

換を行い、BmDJ-1をBmNPVに導入した。培養上清を用いて、形質転換を3回繰り返し、DJ-1/BmNPV組み換えウイルスを得た。

3. Rotenone による酸化ストレス負荷

BmN4 培養系に、50 μ M Rotenone(Rot)を添加して16時間培養後、Mitochondria Isolation Kit for cultured cells(Pierce)を用いてミトコンドリアを精製した。Rotenone はミトコンドリア電子伝達系複合体 I を阻害し、酸化ストレス誘導性細胞死を惹起する化合物である。

予備実験として5齢3日幼虫を用いて、Rot LD50 = 10.1 μ g/g を決めた(95% confidence interval 6.02-17.4)。次にSASを用いて、RotとBmDJ-1同時投与による生存・死亡有意差検出モデルを構築したところ、LD70 = 20.9 μ g/g (95% confidence interval 12.7-46.8)にあたる20 μ g/gが最適であることが分かった。従って以降の実験は、Rotのin vivo投与量を20 μ g/gに設定した。

5齢3日幼虫を体重の平均が一致するように3群に分け、体重1g当たり2 μ g/ μ l Rot 10 μ l (LD70)を血体腔内投与した。50 ng rBmDJ-1, 50 ng rLacZ, or PBSを同時に血体腔内に投与し、24 hr後の死亡数を計測した。

また5齢0日幼虫を用いて、体重の平均が一致するように2群に分け、DJ-1/BmNPV(MOI=5) or empty/BmNPVを血体腔内に投与し、ウイルスを感染させた。感染5日後に、体重1g当たり2 μ g/ μ l Rot 10 μ l (LD70)を血体腔内投与し、24 hr後の死亡数を計測した。全ての実験は3回繰り返し、SAS Ver.8.0.2で統計学的検定を行った。

(倫理面への配慮)

本研究ではカイコを使用しており、倫理的な問題は考慮する必要がない。

C. 研究結果

1. BmDJ-1 のクローニングと発現分布

DmDJ-1alpha, betaをQueryに、Bm ESTデータベースから候補配列NRPG1136を得た。PCRで増幅した配列には開始コドンが欠いていたため、5'RACE法で全長を得た。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ドメインを有していた。オルソログに関しては、*C. elegans* Djr-1.2(NM_071731) と 39%, DmDJ-1alpha(NM_137072)および*M. musculus* DJ-1(NM_020569) と 50%, *R. norvegicus* DJ-1(NM_057143) および *G. gallus* DJ-1(NM_204585) と 51%, *C. elegans* Djr-1.1(NM_061295) および *H. sapiens* DJ-1(NM_001123377) と 52%, *D. rerio* DJ-1(NM_001005938) および Dm DJ-1beta(NM_143568)と55%の相同性を認め、系統樹ではDmDJ-1とは別のクラスターに位置していた(Fig. 1a, b)。またBmDJ-1は23番染色体上(2995719-2998746)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、血球で構成的発現を認め(Fig. 2a)、転写産物は単一(750 bp)であった。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。

BmDJ-1(21.5-kDa)は発育ステージが上がるごとに発現量が増加し、5 齢から成虫にかけて、周期的に増減を繰り返していた。

2. Rotenone による酸化ストレス負荷

BmN4 を 100 μ M Rot に 3 hr 暴露(酸化ストレス負荷)したところ、発現量が顕著に増加した。抗 BmDJ-1 抗体で免疫沈降を行い、沈降物を 2 次元電気泳動で分離し、ウエスタンブロットにより非酸化型 BmDJ-1 (pI 5.1), 酸化型 BmDJ-1 (pI 4.9)を検出出来た。Rot 投与により酸化型 BmDJ-1 の増加を認めた(PI shift)(Fig. 2b)。また細胞質分画とミトコンドリア分画において、酸化ストレス負荷により BmDJ-1 発現量の増加を認めた。

5 齢 4 日幼虫に 20 μ g/g Rot と rBmDJ-1, rLacZ, PBS を同時に投与し、24 hr 後の死亡数を計測した結果、rBmDJ-1 投与群では LacZ 投与群に比べ Rot による死亡率が有意に低下していた (Fig. 3a)。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 Rot を投与し、24 hr 後の死亡数を計測した結果、empty(control)群に対し DJ-1 群では、Rot による死亡率が有意に低下していた(Fig. 3b)。

D. 考察

本研究では、カイコ幼虫脳 cDNA より BmDJ-1 をクローニングし配列を決定した。他生物種の DJ-1 と比較して約 50%の高い相同性を保持し、機能発現に重要な Cys106 と Leu166 が保存されており、DJ-1/ThiJ/PfpI スーパーファミリーに属するカイコのオルソログであると考えられた。全ての組織とステ

ージで構成的発現を認めた。Cys106 は酸化ストレス下で、自己酸化により sulfonic acid form に変化すると pI shift を呈して、ミトコンドリアへ局在が移動し、細胞死に対して保護機能を呈するようになる (Blackinton J et al. J Biol Chem 284: 6476-6485, 2009)。また、Leu166 は DJ-1 の dimer 化に関与する。Leu166 に変異を認める場合は、DJ-1 のプロテアソームでの分解が促進される (Miller DW et al. J Biol Chem 278: 36588-36595, 2003)。

カイコは 5 齢幼虫ステージになると、体のサイズが飛躍的に増大し、5 齢幼虫後半までに精巣では成熟精子が完成する。蛹のステージでは、アポトーシス機序により幼虫組織を溶解し、成虫の組織に作り変えている。体組織の成長時には、細胞分裂が活発となり、ミトコンドリア電子伝達系を介するエネルギー産生も高まる。その際に大量の ROS が放出される。昆虫の変態時に活性酸素の産生が増大することは既に報告されている。従って、5 齢幼虫から成虫に至るまでの BmDJ-1 の発現量の周期的な変動は、成長や変態に伴い発生する ROS に応答する増大の可能性が考えられる。

また組み換えタンパク投与実験と組み換えウイルス感染実験の結果より、BmDJ-1 はカイコ幼虫において、Rot による酸化ストレス誘導性個体死から防御することが明らかとなった。

E. 結論

カイコ DJ-1 オルソログ(BmDJ-1)のクローニングに成功した。BmDJ-1 は in vivo で Rotenone による酸化ストレス誘導性個体死に対して防御作用を示した。NHD の白質脳症・軸索傷害・神経変性過

程において酸化ストレスが関与している可能性がある
あるので、強力な保護作用を有する DJ-1 は治療
薬となる可能性がある(PLoS One 2010, in press)。

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, 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.
11. 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.

12. 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.

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, 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.
7. 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. 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.
 9. 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 IFNβ の効果. 第 22 回日本神経免疫学会学術集会. 東京、2010. 3.18.
 10. 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.
 11. 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.
 12. 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.
 13. 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.
 14. 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.
 15. 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.
 16. 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.
 17. 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.
 18. 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

(a)

B.mori	1	-----NSKSALVIL-AQGAEMETVITVDMLRRGGVITVLAGLEGSSPVLCSRQVTLVPDKSLIEAL	61
D.melanogaster (beta)	1	-----MVFFGFPQISRHFSEKFTKMSKALVIL-APGAEMEFIIAADVLRRAIKVIVVAGLNGGEAVRCSREVVQILPDTSLAQ-V	78
D.melanogaster (alpha)	1	MLSVLRKSFNGVTHARRVIRCKSNQDRCARNALVIL-APGAEMEFTISADVLRRAIKVIVVAGLHDCEPVCSSRVVIVPDTSLIEAV	89
C.elegans (1.1)	1	-----HAQKSALILAAEGAEMEVIITGDVLRARGEIRVVYAGLDGAEFVPCARGAHIVPDVKLEDVE	63
C.elegans (1.2)	1	-----MAAQKSALILPPDAEEIEVIVTGDVLRGGGLQVLYAG-SSTFVRCARGARIVPDVALKDVK	63
D. rerio	1	-----MAGKRALVIL-ARGAEMETVIFVDVMRRAGIIVVAVAGLAGKEFVQCSREVMICPDSSLEDAH	62
G.gallus	1	-----MASHKRALVIL-ARGAEMETVIFVDVMRRAGIKVIVVAVAGLAGKDFVQCSREVMICPDASLEDAK	62
H.sapiens	1	-----MASHKRALVIL-ARGAEMETVIFVDVMRRAGIKVIVVAVAGLAGKDFVQCSREVMICPDASLEDAK	62
M.musculus	1	-----MASHKRALVIL-ARGAEMETVIFVDVMRRAGIKVIVVAVAGLAGKDFVQCSREVMICPDASLEDAK	62
R.norvegicus	1	-----MASHKRALVIL-ARGAEMETVIFVDIMRRAGIKVIVVAVAGLAGKDFVQCSREVMICPDASLEDAK	62
B.mori	62	AERQQYDAVILPGGLEGSDSLKSEKVGALLKDHEENKIIAARI*CAAPIAFAAHGVARGRRVTSYPSTRDK-LSAGDYTYVEGERVVVDG	150
D.melanogaster (beta)	79	A-SERFDVVVLPGLGGSNAGESLVDLLRSQESGGIIAACAAPVLRKHGVAAGRSLSYSPMRPQ-L-VNYSYVDDRTVVKDG	165
D.melanogaster (alpha)	90	T-RGDYDVVVLPGGLAGNKALMNSAVGDLRQCQSKGLIARICAAPIALAKHGIGKGRSITSHPMRPPQ-L-KELYCIDDKTVVQDG	176
C.elegans (1.1)	64	T--EKFDIVILPGGPGSNTLAESELLVRDLKQVESGGLIARICAAPIALLSHGV-KAELVTSHPVSKK-LEKGGYKY-SEDRVVVSG	148
C.elegans (1.2)	64	N--KTFDIIIPGG-PGCSKLAECFVIGELLKTKVSKGLIARICAAPIALLSHGI-VAERVICHTYVSKK-MTEGGYKY-LDDNVVVISD	147
D. rerio	63	K-QGPDVVVLPGLLGAQNLSESPAVKEVILKQCEGRGLIARICAGPTALLAHGIAGSTVITHPGAKDRMNGHDHYKY-SEARVQKDG	150
G.gallus	63	K-EGPYDVVLPGGNLGAQNLSESAAVKDLKQCESRGLIARICAGPTALLAHGIGFGSKVITHPLAKDKMMNGAHYCY-SESRVERDG	150
H.sapiens	63	K-EGPYDVVLPGGNLGAQNLSESAAVKEILKQENRRGLIARICAGPTALLAHEIGFGSKVITHPLAKDRMNGGHYTY-SENVRERDG	150
M.musculus	63	T-QGPDVVVLPGGNLGAQNLSESPVKEILKQCESRGLIARICAGPTALLAHEVGFCKVITHPLAKDRMNGSHYSY-SESRVERDG	150
R.norvegicus	63	T-QGPDVVVLPGGNLGAQNLSESAVKEILKQENRRGLIARICAGPTALLAHEVGFCKVITHPLAKDKMMNGSHYSY-SESRVERDG	150
B.mori	151	NVVISRGGGTAYWFGTLIELLIGKEKADQVKGMLISQY--	190
D.melanogaster (beta)	166	NLITSRGPGTAYEFALKIAEELAGREKVCVARGLVAYN-	205
D.melanogaster (alpha)	177	NIITSRGPGTTFDFALKITEQLVGAEVAKAVAKMLWTYK-	217
C.elegans (1.1)	149	KIITSRGPGTAFEFALKIVELLEGRKATSLIAPMLLRL--	187
C.elegans (1.2)	148	RVITSRGPGTAFEFALKIVETLEGPERINSLLKPLCLAK--	186
D. rerio	151	NVITSRGPGTSFEFALTIIVEELMGAEVAAQVKAPLILRD--	189
G.gallus	151	NLITSRGPGTSFEFALAIVEALMGREVAEQVKAPLILRD--	189
H.sapiens	151	LITSRGPGTSFEFALAIVEALNGREVAQVKAPLILRD--	189
M.musculus	151	LITSRGPGTSFEFALAIVEALVGRDMANQVKAPLILRD--	189
R.norvegicus	151	LITSRGPGTSFEFALAIVEALSGKDMANQVKAPLILRD--	189
		Identity	similarity
		50.0	86.7
		55.1	91.4
		51.9	83.8
		38.8	83.6
		54.5	86.1
		51.3	85.6
		51.9	86.6
		50.3	87.2
		51.3	87.7

(b)

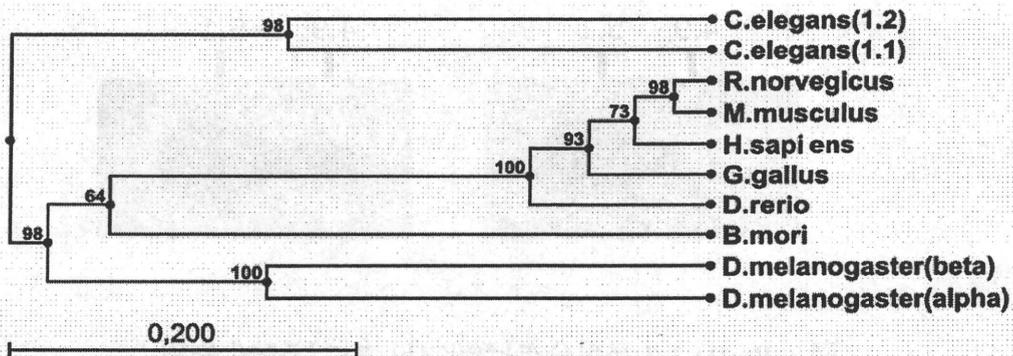


図 1. BmDJ-1 のクローニング。

(a) マルチプルアラインメント解析. カイコ 5 齢 5 日幼虫脳 cDNA から BmDJ-1 をクローニングし、シーケンスを解析、マルチプルアラインメントを行った。他生物種の DJ-1 とは約 50% の高い相同性を保持し、DJ-1 ファミリー特有の PflI ドメインを有していた。(b) 系統樹解析. 近接結合法では、BmDJ-1 はショウジョウバエ DmDJ-1alpha, DmDJ-1beta とは別のクラスターに分離された。

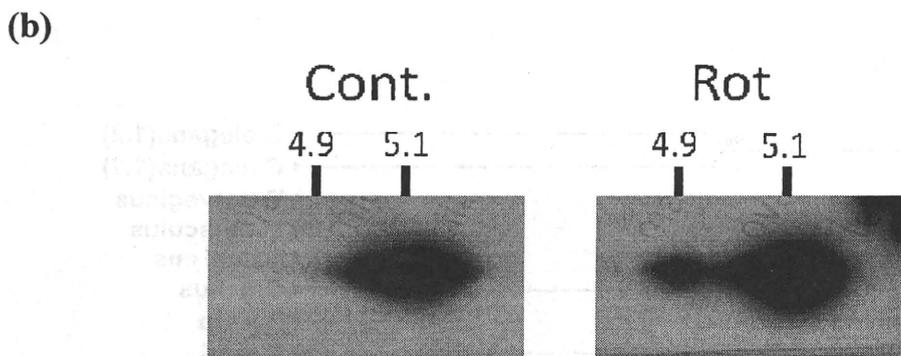
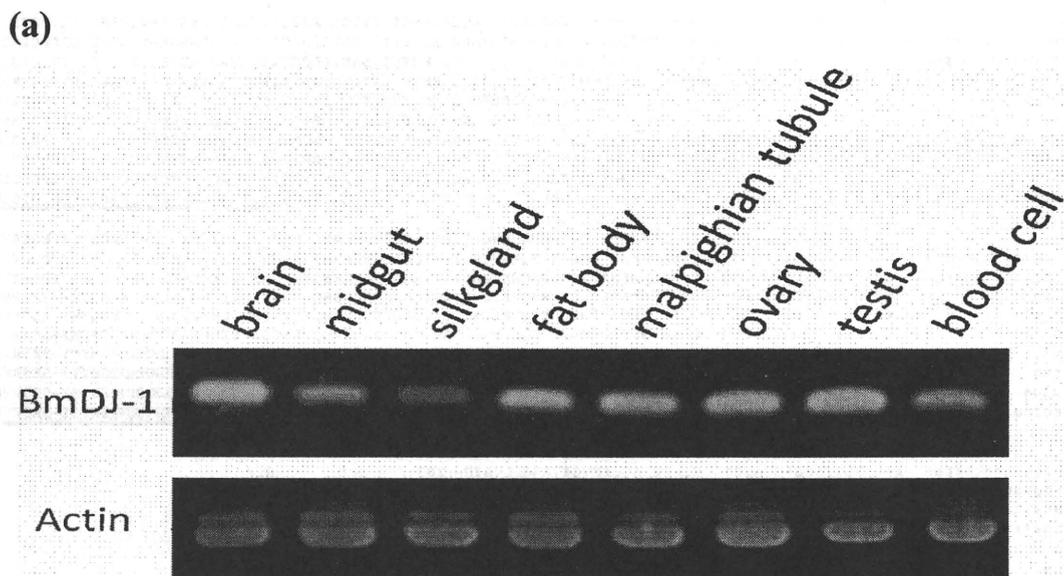


図 2. BmDJ-1 の発現分布と酸化ストレスによる酸化修飾.

(a)RT-PCR. 5 齢 5 日幼虫では脳、中腸、絹糸線、脂肪体、マルピギー管、卵巣、精巣、卵巣、血球における BmDJ-1 mRNA の構成的発現を認めた。(b)2D-PAGE. BmN4 を 100 μ M Rotenone(Rot)に 3 hr 暴露後、2 次元電気泳動とウエスタンブロットで非酸化型 BmDJ-1 (pI 5.1), 酸化型 BmDJ-1 (pI 4.9) を検出した。Rot 投与により酸化型 BmDJ-1 の増加を認めた(PI shift)。

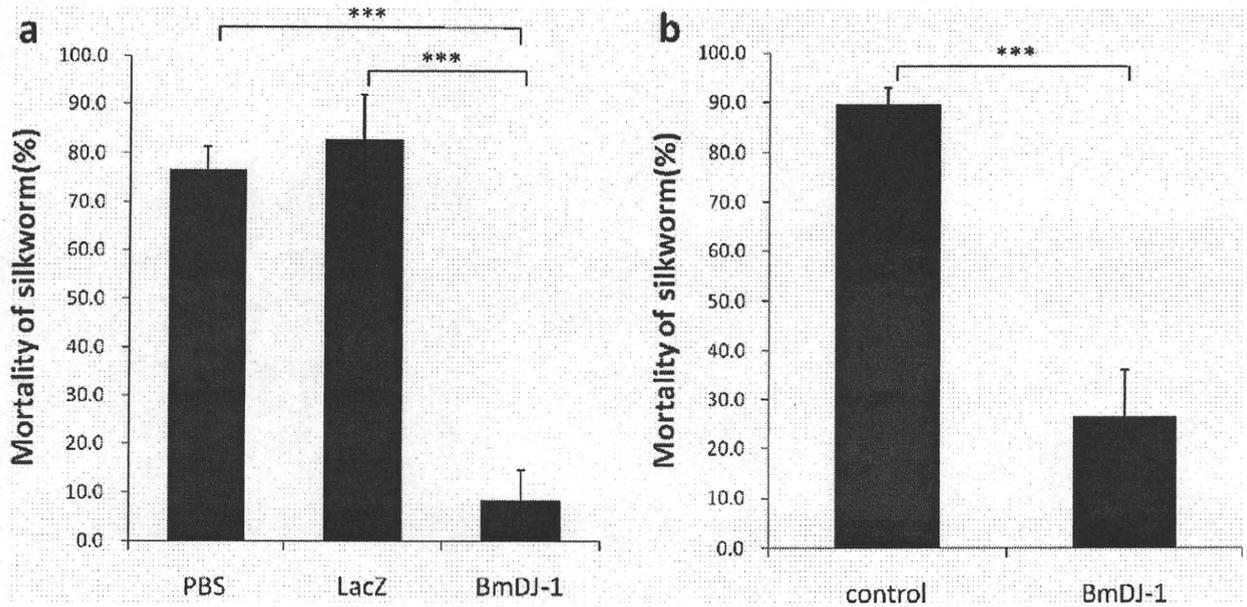


図 3. Rotenone による酸化ストレス誘導性個体死に対する BmDJ-1 の防御作用.

(a)組み換え型 BmDJ-1(rBmDJ-1)タンパク投与による酸化ストレス誘導性個体死防御作用. 5 齢 4 日幼虫に 20 µg/g Rotenone と rBmDJ-1, rLacZ, PBS を血体腔内に同時に投与し、24 hr 後の死亡数を計測した。(b)BmDJ-1 組み換え型ウイルス感染による酸化ストレス誘導性個体死防御作用. 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 µg/g Rotenone を投与し、24 hr 後の死亡数を計測した。

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	出版社名	出版年
		書籍名	出版地	ページ
佐藤 準一	アクアポリン-4(AQP-4).	山村 隆	診断と治療社	2011
		多発性硬化症(MS)診療のすべて.	東京	印刷中
佐藤 準一	多発性硬化症(MS)の血液診断.	山村 隆	診断と治療社	2011
		多発性硬化症(MS)診療のすべて.	東京	印刷中
佐藤 準一	DNAマイクロアレイ.	山村 隆	診断と治療社	2011
		多発性硬化症(MS)診療のすべて.	東京	印刷中

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
Satoh J, Tabunoki H, Yamamura T	Molecular network of the comprehensive multiple sclerosis brain lesion proteome.	Multiple Sclerosis	15(5)	531-541	2009
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(3)	423-438	2009
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
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
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
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
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
Satoh J	Bioinformatics approach to identifying molecular biomarkers and networks in multiple sclerosis.	Clinical and Experimental Neuroimmunology	1(3)	127-140	2010
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
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		in press	2010
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		in press	2010
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		in press	2011
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
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)	1182-1188	2010

IV. 研究成果の刊行物・別刷

多発性硬化症(MS)診療のすべて

Mini Lecture

アクアポリン-4 (AQP-4)

佐藤 準一

明治薬科大学薬学部生命創薬科学科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 & Fax: 042-495-8678

Jun-ichi Satoh

Department of Bioinformatics, Meiji Pharmaceutical University, 2-522-1 Noshio,
Kiyose, Tokyo 204-8588, Japan.

Tel & Fax: 042-495-8678

1. AQP4 の発現分布

アクアポリン(aquaporin; AQP)は、水分子を選択的に通過させるチャネルタンパク質ファミリーで、細胞膜を貫通して存在している。哺乳類では 13 種類の AQP ホモログ(AQP0-12)が同定されており、中枢神経系では AQP1, AQP4, AQP9 の発現を認める¹⁾。AQP1 と AQP4 は水分子のみを選択的に通過させるが、AQP9 はグリセロールや尿素も通過させるので aquaglyceroporin と呼ばれている。正常脳では、AQP1 は脈絡叢上皮細胞に分布し、AQP9 は一部の神経細胞(カテコールアミンニューロンなど)に発現している。AQP4 は血液脳関門(blood-brain barrier; BBB)を形成するアストロサイト(astrocyte; AS)の足突起(endfeet)(図 1a)および血液髄液関門(blood-CSF barrier)を形成する軟膜のグリア限界膜(glial limitans)や脳室上皮細胞の基底外側に発現している。AQP4 はシナプスを取り囲む AS の足突起にも発現している。AQP4 は大脳・小脳・脳幹・脊髄・視神経に広く分布し、他には腎集合管・骨格筋・網膜 Müller 細胞でも発現を認める²⁾。しかしながら AQP4 が自己抗体の標的となる neuromyelitis optica(NMO)では、神経組織外病変の報告はない。

2. AQP4 の構造

X 線結晶構造解析³⁾および電子結晶構造解析⁴⁾の結果、AQP4 は 6 つの膜貫通型アルファヘリックスと 2 つの短いアルファヘリックスが 5 つのループ(A-E)により連結された構造を呈していることがわかった(図 1b)。N 末端と C 末端は細胞質に配向し、A, C, E ループは細胞外に露出している²⁾。C 末端の SSV モチーフは、ジストロフィン複合体の構成要素である α 1-syntrophin(SNTA1)の PDZ ドメインと結合し、間接的にアクチンと連絡している。SNTA1 欠損マウスでは AS 足突起に分布している AQP4 の発現量が著減している⁵⁾。ループ E 近傍には、NMO における自己抗体が認識するエピトープが存在している⁶⁾。自己抗体は水分子の通過を妨げることはないが、抗体が結合すると AQP4 のエンドサイトーシスが起り、エンドゾームにおける分解が促進される(Hinson *et al.* *Neurology* 2007; **69**: 2221-2231)。AQP4 は側面から見ると漏斗状構造を呈しており、8 つの水分子が 1 列になって細孔の縦方向に配列している。細孔には AQP ファミリーに特徴的な 2 個の NPA(Asn-Pro-Ala)モチーフと水分子以外の通過を妨げるフィルター(Arg-216, His-201)が存在している^{3,4)}。AQP4 には AQP1 の Cys-191 に相当するシステイン残基がないため、mercury に対する感受性はない。AQP4 には開始コドンの相違により、全長型 M1(323 アミノ酸: 32-kDa)と N 末端短縮型 M23(301 アミノ酸: 30-kDa)が存在している。AQP4 はモノマーでも水チャネル機能を有するが、細胞膜では 4 量

体(homotetramer または heterotetramer)を構成し、さらに orthogonal array と呼ばれる多分子集合体を形成して安定化している。M23はASの足突起に多く、大きなアレイを形成し水通過能が高く、M1は4量体の singlet を形成している⁷⁾。M1/M23 mRNA 発現量比は、視神経と脊髄が最も高い(Saini *et al. J Neuroimmunol* 2010; **221**: 68-72)。NMOの自己抗体がアレイの構造エピトープを認識しているとの報告もある⁸⁾。

3. AQP4の機能

AQP4は浸透圧勾配に従って細胞膜を介する両方向性の水分子の輸送を行い、中枢神経系組織における water homeostasis の制御で中心的な役割を果たしている。AQP4欠損マウスでは、血管性脳浮腫は増悪し、細胞性脳浮腫は軽減する¹⁾。AQP4遺伝子多型と中大脳動脈閉塞症における脳浮腫の重症化に相関を認めるとの報告もある⁹⁾。個々の細胞レベルでは、AQP4を介する水分子の流入は葉状仮足(lamellipodium)による細胞の移動を制御している¹⁾。ASの足突起に発現しているAQP4は、SNTA1を介して内向き整流カリウムチャネルKir4.1と共存しており、細胞外Kイオンの取り込みにも関与している(Nagelhus *et al. Neuroscience* 2004; **129**: 905-913)。さらにAQP4はEAAT2(GLT-1)とも共存しており、グルタメートの取り込みにも関与している¹⁰⁾。AQP4欠損マウスでは、てんかん発作の閾値が上昇している(Binder *et al. Neuroreport* 2004; **15**: 259-262)。AQP4は神経幹細胞にも発現しているが、AQP4欠損マウス由来の神経幹細胞では、カルシウムチャネルCav1.2の発現量が著減しており、増殖分化が抑制されている(Kong *et al. J Cell Sci* 2008; **121**: 4029-4036)。

文献

- 1) Verkman AS: More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J Cell Sci* 2005; **118**: 3225-3232
- 2) Graber DJ, Levy M, Kerr D, *et al.*: Neuromyelitis optica pathogenesis and aquaporin 4. *J Neuroinflammation* 2008; **5**: 22
- 3) Ho JD, Yeh R, Sandstrom A, *et al.*: Crystal structure of human aquaporin 4 at 1.8 Å and its mechanism of conductance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 7437-7442
- 4) Tani K, Mitsuma T, Hiroaki Y, *et al.*: Mechanism of aquaporin-4's fast and highly selective water conduction and protein exclusion. *J Mol Biol* 2009; **389**: 694-706
- 5) Neely JD, Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP, *et al.*: Syntrophin-dependent

- expression and localization of Aquaporin-4 water channel protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**:14108-14113
- 6) Tani T, Sakimura K, Tsujita M, *et al.*: Identification of binding sites for anti-aquaporin 4 antibodies in patients with neuromyelitis optica. *J Neuroimmunol* 2009; **211**: 110-113
- 7) Furman CS, Gorelick-Feldman DA, Davidson KGV, *et al.*: Aquaporin-4 square array assembly: opposing actions of M1 and M23 isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 13609-13614
- 8) Nicchia GP, Mastrototaro M, Rossi A, *et al.*: Aquaporin-4 orthogonal arrays of particles are the target for neuromyelitis optica autoantibodies. *Glia* 2009; **57**: 1363-1373
- 9) Kleffner I, Bungeoth M, Schiffbauer H, *et al.*: The role of aquaporin-4 polymorphisms in the development of brain edema after middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 2008; **39**: 1333-1335
- 10) Zeng XN, Sun XL, Gao L, *et al.*: Aquaporin-4 deficiency down-regulates glutamate uptake and GLT-1 expression in astrocytes. *Mol Cell Neurosci* 2007; **34**: 34-39

図の説明

図 1. AQP4 の分布と構造.

- (a) 血液脳関門(blood-brain barrier)を形成するアストロサイト(astrocyte)の足突起(endfeet)の細胞膜における AQP4 の発現. AQP4 を砂時計マーク(赤色)で示す。
- (b) AQP4 の 4 量体構造(Protein Data Bank code 3GD8). 各々の AQP4 モノマーが水分子を通過させることが出来る。

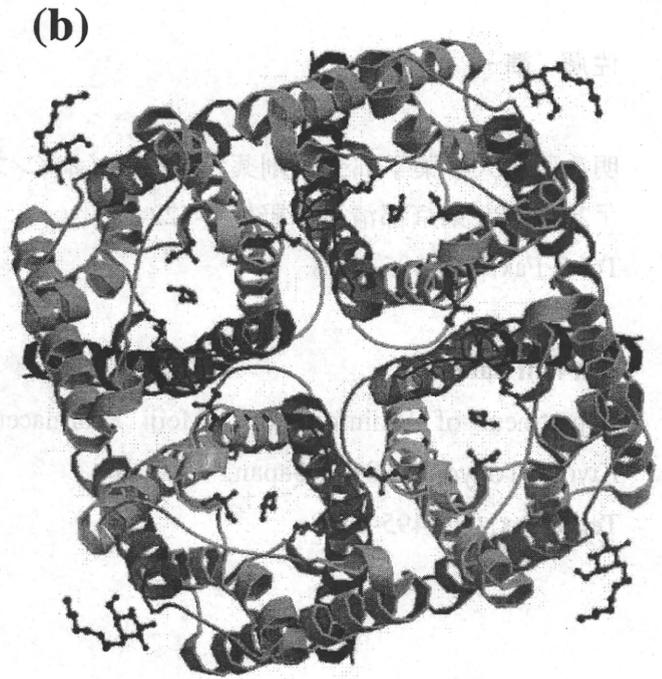
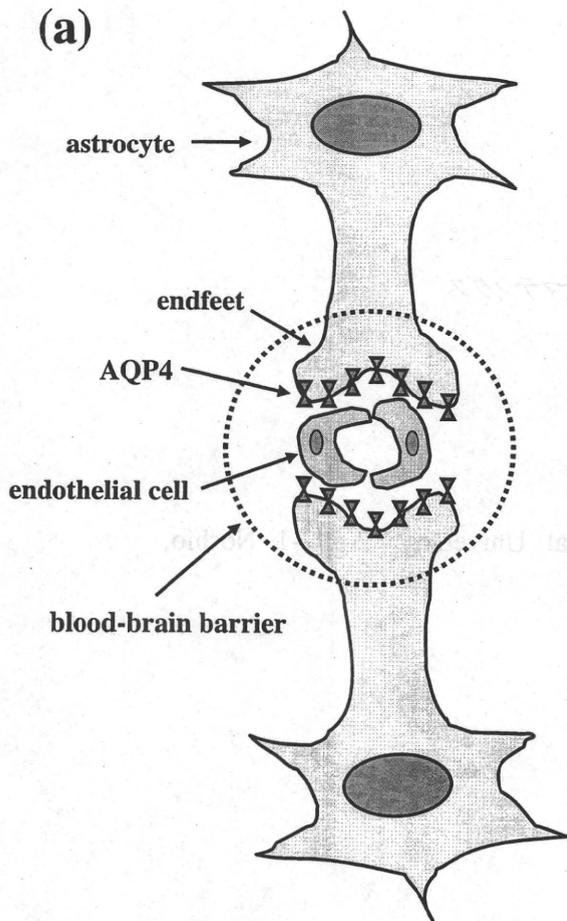


图1

多発性硬化症(MS)診療のすべて

多発性硬化症(MS)の血液診断

佐藤 準一

明治薬科大学薬学部生命創薬科学科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 & Fax: 042-495-8678

Jun-ichi Satoh

Department of Bioinformatics, Meiji Pharmaceutical University, 2-522-1 Noshio,
Kiyose, Tokyo 204-8588, Japan.

Tel & Fax: 042-495-8678

1. MS の血液診断の概要

多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)は、自己抗原反応性 T 細胞により惹起される中枢神経系炎症性脱髄疾患であり、時間的空間的多発を特徴とする。未だ MS 特異的自己抗原は明らかにされていない。回復期には髄鞘再生を認めるが、再発を反復し炎症が遷延化すると髄鞘再生不全や軸索傷害、神経変性を来して、不可逆的な神経機能障害を残す。もし事前に再発を予測出来れば、早期治療が可能となり、後遺症を少なく出来る。しかしながら現在まで再発予測法は樹立されていない。MS は神経学的所見、臨床経過、脳脊髄液所見、MRI 画像に基づいて診断されるが、鑑別診断が多く、正確な診断は必ずしも容易ではない。また通常の血液検査では異常を認めず、特異的なバイオマーカーはなく¹⁾、血液所見単独では診断を確定することは出来ない。以下 MS の血液異常に関する最新の知見²⁾を概説する。

2. MS 血液中のリンパ球異常

MS では遺伝的要因と環境因子の複雑な相互作用を背景に出現した活性化自己反応性 CD4⁺ T helper type 1(Th1)細胞や Th17 細胞が、血液脳関門(blood-brain barrier; BBB)を通過して脳や脊髄に浸潤し、マクロファージやミクログリアを活性化して、TNF α 、一酸化窒素(nitric oxide; NO)などの炎症増強因子の産生を誘導し、脱髄を惹起すると考えられている。MS は臨床経過から relapsing-remitting MS(RRMS), secondary progressive MS(SPMS), primary progressive MS(PPMS)に分類され、病理学的には T 細胞浸潤、抗体補体沈着、オリゴデンドロサイトアポトーシスの所見により 4 タイプに分類されており(Lucchinetti *et al. Ann Neurol* 2000; 47: 707-717)、多様性(heterogeneity)を呈する。病態形成に関与するリンパ球には、Th1, Th17, Th9, Treg, CD8⁺ T, $\gamma\delta$ T, NK, NKT, B があり、Th1, Th17, Th9, CD8⁺ T, $\gamma\delta$ T はエフェクターとして、Treg, CD8⁺ T, $\gamma\delta$ T, NK, NKT はレギュレーターとして働いている(図 1)。1990 年代まで、MS は IFN γ 投与で増悪を認めた臨床試験の結果(Panitch *et al. Neurology* 1987; 37: 1097-1102)より、Th1 病と見なされて来た。現在では、MS の病態形成で中心的役割を果たしているのは、IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 を産生する Th17 細胞であると考えられている(Th17-mediated disease)³⁾。Th17 細胞は、IL-6 と TGF β の存在下で Th0 細胞から分化誘導される。IL-23, IL-1 β , IL-21, IL-7 は、Th17 の分化や増殖を協調的に促進する。活動期 RRMS 患者の血中では、Th17 細胞が非活動期や健常者に比較して 7 倍増加しており、髄鞘抗原 myelin basic protein(MBP)に対して反応性を呈する⁴⁾。Th17 細胞は MS 脳の活動性病巣に集積している(Tzartos *et al. Am J Pathol* 2008;

172: 146-155)。CCR6⁺ Th17 細胞は、脈絡叢上皮細胞上に発現している CCL20 を介して脳内へ侵入する(Rebolidi *et al. Nat Immunol* 2009; **10**: 514-523)。IL-17 は脳血管内皮細胞の tight junction を開くことにより、BBB の通過性を高める(Kebir *et al. Nat Med* 2007; **13**: 1173-1175)。浸潤細胞における Th17/Th1 比の高値が、脳における炎症の局在化を規定している(Stromnes *et al. Nat Med* 2008; **14**: 337-342)。Interferon- β (IFN β)は Th1 病には有効だが、Th17 病には無効であり、RRMS 患者のうち IFN β ノンレスポンスでは血清 IL-17F が増加している⁵⁾。

自己抗原反応性 Th17 細胞の活動性を抑制する細胞として、制御性 T 細胞 (Treg)が注目されている⁶⁾。Treg の機能低下により免疫寛容が破綻する。Treg は胸腺由来で転写因子 Foxp3 を発現している CD4⁺CD25⁺ naturally occurring Treg (nTreg)と末梢由来で抗原と IL-10, TGF β , retinoic acid(RA)により誘導される inducible Treg(Tr1, Th3, CD8 陽性 Treg を含む)に分類される(図 1)。主として Tr1 は IL-10 を、Th3 は TGF β を産生する。MS 末梢血では CD4⁺CD25⁺ nTreg 数は減少していないが、nTreg による CD4⁺CD25⁺ T 細胞の増殖抑制機能は低下している(Viglietta *et al. J Exp Med* 2004; **199**: 971-979)。しかしながら CD127(IL-7R α)陽性細胞を除去した純度の高い nTreg の機能は、MS 患者と健常者で変わりがないという報告もある(Michel *et al. J Clin Invest* 2008; **118**: 3411-3419)。MS では CD39⁺ nTreg サブポプレーションの Th17 抑制能が低下している(Fletcher *et al. J Immunol* 2009; **183**: 3411-3419)。また RRMS 末梢血では、Tr1 の誘導能と IL-10 産生が低下している(Astier *et al. J Clin Invest* 2006; **116**: 3252-3257)。さらに寛解期の RRMS 末梢血では、IL-5 産生性 CD95⁺CD11^{low} NK 細胞 (NK2)および IL-4 産生性 CD4⁺ NKT 細胞が増加している(Aranami *et al. J Immunol* 2006; **177**: 5659-5667; Araki *et al. Int Immunol* 2003; **15**: 279-288)。

MS 脳病巣における軸索傷害や髄鞘破壊では、MHC class I 拘束性 CD8⁺ T 細胞の直接的関与が示唆されている⁷⁾。MS 脳病巣では、CD4⁺ T 細胞より CD8⁺ T 細胞の方が数多く集積しており、CD8⁺ T 細胞は病巣や cerebrospinal fluids(CSF), 血液中でオリゴクローナルに増加している(Skulina *et al. Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 2428-2433)。また近年、MS の免疫病態において、LT, TNF α 産生細胞や抗原提示細胞として働く B 細胞の役割が注目されている⁸⁾。MS 脳のクモ膜下腔では、リンパ濾胞 (ectopic B-cell follicles with germinal centers)の形成を認める(Serafini *et al. Brain Pathol* 2004; **14**: 164-174)。MS 脳病巣の反応性アストロサイトは、B 細胞増殖因子 BAFF, APRIL を産生する。B 細胞は CSF 中のオリゴクローナルイムノグロブリン産生細胞となり得る(Obermeier *et al. Nat Med* 2008; **14**: 688-693)。B 細胞の CD20 を標的とす

るモノクローナル抗体 Rituximab は、RRMS における Phase II 臨床試験で著効を呈した(Hauser *et al. N Engl J Med* 2008; **358**: 676-688)。

3. MS 血液中の自己抗体と生体分子

MSの病理学的分類パターンII型は、抗体と補体(C9neo)の沈着を主徴とする脱髄(antibody-mediated demyelination)を呈し、液性免疫の関与が示唆されている。オリゴデンドロサイト細胞膜上のmyelin oligodendrocyte glycoprotein(MOG)に対する自己抗体は、MS脳の急性期脱髄巣に沈着している(Genan *et al. Nat Med* 1999; **5**: 170-175)。血清抗MOG抗体と抗MBP抗体を有する患者は、clinically isolated syndrome(CIS)からclinically definite MS(CDMS)へ移行するリスクが高い(Berger *et al. N Engl J Med* 2003; **349**: 139-145)。抗MOG抗体はEpstein-Barrウイルス核抗原EBNAと交差反応性を呈する(Wang *et al. Neurology* 2008; **71**: 1142-1146)。

活性化T細胞やマクロファージが産生するosteopontin(OPN)は、 $\alpha\beta 1$ インテグリンと結合し、Th1細胞やTh17細胞を刺激して炎症増強に働く。MS再発期には血漿OPNレベルが上昇する(Vogt *et al. Ann Neurol* 2003; **53**: 819-822)。日照時間の短い高緯度地域でMS発症頻度が高いという疫学的調査結果から、vitamin DのMS発症予防効果が議論されているが、血清25-OH-vitamin Dレベル上昇と再発リスク減少が相関している(Simpson *et al. Ann Neurol* 2010; **68**: 193-203)。髄鞘特異的に発現しているNogo-Aは、脱髄時に遊離すると、Nogo-66ドメインを介して神経細胞上のNgR/LINGO-1/p75NTR複合体と結合し、RhoAを活性化して神経突起伸長抑制シグナルを伝達する。脊髄損傷やMSの動物モデルに、Nogo-A中和抗体を投与してNogo-66とNgRの結合を阻止すると、軸索再生と機能的回復が促進される。MSの血清では対照群に比較して、抗NgR抗体の検出頻度が高い(Onoue *et al. Acta Neurol Scand* 2007; **115**: 153-160)。MSの血清やCSFでは、様々な自己抗原(neurofilament proteins, α B-crystallin, heat shock proteins, gangliosides)に対する抗体が検出されているが、病態への直接的関与は明らかではない⁹⁾。マイクロアレイは、多数の自己抗体を効率的にスクリーニングする際には有用なツールとなる。Quintanaらは、RRMS患者(n=38)と健常者(n=30)の血清を、63種類の抗原がスポットされたアレイで解析し、RRMSにおいて抗HSP60, HSP70 IgM抗体を特徴とするパターンを見出した(*Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 18889-18894)。

14-3-3 は神経組織に豊富に含まれている酸性蛋白質で、Ras/Raf-1/MAPK 系やBad/Bcl-2 系のシグナル伝達においてコーオディネーター分子として働き、神経細胞