

201024191A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤 準一

平成23年(2011)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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤 準一

平成23年(2011)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) 疾患概要

(資料-2) Disease Summary

(資料-3) 研究班名簿

(資料-4) 診断基準

(資料-5) 患者家族の相談窓口

II. 分担研究報告

本邦初のTREM2遺伝子変異による那須ハコラ病の1家系:

分子遺伝学的解析 ----- 23

明治薬科大学 佐藤 準一

那須ハコラ病の創薬研究:

カイコモデル系を用いた神経変性責任遺伝子DJ-1の

抗酸化作用に関する研究 ----- 34

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 ----- 45

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 47

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 22 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 DAP12 遺伝子または TREM2 遺伝子の変異による常染色体劣性遺伝性疾患で、多発性骨嚢胞と白質脳症を主徴とする。DAP12 は破骨細胞やミクログリアの細胞膜上で 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。未だ白質脳症の発症機序は解明されておらず、有効な治療法がない難病である。NHD は日本とフィンランドに集積しているが、本邦においては現在まで TREM2 遺伝子変異の報告はない。H21-難治-一般-201 では、臨床診断基準を作成し、Web 上で公開した。また全国神経内科・精神科・整形外科 4071 施設を対象にアンケート調査を実施し、データベースを作成し、本邦患者数を約 200 人と推定し、ホームページに患者家族の相談窓口を開設した。H22-難治-一般-136(1 年目)では、研究体制を強化し、本邦初の TREM2 変異による NHD1 家系 3 症例を精査して、罹患脳の遺伝子発現プロフィールを解明し、新規バイオマーカー RGS1 を発見し、患者 2 名の皮膚線維芽細胞より iPS 細胞を樹立した。また本邦 NHD3 例の剖検脳を解析し、マクロファージと単球における TREM2 の発現を解明し、創薬モデル系 DAP12 欠損ヒト脳ミクログリア細胞株を樹立した。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の作成や患者の 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)

新谷 周三 (取手協同病院院長)

高橋 和也 (国立病院機構医王病院神経内科医
長)

研究協力者

有馬 邦正 (国立精神・神経医療研究センター
病院精神科部長)

新井 信隆 (東京都医学研究機構東京都神経科
学総合研究所臨床神経病理部門長)

山村 隆 (国立精神・神経医療研究センター神
経研究所疾病研究第六部部長)

神田 隆 (山口大学医学部神経内科学教授)

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 博士によりほぼ同時に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する稀少疾患である(Nasu T et al. Acta Pathol Jpn 23: 539-558, 1973; Hakola HP. Acta Psychiatr Scand Suppl 232: 1-173, 1972)。近年、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)遺伝子に変異が発見されて疾患単位として確立し、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; OMIM 221770)とも呼ばれている(Paloneva J et al. Am J Hum Genet 71: 656-662, 2002)。現在までに17種類の機能喪失型遺伝子変異が同定されている(図1)。

NHDの病期は以下の4期に区分される(資料-1, 資料-2)。(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):進行性認知症を呈する(Klünemann HH et al. Neurology 64: 1502-1507, 2005)。患者は日本とフィンランドに集積している。これまで本邦では疫学の実態調査はなく、正確な患者数は把握されていなかった。

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ており、受容体 TREM2 と会合して、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(図2)。細胞膜上の受容体である TREM2 に結合するリガンドは、未だ同定されていない。DAP12 欠損マウスでは、視床髄鞘低形成(hypomyelinoses)と骨硬化症(osteopetrosis)を認める(Kaifu T et al., J Clin Invest 111:323-32, 2003)。しかしながらヒトの counterpart である 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)。

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、NHD の診断は死後の病理学的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。また臨床診断基準も存在せず、専門医でも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。2006年より、われわれは国立精神・神経医療研究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、様々な新規遺伝子変異を発見し、NCBI データベースに登録した(Kuroda R, Satoh J et al. J Neurol Sci 252: 88-91, 2007; GenBank Accession No. AB280796, AB280795, AB361433)。

本研究(H22-難治-一般-136)の研究組織(主たる専門領域)は、研究代表者佐藤準一(神経内科学・バイオインフォマティクス)、研究分担者天竺桂弘子(分子生物学・バイオインフォマティクス)、および

び研究協力者として有馬邦正(神経病理学)、山村隆(神経免疫学)、神田隆(神経内科学)、新谷周三(神経内科学)、高橋和也(神経内科学)、新井信隆(神経病理学)の計 8 名から構成されている。前年度(H21-難治-一般-201)に比較し 5 名を新たに追加して、研究体制を強化した(資料-3)。

昨年度 H21-難治-一般-201 では、臨床診断基準を作成し Web 上で公開した(資料-4)。また初めて、全国神経内科・精神神経科・整形外科教育研修施設 4071 カ所を対象に、臨床病理遺伝学的項目のアンケート調査を実施して、1656 施設から回答を得て(平成 21 年度研究報告書:回答率 41%; 患者 29 名; 剖検 8 例)、データベースを作成した。その結果、本邦の患者数を約 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)と推定した。またホームページ(<http://www.my-pharm.ac.jp/~satoj/>)に患者家族の相談窓口を開設した(資料-5)。さらに NHD 患者樹状細胞(DC)の遺伝子発現データ(GEO: GSE3624)を利用して、バイオインフォマティクス手法で再解析し、NHD DC 特異的遺伝子 SIGLEC1, AIF(IBA1)を発見した。

本年度 H22-難治-一般-136(1 年目)では、NHD の臨床病理遺伝学的研究をさらに推進するために、(1)NHD 家系の遺伝学的精査を行い、文書同意を取得した患者の生検皮膚から induced pluripotent stem cells(iPS)細胞を樹立する。京都大学山中伸弥教授らが確立した iPS 細胞は、無限に増殖し、あらゆる組織を構成する細胞に分化する多能性幹細胞として、注目されている。NHD 患者由来の iPS 細胞は疾患の病態解明や治療法開発に役立つ、(2)非常に貴重な本邦 NHD 患者剖検脳組織を収

集して、従来明らかにされていなかった脳における TREM2, DAP12 の発現を免疫組織化学的に解析する、(3)創薬モデル系として DAP12 欠損ヒト脳ミクログリア細胞株を樹立する、(4)治療薬開発の糸口を得るため、カイク神経変性モデル系を用いて、DJ-1 の in vivo 抗酸化ストレス作用を研究することを目標として掲げた。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と思われる。

B. 研究方法

1. NHD 家系の遺伝学的精査(詳細は平成 22 年度佐藤分担研究報告書を参照):患者背景は 1 家系 3 例。発端者は 36 歳女性(PT3)。てんかん発作で入院。両親血族結婚。4 人兄弟の 3 番目。多発性骨嚢胞、認知症(HDS-R 7/30), CT 基底核石灰化、MRI 脳萎縮、99mTc-ECD SPECT 前頭側頭葉血流低下を認めた(図 3a-d)。長兄(PT1)と次兄(PT2)も、臨床的に NHD が疑われ、それぞれ 39 歳と 31 歳で死亡。長兄は剖検により病理学的診断が確定した。妹は異常なし。

PT3 の末梢血と PT1 の剖検脳より、genomic DNA を精製し、TREM2 遺伝子、DAP12 遺伝子の各 5 つのエクソンをカバーするプライマーセットを用いて PCR で増幅した。PCR 産物を 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems)で直接シーケンス解析した。また peripheral blood mononuclear cells(PBMC)からタンパクを抽出し、anti-TREM2 antibody(HPA010917; Sigma)を用いて western

blot 解析を行った。

また PT1 の剖検凍結前頭葉脳組織から total RNA を抽出し、normal human frontal lobe RNA (636563; Clontech) をコントロールとして、Human Gene 1.0 ST array(28,869 genes; Affymetrix) を用いて遺伝子発現プロファイルを解析した。

PT3 と別の NHD 患者(合計 2 名)において、文書同意を取得し、皮膚生検を行い、組織を iPS 細胞バンク(熊本大学江良沢実教授)に送付し、線維芽細胞と iPS 細胞を樹立し、難病研究資源バンクへの登録を促した。

2. NHD 患者剖検脳組織の免疫組織化学的解析: 研究協力者有馬邦正が主宰する脳組織バンク Research Resource Network (RRN) を通じて提供された研究使用に対して文書同意を取得した NHD 患者、他の神経変性疾患患者、健常者の脳組織を用いた。全ての脳組織では、個人情報は一切削除されている。脳組織のパラフィン切片を用いて、DAP12, TREM2, TREM1, CD68, IBA1, SIGLEC1 の発現を免疫組織化学的に解析した。

3. DAP12 欠損ヒト脳ミクログリア細胞株の樹立: Kim らの研究室で樹立された株化ヒトミクログリア細胞 HMO6(Nagai A et al. Neurobiol Dis 8: 1057-1068, 2001) を 10% FBS Dulbecco's MEM で、株化ヒト単球性白血病細胞 THP-1(Tsuchiya S et al. Cancer Res 42: 1530-1536, 1982) を 10% FBS RPMI1640 で培養した。RT-PCR 解析と western blot 解析を行い、THP-1 では DAP12 発現を認めるが、HMO6 では DAP12 発現が見られないことを確認した。DAP12-coding region を発現ベクター pEF6-TOPO(Invitrogen) にクローニングし、Lipofectamine 2000(Invitrogen) を用いて HMO6 に

導入後、blastocidin 抵抗細胞を選択し、DAP12 発現安定 HMO6 細胞株を樹立した。また 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、THP-1 に導入後、hygromycin B 抵抗細胞を選択し、DAP12 knockdown(KD) 安定 THP-1 細胞株を樹立した。DAP12-siRNA THP-1 細胞と DAP12-scrRNA THP-1 細胞の遺伝子発現プロファイルを Human Gene 1.0 ST array(28,869 genes; Affymetrix) を用いて比較解析した。

4. DJ-1 の酸化ストレス防御作用の解析(詳細は平成 22 年度天竺桂分担研究報告書を参照): DJ-1 は当初 oncogene として発見され、イタリアとオランダの常染色体劣性遺伝パーキンソン病家系で機能喪失型遺伝子変異を認め、パーキンソン病の責任遺伝子 PARK7 として命名された。DJ-1 は酸化活性、プロテアーゼ活性、シャペロン機能を有する。現在まで DJ-1 の機能喪失による PD 発症の分子機構は十分解明されていない。

カイコ(*Bombyx mori*) は、2006 年に日本と中国が中心となって全ゲノム解読を完了した鱗翅目昆虫である。ヒト疾患関連遺伝子オルソログを多数有している。また 500 種の自然変異体が存在し、遺伝子操作技術も確立されている。哺乳類相同器官を保有し、腸管内や血体腔内へ薬物投与が可能で、薬物動態や細胞毒性をモニター出来る利点がある。本研究ではカイコ DJ-1 cDNA(BmDJ-1) をクローニングし、組織分布と *in vivo* における酸化能を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究におけるゲノム解析研究は、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。研究使用に対して文書同意を取得したヒト脳組織は全て RRN を介して提供された。

C. 研究結果

1. NHD 家系の遺伝学的精査

PT3, PT1 のゲノム DNA の遺伝子解析では、DAP12 遺伝子には変異を認めなかったが、TREM2 遺伝子の第 3 イントロン第 2 位 (the splice-donor consensus site) の T>C 変異 (c.482+2T>C) を認めた (過去にはイタリア人 1 家系 2 例の報告しかない)。患者では exon 3-exon 4 junctional sequence が PCR で増幅されず、exon 3 splicing の異常が示唆された。また健常者 PBMC では、TREM2 は 38-kDa の単一バンド (全長型) を呈したが、PT3 では 27-kDa, 24-kDa の短縮型 (truncated forms of TREM2 proteins) の発現を認めた。さらに PT3 の cDNA から PCR で TREM2 ORF を増幅してクローニングし、4 つの異なるクローンを得た。シーケンス解析では、全てのクローンで exon 3 が欠失していた (exon 3 skipping)。

PT1 の剖検凍結前頭葉組織を用いて DNA マイクロアレイ解析を行い、コントロールに比較して 4 倍以上に発現上昇している 136 遺伝子と 0.1 倍以下に発現低下している 188 遺伝子を同定した (Top 10 発現上昇・発現低下遺伝子群: 表 1)。発現上昇遺伝子群には、CD163, MSR1, CD68 などマクロファ

ージ・ミクログリアのマーカー遺伝子が含まれ、発現低下遺伝子群には GABRG2, GABRA1, GABRB2, GABRA2, GABRA4, GABRA3, GABRA5, GABRB3, GABRB1 などの GABA 受容体サブユニットや SYT1, SNAP25, SV2B, SYNPR, SYT4, SYT13, SYN2, SYT5 などのシナプス構成タンパク質が含まれていた。NHD 脳で発現が上昇している新規バイオマーカー遺伝子として regulator of G-protein signaling-1 (RGS1) を同定した。RGS1 と CD163 の上昇および GABRG2 と SYT1 の低下を定量的リアルタイム PCR で確認した。Ingenuity Pathways Analysis (IPA) では、発現上昇遺伝子群は inflammatory response, cellular movement, and immune cell trafficking ($p = 1.00E-116$) と、発現低下遺伝子群は cell-to-cell signaling and interaction, nervous system development and function, and genetic disorder ($p = 1.00E-168$) との関連性が示唆された (Numasawa Y et al. Eur J Neurol 2010, in press)。

2. NHD 患者剖検脳組織の免疫組織化学的解析

RRN を通じて提供された本邦の NHD 患者 3 例 (2 例は DAP12 141delG 変異; 1 例は遺伝子変異未確認)、コントロールとして筋緊張性ジストロフィー患者 4 例と健常者 4 例の前頭葉・海馬・基底核における TREM2, DAP12, IBA1, SIGLEC1 の発現を免疫組織化学的に解析した。DAP12 はコントロール脳ではミクログリア (ramified microglia) に発現していたが、NHD 脳では 3 例とも DAP12 の発現を認めなかった (DAP12 欠損: 図 4b)。SIGLEC1 は少数のマクロファージ (perivascular macrophages) で発現を認めたが、ミクログリアでは発現を認めな

った。TREM1 は一部のアストロサイト(multipolar fibrillary astrocytes)に発現していた。

マウスにおける過去の研究(Schmid CD et al. *J Neurochem* 83: 1309-1320, 2002; Thrash JC et al. *Neurochem Res* 34: 38-45, 2009)では、TREM2と DAP12 は、脳においてはミクログリア特異的に発現していると報告されている。これに反して、TREM2はヒトミクログリアでは構成的発現を認めず、少数の血管内の単球やマクロファージ、神経細胞の細胞質に発現していた(図 4c,d)。一方、NHD 患者脳では、コントロール脳と同程度の数の Iba1 陽性ミクログリアを認めた(図 4e, f)。すなわちミクログリアの数自体は減少していないことがわかった(Satoh J et al. *Neuropathology* 2010, in press)。

3. DAP12 欠損ヒト脳ミクログリア細胞株の樹立

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、HMO6(DAP12-)に DAP12 遺伝子を導入した細胞株 HMO6(DAP12+)を樹立した(図 5)。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ァイルを Human Gene ST1.0 array を用いて比較解析する予定である。

また DAP12 siRNA 発現ベクターと scramble oligonucleotide 発現ベクターを作成し、THP-1 に導入し、DAP12 knockdown(KD)安定 THP-1 細胞株を樹立した。siRNA-THP-1 (KD)細胞と DAP12-scrRNA THP-1 細胞の遺伝子発現プロファイルを Human Gene 1.0 ST array を用いて比較解析したところ、KD 細胞で3倍以上に発現上昇した41遺伝子と0.33倍以下に発現低下した41遺伝子を同定した(投稿準備中)。

4. DJ-1 の酸化ストレス防御作用の解析

Drosophila の DmDJ-1alpha, beta を Query として、*Bombyx* EST データベースから候補配列 NRPG1136 を得て、5'RACE 法で BmDJ-1 全長を同定した。BmDJ-1 は 190 アミノ酸残基、分子量 20,114, pI 5.15 の酸性タンパクで、DJ-1 ファミリー特有の PfpI ドメインを有し、23 番染色体上の 2995719 から 2998746 に逆向きに配座していた。BmDJ-1 mRNA は脳、中腸、絹糸線、脂肪体、マルピギー管、卵巣、精巣、卵巣、血球において構成的発現を認めた。次に 1, 2, 3, 4, 5 齢幼虫、蛹、成虫の whole body、5 齢 0 日幼虫から成虫まで連日の中腸、脂肪体、マルピギー管、精巣、卵巣からタンパクを抽出し、ウエスタンブロットで発現を解析したところ、BmDJ-1(21.5-kDa)は発育ステージが進行するごとに発現量が増加し、5 齢から成虫にかけては、周期的に増減を繰り返していた。

Bombyx mori 卵巣細胞 BmN4 に酸化ストレス (100 μ M Rotenone, 3 時間)を負荷したところ、BmDJ-1 の発現量が顕著に増加し、特に酸化型 BmDJ-1 (pI 4.9)の増加を認めた。5 齢 4 日幼虫に 20 μ g/g Rotenone と recombinant BmDJ-1, recombinant LacZ, PBS を同時に投与し、24 時間後の死亡数を計測した結果、BmDJ-1 投与群では LacZ 投与群に比べ有意に死亡率が低下した。さらに 5 齢 0 日幼虫に組み換え型ウイルス DJ-1/BmNPV or empty/BmNPV(control)を感染させ、感染 5 日後に 20 μ g/g Rotenone を投与し、24 時間後の死亡数を計測した結果、empty(control)群に対し、組み換え型 DJ-1 ウイルス感染群では、死亡率が有意に低下していた。以上から、BmDJ-1 は酸化ストレスに応答してその発現が上昇し、生体内では酸化ストレスによる個体死を防御することが

わかった(Tabunoki H et al. PLoS One 2011, in press)。

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 遺伝子または TREM2 遺伝子機能喪失変異により発症し、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。最近まで本邦では疫学的実態調査は行われていなかったが、昨年度のわれわれの研究 H21-難治-一般-201 では、一般臨床医が利用可能な平易な臨床診断基準を作成し、初めて、全国神経内科・精神神経科・整形外科教育研修施設 4071 カ所を対象に、臨床病理遺伝学的項目のアンケート調査を実施して、本邦の患者数を約 200 人と推定した。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。さらにホームページに患者家族の相談窓口を開設し、セカンドオピニオン的な対応を開始した。このような取り組みは、厚生労働行政を主導とする NHD 患者の QOL 向上につながる。

本年度 H22-難治-一般-136(1 年目)では、NHD の臨床病理遺伝学的研究をさらに推進するために、研究組織を合計 8 名に増員強化した。本邦初の TREM2 変異による NHD1 家系 3 症例を精査し、罹患脳の遺伝子発現プロフィールを解明し、新規バイオマーカー RGS1 を発見した(Numasawa Y et al. Eur J Neurol 2010, in press)。現在 RGS1 の機能

を解析中である。また世界で初めて、NHD 患者 2 名の皮膚より iPS 細胞を樹立した(熊本大学江良実教授のご厚意による)。今後、iPS 細胞が NHD 発症分子機構や新規創薬標的の解明に役立つものと思われる。また本邦 3 例の NHD 患者剖検脳組織を解析して、ヒトマクロファージや単球における TREM2 の発現を明らかにした(Satoh J et al. Neuropathology 2010, in press)。さらに創薬モデル系として DAP12 欠損ヒト脳ミクログリア細胞株を樹立した。また治療薬開発の糸口を得るため、カイコモデル系を用いて、DJ-1 の抗酸化ストレス作用を明らかにした。

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

本邦初の TREM2 変異による NHD1 家系 3 症例を精査し、罹患脳の遺伝子発現プロフィールを解明し、新規バイオマーカー RGS1 を発見し、患者由来 iPS 細胞を樹立した。本邦 3 例の NHD 患者剖検脳組織を解析して、ヒトマクロファージ・単球における TREM2 の発現を明らかにした。今後は、変異 DAP12, TREM2 タンパクの構造解析や TREM2 リガンドの同定、患者細胞・組織の遺伝子発現データベースの樹立が必要となる。

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, Sumiyoshi K, Oosumi K, Tabunoki H: Protein microarray analysis identifies human cellular prion protein interactors. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 35(1): 16-35, 2009.
2. Satoh J, Tabunoki H, Yamamura T: Molecular network of the comprehensive multiple sclerosis brain lesion proteome. *Multiple Sclerosis* 15(5): 531-541, 2009.
3. 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.
4. Watanabe H, Tabunoki H, Miura N, Matsui A, Sato R, Ando T: Identification of a new pheromone-binding protein in the antennae of a geometrid species and preparation of its antibody to analyze the antennal proteins of moths secreting type II sex pheromone components. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 73(6): 1443-1446, 2009.
5. 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.
6. 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.
7. 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* 30(3): 415-426, 2010.
8. Shiina Y, Arima K, Tabunoki H, Satoh J: TDP-43 dimerizes in human cells in culture. *Cellular and Molecular Neurobiology* 30(4): 641-652, 2010.
9. 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* 36(4): 320-330, 2010.
10. Satoh J: Bioinformatics approach to identifying molecular biomarkers and networks in multiple sclerosis. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 1(3): 127-140, 2010.
11. Satoh J: MicroRNAs and their therapeutic potential for human diseases: Aberrant MicroRNA Expression in Alzheimer Disease Brains. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 114(3): 269-275, 2010.
12. Satoh J, Tabunoki H, Ishida T, Yagishita S, Jinnai K, Futamura N, Kobayashi M, Toyoshima I, Yoshioka T, Enomoto K, Arai N, Arima K. Immunohistochemical characterization of microglia in Nasu-Hakola disease brains. *Neuropathology* 2010, in press.
13. Numasawa Y, Yamaura C, Shintani S,

Yamazaki M, Tabunoki H, Satoh J. Nasu-Hakola disease with a splicing mutation of TREM2 in a Japanese family. *European Journal of Neurology* 2010, in press.

14. Tabunoki H, Ode H, Banno Y, Katsuma S, Shimada T, Mita K, Yamamoto K, Sato R, Ishii-Nozawa R, Satoh J. BmDJ-1 is a key regulator of oxidative modification in the development of the silkworm. *PLoS One* 2011, in press.
15. 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.
16. 佐藤準一: 多発性硬化症病変分子のネットワーク解析. ヒト免疫疾患研究の新展開-From clinic to bench. *日本臨床免疫学会会誌* 33(4): 182-188, 2010.

著書

17. 佐藤準一: アクアポリン-4(AQP-4). 多発性硬化症(MS)診療のすべて. 山村隆編. 診断と治療社、2011, 印刷中.
18. 佐藤準一: 多発性硬化症(MS)の血液診断. 多発性硬化症(MS)診療のすべて. 山村隆編. 診断と治療社、2011, 印刷中.
19. 佐藤準一: DNA マイクロアレイ. 多発性硬化症(MS)診療のすべて. 山村隆編. 診断と治療社、2011, 印刷中.

2. 学会発表

国際学会

1. 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.

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 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Satoh J: Molecular network of the comprehensive multiple sclerosis brain lesion proteome. Second German-Japanese

Neuroimmunology Symposium. Invited Lecture. Eibsee, 2009.7.11.

7. 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.
8. Satoh J, Tabunoki H, Kim SU, Ishida T, Jinnai K, Arima K: Immunopathogenesis of Nasu-Hakola disease brain lesions. 14th International Congress of Immunology. Kobe, 2010.8.23.
9. Satoh J, Tabunoki H, Kim SU, Ishida T, Jinnai K, Arima K: Immunopathogenesis of brain lesions of Nasu-Hakola disease. 10th International Congress of Neuroimmunology. Barcelona, 2010.10.27.

国内学会

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 佐藤準一: T細胞活性化に対する IFNβ 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.
12. 佐藤準一: 那須ハコラ病の臨床病理遺伝学的研究. 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推進事業研究成果

発表会. 東京 2010.3.12.

13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 佐藤準一、塩谷真央、尾林信哉、天竺桂弘子、石田剛、有馬邦正: アルツハイマー病脳で発現低下している miR-29a の標的遺伝子 neuron navigator 3. 第51回日本神経病理学会学術研究会. 東京、2010.4.24.
18. 高橋広行、中馬越清隆、塩谷彩子、佐藤準一、玉岡 晃: DAP12 遺伝子変異を認めた那須ハコラ病の36歳男性例. 第193回日本神経学会関東・甲信越地方会. 東京、2010.6.5.
19. 佐藤準一、天竺桂弘子、有馬邦正、陣内研二: 那須ハコラ病の臨床病理遺伝学的研究. 第51回日本神経学会総会. 東京、2010.5.20.
20. 佐藤準一: 脳疾患における microRNA 発現の網羅的解析. 第122回日本薬理学会関東部会シンポジウム. 再生医療および中枢性機能疾患における神経分化制御とエピジェネティクス. 静岡、2010.6.5.
21. 佐藤準一、塩谷真央、天竺桂弘子、尾林信哉、有馬邦正、齋藤祐子、石田剛: アルツハイマー病脳で発現低下している miR-29a の標的遺伝子 NAV3. 第33回日本神経科学大会. Neuro2010. 神戸、2010.9.2.
22. Satoh J, Tabunoki H: Comprehensive analysis of human microRNA target networks. The 2010 Annual conference of the Japanese Society for Bioinformatics. Fukuoka, 2010.12.14.
23. 佐藤準一: FTY720 のヒトミクログリアに対するアポトーシス誘導能. 平成22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22年度班会議. 東京、2010.12.17.
24. 天竺桂弘子、嶋田透、伴野豊、三田和英、佐藤令一、野澤玲子、佐藤準一: カイコ DJ-1 オルソログは NO により酸化される. 日本薬学会第131年会. 静岡、2011.3.30.
25. 佐藤準一、吉野隆、小口翔、天竺桂弘子: TDP-43 インターラクトームの分子ネットワーク解析. 日本薬学会第131年会. 静岡、2011.3.30.

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

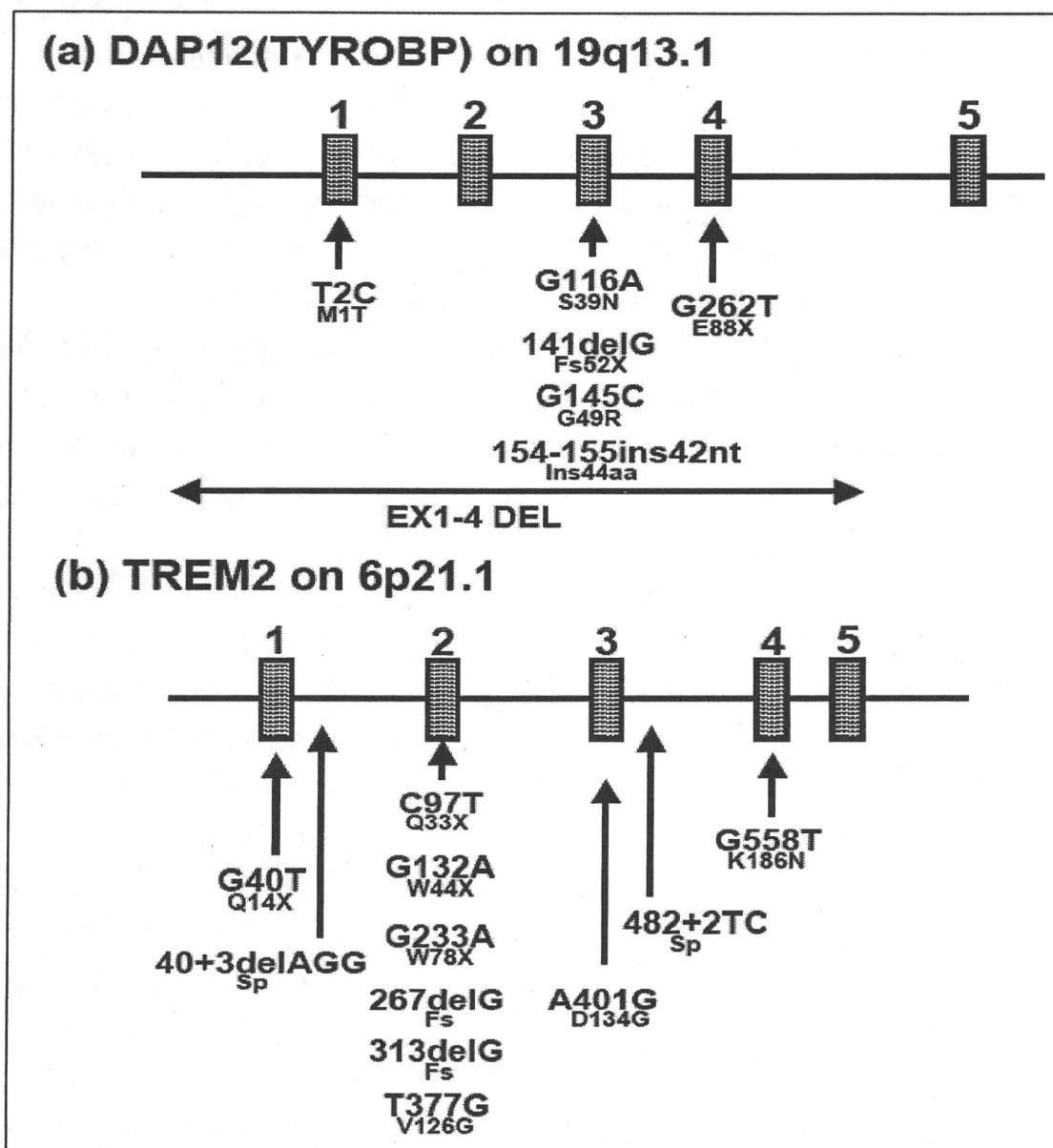


図 1. NHD における遺伝子変異.

(a)DAP12 遺伝子変異 7 種類. (b)TREM2 遺伝子変異 11 種類. 現在までに報告されている 18 種類の遺伝子変異を示す. TREM2(receptor)と DAP12(adaptor)は、破骨細胞、樹状細胞、マクロファージ、ミクログリアの細胞膜上で signaling complex を形成しており、上記の変異は全て機能喪失(loss of function)を引き起こす。

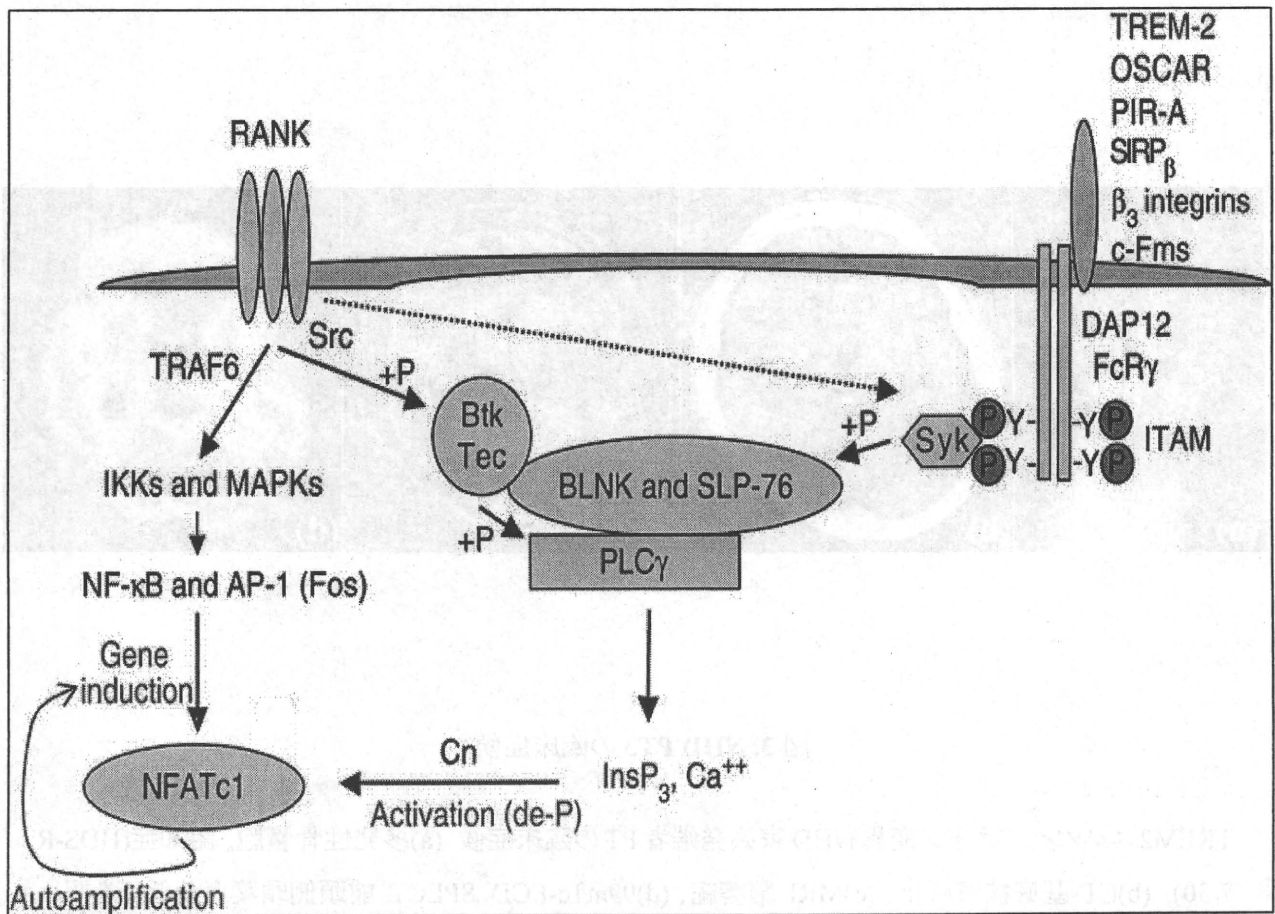


図 2. TREM2/DAP12 シグナル伝達複合体.

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・マクローファージ・ミクログリアの細胞膜に発現しており、受容体TREM2(他にもTREM1, NCR2 (NKp44), SIRPB1, MDL1)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。TREM2のリガンドは明らかにされていない。リガンドの結合親和性に依存して、活性化シグナルまたは抑制性シグナルを伝達する。図はIvashkiv LB. Nat Immunol 10: 340-347, 2009より引用。

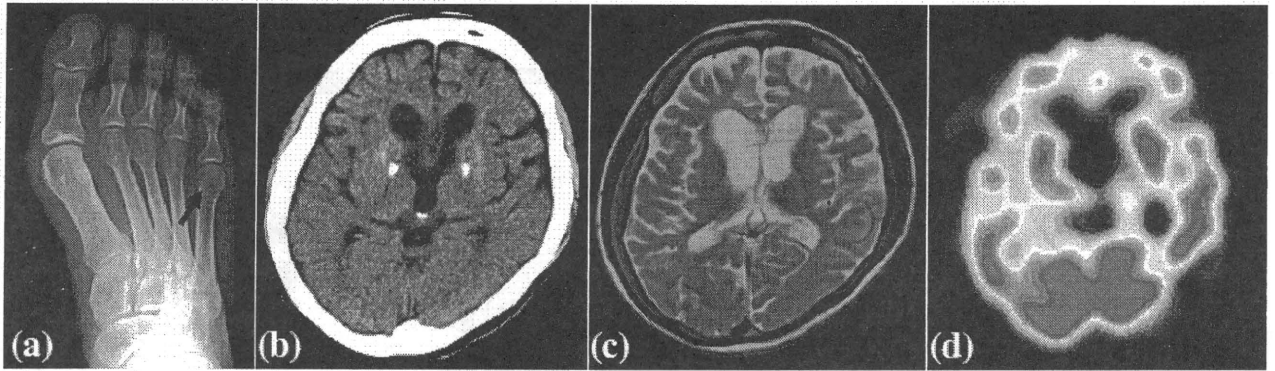


図 3. NHD PT3 の臨床症候.

TREM2 エクソン3 スキップ変異 NHD 家系発端者 PT の臨床症候. (a)多発性骨嚢胞、認知症(HDS-R 7/30), (b)CT 基底核石灰化、(c)MRI 脳萎縮、(d)99mTc-ECD SPECT 前頭側頭葉血流低下を認める。図は Numasawa Y et al. Eur J Neurol 2010, in press より引用。

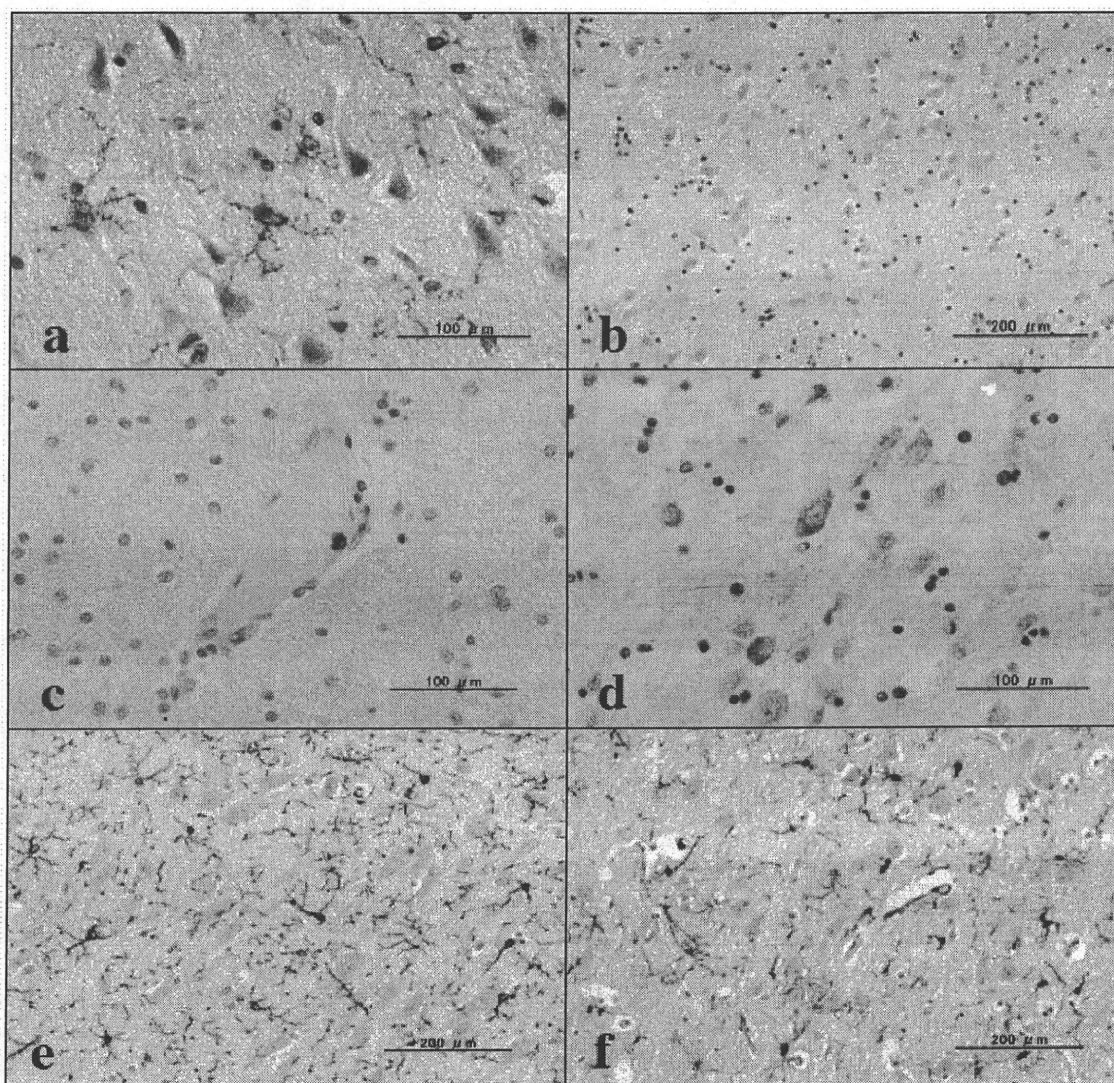


図 4. NHD 脳における DAP12, TREM2, Iba1 の発現.

(a, c, e)コントロール脳. (b, d, f)NHD 脳. (a, b)DAP12, (c, d)TREM2, (e, f)Iba1. NHD 脳では DAP12 の発現を認めない(DAP12 欠損)。TREM2 はヒトミクログリアでは構成的発現を認めず、少数の血管内の単球やマクロファージ、神経細胞に発現している。NHD 患者脳ではコントロール脳と同程度の数の Iba1 陽性ミクログリアを認める。図は Satoh J et al. Neuropathology 2010, in press より引用。

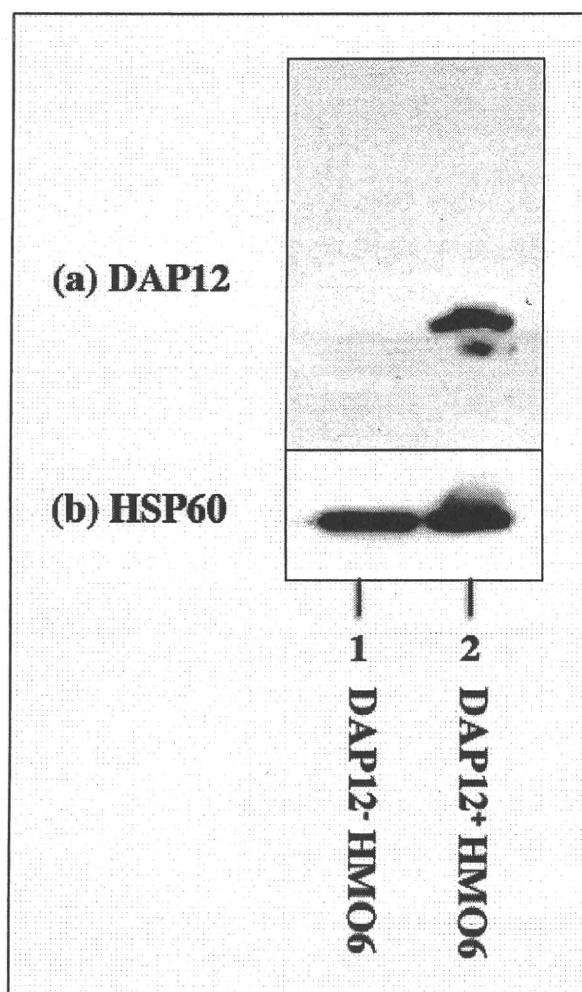


図 5. DAP12 発現陰性および陽性ヒトミクログリア細胞株 HMO6 のウエスタンプロット.

(a)DAP12, (b)HSP60, an internal control of protein loading. DAP12を発現ベクターpEF6-TOPOにクローニングし HMO6(lane 1)に導入、blastocidin で耐性細胞を選択し、DAP12 発現安定細胞株(lane 2)を樹立した。