

200936256A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

那須ハコラ病の臨床病理遺伝学的研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤 準一

平成22年(2010)年3月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

那須ハコラ病の臨床病理遺伝学的研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤 準一

平成22年(2010)年3月

目 次

I. 総括研究報告

那須ハコラ病の臨床病理遺伝学的研究 ----- 1

明治薬科大学 佐藤 準一

(資料-1) 那須ハコラ病診断基準

(資料-2) 那須ハコラ病全国調査アンケート用紙

(資料-3) 那須ハコラ病疾患概要

(資料-4) 研究班名簿

II. 分担研究報告

那須ハコラ病の創薬研究:細胞移植治療の実現へ向けての課題 ----- 23

明治薬科大学 佐藤 準一

那須ハコラ病の創薬研究:

FTY720のヒトミクログリアに対する細胞傷害活性の検討 ----- 33

明治薬科大学 天竺桂 弘子

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 43

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 45

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業

平成 21 年度 総括研究報告書

那須ハコラ病の臨床病理遺伝学的研究

研究代表者 佐藤 準一 明治薬科大学教授

研究要旨 那須ハコラ病(Nasu-Hakola disease; NHD)は、1970 年代初頭に那須毅博士と Hakola 博士により最初に報告された多発性骨嚢胞と白質脳症を主徴とする常染色体劣性遺伝性疾患である。DAP12 または TREM2 遺伝子の機能喪失変異により発症する稀少疾患であり、有効な治療法のない難病である。本邦では現在まで疫学的実態調査はなく、正確な患者数は把握されていない。DAP12 は脳ではミクログリアの細胞膜に発現し TREM2 と会合し、ITAM モチーフを介してシグナルを伝達するアダプター分子である。DAP12 機能喪失に基づく白質脳症発症機構は明らかでない。われわれは 2006 年より全国神経内科専門施設から検査依頼を受け、文書同意を取得した NHD 患者の DAP12 遺伝子解析を行い、エクソン 1, 3, 4 の新規遺伝子変異を見出していた。本研究では、(1)本邦における NHD 患者数把握のため、NHD 診断基準を作成し、全国の神経内科・精神科・整形外科教育研修施設 4071 カ所を対象に臨床病理遺伝学的項目に関するアンケート調査を行い、NHD データベースを作成する、(2) DAP12 機能喪失ヒト脳ミクログリア創薬モデル系を樹立し、GeneChip による網羅的遺伝子発現解析と KeyMolnet による分子ネットワーク解析により、創薬標的分子を発見する、(3) NHD 患者剖検脳組織を免疫組織化学的に解析し、脳分子病態を解明することを目的としている。現在まで国内外を通じ、類似の研究はなく、本研究の成果は厚生労働行政を主導とする NHD 診断治療ガイドライン作成や患者の QOL 向上につながり、さらにはアルツハイマー病など多くの認知症疾患の早期診断法やテラメイド治療法の樹立にも貢献し得る。

研究分担者

天竺桂 弘子 (明治薬科大学薬学部バイオインフォマティクス 助教)

A. 研究目的

那須ハコラ病(Nasu-Hakola disease; NHD)は、1970 年代初頭に那須毅博士と Hakola 博士により発見された多発性骨嚢胞(multiple bone cysts)と白

質脳症(leukoencephalopathy)を主徴とし、常染色体劣性遺伝性形式を呈し、日本とフィンランドに集積している稀少疾患で、硬化性白質脳症を伴う多発嚢胞性脂肪膜性骨異形成症 polycystic lipomembranous osteodysplasia with sclerosing encephalopathy; PLOSL) と呼ばれている(Nasu T et al. Acta Pathol Jpn 23: 539-558, 1973; Hakola HP. Acta Psychiatr Scand Suppl 232: 1-173, 1972)。

近年 NHD では 19q13.1 染色体上の DNAX-activation protein 12(DAP12)遺伝子または 6p21.1 染色体上の triggering receptor expressed on myeloid cells 2(TREM2)遺伝子の機能喪失変異が発見され、疾患単位(OMIM 221770)として確立した(Paloneva J et al. Am J Hum Genet 71: 656-662, 2002)。病期は以下の 4 期に区分される。(1)無症候期(20 歳代まで), (2)骨症状期(20 歳代以降):長管骨の骨端部に好発する多発性骨嚢胞と反復する病的骨折, (3)早期精神神経症状期(30 歳代以降):脱抑制・多幸症・人格障害・言語障害などの前頭葉症候・てんかん発作, (4)晩期精神神経症状期(40 歳代以降):進行性の認知症を呈する(Klünemann HH et al. Neurology 64: 1502-1507, 2005)(資料-3)。しかしながら、本邦では現在まで疫学の実態調査はなく、正確な患者数は把握されていない。

DAP12(TYRO protein tyrosine kinase binding protein; TYROBP)は、ナチュラルキラー細胞・樹状細胞・破骨細胞・マクロファージ・ミクログリアの細胞膜に発現し TREM2 と会合し、immunoreceptor tyrosine-based activation motif(ITAM)を介してシグナルを伝達するアダプター分子である。DAP12 欠損マウスでは視床髄鞘低形成を認めるが(Kaifu T et al., J Clin Invest 111:323-32, 2003), NHD における白質脳症の発症機序は明らかでない(Paloneva J et al. Neurology 56: 1552-1556, 2001)。

われわれは 2006 年より、国立精神・神経センター免疫研究部山村隆部長との共同研究で、全国神経内科専門施設から検査依頼を受け、文書同意を取得した NHD 患者の DAP12 遺伝子解析を行い、エクソン 1, 3, 4 の新規の遺伝子変異を見出

し報告した(Kuroda R, Satoh J et al. J Neurol Sci 252: 88-91, 2007; GenBank Accession No. AB280796, AB280795, AB361433)。NHD の診断は、2000 年に責任遺伝子 DAP12, TREM2 の変異が発見されて遺伝子診断が確立されるまでは、病理診断に頼るしかなく、正確な患者数の把握は非常に困難であった。さらに臨床診断基準もなく、専門医でもしばしば正確な診断は難しく、統合失調症・若年性アルツハイマー病・骨代謝異常症として誤診されているケースも多い。

本研究の研究組織は、研究代表者佐藤準一、研究分担者天竺桂弘子、研究協力者有馬邦正から構成されている(資料-4)。本研究では、(1)本邦における NHD 患者数把握のため、NHD 診断基準を作成し、全国の神経内科・精神科・整形外科教育研修施設を対象に臨床病理遺伝学的項目に関するアンケート調査を行い、患者の実態を把握して NHD データベースを確立する、(2) DAP12 機能喪失ヒト脳ミクログリア創薬モデル系を樹立し、GeneChip による網羅的遺伝子発現解析と生物情報統合プラットフォーム KeyMolnet(医薬分子設計研究所)(Satoh J et al. Mult Scler 15: 531-541, 2009)による分子ネットワーク解析により、創薬標的分子を発見する、(3) NHD 患者剖検脳組織を免疫組織化学的に解析し、脳分子病態を解明することを目的としている。現在まで国内外を通じ、類似の研究はなく、本研究の成果は厚生労働行政を主導とする NHD 診断治療ガイドライン作成や患者の QOL 向上につながり、さらにはアルツハイマー病など多くの認知症疾患の早期診断法やテラメイド治療法の樹立にも貢献し得る。

B. 研究方法

1. NHD 診断基準の作成と全国アンケート調査:過去の症例報告(1972年-2009年)から臨床所見の特徴を精査し、専門的知識のない一般臨床医でも容易に診断可能となるようなNHD診断基準を作成した(資料-1)。

全国の神経内科(日本神経学会)・精神神経科(日本精神神経学会)・整形外科(日本整形外科学会)教育研修施設4071カ所を対象に文書を郵送して、臨床病理遺伝学的項目に関するアンケート調査を実施した(資料-2)。

2. DAP12機能喪失ヒト脳ミクログリア創薬モデル系の樹立:ヒトミクログリア細胞株HMO6(Nagai A et al. Neurobiol Dis 8: 1057-1068, 2001)を10%FBS Dulbecco's MEMで、ヒト単球性白血病細胞株THP-1(Tsuchiya S et al. Cancer Res 42: 1530-1536, 1982)を10%FBS RPMI1640で培養した。HMO6, THP-1をphorbol ester (50 nM PMA), 50 ng/ml interferon-gamma (IFNG), 50 ng/ml lipopolysaccharide (LPS)で24時間刺激後にTRIZOLでRNAを抽出精製、LightCycler ST300 (Roche)によるreal-time RT-PCRでmRNA発現量を定量的に解析した。

GeneClip U1 Hairpin cloning system(Promega)を用いて、DAP12 siRNA発現ベクターとscramble oligonucleotide発現ベクターを作成し、Lipofectamine 2000(Invitrogen)を用いて培養細胞に導入した。

3. NHD患者剖検脳組織の免疫組織化学的解析:研究使用に対して文書同意を取得したNHD患者脳組織および他の神経変性疾患脳組織は、脳組織バンク Research Resource Network

(RRN)(責任者有馬邦正)を通じて提供された。これらの脳組織を用いて、DAP12, TREM2, CD68, IBA1の発現を免疫組織化学的に解析した。

(倫理面への配慮)

アンケートの結果は個人情報保護方針に基づき厳重に管理し、難治性疾患克服研究事業の遂行に限定して使用するよう配慮した。HMO6, THP-1は既存の培養細胞株であり、使用に当たり倫理的な問題はない。研究使用に対して文書同意を取得したヒト脳組織は、RRNを介して提供された。本研究でのゲノム解析研究は、明治薬科大学倫理委員会1904号「Nasu-Hakola病のDAP12ゲノム遺伝子解析」、脳分子病態解析研究は国立精神・神経センター倫理委員会(19-2-事7)および国立国際医療センター倫理委員会(657)の承認を得ている。

C. 研究結果

1. NHD診断基準の作成と全国アンケート調査

NHD診断基準(資料-1)を作成し、Web上(www.my-pharm.ac.jp/~satoj/)で公開した。平成21年11月11日より、4071施設に対してアンケート調査を開始した。平成22年1月31日(締切)時点で1656施設から回答を得た(回答率41%;患者29名;剖検8例)。従って、本邦における患者数は約200人(患者数29x回収率補正2.5x病院数補正3.5;20-40歳代に集積)と推定された(表1;図1)。2施設からは遺伝子解析の依頼があり、DAP12, TREM2遺伝子解析を施行し、1例では本邦初のTREM2変異を同定した。最終的な集計結果は、平成22年5月の第51回日本神経学会総会で報告する予定である。

2. DAP12 機能喪失ヒト脳ミクログリア創薬モデル系の樹立

RT-PCR により、ヒト大脳(CBR), NTera2 由来神経細胞(NTera2N), 神経前駆細胞由来アストロサイト(AS), ヒトミクログリア HMO6, THP-1, 末梢血単核細胞(PBMC)における DAP12, TREM2, TREM1, IBA mRNA の発現を解析した。DAP12 と TREM2 は、CBR, THP-1, PBMC で高発現を認めた(図 2)。一方 HMO6 は TREM1 を高発現していたが、DAP12, TREM2 は発現していなかった。

Real-time RT-PCR で mRNA の発現量を定量的に解析した結果、THP-1 では PMA 刺激で DAP12 の発現が 6.4 倍、TREM2 の発現が 58 倍、interferon gamma-inducible protein 30 (IFI30) の発現が 47 倍上昇したが、HMO6 では DAP12 の発現上昇は見られず、TREM2 は発現レベルが微増したのみであった(図 3)。HMO6 は IFNG に応答して IFI30 を高発現したが、DAP12 と TREM2 は IFNG+LPS の刺激で発現レベルが微増したのみであった(図 4)。

DAP12 機能喪失ヒト脳ミクログリア創薬モデル系を樹立するために、現在 HMO6(DAP12-) に DAP12 遺伝子を導入した細胞株 HMO6(DAP12+) を継代培養中である。この細胞株が樹立されれば、DAP12 シグナル標的分子を同定するために、HMO6(DAP12-) と HMO6(DAP12+) の遺伝子発現プロフィールを Human Gene ST1.0 array (Sato et al. Cell Mol Neurobiol, 2009 in press) を用いて比較解析する予定である。

また本研究では、NHD 患者樹状細胞(DC)の遺伝子発現データ(GEO: GSE3624)に関して、バイオインフォマティクス手法を駆使して再解析した。

GSE3624 は 3 名の DAP12 EX1-4DEL 変異 NHD 患者と 2 名の TREM2 変異 (GLN33TER, VAL126GLY) NHD 患者および 3 名の健常者から PBMC を分離し、7 日間 20 ng/ml IL-4 と 10 ng/ml GM-CSF の存在下で培養することにより DC を誘導し、その遺伝子発現プロフィールを Human Genome U133A array で解析したデータセットである (Kiialainen A et al. J Mol Med 85: 971-983, 2007)。本研究では ANOVA $p < 0.001$, change > 2 -fold, delete no P signal genes の条件で 73 differentially expressed genes (DEG) を抽出し、TreeView 1.1.3 を用いて階層的クラスタ解析を行った。その結果、NHD DC 特異的に発現変動を認めた 73 遺伝子 SIGLEC1, AIF(IBA1), CTSK などを同定出来た(図 5)。また DAP12 変異 NHD 患者における TYROBP(DAP12) の発現欠如を確認出来た。

3. NHD 患者剖検脳組織の免疫組織化学的解析

アルツハイマー病脳組織を解析し、CD68 陽性ミクログリアにおける DAP12 発現を確認した(図 6)。また DAP12 141delG NHD 患者剖検脳組織(RRN を通じて兵庫中央病院陣内研二院長より分与された)を解析し、DAP12 染色欠如を確認し、HLA-DR 陽性 Iba1 陽性ミクログリアの集積を発見した(図 6)(投稿準備中)。また TREM2 の発現は少数のマクローファージに限られていた。これらの結果は、平成 22 年 8 月の 14th International Congress of Immunology で報告する予定である。

D. 考察

那須ハコラ病(NHD)は、1970 年代初頭に那須

毅博士と Hakola 博士により疾患概念が確立された多発性骨嚢胞と若年性進行性白質脳症を主徴とする若年発症認知症で、有効な治療法のない難病である。DAP12 または TREM2 遺伝子機能喪失変異による常染色体劣性遺伝形式を呈し、患者は日本とフィンランドに集積している。白質脳症の発症機序は不明である。これまで本邦では疫学的実態調査は行われていなかった。また NHD の診断は、2000 年に責任遺伝子 DAP12, TREM2 の変異が発見されて遺伝子診断が確立されるまでは、病理診断に頼るしかなく、正確な患者数の把握は非常に困難であった。さらに臨床診断基準もなく、専門医でもしばしば正確な診断は難しく、統合失調症・若年性アルツハイマー病・骨代謝異常症として誤診されているケースも多い。

本研究では初めて一般臨床医が利用可能な平易な診断基準を作成した。また文書で実施した全国規模の臨床病理遺伝学的項目アンケート調査の結果より、本邦の患者数は約 200 人と推定出来た。現在データベースの完成作業中である。驚いたことに、30 施設は専門医であるにも関わらず、NHD を初めて聞いたと回答した。数施設からは遺伝子解析の依頼と遺伝病カウンセリングの問い合わせがあった。すなわち本研究は NHD の医療的認知度向上に貢献したと考えられる。またわれわれは国内で初めて TREM2 遺伝子診断を施行可能なように、検査体制を整備した。従って本研究の継続は、厚生労働行政を主導とする NHD 患者の QOL 向上につながり、さらにアルツハイマー病など多くの認知症を主徴とする難治性疾患の早期診断法やテーラメイド治療法の樹立にも貢献し得ると思われる。

本研究では NHD 脳病態を解明するため、剖検脳を免疫組織化学的に解析し、大脳における HLA-DR 陽性 Iba1 陽性ミクログリアの集積を初めて見出した(投稿準備中)。この所見は DAP12 遺伝子欠損マウスにおけるミクログリア数の減少(Otero K et al. Nat Immunol 10: 734-743, 2009)とは相反している。これらの差異は、ヒトとマウスの種差に起因している可能性がある。またマイクロアレイデータ GSE3624 を解析し、NHD マーカー遺伝子 AIF1(IBA1)を突き止めた。すなわち本研究により、正常脳では DAP12 はミクログリアに対して活性化抑制シグナルを伝達していることが明らかになった。現在創薬モデル系を開発するために、DAP12 機能喪失ヒトミクログリアの樹立を継続中である。また THP-1 細胞は DAP12, TREM2 の両者を発現し、PMA 刺激による単球への分化過程で、両者の発現がさらに上昇する事がわかり、NHD の創薬モデル系として利用出来る可能性があることが判明した。過去に国内外を通じて、那須ハコラ病創薬モデル系確立や治療薬開発を目指した研究はなく、本研究の学術的・国際的意義は高い。

E. 結論

本邦で初めて実施した全国規模の NHD 臨床病理遺伝学的項目アンケート調査の結果より、本邦の患者数は約 200 人と推定出来た。脳におけるミクログリアの異常活性化を阻止する薬を開発出来れば、創薬につながる可能性がある。

F. 健康危険情報

研究代表者佐藤準一および研究分担者天竺桂弘子の両者とも該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Satoh J, Obayashi S, Misawa T, Tabunoki H, Yamamura T, Arima K, Konno H: Neuromyelitis optica/Devic's disease: Gene expression profiling of brain lesions. *Neuropathology* 28 (6): 561-576, 2008.
2. Tabunoki H, Shimada T, Banno Y, Sato R, Kajiwara H, Mita K, Satoh J: Identification of *Bombyx mori* 14-3-3 orthologs and the interactor Hsp60. *Neuroscience Research* 61(3): 271-280, 2008.
3. Satoh J, Misawa T, Tabunoki H, Yamamura T: Molecular network analysis of T-cell transcriptome suggests aberrant regulation of gene expression by NF- κ B as a biomarker for relapse of multiple sclerosis. *Disease Markers* 25(1): 27-35, 2008.
4. Misawa T, Arima K, Mizusawa H, Satoh J: Close association of water channel AQP1 with amyloid-beta deposition in Alzheimer disease brains. *Acta Neuropathologica* 116(3): 247-60, 2008.
5. Satoh J, Obayashi S, Misawa T, Sumiyoshi K, Oosumi K, Tabunoki H: Protein microarray analysis identifies human cellular prion protein interactors. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 35: 16-35, 2009.
6. Satoh J, Tabunoki H, Yamamura T: Molecular network of the comprehensive multiple sclerosis brain lesion proteome. *Multiple Sclerosis* 15: 531-541, 2009.
7. Obayashi S, Tabunoki H, Kim SU, Satoh J: Gene expression profiling of human neural progenitor cells following the serum-induced astrocyte differentiation. *Cellular and Molecular Neurobiology* 29: 423-438, 2009.
8. Satoh J, Tabunoki H, Arima K: Molecular network analysis suggests aberrant CREB-mediated gene regulation in the Alzheimer disease hippocampus. *Disease Markers* 27(5): 239-252, 2009.
9. Sumiyoshi K, Obayashi S, Tabunoki H, Arima K, Satoh J: Protein microarray analysis identifies cyclic nucleotide phosphodiesterase as an interactor of Nogo-A. *Neuropathology* 30(1): 7-14, 2010.
10. Satoh J, Obayashi S, Tabunoki H, Wakana T, Kim SU: Stable expression of neurogenin 1 induces LGR5, a novel stem cell marker, in an immortalized human neural stem cell line HB1.F3. *Cellular and Molecular Neurobiology*, in press, 2009.
11. Shiina Y, Arima K, Tabunoki H, Satoh J: TDP-43 dimerizes in human cells in culture. *Cellular and Molecular Neurobiology*, in press, 2009.
12. Shioya M, Obayashi S, Tabunoki H, Arima K, Saito Y, Ishida T, Satoh J: Aberrant microRNA expression in the brains of neurodegenerative diseases: miR-29a decreased in Alzheimer disease brains targets neuron navigator-3.

Neuropathology and Applied Neurobiology, in press, 2010.

13. 佐藤準一: 免疫性神経疾患 Update. 多発性硬化症. 再発予測バイオマーカー. 日本臨床 66(6): 1103-1111, 2008.
14. 佐藤準一: DNA マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析. 進歩総説. ぶんせき 2: 75-83, 2008.
15. 佐藤準一: アレイインフォマティクスの進展. 薬学雑誌. 128(11):1537-1545, 2008.
16. 佐藤準一: ゲノムワイド解析により同定された多発性硬化症のリスクアレル. Medical Briefs in Brain & Nerve 17(1): 10-11, 2009.

2. 著書

1. 佐藤準一: プロトアレイによるタンパク質インターラクトーム解析. 創薬研究のためのタンパク質・プロテオミクス解析技術. 小田吉哉・長野光司編. 羊土社. 2010. 印刷中.

3. 学会発表

国際学会

1. Satoh J, Misawa T, Tabunoki H: Protein microarray analysis identifies the human cellular prion protein interactome. 60th Annual Meeting of American Academy of Neurology. Chicago, 2008. 4.17.
2. Satoh J, Misawa T, Obayashi S, Tabunoki H, Yamamura T, Arima K, Konno H: Gene expression profile of neuromyelitis optica brain lesions. 9th International Congress of Neuroimmunology. Poster Session: MS

pathogenesis and immunology. Fort Worth, 2008.10.27.

3. Misawa T, Arima K, Mizusawa H, Satoh J: Close association of AQP1-expressing astrocytes with amyloid-beta deposition in Alzheimer disease brains. 9th International Congress of Neuroimmunology. Poster Session: Neurodegenerative and paraneoplastic disorders. Fort Worth, 2008.10.28.
4. Obayashi S, Tabunoki H, Kim SU, Satoh J: Gene expression profiling of human neural progenitor cells following the serum-induced astrocyte differentiation. The JSPS 3rd Medicinal Chemistry Seminar of Asia/Africa Scientific Platform Program & the 2nd International Seminar of MPU Asia/Africa Center for Drug Discovery. Poster Presentation. Tokyo 2009.1.15.
5. Tabunoki H, Shimada T, Banno Y, Sato R, Kajiwara H, Mita K, Satoh J: Identification of Bombyx mori 14-3-3 orthologs and the interactor heat shock protein 60. The JSPS 3rd Medicinal Chemistry Seminar of Asia/Africa Scientific Platform Program & the 2nd International Seminar of MPU Asia/Africa Center for Drug Discovery. Poster Presentation. Tokyo 2009.1.15.
6. Satoh J, Tabunoki H, Yamamura T: Molecular network of the comprehensive multiple sclerosis brain lesion proteome. 61st Annual Meeting of American Academy of Neurology.

- Seattle, 2009. 4.28.
7. Satoh J, Obayashi S, Tabunoki H, Yamamura T: Molecular network of the comprehensive multiple sclerosis brain lesion proteome. The 8th International Workshop on Advanced Genomics. Tokyo 2009.6.17.
 8. Satoh J: Molecular network of the comprehensive multiple sclerosis brain lesion proteome. Second German-Japanese Neuroimmunology Symposium. Invited Lecture. Eibsee, 2009. 7.11.
 9. Satoh J: Molecular network of the comprehensive multiple sclerosis brain lesion proteome. Progress in MS Research Conference. MS Research Australia. Invited Lecture. Sydney, 2009. 10.15.
 10. Satoh J, Obayashi S, Tabunoki H: Molecular Network Analysis Suggests Aberrant CREB-Mediated Gene Regulation in the Alzheimer's Disease Hippocampus. The 20th International Conference on Genome Informatics. GIW2009. Yokohama, 2009.12.14.

国内学会

1. 有馬邦正、橋本洋二、坂元綾子、遠藤史人、大矢寧、村田美穂、佐藤準一: ミトコンドリア脳筋症の抗 14-3-3 タンパク抗体による免疫組織化学的研究. 厚生労働科学精神・神経疾患委託費 RRN 班. 平成 19 年度班会議. 東京 2008. 1.11.
2. 佐藤準一: アレイインフォマティクスの進展. 日本薬学会・日本学術会議薬学委員会共催シンポジウム, バイオインフォマティクスの薬学研究・薬学教育への応用と展開. 日本薬学会第 128 年会. 横浜, 2008.3.26.
3. 尾林信哉、住吉健太、大隅貴美子、三澤多真子、天竺桂弘子、佐藤準一: ヒト神経前駆細胞からアストロサイトへの分化を制御する転写因子 ID1 と DLL1. 日本薬学会第 128 年会. 横浜, 2008.3.27.
4. 大隅貴美子、住吉健太、尾林信哉、三澤多真子、天竺桂弘子、佐藤準一: ヒト神経系細胞におけるインターフェロンベータによる ISG15 化タンパク質の発現誘導. 日本薬学会第 128 年会. 横浜, 2008.3.27.
5. 住吉健太、大隅貴美子、尾林信哉、三澤多真子、天竺桂弘子、佐藤準一: プロテインマイクロアレイによる神経突起伸長抑制因子 NIG 結合タンパク質の網羅的解析. 日本薬学会第 128 年会. 横浜, 2008.3.27.
6. 天竺桂弘子、三澤多真子、伴野豊、嶋田透、三田和英、佐藤令一、佐藤準一: カイコ 14-3-3 タンパク質と HSP60 の結合. 日本薬学会第 128 年会. 横浜, 2008.3.27.
7. 椎名有葵、塩谷真央、三澤多真子、天竺桂弘子、佐藤準一: デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者における oxandrolone の分子機序: KeyMolnet による解析. 日本薬学会第 128 年会. 横浜, 2008.3.28.
8. 三澤多真子、天竺桂弘子、水澤英洋、村田美穂、有馬邦正、佐藤準一: 水チャンネル AQP1, AQP4 は神経変性疾患脳のアストログリアで高発現している. 第 20 回日本神経免

- 疫学会学術集会 新潟、2008. 4.17.
9. 三澤多真子、天竺桂弘子、水澤英洋、村田美穂、有馬邦正、佐藤準一: Alzheimer 病脳アストロサイトにおける AQP1 高発現. 第 49 回日本神経学会総会. 横浜、2008. 5.16.
 10. 佐藤準一、天竺桂弘子、三澤多真子、山村隆、有馬邦正、今野秀彦、南里悠介、黒田康夫: NMO 脳病巣の遺伝子発現プロフィール. 第 49 回日本神経学会総会. 横浜、2008. 5.17.
 11. 佐藤準一、三澤多真子、天竺桂弘子: ヒトプリオン結合タンパクの網羅的解析. 第 49 回日本神経病理学会学術研究会. 東京、2008. 5.20.
 12. 三澤多真子、天竺桂弘子、水澤英洋、村田美穂、有馬邦正、佐藤準一: Alzheimer 病脳アストロサイトにおける AQP1 高発現: 病態生理学的意義. 第 49 回日本神経病理学会総会. 東京、2008. 5.17.
 13. 佐藤準一、天竺桂弘子: プロテインマイクロアレイによるヒトプリオンタンパクインターラクトームの解析. 第 8 回日本タンパク質科学会年会. 東京、2008. 6.11.
 14. Satoh J, Obayashi S, Tabunoki H: Gene expression profiling of brain lesions of neuromyelitis optica. 第 31 回日本神経科学大会. Neuro2008. 東京、2008. 7.9.
 15. 佐藤準一: 脳病巣分子ネットワークから見た MS 治療の標的分子. 厚生労働科学こころの健康科学研究推進事業. 第 5 回多発性硬化症フォーラム. 医療講演会・研究成果発表会. 東京、2008.12.13.
 16. Satoh J, Obayashi S, Tabunoki H: Molecular network analysis of the comprehensive multiple sclerosis brain lesion proteome. 日本バイオインフォマティクス学会 2008 年会. 大阪、2008.12.15.
 17. 佐藤準一、住吉健太、尾林信哉、天竺桂弘子: 神経突起伸長抑制因子 Nogo 結合タンパク質 CNP. 第 21 回日本神経免疫学会学術集会 大阪、2009. 3.13.
 18. Satoh J, Obayashi S, Tabunoki H, Kim SU: Gene signature of human astrocyte differentiation in culture. 第 30 回神経組織培養研究会 湯河原、2009. 3.14.
 19. 尾出洋章、天竺桂弘子、嶋田透、伴野豊、三田和英、佐藤令一、佐藤準一: カイコ DJ-1 の cDNA クローニングと組織分布. 日本薬学会第 129 年会. 京都、2009.3.26.
 20. 椎名有葵、天竺桂弘子、佐藤準一: 培養ヒト細胞株における TDP-43 のダイマー形成. 日本薬学会第 129 年会. 京都、2009.3.27.
 21. 塩谷真央、尾林信哉、有馬邦正、佐藤準一: Alzheimer 病巣の microRNA 発現プロフィール. 日本薬学会第 129 年会. 京都、2009.3.27.
 22. 佐藤準一、天竺桂弘子、山村隆: MS 脳病巣プロテオームの分子ネットワーク解析. 第 50 回日本神経学会総会. 仙台、2009. 5.20.
 23. 佐藤準一、椎名有葵、天竺桂弘子、有馬邦正: ヒト培養細胞・脳組織のける TDP-43 のダイマー形成. 第 50 回日本神経病理学会学術研究会. 高松、2009. 6.5.
 24. Satoh J, Shiina Y, Tabunoki H: Constitutive

- dimer formation of TDP-43 in human cell lines. 第32回日本神経科学大会. Neuro2009. 名古屋、2009. 9.16. (Neuroscience Research : Suppl S 2009).
25. 佐藤準一:脳病巣の分子ネットワークから見た神経疾患の病態解析. 多発性硬化症とアルツハイマー病. 第10回神奈川免疫性脳・神経疾患研究会. 特別講演. 横浜、2009. 10.2.
26. 尾出洋章、天竺桂弘子、嶋田透、伴野豊、三田和英、佐藤令一、佐藤準一: カイコDJ-1のcDNAクローニングと細胞分布. 第82回日本生化学会大会. 神戸、2009.10.23.
27. 佐藤準一:多発性硬化症病変発現分子のネットワーク解析. 第37回日本臨床免疫学会総会. シンポジウム 2 ヒト免疫疾患研究の新展開-from clinic to bench. 招待講演. 東京、2009. 11.13.
28. 佐藤準一:T細胞活性化に対するIFNbetaの効果. 平成21年度厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業免疫修飾薬による多発性硬化症の治療成績向上を実現する探索的研究班. 平成21年度班会議. 東京 2010. 1.21.
29. 佐藤準一:脳疾患におけるmicroRNA発現の網羅的解析. 第83回日本薬理学会年会. シンポジウム 各種疾患とmicroRNA: 創薬ターゲットとしての可能性. 大阪、2010. 3. 16.
30. 佐藤準一、藤本幸太、吉野隆、天竺桂弘子: 遺伝子発現プロファイルから見たT細胞活性化に対するIFNbetaの効果. 第22回日本神経免疫学会学術集会 東京、2010. 3.18.
31. 吉野隆、天竺桂弘子、杉山重夫、石井啓太郎、Seung U. Kim, 佐藤準一:培養ヒトマイクログリアにおけるFTY720のアポトーシス誘導能. 日本薬学会第130年会. 岡山、2010.3.28.
32. 小口翔、Raveney BJE, 大木伸司、天竺桂弘子、佐藤準一、山村隆:合成レチノイド Am80はTh17依存性眼炎症を抑制し、Foxp3陽性T細胞を誘導する. 日本薬学会第130年会. 岡山、2010.3.28.
33. 天竺桂弘子、尾出洋章、嶋田透、伴野豊、三田和英、佐藤令一、佐藤準一:カイコDJ-1の抗酸化作用. 日本薬学会第130年会. 岡山、2010.3.30.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

なし

区分	No.	教育研修施設分類	所在地	時期	性別	年代
現在診療中	1	日本神経学会	奈良県	現在	女	30代
	2	日本精神神経学会	大阪府	現在	女	30代
	3	日本精神神経学会	群馬県	現在	女	40代
	4	日本整形外科学会	東京都	現在	女	50代
	5	日本整形外科学会	茨城県	現在	男	30代
	6	日本整形外科学会	奈良県	現在	男	30代
過去診療歴	1	日本神経学会	長崎県	4年前	男	40代
	2	日本神経学会	兵庫県	4年前	男	40代
	3	日本神経学会	東京都	20年前	男	40代
	4	日本神経学会	東京都	19年前	女	30代
	5	日本神経学会	石川県	15年前	女	30代
	6	日本神経学会	長崎県	10年前	男	30代
	7	日本神経学会	秋田県	未記入	未記入	40代
	8	日本神経学会	東京都	15年前	男	40代
	9	日本精神神経学会	神奈川県	5年前	女	40代
	10	日本精神神経学会	東京都	9年前	男	20代以下
	11	日本精神神経学会	福岡県	15年前	男	30代
	12	日本精神神経学会	熊本県	1年前	女	30代
	13	日本精神神経学会	宮崎県	7年前	女	40代
	14	日本精神神経学会	群馬県	20年前	女	30代
	15	日本整形外科学会	青森県	10年前	男	30代
	16	日本整形外科学会	栃木県	13年前	男	30代
	17	日本整形外科学会	千葉県	7年前	女	40代
	18	日本整形外科学会	静岡県	1年前	女	40代
	19	日本整形外科学会	愛知県	未記入	未記入	未記入
	20	日本整形外科学会	島根県	10年前	女	20代以下
	21	日本整形外科学会	福岡県	20年前	女	20代以下
	22	日本整形外科学会	鹿児島県	6年前	女	40代
	23	日本整形外科学会	奈良県	10年前	女	未記入
過去剖検歴	1	日本神経学会	長崎県	4年前	男	40代
	2	日本神経学会	兵庫県	4年前	男	40代
	3	日本神経学会	秋田県	1年前	女	40代
	4	日本神経学会	東京都	15年前	男	40代
	5	日本神経学会	石川県	未記入	未記入	未記入
	6	日本精神神経学会	宮崎県	4年前	女	40代
	7	日本精神神経学会	山梨県	16年前	未記入	未記入
	8	日本精神神経学会	群馬県	20年前	女	30代

表 1. 那須ハコヲ病全国アンケート調査集計結果.

全国の神経内科・精神神経科・整形外科教育研修施設 4071 カ所を対象に文書を郵送して、NHD の臨床病理遺伝学的項目に関するアンケート調査を実施し、1656 施設から回答を得た (回答率 41%;患者 29 名;剖検 8 例)。本邦における患者数は約 200 人と推定された。

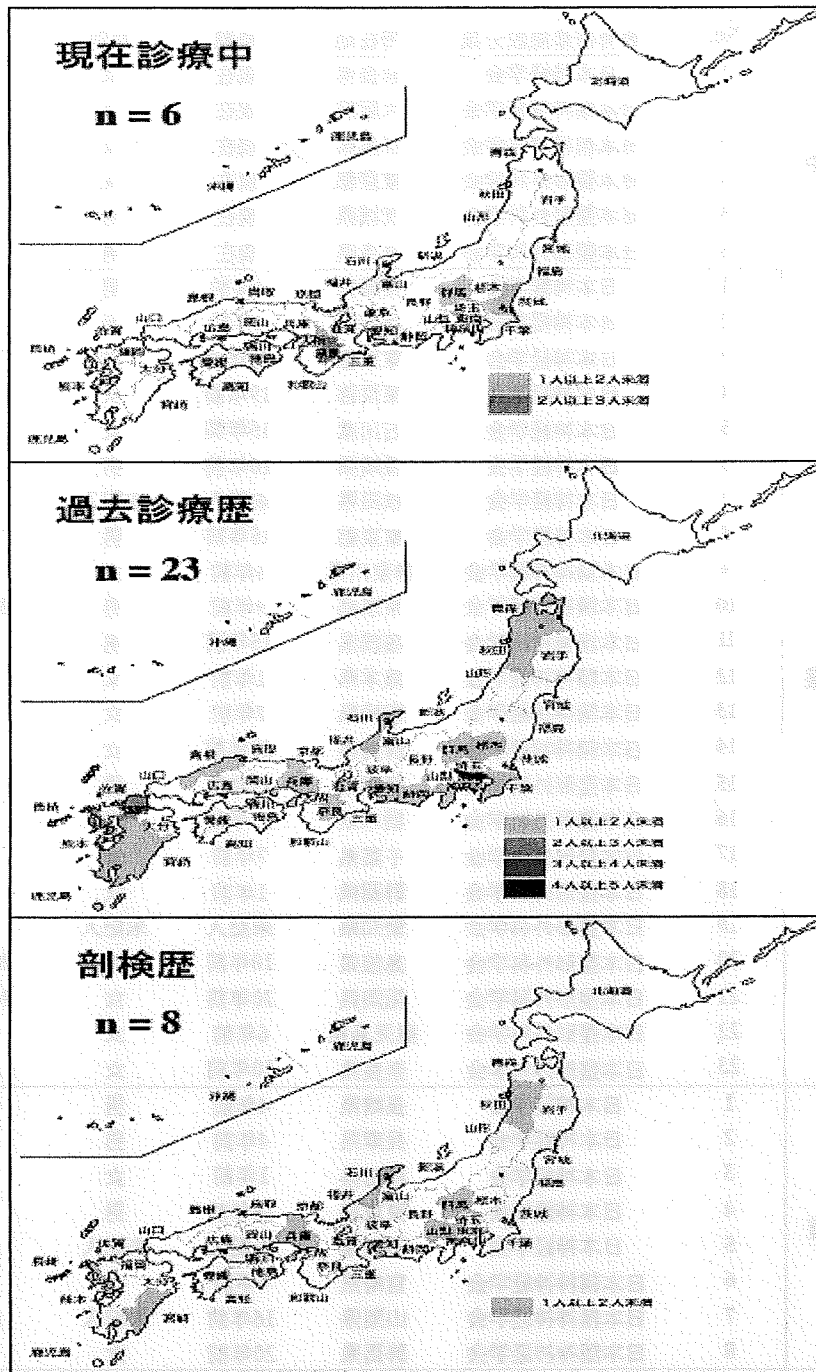


図 1. 那須ハコラ病全国アンケート調査集計結果.

全国の神経内科・精神神経科・整形外科教育研修施設 4071 カ所を対象に文書を郵送して、NHD の臨床病理遺伝学的項目に関するアンケート調査を実施した。患者に関して、現在診療中の施設 (n=5)、過去に診療歴のある施設 (n=22)、過去に剖検歴のある施設 (n=7) の分布を示した。

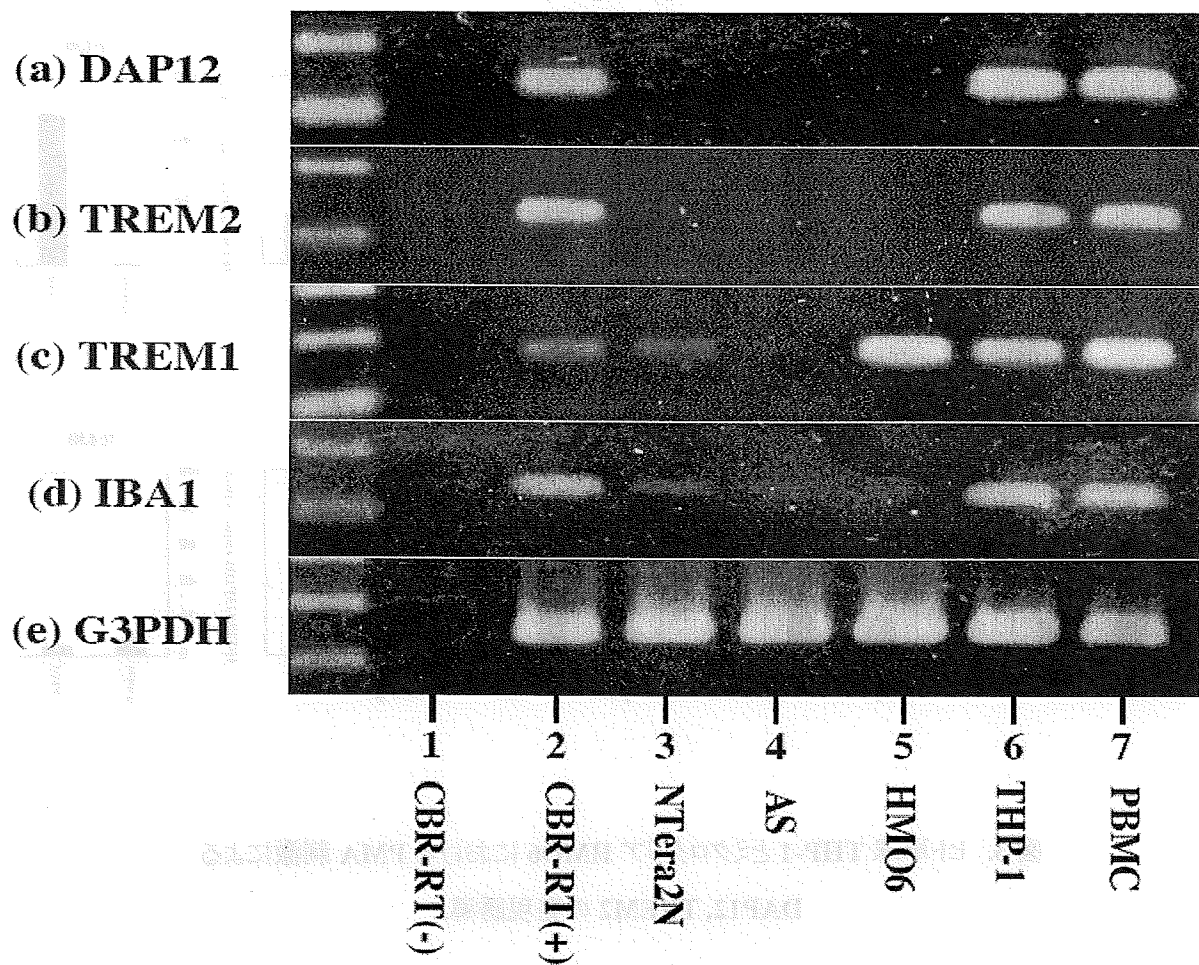
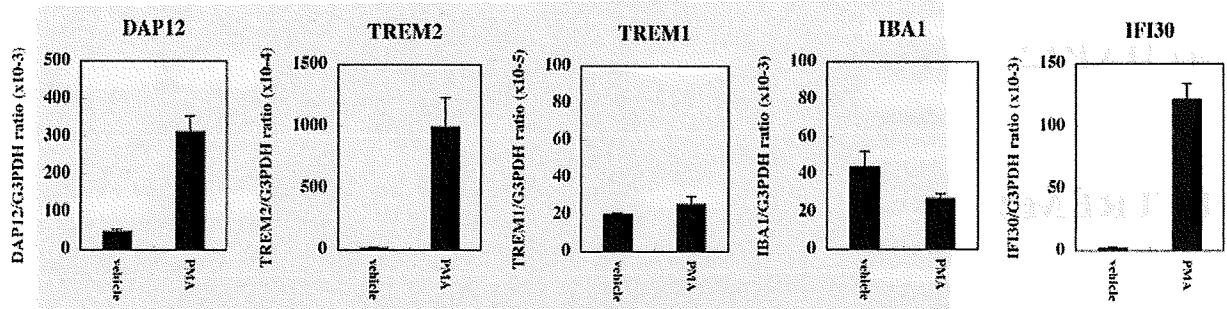


図 2. ヒト細胞株における DAP12, TREM2 mRNA の発現.

RT-PCR により、ヒト大脳(CBR), Ntera2 由来神経細胞(Ntera2N), 神経前駆細胞由来アストロサイト(AS), ヒトミクログリア HMO6, THP-1, 末梢血単核細胞(リンパ球 PBMC)における DAP12, TREM2, TREM1, IBA mRNA の発現を解析した。

(a) THP-1



(b) HMO6

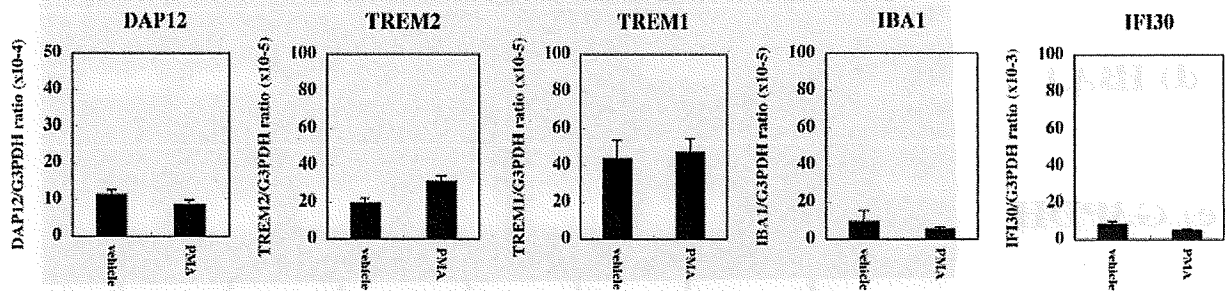


図 3. ヒト単球 THP-1 とマイクログリア HMO6 における PMA 刺激による DAPI12, TREM2 の発現誘導.

THP-1 と HMO6 を phorbol ester (50 nM PMA) で 24 時間刺激後に RNA を精製し、LightCycler ST300 による real-time RT-PCR で mRNA 発現量を定量的に解析した。

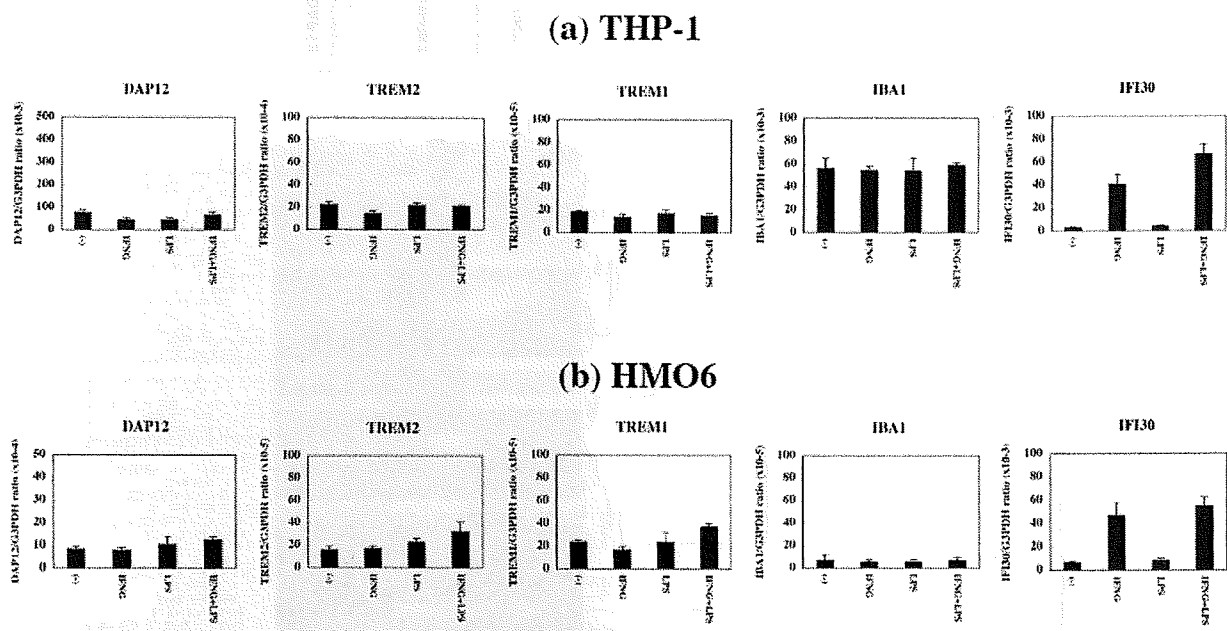


図 4. ヒト単球 THP-1 とマイクログリア HMO6 における IFNG, LPS 刺激による DAP12, TREM2 の発現誘導.

THP-1 と HMO6 を 50 ng/ml IFNG, 50 ng/ml LPS で 24 時間刺激後に RNA を精製し、LightCycler ST300 による real-time RT-PCR で mRNA 発現量を定量的に解析した。

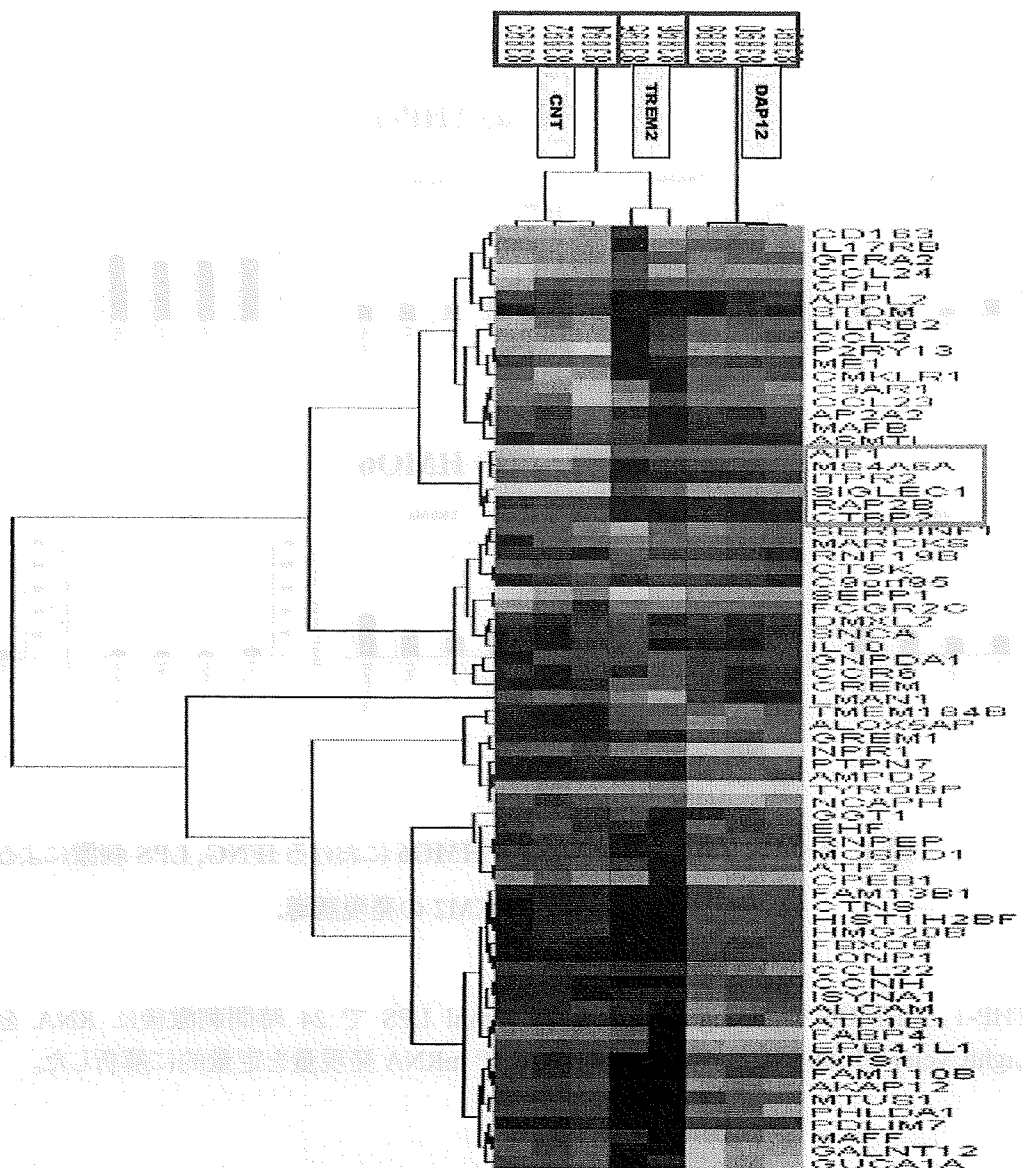


図5. NHD 患者樹状細胞(DC)の遺伝子発現データ(GEO: GSE3624).

GEO: GSE3624 は、3 名の DAP12 EX1-4DEL 変異 NHD 患者と 2 名の TREM2 変異 (GLN33TER, VAL126GLY)NHD 患者および 3 名の健常者から PBMC を分離し、7 日間 20 ng/ml IL-4 と 10 ng/ml GM-CSF の存在下で培養することにより樹状細胞(DC)を誘導し、遺伝子発現プロファイルを Human Genome U133A array で解析したデータセットである。ANOVA $p < 0.001$, change > 2 -fold, delete no P signal genes の条件で、73 differentially expressed genes (DEG)を抽出し、TreeView 1.1.3 で階層的クラスター解析を行った。その結果、NHD DC 特異的に発現変動を認めた 73 遺伝子 SIGLEC1, AIF(IBA1), CTSK などを同定した。右横ボックスに DAP12 変異と TREM2 変異に共通して発現上昇が認められた遺伝子を示す。