立した。この Light Cycler 330 システムを用いることによって従来の方法よりも簡便で高精度に遺伝子発現を測定できると考えられた。今後は本システムを用いて bv の原因遺伝子解明を図りたい。

A. 研究目的

選択的内有毛細胞障害が生後早期に生じる Bronx waltzer mouse (bv) の原因遺伝子を解明することを目的に研究を行っている。昨年度は Differential display 法により検討を行い 71 の bv 特異的バンドを検出したが、遺伝的バックグラウンドが不均一なために原因遺伝子を検討することは困難との結論に達した。また、マウス 5 番染色体の bv 原因遺伝子領域のゲノム情報が明らかになっていないため候補遺伝子を選択することすら困難な状況にある。

本年度、主任研究者のグループが bv マウスに特徴的な行動異常、すなわち迅速な回転を主徴とする過剰行動パターンを発見した。そして、この行動異常が脳内モノアミンの代謝異常による可能性を示した。そこで、分担研究者は本年度この病態に焦点をしばって研究を進めることとした。すなわち、脳内の詳細な部位ごとにモノアミン代謝系の遺伝子発現を正確に検討できるシステムの構築の確立を図った。

この行動異常の原因となる遺伝子を突きとめることにより bv における脳内のモノアミン系代謝の分子病態が解明でき、さらに bv の原因遺伝子の解明に迫ると考えられる。

B. 研究方法

行動異常を示す bv マウスと示さない bv マウス、対照の正常マウスの脳を用いた。脳は limbic forebrain, striatum, prefrontal cortex, cerebellum, mid brain, pons, left cortex, right cortex に分けて -80℃ で冷凍保存したものを使用した。

方法:

1, RNA の分離

1ml の Isogen (Nippon Gene) とペッスル (Scientific Specialities Inc.) を用いて組織をホモジナイズし、全 RNA を分離した。20μl の全 RNA を DNase I, RNase Inhibitor を含む 120μl の溶液に溶解し 37℃, 15 分間保温後にフェノール処理を行い、ゲノム DNA を完全に除去した。

2, プライマー

検索遺伝子として tyrosine hydroxylase, Snap25, catechol-O-methyltransferase, aromatic-L-amino-acid decarboxylase を, 対照遺伝子として actin のプライマーを作成した. これらのプライマーは, Gene Bank (National Center for Biotechnology Information) の遺伝子配列情報をもとに日本遺伝子研究所に依頼して合成した.

3, リアルタイム PCR

全 RNA 2 μ g を MMLV-reverse transcriptase (BRL) 1 μ l, バッファー, random primer 0.5 μ g, 50mM DTT, 200 μ M dNTP を含む 20 μ l の溶液に溶解した. この溶液を, 37 $^{\circ}$ C, 60 分間保温することにより逆転写反応を行った. この逆転写反応産物を 5-10 倍希釈して PCR 反応に用いた.

希釈した逆転写反応産物 1 μ l, 各プライマー 0.5 μ M, Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green I 1 μ l を含む 10 μ l の溶液を作成し, Light Cycler クイックシステム 330 (Roche) を用いてリアルタイム PCR を行った (文献 1). 反応条件は 95 $^{\circ}$ C で 10 分間初期酵素活性化を行い, tyrosine hydroxylase では 変性 95 $^{\circ}$ C 15 秒, アニール 55 $^{\circ}$ C 5 秒, 合成 72 $^{\circ}$ C 8 秒の反応後, 融解曲線分析を行った. アニール温度 (55 $^{\circ}$ C-68 $^{\circ}$ C) と合成の時間 (8-10 秒) は, 各プライマーの T_m および PCR 産物の長さによって調整した. 特異的反応条件を検討するために, 溶液中の Mg 濃度を 1mM から 5mM の条件で検討した. 定量用スタンダードとしてはプラスミドに組み込んだ PCR 産物または PCR 産物そのものを希釈して用いた.

最終的には actin の発現量との比をとることにより, 逆転写反応の効率などを補正するシステムとした.

(倫理面への配慮: 対象マウスは処置や処分の配慮を注意深く行い, 麻酔処置により疼痛を緩和し, 苦痛を与えない方法によって臓器を摘出した.)

C. 研究結果

1, 作成したプライマーの検討

最初に Cortex サンプルを用いて Mg 濃度 1mM-5mM の条件でプライマーの検討をした. その結果, tyrosine hydroxylase, Snap25, aromatic-L-amino-acid decarboxylase は 1mM では PCR 産物は増幅されず, 2mM Mg 濃度が至適であった. 融解曲線分析の検討で前者 2 つに関して, 反応が特異的で定量システムが構築できると判断された. aromatic-L-amino-acid decarboxylase は融解曲線分析の検討で二峰性のピークが観察され, プライマーダイマーが合成されることにより, 定量システム構築が難しいと判断された. また, catechol-O-methyltransferase は, PCR 産物が増幅できなかった.

2, 定量性の検討

各遺伝子産物を 10 倍ずつ希釈することにより, 定量用スタンダードを作成して検討した. tyrosine hydroxylase 遺伝子, Snap25 遺伝子では, それぞれ slope=-3.865, Error=0.065, r=-1.00 と slope=-2.750, Error=0.177, r=-0.98 の良好な定量直線を得ることができた.

また, tyrosine hydroxylase, Snap25 の脳内各部位での遺伝子発現は actin より少なく, 特に Snap25 の発現は actin の 1/100 から 1/1000 であった.

D. 考察

遺伝子発現を検討するにはノーザンブロット法が従来用いられていたが, サンプル

の量が比較的多量に必要なうえ解析に時間がかかるために、体重が20から30グラムのマウスの脳の微細な部位ごとの遺伝子発現の検討を行うことは容易ではなかった。

一方、RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) 法を用いると微量のサンプルで遺伝子発現を検討できるが、原理的には正確な定量が不可能である。このために、我々は独自の競合 RT-PCR システムを開発してきた(文献 2, 3)。しかし、競合 RT-PCR システムは、競合鋳型を構築する必要がある上に、1 サンプルで 5-10 の PCR 反応が必要であり、手技が煩雑であった。

今回、Light Cycler330 によるリアルタイム PCR 法を導入することで、これらの問題が多く解消され、複数のサンプルにおける多数の遺伝子発現を比較的簡単に、しかも正確に測定することが可能になった。

プライマーダイマーが合成された aromatic-L-amino-acid decarboxylase や PCR 産物が増幅できなかった catechol-O-methyltransferase に関しては、プライマー設計をさらに検討することにより今後解析が可能になると期待できる。

次年度は、本システムさらに充実させモノアミン系代謝異常のみならず、bv マウスの原因遺伝子解明を行う予定で、さらに詳細な検討を進めていく。

E. 結論

脳内モノアミン分子病態を解明するためリアルタイム PCR システムを確立し、脳の部位毎の多数遺伝子発現を正確に定量できるシステムを確立した。この Light Cycler 330 システムを用いることによって従来の方法よりも簡便で高精度に遺伝子発現を測定できると考えられた。今後さらに詳細な検討が必要である。

文献

1. Witter C.T. et al. Anal Biochem 1997; 245: 154-160.
2. Ueta E, et al. Biosci Biotechnol Biochem 2001; 65: 2548-2551.
3. Kono Y, et al. Pediatr Int 2001; 43: 458-464.

F. 健康危険情報 特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kono Y, Okada S, Tazawa Y, Kanzaki S, Mura T, Ueta E, Nanba E, Otsuka Y. Effect of lactational exposure to 1, 2, 3, 4- tetrachlorodibenzo-p-dioxin on cytochrome P-450 1A1 mRNA in the neonatal rat liver: Quantitative analysis by the competitive RT-PCR method. Pediatr Int 2001; 43: 458-464.
2. Ueta E, Suzuki E, Nanba E, Tadokoro Y, Otsuka Y, Kurata T. Regulation of cigarette smoke-induced cytochrome P450 1A1 gene expression in osteogenic disorder Shionogi rat liver and in lung by large ascorbic acid dose. Biosci Biotechnol Biochem 2001; 65: 2548-2551.

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

Ⅱ. 分担研究報告

4. 虚血脳組織への細胞治療法開発に関する研究

桜川 宣男

厚生科学研究費補助金(感覚器障害研究事業)
分担研究報告書

虚血脳組織への細胞治療法開発に関する研究

分担研究者 桜川 宣男
国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第5部 部長

研究要旨

脳虚血に対する脳移植法を用いて再生医療の基礎研究をおこなった。ラット培養羊膜上皮細胞は nestin + / MAP2 + の性質を持ち、移植後は MAP2 強陽性細胞となった。脳虚血ラットの海馬に移植したところその細胞は CA1 pyramidal layer に遊走し、5 週間後も生着していた。また、神経細胞様の形態を呈していた。以上のことから、虚血脳に対する羊膜上皮細胞移植は再生医療法として有望であり、幼弱蝸牛組織への応用も考えられる。

A. 研究目的

分担研究者は遺伝性難聴モデル動物の直接治療法開発をめざして細胞療法の基礎的研究を行ってきた。その際用いるべき細胞の性質として羊膜細胞が優れていると思われる。なぜなら、同細胞は免疫寛容を示す特殊な細胞だからである。また、様々な液性因子を放出するなど種々の機能を持つことが知られてきている。一方、主任研究者の有する特異的遺伝性難聴モデル(bv)は生後に神経変性がみられることが分かってきた。そこで、本研究では羊膜上皮細胞の脳移植によって神経変性が治療可能か検討するため、まず脳虚血をモデル動物において作成し、移植によって病変が改善されるかどうかを検討した。

B. 研究方法

モデル動物作成:Mongolian gerbil をハ

ロセン麻酔下で総動脈結紮し5分後に再開通し、脳虚血モデルを作成した。

羊膜細胞の調整と性質検討:E17 妊娠ラットの胎盤より羊膜を採取した。0.125%トリプシンと0.05%DNaseで37°C、15分間処理した。以下は既報のごとく、羊膜細胞を分離、培養した。免疫染色にてNeurofilament (NF), MAP2, nestin 発現をおよび RT-PCR で nestin 発現を調べた。

移植と解析:PKH26 でラベルした羊膜上皮細胞を虚血 1 週後のモデル動物右外側海馬に移植した。5 週間後、脳組織標本を作製し、免疫染色で解析した。

(倫理面への配慮:対象マウスは処置や処分の配慮を注意深く行い、麻酔処置により疼痛を緩和し、苦痛を与えない方法によって手術を行った。)

C. 研究結果

ラット羊膜上皮細胞は NF, MAP2,

nestin に陽性反応を示した. RT-PCR では nestin の当該バンドを検出した. 移植した細胞はクラスター状に存在していた. 興味深い点は虚血側の CA1 pyramidal layer に移植細胞が移動し, 神経細胞様の突起を出していたことであった. また, 移植前の細胞は nestin + / MAP2 + の特徴を示していたが, 移植後は MAP2 強陽性であるものの nestin 陽性細胞はほとんどみられなかったことであった.

D. 考察

Nestin は当初神経幹細胞のマーカーとして開発されたが最近では未熟グリア細胞, 障害脳のアストロサイト, 一部の脳腫瘍および未熟筋細胞に発現がみられるとされる. 羊膜上皮細胞も nestin 陽性細胞が存在していることから神経幹細胞であるとの結論は早急であり, さらに検討の余地がある. しかしながら, 移植前の細胞の性質が nestin + / MAP2 + であり, 移植部位から CA1 pyramidal layer に遊走した細胞の nestin 反応が消失し, MAP2 強陽性に変化したことは一部の細胞に神経幹細胞の性質が備わっていることを示唆している. この性質を利用することで神経難病に対する羊膜細胞移植療法が開発される可能性があると思われる. さらに研究を進展させて, 難聴に伴う聴神経変性の治療に応用ができるものとも考えられる.

E. 結論

ラット羊膜上皮細胞を脳虚血モデル動物海馬に移植した. その結果, 移植前の羊膜上皮細胞に神経幹細胞の存在が

示唆された. 移植5週間後も細胞は生着し, 神経細胞様の免疫染色性を示した. 羊膜上皮細胞は虚血脳に対する移植細胞として有望であると考えられた.

研究協力者

大川秀典, 屋田 修, 新井 一, 佐藤 潔: 順天堂大学医学部脳神経外科

F. 健康危険情報

特になし.

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Takahashi S, Ohsugi K, Yamamoto T, Shiomi M, Sakuragawa N. A novel approach to ex vivo gene therapy for familial hypercholesterolemia using human amniotic epithelial cells as a transgene carrier *Tohoku J Exp Med* 2001 Apr; 193(4):279-92

2) Kosuga M, Sasaki K, Tanabe A, Li XK, Okawa H, Ogino I, Okuda O, Arai H, Sakuragawa N, Kamata Y, Azuma N, Suzuki S, Yamada M, Okuyama T. Engraftment of genetically engineered amniotic epithelial cells corrects lysosomal storage in multiple areas of the brain in mucopolysaccharidosis type VII mice. *Mol Ther* 2001 Feb; 3(2):139-48

3) Matsuura K, et al. Synthesis and release of erythropoietin by human amniotic epithelial cells. *J Tokyo Medical University* 59: 38, 2001

4) Kosuga M, Takahashi S, Tanabe A, Fujino M, Li XK, Suzuki S, Yamada M, Kakishita K, Ono F, Sakuragawa N, Okuyama T. Widespread distribution of adenovirus-transduced monkey amniotic epithelial cells after local intracerebral injection: implication for cell-mediated therapy for lysosome storage disorders. *Cell Transplant* 2001; 10(4-5): 435-9

5) Nakajima T, Enosawa S, Mitani T, Li XK, Suzuki S, Amemiya H, Koiwai O, Sakuragawa N. Cytological examination of rat amniotic epithelial cells and cell transplantation to the liver. *Cell Transplant* 2001; 10(4-5): 423-7

6) Okawa H, Okuda O, Arai H, Sakuragawa N, Sato K. Amniotic epithelial cells transform into neuron-like cells in the ischemic brain. *Neuroreport* 2001 Dec 21;12(18):4003-7

7) Elwan MA, Sakuragawa N. Uptake of dopamine by cultured monkey amniotic epithelial cells. *Eur J Pharmacol* 2002 Jan 25; 435(2-3): 205-8

8) Koyano S, et al. Synthesis and release of activin and noggin by cultured human amniotic epithelial cells. *Dev Growth and Diff.* In press

9) Naganawa et al. In vitro study of encapsulation therapy for Fabry disease using genetically engineered CHO cell

line. *Cell transplant.* In press.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表