

- 長崎県医師会館. 産婦人科における臨床遺伝学-ゲノム医療の展開- 総論.
- ② 第 18 回小児血液セミナー 平成 26 年 4 月 5 日 (土), ANA クラウンプラザホテル福岡. 「小児血液・主要研究における全エクソーム解析の可能性」次世代シーケンサーを用いた疾患解析法～総論
- ③ 第 57 回日本形成外科学会総会・学術集会 平成 26 年 4 月 9 日 (水)～11 日 (金), 長崎ブリックホール. 特別企画「予防的乳房切除の今後」特別企画 1-1 遺伝子診断が医療にもたらすもの
- ④ 平成 26 年度長崎県高等学校理科教育研究会第 55 回定期大会総会, 2014 年 5 月 23 日 (金) 長崎県佐世保北高校. 医学系研究のための高等学校理科から医学部学生教育について
- ⑤ 第 23 回日本組織適合性学会大会@長崎大学良順会館 ランチョンセミナー 次世代シーケンサーで何が出来るのか 平成 26 年 9 月 14 日 (日)
- ⑥ 第 10 回広島大学-長崎大学連携研究事業カンファランス -放射線災害医療の国際教育拠点確立に向けた機関連携事業- 2014 年 5 月 31 日 (土), 場所: 長崎大学良順会館 専斎ホール, 長崎. DIGItAl PCR を利用した rArE vArIAnt/mutAtIon 検出法の検討. 渡辺聡, 朝重耕一, 吉浦孝一郎, 三嶋博之, 木下晃
- ⑦ 第 59 回日本人類遺伝学会 2014 年 11 月 19 日 (水)～22 日 (土), 場所: タワーホール船堀 (東京都江戸川区), 東京
- 1BO-1: 家族性肺がんにおける新規責任遺伝子の同定. NovEl CAusAtIvE GEnE oF FAmIIIAl non-smAll CEll lunG CAnCEr. 朝重耕一, 渡辺聡, 三嶋博之, 木下晃, 松本桂太郎, 及川将弘, 宮崎拓郎, 土谷智史, 山崎直哉, 福島喜代康, 永安 武, 吉浦孝一郎
- 1O1-3: 多発性歯牙腫合併症例を含む SATB2 遺伝子変異症候群の新規変異の同定. IDEntIFICAtIon oF NoEl MutAtIons In PATIEnts wItH SATB2 GEnE MutAtIon SynDromE wItHout Multiple ODontom. 三嶋博之, 菊入崇, 三古谷 忠, 木下晃, 吉浦孝一郎
- 1O14-2: DDPCR を用い他 MCCunE-AIBrIGHt 症候群の GNAS モザイク変異検出の試み. GNAS mosAIC mutAtIon DEtECtIon oF tHE MCCunE-AIBrIGHt synDromE wItH DDPCR. 渡辺聡, 伊達木澄人, 中富明子, 木下晃, 朝重耕一, 木下英一, 三嶋博之, 森内浩幸, 吉浦孝一郎
- 2O3-2: PAnIC 障害多発家系例に対する ExomE 解析. THE molECulAr AnAlYsIs oF FAmIIIAl PAnIC DIsoRDEr. 森本芳郎, 小

- 野慎治, 森貴俊, 黒滝直弘, 吉浦孝一郎,
小澤寛樹
- 3O4-1: 母体血漿中への妊娠関連胎盤特異的
miCroRNA の流入量および分娩後の消失
速度と陣痛との関連について. EFFECt oF
LABor on plAsmA ConCEntRAtions AnD
postpArtum ClEARAnCE oF prEGnAnCy-
AssoCIAtED, plAsmA-spECIFIC
miCroRNA. 森崎慎太郎, 三浦清徳, 東島
愛, 阿部修平, 三浦生子, 長谷川ゆり,
吉田 敦, 金内優典, 吉浦孝一郎, 増崎
英明
- 3O4-2: 母体血と比較して胎児血で高発現す
る miCroRNA の同定. IDEntIFICAtIon oF
HIGHly ExprEssED miCroRNAs In FEtAl
BlooD CElls CompArED mAtErnAl BlooD
CElls. 東島 愛, 三浦清徳, 三嶋博之, 木
下 晃, 塚本大空, 阿部修平, 長谷川ゆ
り, 吉田 敦, 吉浦孝一郎, 増崎英明
- 3O4-3: 母体血漿中 miR-517A および
miR518B は前置胎盤に対する帝王切開時
の出血量に関連する. miR-517A AnD
miR518B In mAtErnAl plAsmA As A
prEDICtIvE mArKEr For tHE
HEmorrHAGE volumE In plACEntA
prEvIA At DElIvEry. 長谷川ゆり, 三浦清
徳, 東島愛, 阿部修平, 三浦生子, 吉田
敦, 金内優典, 吉浦孝一郎, 増崎英明
- 3O4-4: 母体血漿中 CELL-FrEE miCroRNA 流
入量と母体の BoDy mAss InDEX および新
生児出生体重との関連. ClrCulAtInG
lEvElS oF mAtErnAl plAsmA CF-mIR-21
ArE AssoCIAtED wItH mAtErnAl BoDy
mAss InDEX AnD nEonAtAl BIRtH wEIGHt.
淵直樹, 三浦清徳, 東島愛, 長谷川ゆり,
阿部修平, 三浦生子, 村上優子, 三嶋博
之, 木下晃, 金内優典, 吉浦孝一郎, 増
崎英明
- 3O4-5: 相胎間輸血症候群発症予測における
母胎血漿中胎盤特異的 CELL-FrEE mRNA
の有用性に関する検討. PrEDomInAntly
plACEntA-ExprEssED mRNAs In
mAtErnAl plAsmA As prEDICtIvE
mArKErs For twIn-twIn trAnsFusion
synDromE. 村上優子, 三浦清徳, 東島 愛,
長谷川ゆり, 阿部修平, 三浦生子, 三嶋
博之, 木下晃, 金内優典, 吉浦孝一郎,
増崎英明
- 3O11-4: NILM/ASC-US 例における HPV-16
単独感染群と HPV-52 単独感染群の細胞
診 所 見 の 変 化 . SInGLE HumAn
pApIllomAVirus 16 or 52 InFEctIon AnD
lAtEr CytoloGICAl FlnDInGs In JApAnEsE
womEn wItH NILM or ASC-US. 阿部修平,
三浦清徳, 三浦生子, 山崎健太郎, 長谷
川ゆり, 東島愛, 吉田敦, 金内優典, 吉
浦孝一郎, 増崎英明

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許得取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

平成 26 年度厚生労働科学研究委託費
(難治性疾患等実用化研究事業 (難治性疾患等実用化研究事業))
「遺伝性神経疾患の分子病態に基づく治療法開発に関する研究」
研究分担報告書

研究分担者：齋藤伸治
名古屋市立大学大学院医学研究科新生児 小児医学分野 教授

研究要旨

発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ (PKD) は PRRT2 の変異により発症する。PRRT2 の変異は PKD 以外の乳児けいれんの原因ともなり、必ずしも遺伝型と表現型の連関は明確ではない。PKD はシナプス機能の制御の問題と考えられるが、分子病態は不明である。新規治療薬の開発には、病態の解明が必須である。私たちは、遺伝子変異がシナプス可塑性を障害する疾患である AnGEImAn 症候群 (AS) をモデルとして、遺伝子変異と分子病態を研究するシステムの構築を行い、新規治療薬開発のプラットフォームを築くことを目的として、AS 由来 IPS 細胞の樹立を行った。

A. 研究目的

発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ (PKD) は PRRT2 の変異により発症する。PRRT2 の変異は PKD 以外の乳児けいれんの原因ともなり、必ずしも遺伝型と表現型の連関は明確ではない。さらに、PKD はシナプス機能の制御の問題と考えられるが、分子病態は明らかにされていない。解析が進まない理由のひとつとして、遺伝子変異により引き起こされるシナプス機能障害を評価するシステムが開発されていないことが挙げられる。そこで、私たちは、シナプス機能障害により発症することが示されている AnGEImAn 症候群 (AS) をモデルとして、遺伝子変異とシナプス機能との関係を研究するためのプラットフォームの作成を目的として IPS 細胞に着目した。IPS 細胞から神経細胞を分化させることで、In vitro にてシナプス形成を再現することができる。AS 患者由来 IPS 細胞を樹立することで、このシステムの FEAsIBility を検討することを目的とする。

B. 研究方法

AS が分子遺伝学的に診断された 3 例を疾患 IPS 細胞研究拠点である慶応義塾大学生理学教室 (岡野栄之教授) に委託して、IPS 細胞の樹立を行っていただいた。委託した患者の遺伝学的診断はエピ変異 2 例、刷り込み中心微細欠失例 1 例である。

(倫理面への配慮)

本研究は名古屋市立大学大学院医学研究科倫理審査委員会にて承認を受けており、解析にあたっては、両親から書面による同意を得た。

C. 研究結果

エピ変異 2 例から IPS 細胞をそれぞれ 3 ラインずつ樹立した。残り 1 例では現在樹立が進行中である。樹立された AS エピ変異由来 IPS 細胞では SNURF-SNRPN 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化および UBE3A 遺伝子のゲノム刷り込み状態が維持されていることが確認された。

D. 考察

今回の研究において、AS患者由来IPS細胞の樹立に成功した。IPS細胞における初期化はゲノム刷り込み現象の樹立よりは後の状態までであることが報告されている。今回樹立されたIPS細胞においてAS患者において認められたゲノム刷り込み状態が維持されていたことは、IPS細胞の初期化がゲノム刷り込み現象の樹立時期には至っていないことを示し、これまでの報告と一致する結果であった。

岡野研ではIPS細胞から種々の神経細胞への分化方法が確立している。AS患者由来IPS細胞を神経細胞へ分化させ、In vitroでシナプス形成を行うことが、次の実験ステップとして取り組んでいる。シナプス機能異常をIn vitroで作成することができれば、有効な薬物のスクリーニングを基盤を作成することができる。PRRT2変異に由来するPKDの治療法開発においても同様の手法を用いることができるため、このIn vitroシステムの確立は重要な意義を有すると考えている。

E. 結論

ASをモデルとして、遺伝子変異が特定されている患者由来IPS細胞の樹立に成功した。神経細胞へ分化誘導し、In vitroでシナプス形成を再現することで、薬物スクリーニングの基盤を作ることが期待される。

F. 研究発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. 論文発表

- ① Goto M, SAItO Y, HonDA R, SAItO T, SuGAI K, MATsuDA Y, MIyAtAKE C, TAKEsHIItA E, IsHIyAmA A, KomAKI H, NAKAGAwA E, SAsAKI M, Uto C, KIKuCHI K, MotoKI T, SAItOH S. EpIsoDIC trEmors rEprEsEntInG CortICAl

myoClonus ArE CHArACTErIstIC In AnGElmAn synDromE DuE to UBE3A mutAtIons. *BrAIn DEv* [EpuB AHEAD oF prInt]

- ② NEGIshI Y, HAttorI A, TAKEsHIItA E, SAKAI C, AnDo N, Ito T, Goto Y-I, SAItOH S. HomoplAsmy oF A mItoCHonDrIAI 3697G>A mutAtIon CAusEs LEIGH synDromE. *J Hum GEnEt* 59: 405-407, 2014.
- ③ OKAmoto N, MIyA F, TsunoDA T, YAnAGIHArA K, KAtO M, SAItOH S. YAmAsAKI M, KAnEmurA Y, KosAKI K. KIF1A mutAtIon In A pAtIEnt wIth proGrEssIvE nEuroDEGEnErAtIon. *J Hum GEnEt* 59:639-641, 2014.
- ④ OKAmoto N, MIyA F, TsunoDA T, KAtO M, SAItOH S. YAmAsAKI M, SHImIzu A, TorII C, KAnEmurA Y, KosAKI K. TArGETED nExt-GENErAtIon sEquEnCInG In tHE DIAGnosIs oF nEuroDEvElopmentAl DIsoRDers. *Clin GEnEt* [EpuB AHEAD oF prInt]
- ⑤ NEGIshI Y, MIyA F, HAttorI A, MIzuno K, HorI I, AnDo N, OKAmoto N, KAtO M, TsunoDA T, YAmAsAKI M, KAnEmurA Y, KosAKI K, SAItOH S. TrunCATInG mutAtIon In *NF1A* CAusEs BrAIn mAIFormAtIon AnD urInAry trACT DEFECTs. *Hum GENomE Var* 2:15007, 2015.

2. 学会発表

- ① YutAKA NEGIshI, AyAKo HAttorI, IKumi HorI, NAoKI AnDo, Fuyuki MIyA,

TsunoDA TAtsuHIKo, NoBuHIKo
OKAmoto, MItsuHIro KAto, MAml
YAmAsAKI, YonEHiro KAnEmurA,
KEnJIro KozAKI, SHInJI SAItOH.
TrunCAInG mutAtIon oF *NFLA* CAusEs A
BrAIn mAIFormAtIon AnD urInAry trACT
DEFECT. 64th AnnuAl MEETInG oF
AmErICAn SoCIety oF HumAn GEnEtICs,
SAnDIEGo, USA, 10/18-21/20

② 根岸豊、堀いくみ、服部文子、安藤直樹、
齋藤伸治、水野健太郎、宮冬樹、角田達
彦、岡本伸彦、加藤光広、山崎麻美、金
村米博、小崎健次郎 NFIA 遺伝子変異は
1p32-p31 欠失症候群の中核症状を規定
する 第 59 回日本人類遺伝学会 平成 26
年 11 月 20-22 日（東京）

③ 横井摂理、石原尚子、夏目淳、堤真紀子、
大江瑞恵、加藤武馬、稲垣秀人、柳原格、
齋藤伸治、倉橋浩樹 水無脳症を呈した
TUBA1A 遺伝子異常の一例 第 59 回日
本人類遺伝学会 平成 26 年 11 月 20-22
日（東京）

**G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含
む。）**

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

平成 26 年度厚生労働科学研究委託費
(難治性疾患等実用化研究事業 (難治性疾患等実用化研究事業))
「PKD の発症メカニズムに関する研究」
研究分担報告書

研究分担者 城谷圭朗 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科薬品 生物工学研究室 准教授
岩田修永 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 生物工学研究室 教授

研究要旨

発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ (PKD) の原因遺伝子 PRRT2 は、脳内で 70 KDA の全長タンパク質として合成された後に、プロセッシングを受け 20 DA の C 末断片としても存在することが明らかになった。これは PRRT2 の機能がプロセッシングにより調節されていることを示唆している。また全長の PRRT2 はナトリウムチャンネルと相互作用したことから、PRRT2 の機能としてナトリウムイオンの神経細胞内流入及びその後の神経発火を調節していることが示唆された。このように本研究により PKD の発症メカニズムについて重要な知見が得られた。

A. 研究目的

本研究グループの統括黒滝らをはじめとして世界中の研究者から発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ(PKD)の原因遺伝子として PRRT2 (prolInE-riCH trAnsmEmBrAnE protEIn 2)が同定されている(CHEN Et Al., 2011、Ono Et Al., 2012、他多数)。PKD は急激な随意運動に引き続いて不随意運動が誘発され日常生活に支障をきたす疾患であるため、根本治療薬が必要である。しかしながら PKD の発症メカニズムが全く明らかでないため根本治療薬はない。そこで対処療法に留まる現在の治療法を進展させるため、PRRT2 の変異による発症メカニズムを解明することを目的とした。

PRRT2 は膜貫通部位を 2 つ持つ膜タンパ

ク質である。患者で見つかっているほとんどの変異は PRRT2 タンパク質の翻訳途中で終止コドンが生じるため、全長タンパク質が合成されない。このことから PKD は PRRT2 の機能消失により発症するという loss of FunCtion 説が有力である。ところが現在までのところ PRRT2 の生理機能は全くわかっていない。そこで PRRT2 の生理機能を同定することで PKD の発症機序を明らかにすることを試みた。また対処療法ではあるが、ナトリウムチャンネル遮断薬のカルバマゼピンやフェニトインが PKD の予防に効果的であるという臨床知見をもとに、PRRT2 はナトリウムチャンネルやその関連因子と相互作用しているという仮説を立て、検証した。

B. 研究方法

PRRT2の機能を解析するため、ヒトPRRT2の野生型CDNA（アミノ酸340個をコードする）を入手し、それをもとに患者で発見されている変異の約80%を占めるC.649DupC変異型（アミノ酸223個をコードする）を作製し、哺乳類細胞用発現ベクターに挿入した。作製した発現ベクターをマウス神経芽細胞腫NEuro2A細胞もしくはヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞に一過的および恒常的に導入し、PRRT2タンパク質のウエスタンブロット分析を行った。またPRRT2と他のタンパク質との相互作用を調べるため、抗PRRT2抗体もしくは、他のタンパク質に対する抗体で、PRRT2を恒常的に発現するSH-SY5Y細胞の膜タンパク質を免疫沈降しウエスタンブロット分析を行った。

（倫理面への配慮）

本報告で行った研究は倫理面への配慮が必要ないものであった。

C. 研究結果

PRRT2の野生型と変異型C.649DupCの発現ベクターを哺乳類細胞に導入しウエスタンブロット分析を行ったところ、野生型は70kDa、変異型は55kDaにPRRT2タンパク質が検出された。変異型は常に野生型より発現量が少なかった。これはloss of Function説を支持するものである。また野生型は70kDaのタンパク質に加えて、50kDaや20kDaにもPRRT2タンパク質が検出された。これはPRRT2が細胞内でプロセッシング（切断）を受けていることを示唆している。

次に、野生型PRRT2から合成された50kDaや20kDaの切断部位を同定するため、N末端あるいはC末端にタグを接続したPRRT2の発現ベクターを哺乳類細胞に導入しタグに対する抗体でウエスタンブロット分析を行った。その結果、N末端にタグをつけたPRRT2を発現させると、全長のPRRT2以外に約50kDaにPRRT2が検出された。よってこの約50kDaはPRRT2のN末端を含むため、C末付近でプロセッシングされた断片であることが示唆された。またC末端にタグをつけたPRRT2では全長のPRRT2以外にやはり約50kDaにPRRT2が検出されたため、この約50kDaはN末付近でプロセッシングされた断片であることが示唆された。つまりウエスタンブロット分析で検出された約50kDaには切断部位の異なる2つのPRRT2タンパク質が重なって検出されていると考えられる（図1）。さらに興味深いことにC末端にタグをつけたPRRT2からは約20kDaにもPRRT2タンパク質が検出された。PRRT2はC末付近でもプロセッシングされることを示唆しており、N末端にタグを付けた実験結果と矛盾しない。以上をまとめると、PRRT2は全長が合成されたあと、図1のように2箇所プロセッシングされることが示唆された。

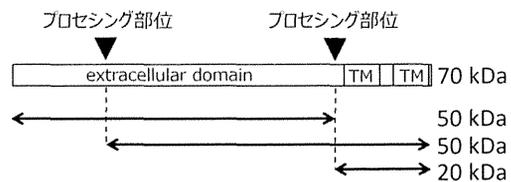


図1 PRRT2のプロセッシング部位

ウエスタンブロット分析による分子量からPRRT2のプロセッシング部位を推定して矢頭で示した。最上段はPRRT2（70kDa）の構造を示す。extracellular domainは細胞外部位、2つのTMは膜貫通部位である。ウエスタンブロット分析で検出された50kDaと20kDaの位置を下に示した。

次に脳内の PRRT2 が実際にプロセシングされるかどうかを調べるため、マウス大脳皮質の膜タンパク質中に存在する PRRT2 の分子量をウエスタンブロット分析で調べた。その結果全長の 70 KDA と約 20 KDA に PRRT2 が検出された。これより、マウス大脳皮質の内在性 PRRT2 は全長タンパク質に加えて、C 末付近でプロセシングを受けた 20 KDA の C 末断片が存在することが初めて明らかになった。一方培養細胞に PRRT2 を一過的に発現させた際に検出された 50 KDA の PRRT2 はマウス脳からは検出されなかった。

次に PRRT2 の生理機能を明らかにするため、過去の文献をもとに PRRT2 との相互作用が考えられる候補分子をあげた。まず臨床現場からの知見として、PKD にはナトリウムチャンネル遮断薬のカルバマゼピンやフェニトインが予防に効果的であることが報告されている。このことから、PKD の患者では神経細胞のナトリウムイオンの濃度調節が適切に行われなくなり神経発火を起こしやすい状態になっている可能性が示唆される。よってナトリウムチャンネルを PRRT2 の相互作用の候補因子としてあげた。またナトリウムイオンの細胞外放出を行うナトリウムポンプも PRRT2 の相互作用分子として候補にあげた。PKD と臨床症状が似ているてんかんの原因遺伝子としてナトリウムチャンネルやナトリウムポンプが同定されていることもこれらを候補分子にあげた根拠になっている。またこれまでにてんかんの原因遺伝子として、カリウムチャンネル、カルシウムチャンネル、SNAP25、そして SyntAxIn 1 などいずれも神経細胞の発火に関わる因子が同定されているので、これら

も候補分子にあげた。

まずナトリウムチャンネルと PRRT2 との相互作用を共免疫沈降実験により調べた。PRRT2 を恒常的に発現する SH-SY5Y 細胞を作製しその膜タンパク質から、ナトリウムチャンネルのアルファサブユニットを認識する抗体で免疫沈降した。その結果、ナトリウムチャンネルのアルファサブユニットは免疫沈降され、同時に PRRT2 も沈降された(図 2、レーン右)。これにより PRRT2 とナトリウムチャンネルとの相互作用が明らかになった。次に同様の方法でナトリウムポンプや SyntAxIn 1 が PRRT2 と相互作用しているかを調べたが、これまでのところ相互作用は検出できていない。

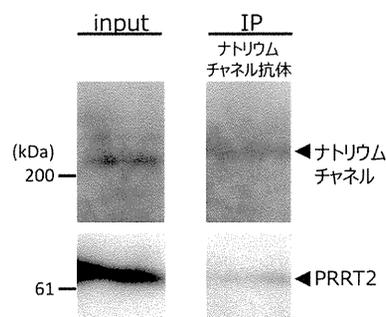


図 2 PRRT2 と Na⁺ channel の共免疫沈降

PRRT2 を恒常的に発現する SH-SY5Y 細胞の膜タンパク質を、抗ナトリウムチャンネル (Na⁺ channel) 抗体で免疫沈降 (IP) し、抗ナトリウムチャンネル抗体と抗 PRRT2 抗体でウエスタンブロット分析した (レーン右)。input は免疫沈降する前の膜タンパク質 (レーン左) である。

D. 考察

PRRT2 の機能を調べるため、PRRT2 の野生型と C.649DupC 変異型を一過的に培養細胞に導入すると、それぞれ 70 KDA と 50 KDA のタンパク質が発現された。発現量は野生型 PRRT2 に比べて変異型は常に少なかった。また野生型 PRRT2 を恒常的に発現する細胞は作製できたが、変異型を恒常的に発現す

る細胞は得られていない。これらのことより C.649DupC 変異型は細胞内での安定性が低くタンパク質として機能を発揮できない可能性が示唆された。これは loss of Function 説を支持する結果である。

PRRT2 は 70 KDA の全長タンパク質として合成された後、2か所でプロセッシングされ 50 KDA と 20 KDA の切断断片として存在することが今回の研究で示された (図 1)。さらにマウス脳を用いた実験より、生体内では少なくとも全長 PRRT2 に加えて C 末付近で切断された 20 KDA の PRRT2 (図 1) が存在していることがわかった。現在のところ全長 PRRT2 と 20 KDA の PRRT2 のどちらが生理機能を持っているかは不明であるが、その両方の可能性を考えて研究を進める必要がある。またどちらの分子が生理機能を持っている場合でも、切断により生理機能の発現が調節されていることが考えられるので、PRRT2 を切断する酵素の同定も PKD の発症メカニズムを考えるうえで重要になる。バイオインフォマティクス解析を行うと、20 KDA の PRRT2 を産生する切断部位付近には、数種のマトリックスメタロプロテアーゼやカテプシン K などによる切断配列があった。これら酵素が PRRT2 の切断を行っているかどうかについて阻害剤を用いた実験で明らかにしていく予定である。この 20 KDA の PRRT2 は膜貫通部位を含んでいるため細胞膜上で機能していると考えられる。よって 20 KDA の PRRT2 がナトリウムチャンネルなどの膜タンパク質と相互作用するかどうかを明らかにすることは発症メカニズムを考えるうえで重要である。一方、N 末端を含む 50 KDA の PRRT2 はマウス脳の膜タンパク質からは検出されな

ったが、細胞外液中に分泌されたため検出できなかった可能性がある。今後はマウス脳の細胞外環境に存在するかどうか、存在する場合には生理機能を持つか、切断を行う酵素は何かという点に注目して PKD 発症メカニズムの解明を進めていく。

PRRT2 の機能を明らかにするため、細胞膜上で相互作用する分子の候補をあげ共免疫沈降実験を行った結果、全長の PRRT2 とナトリウムチャンネルが相互作用することが示唆された。PKD と似た症状を示すてんかんの原因遺伝子としてナトリウムチャンネルが同定されていることを考えればこの結果は PKD の発症メカニズムの一部を説明できる。つまり、通常 PRRT2 は神経細胞膜上でナトリウムチャンネルと相互作用し神経発火を負に制御しているとすれば、PKD の患者では PRRT2 の機能消失により神経発火が起りやすい状態になっているため不随意運動が現れると考えることができる。この仮説を明らかにするために、PRRT2 を高発現させた神経細胞、あるいはノックダウンした神経細胞に刺激電流を与えた際の膜電位の変化を測定することにより PRRT2 が神経発火に与える影響を調べる予定である。相互作用分子の候補としてあげたカリウムチャンネル、カルシウムチャンネル、SNAP25 についても共免疫沈降実験を行い相互作用を明らかにしていく。

E. 結論

本分担研究の担当責任者 (城谷圭朗と岩田修永) は、PKD の原因遺伝子である PRRT2 は脳内で全長 70 KDA と C 末断片の 20 KDA のタンパク質として存在することを明らかにし、PRRT2 の機能がプロセッシングにより

調節されている可能性を示唆した。全長の PRRT2 はナトリウムチャンネルと相互作用したことから、PRRT2 の機能としてナトリウムイオンの神経細胞内流入およびその後の神経発火を調節していることが示唆された。

F. 健康危険情報

(委託業務成果報告(業務項目)には記入せずに、委託業務成果報告(総括)にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① SAItO T, MATsuBA Y, MIHirA N, TAKAno J, Nilsson P, ItoHArA S, IwAtA N, SAIDo TC: SInGLE *App* KnoCK-In mouse moDEls oF AlzHEImEr's DisEAsE. NAT NEuroSCI 17 (5): 661-663, 2014
- ② KIzuKA Y, KIAtzumE S, FuJInAwA R, SAItO T, IwAtA N, SAIDo TC, NAKAno M, YAmAGuCHI Y, HAsHImoto Y, StAuFEnBIEl M, HAtsutA H, MurAyAmA S, MAnyA H, EnDo T, TAnIGuCHI N: An ABErrAnt suGAR moDIFICAtion oF BACE1 BloCKs Its lysosomAl tArGETInG In AlzHEImEr's DisEAsE. EMBO Mol MED 7 (2): 175-189 (2015)
- ③ Nilsson P, SEKIGuCHI M, AKAGI T, Izumi S, Komori T, Hui K, SorGJErD K, TAnAKA M, SAItO T, IwAtA N, SAIDo TC: AutopHAGy-RElAtED ProtEIn 7 DEFICIEnCy In Amyloid β (A β)

PrECursor ProtEIn TrAnsGEnIC MICE DECrEAsEs A β In tHE MultIvEsICulAr BoDIEs AnD InDuCEs A β ACCumulAtion In tHE GolGI. Am J PAtHol 185 (2): 305-313 (2015)

- ④ 浅井将, 城谷圭朗, 近藤孝之, 井上治久, 岩田修永: 孤発性および家族性アルツハイマー病患者由来 IPS 細胞を用いたアルツハイマー病の病態解析. 日本薬理学雑誌 143 (1): 23-26, 2014
- ⑤ 高橋茜, 城谷圭朗, 浅井将, 岩田修永, 西道隆臣: 「第 15 節 アルツハイマー病の遺伝子治療」遺伝子治療・診断の最先端技術と新しい医薬品・診断薬の開発. (第 7 章 各疾患における遺伝子治療、遺伝子診断の現状と今後有望な開発ターゲットの考察). 株式会社技術情報協会 (東京) pp. 366-372, 2014

2. 学会発表

国際学会

- ① IwAtA N: ExpErImEntAl GEnE tHErApy For AlzHEImEr's DisEAsE-A novEl ApproACH usInG A vIral vECTOR DrIVInG nEuron-spECIFIC GEnE ExprEssion By InTRAvAsCulAr ADmInIstrAtion. THE 4th BusAn-NAGAsAKI JoInt Symposium on AGInG REsEARCH: ABstrAct p.9, (BusAn, South KorEA) FEB. 21, 2014.
- ② SHIrotAnI K: IPS stuDY oF sporADIC AlzHEImEr's DisEAsE: THE 5th NAGAsAKI-HAllym JoInt MEETInG on

NEuroBIoloGy AnD BrAIIn AGInG:
(NAGAsAKI, JApAn) MAr. 8, 2014.

- ③ Nilsson P, SEKIGUCHI M, AKAGI T, Izumi S, Komori T, Hui K, TANAKA M, SAITO T, Iwata N, SAIDO T: MECHANISMS OF Autophagy-mediated $A\beta$ secretion. AAIC14/Alzheimer's Association International Conference (Copenhagen, Denmark), Jul. 12-17, 2014.

国内学会

- ① 浅井 将, 中野梨絵, 小出恵理子, 森田知樹, 荒木 希, 渡邊かおり, 八幡直樹, 関 恒慶, 小林千浩, 戸田達史, 城谷圭朗, 井上治久, 岩田修永: IPS細胞の神経分化過程における $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ 産生比の変化とその責任遺伝子の解析. IPS細胞研究の今「IPS細胞」研究支援3制度合同シンポジウム2014抄録集 p. 85, 2014
- ② 城谷圭朗, 星 京香, 荻谷慶喜, 奈良清光, 伊藤浩美, 松本加奈, 長江雅倫, 山口芳樹, 中島 円, 宮嶋雅一, 新井 一, 久野 敦, 成松 久, 橋本康弘, 岩田修永: レクチンによる抗体抗原反応の阻害を利用した糖タンパク質迅速測定法の開発. 日本薬学会第134年会 要旨集 4 p. 131, 2014
- ③ 浅井 将, 城谷圭朗, 岩田修永: 疾患IPS細胞を用いたアルツハイマー病オリゴマー仮説の検証. 日本薬学会第134年

会 要旨集 1 p. 135, 2014

- ④ 北爪しのぶ, 木塚康彦, 藤縄玲子, 斉藤貴志, 岩田修永, 西道隆臣, 中の三弥子, 山口芳樹, 橋本康弘, 初田裕幸, 村山繁雄, 萬谷 博, 遠藤玉夫, 谷口直之: BACE1細胞内安定性をコントロールするバイセクト糖鎖. 日本薬学会第134年会 要旨集 1 p. 135, 2014
- ⑤ 岩田修永: IPS細胞を用いたアルツハイマー病の発症機構と遺伝子治療. 長崎県小児科医会総会 学術講演会, 2014
- ⑥ 川久保 昂, 金城亜衣美, 池原健太, 丸山 敬, 浅井 将, 城谷圭朗, 岩田修永: アルツハイマー病病理におけるDYRK1AとRCAN1の機能的役割について. 平成26年度日本生化学会九州支部例会 要旨集 p. 36, 2014
- ⑦ 小出恵理子, 森田知樹, 渡邊かおり, 近藤孝之, 浅井 将, 城谷圭朗, 井上治久, 岩田修永: アルツハイマー病患者IPS細胞由来神経細胞におけるオートファジーの機能破綻. 第19回日本病態プロテアーゼ学会学術集会 要旨集 p. 45, 2014
- ⑧ 城谷圭朗: IPS細胞を駆使した認知症のグライコバイオロジー. 第33回日本糖質学会年会 要旨集 p. 38, 2014
- ⑨ 岩田修永: アルツハイマー病原因解明や治療方法確立へのAAVの利用. 第36回日本生物学的精神医学会・第57回日本神経化学会合同年会, 2014

- ⑩ 能登雄太, 吉崎涼平, 門富竜之介, 森田知樹, 浅井 将, 城谷圭朗, 武田 晃, 阿保博仁, 山本一夫, 関口みさき, 西道隆臣, 岩田修永: モデルマウスを用いたアルツハイマー病病態修飾因子のプロテオミクス解析. 第 87 回日本生化学会大会 要旨集 p. 165, 2014
- ⑪ 浅井将, 能登雄太, 久松 翼, 森田知樹, 城谷圭朗, 丸山敬, 大河内正康, 武田雅俊, 岩田修永: γ セクレターゼ阻害剤セマゲスタットの $A\beta$ 産生に及ぼす影響. 第 87 回日本生化学会大会 要旨集 p. 164, 2014
- ⑫ 浅井将, 能登雄太, 久松翼, 森田知樹, 城谷圭朗, 丸山敬, 大河内正康, 武田雅俊, 岩田修永: 第 III 相臨床試験薬 SEmAGACEstAt (LY450139) による認知機能悪化の原因解析. 第 33 回日本認知症学会学術集会 要旨集 p. 102, 2014
- ⑬ 岩田修永: アルツハイマー病の病態メカニズムと新たな治療の試み. 沖縄認知症ネットワーク研究会第24回学術集会, 2014
- ⑭ 高橋茜, 本多美佳子, 服部芳野, 川久保昂, 浅井将, 城谷圭朗, 樋口真人, 西道隆臣, 岩田修永: $A\beta$ ピログル化酵素グルタミルシクラーゼの酵素学的特性についての検討. 第 33 回日本認知症学会学術集会 要旨集 p. 106, 2014
- ⑮ 能登雄太, 吉崎涼平, 門富竜之介, 森田知樹, 浅井 将, 城谷圭朗, 武田晃, 山本一夫, 西道隆臣, 岩田修永: モデルマウスを用いたアルツハイマー病病態修飾因子のプロテオミクス解析. 第 33 回日本認知症学会学術集会 要旨集 p. 117, 2014
- ⑯ Nilsson P, Hul K, 津吹 聡, 赤木 巧, 和泉伸一, 小守壽文, 田中元雅, 齋藤貴志, 岩田修永, 西道隆臣. AlzHEImEr's DIseAsE $A\beta$ sECrEtion AnD plAquE FormAtion DEpEnD on AutopHAGy. 第 33 回日本認知症学会学術集会 要旨集 p. 60, 2014
- ⑰ 城谷圭朗, 能登雄太, 高橋 茜, 森田知樹, 小出恵理子, 浅井将, 近藤孝之, 井上治久, 岩田修永: アルツハイマー病 IPS 細胞由来神経細胞のオートファジー関連分子の解析. 第 33 回日本認知症学会学術集会 要旨集 p. 60, 2014
- ⑱ 岩田修永, 高橋 茜, 川久保 昂, 斉藤貴志, 樋口真人, 柴田宏昭, 村松慎一, 西道隆臣. AAV ベクターを用いたアルツハイマー病防御遺伝子補充療法. 第 33 回日本認知症学会学術集会 要旨集 p. 72, 2014
- ⑲ 浅井将, 能登雄太, 久松翼, 森田知樹, 城谷圭朗, 丸山敬, 大河内正康, 武田雅俊, 岩田修永. 第 III 相臨床試験薬 SEmAGACEstAt (LY450139) による認知機能悪化の原因解析. 第 33 回日本認知症学会学術集会 要旨集 p. 102, 2014
- ⑳ 森田知樹, 小出恵理子, 渡辺かおり, 近

- 藤孝之, 浅井将, 城谷圭朗, 井上治久, 岩田修永: アルツハイマー病患者のIPS細胞由来神経細胞におけるオートファジーの機能破綻. 第31回日本薬学会九州支部大会 要旨集 p. 45, 2014
- ⑳ 池原健太, 樋口恵理, 平山未央, 大槻純男, 浅井将, 城谷圭朗, 岩田修永: 新規アルツハイマー病リスク因子による発症メカニズムの解析. 第31回日本薬学会九州支部大会 要旨集 p. 48, 2014
- ㉑ 能登雄太, 吉崎涼平, 門富竜之介, 森田知樹, 浅井将, 城谷圭朗, 平山未央, 大槻純男, 武田 晃, 阿保博仁, 山本一夫, 関口みさき, 西道隆臣, 岩田修永: モデルマウスを用いたアルツハイマー病病態修飾因子のプロテオミクス解析. 第31回日本薬学会九州支部大会 要旨集 p. 47, 2014
- ㉒ 高橋茜, 本多美佳子, 服部芳野, 浅井将, 城谷圭朗, 樋口真人, 西道隆臣, 岩田修永: グルタミンシルクラーゼの酵素的特性がアミロイド病理に与える影響. 第31回日本薬学会九州支部大会 要旨集 p. 46, 2014
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
1. 特許取得
特願 2014-22623、アルツハイマー病治療薬、岩田修永、城谷圭朗、浅井将、田中隆、2014年11月6日出願。
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

様式第19

学会等発表実績

委託業務題目「発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼ（PKD）の発症メカニズムの解明及び新規治療薬の開発」

機関名 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科精神神経科学

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
有床総合病院精神科における身体合併症医療・精神科リエゾンチーム加算算定病院の立場から	黒滝直弘 (シンポジスト)	第110回日本精神神経学会学術総会	2014	国内
015-2. マウスにおける低濃度リチウム長期投与による衝動性の変化の検討	山口尚宏, 森本芳郎, 小野慎治, 松本一隆, 松本俊二, 中根秀之, 今村明, 黒滝直弘, 吉本静志, 中根允文, 岡崎祐士, 小澤寛樹	第36回日本生物学的精神医学会	2014	国内
長崎大学病院精神神経科におけるラモトリギンの使用状況～抗うつ薬の減量効果をふまえて～	吉田真太郎, 山口尚宏, 橋口知喜, 楠本優子, 岩倉由佳, 黒滝直弘, 小澤寛樹	第24回日本臨床精神神経薬理学会・第44回日本神経精神薬理学会合同年会	2014	国内
留学生のメンタルヘルスにおける問題点～双極性感情障害を発症し入院に至った一例から～	小林典子, 田山達之, 鬼塚芙美, 久保達哉, 黒滝直弘, 小澤寛樹	第67回九州精神神経学会, 第60回九州精神医療学会	2014	国内
Gender Identity Disorder (GID) in Asia	Toshikazu SAITO, Hai-Gwo HWU, Kazuyoshi YAMAMOTO, Yosuke MATSUMOTO, Cheng LEE, Naohiro KURITAKI	第5回アジア精神医学会	2015	国内
性差構築からみる同一障害の治療戦略 Strategies of GID Medicine Based on Sex Differences	山本和儀, 黒滝直弘, 尾形勉, 宮島英一	GID学会第17回研究大会	2015	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所 (学会誌・雑誌等名)	発表した時期	国内・外の別
ベンゾジアゼピン系薬および mECTでの治療にて改善した緊 張病（カタトニア）症候群の2 症例	久保達哉, 森本芳郎, 田中大三, 大橋愛子, 杉本流, 黒滝直弘, 小澤寛樹	精神科	2014	国内
ソトス症候群	黒滝直弘	日本臨床（0047-1852）別 冊神経症候群IV	2014	国内
Recent global movement on mental health	Shunsuke Nonaka, Naohiro Kurotaki, Yuko Kusumoto, Hirohisa Kinoshita, Tadashi Takashima, Hiroki Ozawa	Acta Nagasaki	in press	国内

（注1）発表者氏名は、連名による発表の場合には、筆頭者を先頭にして全員を記載すること。

（注2）本様式はexcel形式にて作成し、甲が求める場合は別途電子データを納入すること。

様式第19

学会等発表実績

委託業務題目「発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼ（PKD）の発症メカニズムの解明及び新規治療薬の開発」

機関名 名古屋市立大学大学院医学研究科小児神経学

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所（学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
TrInuCIeotIDE InsErtIon In tHE SMN2 promotEr mAy not BE rElAtED to tHE ClInICAl pHEnotypE oF SMA	HArAHAp NI, TAKEuCHI A, YusoFF S, TomInAGa K, OKInAGa T, KItAI Y, TAKArADA T, KuBo Y, SAItO K, SA'ADAH N, NurputrA DK, NIsHImurA N, SAItO T, NIsHIo H	BrAIn DEv	2014	国外
SMA SCrEEInG SystEm UsInG DrIED BlooD Spots on FilTEr PApEr : ApplICAtIon oF COP-PCR to tHE SMN1 DEIEtIon TEst	KAtO N, SA'ADAH N, RoCHmAH MA, HArAHAp NI, NurputrA DK, SAto H, NIsHImurA N	KoBE J.MED.SCI	In Press	国内
A stuDY oF vAlproIC ACID For pAtIEnts wItH spInAl musCulAr AtropHy. NEuroloGy AnD ClInICAl NEuroSCIEnCE	SAItO T, NurputrA DK, HArAHAp NI, InDrA S.K.HArAHAp, YAmAmoto H, MunEsHIGE E, NIsHIzono H, MATsumurA T, FuJImurA H, SAKoDA S, SAItO K, NIsHIo H	NEuroloGy AnD ClInICAl NEuroSCIEnCE	2014	国外

<p>A novEl EvAluAtIon mEtHoD oF survIvAl motor nEuron protEIn As A BlomArKer oF spInAl musCulAr AtropHy By ImAGInG Flow CytomEtry</p>	<p>ArAKAwA M, ArAKAwA R, TAtsumI S, AoKI R, SAItO K, Nomoto A</p>	<p>BloCHEm BloPHys REs Commun</p>	<p>2014</p>	<p>国外</p>
<p>MoleCulAr EpIDEmIoloGy AnD ClInICAl spECtrum oF HErEDItAry spAstIC pArAplEGIA In tHE JApAnEsE populAtIon BASed on ComprEHEnsIvE mutAtIonAl AnAlYsEs</p>	<p>IsHlurA H, TAKAHAsHI Y, HAYAsHI T, SAItO K, FuruyA H, WAtAnABE M, MurAtA M, SuzuKI M, SuGIurA A, SAwAI S, SHIBuyA K, UEDA N, ICHIKAwA Y, KAnAzAwA I, Goto J, TsuJI S</p>	<p>J Hum GENet</p>	<p>2014</p>	<p>国外</p>
<p>OvErAppInG mICroDElEtions InvolvInG 15q22.2 nArrow tHE CrItICAl rEGIon For IntEllectuAl DIsAbIllty to NARG2 AnD RORA.</p>	<p>YAmAmoto T, MEnCArEllI A, DI MArCo C, MuCCIolo M, VAsCotto M, BAIEstrI P, Gé rArD M, MATHEu- DrAmArD M, AnDrIEux J, BrEunInG M, HoFFEr MJV, RuIvEnKamp CAL, SHImADA S, SAnGu N, SHImoJImA K, UmEzu R, KAwAmE H, MAtsuo M, SAItO K. REnIEr AI, MArI F</p>	<p>Eur J MED GENet</p>	<p>2014</p>	<p>国外</p>

<p>BioCHEMICAL AND molecular Analysis of 13 Japanese patients with β- uridopropionase DEFICIENT Demonstrates HIGH prevalence of the C.977G > A (p.R326Q) mutation</p>	<p>NAKAJIMA Y, MEIJER J & DoBrItzsCH D, Ito T, MEInsmA R, ABEllnG NGGM, RoEloFsEn J, ZoEtEKouw L, WAtAnABE Y, TAsHIro K, LEE T, TAKESHIMA Y, MitsuBUCHI H, YonEyAmA A, OHtA K, Eto K, SAItO K, KuHArA T, vAn KullEnBurG ABP. ClInICAL</p>	<p>J InHERIt MEtAB DIs</p>	<p>2014</p>	<p>国外</p>
<p>THE SpECtrum of ZEB2 Mutations CAUsInG THE MowAt-Wilson SynDromE In JApAnEsE PopulAtions</p>	<p>YAmADA Y, NomurA N, YAmADA K, MAtsuo M, SuzuKI Y, SAmEsHImA K, KImurA R, YAmAmoto Y, FuKusHI D, FuKuHArA Y, IsHIHArA N, NIshI E, ImAtAKA G, SuzumurA H, HAmAno S-I, SHImIzu K, IwAKosHI M, OHAmA K, OHtA A, WAKAmoto H, KAJItA M, MIurA K, YoKoCHI K, KosAKI K, KuroDA T, KosAKI R, HIrAKI Y, SAItO K, MIzuno S, KurosAwA K, OKAmoto N, WAKAmatsu N</p>	<p>Am J MED GEnEt PArt A</p>	<p>2014</p>	<p>国外</p>

IntrAGEnIC mutAtIons In SMN1 mAy ContrIButE morE sIGnIFICAntly to ClInICAl sEvErItY tHAn SMN2 Copy numBErs In somE spInAl musCulAr AtropHy (SMA) pAtIEnts	YAmAmoto T, SAto H, LAI PS, NurputrA DK, HArAHAp NI, MorIKAwA S, NIsHImurA N, KurAsHIGE T, OHsHitA T, NAKAJImA H, YAmADA H, NIsHIDA Y, ToDA S, TAKAnAsHI J, TAKEuCHI A, ToHyAmA Y, KuBo Y, SAItO K, TAKEsHImA Y, MAtsuo M, NIsHIo H		2014	国外
sIBlInG CAse oF WolFrAm synDromE wItH A novEl mutAtIon Y652X In WFS1	IwAsAKI N, FuKAwA K, MAtsuo M, UrAno M, WAtAnABE M, Ono Y, TAnABE K, TAnIzAwA Y, OGAtA M, IDE R, TAKIzAwA M, NAGAtA S, OsAwA M, UCHIGAtA Y, SAItO K. A	DIABEtol Int	2014	国外
CortiCostEroID tHErApy For DuCHEnnE musCulAr DystropHy: ImprovEmEnt oF psyCHomotor FunCtIon	SAto Y, YAmAuCHI A, UrAno M, KonDo E, SAItO K	PEDIAtr NEurol	2014	国外

(注1) 発表者氏名は、連名による発表の場合には、筆頭者を先頭にして全員を記載すること。

(注2) 本様式はexcel形式にて作成し、甲が求める場合は別途電子データを納入すること。