

20020898

厚生労働科学研究費補助金
こころの健康科学研究事業

神経回路網形成障害の分子機構に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 大野耕策

平成15（2003）年3月

目次

I. 総括研究報告書

神経回路網形成障害の分子機構に関する研究	-----	1
----------------------	-------	---

II. 分担研究報告書

1. 神経回路網形成障害の分子機構に関する研究	-----	9
分担研究者 鳥取大学医学部助教授 二宮治明		
2. 神経セロイドリポフスチン症の病態解析に関する研究	-----	10
分担研究者 鳥取大学医学部助教授 岡 明		
3. 神経回路網形成と興奮性シナプス可塑性に関する研究	-----	13
分担研究者 北里大学医療衛生学部教授 佐治真理		
4. 疾患モデルマウスからの培養シュワン細胞株の樹立と解析	-----	21
研究協力者 東京都神経科学総合研究所副参事 渡部和彦		
5. ニーマン・ピック病C型モデルマウスの軸索ジストロフィー	-----	24
研究協力者 国立療養所中信松本病院医長 大原慎司		
6. ニーマン・ピック病C型の前覚細胞内蓄積物質の超微形態	-----	26
研究協力者 鳥取大学医学部教授 大濱栄作		
7. ニーマン・ピック病C型と結節性硬化症の遺伝子変異	-----	29
研究協力者 鳥取大学遺伝子実験施設助教授 難波栄二		

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	34
---------------------	-------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷り	-----	38
------------------	-------	----

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
総括研究報告書

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】 発育期神経遺伝病は脳の形成途上にあること、神経系の可塑性と神経回路網形成が未熟なため、成人とは異なった神経障害を示す。胎児期早期の異常は神経分化の異常を伴い、発育期には成人とは異なった神経回路の脆弱性が存在する。これら発育期の神経遺伝病の治療法開発のためには、発育期神経回路網形成障害の分子機構を知る必要がある。この目的のために、結節性硬化症の神経分化異常の背景とニーマン・ピック病C型の神経変性の分子機構の解明を目指し、結節性硬化症の原因分子が神経細胞の分化後の細胞死と関係する NADE と結合し、また細胞周期進行と関与する MAT1 と結合することを明らかにした。これらの分子と結節性硬化症原因分子との相互作用がどのように神経分化と過誤腫形成に関与するか明らかに出来る体制が出来た。ニーマン・ピック病C型については、モデルマウスで症状の進行と平行して変性する神経回路網を新に見出し、この変性と JAK/STAT 系シグナル伝達の異常が関与している可能性を見出した。さらにこのシグナルの恒常的活性化はニーマン・ピック病C型の出すサイトカインによることを明らかにし、このシグナル伝達系の制御による治療法の開発を行う予定である。

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
大濱栄作 鳥取大学医学部・教授

A. 研究目的

種々の遺伝的障害は、それぞれに特有な神経症状を示すことが多い。その原因は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からである。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につながるのか明らかにされた例はほとんどない。また発育期は神経回路網形成が未熟で、種々の障害に対する脆弱性が異なり、神経系の可塑性が存在し、成人期の神経障害と同じではない。小児期の遺伝的欠陥による神経回路網障害の分子機構を明らかにしていくことは、障害される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。この3年間で、神経細胞の発生分化異常をおこす結節性硬化症、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して来た。

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-リポ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た。

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と大濱、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を研究協力者とした。

B. 研究方法

1. 結節性硬化症の遺伝子産物の機能解析

結節性硬化症では、神経分化異常による脳結節とそれに起因するてんかんと知的障害、腎臓などの臓器の過誤腫形成がQOLと深く関わっている。神経分化異常と過誤腫形成の分子機構を明らかにする目的で、結節性硬化症の原因遺伝子の1つTSC1のcoiled-cold domainをベイトとしてイーストツーハイブリッドを行い、TSC1と結合する分子を検索した。(主任研究者 大野)

2. ニーマン・ピック病C型の神経変性機構の解明

ニーマン・ピック病C型の神経病

ニーマン・ピック病C型の神経病理についてはこれまで知られていたブルキンエ細胞の脱落に加え、視床神経細胞の脱落がおこることを見出している。これらの神経細胞の脱落には、STAT系のシグナルの恒常的活性化が生じていることを見出した。これらの神経細胞の脱落機構をシグナル伝達の異常によって説明できるかどうかが一番の課題であるが、視床の神経細胞脱落の背景として、視床に入力する感覚系の神経回路を検索した。NPC1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・脊髄組織切片を用い、調べた（研究協力者 大原、大濱）。

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）

3. ニーマン・ピック病C型におけるJAK/STAT系シグナル伝達の恒常的活性化の背景

これまで、ニーマン・ピック病C型細胞ではインターフェロンで誘導される遺伝子群の発現増強があり、これがSTAT系シグナルの恒常的活性化によることを見出している。また、このSTAT系シグナルの恒常的活性化は症状の進行に従って脱落するブルキンエ細胞や視床VPL/VPM神経細胞にみられ神経変性に関係している可能性がある。そこで、このSTAT系シグナルの活性

化の背景を知るために、ニーマン・ピック病C型患者細胞は、細胞外にこのシグナル伝達系を活性化させる物質を出していると考え、研究を進めた（大野、分担研究者二宮）。

4. その他の遺伝的脳形成障害における神経回路網形成障害の分子機構

神経セロイドリポフスチン症の神経変性機構を明らかにする目的で、正常線維芽細胞と神経セロイドリポフスチン症のmRNA発現の違いをDNAチップ解析により検討した。（研究分担者 岡）

5. 局所神経回路網遮断による海馬てんかん発症と関連する神経回路網の検討

ラット扁桃体へのカイニン酸注入におけるてんかん性興奮は、視床下部上乳頭核からの入力を抑制することで、発生しなくなることを見出している。HVJ-リポソーム法により上乳頭核へシナプス伝達に参与するシナプトタグミンアンチセンスDNAの導入を行った。（研究分担者 佐治）。

C. 研究結果

1) 結節性硬化症 原因分子ハマルチンと結合する分子

の検索を行い、神経分化と関係する NADE と細胞周期に関与するサイクリン H アッセムブリー因子 (MAT1) が、酵母、細菌及び哺乳類細胞内で、ハマルチンと結合することを明らかにした。

2) C 型患者における神経原線維性変化の出現

C 型患者脳では若年成人期死亡例で神経原線維性変化を見ることがある。モデルマウスの脳では、MAPK シグナルの恒常的活性化により、部位特異的なタウのリン酸化がおこることを明らかにした。また、神経原線維性変化を示す場合、遺伝的背景として APOE (ε4) が重要であることを明らかにした。

3) C 型モデルマウスの神経回路網変性

C 型モデルマウスではプルキンエ細胞が脱落することが知られていたが、視床 VPL/VPM 神経細胞も症状と平行して脱落すること、この脱落は脂質の蓄積とは直接関係がないことを見いだした。

4) STAT 系シグナルの恒常的活性化

C 型患者細胞ではインターフェロンで誘導される一連の遺伝子の発現が増強し、この異常はひと細胞、モデルマウス臓器などで、STAT 系シグナルの増強によることを見いだした。さらに変性する神経細胞で

STAT 系シグナルが増強し、このシグナル異常が神経変性と関係すると考えるに至った。さらに、このシグナル増強は C 型細胞が細胞外に放出する IL-6 などのサイトカインによることを明らかにした。

5) 神経セロイドリポフスチン症の神経変性

神経セロイドリポフスチン症患者細胞の遺伝子発現を比較し、カテプシン D 遺伝子発現が低下していることを見いだした。神経セロイドリポフスチン症の発症にはカテプシン D の二次的発現低下が関与していると考え研究を進めている。

6) てんかんによる海馬ニューロンの変性

幼弱ラット扁桃体へのカイニン酸投与による海馬てんかんでは海馬ニューロンの障害や海馬硬化をおこす。これらは小児期のてんかんモデルとして重要である。このモデルに対し、視床下部のシナプトタグミン I の発現をアンチセンス DNA で抑制すると海馬ニューロンの変性を防御できることを見いだした。海馬硬化は、視床下部から海馬への興奮性入力が 1 つの因子であることを明らかにした。

D. 考察

結節性硬化症

結節性硬化症に欠損する分子は、癌抑制遺伝子機能を持ち、多くの癌研究者から注目され、多くの成果が発表されている。日本では癌研の樋野らのグループが最も活発に研究をすすめている。我々のグループの研究は結節性硬化症の遺伝子変異の検討を終え、研究の対象とするべき結節性硬化症の原因蛋白質と相互作用する分子を見いだした段階である。

ニーマン・ピック病C型

C型に欠損する NPC1 分子は、細胞内脂質のホメオスターシスに関与する分子で、欧米を中心にこの分子の研究は活発に行われている。これらの中で、NPC1 が早期エンドソームから細胞膜への逆行性脂質輸送にも関与することを明らかにした。

国内では、ニーマン・ピック病C型はアルツハイマー病研究者から注目を集め、老人研の村山らのグループと神経原繊維性変化、 β アミロイド沈着機構との関係で共同研究を行い、アポ E の遺伝子型が、リン酸化タウの形成や神経原繊維性変化形成に関与することを明らかにした意義は大きい。

ニーマン・ピック病C型の治療については、現在糖脂質の合成阻害剤が米国で試みられている。我々の見いだしつつあるシグナル伝達の恒常的活性化とその制御による治療法開発は、神経回路網変性機構との関係で極めて重要と考え、今後、このシ

グナル伝達制御に向けた治療実験を行う。

E. 結論

1. 結節性硬化症の神経分化異常、過誤腫形成と関係する可能性の高い分子を同定した。
2. ニーマン・ピック病C型で、臨床症状と平行して変性する神経回路網を同定し、この神経回路変性と関係する可能性のあるシグナル伝達異常を見出した。今後、このシグナル伝達系の制御による治療を試み、この可能性を検証する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. Sakuraba H, matsuzawa F, Aikawa S, Doi H, Kotani M, Lin H, Ohno K, Tanaka A, Yamada H, Uyama E. Molecular and structural studies of the GM2 gangliosidosis O variants. *J hum Genet* 47: 176-183, 2002.
2. Yamamoto T, Pipo JR, Feng J-H, Takeda H, Nanba E, Ninomiya H, Ohno K. Novel TSC1 and TSC2 mutations in Japanese patients with tuberous sclerosis complex. *Brain*

- Dev 24: 227-230, 2002
3. Saito Y, Suzuki K, Nanba E, Yamamoto T, Ohno K, Maruyama S. Niemann-Pick type C disease: accelerated neurofibrillary tangle formation and amyloid β deposition associated with APOE $\epsilon 4$ homozygosity. *Ann Neurol* 52: 351-355, 2002.
 4. Kobayashi S, Ohno K, Kaneda Y, Saji M. Synaptotagmin I hypothalamic knockdown prevents amygdaloid seizure-induced damage of hippocampal neurons but not of entorhinal neurons. *Neurosci Res* 44:455-65, 2002
 5. 大野耕策. 結節性硬化症 - 2つの原因遺伝子の同定とその後の展開. *日本小児科学会雑誌*. 160 : 1556-1565, 2002
 6. Sugii S, Reid PC, Ohgami N, Shimada Y, Maue RA, Ninomiya H, Ohno-Iwashita Y, Chang TY. Biotinylated theta toxin derivative as a probe to examine intracellular cholesterol-rich domains in normal and Niemann-pick type C1 cells. *J Lipid Res* (in press), 2003.
 7. Kitamura Y, Ninomiya H. Smad expression of hepatic stellate cells in liver cirrhosis in vivo and hepatic stellate cell line in vitro. *Pathol. Int.* 53, 18-26, 2003
 8. Hosokawa H, Ninomiya H, Kitamura Y, Fujiwara K, Masaki T. Vascular endothelial cells that express dystroglycan are involved in angiogenesis. *J. Cell Sci.* 115, 1487-1496, 2002
 9. Inada K, Ishigooka J, Anzai T, Suzuki E, Miyaoka H, and Saji M. Antisense hippocampal knockdown of NMDA-NR1 by HVJ-liposome vector induces deficit of prepulse inhibition but not of spatial memory. *Neurosci Res* (in press)
 10. Iwakuma M, Anzai T, Kobayashi S, Ogata M, Kaneda Y, Ohno K, and Saji M. Antisense in vivo knockdown of synaptotagmin I and synapsin I by HVJ-liposome mediated gene transfer modulates ischemic injury of hippocampus in opposing ways. *Neurosci Res* (in press)
 11. Anzai T, Tsuzuki K, Yamada N, Hayashi T, Iwakuma M, Inada K, Kameyama K, Hoka S, and Saji M. Overexpression of Ca^{2+} -permeable AMPA receptor promotes delayed cell death of hippocampal CA1 neurons following transient forebrain ischemia. *Neurosci Res* (in press)
 12. Kobayashi S, Ohno K, Iwakuma M, Kaneda Y, and Saji M. Synaptotagmin I hypothalamic knockdown prevents amygdaloid seizure-induced damage of hippocampal neurons but not of entorhinal neurons. *Neurosci Res*, 44: 455-465, 2002
 13. Saito Y, Geyer A, Sasaki R,

- Kuzuhara S, Nanba E, Miyasaka T, Suzuki K, Murayama S. Early-onset, rapidly progressive familial tauopathy with R406W mutation. *Neurology* 58:811-813, 2002
14. Sango K, Yamanaka S, Ajiki K, Tokashiki A, Watabe K. Lysosomal storage results in impaired survival but normal neurite outgrowth in dorsal root ganglion neurons from a mouse model of Sandhoff disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 28: 23-34, 2002.
15. Shen J-S, Watabe K, Meng XL, Ida H, Ohashi T, Eto Y. Establishment and characterization of spontaneously immortalized Schwann cells from murine model of globoid cell leukodystrophy (Twitcher). *J Neurosci Res* 68: 588-594, 2002.
16. Watabe K, Sakamoto T, Kawazoe Y, Michikawa M, Miyamoto K, Yamamura T, Saya H, Araki N. Tissue culture methods to study neurological disorders: Establishment of immortalized Schwann cells from murine disease models. *Neuropathology* 23: 64-74, 2003
17. Saito K, Shiotani A, Watabe K, Moro K, Fukuda H, Ogawa K. Adenoviral GDNF gene transfer prevents motoneuron loss in the nucleus ambiguus. *Brain Res* 962:61-67, 2002.
18. Sakamoto T, Kawazoe Y, Shen J-S, Takeda Y, Arakawa Y, Ogawa J, Oyanagi K, Ohashi T, Watanabe K, Inoue K, Eto Y, Watabe K. Adenoviral gene transfer of GDNF, BDNF and TGF β 2, but not CNTF, cardiotrophin-1 or IGF1, protects injured adult motoneurons after facial nerve avulsion. *J Neurosci Res* 2003 (in press).
19. Hakuba N, Watabe K, Hyodo J, Ohashi T, Eto Y, Taniguchi M, Yang L, Tanaka J, Hata R, Gyo K. Adenovirus-mediated overexpression of a gene prevents hearing loss and progressive inner hair cell loss after transient cochlear ischemia in gerbils. *Gene Ther* 2003 (in press).
20. Shirakura M, Fukumura M, Inoue M, Fujikawa S, Maeda M, Watabe K, Kyuwa S, Yoshikawa Y, Hasegawa M. Sendai virus vector-mediated gene transfer of glial cell line-derived neurotrophic factor prevents delayed neuronal death after transient global ischemia in gerbils. *Exp Anim* 2003 (in press).
21. Kato S, Esumi H, Hirano A, Kato M, Asayama K, Ohama E. Kato S., et al. Immunohistochemical expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in human brain tumors: relationships of iNOS to superoxide dismutase (SOD) proteins (SOD1 and SOD2), Ki-67 antigen (MIB-1) and p53 protein. *Acta Neuropathol.* 104: 57-66, 2002

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

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 の病態生理を解明する手がかりを得ることを目的として、NPC 細胞での遺伝子発現パターンを解析し、以下の結果を得た。(1) NPC ヒト細胞では ISRE (interferon-stimulated response element) で誘導される遺伝子の発現が増加している。(2) NPC ヒト細胞/NPC1 欠損 CHO 細胞/NPC マウス組織において STAT (signal transducer and activator of transcription) が過剰発現している。(3) NPC ヒト細胞は STAT を活性化させる因子（サイトカインの一種と予想される）を産生する。これらの結果は、NPC 細胞ではある種のサイトカインの過剰産生のため JAK/STAT シグナル伝達系が恒常的に活性化されている事を示唆する。

A. 研究目的

NPC の病理学的/臨床的特徴は、小脳 Purkinje 細胞をはじめとする神経細胞の進行性脱落とそれによる中枢神経症状である。一方、培養細胞レベルでの NPC 細胞の生化学的特徴は、コレステロールをはじめとする脂質の細胞内蓄積であるが、主にモデルマウスを用いた遺伝学的/薬理学的実験により、脂質蓄積そのものが神経細胞死の直接の原因ではないと結論されている。そこでわれわれは、NPC の病態生理を解明する手がかりを得ることを目的として、NPC 細胞での遺伝子発現パターンを解析し、神経細胞死につながる可能性のある変化をとらえることを計画した。

B. 研究方法

NPC 患者と正常人から得た皮膚繊維芽細胞から mRNA を抽出し、cDNA に reverse transcribe した後、各々を Cy2, Cy5 で標識した。これを probe として、約 8,600 のヒト cDNA clone が固相化された microarray を用いて競合的 hybridization を行い、NPC 細胞において発現の亢進している遺伝子をスクリーニングした。

C. 研究結果

Microarray 解析の結果、NPC 細胞で 2 倍以上の mRNA 発現亢進が認められた遺伝子の中に、MxA、2'-5' oligoadenylate synthetase など、ISRE により誘導される一群の遺伝子が含まれてる事が判明した。この生化学的機序を解明するため、ISRE に結合する転写因子の複合体である ISGF3

(interferon-stimulated gene factor 3) を構成する STAT と ISGF3 γ の蛋白質レベルを調べた。ヒト NPC 細胞において、STAT1~STAT5 と ISGF3 γ のレベルの増加しており、同様に NPC1 欠損 CHO 細胞においても STAT1, STAT3~STAT6 の増加が認められた。NPC1 欠損マウスの肝臓/脳の lysate においても同様に STAT1, STAT3~STAT6 の増加が認められ、視床神経細胞や小脳 Purkinje 細胞、foamy macrophage で STAT3,

STAT6 の抗原性が増加していた。さらに、STAT の過剰発現の生化学的機序を解明するため、NPC 細胞と正常細胞の共培養実験、各々の培養上清による刺激実験を行ったところ、NPC 細胞の培養上清中に、MxA/STAT1 の発現レベルを亢進させる活性物質が存在することが判明した。この物質は、0.2 μ m フィルターでトラップされず、超遠心でも除去されない可溶性の物質であり、正常細胞の培養上清中には存在しない。

D. 考察

以上の結果は、NPC 細胞ではある種のサイトカインの過剰産生のため JAK/STAT シグナル伝達系が恒常的に活性化されている事を示唆する。IL-6 などのサイトカインを脳内で過剰発現する transgenic mouse は JAK/STAT シグナル伝達系の恒常的活性化に伴い神経変性をきたす事か知られており、これらの結果は、NPC での神経細胞死の機序を解明するための重要な手がかりである。

E. 結論

NPC 細胞では、ある種のサイトカインの過剰産生のため JAK/STAT シグナル伝達系が恒常的に活性化されている。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sugii S. et al., *J. Lipid Res.* in press

Kitamura Y. et al., *Pathol. Int.* 53, 18-26 (2003)

Hosokawa H. et al., *J. Cell Sci.* 115, 1487-1496 (2002)

Yamamoto T. et al., *Braun Dev.* 24, 227-230 (2002)

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（厚生科学研究事業）
分担研究報告書

神経セロイドリポフスチン症の病態解析に関する研究

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 乳児後期型神経セロイドリポフスチン症 (CLN2) の病態を検討する目的で、cDNA マイクロアレイにより患者由来線維芽細胞での mRNA を正常対照と比較した。280 の遺伝子について 2 倍以上あるいは 2 分の 1 以下の変化が見られた。本疾患の原因酵素も含めた peptidase 群の mRNA に変化が顕著であり、病態に関連したものと考えられた。

A. 研究目的

神経セロイドリポフスチン症 (NCL) は、特徴的な細胞内封入体を生じる難治性進行性神経変性疾患群である。少なくとも 8 つ以上のサブタイプが存在し、これまでに 5 つの原因遺伝子が同定されている。我々はこの内、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) について、患者血液を用いた酵素診断のシステムを作り、国内各施設からの依頼による診断サービスを行っている。

本年度は、CLN2 の病態を検討するために、患者由来の線維芽細胞を用いて、mRNA を用いた cDNA マイクロアレイ解析を行った。

B. 研究方法

酵素活性および遺伝子解析にて CLN2 と診断が確定している患者由来の線維芽細胞および正常対象細胞から totalRNA を抽出し cDNA に逆転写し、約 1 万の遺伝子が固相化されている cDNA マイクロアレイ (クラボ

ウ) にてハイブリダイズさせた。2 倍以上、あるいは 2 分の 1 以下に変化のあった mRNA を有意として検討した。

C. 研究結果

(1) CLN2 患者線維芽細胞にて 2 倍以上増加していた mRNA は 129 種で、2 分の 1 以下に減少していたのは 151 種類であった。

(2) 増加あるいは減少していたものの内、表 1 では機能などが明らかにされているもので有意と考えられる遺伝子を各 20 と 21 選択した。

表 1 増減の見られた主要遺伝子

Upregulated gene
AMINOPEPTIDASE (LOC64167)
PHOSPHODIESTERASE 1C, CALMODULIN-DEPENDENT
COMPLEMENT-C1Q TNF-RELATED PROTEIN
PAIRED BASIC AMINO ACID CLEAVING ENZYME (FURIN)
VOLTAGE-DEPENDENT Ca CHANNEL β -1 SUBUNIT
NITRIC OXIDE SYNTHASE 1 (NEURONAL) (NOS1)
BETA-SITE APP-CLEAVING ENZYME 2 (BACE2)
NITRIC OXIDE SYNTHASE 3 (ENDOTHELIAL CELL) (NOS3)

LATROPHILIN (KIAA0786)
LEUKOTRIENE A4 HYDROLASE (LTA4H)
GABA-B RECEPTOR MRNA, COMPLETE CDS
CALBINDIN 2
LARGE CONDUCT Ca_v -VOL-DEP K CHANNEL α -SUB
PROPROTEIN CONVERTASE SUBTILISIN/KEXIN TYPE 1
SHORT-CHAIN DEHYDROGENASE/REDUCTASE 1 (SDR1)
CHLORIDE CHANNEL 1, SKELETAL MUSCLE
VERY LOW DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR (VLDLR)
ARACHIDONATE 5-LIPOXYGENASE-ACTIVATING PROTEIN
CYSTATIN A (STEFIN A) (CSTA)
GABA A RECEPTOR, ALPHA 4 (GABRA4)

Down-regulated gene
GLUTATHIONE S-TRANSFERASE THETA 1 (GSTT1)
PROSTAGLANDIN-ENDOPEROXIDE SYNTHASE 1 (COX1)
5-HYDROXYTRYPTAMINE RECEPTOR 2B (HTR2B)
CATHEPSIN C (CTSC)
INTERLEUKIN 13 RECEPTOR, ALPHA 2 (IL13RA2)
PRO-GALANIN MRNA, 3' END*
WISP2
CLN2
HEAT SHOCK 27KD PROTEIN 3 (HSPB3)
TOLL-LIKE RECEPTOR 4 (TLR4)
COMPLEMENT COMPONENT 2 (C2)
SERINE/THREONINE KINASE KPM
COPINE VI (NEURONAL) (CPNE6)
PROSTAGLANDIN-ENDOPEROXIDE SYNTHASE 2 (COX2)
TENASCIN XB (TNXB), TRANSCRIPT VARIANT XB-S
TNF RECEPTOR SUPERFAMILY, MEMBER 6B (TNFRSF6B)
LDL RECEPTOR-RELATED PROTEIN 5 (LRP5)
CARBOXYPEPTIDASE Z (CPZ)
COMPLEMENT COMPONENT 4A (C4A)
COPINE I (CPNE1)
TNF RECEPTOR SUPERFAMILY, MEMBER 5 (TNFRSF5)

表 2

Down-regulated gene
CLN2
CATHEPSIN C (CTSC)
CARBOXYPEPTIDASE Z (CPZ)

Upregulated gene
PAIRED BASIC AMINO ACID CLEAVING ENZYME (FURIN)
BETA-SITE APP-CLEAVING ENZYME 2 (BACE2)
CYSTATIN A (STEFIN A) (CSTA)

Upregulated gene
NITRIC OXIDE SYNTHASE 1 (NEURONAL) (NOS1)
NITRIC OXIDE SYNTHASE 3 (ENDOTHELIAL CELL) (NOS3)

Down-regulated gene
PROSTAGLANDIN-ENDOPEROXIDE SYNTHASE 1 (COX1)
PROSTAGLANDIN-ENDOPEROXIDE SYNTHASE 2 (COX2)

Upregulated gene
ARACHIDONATE 5-LIPOXYGENASE-ACTIVATING PROTEIN

D. 考察

(1) cDNA マイクロアレイでの結果は、実際の線維芽細胞の蛋白レベルにて変化が確認される必要があり、今後、western blot あるいはリアルタイム PCR にて検証する予定である。

(2) 興味深いことに本疾患の原因遺伝子である CLN2 mRNA の発現が低下していた。転写の時点かあるいは転写後の mRNA の不安定性による mRNA レベルの低下が起こっているものと考えられた。Ezaki らは、competitivePCR にて、CLN2 患者細胞で、CLN2 遺伝子の mRNA レベルには有意な変化はないと報告している。従って、本患者で

見られた mRNA の低下が本疾患に特有のものであるかどうかは、さらに鋭敏な方法で複数の患者で検証する必要がある。

(3) 表 1 で示した遺伝子群の中で、特に顕著な変化として、CLN2 蛋白も含めた peptidase 酵素および inhibitor の mRNA に変化が見られた (表 2)。このうち、CathepsinC は、CLN2 に類似した機能を有するものと考えられており、この酵素の mRNA も低下していることにより、細胞内の蛋白分解の異常が促進されるものと考えられる。これに対し、Furin および BASE2 の mRNA の上昇は、代償的な現象であるとも考えられた。また、peptidase の inhibitor である cystatin A mRNA の増加も、細胞内の peptidase 群の活性低下に関与している可能性が考えられた。

(4) 神経系に関与した蛋白としては神経細胞に発現する NOS1 および血管内皮細胞に発現する NOS3 が上昇していた。NO は神経細胞に対して、場合によっては障害性に働くことが示されており、本疾患の神経細胞変性との関連する可能性がある。

(5) COX1 および COX2 の mRNA が減少しており、また Arachidonate 5-lipoxygenase activating protein の mRNA が増加していた。神経細胞に高発現する COX2 などによるアラキドン酸代謝が、神経系においてどのような生理的機能を有しているか、まだ明らかではない。COX2 はストレスによる容易に誘導されることが知られており、この抑制が病態に関与している可能性が考えられる。

E. 結論

CLN2 患者由来の線維芽細胞にて、280 種類の mRNA が 2 倍以上あるいは 2 分の 1

以下に変化していた。このうち、本疾患の原因蛋白を含む peptidase 群に変化が顕著であった点が注目された。

F. 健康危険情報

特に該当せず。

G. 研究発表

2. 学会発表

Pathogenetic significance of the CLN2 protein in late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis 9th International Child Neurology Congress (於：北京) 平成 14 年 9 月 21 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

厚生科学研究費助成（脳科学研究事業）

分担研究報告書

神経回路網形成と興奮性シナプス可塑性に関する行動学的研究
—NMDA 受容体海馬ノックダウン動物の統合失調症様の認知障害—

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

脳高次機能におけるグルタミン酸受容体のサブタイプ NMDA 受容体の役割を明らかにするために、我々は NMDA-NR1 サブユニットに対するアンチセンス DNA を HVJ-リポソーム遺伝子導入法を用いてラットの海馬に導入した。アンチセンスの NR1 発現抑制効果はウェスタンブロット解析により確かめられた。空間記憶は水迷路課題により、また sensorimotor gating（知覚情報統合処理機能）は prepulse inhibition (PPI) テストにより調べられた。ウェスタンブロット解析から、アンチセンス処置が海馬 NR1 タンパク発現を 30%抑制することが示された。このアンチセンス処置は空間記憶に影響を与えることなく、知覚情報統合処理機能の障害を引き起こした。海馬 NMDA 受容体の機能低下は sensorimotor gating（認知機能）の障害と比較的正常な記憶を生じるとの結果から、我々は海馬 NR1 ノックダウン動物に見られた正常な空間記憶と PPI 障害との組み合わせは統合失調症のモデル行動の一部を現していると結論する。

A. 研究目的

大脳皮質や海馬辺縁系等では、興奮性シナプスのほとんどが spiny neuron の樹状突起スパイン（棘）上に集積したグルタミン酸受容体群を介して機能的接続を形成している。更に、近年、アルツハイマー病やダウン症の脳でグルタミン酸受容体（特に NMDA 受容体）量の減少と樹状突起スパイン密度の激減があることが報告され、これら知的障害を伴う疾患と興奮性シナプス機能の低下との関係が注目されている。また統合失調症の生物

学的原因仮説について近年、NMDA 受容体低機能仮説が提唱されている。この仮説は、NMDA 受容体の非競合的拮抗薬である phencyclidine (PCP) が統合失調症に極めて類似する症状を引き起こすことを根拠としており、NMDA 受容体低機能がドーパミン過敏性を含めた神経系の変化を引き起こし、統合失調症様症状を引き起こすとしている。

NMDA 受容体を構成するサブユニットには NR1, NR2A~2D の 5 種類があり、このうち NR1 サブユニットは NMDA 受

容体機能を発揮するために必要不可欠である主要なサブユニットと考えられており、特に海馬における記憶学習の獲得や認知機能と密接に関与している事が知られている。以上の背景を踏まえ、我々は本研究において、海馬の NMDA 受容体機能解析を行うことにより、海馬の NMDA 受容体機能（興奮性シナプス機能の主要部分）の低下と精神疾患の関連を明らかにすることを目指した。

従来の NMDA 受容体機能を検討する研究は、主に行動薬理学的手法と遺伝子改変動物により行われて来た。しかし、薬理学的手法には受容体特異性の問題があり遺伝子変容動物では個体の正常な成長発達への影響や、局所機能変容が難しいという問題点があった。これらの問題を解決するために、我々はアンチセンス法により NMDA 受容体の発現を特異的にかつ限局的に抑制することを検討した。アンチセンスの導入効率と効果の持続性の低さを改善するために、HVJ-リポソームベクターという新しい遺伝子導入法を用いて NMDA 受容体の高効率かつ長期のアンチセンスノックダウン（発現抑制）を試みた。

B. 研究方法

1. 動物

実験には 10 週齢 Wistar 系雄ラット（体重 230 - 300 g）を用いた。動物の取扱いは北里大学動物実験指針を遵守して行った。

2. オリゴヌクレオチド (Oligodeoxy nucleotides; ODN)

NR1 に対するアンチセンス ODN は Whalstedt らの報告に基づいた配列を用い、コントロールとして、センス配列の ODN を用いた。配列は各々以下の通りである。

NR1- アンチセンス (NR1-AS) :

5'-CAGCAGGTGCATGGTGCT-3'.

NR1- センス(NR1-SE) :

5'-AGCACCATGCACCTGCTG-3'.

3. HVJ リポソーム法による遺伝子導入

HVJ リポソームは既報に掲載の方法に従った。概要を記載すると、5種類の脂質をクロロフォルムに溶解した。溶解した混合脂質をロータリーエバポレーターで乾燥させながら、ガラス管内面に脂質薄膜を形成させた。100 μ g の ODN をガラス管内に入れ強震盪することにより、脂質単膜で ODN を包埋したりポソームを形成した。このリポソームに不活化したHVJウィルス(Hemagglutinating Virus of Japan) 1 ml (30,000 hemagglutinating unit) を混和融合させた。この懸濁液からショ糖勾配中で超遠心を行い、HVJ の細胞融合能をもった ODN-HVJ リポソームを精製した。精製された ODN-HVJ リポソームは 540 nm の吸光度にて OD= 0.8 に調整した。文献的には懸濁液 1 μ l 中に約 20-60 ng の ODNs が包埋されている。

4. 海馬への ODN-HVJ リポソームの注

入

ラットは麻酔下で ODN を包埋した HVJ-リポソーム混合懸濁液を、マイクロピペットと空気圧注入装置を用いて、脳定位固定手術法により、両側海馬全域に行渡るよう、12箇所に入注した。懸濁液の入注量は1箇所に入注した。懸濁液の入注量は1箇所に入注した。懸濁液の入注量は1箇所に入注した。

5、ウェスタンブロット解析

アンチセンス投与によるタンパク質発現抑制効果を確認するため、ウェスタンブロット法による受容体タンパク質の定量を行った。

ラットを麻酔下にて断頭し、速やかに海馬を摘出した。摘出した海馬をホモジネートし、タンパク合成酵素阻害剤を含んだバッファーに溶解し、サンプルとした。サンプル内に含まれるタンパク質量を BCA キット (Pierce) を用いて定量した。ウェスタンブロット法は 7.5% SDS ゲルを用い標準的な手法により電気泳動分離し、ニトロセルロースメンブラン (Bio-Rad) にブロッティングした。一次抗体は抗ウサギ NMDA-R1 抗体 (Chemicon) と抗ウサギ GluR2/3 抗体 (Chemicon)、二次抗体としてペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Vector Lab.) を用いた。

フィルム上に得られた陰影濃度をデジタルスキャナーで取り込み、コンピュータソフトウェア上で解析、定量化を行った。

6、組織染色

ODN-リポソーム混合懸濁液投与の物理的な海馬組織損傷の影響を調べるため、注入を受けた一部のラットは、組織染色にて、組織損傷を検討した。パラホルム固定の上、25 μm に薄切し、Nissl 染色して鏡検した。

7、オープンフィールドにおける自発運動量の計測

基本的な運動量の変化を検討するため、新規環境下における自発運動量を測定した。ラットは 60cm x 60cm の正方形のオープンフィールドに静置し、行動をビデオカメラで撮影した。フィールドを 15cm x 15cm の 16 区画に分割し、各区画間の移動回数を 10 分間計測した。

8、モリス水迷路実験

空間記憶機能についての検討を目的として、モリス水迷路実験を行った。直径 1.5m の円形プールに水を張り、水面下 2cm に透明プラスチック製のプラットフォームを置いた。ラットをランダムな位置から投下し、プラットフォームに到達するまでの時間を計測した。テストは 1 日に 6 試行ずつ、アンチセンス投与後 6 日後から 11 日後まで 5 日間連続で行った。加えて、5 日目の 6 試行を終えた後、プラットフォームを取り除き、1 分間自由遊泳させるプローブテストを行った。

9、プレパルスインヒビション

プレパルスインヒビションとは、知覚刺激に対する驚愕反応が先行する弱い刺激により抑制される現象である。プレパルスインヒビションは直接的には高次の知覚情報制御機構 (sensorimotor gating 機構) を反映し、間接的には認知機能を反映すると考えられている。

実験はアンチセンス投与後 6 日後と、14 日後に行った。実験方法は Furuya らの方法⁴⁾に従った。実験には SR-Lab (SanDiego) の実験装置を用いた。65dB のバックグラウンドノイズにおいて、120dB のパルス刺激、70 もしくは 80dB のプレパルス刺激と 120dB のパルス刺激、刺激なしの 4 種類の刺激を偽ランダムに与え、反応を測定した。驚愕反応の抑制は以下の式で示される抑制率 (%PPI) を算出し比較検討した。

$$\%PPI_{80}=[1-(PP_{80\&P})/(P \text{ alone})] \times 100$$

$$\%PPI_{70}=[1-(PP_{70\&P})/(P \text{ alone})] \times 100$$

10、統計検定

NR1-AS と NR1-SE 投与の効果は処置を要因とした one-way analysis of variance (ANOVA) により検定した。Post-hoc 分析には Fisher's PLSD もしくは the Student's t-test を用いた。危険率 $p < 0.05$ を有意水準とした。

C. 結果

1、アンチセンス法による NR1 の発現

抑制

アンチセンス投与 6 日後におけるウェスタンブロットによる NR1 受容体タンパク量の定量解析から、NR1-AS 投与群はコントロールと比較して、 $29.8 \pm 7.0\%$ (\pm S.E.) と有意な発現抑制が認められた。GluR2/3 受容体タンパク量に対して NR1-AS 投与の影響は認められず、NR1 に対して特異的な効果であったことが分かる。時間経過に関しては、投与 3 日後より発現抑制が生じ、11 日後まで持続した後、14 日後には回復していることが分かった。

2、組織染色

ODN-リボソーム混合懸濁液を注入した 6 日後の、冠状断海馬組織の Nissl 染色顕微鏡写真像から、注入部位には微少な組織損傷が認められるが、これは NR1-AS 投与群コントロール投与群いずれにおいても同程度であった。

3、自発運動量

10 分間の自発運動量から評価された移動度 (locomotor activity) は各々 NR1-AS 群 105.4 ± 17.9 回 (\pm S.E.)、NR1-SE 群 126.2 ± 14.1 回 (\pm S.E.) で、両群間に移動度の有意な差は見られなかった。

4、空間記憶機能

水迷路実験における到達時間 (escape latency) と試行回数関係において、NR1-AS 投与群も NR1-SE 投与群も試行

を繰り返すに従って到達時間は短縮し、両群間において空間記憶学習機能の有意な差は認められなかった。プローブテストにおいて、NR1-AS 群と NR1-SE 群はともにプラットフォームの存在していた区画 (target quadrant) における滞在時間が有意に長く、空間学習記憶の獲得が確認された。

5、プレパルスインヒビション

NR1 の約 30% 発現抑制が確認された投与後 6 日目でのプレパルス 80dB の %PPI は、NR1-AS 投与群で %PPI = $68.0\% \pm 4.9\%$ (\pm S.E.), NR1-SE 投与群で %PPI = $87.0\% \pm 3.0\%$ (\pm S.E.) であり、NR1-AS 投与群で有意に PPI が障害されていた。($p < 0.05$, t-test)。プレパルス 70dB における %PPI は、NR1-AS 群で $46.8 \pm 8.2\%$ (\pm S.E.), NR1-SE 群で $62.0\% \pm 6.3\%$ (\pm S.E.) であり、統計的有意差は見られなかったものの、NR1-AS 群で低値であった。一方、NR1 の発現抑制の回復が確認されている 14 日後においては、両群間で %PPI の有意な差は見られなかった。

D. 考察

1、アンチセンス法による NR1 の発現抑制

ウェスタンブロット法による解析から、HVJ-リポソーム法によるアンチセンス投与は、単回の手術・投与でありながら、NR1 タンパク量の約 30% の発現抑制し、

14 日後には回復することが明らかとなった。この発現の抑制効率は従来試みられてきた、アンチセンス ODN の複数回投与や浸透圧ポンプを用いた持続投与方法と比較しても、遜色のない高効率なものであると考えられる。なおかつ、単回の投与であるため、行動実験においては、きわめてバイアスの低い状態で実験を行えたと考えられる。また、GluR2/3 受容体のタンパク量は変化をきたしておらず、NR1 のみが特異的に発現抑制されたと考えられる。

今回筆者らの用いた、アンチセンス法と HVJ-リポソーム法の組み合わせによる特異的たんぱく質発現抑制は、将来におけるタンパク質あるいは遺伝子の機能解析の有用な手法となりうるものと考えられる。

2、行動

NR1-AS を投与されたラットのオープンフィールドにおける移動量は、コントロール群の NR1-SE を投与されたラットと比較して、差は見られない。海馬の NR1 の発現抑制は運動機能に影響を及ぼすことはなく、直接に行動量の変化をきたすものではないといえる。

筆者らの行動実験において、NR1-AS 投与ラットはモリス水迷路において空間記憶学習の障害は見られなかった。この結果は海馬 CA1 の NR1 ノックアウトマウスや NMDA 受容体拮抗薬の海馬内局所注入投与で、空間記憶障害を呈した

とする報告と異なっている。既報と今回の NR1-AS 投与ラットとの明らかな違いは、我々のラットは 30%の発現抑制であるという点である。すなわち 30%のノックダウンでは空間記憶機能は障害されないと考えられる。

PPI において、NR1-AS 投与ラットは投与 6 日後に PPI の障害を呈し、投与 14 日後の NR1 タンパクが回復した時点においては、PPI の障害が見られなかった。このことから、PPI の障害は NR1 の 30% 発現抑制に依存したものであると考えられる。過去の報告において、海馬内へ NMDA 受容体アンタゴニストを局注すると、PPI の障害が見られるという報告がある¹⁾。我々の実験結果と一致したものであり、矛盾しない。

筆者らの行った 2 つの実験結果から、NR1 の 30%発現抑制では空間記憶機能の障害は見られないものの sensorimotor gating の障害だけが見られる、ということが分かった。すなわち、海馬における NMDA 受容体の軽度機能低下では sensorimotor gating 障害のみを引き起こし、高度機能障害では sensorimotor gating 障害に加えて空間記憶障害も引き起こされると考えられた。

3. 統合失調症との関係

ヒトを対象とした臨床的な研究において、統合失調症の患者では空間記憶能力の障害は見られないが、認知機能の障害が存在する状態はよく観察される。また、

PPI の研究において、sensorimotor gating が統合失調症患者で特徴的に障害されていることが示されている²⁾。これらの知見より、空間記憶の障害を示さず、sensorimotor gating 機構の障害のみを示した NR1-AS 投与ラット、すなわち海馬の NR1 が 30%発現抑制された状態は、記憶障害を伴わずに認知障害を呈した状態のモデルである可能性がある。このことは、海馬 NMDA 受容体機能異常が統合失調症の病態にその一部として関与している可能性を示唆している。

今後、統合失調症の NMDA 仮説を検証するためには、このモデル動物においてもドパミン系の異常が生じているか検討する必要がある。そのためには、この動物モデルで見出された PPI の障害がドパミン拮抗薬により回復するか、さらにはドパミン作動薬に対して PPI の障害や運動量に過感受性が認められるかといった点についての検討が必要と考えられる。

E. 結論

脳の海馬に局限したグルタミン酸受容体サブタイプである NMDA 受容体の発現抑制（約 30%ノックダウン）は、海馬の興奮シナプス機能低下に起因するとされる知覚情報の統合処理機能の異常を呈したが、一方、海馬の全破壊あるいは全機能麻痺により現れるとされる空間記憶障害は見られなかった。記憶障害を伴わずに認知機能障害だけを呈したことは、海馬 NMDA 受容体異常が統合失調症の