

Rank	Fold change	Gene ID	Gene symbol	Gene description
Upregulated genes				
1	40.2	5996	RGS1	regulator of G-protein signaling 1
2	13.3	9103	FCGR2C	Fc fragment of IgG, low affinity IIc, receptor for (CD32)
3	13.2	9332	CD163	CD163 molecule
4	12.9	312	ANXA13	annexin A13
5	12.1	4640	MYO1A	myosin IA
6	11.6	7852	CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4
7	11.5	118932	ANKRD22	ankyrin repeat domain 22
8	10.7	84689	MS4A14	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 14
9	10.7	1610	DAO	D-amino-acid oxidase
10	10.4	3606	IL18	interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)
Downregulated genes				
1	0.008	7447	VSNL1	visinin-like 1
2	0.010	2566	GABRG2	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, gamma 2
3	0.010	2554	GABRA1	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 1
4	0.011	5999	RGS4	regulator of G-protein signaling 4
5	0.011	6857	SYT1	synaptotagmin I
6	0.012	6616	SNAP25	synaptosomal-associated protein, 25kDa
7	0.014	8507	ENCI	ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain)
8	0.016	114569	MAL2	mal, T-cell differentiation protein 2
9	0.018	4753	NELL2	NEL-like 2 (chicken)
10	0.018	9899	SV2B	synaptic vesicle glycoprotein 2B

表 1. NHD 脳の遺伝子発現プロフィール

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 発現上昇遺伝子(upregulated genes)および発現低下遺伝子(downregulated genes)を示す。NHD 脳で発現上昇を認める新規バイオマーカーとして RGS1 を同定した。表は Numasawa Y et al. Eur J Neurol 2010, in press より引用。

疾患概要

【疾患名】	那須ハコラ病
【患者数】	約200人
【概要】	<p>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)遺伝子またはTREM2遺伝子の変異を認める常染色体劣性遺伝性疾患である。1970年代に、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、これまでに国内外で200症例以上の報告がある。神経病理学的には、大脳白質の広汎な脱髄・グリオシス・スフェロイドと基底核石灰化を特徴とする。本研究班が平成21年度に、全国の神経内科・精神神経科・整形外科教育研修施設4071カ所を対象に実施したアンケート調査の結果より、本邦における患者数は約200人と推定される。</p>
【原因の解明】	<p>脳のミクログリアや骨の破骨細胞に発現しているDAP12(TYROBP)遺伝子またはTREM2遺伝子の機能喪失変異により発症する。遺伝形式は常染色体劣性遺伝である。現在までに国内外より18種類の遺伝子変異が報告されているが、臨床像はほぼ同一である。脳のミクログリアや骨の破骨細胞に発現しているTREM2とDAP12は、シグナル伝達複合体を形成し、これらの細胞の機能遂行において重要な役割を果たしている。</p>
【主な症状】	<p>臨床経過・病期は4期に分類されている。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):進行性認知症を呈し、50歳ぐらいまでに死亡することが多い。</p>
【主な合併症】	<p>20歳代頃から骨折を繰り返す。30歳代頃から精神神経症状を呈して緩徐に進行し、晩期に寝たきり状態となり誤嚥性肺炎などの感染症を来す。</p>
【主な治療法】	<p>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。</p>
【研究班】	那須ハコラ病の臨床病理遺伝学的研究研究班

Disease Summary

【Name of the disease/symptom】	Nasu-Hakola Disease
【Number of Patients】	Approximately 200 patients in Japan
【Background】	<p>Nasu-Hakola disease (NHD), also designated polycystic lipomembranous osteodysplasia with sclerosing leukoencephalopathy (PLOS; OMIM 221770), is a rare autosomal recessive disorder, clustered in Japan and Finland, characterized by progressive presenile dementia and formation of multifocal bone cysts. The neuropathological hallmark of NHD is profound loss of myelin and axons, and accumulation of axonal spheroids and sudanophilic granules, accompanied by intense astrogliosis predominantly in the frontal and temporal lobes and the basal ganglia. More than 200 cases have been reported worldwide. In 2009, we performed a nation-wide survey of NHD by sending a questionnaire to 4071 hospitals of neurology, psychiatry, and orthopedics. Based on the results of this survey, we estimate the prevalence of approximately 200 NHD patients in Japan.</p>
【Cause】	<p>NHD is caused by a structural defect in one of the two genes, DNAX-activation protein 12 (DAP12), alternatively named TYRO protein tyrosine kinase-binding protein (TYROBP) on chromosome 19q13.1 or triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) on chromosome 6p21.1. The TREM2/DAP12 complex, expressed on natural killer cells, osteoclasts, dendritic cells, and microglia, regulates key signaling events involved in immune responses, differentiation of dendritic cells and osteoclasts, and phagocytic activity of microglia. Currently, 18 different NHD-causing loss-of-function mutations are identified in either DAP12 or TREM2, and they cause an identical disease phenotype.</p>
【Major symptoms】	<p>The clinical course of NHD is classified into four stages: (i) the latent stage with normal early development, (ii) the osseous stage beginning at the third decade of life, presenting with pain and swelling of ankles and feet followed by pathological bone fractures, (iii) the early neuropsychiatric stage occurring at the fourth decade of life, presenting with a frontal lobe syndrome such as euphoria and loss of social inhibitions, often accompanied by epileptic seizures, and (iv) the late neuropsychiatric stage occurring at the fifth decade of life, presenting with profound dementia, loss of mobility, and death usually by age 50 years.</p>
【Major complications】	<p>In the osseous stage beginning at the third decade of life, the patients often suffer from repeated episodes of bone fractures with pain. In the the early neuropsychiatric stage occurring at the fourth decade of life, the patients show various neuropsychaitric symptoms that prevent normal daily life. In the late neuropsychiatric stage occurring at the fifth decade of life, the patients become bedridden accompanied by respiratory and urinary tract infections.</p>
【Major treatments】	<p>No curative treatment is currently available. At present, symptomatic therapy and supportive care are the most important issue, including orthopedic management for bone fractures, psychiatric medications for neuropsychiatric symptoms, and antiepileptic agents for seizures.</p>
【Contact information】	<p>The Study Group entitled "Clinicopathological and Genetic Studies of Nasu-Hakola Disease (H22-Nanchi-Ippan-136)"</p>

那須ハコラ病の臨床病理遺伝学的研究研究班

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・神経医療研究センター病院精神科	部長
	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
	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
	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研究部門	部門長
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 T E L 042-495-8678 F A X 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 T E L 042-495-8624 F A X 042-495-8612 e-mail kakio@my-pharm.ac.jp	

那須ハコラ病診断基準 2009年11月1日

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(舞踏病、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

那須ハコラ病の患者様およびご家族の方へのご案内

那須ハコラ病は、那須毅博士(日本)とハコラ博士(フィンランド)により発見された骨と脳の病気で、遺伝性疾患です。日本と北欧に多く、およそ 20 歳代以降に、手足の骨に嚢胞(のうほう)と呼ばれる空洞が多発し、ささいなことで骨折を反復します。およそ 30 歳代以降に、いろいろな精神症状が出現します。大脳の前頭葉の機能が低下して、人格が変わることもあります。次第に認知症が進行して、正常な社会生活が困難となります。主として整形外科、神経内科、精神科の医師が診察し、特徴的な骨所見と精神神経症状から診断されますが、確定のために遺伝子検査(DAP12 遺伝子および TREM2 遺伝子)が必要になることもあります。常染色体劣性という遺伝形式なため、通常は患者さんのご子息が発病することはありませんが、ご兄弟に同じ病気が見られることはあります。現在、特效薬はなく、対症的な治療法がなされています。

私どもの研究班では、日本における那須ハコラ病の疫学調査、診断基準の作成、遺伝子診断システムの整備、病態モデル系や新規治療法の開発を行っております。

患者様とご家族におかれましては、私どもは主として医療面に関するご相談を郵便による文書で受け付けております。ただし、主治医の先生のご意見を最大限尊重し、私どもからの回答はセカンドオピニオン的なものとしてお考えください。ご相談内容は那須ハコラ病に限ります。個人情報保護のため、メールによるご連絡は受け付けておりません。また皆様からご送付いただきました郵便物は、回答後に当方でシュレッダー裁断し廃棄させていただきます。

2010 年 4 月 11 日

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
「那須ハコラ病の臨床病理遺伝学的研究」班
研究代表者 佐藤 準一

(宛先)〒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
佐藤 準一(宛)

II. 分担研究報告書

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

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、DAP12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、現在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。平成21年度に本研究班が実施した全国調査により、本邦における患者数は約200人と推定されている。現在まで18種類の遺伝子変異が報告されているが、日本からはTREM2遺伝子変異によるNHDの報告はない。本研究では、本邦初のTREM2遺伝子変異に起因するNHDの1家系3例に関して、変異解析と剖検脳の遺伝子発現解析を行った。発端者は36歳女性。てんかん発作で入院。多発性骨嚢胞、認知症、脳萎縮、基底核石灰化、前頭側頭葉血流低下を認めた。DAP12に変異はなく、TREM2エクソン3スキップ変異(c.482+2T>C)と短縮型タンパクの発現を認めた。長兄と次兄も臨床的にNHDが疑われ、39歳と31歳で死亡。長兄の剖検脳のDNAマイクロアレイ解析で、マクロファージ・ミクログリアマーカー遺伝子の発現上昇とGABA受容体サブユニット・シナプス構成タンパクの発現低下を認めた。本家系は本邦初のTREM2スプライス変異によるNHDであり、分子機序として神経変性と炎症の同時進行が示唆された。

研究協力者

新谷 周三 (取手協同病院院長)

沼沢 祥行 (取手協同病院神経内科医師)

山崎 峰雄 (日本医科大学第2内科准教授)

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、現在有効な治療

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、ほぼ同時期に発見された多発性骨嚢胞と白質脳症を主徴とする稀少疾患である (Nasu T et al. Acta Pathol Jpn 23:

法がない難病である(Klünemann HH et al. *Neurology* 64: 1502-1507, 2005)。白質脳症発症の機序は明らかでないが、患者脳では広汎な脱髄、軸索腫大、神経細胞変性脱落、アストログリオシス、およびミクログリア活性化を認める(Paloneva J et al. *Neurology* 56: 1552-1556, 2001)。患者は日本とフィンランドに集積している。平成 21 年度に本研究班が実施した全国調査により、本邦における患者数は約 200 人と推定されている。現在まで 18 種類の遺伝子変異が報告されている(Fig. 1)。しかしながら日本からは TREM2 遺伝子変異による NHD の報告はない。

最近われわれはNHDの1家系3例に関して、遺伝子解析を行い、TREM2エクソン3スキップ変異(c.482+2T>C)を見出したので報告する。本研究の成果は、NHD発症機構解明に貢献し、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. 患者背景

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、MRI で脳萎縮、基底核石灰化、99mTc-ECD SPECT で前頭側頭葉血流低下を認めた。長兄(PT1)と次兄(PT2)も臨床的に NHD が疑われ、39 歳と 31 歳で死亡。長兄は剖検された。妹は異常なし。

2. 遺伝子解析

PT3 の末梢血と PT1 の剖検脳より、genomic DNA を精製し、TREM2 遺伝子、DAPI2 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を行った。PCR産物に関して、3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems)で直接シーケンスを解析した。また peripheral blood mononuclear cells(PBMC)からタンパクを抽出、anti-TREM2 antibody(HPA010917; Sigma)を用いて、western blot 解析を行った。

3. DNA マイクロアレイ解析

PT1 の凍結前頭葉脳組織から total RNA を抽出し、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。コントロールとして、normal human frontal lobe RNA (636563; Clontech)を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は明治薬科大学倫理委員会により承認されている(1904 号)。全ての患者検体は、文書による研究使用への同意を取得して解析に用いた。

C. 研究結果

1. TREM2 遺伝子変異の同定

PT3, PT1 のゲノム DNA の PCR 解析で、TREM2 遺伝子の第 3 インترون第 2 位(the splice-donor consensus site) の T>C 変異(c.482+2T>C)を認めた(Fig. 2a)。患者では exon 3-exon 4 junctional sequence が PCR で増幅されず、第 3 インترونの splicing の異常が示唆された(Fig. 2b)。DAPI2 遺伝子には変異を認めなかった。

健常者 PBMC では、TREM2 は 38-kDa の単一バンドを呈したが、PT3 の PBMC では 27-kDa, 24-kDa の短縮型 TREM2(truncated forms)の発現を認めた(Fig. 2c)。

また、患者 cDNA から PCR で TREM2 open-reading frame (ORF)をクローニングし、4 つの異なるクローンを得た。シーケンズ解析では、全てのクローンで exon 3 を欠失していた(Fig. 3)。

2. 患者脳の遺伝子発現プロフィール解析

PT1 の剖検凍結前頭葉脳組織を用いて、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。

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。発現差異を認めた遺伝子群の分子ネットワークに関して Ingenuity Pathways Analysis (IPA)を行ったところ、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 ($p = 1.00E-168$)との強い関連性が示唆された(Fig. 4)。

D. 考察

本研究では、本邦初のTREM2遺伝子変異に基づくNHDの1家系3例に関して、変異解析と剖検脳の遺伝子発現解析を行った。3例とも臨床所見と臨

床経過はNHDに一致している。本家系では TREM2エクソン3スキップ変異(c.482+2T>C)と短縮型タンパクの発現を認めた。同一の変異は、過去イタリア人NHD家系の患者2例でのみ報告されている(Salmaggi A et al. J Neurol 250: 878-880, 2003)。本研究では、世界で初めて、剖検脳のDNAマイクロアレイ解析を行い、マクロファージ・ミクログリアマーカー遺伝子の発現上昇とGABA受容体サブユニット・シナプス構成タンパクの発現低下を認めた。すなわち、病態形成の分子機序として神経変性(neurodegeneration)と神経炎症(neuroinflammation)の同時進行が示唆された。

E. 結論

本邦初のTREM2遺伝子変異に基づくNHDの1家系において、TREM2エクソン3スキップ変異(c.482+2T>C)を認めた。罹患脳では神経変性(neurodegeneration)と神経炎症(neuroinflammation)の同時進行を示唆する遺伝子発現プロフィールが見られた(Numasawa et al. European Journal of Neurology 2010, in press)。炎症と変性を同時に制御する治療薬の開発が望まれる。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照。

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 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.
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:カイク 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:カイク 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

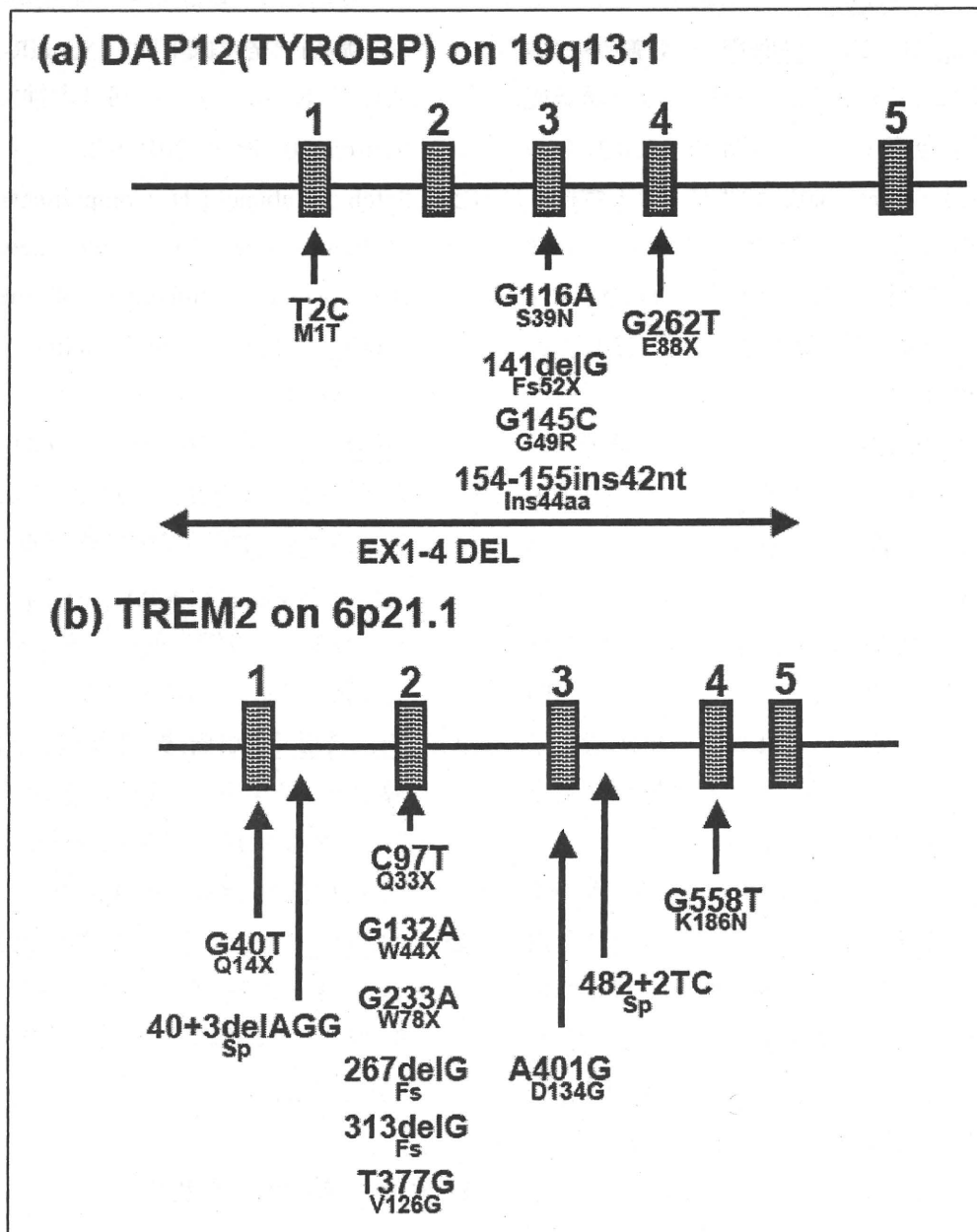


図 1. NHD で報告されている遺伝子変異.

(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、ミクログリアで signaling complex を形成しており、どちらかの遺伝子変異は機能喪失(loss of function)を引き起こす。

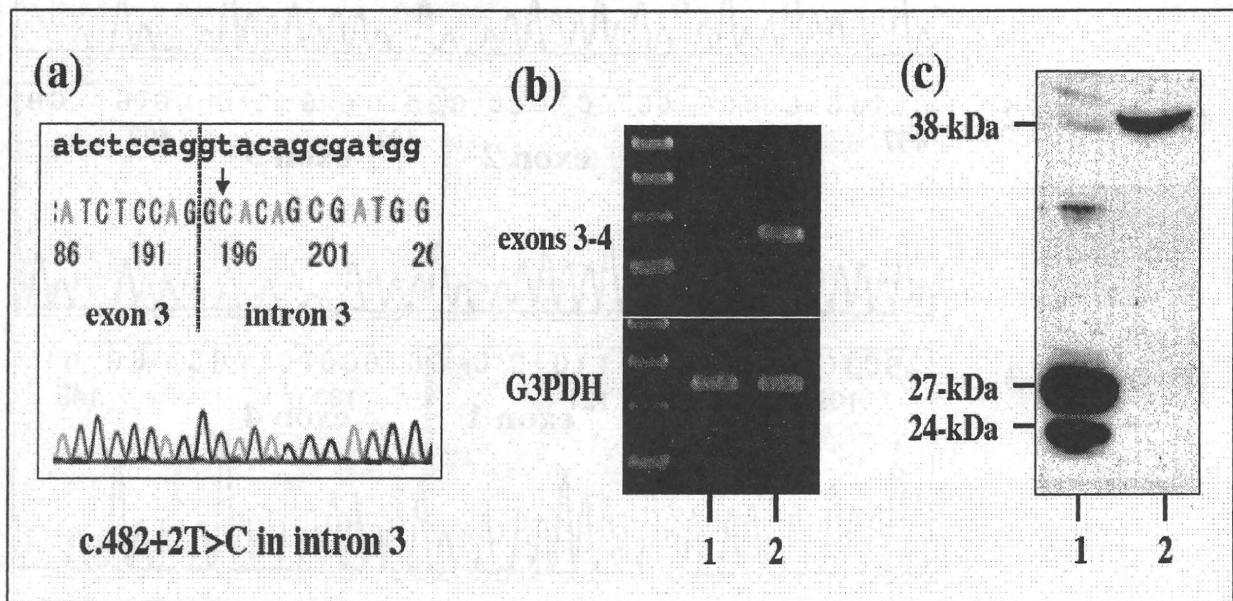


図 2. 患者における TREM2 c.482+2T>C 変異.

(a) TREM2 遺伝子変異. PT3, PT1 のゲノム DNA を解析し、TREM2 遺伝子の第 3 イントロン第 2 位の the splice-donor consensus site において T>C 変異(c.482+2T>C)を認めた。(b) エクソン 3-エクソン 4 接合部. PCR で exon 3-exon 4 junctional sequence は、健常者では増幅された(lane 2)が、PT3 では増幅されなかった(lane 1)。G3PDH を housekeeping gene (internal control)として用いた。(c) TREM2 タンパク質の発現. 健常者 PBMC では TREM2 は 38-kDa の単一バンドを呈したが(lane 2)、PT3 では 27-kDa, 24-kDa の短縮型(truncated forms)が発現していた(lane 1)。

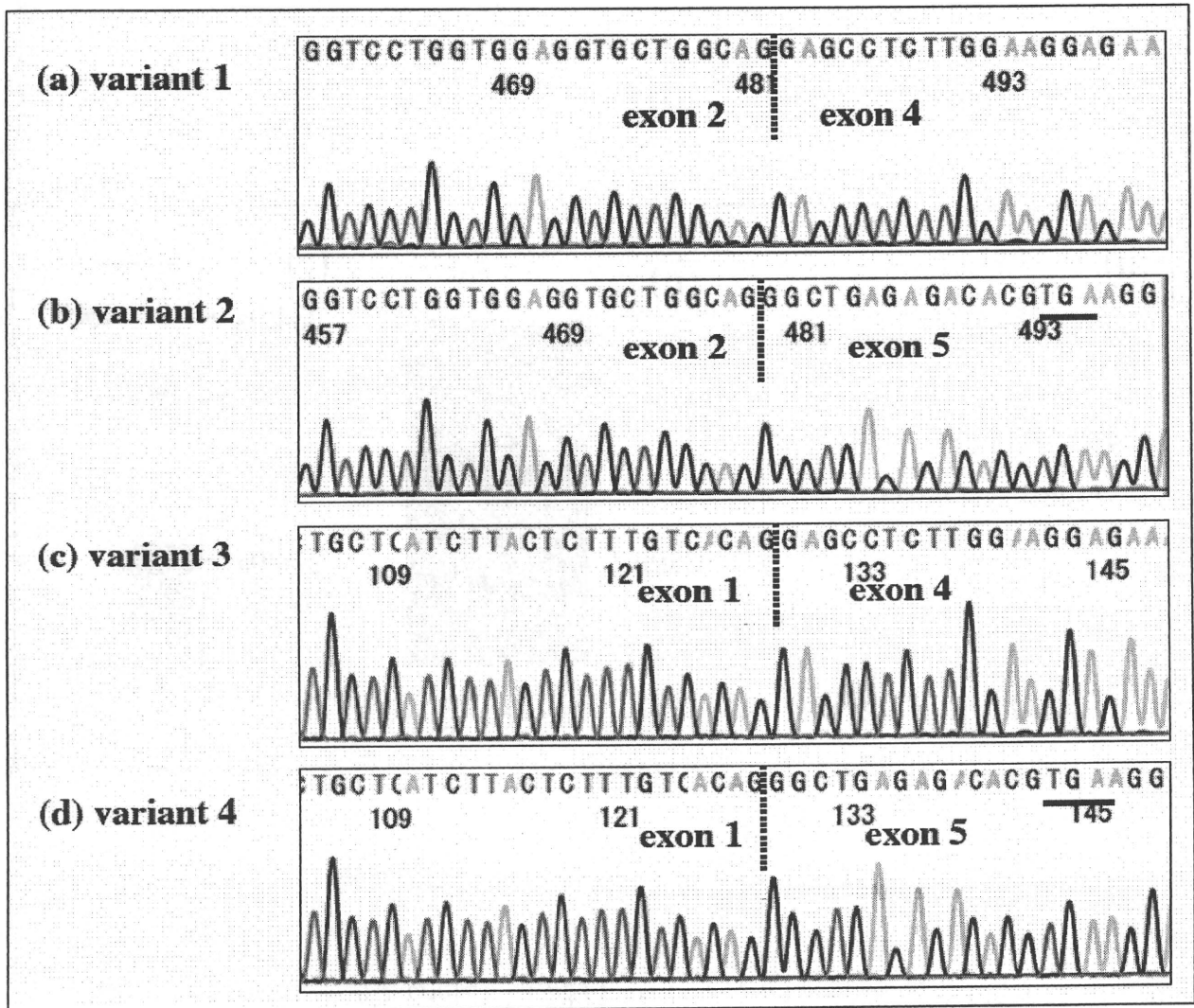


図 3. TREM2 exon 3 skipping.

PT3 の cDNA から PCR で TREM2 ORF をクローニングし、4 つの異なるクローンを得た(a-d)。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。予測分子量は(a) variant 1: 157 amino acids (35-kDa), (b) variant 2: 135 amino acids (28-kDa), (c) variant 3: 40 amino acids (11-kDa), and (d) variant 4: 18 amino acids (0.5-kDa). TREM2 タンパク全長は 230 amino acids で、13 amino acids のシグナルペプチド、リガンド結合部位である 154 amino acids の細胞外 Ig スーパーファミリードメイン (Ig-SF), DAP12 結合部位である 33 amino acids の膜貫通ドメイン(TM), 30 amino acids の細胞内ドメインにより構成されている。Variants 1, 2 は IgSF を有するが TM がなく、variants 3, 4 は IgSF, TM 両者を欠く。いずれも non-functional mutations である。

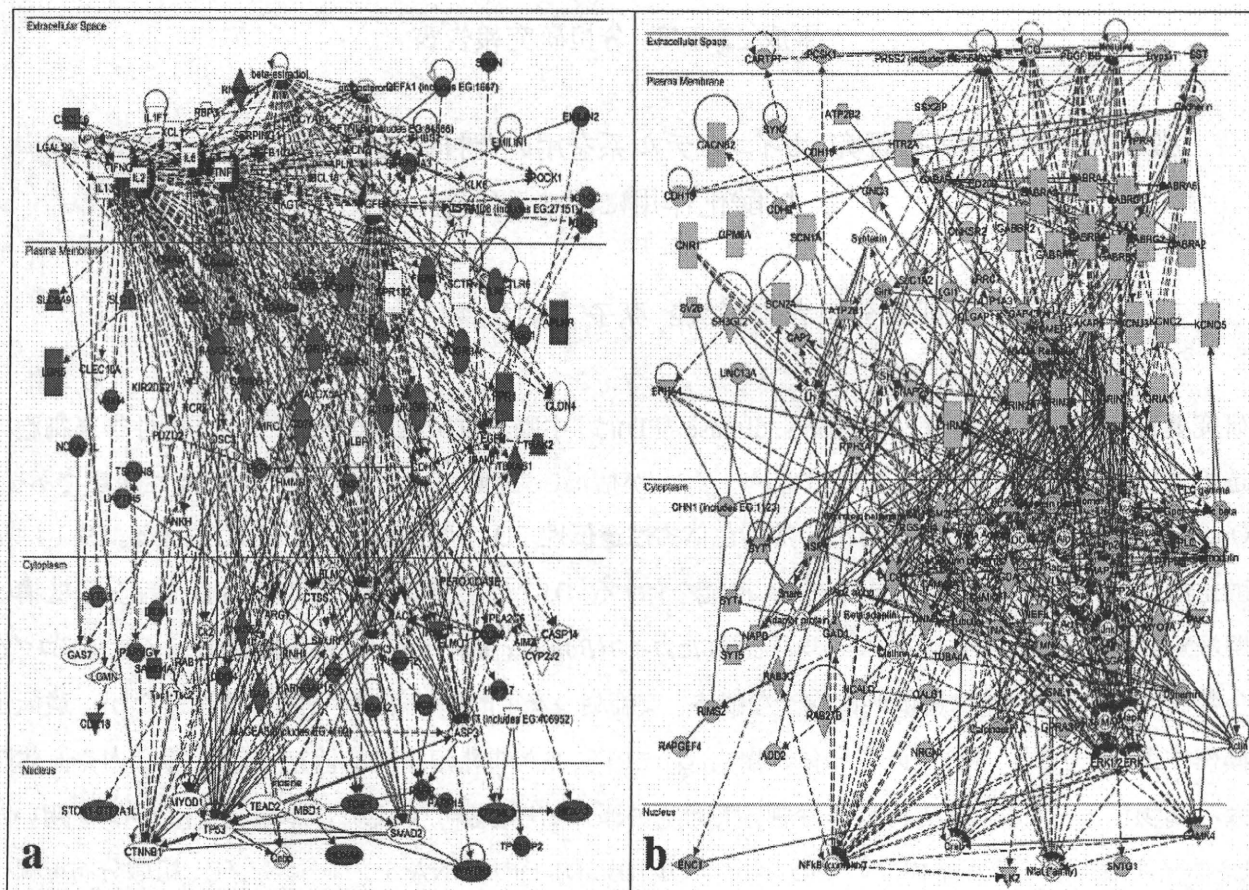


図 4. Molecular network of deregulated genes in the NHD brain.

PT1 の剖検凍結前頭葉脳組織を用いて、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、分子ネットワークを Ingenuity Pathways Analysis (IPA) tool で解析した。(a) 発現上昇遺伝子群の分子ネットワーク。Inflammatory response, cellular movement, and immune cell trafficking ($p = 1.00E-116$) との関連性が示唆された。(b) 発現低下遺伝子群の分子ネットワーク。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。

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

研究分担者 天竺桂 弘子 明治薬科大学助教

研究要旨 パーキンソン病(Parkinson's disease; PD)は、中脳黒質緻密層のドーパミン作動性神経細胞の選択的変性脱落により、大脳基底核でドーパミンが枯渇し、運動障害を発症する神経変性疾患である。Oncogene として発見された DJ-1 は、常染色体劣性遺伝性 PD の原因遺伝子(PARK7)である。DJ-1 は抗酸化活性、プロテアーゼ活性、シャペロン機能を有する。DJ-1 の機能喪失変異による PD 発症分子機構は明らかでない。2006 年に全ゲノムが解読されたカイコ(*Bombyx mori*)は、ヒト疾患関連遺伝子オルソログを多数有している。カイコは遺伝的に均一な個体を安価かつ安定的に供給できる鱗翅目昆虫であり、遺伝子操作技術も確立され、500 種の変異体が樹立されている。また哺乳類相同的器官を有し、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。本研究ではカイコを用いたヒト神経変性疾患モデル系樹立のため、カイコ DJ-1(BmDJ-1)の cDNA をクローニングし、組織分布を調べ、*in vivo* 抗酸化能を解析した。本研究の成果は、難治性神経疾患である那須ハコラ病(Nasu-Hakola disease; NHD)における神経変性機序の解明および新規神経保護薬の開発につながる。

研究協力者

尾出 洋章 (明治薬科大学大学院修士課程 2 年)

A. 研究目的

パーキンソン病(Parkinson's disease; PD)は、中脳黒質緻密層のドーパミン作動性神経細胞が選択的に変性脱落し、大脳基底核でドーパミンが枯渇し、運動障害を発症する神経変性疾患である。本邦における PD 患者数は約 14 万人と推定され、その大部分を孤発性 PD が占めている。

一方、遺伝性 PD は全患者の 5-10%程度を占

め、現在まで 11 の責任遺伝子が同定されている。

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の PD 家系で遺伝子変異を認め、PARK7 と命名された。DJ-1 は抗酸化活性、プロテアーゼ活性、シャペロン機能を呈する。しかしながら現在まで、DJ-1 の機能喪失変異による PD 発症分子機構は解明されていない。

1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP), paraquat, 6-hydroxydopamine(6-OHDA), rotenone は、ミトコンドリアで活性酸素種(reactive oxygen species; ROS)を発生させて、電子伝達系

complex I を阻害する化合物である。孤発性PDにおいて、酸化型 DJ-1 およびミトコンドリア機能障害が見られることから、酸化ストレスやミトコンドリア機能障害による神経細胞死が、PD 発症機序の 1 つとして考えられている(Bandopadhyay R et al. Brain 127: 420-430, 2003)。

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を解読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、500 種の変異体が樹立されており、遺伝子操作技術も確立されている。またカイコは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、カイコを用いたヒト神経変性疾患モデル系樹立のため、カイコ DJ-1(BmDJ-1)の cDNA をクローニングし、組織分布を調べ、*in vivo* における抗酸化能を解析した。那須ハコラ病(Nasu-Hakola disease; NHD)は、DAP12, TREM2 遺伝子の機能喪失変異により、多発性骨嚢胞と白質脳症を呈する難病である。罹患脳では軸索腫大(axonal spheroid)を認める。神経細胞死には酸化ストレスやミトコンドリア機能障害が関与している可能性がある。本研究の成果は、NHD における神経変性機序の解明や新規神経保護薬の開発および、厚生労働行政を主導とする患者 QOL の向上につながる可能性がある。

B. 研究方法

1. BmDJ-1 のクローニングと発現分布の解析

カイコ(錦秋鐘和; 上田蚕種) 5 齢 5 日幼虫脳から常法に従い cDNA を合成した。

KAIKOBASE(<http://sgp.dna.affrc.go.jp/index.html>)を用いて EST データベースから *Drosophila melanogaster* (Dm)DJ-1alpha(NM_137072), beta(NM_143568)をクエリーとして、相同配列を得た。この配列をもとに primers を作成、PCR で増幅、p3T vector(MobiTec)にクローニングした。また Genetix Ver.8.2.0 でマルチプルアライメントを解析し、CLC Free work bench Ver.4.0.1 Tree viewer により近接結合法で系統樹を作成した。さらに SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de>)でドメインを解析し、Silkworm Genome Database(<http://sil-kworm.genomics.org.cn>)で遺伝子座を同定した。

また 5 齢 5 日幼虫の脳、絹糸腺、中腸、マルピギー管、脂肪体、卵巣、精巣の total RNA を用いて、RT-PCR とノーザンブロットで BmDJ-1 mRNA の発現分布を解析した。

さらに抗体作成のため BmDJ-1 ORF を pTrcHis-TOPO vector(Invitrogen)にクローニングし、大腸菌で Xpress-His タグ付加 recombinant BmDJ-1(rBmDJ-1)を発現させ、HIS-Select Spin Column(Sigma)で精製、アジュバントと混和して、ウサギに皮下注射した。2 回追加免疫を行い、ネブタール麻酔下で全血を採取した。

2. BmDJ-1 組み換え BmNPV の作成

カイコ卵巣細胞 BmN4(日本農産)は 28°C, 10% FBS 添加 TC-100 medium(日本農産)で培養した。BmDJ-1 をトランスファーベクター pBK283 にクローニングし、カイコ核多角体ウイルス(BmNPV)および Cellfectin Reagent(Invitrogen)と混合し、BmN4 細胞培養液中に添加、28°C, 3 日間培養し、形質転