

201128096B

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22～23年度 総合研究報告書

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22～23年度 総合研究報告書

研究代表者 佐藤 準一

平成24年(2012)年3月

目 次

I. 総合研究報告

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

研究代表者 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 那須ハコラ病の臨床病理遺伝学的研究研究班名簿

資料-4 那須ハコラ病診断基準

資料-5 那須ハコラ病患者家族相談窓口

資料-6 那須ハコラ病遺伝子変異

那須ハコラ病の創薬研究:

創薬モデル系の開発 ----- 21

研究分担者 明治薬科大学 天竺桂 弘子

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 33

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 37

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 22-23 年度 総合研究報告書

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に発現し、受容体・アダプター複合体を形成し、下流に位置する Syk のリン酸化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、有効な治療法がない難病で、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)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。平成 22 年度(H22-難治-一般-136:1 年目)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、罹患脳における神経炎症と神経変性の同時進行の遺伝子発現プロファイルを発見した。また患者 2 名の生検皮膚を熊本大学江良沢実教授に送付して iPS 細胞株を樹立、難病研究資源バンクに登録し、Florent Ginhoux 博士との共同研究で iPS よりミクログリア細胞株を作成中である。しかしながら現在まで、NHD における白質脳症の発症機構は明らかではなく、治療薬開発に利用可能な創薬モデル系は確立されていない。平成 23 年度(H22-難治-一般-136:2 年目)は、剖検脳におけるリン酸化 Syk の発現を免疫組織化学的に解析し、神経細胞における Syk シグナル伝達系制御異常が白質脳症発症を誘導している可能性を見出した。また NHD 創薬モデル系として、DAP12 遺伝子ノックダウンヒト単球細胞株を樹立した。さらに公開セミナーを開催して研究成果を広く公知し、平成 21-23 年度には NHD 関連英文論文 5 編を報告した。現在まで国内外を通じて類似の研究はなく、本研究の成果は厚生労働行政を主導とする患者 QOL 向上の取り組みにつながり、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
フォーマティクス 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 (JA とりで総合医療センター院長)

高橋 和也 (国立病院機構医王病院神経内科医
長)

新井 信隆 (東京都医学総合研究所脳発達・神
経再生研究分野分野長)

Dr. Florent Ginhoux (Singapore Immunology
Network, Agency for Science, Technology and
Research)

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)(資料-1,
資料-2 参照)。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)。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
面上に発現し、受容体・アダプター複合体を形成
し、下流に位置する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。
TREM2 の内因性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)。

われわれは平成 21 年度に那須ハコラ病の臨床
病理遺伝学的研究研究班を立ち上げた(資料-3 参
照)。代表者佐藤準一(明治薬科大学教授)と分担
者天竺桂弘子(明治薬科大学助教)、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(東京都神経科学総合研究所
臨床神経病理研究部門部門長)で構成され、互い
に緊密に連携を取り合って、合理的に研究を遂行
した。

平成 21 年度(H21-難治-一般-201)には、本研
究班は臨床診断基準を作成した(資料-4 参照)。こ
の診断基準に基づき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(図 1)。平成
22 年度(H22-難治-一般-136:1 年目)には、本研究
班では患者家族の相談窓口を開設し、神経内科

専門医の佐藤らが医療相談に対応した(資料-5 参照)。現在まで 18 種類の DAP12, TREM2 遺伝子変異が報告されているが、本邦では TREM2 変異の症例は報告されていなかった(資料-6 参照)。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ィールを見出した(Numasawa Y et al. Eur J Neurol 18: 1179-1183, 2011)(図 2)。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)には、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。またNHD創薬モデル系として、DAP12 遺伝子ノックダウンヒト単球細胞株を樹立した。一連の研究成果は、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. NHD 診断基準の作成と全国アンケート調査

過去の症例報告(1972 年-2009 年)から臨床所見の特徴を精査し、専門的知識のない一般臨床医でも容易に診断可能となるような NHD 診断基準(案)を作成した。全国の神経内科(日本神経学会)・精神神経科(日本精神神経学会)・整形外科(日本整形外科学会)教育研修施設 4071 カ所を対

象に文書を郵送して、臨床病理遺伝学的項目に関するアンケート調査を実施した。

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(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、DAP12, TREM2, CD68, IBA1, Syk, pSyk, Src の発現を免疫組織化学的に解析した。

3. NHD の 1 家系 3 例の遺伝学的精査

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。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。長兄は剖検で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 遺伝子を PCR で増幅し、PCR 産物を直接シーケンス解析した。また 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ィールを解析した。PT3 と別の NHD 患者(合計 2 名)に関して文書同意を取得し、生検皮膚組織を 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、難病研究

資源バンクへ登録した。

4. NHD 創薬モデル系の開発

DAPI2 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、TREM2/DAPI2 陽性ヒト単球細胞株 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(図 3)。これらに関して、Human Gene 1.0 ST array を用いて、遺伝子発現プロフィールを解析した。また DAPI2 陰性株化ヒトミクログリア細胞 HMO6(Nagai A et al. Neurobiol Dis 8: 1057-1068, 2001)に、DAPI2 発現ベクター導入し、DAPI2 発現安定 HMO6 細胞株を樹立した。また sphingosine 1-phosphate(S1P)受容体調節薬 FTY720(fingolimod)の HMO6 に対するアポトーシス誘導能およびその分子機序を解明した。

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 NHD の *in vivo* 創薬モデルを樹立するために、抗酸化ストレスタンパクであるカイコ DJ-1 cDNA(BmDJ-1)をクローニングし、組織分布と *in vivo* における抗酸化能を解析した。

(倫理面への配慮)

アンケートの結果は個人情報保護方針に基づき厳重に管理し、難治性疾患克服研究事業の遂行に限定して使用するよう配慮した。研究使用に

対して文書同意を取得したヒト脳組織は、RRN を介して提供された。本研究でのゲノム解析研究は、明治薬科大学倫理委員会 1904 号「Nasu-Hakola 病の DAPI2 ゲノム遺伝子解析」、患者 iPS 細胞の利用に関しては、2306 号「iPS を用いた神経難病発症機構の解明に関する研究」、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)の承認を得た。

C. 研究結果

1. NHD 診断基準の作成と全国アンケート調査

NHD 診断基準(資料-4)を作成し、Web 上(www.my-pharm.ac.jp/~satoj/)で公開した。平成 21 年 11 月 11 日-平成 22 年 1 月 31 日に、4071 施設に対してアンケート調査を実施し、1656 施設から回答を得た(回答率 41%;患者 29 名;剖検 8 例)。本邦における患者数は約 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)と推定された(図 1)(平成 21 年度総括報告書参照)。

2. NHD 患者剖検脳組織の免疫組織化学的解析

DAPI2 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 DAPI2 の発現を認めなかった。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。一方、NHD 患者脳では、Iba1 陽性ミクログリアは減少していないことがわかった。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、細胞質における Syk, pSyk の発現を認めた。pSyk は NHD 脳では発現の増強を認め、一部の神経細

胞では核内における発現を認めた(平成 23 年度総括報告書参照)。

3. NHD の 1 家系 3 例の遺伝学的精査

PT3, PT1 のゲノム DNA 遺伝子解析で、TREM2 第 3 インtron 第 2 位(the splice-donor consensus site)の T>C 変異(c.482+2T>C)を認め、exon 3 skipping を呈し、27-kDa, 24-kDa の non-functional truncated proteins の発現を認めた。PT1 の前頭葉脳組織を DNA マイクロアレイで解析し、NHD 脳で発現上昇 136 遺伝子と発現低下 188 遺伝子を同定した。データは National Center for Biotechnology Information のデータベース Gene Expression Omnibus(GEO)に GSE25496 として登録公開した。発現上昇遺伝子群にはマクロファージ・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 GABA 受容体サブユニットやシナプス構成タンパクが集積していた。NHD 脳で発現が高度に上昇す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。Ingenuity Pathways Analysis (IPA)による分子ネットワーク解析では、発現上昇遺伝子群は inflammatory response, cellular movement, and immune cell trafficking(炎症持続を示す所見)と、発現低下遺伝子群は cell-to-cell signaling and interaction, nervous system development and function, and genetic disorder (神経変性を示す所見)との関連性が示唆された(図 2)(平成 22 年度総括報告書参照)。

4. NHD 創薬モデル系の開発

DAP12 SI, SCR 発現ベクターを 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、タンパクレベルの発現抑制を

ウエスタンブロットで検証した(図 3)。マイクロアレイ解析により SI17 で発現低下を呈した 22 遺伝子を同定した。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 との関連性が示唆され、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(平成 23 年度佐藤分担報告書参照)。また 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。

またカイクの抗酸化タンパク DJ-1 の遺伝子(BmDJ-1)をクローニングし、脳、中腸、絹糸線、脂肪体、マルピギー管、卵巣、精巣、卵巣、血球における発現を確認し、ミトコンドリア電子伝達系複合体 I 阻害剤 Rotenone 投与による個体死の防御作用を確認した(平成 22 年度分担報告書参照)。

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。白質脳症は脱髄・グリオシス・軸索腫大を主徴としているが発症機序は不明である。

本邦では疫学的実態調査は行われていなかったが、われわれは平成 21 年度(H21-難治-一般-201)に、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、本邦における患者数を約 200 人と推定した。また国内で初めて TREM2/DAP12 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、神経内科専門医の資格を有する研究代表者佐藤が医療に関してセカンドオピニオンの対応を開始した。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。

平成 22 年度(H22-難治-一般-136:1 年目)には、研究をさらに推進するために、研究組織を神経病理学や臨床神経学の専門家を含む合計 8 名に増員強化した。NHD 患者剖検脳組織を免疫組織化学的に解析して、ヒトマクロファージや単球における TREM2 の発現分布を明らかにした(Satoh J et al. *Neuropathology* 31: 363-375, 2011)。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析、神経変性と炎症の同時進行を解明し、新規バイオマーカー RGS1 を発見した(Numasawa Y et al. *Eur J Neurol* 18: 1179-1183, 2011)。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、難病資源バンクに登録した(熊本大学江良沢実教授のご厚意による)。現在、Florent Ginhoux 博士との共同研究で iPS よりミクログリア細胞株を作成中である。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、NHD の病態解明や治療法開発に役立つものと思われる。

平成 23 年度(H22-難治-一般-136:2 年目)には、

NHD 患者剖検脳組織を免疫組織化学的に解析して、罹患脳神経細胞における TREM2/DAP12 シグナル伝達系中心分子 pSyk の発現増強を明らかにした(Satoh J et al. *Neuropathology* 2011, in press)。さらに創薬モデル系として DAP12 ノックダウンヒト単球 THP-1 細胞株と DAP12 欠損ヒト脳ミクログリア細胞株を樹立した(Satoh J et al. *Cell Moll Neurobiol* 2011, in press)。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(Tabunoki H et al. *PLoS One* 6: e17683, 2011)。

以上の研究成果を広く公知するために、平成 23 年 7 月 25 日に公開セミナーを開催した。

E. 結論

平成 21-23 年度の 3 年間に、NHD の臨床病理遺伝学的な側面に焦点を当てて研究を行い、NHD 脳におけるミクログリア・神経細胞の異常活性化、神経炎症と変性の同時進行など関連英文論文 4 編を報告した。現在まで国内外を通じて類似の研究はなく、本研究の成果は厚生労働行政を主導とする患者 QOL 向上の取り組みにつながり、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ド治療法の樹立にも貢献し得ると思われる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sumiyoshi K, Obasashi 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.
2. 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.
 3. Satoh J: Bioinformatics approach to identifying molecular biomarkers and networks in multiple sclerosis. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 1(3): 127-140, 2010.
 4. 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.
 5. 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.
 6. 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.
 7. 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.
 8. 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.
 9. Satoh J, Tabunoki H: Comprehensive analysis of human microRNA target networks. *BioData Mining* 4: e17, 2011.
 10. 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.
 11. 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.
 12. 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.

13. 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.
 14. 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.
 15. Satoh J: Molecular network of microRNA targets in Alzheimer's disease brains. *Experimental Neurology* in press, 2011.
 16. 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.
 17. 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.
 18. 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.
 19. 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: プロトアレイによるタンパク質インターラクトーム解析. 創薬研究のためのタンパク質・プロテオミクス解析技術. 小田吉哉・長野光司編. 羊土社. 75-80, 2010.
 4. 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.
 5. 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.
 6. 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.
 7. 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, Kim SU, Ishida T, Jinnai K, Arima K: Immunopathogenesis of Nasu-Hakola disease brain lesions. 14th International Congress of Immunology. Kobe, 2010.8.23.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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. 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.
2. 佐藤準一、藤本幸太、吉野隆、天竺桂弘子: 遺伝子発現プロフィールから見た 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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.
 12. 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.
 13. 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.
 14. 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.
 15. 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.
 16. 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.
 17. 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.
 18. 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.
 19. 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.
 20. 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.
 21. 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.
22. 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.
23. Satoh J, Tabunoki H: Molecular network analysis of microRNA targets suggests aberrant expression of cell cycle regulators in Alzheimer's disease brain. 日本バイオインフォマティクス学会 2011 年会. 神戸、2011.11.8.
24. 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.

Ⅱ. 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

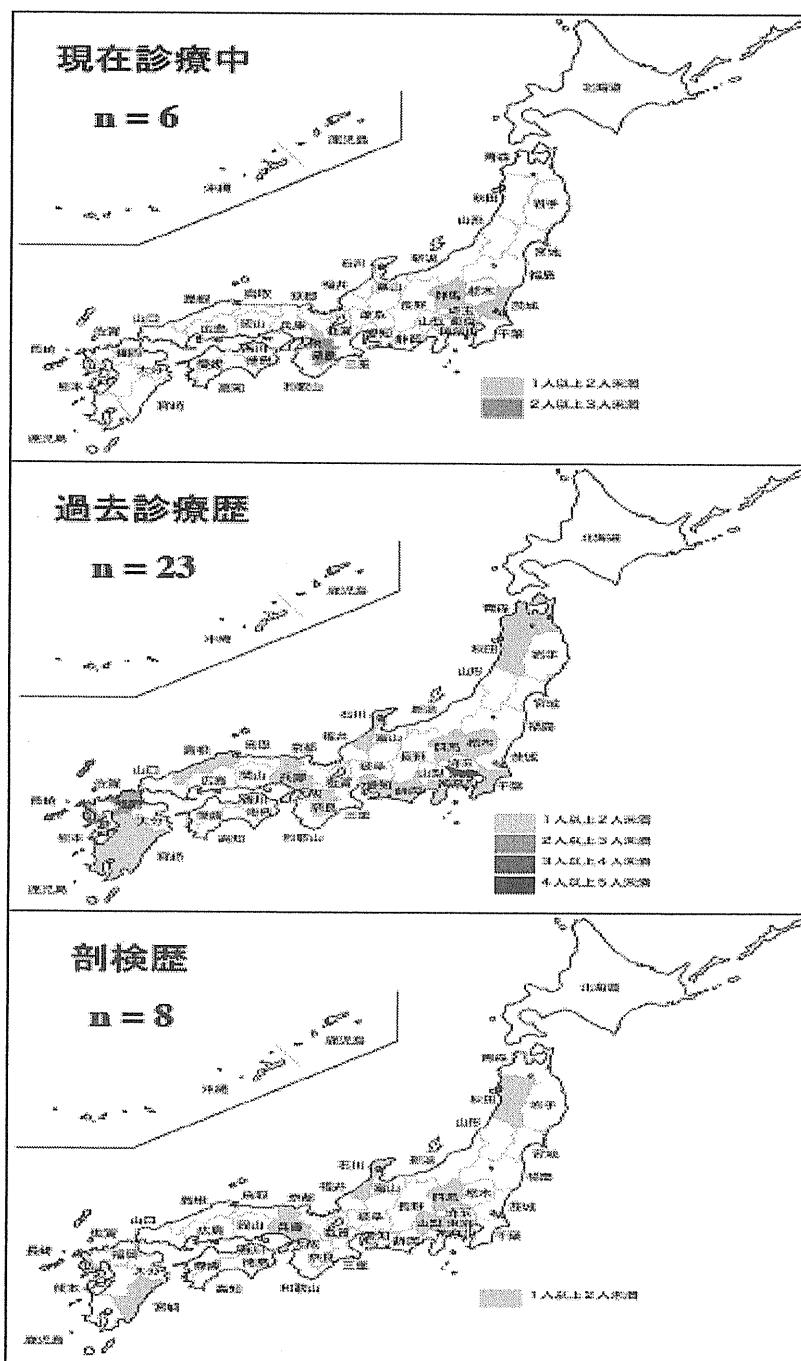


図 1. 那須ハコラ病全国アンケート調査集計結果.

全国の神経内科・精神神経科・整形外科教育研修施設 4071 カ所を対象に文書を郵送して、NHD の臨床病理遺伝学的項目に関するアンケート調査を実施した。患者に関して、現在診療中の施設 (n=5)、過去に診療歴のある施設 (n = 22)、過去に剖検歴のある施設 (n = 7) の分布を示した。

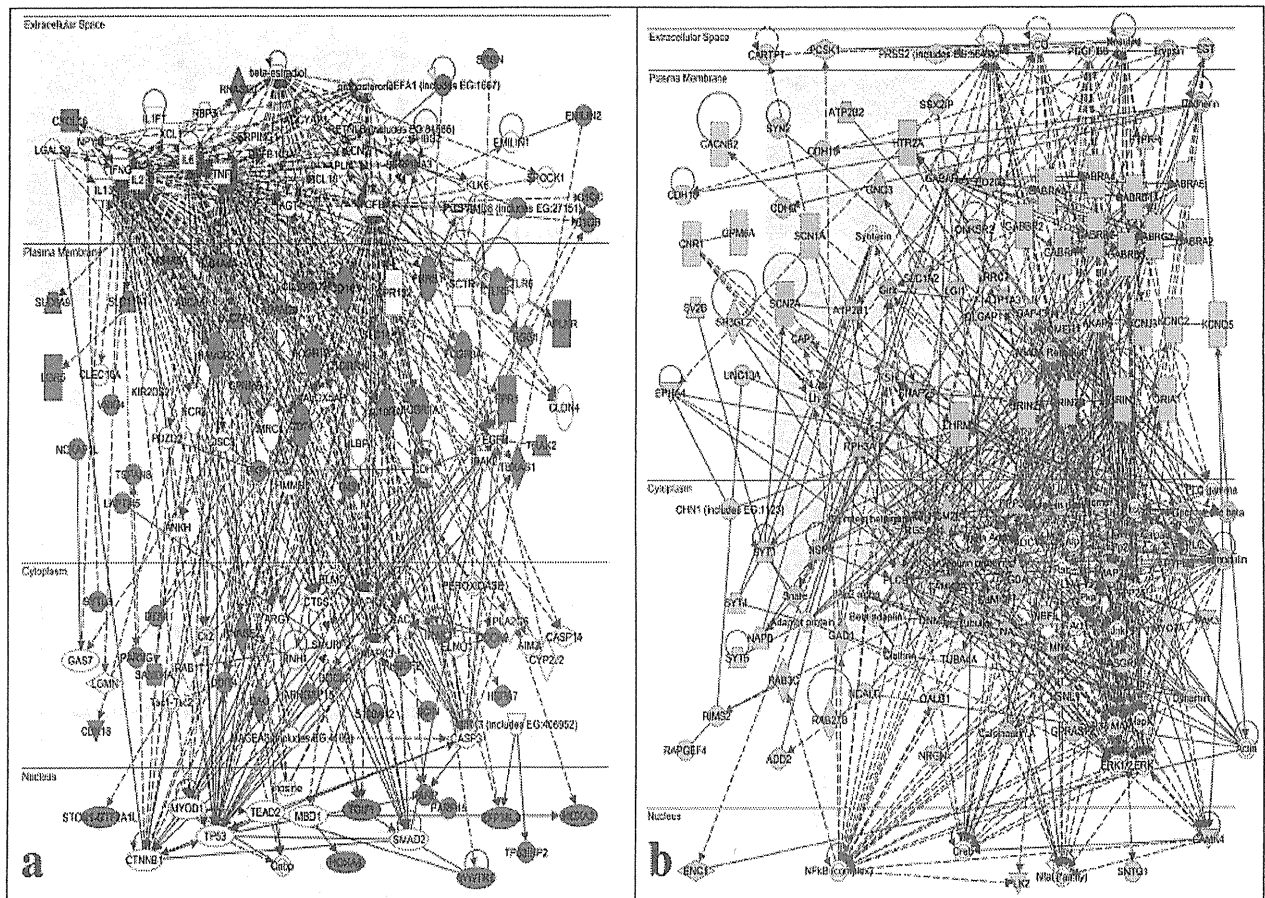


図 2. 那須ハコラ病脳における神経炎症と神経変性の同時進行。

PT1(TREM2 c.482+2T>C)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。

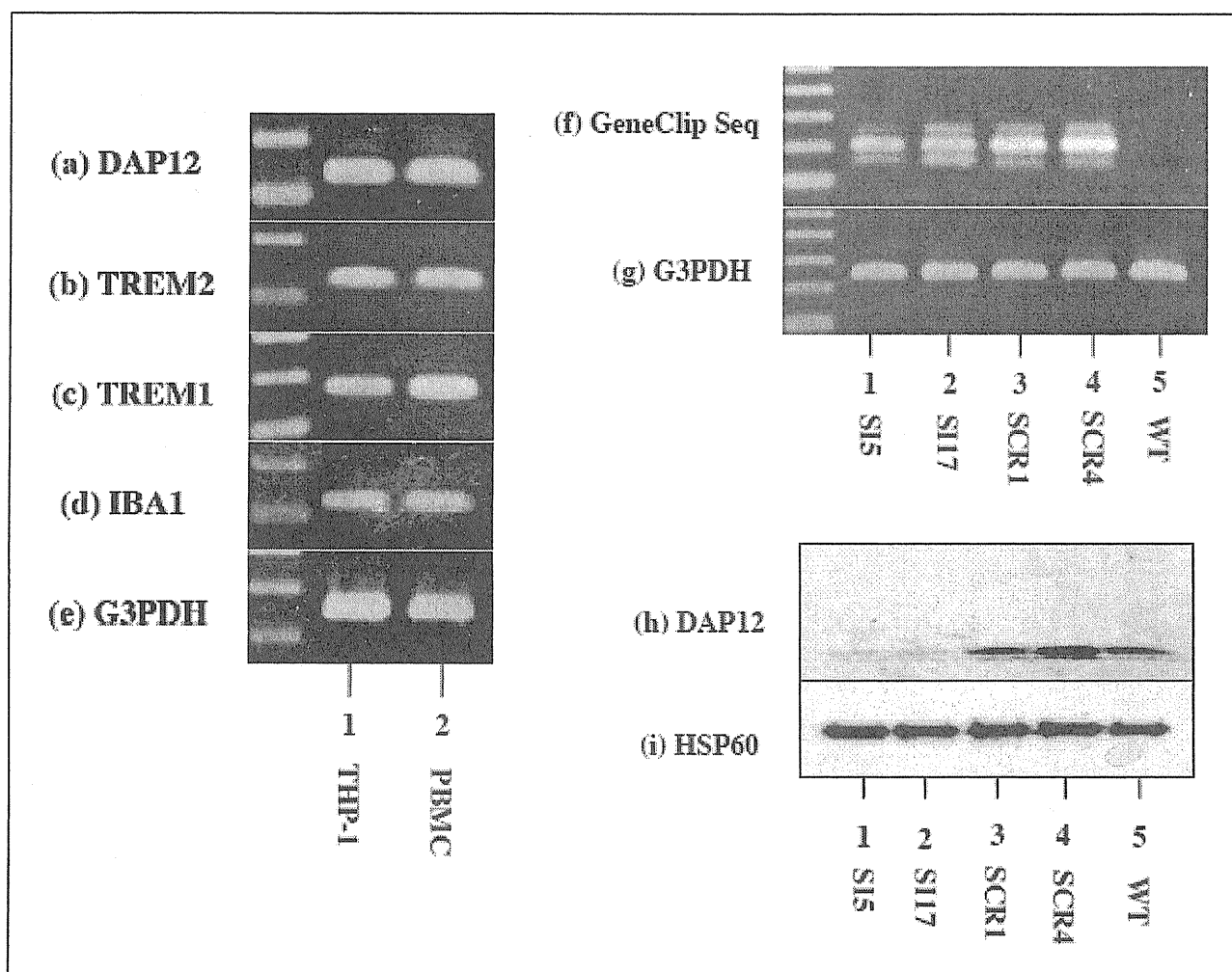


図 3. DAP12 siRNA 発現 THP-1 安定細胞株の樹立.

はじめに RT-PCR でヒト単球細胞株 THP-1 における DAP12, TREM2, TREM1, IBA1, G3PDH(an internal control)の発現を確認した(a-e)。次に DAP12 SI, SCR を発現ベクターにクローニングして導入、SI 発現クローン SIS, SI17 および SCR 発現クローン SCR1, SCR4 を樹立し、外来遺伝子の安定的な組み込みを PCR で確認した(f, g)。またタンパクレベルの発現抑制をウエスタンブロットで検証した(h, i)。PBMC, peripheral blood mononuclear cells; WT, wild-type THP-1 cells; HSP60, 60-kDa heat shock protein (an internal control)。

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 (PLOS: 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・グリオーシス・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>脳のマ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。脳のマ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 (PLOSL; 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>