

病態の一部に含まれている可能性を示唆している」と結論される。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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)

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)

Anzai T, Tsuzuki K, Yamada N, Hayashi T, Iwakuma M, Inada K, Kameyama K, Hoka S, and Saji M. Overexpression of Ca²⁺-permeable AMPA receptor promotes delayed cell death of hippocampal CA1 neurons following transient forebrain ischemia. *Neurosci Res* (in press)

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).

2. 学会発表

Inada K, Ishigooka J, Watanabe S, Suzuki T, Sugiyama K, Yokoyama M, Maruta S, Suzuki E, Miyaoka H, and Saji M*: MEMORY AND COGNITIVE FUNCTION OF THE RATS THAT RECEIVED NMDA-R1 HIPPOCAMPAL KNOCKDOWN BY ANTISENSE TECHNIQUE. 国際神経精神薬理学会(CINP)広島会議、2002.7

稲田健, 石郷岡純, 鈴木映二, 宮岡等, 佐治真理:海馬 NR1 受容体発現抑制ラットの空間記憶とプレパルスインヒビションについての検討。第11回海馬と高次機能学会 浜松、2002.11

Saji M, Akiba R, Tanaka S, Sekino Y and Shirao T. Impaired spatial learning and intact habituation in rats with antisense hippocampal knockdown of drebrin A. 32 th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Orland in USA, 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

研究要旨 種々の遺伝子変異疾患モデルマウスからシュワン細胞培養系を確立し、長期培養による不死化シュワン細胞株の樹立を試みた。Niemann-Pick 病 C 型(NPC)モデルマウス (spm, npc^{nh}), Krabbe 病モデルマウス (twitcher), 末梢ミエリン P0 ノックアウトマウス, desert hedgehog ノックアウトマウス, neurofibromatosis-1 ノックアウトマウスから初代シュワン細胞培養系を得、6-10 ヶ月の長期培養により自発的に不死化したと考えられるシュワン細胞株を得た。これらシュワン細胞株はいずれも位相差像, 蛍光抗体法および RT-PCR で明瞭なシュワン細胞の形質を示し、モデルマウスの末梢神経系でみられるシュワン細胞の特徴を反映しており、末梢神経病変を解析しその治療法を検討する上で有用と考えられた。

A. 研究目的

我々は以前、正常成体マウスから得られた培養シュワン細胞を長期間継代維持することにより、自発的に不死化したシュワン細胞株 (IMS32 細胞; ICR マウス) を樹立した (Watabe et al., J Neurosci Res 1995;41:279-290)。さらに、Niemann-Pick 病 C 型(NPC)モデルマウス (spm/spm; C57BL/KsJ, Watabe et al., J Periph Nerv Syst 2001;6:85-94) および Krabbe 病モデルマウス (twitcher; C57BL/6J, Shen et al., J Neurosci Res 2002;68:588-594) から不死化シュワン細胞株を樹立しうることを報告した。同様に、シュワン細胞あるいは末梢ミエリンの異常を伴う他の遺伝子変異疾患モデルマウスからシュワン細胞培養系を樹立出来れば、細胞レベルでの病態解明に有用であると予想される。さらに現在のところ、成体マウス神経系で安定して樹立可能な細胞株はシュワン細胞以外にはないことから、疾患モデルマウスからシュワン細胞株を得ることは、神経病変全般の解明およびその治療法の開発に少なからず寄与する可能性がある。我々は昨年度の本研究班での報告に引き続き、以下の遺伝子変異疾

患モデルマウスからシュワン細胞培養系を確立し、長期培養による不死化シュワン細胞株の樹立を試みた。

1. Niemann-Pick 病 C 型モデルマウス (npc^{nh}/npc^{nh}, npc^{nh}/+); BALB/c; 9 週齢.
2. P0 ノックアウトマウス (P0^{-/-}, P0^{+/-}); C57BL/6; 21-35 週齢.
3. Desert hedgehog ノックアウトマウス (Dhh^{-/-}); 129/sv x C57BL/6J; 15 週齢.
4. Neurofibromatosis-1 (NF1) ノックアウトマウス (Nf1^{Fcr}/+); C57BL/6; 11 週齢.

B. 研究方法

各モデルマウスより頸～腰部後根神経節および連続する末梢神経を採取し初代培養とした。抗 Thy1.2 および補体処理にて混在する線維芽細胞を除去しつつ継代を行い、ほぼ純粋なシュワン細胞培養系を得た。シュワン細胞の同定には、シュワン細胞マーカーに関する蛍光抗体法、RT-PCR、Western blot (S100, laminin, p75^{NTR}, GFAP, NCAM, NG2, L1, P0, PMP22, GAP43) を行った。npc^{nh} マウス・シュワン細胞については、NPC

phenotype の確認に filipin cholesterol 染色, NPC1 mRNA の RT-PCR, NPC1 蛋白の western blot, 電顕観察を行った. 対照として正常マウス・シュワン細胞株 IMS32 についても検討した. 本動物実験に関しては, 当研究所動物実験委員会の承認を得て行った.

C. 研究結果

初代培養を抗 Thy1.2 および補体により処理し継代することにより, 各マウスからほぼ純粋なシュワン細胞培養系を得た. これらシュワン細胞を 8~10 ヶ月継代維持したところ, 正常不死化シュワン細胞株 IMS32 と同様に例外なくコロニーを形成しはじめ, 試みた全てのマウスから不死化したと考えられるシュワン細胞株を得ることが出来た. これら細胞株はいずれも蛍光抗体法, RT-PCR あるいは Western blot で上記シュワン細胞マーカーが検出され, 明確なシュワン細胞の形質を示し, 増殖能は正常対照と同様であり, 週 2 回の継代, 6 ヶ月経過後も不変であった.

1. npc^{nh}/npc^{nh}細胞株 (573C10): 胞体内に filipin cholesterol 染色陽性顆粒が充満, GM2 ganglioside の蓄積を認め, Western blot では NPC1 蛋白は検出されず, 電顕下で胞体内に膜様封入体あり. NPC1 cDNA の形質導入により蓄積物質は消失.

2. P0^{-/-}細胞株 (675C20): P0 genomeDNA, P0 mRNA とともに欠失.

3. Dhh^{-/-}細胞株 (746C1): Dhh genome DNA, Dhh mRNA とともに欠失.

4. Nf1^{Fcr/+}細胞株 (645C1): NF1 genome の heterozygosity. Western blot で NF1 は減少, Ras-GAP 活性も減少.

D. 考察

今回, 試みた全ての遺伝子変異疾患マウスから不死化したと考えられるシュワン細胞株を得ること

が出来た. すなわち, ICR, C57BL, BALB/c のいずれの系統のマウスからも同一条件下で不死化シュワン細胞が発生することがわかった. これらシュワン細胞株はいずれも位相差像, 蛍光抗体法および RT-PCR で明確なシュワン細胞の形質を示し, モデルマウスの末梢神経系でみられるシュワン細胞の特徴を反映しており, 末梢神経病変を解析しその治療法を検討する上で有用と考えられた.

E. 結論

本研究で確立したシュワン細胞培養系は, 末梢神経病変を解析しその治療法を検討する上で有用と思われる. また, 我々の方法によるシュワン細胞株の樹立は, 様々な疾患モデルマウスに適用可能と考えられた.

本研究は, 坂本 剛, 川添陽子 (東京都神経科学総合研究所分子神経病理), 武田泰生 (東京都老人総合研究所細胞認識研究グループ), 道川 誠 (長寿医療研究センター痴呆疾患研究部), 二宮治明 (鳥取大学医学部神経生物学), 宮本勝一, 山村 隆 (国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部), 梅原藤雄 (鹿児島大学医学部第 3 内科), 佐谷秀行, 荒木令江 (熊本大学医学部腫瘍医学講座) との共同研究で行われた.

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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*

2002; 28: 23-31.

2. 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* 2002; 68: 588-594.
3. 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* 2003;23: 64-74.
4. 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* 2003;962:61-67.
5. 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).
6. 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).
7. 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).

2. 学会発表

1. 渡部和彦. 神経系の細胞・組織培養における研究方法, 第43回日本神経病理学会総会学術研究会ワークショップ, 神経疾患研究の方法について, 東京 (2002, 5.17).
2. 渡部和彦, 沈 勁松, 坂本 剛, 小川順子, 大橋十也, 井田博幸, 衛藤義勝. リピドーシス・モデルマウスからの培養シュワン細胞株の樹立, 第43回日本神経学会総会, 札幌 (2002, 5.31).
3. 渡部和彦, 坂本 剛, 川添陽子, 沈 勁松, 大橋十也, 衛藤義勝, 道川 誠, 柳澤勝彦, 宮本勝 ; 山村 隆, 荒木令江. 疾患モデルマウスからの培養シュワン細胞株の樹立. 第45回日本神経化学学会総会, 札幌 (2002.7.18).
4. Watabe K, Sakamoto T, Kawazoe Y, Shen J-S, Ohashi T, Eto Y, Michikawa M, Yanagisawa K, Miyamoto K, Yamamura T, Araki N. Establishment of immortalized Schwann cells from murine disease models. , Society for Neuroscience, Orlando, FL, USA (2002, 11.5)

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

主任研究者 大野耕策

研究要旨 NPCマウスの後根神経節の後索核に終止する軸索終末と、腰髄後根神経の経時的な変化を、電顕形態的および定量的に検討した。その結果、本マウスでは後索核に極めて早期から neuroaxonal dystrophy が出現し、後根神経節細胞の変性脱を伴うことが示された。

研究協力者：大原慎司
国立療養所中信松本病院神経内科医長

A. 研究目的

- 1) NPCマウスの後索核の neuroaxonal dystrophy と、正常のマウスで老化に伴って出現する neuroaxonal dystrophy との形態的な比較検討を行う。
- 2) NPCマウス後索核の薄束核と楔状核の neuroaxonal dystrophy の出現頻度を定量的に比較検討する。
- 3) NPCマウスの脊髄後根について、その形態的な変化と脱落の程度を、経時的および定量的に検討する。

B. 研究方法

1) 光顕および電顕的観察

対象1：後索核

a) 3, 6, 9週齢の Balb/c npc マウス及びその正常対照 (n=4 または5)

b) 5, 10, 14月齢 Balb/c マウス (n=2)

対象2：腰髄後根神経 (L4+5)

方法：動物は経心的にグルタールパラホルムアルデヒド液で灌流固定し、同液で後固定の後、epon 包埋標本作製を行った。

2) 定量的検討

対象：腰髄 (L4+L5) 後根神経の epon 光顕標本

方法：パソコンに接続した顕微鏡よりデジタル画像を取り込み、画像解析ソフトウェア (Macscope, Mitani co. op) を用いて、以下の3項目について検討した。

a) 総有髄線維数 b) 総神経束面積

c) 軸索面積ヒストグラム

C. 研究結果

1) 正常 Balb/c マウスで老化に伴って後索核

に出現する neuroaxonal dystrophy は、9週齢までの対照群および5月齢マウスでは全く認められなかったが、10月齢、14月齢で散見された。

2) それらは、電顕的にNPCマウスの脊髄マウスの後索核で6週以降に認められる neuroaxonal dystrophy と同一の電顕形態な所見を示した。

3) 腰髄後根では、脱髄所見とともに、dystrophic な軸索を有する有髄線維が散見された。活動性の Waller 変性の所見は認めなかった。

4) Balb/d npc マウスの脊髄後根の総有髄線維数と総神経束面積は、いずれも9週齢で正常対照に比べ有意 ($p < 0.0005$) な減少を示した。

5) 軸索面積の histogram では、NPC群と対照群にあきらかなパターンの違いを認めなかった。

D. 考察

軸索の腫脹 (spheroid) はNPCの中枢神経系の特徴的な病理所見のひとつであるが、その発生機序や病的意義については未知の点が多い。我々は、後根神経節細胞の中枢側の軸索終末の形態変化について系統的な検索を進めてきた。その結果、薄束核では軸索の腫脹が前シナプス終末部に、既に3週齢から出現し、6, 9週ではその出現密度とサイズを増すとともに、電顕的に neuroaxonal dystrophy (NAD) に一致する形態変化を伴うことを明らかにした。一方、楔状核や脊髄後角ではこれらの変化は軽度であり、このことから spheroid の形成は軸索の長さに依存していることが示唆された。

今回は、正常マウスの後索核の NAD の出現時期と、その電顕形態を、NPCのそれと比較検討した。その結果、正常の老化では5ヶ月齢までは後索核 NAD の出現は認められず、10ヶ月齢以降の後索核で NAD を低頻度に認めた。電顕形態的に、これらはNPCマウスの後索核の NAD と同一の形態的な特徴を示していた。このことから、NPCマウスの後索核では、極めて早期から老化性的変化が出現していると結論され

る。さらに、脊髄後根の有髄線維の定量的な検討を行った。その結果、6週齢では対照群と有意差がなく、9週齢になり対照群に比べて有意な神経線維数の減少を認めた。後根の数は後根神経細胞数と1:1に対応すると考えられるので、後根神経細胞がNAD形成に継起して変性脱落することが強く示唆された。後索核の正常老化過程でのNADの形成には、軸索輸送の障害が想定されている。以上の所見は、NPCのspheroidの形成機序として軸索輸送の障害があり、神経変性機序のひとつである可能性を示唆するものと考えられた。

E. 結論

NPCマウスの後索核には正常の老化過程に比べて極めて早期からneuroaxonal dystrophyが出現する。それは形態的には、老化に伴うneuroaxonal dystrophyと同一であり、脊髄後根の変性脱落を伴っている。NPCの神経変性の機序として軸索輸送の障害が示唆される。

G. 研究発表

Ohara S, Ukita Y, Ninomiya H, Ohno K. Neuroaxonal dystrophy of the dorsal root sensory neurons in Niemann-Pick type C model mouse. *Neurology suppl.* 2003 in press

厚生労働科学研究費補助金（神経回路網形成障害の分子機構に関する研究事業）
(H12-こころ-009)
(分担) 研究報告書

Nieman-Pick disease type C の前角細胞内蓄積物質の超微形態：ヒトとマウスでの比較検討

研究協力者：大浜栄作 鳥取大学医学部附属脳幹性疾患研究施設脳神経病理部門

研究要旨：Nieman-Pick disease type C (NPC) のヒト剖検例（3歳8ヶ月）とそのモデルマウス（NPC^{mh} マウス）（9週）の脊髄前角細胞内蓄積物質の超微形態学的特徴について検討した。細胞内蓄積物質の超微形態像は、ヒト NPC と NPC^{mh} マウスとは基本的に同一であり、membranous structure、vesicle-like structure、rose flower structure、membranous cytoplasmic body (MCB)-like structure の4種類の形態を呈した。ヒト NPC においては、MCB-like structure が最も高頻度に観察され、NPC^{mh} マウスにおいては、rose flower structure が最も多く認められた。この偏りは、細胞内蓄積物質の形成にヒトとマウスにおける前角細胞の代謝過程の相違が関与していると推測された。

共同研究者：加藤信介¹、楊 春慧¹、鈴木倫毅²、
二宮治明²、加藤雅子³、大野耕策⁴

¹ 鳥取大学医学部附属脳幹性疾患研究施設脳神経病理部門、² 鳥取大学医学部神経生物学、³ 鳥取大学医学部附属病院病理部、⁴ 鳥取大学医学部附属脳幹性疾患研究施設脳神経小児科部門

A. 研究目的

ヒトの Niemann-Pick disease type C (NPC) は、sphingomyelinase の欠損を伴わない、18 番染色体上の NPC1 の遺伝子異常に基づく cholesterol の carrier protein 欠損病である。また、そのモデル動物である NPC^{mh} マウスも NPC1 遺伝子にレトロポゾンを挿入させて、NPC1 遺伝子を分断させたマウスであり、ヒトの NPC と遺伝子レベル上は同一の異常を有する。中枢神経系では、ヒト NPC も NPC^{mh} マウスも、脊髄は主病変部の一つであり、脊髄前角細胞は、細胞内蓄積物質が異常に存在することにより顕著な ballooned neuron として認められる。本研究は、NPC のヒトおよびモデルマウスにおける脊髄前角細胞内蓄積物質の超微形態学的比較検討を行うことにより、NPC にお

ける細胞機能障害の分子機構を解明することを目的とする。

B. 研究方法

NPC のヒトとそのモデルマウスの脊髄を使用した。ヒトは3歳8ヶ月症例で、臨床的、生化学的、病理学的に NPC と診断された症例である。マウスは NPC^{mh} の、end stage に相当する9週齢を使用した。これら脊髄を光顕用に paraffin 包埋し、routine 染色として HE、HE-Luxol fast blue 二重染色、Klüver-Barrera の各染色を施行した。また、電顕用として、頸髄と腰髄を epon 包埋し、uranyl acetate と lead citrate の二重染色を施し、電顕検索に供した。

C. 研究結果

9 週齢 NPC^{mh} マウスの脊髄光顕像は、routine 染色でも、1 μ m Epon toluidin blue 染色でも、核は偏在し、胞体は腫大した ballooning を起こした脊髄前角細胞が認められた。細胞内蓄積物質は多数の小空胞として、あるいはそれが集合して、胞体全体に蓄積していた。

NPC^{mh} マウスの前角細胞内蓄積物質の超微形態

像では、蓄積物質をいれた空胞は limiting membrane が一部で認められるところも存在したが、認められないところもあった。空胞内蓄積物質の超微形態は、バラの花様(rose flower structure)を示しているものが最も多く観察された。即ち、何枚かの membrane 様構造物(membranous structure)が幾重にも順に被さって生じた像を示していた。また、一枚の membranous structure や一枚の membrane が完全な球体を形成した vesicle 様構造物(vesicle-like structure)の像も比較的容易に観察できた。少数ではあったが、membranous cytoplasmic body (MCB)と呼ばれる完全な全周性を示す同心円状の構造物も認められた。また、9週齢の NPC^{md} マウスの前角には、光顕的には細胞死への process 上にあると考えられる atrophic dark neuron が時々観察された。この neuron は、電顕的には electron dense neuron として観察され、核はほぼ胞体と同質化し、また胞体内の micro-organellae は、一部の endoplasmic reticulum 以外はほとんど認められなかった。即ち、形態学的観点からは、機能できない状態と考えられた。また、細胞内蓄積物質も多数存在していた。その超微形態像は rose flower structure が主体であり、ballooned neuron のそれと同一であった。即ち、細胞死を迎えている neuron でも、細胞内蓄積物質の超微形態には変化がみられなかった。

ヒト NPC の脊髄前角細胞の光顕像は、NPC^{md} マウスのそれと同一であったが、胞体の腫大化(ballooning)がより顕著で、細胞内蓄積物質は、偏在した核周辺部より、胞体辺縁部に高度に蓄積していた。ヒト NPC の超微形態学的検索では、蓄積物質を囲む空胞の limiting membrane は、マウス NPC^{md} のそれと全く同一で、一部分観察される場所もあったが、観察されないところもあった。ヒト NPC の空胞内蓄積物質の超微形態像は、MCB-like structure が最も多く認められ、vesicle-like structure も高頻度にみられ、membranous structure や rose flower structure も少数ながら観察された。ヒト NPC の脊髄前角細胞の核周辺部では、蓄積物質として、MCB-like structure と

membranous structure が見られたが、limiting membrane ははっきりしなかった。細胞体辺縁部への移行部位では、MCB-like structure や vesicle-like structure がみられた。この vesicle-like structure には中に osmiophilic fuzzy material が入っているものもあった。細胞内蓄積物質の最も多く存在している細胞体辺縁部では、蓄積物質を入れた空胞は一部では融合していたが、多くの空胞は独立して密に充満していた。空胞が集合して密集した部位では、MCB-like structure 以外に、vesicle-like structure や rose flower structure も認められた。

D. 考察

ヒト NPC の細胞内蓄積物質も NPC^{md} マウスのそれも membrane の主構成成分である cholesterol が蓄積されるため、メカニズムは不明であるが、恐らくこの蓄積された cholesterol を原料として、基本的には membranous structure が形成されたものと考えられた。この membranous structure が三次元的には球体を形成すれば vesicle structure として観察され、三次元的に緩やかに幾重にも重なり非全周性の球体を形成すれば、rose flower structure として、また、密に重なり完全な全周性同心円を形成する球体を形成すれば、MCB-like structure として認められると考えられた。従って、基本的には細胞内蓄積物質の超微形態像は、ヒト NPC と NPC^{md} マウスとは同一であったが、ヒト NPC では、MCB-like structure が最も多く観察され、NPC^{md} マウスでは、rose flower structure が最も多くみられ、ヒトとマウスでは、structure の偏りが認められた。このことは、NPC1 遺伝子異常という同一の pathogenesis による cholesterol の蓄積が生じるにもかかわらず、ヒトでは生後3年8ヶ月、NPC^{md} マウスでは9週という生存期間の長短、あるいは種による前角細胞の代謝過程の相違が関与していることが推測された。

E. 結論

ヒト NPC と NPC^{md} マウスにおける脊髄前角細胞内蓄積物質の超微形態学的特徴は、membranous

structure, vesicle-like structure, rose flower structure, MCB-like structure の4種類の同ースペクトラム形態を呈した。ヒト NPC においては、MCB-like structure が最も高頻度に観察され、NPC^{mb} マウスにおいては、rose flower structure が最も多く認められた。

F. 健康危険情報；なし

G. 研究発表

論文発表

1. Kato S., et al. *Acta Neuropathol.* 104: 57-66, 2002

2. Sumi-Akamaru H., et al. *Acta Histochem. Cytochem.*

35(1): 33-38, 2002

3. Yamashita S., et al., *Neuroscience Lett.* 328:289-293, 2002

4. Umahara T., et al., *Neuropathology* 22:9-12, 2002

5. Amin MR., et al., *Brain Tumor Pathol.* 19:5-10, 2002

6. Morita T. et al., *Canadian J. Vet. Res.* 66:35-41, 2002

7. 大浜栄作、松末英司 化学療法の領域
18(5):685-690, 2002

8. 川島真里子、大浜栄作 米子医学雑誌53:181-192,
2002

H. 知的財産権の出願・登録状況；なし

厚生科学研究：神経回路網形成障害の分子機構に関する研究
(H12-こころ 009)
研究報告書

研究協力者 難波栄二 鳥取大学遺伝子実験施設助教授

研究要旨

脳回路網形成障害の分子機構を検討するにあたり、我々は先天代謝異常に着目し、患者の遺伝子変異と分子機構の関連を解明するシステムの構築を目指した。本年度は、PCR-SSCP を用いて遺伝子変異を効率よく同定する方法を確立し、ニーマンピック病 C 型において、3 種類の新規あるいは既知の変異を同定した。このシステムは結節性硬化症を含む多くの神経疾患の遺伝子解析に応用可能であり、今後分子機構の解明を行う上で重要な方法となる。

A. 研究目的

我々はニーマンピック病や結節性硬化症の遺伝子解析を行ってきた。ニーマンピック病においては、17 名の患者より 21 の変異を報告し、結節性硬化症については、TSC1 遺伝子 11 種類、TSC2 遺伝子 23 種類の変異を報告してきた。現在までに、多くの遺伝子変異が発見されている、しかし新しい患者さんの診断のニーズは常に存在している。さらに、多くの神経疾患における遺伝子診断の要望が強くなってきている。これら疾患の遺伝子診断では、多くの場合変異のホットスポットがないことから、すべてのエクソンを解析する必要がある。そのためには、研究レベルではなく診断システムとして効率的のシステムを構築することが重要にな

る。今回は、ニーマンピック病 C 型をモデルにテクニシャンレベルで効率的に遺伝子解析を行うシステムの検討を行った。

B. 研究方法

材料：3 例の患者さん（ニーマンピック病 C 型）の末梢血から採取して DNA を用いた。

方法：NPC1 遺伝子は 25 全エクソンをカバーするプライマーをそれぞれ設計し（表 1）、合計 29 のフラグメントに分割して解析した。ゲノム DNA200ng をバッファー、250 μ M dNTPs、各プライマー 1 μ M、Taq gold 1 μ l を含む 10 μ l の溶液を作成し、PCR を行った。PCR の反応条件は、95 $^{\circ}$ C で 5 分間初期酵素活性化を行い、変性 95 $^{\circ}$ C 1 分、アニーリング 55 $^{\circ}$ C 1 分、伸長 72 $^{\circ}$ C 5 分の 35 サイクルと

した。

SSCP (single strand conformation polymorphism)

PCR 産物 5 μ l と変性剤 1 μ l を混合し泳動サンプルとした。ゲルは 18%ポリアクリルアミドゲル、あるいは 5%グリセロール入り 18%ポリアクリルアミドゲルを用いた。泳動条件は 150V、15°C 18 時間あるいは 4°C 24 時間とし、1 サンプルあたり合計 4 条件で検討した。

ダイレクトシーケンシング

SSCP により差を検出したエクソンは、ダイレクトシーケンシングを行った。PCR 産物を精製し、ABI 3100 Genetic Analyzer (ABI) を用い解析した。

(倫理面での配慮)

診断のためにインフォームドコンセントを得て、患者さんの末梢血をいただいた。

C. 研究結果

テクニシャン 1 人で、1 週間あたり 2 条件 (15°C、4°C) で合計 480 サンプルの解析が可能であった。解析した NPC 患者 3 名より 3 種類の変異を同定した (表 2)。それらは、既知変異エクソン 24 の 3615(-3618)A 欠失(図 A)、新規変異イントロン 23 の (IVS23+1 G to A) (図 B)、新規変異エクソン 25 のアミノ酸置換 R1266Q(3797G to A) (図 C)をであっ

た。さらに 6 種類の多型も同定した。正確かつ多くの遺伝子変異を同定するためには、システム化と検出度を上げる必要がある。今回の検討では、室温での温度を一定化すること、ゲルの成分により、泳動度を変化させること、さらに泳動時間の改善により従来行っていた方法に比べ検出度を上げることができた。

D. 考察

これまでに我々は NPC1 遺伝子変異について、約 20 の変異を報告してきた。しかし、変異を同定することができない例を経験している。SSCP 法はプライマー近傍の異常の検出が難しいとされ、また条件によっても検出率が異なる。このために、今回は 18%という比較的硬いゲルを用いて長時間電気泳動を行うことにより、異なる塩基配列バンドの移動度の差をできるだけ大きくする工夫を行った。我々の方法は、簡便な銀染色を利用しているために、比較的安価でテクニシャン一人当たり 480 もの解析を一週間で行えるシステムを構築できた。これにより、一週間以内で 1 人の解析を行うことも可能である。また、今回の検討で変異が検出できなかったのは、プロモーター領域やイントロンの変異による可能性もある。これはエクソンイントロン境界以外のイントロン内の異常によりスプライス異常を示す例も報告されており、今後の検討課題になる。

近年、SSCP よりもさらに検出感度

が高く効率的とされる Denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC)法なども開発されており、この方法も含めてさらに検討を行ってゆく予定である。

最後に、この方法を多くの疾患に対して応用し、システムとして維持していく為には、研究としてではなく、高度先進医療などの医療システムとして定着させていかなければならない。

E. 結論

PCR-SSCP を用いた遺伝子診断システムを確立した。この方法を用い従来の方法よりも高精度に遺伝子変異を同定することができると考えられた。今度さらに多くの疾患に応用していき、分子機構の解明と臨床応用をすすめる必要がある。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 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
2. Saito Y, Suzuki K, Nanba E, Yamamoto T, Ohno K, Murayama S. Niemann-Pick type C disease: accelerated neurofibrillary tangle formation and amyloid beta deposition associated with apolipoprotein E ϵ 4 homozygosity. *Ann Neurol.* 52:351-355. 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 NPC1 遺伝子解析のためのプライマー

exon1F: CTGAAACAGCCCGGGGAAGTAG	exon12F: AAGTTTCTTACTTAGCTGTCAG
exon1R: GCCTGAGCCGTCGCTGGGCC	exon12R: GACGTTACACTGTGCACTGC
exon2F: ACCATTGAGACCCTGGTAAC	exon13F: AAGTGGGACAGACAACCCTG
exon2R: CATTTTGTGTTCCAGTGCC	exon13R: GGAGCCATTACAGTCCCTG
exon3F: GACCTTACTCTAACTGTTGCC	exon14F: CAAGGCAGCAAGAAATGGCG
exon3R: CACAAGTATCTACAGCCCAG	exon14R: CATGTTCAAGGTAGCCAGCTCCTTC
exon4F: CTGCTGGCCCTATTATGTGTG	exon15F: GAACATAAGACCTGCAGAGAGC
exon4R: CAATTTGCTCTGCTGTCCTG	exon15R: CCGCTAGCTGCTTCCTCTAG
exon5F: CCTCGTGAATTACAGCAAGC	exon16F: CTAGAGGAAGCAGCTAGCGG
exon5R: GCAATTCTCTGCCTCAGTC	exon16R: TCCTTCCCAGGCTGTCTGGC
exon6aF: ATTCCATAGGACGAAGCAGC	exon17F: TGTACTCCCTATTAGCTGTC
exon6aR: CATACTGGCGTCCAAGCCAAG	exon17R: CTTGCTTGAAACACCTACGTGC
exon6bF: GACTGCTCTATTGTCTGTGGC	exon18F: CTTATTCTCCRTGATCCTCGC
exon6bR: CCATGCAATGGTATTCATGGAGG	exon18R: CAGTGAGACATTCAGGCCTG
exon7F: GAAGGCAGTAATTAGGGAGG	exon19F: AGACTTCCCTCCCTGTGGAGC
exon7R: TGCAACCCCACTGAGGAAACG	exon19R: GGTATAAACTGAGGCACGATGC
exon8aF: GTTCCGACTTTCAGGAACGGC	exon20F: GTAATGCCCCCTCACTGTGAG
exon8aR: GGGTTTCGGACGCAGAAAGAC	exon20R: GTCTTAGCCCAGTCCTCTCC
exon8bF: CAGCATTTGAGGGCTGCTTGAG	exon21F: AATGTACAGCTGGGTCTGACC
exon8bR: GTCCAAAGGGTACATCAGCTCC	exon21R: CAGTGTAGGCCCTTTGCTGG
exon8cF: CCCCTCTCACTGACAAACAC	exon22F: TGTTCCGGGAGTGAGAGCGAGC
exon8cR: AGCCCCAAATCCCCATCTAGC	exon22R: ATGGAATCTAAGACAGCCAATTCC
exon9aF: ATTCTCTCCCTCATCTIAGG	exon23F: AGCACCCATCCTCAGAACGG
exon9aR: CTTTCTTGTGGTCCAGCACG	exon23R: CTCTTCAGCCAGTGACCAGG
exon9bF: CTTCAAGACATCTGCTTGGC	exon24F: CAATTACAGGTTGGTAAAAGTGG
exon9bR: GTAAACTTCACAGGGCAAGG	exon24R: ATGTCCTTCCATTGTGCCACC
exon10F: AGGGCCCATGTTGTCCTTAG	exon25F: TGAGCCACTATGCCAGCCAAC
exon10R: TGATGCTAATGACAAAACCGAG	exon25R: GACACAGTTCAGTCAGGATG
exon11F: GAGATACAGTCCATAGCTCC	
exon11R: AAGTGCTTGCTGCAAGTGTC	

表 2 NPC 遺伝子解析のまとめ

patient	Int23	G→G/A	splicing error	Cmpd
	24	3615(-3618)A	aa1205 frameshift -	
patient	24	3615(-3618)A	aa1205 frameshift -	Cmpd
patient	25	3797G→G/A	R1266Q	Cmpd

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
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
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 ϵ 4 hmomozygosity	Ann Neurol	52	351-355	2002
Yamamoto T, Pipo J R, Heng J-H, Takeda H, Nanba E, Maegaki Y, Ninomiya H and Ohno K	Novel TSC1 and TSC2 mutations in Japanese patients with tuberous sclerosis complex	Brain Dev	24	227-230	2002
Hosokawa H, Ninomiya H, Kitamura Y, Fujiwara K and Masaki T	Vascular endothelial cells that express dystroglycan are involved in angiogenesis	J Cell Sci	115	1487-1496	2002
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
Oide T, Ohara S, Yazawa M, Inoue K, Itoh N, Ikeda S	Progressive supranuclear palsy with asymmetric tau pathology presenting with unilateral dystonia	Acta Neuropathologica	104	209-214	2002
Ohara S, Tsuyuzaki J, Oide T, Arai H, Hasegawa M, Iwatubo T	A clinical and pathological study of an unusual case of sporadic tauopathy. A variant of corticobasal degeneration?	Neurosci Lett	330	84-88	2002
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
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
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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Kato S, Shinozawa T, Nagashige H, Nakamura M, Asano Y, Takikawa M, Kato M, Awaya A, Hirano A, Ohama E	Monoclonal antibody to stage-specific fetal brain 68-kDa glycoprotein (FGP68) revealed increased FGP68 expression in human primary brain tumors	Acta Neuropathologica	104 (1)	57-66	2002
Sumi-Akamaru H, Fujimura H, Kato S, Takayasu S, Eto M, Ohama E, Sakoda S	Immunohistochemical analysis of copper chaperone for superoxide dismutase in mouse central nervous system; a comparative study with paraffin and frozen section	Acta Histochem Cytochem	35 (1)	33-38	2002
Yamashita S, Mita S, Kato S, Okado H, Ohama E, Uchino M	Effect on motor neuron survival in mutant SOD1(G93A) transgenic mice by Bcl-2 expression using retrograde axonal transport of adenoviral vectors	Neuroscience Letters	328 (3)	289-293	2002
Umahara T, Tsuchiya K, Ikeda K, Kanaya K, Iwamoto T, Takasaki M, Mukai K, Shibata N, Kato S	Demonstration and distribution of tau-positive glial coiled body-like structures in white matter and white matter threads in early onset Alzheimer's disease	Neuropathology	22 (1)	9-12	2002
Amin MR, Kamitani H, Watanabe T, Ishibashi M, Ogawa T, Funakoshi T, Miyata H, Ohama E	A topographic analysis of the proliferating tumor cells in an autopsied brain with infiltrative thalamic glioma	Brain Tumor Pathology	19 (1)	5-10	2002
Morita T, Shimada A, Takeuchi T, Hikasa Y, Sawada M, Ohiwa S, Takahashi M, Kubo N, Shibahara T, Miyata H, Ohama E	Cliniconeuropathologic findings of familial frontal lobe epilepsy in Shetland sheepdogs	The Canadian Journal of Veterinary Research	66 (1)	35-41	2002
大野耕策、山下克子、湯浅 勲	先天性グリコシル化異常症	細胞	34	12-15	2002
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
大浜栄作、松末英司	ニューバリエントクロイツフェルト・ヤコブ病の病理	化学療法領域	18 (5)	685-690	2002
川島麻里子、大浜栄作	進行性核上性麻痺における pretangle および tuft-shaped astrocyte の病理学的意義：免疫組織化学的および形態計測的研究	米子医学雑誌	53 (3)	181-192	2002

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
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
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	2003
Kitamura Y and Ninomiya H	Smad expression of hepatic satellite cells in liver cirrhosis in vivo and hepatic satellite cell lines in vitro	Pathol Int	53	18-26	2003
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	45	285-296	2003
上野 誠、大野耕策	Niemann-Pick 病 C 型での JAK/STAT シグナル伝達系の恒常的活性化	米子医誌 J Yonago Med Ass	54	17-32	2003
Sugii S, Reid P C, Ohgami N, Shimada Y, Maue R A, Ninomiya H, Ohno-Iwashita Y and Chang T Y	Biotinylated θ toxin derivative as a probe to examine intracellular cholesterol-rich domains in normal and Niemann-Pick type C1 cells	J Lipid Res		in press	
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	
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	
Ohara S, Ukita Y, Ninomiya H, Ohno K	Neuroaxonal dystrophy of the dorsal root ganglion sensory neurons in Niemann-Pick type C model mouse	Neurology suppl		in press	
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		in press	

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
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		in press	
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		in press	

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	ページ	出版年
大野耕策、小倉加恵子	Prader-Willi 症候群の精神運動発達の特徴 1. 知的障害と認知障害	藤枝憲二	Prader-Willi 症候群 - 臨床からケアまで -	診断と治療社	東京	67-74	2002

20020898

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.34- P.37の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。