

令和元年5月31日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08533

研究課題名(和文)新規オレキシン転写制御因子の機能解析とナルコレプシーへの関与

研究課題名(英文) Analysis of novel transcription factors for hypocretin and involvement of narcolepsy

研究代表者

田中 進 (TANAKA, Susumu)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30399472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：オレキシンは様々な生理活性を有する。我々の以前の研究にて転写因子PLAGL1のオレキシンニューロンでの発現が示唆された。本研究では、PLAGL1のオレキシン転写制御への関与を検討した。大部分のオレキシンニューロンにて核内のPLAGL1を確認した。断眠によりオレキシンニューロン核内でのPLAGL1の偏在を見出した。ChIP-PCRによりPLAGL1がマウス視床下部オレキシン遺伝子上流制御領域に結合することが明らかとなった。さらに、胎児の視床下部へのPLAGL1強制発現は視床下部オレキシン転写を促進した。これらの結果はPLAGL1がオレキシン転写を調節している可能性があることを示唆していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により見いだされたオレキシン転写制御因子を用いることにより、ある程度オレキシンニューロンへの分化が決定した幹細胞のオレキシン発現を安定させられると考えられる。それはナルコレプシーの根本治療へとつながっていく。さらにオレキシンニューロン数を安定させることにより、ナルコレプシー患者血清ならびに脳脊髄液中に存在すると考えられているオレキシンニューロン脱落因子の探索を可能とし、ひいてはナルコレプシーの病態解明につながっていく。

研究成果の概要(英文)：The hypocretin/orexin neuropeptide coordinates the regulation of various physiological processes. Our previous study suggested that PLAGL1 is coexpressed in hypocretin neurons and regulates hypocretin transcription. The present study examined whether canonical prepro-hypocretin transcription is functionally modulated by PLAGL1.

The majority of hypocretin neurons were positive for PLAGL1 in the nucleus. Notably, PLAGL1 in hypocretin neurons was altered in response to several conditions affecting hypocretin function. An uneven localization of PLAGL1 was detected following sleep deprivation. ChIP-PCR revealed that endogenous PLAGL1 may bind to a putative PLAGL1 binding site in the proximal region of the hypocretin gene, in the murine hypothalamus. In addition, electroporation of the PLAGL1 expression vector into the fetal hypothalamus promoted hypothalamic hypocretin transcription. These results suggested that PLAGL1 may regulate hypothalamic hypocretin transcription.

研究分野：睡眠科学

キーワード：オレキシン 睡眠 覚醒 PLAGL1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経ペプチドであるオレキシンは視床下部外側野に局限発現し、多彩な生理活性(情動、エネルギー恒常性、摂食行動の制御、報酬行動、睡眠/覚醒維持および制御等)を有する [de Lecea & Sutcliffe. FEBS J. 2005, Sakurai et al. Nature rev Neurosci. 2007].

先行研究におけるオレキシン遺伝子座上流発現制御領域の解析により、ヒトとマウスにて保存されている orexin regulatory element (ORE 配列、57bp)が見いだされた。この ORE 配列がオレキシンの視床下部外側野での特異的な発現のために必要であることが報告された [Moriguchi et al. JBC. 2002]。さらに、この ORE 配列中の各 15bp 前後の配列 (ORE-1、-2、ならびに-4)の欠損変異体において視床下部内でのオレキシン発現部位が変化することが示されている。我々は RT-PCR・in situ hybridization を用いた解析において、胎生 10 日目マウス視床下部外側野内脳弓近傍でのオレキシンの発現開始を確認した [Tanaka et al. BBRC. 2010, Tanaka. Vitam & Horm. 2012]。オレキシン発現開始時期よりも前に ORE 制御因子が胎児視床下部にて発現することが必要と考えられた。そこで我々は、酵母内在性因子による非特異的な結合を極限まで抑制できるよう新規に開発した酵母 One-hybrid システムを用いて、我々が作製した胎生 9~10 日のマウス視床下部 cDNA ライブラリーより ORE 制御因子の同定を試みた。その結果、新規の候補オレキシン転写因子として Pleiomorphic adenoma gene-like 1 (Plagl1) を得た。

2. 研究の目的

Plagl1 は腫瘍抑制因子の相同遺伝子である。一方、Plagl1 は一過性新生児糖尿病の責任遺伝子としても知られ、オレキシン代謝制御機構への Plagl1 の関与が示唆される。本研究において、オレキシン発現制御機構への Plagl1 の関与を検討していく。

3. 研究の方法

<動物>

♂C57 black/6J マウスを用いた。12 時間明期 12 時間暗期 (午前 8 時明期スタート、明期開始を ZT0 とする)にて飼育した。20 匹の 12 週齢マウス (28-30g) を ZT6、ZT18、または 6 時間断眠 (SD6h) 後に屠殺し、免疫組織化学に供した。断眠はケージのまま、シーソーシェーカー (shaking angle, 10°; Wave-SI; Taitec) に 6 時間置くことにより行った。9 匹のマウスに 1 日断食および 2 日断食を行い、断食後の ZT6 に屠殺し、免疫組織化学に供した。8 週齢のマウスに 4 週間高脂肪食 (HFD; D12451; Research Diets Inc.) を与えた後屠殺し、免疫組織化学および定量 PCR に供した。8 週齢時、通常食群と高脂肪食群の体重に差は無かった (28.3±1.4g vs. 26.2±3.8g at 8 weeks of age) が、12 週齢時点で有意な増加が見られた (28.0±2.4g vs. 35.3±2.1g at 12 weeks of age; P<0.01)。

<二重蛍光染色+RNAscope (in situ hybridization)>

PLAGL1 抗体 [ZAC1 antibody (C-7): sc-166944, Santa Cruz Biotechnology] の特異性を確認するため、二重蛍光染色に RNAscope を組み合わせた。4% PFA にて灌流固定後、スクロースに浸漬し、25- μ m の前額断切片を作成した。浮遊切片法にて 4 一晚、ウサギ抗オレキシン抗体 (1:5,000; Phoenix Pharmaceuticals) ならびにマウス抗 PLAGL1 抗体 [1:1,000; ZAC1 antibody (C-7)] と反応させた。次の日、ロバ Cy5-labeled anti-mouse immunoglobulin (Ig)G (1:500; cat. no. 715-175-150, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA) ならびにヤギ Alexa Fluor® 488-labeled anti-rabbit IgG (1:3,000; Molecular Probes) と 30 分反応させ、洗浄後 Superfrost Plus slides (Thermo Fisher Scientific, Inc.) に貼り付け乾燥させた。スライドを 60 °C でベーキングした後、RNAscope® 2.5 HD Reagent kit-RED (cat. no. 322350; Advanced Cell Diagnostics, Inc., Newark, CA, USA) ならびに Mm-Plagl1 プローブにて (cat. no. 462941; Advanced Cell Diagnostics, Inc.) 染色した。

<二重蛍光染色>

他の候補転写因子とオレキシンとの共発現を確認するため、二重蛍光染色を行った。抗体ならびに希釈倍率は以下である; 一次抗体: goat anti-PLAGL2 antibody (1:500; cat. no. sc-19907; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), goat anti-PLAG1 zinc finger antibody (1:500; cat. no. sc-20320; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), mouse anti-FEV antibody (1:500; cat. no. H00054738-A01; Abnova, Taipei, Taiwan), goat anti-PRRX1 antibody (1:500; cat. no. LS-B2380; LifeSpan BioSciences, Inc., Seattle, WA, USA) and sheep anti-VSX2 antibody (1:500; cat. no. PAB9843; Abnova) in PBST/5% BSA. 2 次抗体: goat, chicken or donkey Alexa Fluor® 594-labeled anti-mouse (cat. no. A11005), anti-goat (cat. no. A21468), or anti-sheep (cat. no. A11016) IgG, and goat (cat. no. A11008) or donkey (cat. no. R37118) Alexa Fluor® 488-labeled anti-rabbit IgG (1:3,000; Molecular Probes)。

<クロマチン免疫沈降>

12 週齢の c57Black / 6J マウスの脳を ZT6 に急速に取り出し、視床下部を脳スライサー (Zivic Instruments) を用いて視交叉から乳頭体 (プレグマから約 3.5 mm) までを切り出した。視床下部の背側上限は第 3 脳室の上限、横方向は扁桃核までを切り出した。切り出した視床下部をかみそりの刃で細かく刻み、1%ホルムアルデヒドで室温 10 分間架橋した。さらなる架橋を停止するために、終濃度 0.125M グリシンを添加した。組織を氷冷 PBS で 2 回洗浄し、粗核抽出物を調製した。150~900bp の範囲の消化ゲノム DNA を得るために、核抽出物をマイクロコッカスヌクレアーゼ (Cell Signaling Technology) と共に 37 °C で 20 分間インキュベートした。37 °C で 30 分間 RNase I で、65 °C 2 時間プロテイナーゼ K で処理した後、DNA 断片のサイズをゲル電気泳動によって確認した。溶解物を 4 °C で 43kHz で 3 回 (20 秒 / 超音波) 超音波処理し、遠心分離し、得られた上清に 1 μ g のマウス抗 ZAC1 抗体 (C-7) X (sc-166944X)、または 2 μ g の正常ウサギ IgG を添加し、ホイールローターで 4 一晚反応させた。次いで、試料をプロテイン G アガロースビーズと共に 4 °C で 2 時間インキュベートした。ビーズを低塩お

よび高塩緩衝液で洗浄し、DNA-タンパク質複合体からPCR用のDNA鋳型を得た。KOD plus DNAポリメラーゼ(TOYOBO)、プライマーおよびサーマルサイクラーを用いて、以下の設定でChip-PCRを行った:95 で5分間1サイクル後、94 30sec 変性 58 30sec アニリング 68 30sec 伸長(35サイクル)し、最終伸長反応を68 5分行った。

<ルシフェラーゼアッセイ>

NIH3T3細胞をDMEM10%FBS培地中で5%CO₂、37 にて培養する。細胞を96ウェルプレートに1x10⁴細胞/ウェルの密度で播種した。ルシフェラーゼプラスミドおよび発現ベクターをリポフェクタミン3000でトランスフェクションした。1ウェルあたり100ngのホタルルシフェラーゼレポータープラスミド(pGL3-basic, 3.2kb_basic, or 473bp-basic)、10ngのRenillaルシフェラーゼプラスミド(導入効率補正用、pGL4.74)、および100ngの発現ベクター(対照pCAGGS、またはpCAGGS-mPlagl1)を導入した。トランスフェクションの約48時間後に、Dual-Gloルシフェラーゼレポーターアッセイ試薬(Promega)およびEnSpireプレートリーダー(PerkinElmer)にてルシフェラーゼ活性を2回ずつ測定した。少なくとも8回の独立した実験の平均を代表値とした。トランスフェクション後、マウスPlagl1 mRNA発現を遺伝子特異的プライマーを用いたPCRにより確認した。

<マウス胎児ISH>

DIG標識cRNAプローブを用いたISHをマウス胎児凍結切片にて行った。E13、E14、およびE18における脳サンプルの固定、切片化し、E10~E12において、胚を4 で16時間、0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)中の4%PFAに浸し、その後20%スクロースに浸漬した。25 μ mの前額断切片を作成した。マウスPlagl1および陰性対照としてマウスPlagl2プローブをPCRにて作成した。脳切片を室温にて10分間の後固定を行い、0.1Mトリエタノールアミン(pH8.0)中0.5%無水酢酸で10分間アセチル化した。その後PBSで洗浄する。スライドを室温で2時間プレハイブリダイズ後、1 μ g/ml cRNAプローブを含むハイブリダイゼーション緩衝液(50%ホルムアミド、5 \times SSPE、1mg/ml酵母tRNA、0.2%ドデシル硫酸ナトリウム)を用いて60 で一晩ハイブリダイズさせた。翌日、スライドを2 \times SSC60 で1時間洗浄した。DIGプローブをアルカリホスファターゼにカップリングさせた抗ジゴキシゲニンFab(1:2,000)と反応させ、さらにNBT/BCIPを用いて検出した。Plagl1プローブを用いて得られたAlphosシグナルを、Olympus BX51顕微鏡にて画像を取り込んだ。

<子宮内電気穿孔法>

PLAGL1導入群は、約1 μ LのpCAGGS-mPlagl1およびpCAGGS-EGFP発現ベクター(2 μ g/ μ L)、対照群については約1 μ LのpCAGGSおよびpCAGGS-EGFP発現ベクター(2 μ g/ μ L)を0.05%のトリーサーFastGreenと混合した後、子宮壁を通してガラス毛细管ピペットでフリーハンドに各c57black/6Jマウス胚(E12)の第3脳室に注入した。電極(3mm丸型)を胚の頭近くの両側に配し、エレクトロポレーター-CUY21-EDITを用いてエレクトロポレーションを行った(4パルス;振幅39V;持続時間50msec;パルス間隔950msec)。結果、視床下部の片側に遺伝子が導入された。オレキシン発現の陰性対照マウスとして、側脳室から皮質へと同じベクターをエレクトロポレーションした。胚をE14、E15、E18または出生後(P0)に胚を灌流固定した。脳全体を摘出、後固定し、30 μ m前額断切片を作成した。オレキシンおよびPLAGL1の発現レベルはウサギ抗オレキシン抗体またはマウスZAC1抗体、およびヤギAlexa954標識抗ウサギまたは抗マウスIgGのいずれかを用いた免疫蛍光法によって検出した。得られたオレキシンおよびPLAGL1シグナルをOlympus BX51およびDP70にて可視化した。胚染色におけるバックグラウンドシグナルを減少させるために、マウスオンマウス免疫検出キット(Vector Laboratories)を製造元のプロトコルに従って使用した。

<定量的PCR>

Total RNAを対照動物(n=8、12週齢)、HFD摂取動物(n=8)、対照群のP0胚(n=4)、またはPLAGL1のP0胚(n=6)のそれぞれの視床下部からSepasol-RNA I Super Gを使用して単離した。cDNAは、PrimeScript RT with gDNA Eraser kit(Takara Bio)にて合成した。THUNDERBIRD qPCRミックス(Toyobo Life Science)、遺伝子特異的プライマー、Rotor-Gene Qシステム(Qiagen GmbH)を用いてqPCRにより各mRNAの発現レベルを決定した。視床下部における日内変動が最小のハウスキーピングHprt1遺伝子は、24時間にわたって4時間ごとに遺伝子発現をチェックすることによって以前の研究で同定された。このHprt1を内部対照として $2^{-\Delta\Delta Cq}$ 法を用いて、標的遺伝子発現の相対レベルを評価した。

4. 研究成果

<成体視床下部のオレキシンニューロンにおけるPLAGL1の局在>

Plagl1 mRNA発現は、視床下部外側野領域において明らかに検出され、これはAllen brain atlasにおいても同様に観察される。FEV、PRRX1、VSX2、PLAG1およびPLAGL2の視床下部外側野領域での発現は本研究で用いた抗体では検出されなかった。

PLAGL1抗体[ZAC1抗体(C-7)]の特異性を確認するために、ISHと組み合わせて二重免疫組織化学染色を行った。PLAGL1シグナルを有するニューロン(すなわち、抗PLAGL1抗体に対して免疫陽性のニューロン)は3つの異なる視床下部領域においてRNAscope_Plagl1シグナルと100%合致した。しかしながら、15%のRNAscope_Plagl1陽性ニューロンが抗PLAGL1抗体によって染色されたPLAGL1シグナルと合致しなかった。RNAscopeにおいて、視床下部切片をプロテイナーゼKにて処理しているため、PLAGL1タンパクが部分的に分解され、弱いまたは免疫陽性シグナルを生じない可能性がある。実際にオレキシンシグナルはプロテイナーゼK処理切片において、プロテイナーゼK未処理切片よりも弱かった。

PLAGL1はZT6の成体雄マウス視床下部外側野、背内側核および弓状核で観察された。背内側視

床下部の ZT6 および ZT18 と比較して、SD6h の視床下部外側野のオレキシンニューロンにおいて特異的かつ特徴的な PLAGL1 の核局在が検出された。DAPI 染色を行なうと ZT6 では核全体に広がる PLAGL1 染色像と DAPI の合致が得られるのに対し、SD6h では DAPI のヘテロクロマチン様構造と PLAGL1 との不一致が観察された。SD6h によりユークロマチン構造に PLAGL1 が局在し、オレキシンニューロンにおける転写に特異的に関連していることを示唆している。さらに、対照群 (ZT6) と比較して、ZT18 で PLAGL1 陽性オレキシンニューロンの数および頻度に有意な増加が見られた。

4 週間の HFD 摂取は視床下部オレキシンニューロンの数をわずかに増加させ、PLAGL1 陽性オレキシンニューロンの数と頻度の有意な増加をコントロールグループと比較して誘発した。さらに、2 日間の絶食は視床下部オレキシンニューロンの数に影響を及ぼし、対照群と比較して PLAGL1 陽性オレキシンニューロンの数と頻度の有意な増加を誘導した。対照群 (n=8) と比較して、HFD 群 (n=8) (平均±標準偏差、1.55±0.30; P<0.05) において Plag1 発現が有意に増加した (n=8) (1.22±0.15)。オレキシン (HFD 1.58±0.32 vs. 対照 1.44±0.31) および B2m (1.44±0.32 vs. 1.18±0.13) の発現に有意差はなかった。B2m を参照遺伝子として調べた。

< マウス視床下部におけるオレキシン上流配列への PLAGL1 結合 >

ヒトとマウスの間で高度に保存されており OE1 および OE2 を含む発現制御領域に関して、既知の PLAGL1 コンセンサス結合部位を検索した。最近新たに同定された PLAGL1 結合部位 (G₄N₂G₄) が見いだされ、マウスオレキシン遺伝子の上流領域において、転写開始部位から -496/-474 の位置に GGGGGTGGGGTAGGGGTTGGGG として存在していた。ヒト配列中の位置 -501/-492 には GGGGGAGGGG として存在する。そこで G₄N₂G₄ モチーフの周囲のマウスオレキシン上流領域に特異的なプライマーならびに陰性対照プライマーを用いて Chip-PCR を行った。抗 PLAGL1 抗体で免疫沈降させた精製 DNA にて G₄N₂G₄ モチーフ周辺のプライマーにて陽性バンドが得られた。陰性対照として使用した正常ウサギ IgG または水、または mHert_{-1617F} および mHert_{-1433R} プライマー対および mHert_{-1433R} プライマー対を用いた陰性対照実験では、増幅は検出されなかった。

< NIH3T3 細胞における PLAGL1 過剰発現はオレキシンプロモーター活性を抑制する >

pGAGGS (平均±標準偏差、0.444±0.090) または pGAGGS-mPlag1 (0.517±0.044) ベクターとの pGL3-basic プラスミドの同時トランスフェクションは、NIH3T3 細胞において同様のルシフェラーゼ発現を示し、これは pGL3-basic に内在性に PLAGL1 により調節されるエレメントが存在しないことを示す。3.2kb-basic ルシフェラーゼ活性は、pGL3-basic と比較して有意な増加を示した (1.205±0.161; P<0.001)。3.2kb-basic ルシフェラーゼ活性は pCAGGS-mPlag1 を同時に導入することにより、抑制された (0.521±0.135; P<0.05)。続いて、PLAGL1 結合部位の欠損変異体を作製した (473bp-basic)。この欠損変異体はルシフェラーゼ活性の有意な増加を有していた (0.637±0.198; P<0.05) が、pCAGGS-mPlag1 に対する反応性は有していなかった (0.644±0.183)。これらよりオレキシンプロモーター活性は PLAGL1 により制御されることが考えられるが、NIH3T3 細胞では PLAGL1 が抑制に働くと考えられた。

< 胎児 PLAGL1 発現 >

E10 で中脳、前脳および終脳小胞の脳室周囲領域でマウス Plag1 を検出した。Plag1 シグナルはその後 E11 ~ E13 の脳室周囲領域および視床下部溝で検出された。オレキシンと PLAGL1 の共発現シグナルは 2 重蛍光抗体法により E14 より検出された。E18 でその共発現シグナルは増加していた。Plag1 プローブでは視床下部外側野でのシグナルは検出されなかった。

< 子宮内電気穿孔法 >

視床下部オレキシン転写における PLAGL1 の生理学的関連性を確認するために、マウス視床下部における Plag1 過剰発現系を、子宮内電気穿孔法を用いて作成した。異所性発現の影響を確認するため、皮質への pCAGGS-EGFP ならびに pCAGGS-mPlag1 の電気穿孔を行い PLAGL1 および EGFP の共発現を確認した。しかし、オレキシン発現は観察されていない。また Mouse on Mouse Immunodetection キットを使用しても、いくつかのバックグラウンドシグナルが EGFP シグナルとオーバーラップしないことが観察された。これは、内因性の PLAGL1、または皮質中の血球および血管の存在と見なされた。第 3 脳室への電気穿孔では、ほとんどの EGFP 陽性細胞は第 3 脳室付近 (脳室下帯) でオレキシンを発現しなかったが、第 3 脳室付近から離れ脳実質に移動したいくつかの EGFP 陽性細胞はオレキシン陽性であった。pCAGGS-mPlag1 および pCAGGS-EGFP の子宮内での側脳室へのエレクトロポレーション後に皮質におけるオレキシン発現は検出されず、これは PLAGL1 が視床下部オレキシン転写に特異的に影響を及ぼすことを示唆する。偶然、EGFP/Plag1 が側脳室の底部または硬膜

Definition	pCAGGS+pCAGGS-EGFP導入群	pCAGGS-mPlag1+pCAGGS-EGFP導入群
	EP side/contra side (fold change)	contra side/EP side (fold change)
Enhanced green fluorescent protein	30.4	53.3*
PLEOMORPHIC ADENOMA GENE-LIKE 1	0.9	2.1*
Hypocretin/orexin	0.8	3.8*
Pro-melanin-concentrating hormone	1.3	3.7*
Neuronal pentraxin-2	0.6	1.9
Pro-dynorphin	0.8	2.3*
Thyrotropin-releasing hormone	0.6	3.4*
Oxytocin	0.9	3.6*
Neuropeptide Y	0.6	1.6
Agouti-related peptide	0.6	1.9
Beta-2 microglobulin	0.8	1.5

の外側部分から電気穿孔され胎児が作成され、これを解析した結果、視床下核および視床下部外側野にオレキシン発現が誘導された。第 3 脳室付近での EGFP (PLAGL1) 陽性細胞ではオレキシン発現が検出されなかったため、PLAGL1 が第 3 脳室付近でのオレキシン発現を抑制する可能性が示唆された。一方、PLAGL1 は脳実質、視床下部外側野ならびに視床下核において影響を及ぼす可能性が示唆された。

免疫組織化学的染色ではバックグラウンドシグナルに起因する偽陽性が生じるため、オレキシン発現に対する PLAGL1 影響を qPCR にて実施した。結果を表 1 に示す。

PLAGL1 のオレキシン発現への影響は観察されたが、それは特異的ではなく Pmch, Pdyn, Trh, Oxt への影響も観察された。

結論として、本研究はオレキシン転写調節における PLAGL1 の関与を明らかにした。しかしながら、PLAGL1 発現は視床下部の他の領域においても観察される。したがって、PLAGL1 がオレキシン発現に直接または間接的に影響を与えるかどうかを明らかにするために、Plagl1 コンディショナルノックアウトマウスおよびオレキシンプロモーター-Cre マウスとのクロスハイブリダイゼーションを用いたさらなる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 10 件)

Tanaka S*, Honda Y, Takaku S, Koike T, Oe S, Hirahara Y, Yoshida T, Takizawa N, Takamori Y, Kurokawa K, Kodama T, Yamada H. Involvement of PLAGL1/ZAC1 in hypocretin/orexin transcription. **Int J Mol Med.** 43(5):2164-2176

Koike T*, **Tanaka S**, Hirahara Y, Oe S, Kurokawa K, Maeda M, Suga M, Kataoka Y, Yamada H. Morphological characteristics of p75 neurotrophin receptor-positive cells define a new type of glial cell in the rat dorsal root ganglia. **J Comp Neurol.** doi: 10.1002/cne.24667.

Takizawa N, **Tanaka S***, Oe S, Koike T, Yoshida T, Hirahara Y, Matsuda T, Yamada H. Involvement of DHH and GLI1 in adrenocortical autograft regeneration in rats. **Sci Rep.** 2018 Sep 28;8(1):14542. doi: 10.1038/s41598-018-32870-9.

Toyoda H*, Honda Y, **Tanaka S**, Miyagawa T, Honda M, Honda K, Tokunaga K, Kodama T. Narcolepsy susceptibility gene CCR3 modulates sleep-wake patterns in mice. **PLoS One.** 2017 Nov 29;12(11):e0187888.

Tanaka S*, Honda Y, Honda M, Yamada H, Honda K, Kodama T*. Anti-Tribbles Pseudokinase 2 (TRIB2)-Immunization Modulates Hypocretin/Orexin Neuronal Functions. **Sleep.** 2017 Jan 1;40(1). doi: 10.1093/sleep/zsw036

Takizawa N, **Tanaka S***, Oe S, Koike T, Matsuda T, Yamada H. Hypothalamo-hypophysial system in rats with autotransplantation of the adrenal cortex. **Mol Med Rep.** 2017 15(5):3215-3221.

Tanaka S*, Takizawa N, Honda Y, Koike T, Oe S, Toyoda H, Kodama T, Yamada H. Hypocretin/orexin loss changes the hypothalamic immune response. **Brain Behav Immun.** 2016 57:58-67.

Takizawa N, Matsuzaki T, Yamamoto T, Mishima T, Miyasaka C, **Tanaka S**, Kinoshita H, Uemura Y, Yamada H, Matsuda T*. Novel strategy for cystitis glandularis: Oral treatment with cyclooxygenase-2 inhibitor. **Int J Urol.** 2016 Aug;23(8):706-8.

Tanaka S*, Yamada H, Kodama T (2018) Anti-Trib2 Autoantibody in Narcolepsy as A Result of Hypocretin/Orexin Nerve Deciduation. **BJSTR.** 7(3): 1-2.

Tanaka S*, Kodama T, Yamada H (2017) Why narcoleptic mice exhibit faster recovery from sickness behavior? **Atlas of Sci.** 2017 2-Jan.

(学会発表) (計 12 件)

田中進, 滝澤奈恵, 大江総一, 小池太郎, 平原幸恵, 吉田崇, 山田久夫 2019 副腎自家移植片再生への DHH の関与 第 124 回日本解剖学会総会・全国学術集会 新潟

大江総一, 和田早織, 平原幸恵, 小池太郎, **田中進**, 山田久夫 2019 虚血脳における CYP7A1 発現制御メカニズムの解析 第 124 回日本解剖学会総会・全国学術集会 新潟

小池太郎, **田中進**, 平原幸恵, 大江総一, 山田久夫 2019 3D プリンターを用いた新規 DRG グリア細胞の立体構造観察 第 124 回日本解剖学会総会・全国学術集会 新潟

田中進, 小池太郎, 大江総一, 平原幸恵, 滝澤奈恵, 吉田崇, 山田久夫 2018 腫瘍抑制因子 PLAGL1 のオレキシン転写制御への関与 第 45 回日本神経内分泌学会学術集会 東京

小池太郎, **田中進**, 平原幸恵, 大江総一, 山田久夫 2018 後根神経節における新規グリア細胞の三次元形態 第 59 回日本組織細胞化学学会総会・学術集会 宮崎

田中進 2018 Western blotting 法の基礎と応用 第 43 回組織細胞化学講習会 奈良

田中進 2018 ナルコレプシーにおける免疫機序の関与 日本睡眠学会第 43 回定期学術集会 札幌

大江総一, **田中進**, 平原幸恵, 小池太郎, 高森康晴, 山田久夫 2018 翻訳抑制因子 CPEB1 は 3'非翻訳領域を介して Auf1 による RNA 安定性制御と自己翻訳抑制をうける 第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会 東京

小池太郎, **田中進**, 平原幸恵, 大江総一, 高森康晴, 山田久夫 2018 CLEM Array tomography を用いた後根神経節におけるグリア細胞の解析 第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会 東京

田中進, 本多芳子, 高久静香, 小池太郎, 大江総一, 平原幸恵, 滝澤奈恵, 高森康晴, 黒川清, 児玉亨, 山田久夫 2018 PLAGL1/ZAC1 によるオレキシン転写制御 第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会 東京

小池太郎, 大江総一, 平原幸恵, **田中進**, 山田久夫 2017 DRG ニューロン突起起始部を被う

グリア細胞の分類と分布パターン 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会 長崎
田中進, 滝澤奈恵, 本多芳子, 児玉亨, 山田久夫 2017 オレキシン欠損による視床下部での
免疫反応変化 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会 長崎

〔図書〕(計 1 件)

田中進, 平原幸恵, 大江総一, 小池太郎, 滝澤奈恵, 山田久夫 (2018) Western blotting法の基礎と
応用. 組織細胞化学2018, 159-174.

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www3.kmu.ac.jp/anat1/>

6. 研究組織

(1)研究分担者なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 児玉 亨

ローマ字氏名 (KODAMA, Tohru)