

平成 22 年 4 月 28 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790868

研究課題名 (和文) ナルコレプシー候補遺伝子によるオレキシン転写制御機構

研究課題名 (英文) Transcriptional regulation of orexin by candidate genes for narcolepsy

研究代表者

田中 進 (TANAKA SUSUMU)

財団法人東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所・研究員

研究者番号：30399472

研究成果の概要 (和文)：網羅的遺伝子発現解析により見出されたナルコレプシー候補遺伝子 IGFBP3 および NR6A1 に関しオレキシン (ORX) 機能への関与を検討した。IGFBP3 および NR6A1 の視床下部 ORX 神経細胞への共存が見られた。培養細胞を用いた検討により IGFBP3、NR6A1 とともに ORX 発現を変化させた。生体内においても IGFBP3 は ORX の発現を変化させたが、NR6A1 での検討は十分な個体数を得るには至っていない。

研究成果の概要 (英文)：In this study, I examined the activities of transcriptional modulations of two narcolepsy candidate genes, IGFBP3 and NR6A1, against ORX transcription. (1) IGFBP3 and NR6A1 expression were found in hypothalamic ORX neurons by immunohistochemical studies. (2) By using reporter assay, IGFBP3 and NR6A1 modulated ORX promoter activity in several cell lines. (3) IGFBP3 overexpression mice showed the reduction of hypothalamic ORX expression and modulated sleep conditions. I also found NR6A1 overexpression modulated ORX expression, however the mice number examined have not reached statistically enough yet.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：ナルコレプシー、ORX、IGFBP3、NR6A1、転写制御

1. 研究開始当初の背景

過眠症の一つであるナルコレプシーは、視床下部での ORX 神経細胞の減少によって引き起こされることが示されており、視床下部での ORX 神経細胞を含む睡眠覚醒中枢の機能障害が想定される。ヒト視床下部における健常群およびナルコレプシー群での網羅的遺伝子発現解析を行い、発現差異の見られる 9 候補遺伝子を同定した。その内、IGFBP3 が視床下部において ORX 神経細胞との共局在を示すことを見出した。しかしながら、視床下部における IGFBP3 の ORX への機能的関与は未同定である。

同様に後天的に ORX 神経細胞が欠損するマウスにおいても網羅的遺伝子発現解析を行い NR6A1 を同定した。また、ORX のプロモーター領域においてこの転写因子が結合する可能性のある NurRE 配列を見出した。

2. 研究の目的

本研究はナルコレプシーの候補遺伝子として同定された IGFBP3 および NR6A1 のオレキシン発現制御機構への関与を示すことにより、ナルコレプシーにおける ORX 神経細胞の減少原因の 1 つを証明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 組織学的検討：C57BL/6J マウスより視床下部切片を作成し、In situ hybridization および免疫組織化学的検討をおこなった。IGFBP3 プロブまたは抗 NR6A1 抗体による染色後、抗 ORX 血清にて 2 重染色をおこない、視床下部 ORX 神経細胞との共存を検討した。

(2) ORX 定量：Zeitgeber time 2 から 3 の間に正常マウス、IGFBP3 過剰発現マウス、および IGFBP3 変異マウスより脳組織取り出し、凍結後遠心し、上清をサンプルとした。ORX ラジオイムノアッセイは Phoenix Pharmaceuticals より ¹²⁵I RIA kit を購入しおこなった。同様に組織をと取り出した後 Total RNA を抽出し、逆転写後 ORX mRNA の定量をおこなった。

(3) マウスの睡眠記録と解析：麻酔下にて正常マウスおよび IGFBP3 過剰発現マウスに telemetry transmitters を装着し、EEG、体温、および行動データを記録した。装着後、完全回復（最低 2 週間）が確認されてから 48 時間の睡眠記録をおこなった。SleepSign ソフトウェアにて 10 秒単位で覚醒、non-REM 睡眠、または REM 睡眠の判定をおこなった。

(4) レポーターアッセイ：IGFBP3 および NR6A1 を発現プラスミドに組み込んだ。同様にヒトゲノムより ORX 遺伝子上流 3.2kb 配列 (-3278/+87) をレポータープラスミドである pGL3-basic に組み込み 3.2kb-basic とした。欠損変異体としてオレキシン上流-2023/+87 および-634/+87 を組み込んだものを作成し、2.0kb-basic および 0.7kb-basic とした。内部を欠損させた ΔAlu4/3.2kb-basic (3.2kb-basic より -2186/-634 の位置にある 4 つの Alu 配列を欠損させたもの) および ΔNurRE/0.7kb-basic (0.7kb-basic より NurRE 配列を欠損させたもの) を作成した。1 コピーまたは 3 コピーの NurRE を pTAL-luc レポータープラスミドに組み込み NurREx1-pTAL、および NurREx3-pTAL とした。24 ウェルプレートに各細胞を播種後、ホタルルシフェラーゼ発現プラスミド (pGL3 系または pTAL 系)、タンパク発現プラスミド (pCMVTag3、IGFBP3/Tag3、pCMVTNT、Nur77/TNT、または NR6A1/TNT)、およびトランスフェクション効率を確認するための内部標準として pGL4.74-TK (シーパンジールシフェラーゼ発現プラスミド) を一過性に発現させ、次の日にアッセイをおこなった。細胞を PBS にて洗浄、細胞を溶解、ホタルルシフェラーゼ測定、最後にシーパンジールシフェラーゼを測定した。各ウェルのホタルルシフェラーゼ測定値はシーパンジールシフェラーゼ測定値により補正後、pGL3-basic に pCMVTNT (Mock) を加えた条件を 1.0 として標準化した。ひとつの条件につき最低 8 ウェルからのデータとなっている。

(5) クロマチン免疫沈降：培養中の SY5Y 細胞にホルムアルデヒドを加え内因性の NR6A1 とゲノム DNA とをクロスリンクさせる。粗核分画を抽出後、超音波処理及び Micrococcal Nuclease にてゲノムを断片化する。そこに抗 NR6A1 抗体を加え、一晚 4°C にて反応後、ProteinG にて抗 NR6A1 抗体を結合させ抗体がとらえた NR6A1 に結合している DNA ごと免疫沈降させる。タンパク除去後、精製した DNA を鋳型として NurRE 近傍の Primer にて PCR をおこない、NR6A1 の NurRE への結合を確認する。

(6) 子宮内電気穿孔法：mNr6a1 を pcaDNA3 の CAG プロモーター下流に導入する。子宮内電気穿孔法により胎児期 12 日目の左半球の側

脳室へ発現プラスミドを導入し、右半球の視床下部での ORX 発現と比較する。対照として GFP-CAG プラスミドを導入する。

(7)日内変動：12 時間明期、12 時間暗期にて飼育した 4 週齢の雄ラットより 2 時間おきに視床下部を取り出し Total RNA を抽出した。逆転写後、視床下部での Nr6a1 の発現変化を検討した。

4. 研究成果

(1) C57BL/6J マウス視床下部 Orx 神経細胞での Igfbp3 の共存を確認した。また、Nr6a1 の共存が確認できたとともに核内に存在することを見出した<図 1 青:DAPI(核染色)、緑:Orx、赤:Nr6a1>。しかしながら、Igfbp3、Nr6a1 ともに Orx 細胞以外でのシグナルも観察された。

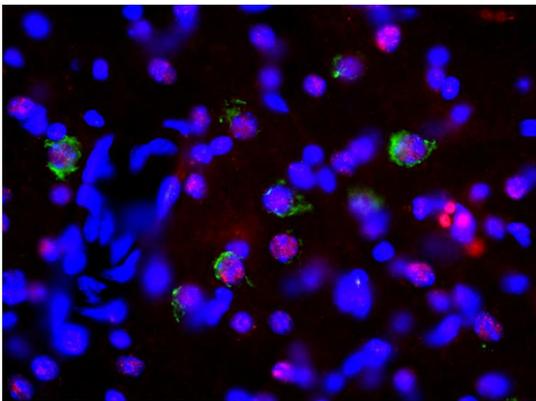


図1 マウス視床下部Orx神経細胞におけるNr6a1の共存

(2) Igfbp3 ノックアウトマウス、ヒト IGFBP3 過剰発現マウス、および Igfbp3 変異マウスを用いて Orx 発現への影響を検討し、視床下部での Orx mRNA 発現は Igfbp3 ノックアウトにおいて有意差には至らなかったものの上昇が観察され、IGFBP3 過剰発現マウスにおいては有意な減少が観察された (図 2) ($p < 0.05$)。しかし IGFBP3 変異マウスでは発現の変化は確認できなかった。コントロールとして視床下部 Orx 領域に発現している Mch 遺伝子の発現を検討したが、どのマウスにおいても発現変化は検出されていない。

さらにラジオイムノアッセイにより視床下部および脳幹の Orx 含有量を測定した結果、正常マウスに比べて IGFBP3 過剰発現マウスで視床下部と脳幹の両方で Orx 含有量の有意な減少が観察された (視床下部: $p < 0.01$ 、脳幹: $p < 0.005$)。

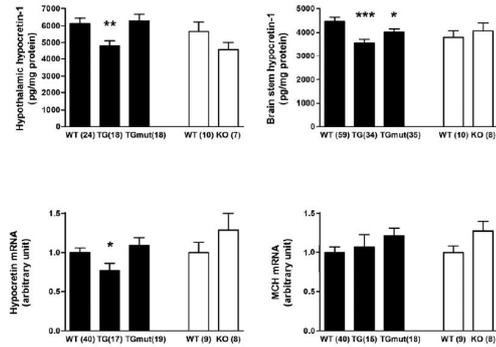


図2 Igfbp3過剰発現マウスおよび変異マウスにおける視床下部Orx発現量

(3) そこでこの変化が実際の睡眠制御にどのような影響を及ぼすかを検討するため正常マウスおよび IGFBP3 過剰発現マウスを用いて睡眠記録をおこなった。その結果、IGFBP3 過剰発現マウスでは覚醒期の終わりに睡眠時間が増えることが示され、睡眠の質としては NREM 睡眠が増えていた (図 3)。

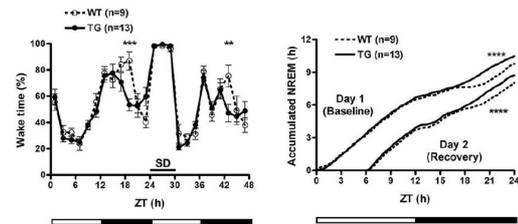


図3 ヒトIGFBP3過剰発現マウスにおける覚醒度の減少

(4) レポーターアッセイ: Orx プロモーター領域 3.2kb 配列のプロモーター活性および IGFBP3 への反応性を検討した。導入した Orx 上流 3.2kb プロモーター領域は HeLa 細胞、SH-SY5Y 細胞、および COS7 細胞内で下流ルシフェラーゼの活性を上昇させることが示された。SF126 細胞および Becker 細胞内ではこの上昇は確認できなかった。活性上昇の認められた 3 種の細胞内において IGFBP3 に対する反応性も観察されたが、SH-SY5Y 細胞内では他の細胞内での反応とは異なりそれは抑制効果であった。

Orx プロモーター領域内で IGFBP3 に反応する部位を同定するため、いくつかの欠損変異体を作成し HeLa 細胞にて検討をおこなった。上流 1.2kb (ひとつめの Alu リピートを含む) の欠損変異体 (2.0kb-basic)、内部 4 つの Alu リピート欠損変異体 (Δ Alu4/3.2kb-basic)、および Alu リピートより上流全ての欠損変異体 (0.7kb-basic) においてプロモーター活性は保持されたままであり、かつ IGFBP3 に対する反応性も保持されていた。

実際にはこの NurRE 配列はオレキシンのプロモーターとして知られている OE1 の近傍に

位置するため、OE1 の活性を制御（エンハンサー、サイレンサー、またはインシュレーター等）する役割もあると考えられた。そこで既知のプロモーターである SV40 プロモーターの上流に NurRE 配列を組み込み検討をおこなった。結果、HeLa 細胞において NurRE は下流のプロモーターに対してエンハンサーとして働き、IGFBP3 に反応してその活性をさらに上昇させることが示された。

同様に SH-SY5Y 細胞においても検討をおこなった。0.7kb-basic 欠損変異体において 3.2kb-basic と同様 IGFBP3 に対して負の反応性を示したが有意差には至っていない。また NurRE 欠損変異体 ΔNurRE/0.7kb-basic において HeLa 細胞での検討と同様にプロモーター活性の消失が確認され、NurRE のみを導入した NurREx3-basic でも活性上昇が確認できた。しかしながら IGFBP3 に対する負の反応性はこちらも有意差には至らなかった。また SH-SY5Y 細胞において NurRE は、IGFBP3 に反応して下流のプロモーターを負に制御する傾向が観察された。ただし、ばらつきが大きく有意差は得られなかった。

NR6A1 に関しても同様にレポーターアッセイにて検討をおこなった。Orx 上流 3.2kb 配列は SY5Y 細胞にて有意に NR6A1 に対する反応性を示した（図 4）。その反応性は NurRE 配列を欠損させることにより消失し、逆に活性を上昇させる方向に働くことが観察された。さらに NurRE 配列を TATA ボックスプロモーター上流に導入し検討を行った結果、NurRE 自体は下流のプロモーターを負に制御することが示唆されたが、リピートになることにより正の制御を持つことが観察された。しかしながら、リピートにより形成された実験的な構造である可能性も否定できないため注意が必要である。

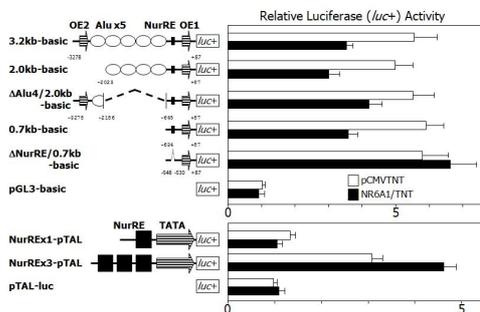


図4 Orx上流配列のNR6A1への反応性

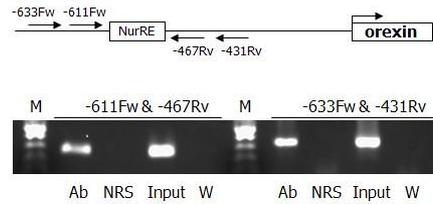


図5 クロマチン免疫沈降法によるNR6A1のNurRE配列への結合

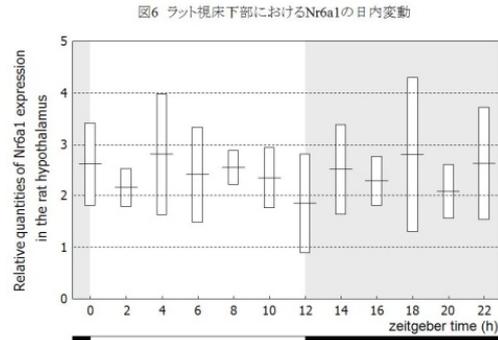


図6 ラット視床下部におけるNr6a1の日内変動

(5)クロマチン免疫沈降：抗 NR6A1 抗体により NR6A1 とともに免疫沈降された SY5Y 細胞由来のゲノム DNA を鋳型として Orx 遺伝子上流の NurRE 配列近傍を増幅するように Primer を設計し PCR をおこなった。NurRE 配列近傍の増幅が確認され別の Primer を用いた検討においても確認された。NR6A1 は NurRE に結合していることが強く示唆されたこととなる（図 5）。

(6)子宮内電気穿孔法：胎児期 12 日目のマウス左半球の側脳室へ mNr6a1 発現プラスミドを注入し電気穿孔法により神経細胞への遺伝子導入をおこなった。生後 1 日目に視床下部を取り出し、左半球およびインタクトの右半球から Total RNA を抽出、逆転写の後、視床下部での Orx 発現を比較した。mNR6A1 遺伝子の発現量依存的な Orx 発現量の変化が観察されているが、個体数が少ないため統計的な検討は出来ていない。

(7)日内変動：24 時間の視床下部での Nr6a1 の日内変動を検討したが、有意な変化は観察されていない（図 6）。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 8 件）

① Tanaka S, Honda M. (2010) IgG Abnormality in Narcolepsy and Idiopathic

- Hypersomnia. PLoS ONE 5(3): e9555. 査読有
- ② Miyagawa T, Honda M, Kawashima M, Shimada M, **Tanaka S**, Honda Y, Tokunaga K. (2010) Polymorphism located in *TCRA* locus confers susceptibility to essential hypersomnia with *HLA-DRB1*1501-DQB1*0602* haplotype. *J Hum Gent.* 55(1), 63-65. 査読有
- ③ **Tanaka S**, Kawashima M, Honda M. (2009) Absence of Anti-aquaporin-4 Antibody in Narcolepsy. *Sleep Biol Rhythms.* 7: 66-70. 査読有
- ④ Miyagawa T, Honda M, Kawashima M, Shimada M, **Tanaka S**, Honda Y, Tokunaga K. (2009) Polymorphism located between CPT1B and CHKB, and HLA-DRB1*1501-DQB1*0602 haplotype confer susceptibility to CNS hypersomnias (essential hypersomnia). *PLoS ONE.* 4(4):e5394. 査読有
- ⑤ **田中進**, 本多真, Mignot E (2009) 網羅的遺伝子解析により見いだされたナルコレプシー候補遺伝子の機能解析. 精神薬療研究年報第41集 97-108. 査読無
- ⑥ Honda M, Eriksson KS, Zhang S, **Tanaka S**, Lin L, Salehi A, Hesla PE, Maehlen J, Gaus SE, Yanagisawa M, Sakurai T, Taheri S, Tsuchiya K, Honda Y, Mignot E. (2009) IGFBP3 colocalizes with and regulates hypocretin (orexin). *PLoS ONE.* 4(1):e4254. 査読有
- ⑦ Matsunaga H, **Tanaka S**, Fukumori A, Tomonaga K, Ikuta K, Amino N, Takeda M. (2008) Isotype analysis of human anti-Borna disease virus antibodies in Japanese psychiatric and general population. *J Clin Virol.* 43(3):317-22. 査読有
- ⑧ **Tanaka S**, Honda Y, Honda M. (2008) MX2 Gene Expression Tends to be Downregulated in Subjects with HLA-DQB1*0602. *Sleep.* 31(5): 749-751. 査読有
- ③ **田中進**, 川嶋実苗, 本多真. (2009) ナルコレプシーにおける抗アクアポリン 4 抗体のスクリーニング 日本睡眠学会第 34 回定期学術集会, 大阪 [2009/10/25]
- ④ **田中進**, 児玉亨, 本多芳子, 臼井節夫, 本多真. (2009) ラット視床下部におけるオレキシン mRNA の日内変動パターン 日本睡眠学会第 34 回定期学術集会, 大阪 [2009/10/25]
- ⑤ **田中進**, 児玉亨, 本多芳子, 臼井節夫, 本多真. (2009) ラット視床下部におけるオレキシン mRNA の日内変動パターン 日本睡眠学会第 34 回定期学術集会, 大阪 [2009/10/25] oral selection
- ⑥ Honda M, **Tanaka S**, Honda Y. (2009) HLA gene expression in white blood cells of narcolepsy. 23rd annual meeting of the Associated Professional Sleep Societies, Seattle [2009/06/09]
- ⑦ **田中進**, 本多真, Emmanuel Mignot. (2008) 網羅的遺伝子発現解析により見いだしたナルコレプシー候補遺伝子の機能解析. 第 41 回 精神神経系薬物治療研究報告会, 大阪 [2008/12/05]
- ⑧ **田中進**, 本多真, 川嶋実苗, 新井誠, 野中隆, 深澤みゆき, Eriksson KS, Lin L, 本多裕, Mignot E. (2008) 視床下部オレキシン発現制御における Nur77/NR4A1 の関与. 日本睡眠学会第 33 回定期学術集会, 郡山 [2008/06/25]
- ⑨ Zhang S, Lin L, Zhang J, **Tanaka S**, Honda M, Mignot E. (2008) Insulin-like growth factor binding protein-3 reduces hypocretin/orexin transmission. 22nd annual meeting of the Associated Professional Sleep Societies, Baltimore [2008/06/07]

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 進 (TANAKA SUSUMU)

財団法人東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所・研究員

研究者番号：30399472

[学会発表] (計 9 件)

- ① **Tanaka S**. (2009) NR6A1 regulates hypocretin/orexin transcription in vitro. The 3rd Asian Narcolepsy Forum, Osaka [2009/10/27]
- ② **Tanaka S**. (2009) IgG abnormality in narcolepsy and idiopathic hypersomnia. The 3rd Asian Narcolepsy Forum, Osaka [2009/10/27]