

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591528

研究課題名(和文) 小児急性脳症において新規に発見したバイオマーカーの機能・神経病理学的探索

研究課題名(英文) Characterization of peptide fragment of neurosecretory protein VGF precursor (373-417) in the mouse brain

研究代表者

浅野 健 (Takeshi, Asano)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70277490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではneurosecretory protein VGF precursorのペプチド断片(373-417残基目)：VGFペプチド373の脳・神経細胞などに与える影響に関して基礎的な探索することを目的とし、VGF373に対する特異的抗体を作成した。その反応に対して脳組織蛋白のwestern blot法によるvalidationを行った。作成した抗体によりラット、マウスの大脳皮質、黒質、海馬の神経細胞の核が染色され、核内蛋白のwestern blotでも確認されたことよりVGF373は主に神経細胞の核内に存在していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The aim of the investigation was to explore the characterization of peptide fragment of neurosecretory protein VGF precursor (373-417) in the brain. We made the antibodies against the peptide and stained the mouse and rat brain tissue. We found the antibodies recognized nuclear protein in the neural cells in cerebral cortex, alveus hippocamp, nigra by immunohistochemistry and western blot. These results suggested the VGF peptide might act as nuclear protein.

研究分野：小児科学

キーワード：急性脳症 髄液 ペプチド 核内蛋白 VGF

1. 研究開始当初の背景

脳症患児の髄液では neurosecretory protein VGF precursor の断片ペプチドが低下する。我々は脳症と熱性痙攣児(単純型、複雑型)の脳脊髄液のプロテオミクス解析から neurosecretory protein VGF precursor の断片(373-417 残基目;以下 VGF ペプチド 373)が脳症例で低下していることを発見した(BMC Neurology (2011).11.101、特許審査請求中)。この VGF ペプチド 373 はアルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、frontotemporal dementia (Proteomics (2003) 3, 1486-1494, Neurology (2006) 66, 1218-1222、Journal of Neurochemistry (2005) 95,1461 - 1471, Experimental Neurology (2005) 196,273-281) においても患者脳脊髄液で正常対照に比べて有意に低下していることが報告されている。しかしいずれの報告でもこの VGF ペプチド 373 の生理学的、病態学的な検討は全くなされていなかった。

別の VGF nerve growth factor の断片(556-616 残基目)を肥満誘導マウスの脳室内に投与した実験ではマウスの活動性があり、体重の減少を認めたという報告(Proc Nat Acad Sci (2006)103:14584-14589)や、統合失調症においては脳脊髄液内 VGF nerve growth factor の断片(23-62 残基目)の濃度が上昇する報告 (PLoS Medicine (2006)3:e428、Nature Medicine(2007)13:3)があり、脳内の生理活性ペプチドとしての可能性があり、本ペプチドの研究を開始する重要性は増していると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は neurosecretory protein VGF precursor のペプチド断片(373-417 残基目); VGF ペプチド 373 が脳内の生理活性ペプチドとして脳・神経細胞などに与える影響に関して基礎的な探索することを目的としている。そのため、VGF ペプチド 373 の正常マウス脳内での遺伝子発現、発現局在、蛋白発現変動を基礎的な検索をすることを目的とした。具体的には

- 1) VGF ペプチド 373 の神経細胞での遺伝子・蛋白発現を検討する。
 - 2) VGF ペプチド 373 の神経細胞への遺伝子・蛋白発現を検討する
 - 3) VGF ペプチド 373 の脳内受容体を同定する。
 - 4) VGF ペプチド 373 の脳内、体内の遺伝子・蛋白の発現局在を検討する。
 - 5) VGF ペプチド 373 の生理活性をマウスモデルで検討する。
- の5つである。

3. 研究の方法

①VGF373 の抗体、RNA プローブの作成
VGF373 に対する特異的抗体を作成する。同様に非アイソトープ性の in situ

hybridization system を確立し、脳内分布について検索する。

②in vitro の培養細胞での解析

In vitro の神経細胞培養系における VGF の発現、および VGF373 添加による遺伝子発現の網羅的变化、蛋白発現の網羅的变化、細胞の phenotype の変化をマイクロアレイ、プロテインチップなどを用いて検討する。

③VGF373 の脳内における発現と分布様式についての画像解析

VGF373 の脳内における分布について、抗体、in situ hybridization 法などを用いて詳細を検索する。

④VGF373 発現細胞と神経機能の解析

脳の神経細胞で発現する神経伝達物質やグリア細胞のマーカーを用いて、VGF373 の発現の状態について二重標識、三重標識などの多重標識蛍光免疫染色を行い解析する。

⑤in vivo の系での生理活性作用は正常または疾患マウスへの直接投与などで検討する

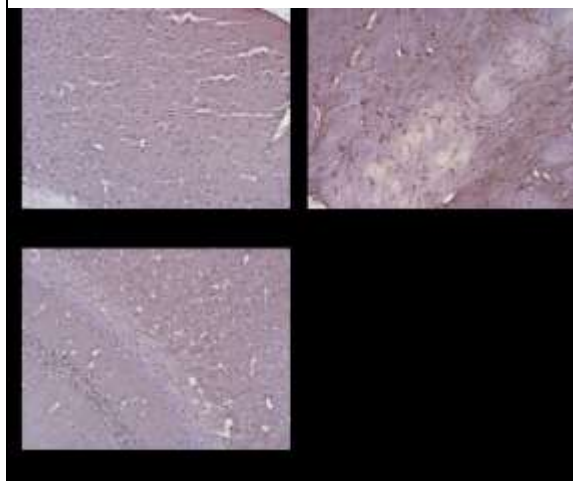
4. 研究成果

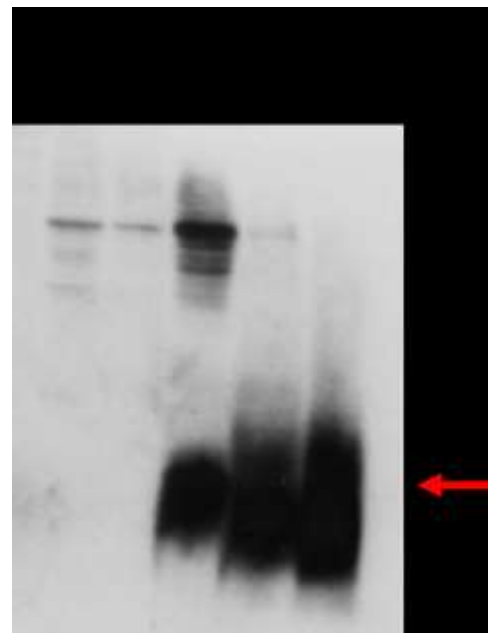
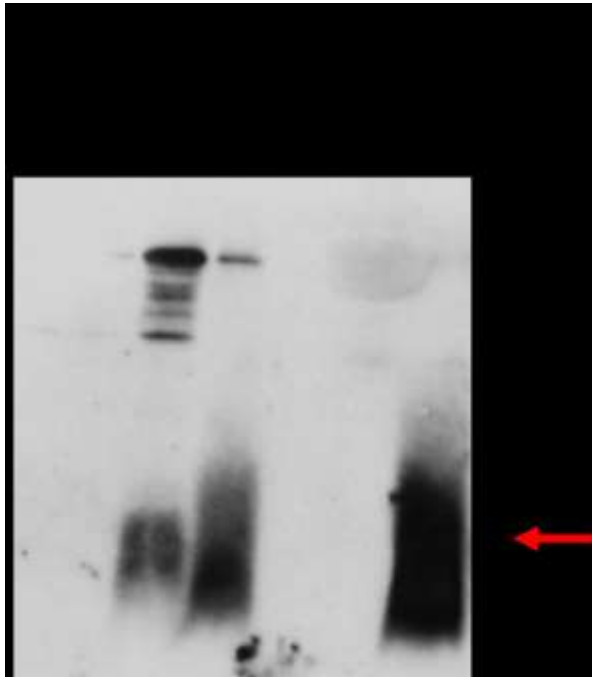
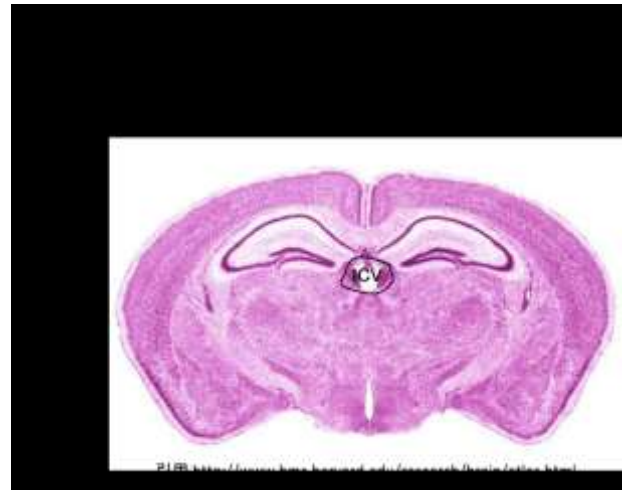
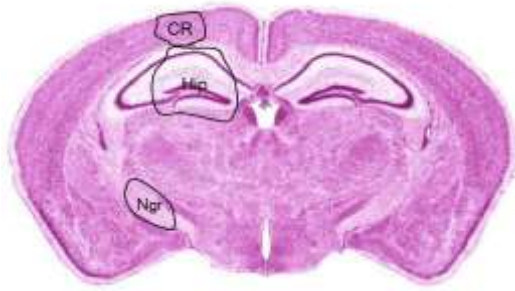
1) VGF ペプチド 373 の神経細胞での遺伝子・蛋白発現を検討する。

VGF ペプチド 373 に対するポリクロナール抗体を4種類作成した。この抗体を用いてその脳内での発現を免疫組織化学法と脳組織の western blot 法によりまず、検証した。

抗体作成のためのペプチドは SAJ500542、SAJ500543 は QNALLFAEEEDGEAGAED、SQ2682R、SQ2682B は AEAEAEAEERARQ の配列を用いた。

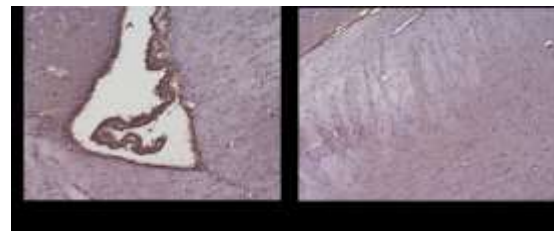
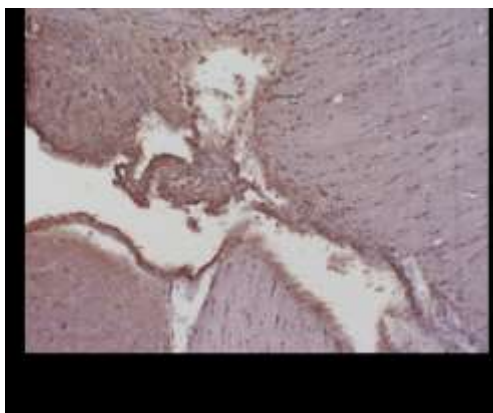
SAJ500542 : マウスの大脳皮質、黒質、海馬、の神経細胞の核が染色された。この結果をもとにマウスの大脳皮質、海馬の細胞の核を分離し、その核内蛋白を抽出、ウエスタンブロットを行ったところ、陽性コントロールの VGF ペプチドと同じ分子量に大脳皮質、海馬からの核抽出蛋白が反応を示した。

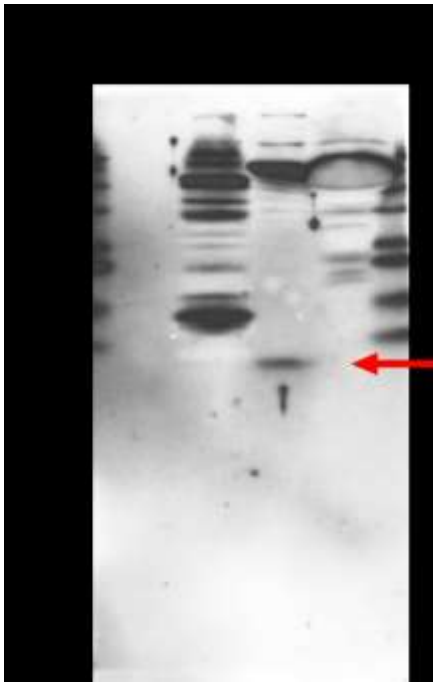
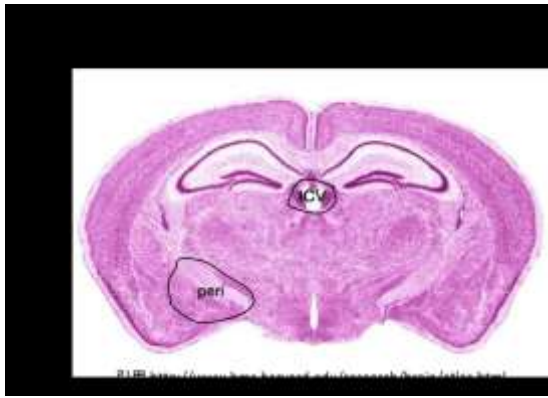




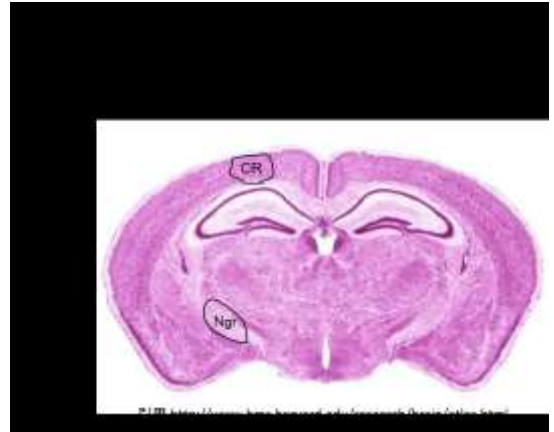
SAJ500543 : ラットの脳では脳室周囲の神経細胞の核が SAJ500542 と同様に免疫染色された。ウエスタンブロットにおいても脳神経細胞の核成分に抗体の反応を認めた。

SQ2682R : マウスの脳では脳室周囲の神経細胞の細胞質が染色された。また赤血球も染色された。マウスの組織から抽出した蛋白によるウエスタンブロットではマウス血清でのみ反応が認められ、マウスの海馬、ヒトの血清では反応しなかった。





SQ2682B はマウスの脳の大脳皮質、黒質の神経細胞に染色を認めた。



現在これらの抗体の validation を行っている。

遺伝子発現：

In situ hybridization 用のプローブの設計を試みたが、ペプチドが低分子過ぎて作成できなかった。

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 1 件)

名称：脳症由来痙攣と発熱由来熱性痙攣の鑑別方法

発明者：浅野 健

権利者：学校法人日本医科大学

出願年月日：平成 20 年 4 月 23 日

取得年月日：平成 26 年 2 月 28 日

国内外の別：国内

公開番号：特開 2009-264846

公開日：平成 21 年 11 月 12 日

特許番号：特許第 5483141 号

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者 浅野 健 (ASANO Takeshi)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70277490

(2) 研究分担者 小澤一史 (OZAWA Hitoshi)

日本医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：60169290