

201128096A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤 準一

平成24年(2012)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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤 準一

平成24年(2012)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:

脳病態分子機序の解明 ----- 1

明治薬科大学 佐藤 準一

II. 分担研究報告

那須ハコラ病の臨床病理遺伝学的研究:

DAP12ノックダウンヒト単球モデル細胞株の樹立 ----- 13

明治薬科大学 佐藤 準一

那須ハコラ病の創薬研究:

DAP12機能喪失マウスマクロファージの網羅的遺伝子発現解析 ----- 22

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 ----- 33

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 35

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 23 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:

脳病態分子機序の解明

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。TREM2とDAP12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表面上で、受容体・アダプター複合体を形成し、非受容体型チロシンキナーゼSykを介してシグナルを伝達する。NHDは、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(H21-難治-一般-201)に本研究班が実施した全国調査により、本邦患者数は約200人と推定された。現在までに、18種類の遺伝子変異が報告されている。平成22年度(H22-難治-一般-136:1年目)に本研究班では、本邦初のTREM2遺伝子変異に起因する1家系3例に関して、変異解析と網羅的遺伝子発現解析を行い、罹患脳における炎症と神経変性の同時進行の遺伝子発現プロフィールを発見した。しかしながら、NHDにおける白質脳症発症機構は未だ明らかではない。平成23年度(H22-難治-一般-136:2年目)では、剖検脳におけるDAP12シグナル伝達分子Sykの発現を免疫組織化学的に解析し、大脳皮質・海馬神経細胞におけるSykの異常リン酸化を見出した。従ってSykシグナル伝達系の制御異常が白質脳症発症に関与している可能性が考えられた。

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 (東京都医学総合研究所臨床神経病理研究部門部門長)

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、1970 年代初頭

に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: 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(loss-of-function)変異により発症し、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)。現在まで 18 種類の遺伝子変異が報告されており、患者は日本とフィンランドに集積している。TREM2 と DAP12 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表面上で、受容体・アダプター複合体を形成し、非受容体型チロシキナーゼ Syk を介してシグナルを伝達する(Fig. 1)。しかしながら TREM2 のリガンドは未だ同定されていない。

NHD の病期は以下の 4 期に区分される。(1)無症候期(20 歳代まで), (2)骨症状期(20 歳代以降): 長管骨の骨端部に好発する多発性骨嚢胞と反復する病的骨折, (3)早期精神神経症状期(30 歳代以降): 脱抑制・多幸症・人格障害・言語障害などの前頭葉症候・てんかん発作, (4)晩期精神神経症状期(40 歳代以降): 進行性認知症を呈する(Klünemann HH et al. Neurology 64: 1502-1507, 2005)。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、ミクログリア活性化を認めるが、白質脳症発症機序の詳細は明らかでない(Paloneva J et al. Neurology 56: 1552-1556, 2001)。平成 21 年度(H21-難治-一般-201)に、本研究班が実施した全国調査により、本邦患者数は約 200 人と推定されている。平成 22 年度(H22-難治-一般-136:1 年目)に、本研究班では、本邦初の TREM2 遺伝子変異に起因する 1 家系 3 例に関して、変異解析と網羅的遺伝子発現解析を行い、罹患脳における炎症(inflammation)と神経変性(neurodegeneration)の同時進行を示唆する遺伝子発現プロファイルを見出した(Numasawa Y et al. Eur J Neurol 18: 1179-1183, 2011)。またヒト脳組

織ではミクログリアにおける TREM2 の構成的発現を認めないことを明らかにした(Satoh J et al. Neuropathology 31: 363-375, 2011)。

平成 23 年度(H22-難治-一般-136:2 年目)は、NHD 剖検脳組織における DAP12 シグナル伝達分子 Syk の発現を免疫組織化学的に解析し、大脳皮質・海馬神経細胞における Syk の異常リン酸化を見出した。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. 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(n = 3; 2 例は DAP12 141delG 変異、1 例は変異未同定)、対照として筋緊張性ジストロフィー(MD)患者(n = 4)、健常者(NC)(n = 4)の前頭葉・海馬・基底核脳組織を用いた。全ての脳組織では、個人情報は一切削除されている。脳組織パラフィン切片を用いて、Syk, pSyk, Src の発現を免疫組織化学的に解析した。発現レベルは BX51 光学顕微鏡(Olympus)の 200X 5 視野の前頭葉皮質第 III 層のイメージを取り込み、Image J(NIH)を用いて定量的に解析した。

2. 抗体特異性の検証

Syk open-reading frame (ORF)を PCR で増幅し、pEF6/V5-His TOPO にクローニングした。QuikChange II XL site-directed mutagenesis kit(Stratagene)を用いて Y525/Y526(wild type)を

N525/N526(non-phosphorylatable mutant)に改変した。HEK293 細胞に wild type または mutant ベクターを導入して一過性に発現させ、ライセートを pY525/Y526-specific pSyk 抗体 (AP3271a; ABGENT)を用いて、ウェスタンブロットで抗体特異性を検証した。

(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. 抗体特異性の検証

Syk を過剰発現させた HEK293 ライセートでは、外来性 Syk は自己リン酸化(autophosphorylation)されている(Fig. 2)。HEK293 細胞のウェスタンブロットで pSyk 抗体(AP3271a)は外来性に導入した V5-tagged pY525/Y526 を特異的に認識した。Syk 抗体 (sc-1077; Santa Cruz Biotechnology) は HEK293 が構成的に発現している内在性 Syk と外来性に導入した Syk の両者を認識した。

2. NHD 患者剖検脳組織における Syk, pSyk, Src の発現

RRN を通じて提供された NHD 患者 3 例、筋緊張性ジストロフィー患者 4 例、健常者 4 例の前頭葉・海馬・基底核の脳組織切片を免疫組織化学的に解析した。NHD およびコントロール 脳の多数の

神経細胞、一部のミクログリア・マクロファージにおいて、主として細胞質における Syk, pSyk の発現を認めた(Fig. 3)。pSyk は NHD ではコントロールと比較して発現増強を認めた($p < 0.01$ by one-way ANOVA with post-hoc Turkey's test)(Fig. 4)。NHD においては一部の神経細胞で、pSyk は核内にも発現を認めた。Syk は NHD とコントロール間で統計学的有意差を認めなかった。Src は主として NHD において、一部の神経細胞の細胞質に発現していた。pSyk と Src は海馬 subiculum の顆粒空胞変性(granulovacuolar degeneration; GVD)を呈している神経細胞の顆粒にも集積していた。一方、NHD 脳大脳白質に集積している反応性アストロサイトや残存しているオリゴデンドロサイトにおいては、pSyk, Syk, Src の発現を認めなかった。

D. 考察

本研究では、NHDとコントロールの脳組織を免疫組織化学的に解析し、NHD罹患脳の神経細胞におけるpSykの発現増強を明らかにした。Sykは非受容体型チロシンキナーゼで、血液系細胞と一部の非血液系細胞(肝細胞・繊維芽細胞・神経細胞)に発現している(Hatterer E et al. Neurosci Res 70: 172-182, 2011)。未知のリガンドと結合し活性化されたTREM2-DAP12からのシグナルは、チロシンキナーゼSrcを介してDAP12のimmunoreceptor tyrosine-based activating motif (ITAM)をリン酸化する(Fig. 1)。リン酸化されたITAMはSykおよびZAP70のドッキングサイトを提供し、SykのSH2ドメインが結合するとSykのactivation loopに存在するY525/Y526がリン酸化される。DAP12以外にも、

Sykは多彩な上流・下流の分子から成る複雑なシグナルネットワークを形成し、中心的な役割を果たしている(Fig. 5)。

非活性時の細胞ではSykはチロシンリン酸化を受けていない。Sykは酸化ストレスなどITAM非依存性シグナルでも迅速に活性化され、リン酸化される(Takano T et al. *Antioxid Redox Signal* 4: 533-541, 2002)。NHDでは30歳代以降にてんかん発作を頻発するが、神経細胞におけるSykリン酸化亢進と関連しているかもしれない。NHDではTREM2-DAP12 ITAM系の機能は喪失しており、Sykリン酸化異常に関しては、ITAM非依存性シグナルの関与が考えられる。またSykはCblでユビキチン化され、PTP1Bで脱リン酸化される。脱リン酸化やユビキチン化の制御異常も、Syk異常リン酸化を惹起し得る。

E. 結論

NHD とコントロールの脳組織を免疫組織化学的に解析し、NHD 罹患脳の神経細胞における pSyk の発現増強を明らかにした。NHD ではTREM2-DAP12 ITAM 系の機能は完全に喪失しており、Syk リン酸化異常に関しては、ITAM 非依存性シグナルの関与が考えられる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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, *Bombyx mori*. *PLoS One* 6(3): e17683, 2011.
2. 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* 31(4): 363-375, 2011.
3. Satoh J, Tabunoki H: Comprehensive analysis of human microRNA target networks. *BioData Mining* 4: e17, 2011.
4. Yoshino T, Tabunoki H, Sugiyama S, Ishii K, Kim SU, Satoh J: Non-phosphorylated FTY720 induces apoptosis of human microglia by activating SREBP2. *Cellular and Molecular Neurobiology* 31(7): 1009-1020, 2011.
5. Numasawa Y, Yamaura C, Ishihara S, 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* 18(9): 1179-1183, 2011.
6. Nakamagoe K, Shioya A, Yamaguchi T, Takahashi H, Koide R, Monzen T, Satoh J, Tamaoka A. A Japanese case with Nasu-Hakola disease of DAP12 gene mutation

exhibiting precuneus hypoperfusion. *Internal Medicine* 50(22): 2839-2844, 2011.

7. Satoh J, Tabunoki H, Ishida T, Saito Y, Arima K: Immunohistochemical characterization of gamma-secretase activating protein expression in Alzheimer's disease brains. *Neuropathology and Applied Neurobiology* in press, 2011.
8. Satoh J, Tabunoki H, Ishida T, Yagishita S, Jinnai K, Futamura N, Kobayashi M, Toyoshima I, Yoshioka T, Enomoto K, Arai N, Saito Y, Arima K: Phosphorylated Syk expression is enhanced in Nasu-Hakola disease brains. *Neuropathology* in press, 2011.
9. Satoh J: Molecular network of microRNA targets in Alzheimer's disease brains. *Experimental Neurology* in press, 2011.
10. Satoh J, Shimamura Y, Tabunoki H: Gene expression profile of THP-1 monocytes following knockdown of DAP12, a causative gene for Nasu-Hakola disease. *Cellular and Molecular Neurobiology* in press, 2011.
11. 佐藤準一: 神経変性と神経炎症の分子ネットワーク解析. 脳内免疫システム: 明らかになる神経疾患との関わり. *細胞工学* 30(10): 1028-1035, 2011.
12. 佐藤準一: 分子ネットワークからみた多発性硬化症の創薬標的分子. 特集 I 神経免疫の新展開. *炎症と免疫* 19(6): 543-552, 2011.

著書

1. Satoh J: Molecular network analysis of target RNAs and interacting proteins of TDP-43, a

causative gene for the neurodegenerative diseases ALS/FTLD. In *Biomedical Engineering and Cognitive Neuroscience for Healthcare: Interdisciplinary Applications*, ed by Wu J. IGI Global, Hershey, Pennsylvania, 2011, in press.

2. Satoh J: Human microRNA targetome indicates a specialized role of microRNAs in regulation of oncogenesis. In *Systems Biology and Cancer*, ed by Azumi AS. Springer, Netherlands, 2011, in press.
3. 佐藤準一: 2. 網羅的遺伝子発現解析からみた病因・病態. 第1章 多発性硬化症の病態と診断 K. 病因・病態をめぐって. *アクチュアル脳・神経疾患の臨床. 最新アプローチ 多発性硬化症と視神経脊髄炎*. 辻省次・吉良潤一編. 中山書店、2011、印刷中.

2. 学会発表

国際学会

1. Satoh J, Tabunoki H, Arima K: Immunohistochemical characterization of microglia in Nasu-Hakola disease brains. 63rd Annual Meeting of American Academy of Neurology. Honolulu, 2011.4.12.
2. Satoh J, Tabunoki H: Molecular network analysis of microRNA targets suggests aberrant expression of cell cycle regulators in Alzheimer's disease brains. The 9th International Workshop on Advanced Genomics. Revolution of Genome Science. Tokyo, 2011.7.12.

3. Tabunoki H, Banno Y, Katsuma S, Shimada T, Mita K, Satoh J: BmDJ-1 is a key regulator of oxidative modification in the development of the silkworm, *Bombyx mori*. Queenstown Molecular Biology Meetings 2011. Queenstown, New Zealand, 2011.8.30.
 4. Tabunoki H, Shimada T, Mita K, Banno Y, Satoh J: BmDJ-1 is a key regulator of oxidative modification in the development of the silkworm, *Bombyx mori*. 2011 Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Washington DC, 2011.11.14.
- 国内学会
1. 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、2011.3.28.
 2. 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、2011.3.28.
 3. 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. 第 52 回日本神経学会総会. 名古屋、2011. 5.18.
 4. 沼沢祥行、山浦千春、石原正一郎、新谷周三、山崎峰雄、天竺桂弘子、佐藤準一: 本邦初の TREM2 遺伝子変異による那須ハコラ病の一家系. 第 52 回日本神経学会総会. 名古屋、2011. 5.20.
 5. 佐藤準一、天竺桂弘子、石田剛、柳下三郎、陣内研二、二村直伸、小林道雄、豊島至、吉岡年明、榎本克彦、新井信隆、有馬邦正: 那須ハコラ病の臨床病理遺伝学的研究. 第 52 回日本神経学会総会. 名古屋、2011. 5.20.
 6. 佐藤準一、天竺桂弘子、石田剛、柳下三郎、陣内研二、二村直伸、小林道雄、豊島至、吉岡年明、榎本克彦、新井信隆、有馬邦正: 那須ハコラ病脳ミクログリアの免疫組織化学的解析. 第 52 回日本神経病理学会総会. 京都、2011. 6.4.
 7. 佐藤準一: 神経難病の病態解明のための分子ネットワーク解析. Ingenuity Pathways Analysis ユーザーミーティング. 招待講演. 東京、2011.9.1.
 8. 佐藤準一、天竺桂弘子、石田剛、有馬邦正: アルツハイマー病脳における GSAP の発現解析. 第 34 回日本神経科学大会. Neuro2011. 横浜、2011. 9.15.
 9. 佐藤準一、吉野隆、天竺桂弘子、杉山重夫、石井啓太郎、Seung U. Kim: FTY720 の SREBP2 活性化を介するヒトミクログリアのアポトーシス誘導. 第 23 回日本神経免疫学会学術集会 東京、2011. 9.17.
 10. 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 オルソログは NO により酸化される. 第 84 回日本生化学会大会. 京都、2011.9.22.
 11. Satoh J, Tabunoki H: Molecular network analysis of microRNA targets suggests aberrant expression of cell cycle regulators in Alzheimer's disease brain. 日本バイオインフ

オマテイクス学会 2011 年会. 神戸、2011.11.8.

12. 佐藤準一、吉野隆、天竺桂弘子、杉山重夫、石井啓太郎、Seung U. Kim: FTY720 は SREBP2 活性化を介してヒトミクログリアのアポトーシスを誘導する. 第40回日本免疫学会学術集会 幕張、2011.11.29.

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

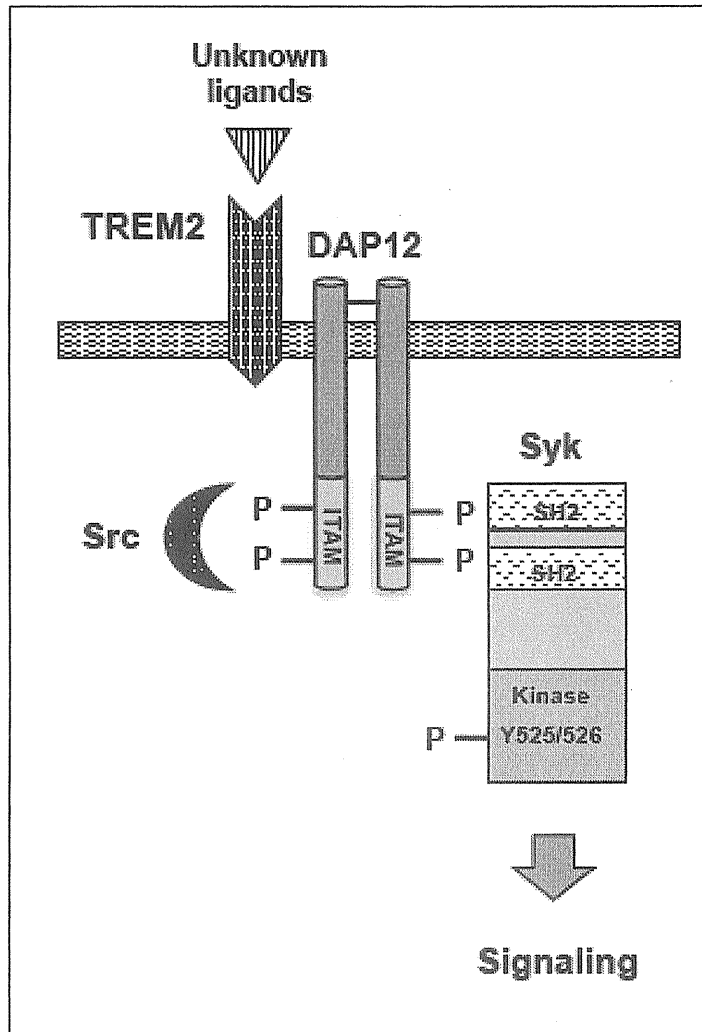


図 1. TREM2-DAP12-SYK シグナル伝達系.

TREM2とDAP12ダイマーは破骨細胞・樹状細胞・マクロファージ・ミクログリアの細胞表面上で、受容体・アダプター複合体(3量体)を形成している。未知のリガンドと結合し活性化された TREM2-DAP12からのシグナルは、チロシンキナーゼ Src を介して DAP12 C 末端の immunoreceptor tyrosine-based activating motif (ITAM)をリン酸化する。リン酸化された ITAM は Syk および ZAP70 のドッキングサイトを提供し、Syk の SH2ドメインが結合すると Syk の activation loop に存在する Y525/Y526 がリン酸化される。

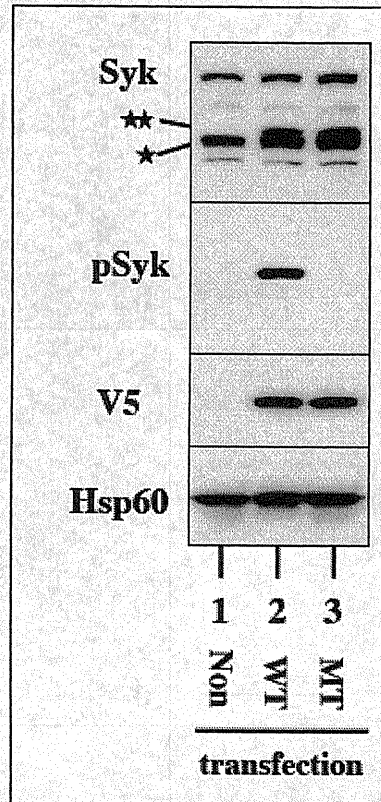


図 2. 抗体特異性の検証.

Syk ORF を pEF6/V5-His TOPO にクローニングし、アミノ酸残基 Y525/Y526(wild type)を N525/N526(non-phosphorylatable mutant)に改変した。HEK293 細胞に wild type(lane 2)または mutant(lane 3)ベクターを導入して発現させ、ライセートを pY525/Y526-specific pSyk 抗体(AP3271a; ABGENT)を用いて、ウエスタンブロットで解析した。Wild-type では外来性 V5-tagged Syk は自己リン酸化(autophosphorylation)されており、pY525/Y526 特異的 pSyk 抗体(AP3271a)で認識された。Syk 抗体(sc-1077)は HEK293 が構成的に発現している内在性 Syk(single star)と外来性に導入した V5-tagged Syk(double stars)の両者を認識した。

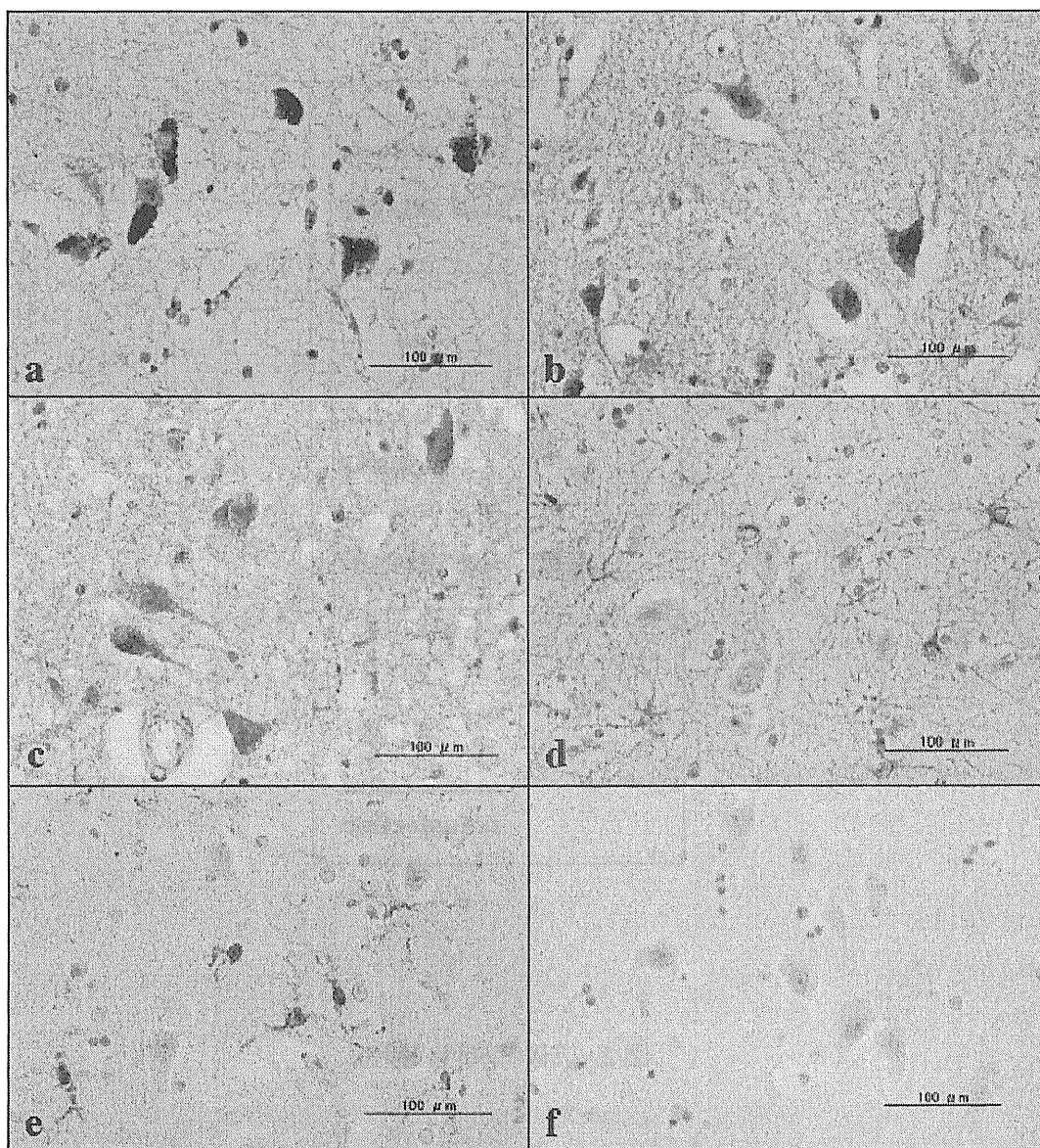


図 3. NHD 脳における Syk, pSyk, Src の発現.

NHD 脳海馬傍回における Syk, pSyk, Src の発現を免疫組織化学的に解析した。(a) pSyk, (b) Syk, (c) Src, (d) アストロサイトマーカー-GFAP, (e) ミクログリアマーカー-Iba1, (f) DAPI2. 神経細胞、一部のミクログリア・マクロファージにおいて、主として細胞質における Syk, pSyk, Src の発現を認めた。

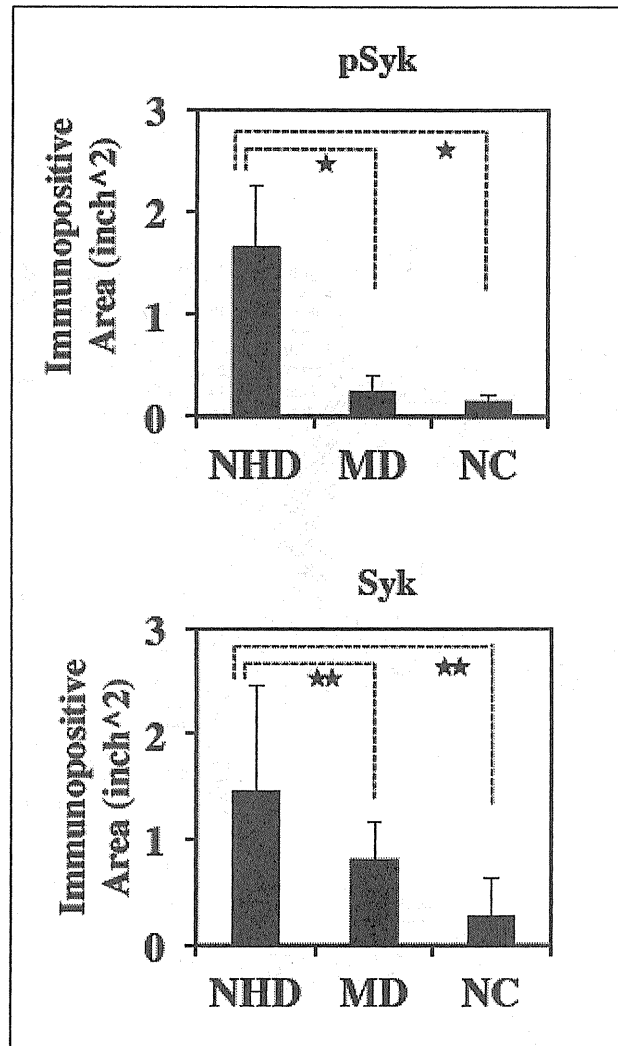


図 4. NHD 脳における pSyk の発現増強。

光学顕微鏡 200X 5 視野の前頭葉皮質第 III 層のイメージを取り込み、Image J を用いて定量的に発現レベルを解析した。pSyk は NHD ではコントロール(MD, NC)に比較して発現増強を認めた(上段 single star; $p < 0.01$ by one-way ANOVA with post-hoc Turkey's test)。Syk は NHD とコントロール間で統計学的有意差を認めなかった(下段 double stars; $p < 0.01$ by one-way ANOVA with post-hoc Turkey's test)。

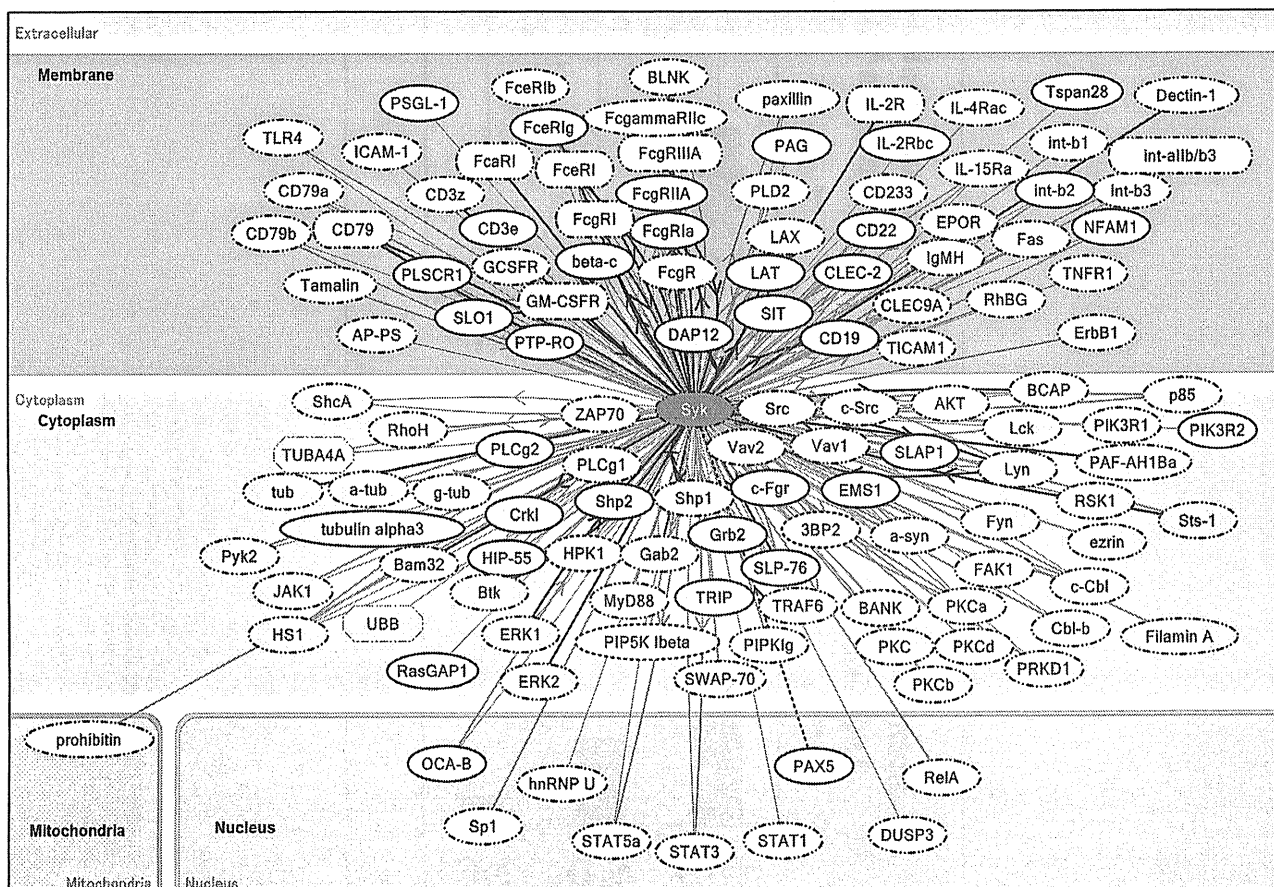


図 5. Syk シグナル伝達分子ネットワーク。

生命情報統合プラットフォームKeyMolnetの周辺検索を用いて、Sykの上流・下流1 pathに存在する分子のネットワークを描画した。DAP12以外にも、Sykは多彩な上流・下流の分子から成る複雑なシグナルネットワークを形成し、中心的な役割を果たしていることがわかる。

II. 分担研究報告書

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 23 年度 分担研究報告書

那須ハコラ病の臨床病理遺伝学的研究:

DAP12 ノックダウンヒト単球モデル細胞株の樹立

分担研究者(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。TREM2とDAP12は、破骨細胞・樹状細胞・単球・マクロファージ・ミクログリアの細胞表面上で、受容体・アダプター複合体を形成し、非受容体型チロシンキナーゼSykを介してシグナルを伝達する。NHDは、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。しかしながら、NHDにおける白質脳症発症機構は未だ明らかではなく、治療薬開発に利用可能な創薬モデル系もない。平成23年度(H22-難治-一般-136:2年目)では、TREM2とDAP12を構成的に発現しているヒト単球細胞株THP-1にsmall interfering RNA(siRNA)を導入して、DAP12遺伝子ノックダウン安定細胞株(THP-1-DAP12KD)を樹立し、遺伝子発現プロファイルを解析し、転写因子NF- κ B制御系の異常を見出した。THP-1-DAP12KDは、NHDにおける創薬モデル系として役立つと考えられる。

研究協力者

島村 悦光 (明治薬科大学大学院修士課程 1年)

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、1970 年代初頭に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: 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(loss-of-function)変異により発症し、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)。現在まで 18 種類の遺伝子変異が報告されている。TREM2 と DAP12 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表面上で、受容体(TREM2)・アダプター(DAP12)複合体を形成し、DAP12 の ITAM モチーフのリン酸化に引き続く非受容体型チロシンキナーゼ Syk のリン酸化を介してシグナルを伝達する。従って患者では TREM2-DAP12 シグナル伝達系が欠落していると

考えられる。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、ミクログリア活性化を認める。しかしながら、NHD における白質脳症発症機構は未だ明らかではなく、治療薬開発に利用可能な創薬モデル系もない。

平成 21 年度(H21-難治-一般-201)に、本研究班が実施した全国調査により、本邦患者数は約 200 人と推定されている。平成 22 年度(H22-難治-一般-136:1 年目)に、本研究班では、ヒト脳組織ではミクログリアにおける TREM2 の構成的発現を認めないことを明らかにした(Satoh J et al. *Neuropathology* 31: 363-375, 2011)。

平成23年度(H22-難治-一般-136:2年目)では、NHD創薬モデル系を開発するため、TREM2とDAP12を構成的に発現しているヒト単球細胞株 THP-1にsmall interfering RNA(siRNA)を導入して、DAP12 遺伝子ノックダウン安定細胞株 (THP-1-DAP12KD)を樹立し、遺伝子発現プロフィールを解析した。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向上につながると思われる。

B. 研究方法

1. DAP12 siRNA 発現 THP-1 安定細胞株の樹立

DAP12 siRNA(SI)および scramble RNA(SCR)を GeneClip U1 Hairpi cloning system(Promega)を用いて発現ベクターにクローニングし、Lipofectamine LTX reagent(Invitrogen)を用いて、ヒト単球細胞株 THP-1 に導入した。Hygromycin B 添加 10%FBS-RPMI-1640 培地で継代し、出現した薬剤耐性株をクローニングし、SI 発現クローン SI5, SI17

および SCR 発現クローン SCR1, SCR4 を樹立した。

2. 網羅的遺伝子発現解析

SI17, SCR4, wild-type THP-1(WT)から total RNA を精製、Human Gene 1.0 ST array(Affymetrix; 28,869 genes)を用いて、遺伝子発現を網羅的に解析し、SI17/SCR4 発現比 0.5 以下の遺伝子群の分子ネットワークを Ingenuity Pathways Analysis(IPA; Ingenuity Systems)を用いて解析した。

(倫理面への配慮)

THP-1 は既存の培養細胞株であり、使用に当たり倫理的な問題はない。

C. 研究結果

1. DAP12 siRNA 発現 THP-1 安定細胞株 (THP-1-DAP12KD)の樹立

はじめに RT-PCR で THP-1 における DAP12, TREM2, TREM1, IBA1 の発現を確認した(図 1a-e)。次に DAP12 SI, SCR を発現ベクターにクローニング、ヒト THP-1 に導入、SI 発現クローン SI5, SI17 および SCR 発現クローン SCR1, SCR4 を樹立した。ベクターの安定的な組み込みを PCR で確認し(図 1f, g)、タンパクレベルの発現抑制をウェスタンブロットで検証した(図 1h, i)。

2. THP-1-DAP12KD の遺伝子発現プロフィール

マイクロアレイ解析の反復実験で、常時 THP-1-DAP12KD 細胞 SI17 で発現低下を呈した TARDBP(DAP12)を含む 22 遺伝子を同定した(表 1)。ALX1, NAV3, DAP12 については、real-time

RT-PCR で発現レベルを検証し、SI5, SI17 で再現性を認めた(図 2a-f)。IPA による分子ネットワーク解析では、“Cell-to-cell signaling and interaction, hematological system development and function, and inflammatory response”と最も高い関連性($p = 1 \times 10E-29$)を示し、転写因子 NF- κ B が中心的な役割を担っていることがわかった(図 2g)。

D. 考察

NHD患者では、TREM2-DAP12シグナル伝達系が欠落していると考えられる。本研究では、NHD創薬モデル系を開発するため、TREM2とDAP12を構成的に発現しているヒト単球細胞株THP-1にsiRNAを導入して、DAP12遺伝子ノックダウン安定細胞株(THP-1-DAP12KD)SI5, SI17を樹立した。DAP12をノックダウンしたSI17で発現低下を来した22遺伝子の分子ネットワーク解析で、転写因子NF- κ Bの中心的な役割を見出した。NF- κ BはTNF α , IL-1など炎症性サイトカイン・ケモカインの発現制御で中心的役割を果たす転写因子である。またTNF α , IL-1はNF- κ Bの発現上昇を誘導、positive feedback loopを形成して炎症を慢性化・遷延化させる(Barnes and Karin. NEJM 336: 1066-1071, 1997)。現在まで150種類以上の遺伝子がNF- κ Bターゲットとして同定されている(Pahl. Oncogene 18: 6853-6866, 1999)。その他様々な刺激がNF- κ Bを活性化し、種々の細胞内シグナル伝達系とクロストークし、cell cycle やapoptosis を制御している(Oeckinghaus et al. Nat Immunol 12: 695-708, 2011)。われわれは患者脳組織で発現低下している188遺伝子(Numasawa Y et al. Eur J

Neurol 18:1179-1183, 2011)の分子ネットワークを再解析し、“Neurological disease, organismal injury and abnormalities, and behavior” ($p = 1 \times 10E-66$)と最も高い関連性を示し、やはりNF- κ Bが中心的な役割を果たしていることを見出した。すなわちTREM2-DAP12シグナル伝達系の異常は、NF- κ Bによる遺伝子発現制御に重大な影響を及ぼす可能性が示唆された(Satoh J et al. Cell Mol Neurobiol 2011, in press)。

E. 結論

今後、本研究で樹立した細胞株THP-1-DAP12KDは、NHDにおける創薬モデル系として役立つものと思われる。

F. 健康危険情報

総括報告書を参照。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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, Bombyx mori. PLoS One 6(3): e17683, 2011.
2. 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