

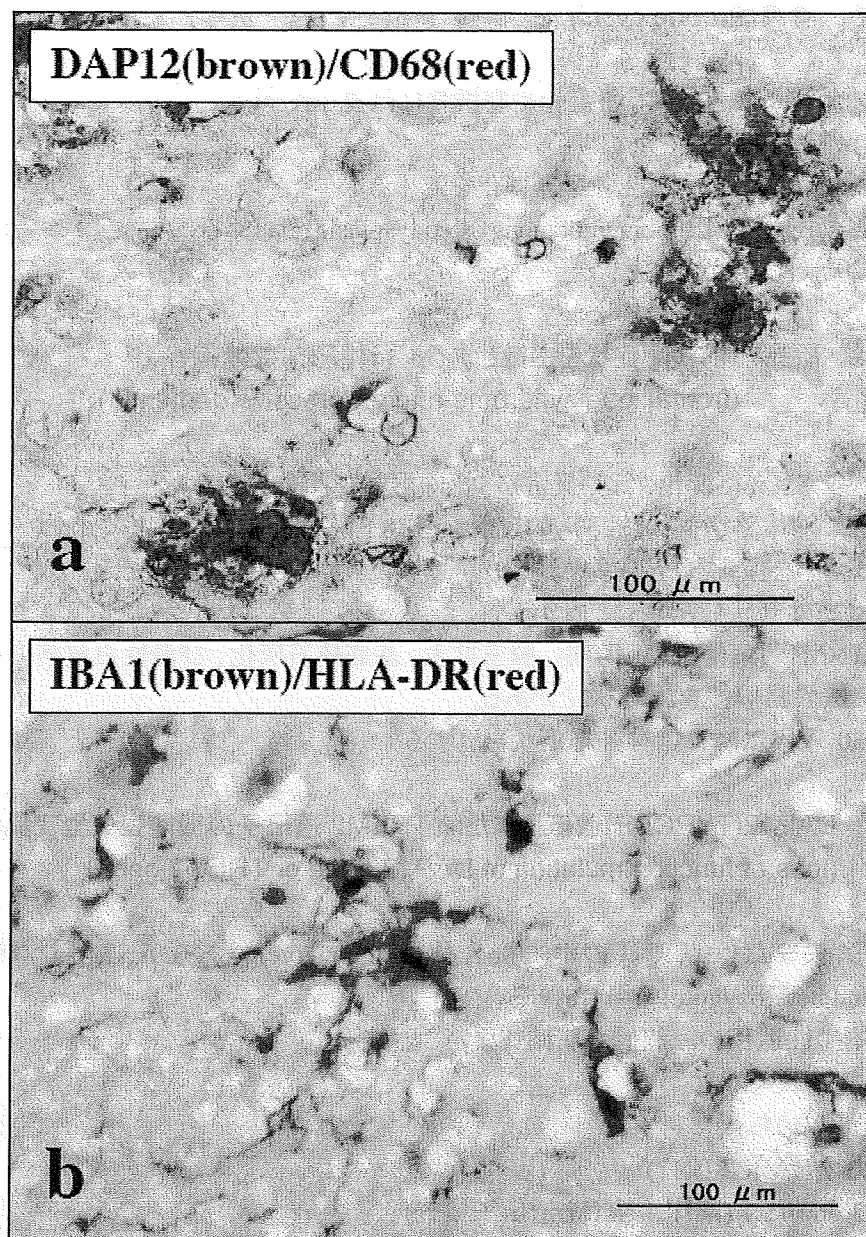


図 6. ヒト脳組織の免疫組織化学的解析.

免疫組織化学的解析により、アルツハイマー病前頭葉運動野におけるCD68陽性DAP12陽性ミクログリア(a)とNHD患者(DAP12 141delG)側頭葉海馬傍回におけるIBA1陽性HLA-DR陽性ミクログリア(b)を同定した。

主要項目と参考事項

1. 骨症状・所見: 骨嚢胞(bone cysts)

- ・長管骨の骨端部に多発し、頭蓋骨や脊椎骨には見られない。
- ・骨痛を伴い、病的骨折を反復する。
- ・単純 x 線で多胞性透亮像と骨梁非薄化を認める。
- ・生検で膜嚢胞性変化(lipomembranous osteodysplasia)を認める。
- ・通常は 20 歳代以降に骨症状を呈する。

2. 精神神経症状・所見: 前頭葉症状を主徴とする進行性認知機能障害
(frontal lobe syndrome and progressive dementia)

- ・脱抑制、多幸、人格変化、行動異常が、認知機能障害に先行する。
- ・歩行障害、錐体路徴候(痙性、病的反射など)、不随意運動(舞蹈病、ミオクローヌスなど)、てんかん発作を呈することが多い。
- ・進行期に失外套状態となる。
- ・CT, MRI で前頭葉優位の脳萎縮、脳室拡大、基底核石灰化、び慢性白質病変を認める。
- ・てんかん様異常脳波を認めることがある。
- ・通常は 30 歳代以降に精神神経症状を呈する。

3. 遺伝子変異: DAP12(TYROBP)遺伝子または TREM2 遺伝子の機能喪失型変異
(loss of function mutation of DAP12 gene or TREM2 gene)

- ・通常は欠失または点変異のホモ接合体(homozygote)であるが、複合ヘテロ接合体(compound heterozygote)の場合もある。
- ・常染色体劣性遺伝の家族歴が明確でないこともある。

以上の主要 3 項目のうち

◎1 と 2 を満たす(臨床 2 項目)

または◎1 と 3 を満たす(臨床 1 項目と遺伝子検査)

または◎2 と 3 を満たす(臨床 1 項目と遺伝子検査)

上記◎の場合は那須ハコラ病と診断出来る。

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

「那須ハコラ病の臨床病理遺伝学的研究」班

〒204-8588 東京都清瀬市野塩 2-522-1

明治薬科大学バイオインフォマティクス

研究代表者 佐藤 準一 (satoj@my-pharm.ac.jp)

TEL (直通) 042-495-8678; FAX 042-495-8612

那須ハコラ病全国調査アンケートご記入のお願い

那須ハコラ病 (Nasu-Hakola disease) は、那須毅博士と Hakola 博士により疾患概念が確立された難病で、多発性骨嚢胞による病的骨折と白質脳症による若年性認知症を主徴とし、DAPI2 (TYROBP), TREM2 遺伝子の機能喪失変異により発症する常染色体性劣性遺伝性疾患です。那須ハコラ病は polycystic lipomembranous osteodysplasia with sclerosing leukoencephalopathy (PLOSL; OMIM 221770) と呼ばれ、国内外で過去約 200 症例報告されています。本邦と北欧に集積していますが、本邦における患者の実態は十分把握されておりません。診断基準の作成、患者の QOL 向上および新規治療薬の開発のためには、患者総数の推定が重要となります。

那須ハコラ病の主要な症状: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

本研究班では、神経内科・精神神経科・整形外科教育研修施設の主任の先生を対象に、臨床病理遺伝学的項目に関してアンケート調査を行い、本邦における那須ハコラ病患者実態の把握を目指しております。アンケートの結果は個人情報保護方針に基づき、難治性疾患克服研究事業の遂行に限定して使用されます。

お忙しい中大変恐縮ですが、平成 22 年 1 月 31 日までにアンケート調査用紙にご記入、同封の返信用封筒に入れてご返送または FAX いただけますと、非常に幸いです。ご協力のほど、どうぞよろしくお願い申し上げます。

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
「那須ハコラ病の臨床病理遺伝学的研究」班
〒204-8588 東京都清瀬市野塩 2-522-1
明治薬科大学バイオインフォマティクス
研究代表者 佐藤 準一 (satoj@my-pharm.ac.jp)
TEL (直通) 042-495-8678 FAX 042-495-8612

FAX to: 042-495-8612

那須ハコラ病全国調査アンケート (平成 22 年 1 月 31 日〆切)

御 担 当 者

御 芳 名

御 所 属

ご連絡先 (E-mail, TEL or FAX)

以下の項目に関し、おわかりになる範囲でご記入ください。

1. 現在、貴施設で那須ハコラ病の患者を外来・入院・訪問で診療している。【□はい □いいえ】

① 1で「はい」を選択された先生へ：患者の性別・年齢層にチェック□をご記入ください。

□ a. 男性 □ b. 女性 □ c. 20 代以下 □ d. 30 代 □ e. 40 代 □ f. 50 代以上

複数例では、右に個別に a-f をご記入ください。[症例 1] [症例 2] []

☆複数例の記入例 [症例 1 a, e] [症例 3] [症例 4] []

② 1で「はい」を選択された先生へ：該当する患者の所見にチェック□をご記入ください。

□ a. 家族歴 □ b. X 線多発性骨嚢胞 □ c. 病的骨折歴 □ d. 骨生検膜状構造物

□ e. 認知症 □ f. 精神症状 □ g. てんかん発作 □ h. 寝たきり状態 □ i. MRI 前頭葉萎縮

□ j. CT 大脳基底核石灰化 □ k. DAPI2 遺伝子変異 □ l. その他の特記事項 []

複数例では、右に個別に a-k をご記入ください。[症例 1] [症例 2] []

☆複数例の記入例 [症例 1 a,b,c,e,f,i] [症例 3] [症例 4] []

2. 過去に、貴施設で那須ハコラ病の患者を診察したことがある。【□はい □いいえ】

① 2で「はい」を選択された先生へ：患者の性別・年齢層にチェック□をご記入ください。

□ a. 約 年前に診察 □ b. 男性 □ c. 女性 □ d. 20 代以下 □ e. 30 代 □ f. 40 代 □ g. 50 代以上

複数例では、右に個別に a-g をご記入ください。[症例 1] [症例 2] []

☆複数例の記入例 [症例 1 5 年, c, e] [症例 3] [症例 4] []

② 2で「はい」を選択された先生へ：該当する患者の所見にチェック□をご記入ください。

□ a. 家族歴 □ b. X 線多発性骨嚢胞 □ c. 病的骨折歴 □ d. 骨生検膜状構造物

□ e. 認知症 □ f. 精神症状 □ g. てんかん発作 □ h. 寝たきり状態 □ i. MRI 前頭葉萎縮

□ j. CT 大脳基底核石灰化 □ k. DAPI2 遺伝子変異 □ l. その他の特記事項 []

複数例では、右に個別に a-k をご記入ください。[症例 1] [症例 2] []

☆複数例の記入例 [症例 1 a,b,c,e,f,i] [症例 3] [症例 4] []

3. 過去に、貴施設で那須ハコラ病の患者の剖検を経験したことがある。【□はい □いいえ】

① 3で「はい」を選択された先生へ：患者の性別・年齢層にチェック□をご記入ください。

□ a. 約 年前に剖検 □ b. 男性 □ c. 女性 □ d. 20 代以下 □ e. 30 代 □ f. 40 代 □ g. 50 代以上

複数例では、右に個別に a-g をご記入ください。[症例 1] [症例 2] []

☆複数例の記入例 [症例 1 5 年, c, e] [症例 3] [症例 4] []

② 3で「はい」を選択された先生へ：該当する患者の所見にチェック□をご記入ください。

□ a. 家族歴 □ b. X 線多発性骨嚢胞 □ c. 病的骨折歴 □ d. 骨生検膜状構造物

□ e. 認知症 □ f. 精神症状 □ g. てんかん発作 □ h. 寝たきり状態 □ i. MRI 前頭葉萎縮

□ j. CT 大脳基底核石灰化 □ k. DAPI2 遺伝子変異 □ l. その他の特記事項 []

複数例では、右に個別に a-k をご記入ください。[症例 1] [症例 2] []

☆複数例の記入例 [症例 1 a,b,c,e,f,i] [症例 3] [症例 4] []

4. その他 ご意見・ご要望などがございましたら、ご記入ください。

後日、改めてご連絡を差し上げる場合がありますが、よろしくお願い申し上げます。どうもありがとうございました。
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「那須ハコラ病の臨床病理遺伝学的研究」班
〒204-8588 東京都清瀬市野塩 2-522-1 明治薬科大学バイオインフォマティクス
研究代表者 佐藤 準一 E-mail : satoj@my-pharm.ac.jp TEL (直通) 042-495-8678

研究奨励分野 研究対象 疾患概要 (資料-3)

【疾患名】	那須ハコラ病
【患者数】	200人
【概要】	那須ハコラ病(Nasu-Hakola disease)は、多発性骨嚢胞による病的骨折と白質脳症による若年性認知症を主徴とし、DAP12(TYROBP), TREM2遺伝子変異を認める常染色体性劣性遺伝性疾患である。那須毅博士とHakola博士により疾患概念が確立され、現在はpolycystic lipomembranous osteodysplasia with sclerosing leukoencephalopathy (PLOSL; OMIM221770)とも呼ばれている。患者は本邦と北欧(フィンランド)に集積し、過去国内外で200症例以上の報告があるが、正確な有病率は不明。
【原因の解明】	脳のmicrogliaや骨のosteoclastsで発現している遺伝子DAP12(TYROBP), TREM2の機能喪失変異により発症する。家族歴が不明確なケースもある。
【主な症状】	①無症候期(20歳代まで), ②骨症状期(20歳代以降):長幹骨骨端部に好発する多発性骨嚢胞と病的骨折, 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・精神症状・てんかん発作, ④晩期精神・神経症状期(40歳代以降):進行性認知症を呈する。
【主な合併症】	20歳代頃から骨折を繰り返す。晩期に寝たきり状態となり誤嚥性肺炎を来す。
【主な治療法】	現在、原疾患に対しては有効な治療法がなく、対症療法が主体である。骨折に対する整形外科的治療、精神症状に対する抗精神病薬の投与やてんかん発作に対する抗てんかん薬の投与が行われている。
【研究班】	那須ハコラ病の臨床病理遺伝学的研究研究班

留意事項

患者数欄には年間発生数や発生率等ではなく、国内の推定患者数(人)を記入してください。
研究班欄には研究課題名の末尾に「班」や「研究班」をつけて記入してください。

那須ハコラ病の臨床病理遺伝学的研究研究班 (資料-4)

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
研究代表者	佐藤 準一	明治薬科大学薬学部バイオインフォマティクス	教授
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
研 究 協 力 者	有馬 邦正	国立精神・神経センター病院精神科	部長
事 務 局	佐藤 準一	明治薬科大学薬学部バイオインフォマティクス 〒204-8588 東京都清瀬市野塩2-522-1 TEL 042-495-8678 FAX 042-495-8678 e-mail satoj@my-pharm.ac.jp	
経理事務担当者	垣尾 将貴	明治薬科大学管理グループ 財務チーム TEL 042-495-8624 FAX 042-495-8612 e-mail kakio@my-pharm.ac.jp	

II. 分担研究報告書

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

研究分担者(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、DAPI2 遺伝子または TREM2 遺伝子の機能喪失変異による常染色体劣性遺伝性疾患である。20-30 歳代に多発性骨嚢胞による病的骨折と白質脳症による精神症状で発症し、40-50 歳代に進行性認知症を来して死亡し、有効な治療法がない難病である。患者は日本とフィンランドに集積している。遺伝子変異に起因する白質脳症の発症機序は明らかでないが、患者脳では広汎な神経細胞変性脱落、脱髄、軸索腫大、血管変性、アストログリオシス、ミクログリア活性化を認める。神経幹細胞(neural stem cells; NSC)は、無限に増殖しながら神経細胞に分化出来る多能性幹細胞であるが、成人の中枢神経系には少数しか存在しない。病巣に移植した神経幹細胞が全て神経細胞に分化すれば神経回路の修復を期待出来るが、他人の細胞を移植すると拒絶されてしまう。近年、自己の皮膚細胞に 4 種類の遺伝子を導入して、全ての細胞に分化出来る人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cells; iPS)を樹立可能となり、神経疾患における細胞移植治療に向けて研究が進められている。NHDにおいても、将来個々の患者由来のiPSをバンクとして整備出来れば、拒絶反応のない細胞移植療法が有望な治療法の選択肢となりうる。しかし、われわれは血清存在下でヒト神経幹細胞を培養すると、即時に転写因子 ID1 の発現が上昇し、容易にアストロサイトに分化してしまうことを見出した。すなわち BBB が破綻し血清成分が浸出している病巣部に、iPS から誘導した神経幹細胞を移植すると、大半が神経細胞に分化せずに、アストロサイトの増生を誘導して瘢痕形成を促進してしまう危険がある。

A. 研究目的

那須ハコラ病(Nasu-Hakola disease; NHD)は、那須毅博士と Hakola 博士により発見された多発性骨嚢胞と白質脳症を主徴とし、日本とフィンランドに集積している疾患である(Nasu T et al. Acta Pathol Jpn 23: 539-558, 1973; Hakola HP. Acta Psychiatr Scand Suppl 232: 1-173, 1972)。NHD は 19q13.1 染色体上の DNAX-activation protein

12(DAPI2)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による常染色体劣性遺伝性形式を呈する(Paloneva J et al. Am J Hum Genet 71: 656-662, 2002)。20-30 歳代に多発性骨嚢胞による病的骨折と白質脳症による精神症状で発症し、40-50 歳代に進行性認知症を来して死亡し、有効な治療法がない難病である

(Klünemann HH et al. *Neurology* 64: 1502-1507, 2005)。遺伝子変異に起因する白質脳症の発症機序は明らかでないが、患者脳では広汎な神経細胞変性脱落、脱髄、軸索腫大、血管変性、アストログリオーシス、ミクログリア活性化を認める(Paloneva J et al. *Neurology* 56: 1552-1556, 2001)。

神経幹細胞(neural stem cells; NSC)または神経前駆細胞(neural progenitor cells; NPC)は、自己複製能(self-renewal capacity)および多分化能(multipotent differentiative capacity)を有する中枢神経系の幹細胞である。NSC/NPC は培養系で無限に増殖し、神経細胞(ニューロン)、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへ分化出来ることから、脊髄損傷、脳梗塞、パーキンソン病、アルツハイマー病において、細胞死に陥った神経細胞を補充する細胞素材として注目されている。NHD においても、将来個々の患者由来の iPS をバンクとして整備出来れば、拒絶反応のない細胞移植療法が有望な治療法の選択肢となりうる。

しかしながら動物実験では、脳や脊髄の病巣に移植した NSC/NPC の大部分は、神経細胞へ分化せずにアストロサイトへ分化することがわかっている(Pallini R et al. *Neurosurg* 57: 1014-1025, 2005)。その結果、移植部で増殖したアストロサイトの形成するグリア瘢痕が、軸索の再生を阻止してしまう。マウス NPC では、酸化ストレスに反応してヒストンデアセチラーゼ(HDAC)Sirt1 の発現が上昇する。Sirt1 は抑制性 bHLH 転写因子 HES1 と協調し、neurogenic bHLH 転写因子 MASH1 の発現をエピジェネティックな機序で抑制し、アストロサイトへの分化を促進する(Prozorovski T et al. *Nat Cell*

Biol 10: 385-394, 2008)。現在まで、ヒト NSC/NPC に関してはアストロサイトへの分化の分子機構は十分に解明されていない。

本研究では、培養ヒト NPC が血清によりアストロサイトへ分化する過程で変動する遺伝子群を DNA マイクロアレイで網羅的に解析し、アストロサイト分化の分子機構の解明を試みた。本研究の成果は、NHD における細胞移植治療法開発に貢献し、厚生労働行政を主導とする患者の QOL 向上につながる。

B. 研究方法

胎児脳由来 NPC を無血清培地(DMEM/F-12 plus ITS, 20 ng/ml EGF, 20 ng/ml bFGF, 10 ng/ml LIF; NPC medium)で、浮遊性球状細胞塊(Floating sphere)として培養した。無血清(S-) NPC spheres と 10% FBS 添加 72 時間(S+) NPC spheres から RNA を精製し、Whole Human Genome Oligonucleotide Microarray (G4112A, 41000 genes; Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)を用いて、2 色法で遺伝子発現プロファイルを比較解析した。正規化は Lowess 法に従った。発現差異を認めた遺伝子は、real-time RT-PCR(qPCR)で発現量を定量した。

(倫理面への配慮)

インフォームドコンセント取得済みのヒト胎児脳由来 NPC を Cambrex-Lonza (Walkersville, MD, USA)から入手した。

C. 研究結果

1. 血清添加による培養ヒト NPC のアストロサイト

への分化誘導

ヒト NPC は無血清 (S-) 培地で数ヶ月間培養すると、浮遊細胞塊 (以下 NPC sphere と呼ぶ) およびプレートに弱く接着した細胞塊の形態を呈して増殖し、NSC マーカー nestin (NES) と musashi homolog 1 (MSH1) を発現していた。NPC sphere を 10% FBS 含有 (S+) 培地で培養すると、即時にプレートに接着し、付着面より扁平な上皮様細胞が急速に増殖し、NPC sphere はプレートに強固に接着した。

qPCR とウエスタンブロットにより、S(+) NPC sphere における GFAP mRNA, protein の顕著な発現増加 (3 倍) を確認した。免疫細胞染色で、付着面より増殖した上皮様細胞における GFAP の発現を確認した。以上の結果より、血清添加はヒト NPC sphere において、アストロサイトへの分化を即時に誘導したと考えられた。

2. 血清添加によりヒト NPC で発現変動した遺伝子群の網羅的解析

マイクロアレイは 1 枚のスライドガラス基盤上に DNA が高密度固定されたチップである。マイクロアレイを用いることにより、迅速かつ網羅的に個々の細胞におけるトランスクリプトームを解析出来る。(S+) NPC spheres では (S-) NPC spheres に比較して、45 遺伝子の発現上昇および 23 遺伝子の発現低下を認めた (Obayashi S et al. Cell Mol Neurobiol 29: 423-438, 2009)。血清添加はアストロサイトマーカー遺伝子 GFAP の発現を上昇させた。また (S+) NPC spheres において、Inhibitor of DNA binding ファミリー ID1, ID2, ID3 遺伝子の発現上昇

および Delta ファミリー DLL1, DLL3 遺伝子の発現低下を認めた。ID ファミリーは DNA 結合ドメインを欠き、bHLH 型転写因子に対して dominant negative に作用する HLH 型転写因子である。Delta ファミリーは Notch リガンドである。qPCR 解析で ID1 の上昇と DLL1 の低下を確認出来た。免疫細胞染色で、血清添加で付着面より増殖した GFAP 陽性細胞 (アストロサイト) の核内に ID1 の集積像を認めた。

3. ID1 と DLL1 の相反関係の解析

8 種類のヒト神経系・非神経系細胞株における ID1, DLL1 の発現レベルを qPCR で定量した。その結果、各細胞株で ID1 と DLL1 の発現レベルは相反関係 (inverse relationship) にあることが明らかとなった。次に生物情報統合プラットフォーム KeyMolnet (医薬分子設計研究所) (Sato H et al. Mult Scler 15: 531-541, 2009) を用いて、N 点→N 点検索法で、開始点 (ID1, ID2, ID3) から終止点 (DLL1, DLL3) へ最短分子経路を解析した。その結果、SMAD 転写制御系 (P-value = 6.6E-12), CREB 転写制御系 (P-value = 7.8E-11), Notch シグナル伝達系 (P-value = 9.7E-9) の関与および中継分子として MASH1 (HASH1, ASCL) を同定した。

MASH1 はホモダイマーもしくは他の bHLH 型転写因子とヘテロダイマーを形成し、神経細胞分化促進遺伝子群の E-box 配列 (CANNTG) に結合して、転写活性化を行なう転写因子である。MASH1 は DLL1 の転写を活性化することが報告されている。そこで HEK293 細胞に MASH1 と ID1 を同時に発現させて免疫沈降法を行ったところ、

MASH1とID1の直接的結合を確認出来た。さらに、ヒト DLL1 遺伝子プロモーター領域#1 (-1,253～-254: E-box 2 個含有), #2 (-2,946～-1,786: E-box 10 個含有)をルシフェラーゼレポーターベクターにクローニングし、MASH1, ID1と共に HEK293 細胞に導入し、デュアルルシフェラーゼアッセイを行った。配列#1と#2の両者はMASH1の発現によって活性化され、MASH1とID1を同時に発現させた場合は、これらの発現が抑制された(Obayashi S et al. Cell Mol Neurobiol 29: 423-438, 2009)。

4. 血清中のアストロサイト分化誘導因子の同定

以上の結果より、血清中にはヒトNPCのアストロサイトへの分化を強力に誘導する因子Xが含まれ、XはIDファミリーの発現上昇とDLLファミリーの発現低下を誘導している可能性が考えられた。そこでIDの発現上昇を誘導するX分子を推定するため、KeyMolnetでID1, ID2, ID3の共通上流分子のネットワークを解析した。その結果、Xの候補としてBMP4が同定された。BMP4は血清中に大量に含まれている事が既に報告されている。そこで、無血清(S-)培養下で、NPC sphereを50 ng/ml recombinant human BMP4に72時間暴露したところ、ID1とGFAPの発現が、血清添加時とほぼ同等レベルにまで上昇した。

D. 考察

動物実験では、血液脳関門(blood-brain barrier; BBB)が破綻した病巣部に移植したNSC/NPCは、血清成分に常時暴露され、神経細胞ではなくアストロサイトへ分化してしまう(Pallini R

et al. Neurosurg 57: 1014-1025, 2005)。ヒト神経疾患に対する再生医学的治療法開発の観点からは、ヒトNSC/NPCのアストロサイトへの分化の分子機構の解明が重要な研究課題となる。特に変性した軸索は再生が困難なため、神経細胞へ分化し得る幹細胞の移植が、最も機能回復効果を期待出来る。また髄鞘再生促進のためには、オリゴデンドロサイトへの分化誘導も必要になる。本研究では、培養ヒトNPC sphereが血清添加によりアストロサイトへ分化する際、72時間以内に発現変動する遺伝子群をDNAマイクロアレイで網羅的に解析し、上昇45遺伝子と低下23遺伝子を同定した。遺伝子発現プロファイルから、血清中のBMP4などのアストロサイト分化誘導因子が、NPCにおけるIDファミリーの発現上昇を誘導し、neurogenic bHLH転写因子(MASH1など)と結合することにより、Deltaファミリーの発現を抑制していると考えられた。DeltaはNotchのリガンドであり、Notchシグナル伝達系が抑制され、その結果神経細胞の分化が阻止されている可能性が考えられる(図1)(Obayashi S et al. Cell Mol Neurobiol 29: 423-438, 2009)。

E. 結論

NHDの治療を目指したヒト神経幹細胞移植においては、あらかじめ抗体を用いてBMP4を中和したり、siRNAを用いてIDの発現を抑制することにより、移植した神経幹細胞の神経細胞への分化を効率的に促進出来る可能性がある。

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, Kajiwarra 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.
 2. 佐藤準一: アレイインフォーマティクスの進展. 日本薬学会・日本学術会議薬学委員会共催シンポジウム. バイオインフォー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: 水チャネル

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.

- 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 病脳の 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: 培養ヒトミ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

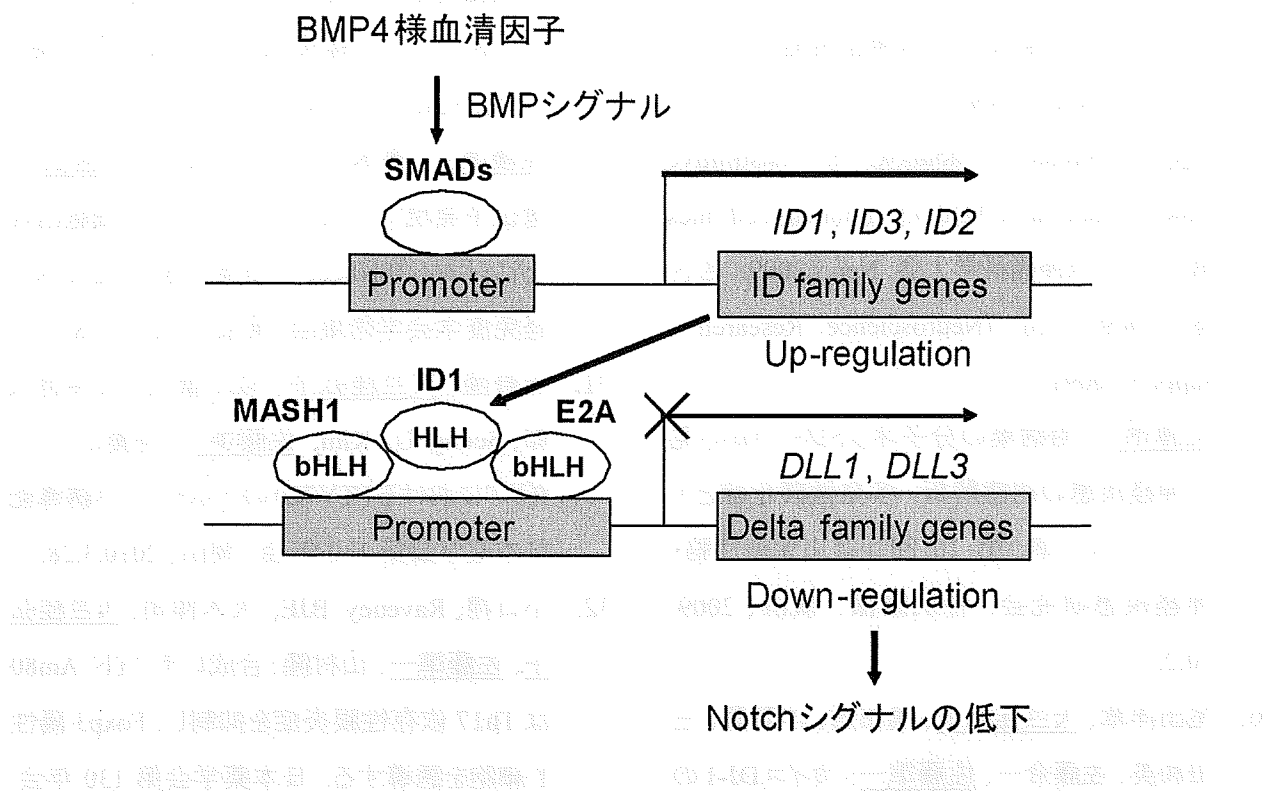


図 1. 血清によるヒト神経幹細胞(NPC)のアストロサイトへの分化の分子機構.

血清中のアストロサイト分化誘導因子(BMP4 など)が、NPC における ID ファミリーの発現上昇を誘導する。ID ファミリーが neurogenic bHLH 転写因子(MASH1 など)と結合して dominant negative として働き、Delta ファミリーの発現を抑制し、Notch シグナル伝達系が抑制されて、その結果神経細胞の分化が阻止されている可能性が考えられた(Obayashi S et al. Cell Mol Neurobiol 29: 423-438, 2009)。

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

研究分担者 天竺桂 弘子 明治薬科大学助教

研究要旨 那須ハコラ病(Nasu-Hakola disease; NHD)は、DAPI2 遺伝子または TREM2 遺伝子の機能喪失変異による常染色体劣性遺伝性疾患である。20-30 歳代に多発性骨嚢胞による病的骨折と白質脳症による精神症状で発症し、40-50 歳代に進行性認知症を来して死亡し、有効な治療法がない難病である。患者は日本とフィンランドに集積している。遺伝子変異に起因する白質脳症の発症機序は明らかでないが、患者脳ではミクログリアの異常活性化を認める。従って、ミクログリア活性化を選択的に抑制する薬を開発出来れば、治療効果を期待出来る。FTY720(fingolimod)は本邦で開発された sphingosine 1-phosphate(S1P)受容体調節薬で、中枢神経系白質炎症性脱髄疾患である多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)の治療薬として、臨床試験で有効性を認めている。生体内では sphingosine kinase-2 によりリン酸化された活性型(S)-FTY720-phosphate(FTY720-P)は、S1P1 受容体の functional antagonist として働き、自己反応性 T 細胞の胸腺やリンパ節からの遊出を抑制して、免疫調節作用を呈する。FTY720 は脳移行性が高く、オリゴデンドロサイトやアストロサイトに作用して、髄鞘再生促進やグリア瘢痕形成抑制にも働く。現在まで、FTY720 のミクログリアに対する直接的作用は明らかではない。本研究では培養ヒトミクログリアに対する FTY720 の薬理作用を解析し、NHD に対する治療薬としての可能性を検討した。

A. 研究目的

那須ハコラ病(Nasu-Hakola disease; NHD)は、那須毅博士と Hakola 博士により発見された多発性骨嚢胞と白質脳症を主徴とし、日本とフィンランドに集積している疾患である(Nasu T et al. Acta Pathol Jpn 23: 539-558, 1973; Hakola HP. Acta Psychiatr Scand Suppl 232: 1-173, 1972)。NHD 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による常染色体劣性遺伝性形式を呈する(Paloneva J et al. Am J Hum Genet 71: 656-662, 2002)。20-30 歳代に多発性骨嚢胞による病的骨折と白質脳症による精神症状で発症し、40-50 歳代に進行性認知症を来して死亡し、有効な治療法がない難病である(Klünemann HH et al. Neurology 64: 1502-1507, 2005)。遺伝子変異に起因する白質脳症の発症機序は明らかでないが、患者脳ではミクログリアの異常活性化を認める(総括研究報告参照;Paloneva J

et al. Neurology 56: 1552-1556, 2001)。従って、白質脳症進行に対して、ミクログリア活性化阻害薬は抑制効果を期待出来る。

FTY720(fingolimod)は、本邦で開発された sphingosine 1-phosphate(S1P)受容体調節薬で、中枢神経系白質炎症性脱髄疾患である多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)の治療薬として、臨床試験で有効性を認めている(Kappos L et al. New Engl J Med 355: 1124-1140, 2006)。生体内では sphingosine kinase-2 によりリン酸化された活性型(S)-FTY720-phosphate(FTY720-P)は、S1P1 受容体の functional antagonist として働き、自己反応性 T 細胞の胸腺やリンパ節からの遊出を抑制して、免疫調節作用を呈する(Brinkmann V. Br J Pharmacol 158: 1173-1182, 2009)。FTY720 は脳移行性が高く、オリゴデンドロサイトやアストロサイトに作用して、髄鞘再生促進やグリア瘢痕形成抑制にも働く。しかしながら現在まで、FTY720 のミクログリアに対する直接的作用は明らかではない。本研究では、培養ヒトミクログリアに対する FTY720 の薬理作用を解析し、NHD 進行抑制治療薬としての可能性を検討した。本研究の成果は、NHD における新規治療薬開発に貢献し、厚生労働行政を主導とする患者の QOL 向上につながる。

B. 研究方法

1. Sphingosine 1-phosphate(S1P)受容体発現解析: 各種ヒト神経系および非神経系細胞株から TRIZOL で total RNA を抽出し、RT-PCR を行って S1P1(EDG1), S1P2(EDG2), S1P3(EDG3), S1P4(EDG6), S1P5(EDG8)の発現を調べた。

2. FTY720 のアポトーシス誘導能の解析: 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 で培養し、0-20 μ M FTY720 に 2-10 時間暴露後に、MPER lysis buffer で total protein を抽出した。抗 poly-(ADP-ribose)-polymerase(PARP)抗体(Roche)を用いたウエスタンブロットで 116-kDa non-cleaved PARP, 85-kDa PARP cleaved by caspases (apoptosis marker)を検出した。

3. FTY720 関連遺伝子発現プロファイル解析: HMO6 を 10%FBS Dulbecco's MEM で培養し、10 μ M FTY720 or EtOH(vehicle)に 2 時間暴露後に、TRIZOL Plus RNA Purification kit(Invitrogen)で total RNA を抽出し、既報(Satoh J et al. Cell Mol Neurobiol 2009, in press)に従い、Human Gene ST1.0 Array(Affymetrix)を用いて遺伝子発現プロファイルを解析した。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)を用いて、FTY720 投与により 1.8 倍以上上昇した 39 遺伝子の共通上流の分子ネットワークを解析した。

(倫理面への配慮)

HMO6 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。

C. 研究結果

1. ヒト神経系・非神経系細胞株における S1P 受容体の発現

ヒト大脳、アストロサイト(AS)、神経前駆細胞(NP), NTera2 由来神経細胞(NTera2N), SK-N-SH 神経芽細胞腫、U-373MG 星状膠細胞腫、HeLa

子宮頸癌細胞では、高低は有るものの、S1P1, S1P2, S1P3, S1P4, S1P5 全ての mRNA の発現を認めた(図 1)。一方ヒトミクログリア HMO6 では主として S1P1, S1P2, S1P3 mRNA の発現を認めた。Y79 網膜芽細胞腫と HepG2 肝芽細胞腫では S1P1 mRNA の発現を認めなかった。

2. ヒトミクログリア HMO6 に対する FTY720 のアポトーシス誘導能

FTY720 は 10 μ M 以上の濃度で、10 時間の暴露により、HMO6 のアポトーシスを誘導し、その結果 85-kDa PARP(apoptosis marker)を検出出来た(図 2)。通常の培養条件下では小型紡錘型を呈している HMO6 は、上記の条件下では球状に膨化して、カルチュアプレートから離脱することがわかった。

3. ヒトミクログリア HMO6 において FTY720 により発現誘導される遺伝子群

HMO6 培養系で 10 μ M FTY720 または等量の EtOH(vehicle)を 2 時間暴露し RNA を抽出して、遺伝子アレイ解析を行った。FTY720 により 1.8 倍以上発現上昇した 39 遺伝子(ACAA1, HMGC1, SLCO4C1, CC2D2B, LOC729574 など)と 0.6 倍以下に発現低下した 55 遺伝子(LIPN, PLK2, IL8, TXNIP, CYR61 など)を同定した。発現上昇した 39 遺伝子に関して共通上流分子ネットワークを解析すると、転写因子 C/EBP($p = 8.178E-011$), SREBP($p = 2.092E-006$), CREB ($p = 5.972E-006$) による発現調節系の関与が示唆された(図 3)。

D. 考察

本研究の結果より、ヒト中枢神経系では、神

経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトに加えて、ミクログリアも S1P1 を発現し FTY720 に応答し得ると考えられる。FTY720 は経口投与で、血液脳関門を通過することが報告されている(Brinkmann V. Br J Pharmacol 158: 1173-1182, 2009)。FTY720 は培養ヒトミクログリア HMO6 に対してアポトーシスを誘導することがわかったので、NHD 患者において長期投与することにより、ミクログリアの異常活性化を阻止出来るかもしれない。現在まで、FTY720 に関しては重大な副作用は報告されていない(Comi G et al. Mult Scler 2009, in press)。一方 FTY720 は PP2A を活性化し、Akt を脱リン酸化することにより、アポトーシスを誘導するとの報告がある(Matsuka Y et al. Br J Pharmacol 138: 1303-1312, 2002)。しかし本研究における DNA マイクロアレイ解析の結果からは、コレステロール合成系を制御する sterol regulatory element binding transcription factor (SREBP)の活性化とアポトーシスのリンクが示唆された(Rank 2)。事実 caspase-7 は、SREBP-1, SREBP-2 の標的遺伝子であることが報告されている(Gibot L et al. Biochem J 420: 473-483, 2009)。

E. 結論

FTY720 は培養ヒトミクログリア HMO6 に対してアポトーシスを誘導するので、NHD 患者において長期投与することにより、ミクログリアの異常活性化を阻止出来る可能性がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Satoh J, Obayashi S, Misawa T, Tabunoki H,