

細胞死をもたらすストレスシグナル伝達機構の解析および生体防御機構の解明

所 属 国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第5部
研究者 桃井 隆

分担研究者

内山 安男 教授 大阪大学大学院医学系研究科情報伝達医学専攻機能形態学
森 啓 教授 大阪市立大学大学院医学研究科脳神経科学
丸山 敬 教授 埼玉医科大学生理学教室
山形 崇倫 講師 自治医科大学小児科
磯合 敦 主任研究員 旭ガラス中央研究所
日比野利彦 主任研究員 資生堂中央研究所

要旨

これまでの研究で以下のことが明らかとなった。1) 神経変性疾患ハンチントン病の原因である伸長ポリグルタミン凝集は小胞体 (ER) ストレスを誘導し、カスパーゼ1, 2を活性化し、細胞死を誘導する。2) ミトコンドリア機能不全によるエネルギー代謝の低下はAPPの代謝の異常や細胞死を生じる。ROS (reactive oxygen species) はミトコンドリアのATP産生を低下させ、蛋白分解能を低下させ、細胞内に異常蛋白の蓄積をもたらす。ERストレスを誘導し、アルツハイマー病以外にも、トリプレット病、シヌクレオパチー、などの変性疾患に共通する潜在的な病変機構である可能性がある。3) 抗酸化剤であるビタミンEはこうした神経変性疾患の治療に有効である。一方、4) 虚血はカスパーゼによる細胞死以外に、カテプシンBとDで制御される細胞死を誘導する。カテプシンDの特異的阻害剤の開発は虚血による神経障害を防ぐ治療薬として有効である。

1. 目的

遺伝性神経変性疾患 (アルツハイマー病、ポリグルタミン蓄積病、パーキンソン病患者) の脳ではユビキチン化された異常蛋白の蓄積が観察されている。こうした異常蛋白蓄積はシャペロンとして働くヒートショック蛋白によって抑制されることから、ATP依存性のユビキチン/プロテアソーム系で分解できなかった異常蛋白の蓄積が細胞死を誘導することが明らかになっている。異常蛋白とストレスシグナルとの関係が注目されているが、こうした疾患における細胞死の経路については依然不明な点が多い。一方、蛋白のフォールディング異常による小胞体 (ER) ストレス、や有機水銀などのさまざまな環境因子も酸化ストレスを介して、細胞死への関与が指摘されている。こうしたアポトーシスの死の他に、虚血ストレス、栄養因子の枯渇ストレスは、ネクローシスの死も起こす。本研究はさまざまな遺伝性 (変性疾患)、非遺伝性 (環境) ストレス刺激による酸化ストレス、ERストレスによるカスパーゼ依存性、非依存性の細胞死経路、およびネク

ローシスの細胞死の経路について研究する。また、こうした細胞死の経路を抑制する阻害剤を探索するとともに、細胞死を誘導する ER ストレスのシグナル伝達系を明らかにすることにより細胞死の経路の上流で、すなわち、ストレスの発生、およびストレスシグナル伝達系を抑制する新たな創薬の可能性を探索するものである。

2. 研究方法

1) カスパーゼ 12 活性型断片特異抗体作製とポリグルタミン凝集による ER ストレスの解析
予想されるカスパーゼ 12 切断部位 (D318 および D341) の C 端 5 アミノ酸残基に相当する合成ペプチドの N 端にシステイン残基を付加し、担体とする Keyhole Limpet Hemocyanin との複合体を作製し、この複合体を抗原としてウサギに免疫した。得られた抗血清より、抗原に用いた合成ペプチドによるアフィニティーカラムクロマトグラフィーにて特異抗体を精製した。pEGFP-72CAG 及び pEGFP-11CAG (5 μ g) を C2C5 細胞にリン酸カルシウム法によりトランスフェクションした細胞、あるいは tunicamycin 処理を施した C2C12 細胞を 2% パラホルムアルデヒドを含む PBS にて固定後、抗 c-Jun リン酸化特異抗体あるいはカスパーゼ 12 活性型断片特異抗体との 2 重染色で解析をおこなった。

3) A β による神経細胞死の誘導

カスパーゼ 3 欠損マウスならびに正常コントロールマウスの胎生 16 日令 (E16) より大脳皮質を単離しトリプシン処理した後、培養液を加え 24 穴プレートにて初代培養をおこなった。培養 4 日目に 2 nM ~ 20 μ M の A β 1-40 を各々の培養液に加え、培養 7 日目に 4% パラフォルムにて固定した。固定後、ニューロンのマーカーとして MAP2 抗体を用い DAB にて可視化し、各濃度中の残存ニューロンを計数した。マウス (10-15 ヶ月齢) の海馬に重合化させた A β あるいは PBS を 0.5 μ l を 1 回微量注入し、2 週間後にパラフォルムアルデヒド溶液による灌流固定した脳組織のパラフィン包埋を作成した。薄切標本は Nissl 染色後、残存ニューロンを計数した。アポトーシス細胞死は、TUNEL 検出キット (MBL) を用いて、蛍光顕微鏡で観察した。

4) 栄養枯渇、虚血ストレスによる細胞死の誘導

短時間脳虚血実験：砂ネズミ (約 60 g) をエーテル麻酔し、頸部を切開後、両側総頸動脈を剖出して動脈瘤用クリップで 5 分間結紮した。この間動物は 37 $^{\circ}$ C に保持された。クリップでの結紮時間は、カテプシン B の特異的インヒビター、CA074、投与実験では 3 分で、また、カテプシン D のインヒビター投与実験では 5 分間で行った。カテプシン D あるいは B 欠損マウスを用いた短時間脳虚血実験は、生後 7 日齢 (P 7) のこれらマウスと同腹の野生型、ヘテロ接合子を有するマウスを麻酔下で片側の総頸動脈を完全結紮して親元に一度帰して 1 時間後に、低酸素条件に調節したコンテナ (8% 酸素-92% 窒素、37 $^{\circ}$ C に保持) で 40 分間の低酸素-虚血負荷 (H-I 負荷) を施した。細胞死の検定は TUNEL 染色で行った。

5) α TTP による酸化ストレス細胞死の抑制

ヒト野生型プレセニリン 1 (PS1) cDNA, Ala²⁶⁰Val 変異型 PS1cDNA およびヒト α TTPcDNA をそれぞれ pCDNA3 ベクターに組み込み、リポフェクション法を用いて PC12D 細胞に導入した。セレクションには G418 (PS1) および hygromycin (α TTP) を用いた。発現細胞の同定は、通常の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、イムノプロット法を用いた。それぞれの抗体は cDNA の配列から推測したアミノ酸配列に基づいて合成したペプチド抗原に対するウサギ抗血清を用いた。

3. 研究成果

3-1) ポリグルタミン凝集によるカスパーゼ 12 活性化と ER ストレス細胞死 (磯合, 桃井, 山形)
ER ストレスによるカスパーゼ 12 のプロセッシング部位を解析した結果、カスパーゼ 12 は自己プロセッシング部位である D318 番目とカスパーゼによる切断部位である D341 で切断されることが明らかとなった (図 1A)。

これら2つの切断部位に特異的な抗体を作製し、これら抗体を用いた免疫染色法により解析した結果、ER上で切断されたカスパーゼ12はその後、核内へと移行することが判明した。一方、伸長ポリグルタミン(polyQ)72は核内だけでなく核周辺の凝集や細胞質でも凝集体を形成し、小胞体シャペロン蛋白であるBipの発現を上昇させた。BipはERのIreを介するUPRにより発現が上昇することから、カスパーゼ12の切断点に対する抗体を用いて解析したところ、ポリグルタミン凝集はカスパーゼ12の活性化を誘導し、細胞死をもたらすことが明らかとなった(図1B)。このようにpolyQ72の細胞質、および核内での凝集体形成はERストレスを誘導し、細胞死した。

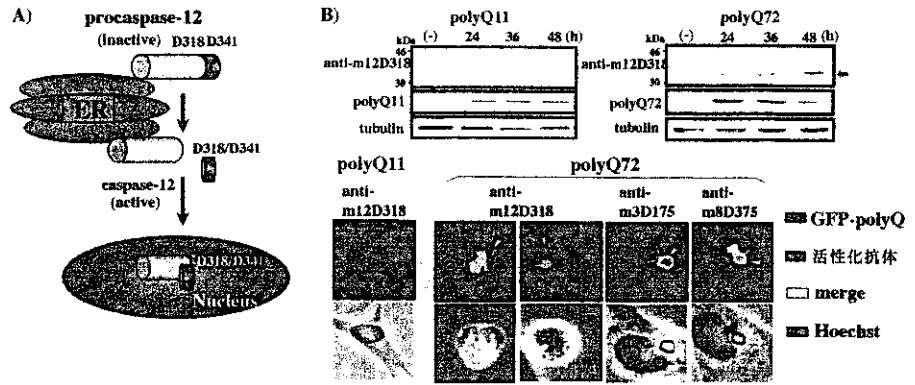


図1.A) Processing of caspase-12 induced by ER stress. Processing at the N-terminal region may be necessary for the translocation of processed caspase-12 into nuclei and cell death induced by ER stress. Some of the caspase-12 processed at the N-terminal and C-terminal regions may directly participate in the apoptotic events in nuclei. B) Immunoblot analysis and immunocytochemical detection of the effect of polyQ on the processing of caspase-12 at D³¹⁸ and the relation between apoptotic features and caspase activation induced by polyQ aggregates. Processing of caspase-12 at D³¹⁸ induced by EGFP-polyQ72 and -polyQ11. pEGFP-72CAG and -11CAG were transfected into C2C5 cells and processing of caspase-12 at D³¹⁸ was examined in time dependent manner by immunoblot analysis using anti-m12D318. Expression of tubulin and EGFP-polyQ in soluble fraction was examined by immunoblot analysis using anti-tubulin and anti-GFP, respectively. Activation of caspases and Hoechst 33342 staining were examined in cells expressing EGFP-polyQ72 (EGFP-labeled; green) by immunostaining using anti-m12D318, anti-m3D175, and anti-m8D387 (rhodamine; red, Hoechst 33342; blue). C2C5 cells expressing EGFP-polyQ11 were negative for anti-m12D318. Arrows indicate EGFP-polyQ72 aggregates and arrowheads indicate anti-m12D318, anti-m8D387, or anti-m3D175 immunoreactivity. Scale bars, 25 μ m.

3-2 酸化ストレス細胞死 (笠原、丸山、森、山形)

3-2-1) FAKによる酸化ストレス細胞死の制御 (笠原)

ヒトグリオーマ細胞 T98G は酸化ストレスや抗癌剤に対し耐性を示すことが知られているが、その原因の一つとして接着斑キナーゼ FAK を介した PI3-kinase-Akt のサバイバル経路の恒常的活性化が考えられた。すなわち、397FAK(397のスレオニンに変異を入れてリン酸化できなくした FAK)は抗アポトーシス分子である XIAP の発現を抑制し、内因性 FAK のサバイバル経路関連シグナル分子との会合を阻害することによりサバイバル経路を遮断した。その結果、アポトーシス誘導因子(Fas, Bad など)が活性化し、カスパーゼ-8 をへてカスパーゼ-3, -6 の活性化がおきるものと考えられる。こうした結果から、FAK リン酸化を調節する試薬により、酸化ストレスの細胞死を防御する創薬の可能性が考えられ、現在その方向での可能性を検討している。

3-2-3) 酸化ストレスと変異蛋白蓄積 (森)

ダウン症中枢神経系細胞では APP の代謝が異常であることを発見した。この異常性は、正常ヒトアストログリア細胞のミトコンドリア人工的障害によっても再現できた(図2A)。すなわち、ダウン症細胞はミトコンドリア機能不全によるエネルギー代謝の低下が引き起こされ、その結果 α -セクレターゼによる APP 代謝が低下し、 β -セクレターゼ代謝経路が上昇すると考えられる。また、外来性 APPs あるいは APP の 17-mer 合成ペプチドが生存活性分子として確認されたことから、細胞内 A β 1 の蓄積より、むしろ APPs の低下が重篤な生存率低下の原因である可能性が示唆された。

3-2-3) プレセニン、ビタミンEによる酸化ストレス細胞死の抑制 (丸山)

アルツハイマー病における神経変性死にも酸化ストレスが関与について調べた。PC12D 細胞に家族性アルツハイマー病原因変異であるプレセニン (PS1) 変異型 cDNA を安定的に導入した細胞では(PS1MT)、野生型 PS1 を導入した細胞に比べ酸化ストレスによる細胞死を起しや

すくなった。一方、PS1MT 細胞に抗酸化作用をもつビタミン E の細胞内輸送蛋白質 (α TTP) cDNA を安定的に導入して、 α TTP を恒常的に発現する細胞株 (PS1MT+ α TTP) では PS1MT 細胞に比べ細胞死が起こりにくくなり、 α -Toc の要求性も低くなった。また酸化ストレスに対する抵抗性も上昇していることが明らかとなった (図 2B)。このことからビタミン E などの抗酸化作用をもつ化合物はアルツハイマー病の治療薬として有効であることが示唆された。

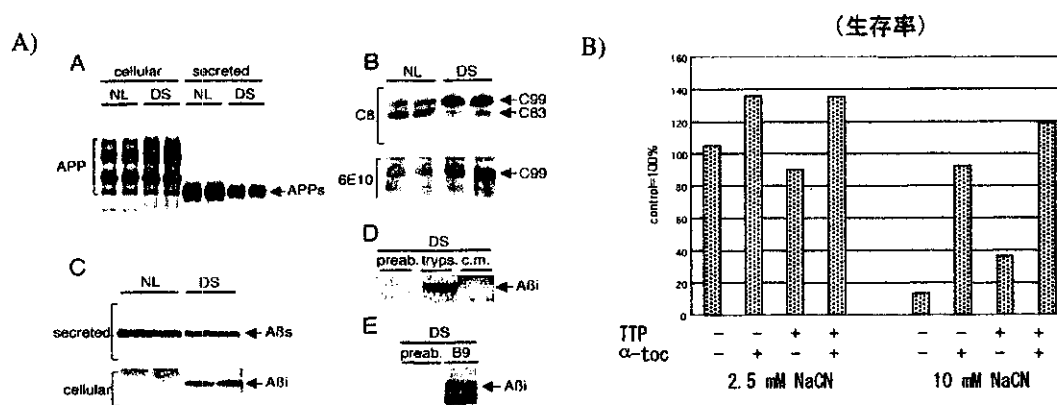


図 2. A) ダウン症アストログリア細胞における APP 分子の異常代謝。アストログリア細胞は正常脳 (NL) とダウン症脳 (DW) から調製した。A、APP ホロ分子は糖鎖の結合した成熟型と結合しない未成熟型からなる。 α -セクレターゼ切断され、細胞外に分泌される分泌型 APP (APPs) は、分子量の小さな APP 断片として同定される。B、APP の細胞質側断片を含む断片の同定には C8 および 6E10 抗体を使用した。後者は、ある α -セクレターゼ切断より N 末上流領域を認識するために、C83 断片は認識されない。C、A β は細胞外へ分泌される A β s と細胞内に蓄積する A β i を B9 抗体によって検出した。D、細胞内 A β i である一つの証拠として細胞をトリプシン処理 (trypsin) に対して抵抗性を示すことが観察された。E、ダウン症にのみ観察される分子種であり、界面活性剤不溶性である A β i は正常には検出され難い。F、ダウン症細胞を 5 日間培養したグリア細胞では、細胞内の APP 分子と A β i が増加し、細胞外へ分泌される APPs と A β s は減少する。B) α -TTP と α -Toc による神経細胞防護。NaCN による酸化ストレスは α -Toc により細胞死が抑制された。

3-3 栄養枯渇および虚血によるカスパーゼ D 依存性神経細胞死 (内山)

ラット褐色細胞腫由来の PC 12 細胞を用いて、血清除去に基づく細胞死の過程を解析した。その結果、培養後早期からオートファジーが誘導され、リソソームカテプシン B の免疫染色性、酵素活性、タンパク量が激減する一方、カテプシン D は上昇することが分かった (図 3)。また、カテプシン B の遺伝子を PC12 細胞に遺伝子導入すると生存活性が有意に上昇すること、逆にカテプシン D の遺伝子を導入すると細胞死が促進されることが分かった。この結果は、PC12 細胞には、オートファジーの下流で、カテプシン D が細胞死促進因子として働き、カテプシン B があればその活性を抑制する細胞死の経路が存在することを示している。これらの事実に基づき、短時間前脳虚血後の砂ネズミ海馬 CA1 錐体細胞に起こる遅延型神経細胞死を解析した結果、虚血後細胞死に陥る細胞では、カテプシン B が減少し、D が上昇することが分かった。即ち、無血清培地で培養した PC12 細胞と同様の変化が虚血後の神経細胞でも起こることが明らかとなった。カテプシン D を欠損するマウスを用いて、hypoxia-anoxia injury (H-I 負荷) 実験を試みた結果、対照群では 40 分の H-I 負荷で約 70 から 80 % の海馬 CA1 領域で TUNEL 陽性細胞が出現したが、カテプシン D 欠損マウス (CD-/-マウス) では、80 % のマウスで陽性細胞は見られなかった。即ち、カテプシン D を欠損すると虚血負荷に対して耐性となることが分かった。しかし、CD-/-マウスの神経系では封入体が観察され、proteolipid の蓄積が示唆され、神経性セロイドリポフスチン蓄積症に類似した表現型を持っていた。免疫組織化学法により、Proteolipid の主成分はミトコンドリアの ATP synthase の subunit c であった。正常な細胞では subunit c はミトコンドリアの内膜にのみ認められたが、欠損マウスの神経細胞では subunit c がライソソームにも蓄積することが明らかとなった。subunit c は網膜にも蓄積し、網膜細胞はアポトーシスによる細胞死をおこしていた。

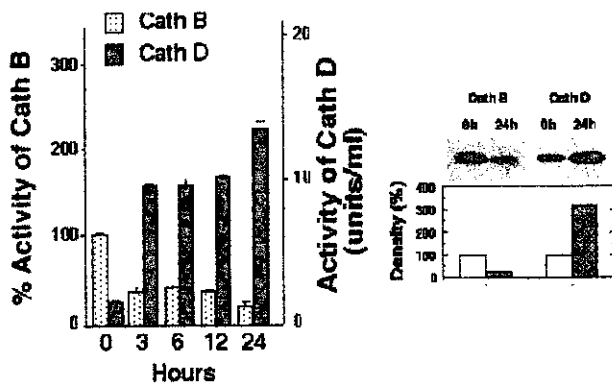


図3. 無血清培地で培養した PC12 細胞におけるリソソームカテプシン B (Cath B) とカテプシン D (Cath D) のタンパク質分解活性 (左パネル) とタンパク質量の変化 (右パネル)。

3-4) その他の結果

3-4-1) Aβによる細胞死の機構 (森)

カスパーゼ 3 ノックアウトマウスでは Aβ1-40 を加えた時(n=5、p<0.001)、加えない時(n=5、p=0.0017)のいずれにおいても野生型に比べて TUNEL 陽性細胞は著明に減少している。また野生型では Aβ1-40 の添加によってアポトーシスを呈する細胞は著明に増加するが、ノックアウトマウスでは若干の増加にとどまった (図 4)。

In vivo Aβ₁₋₄₀ injection

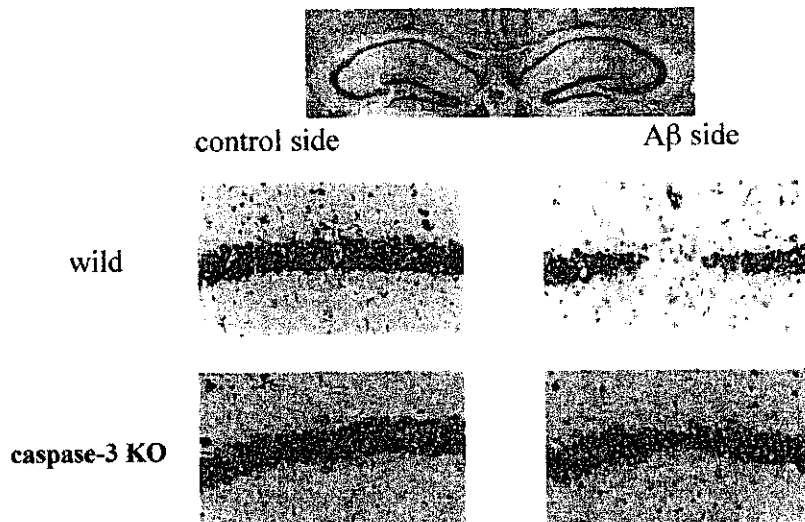


図 4. NC/ Aβ 注入側では神経細胞脱落が有意に多く、Aβ1-40 の神経細胞毒性が認められた。一方カスパーゼ 3 ノックアウトマウスでは Aβ1-40 の神経細胞毒性は著明に減弱していた (図 2)。

3-4-2) 退行期毛包におけるカスパーゼの活性化 (日比野)

TGF-β2 により活性化される細胞死の経路は不明である。成長期から退行期への移行過程の毛包において、毛乳頭細胞と毛母細胞の境界の下部領域に、強い TGF-β2 が沈着を観察した。退行期が進行するに従って、退縮していく上皮系細胞に強く TGF-β2 が局在し、カスパーゼ-8、-9 および-3 の活性化と TUNEL 陽性が観察され、退行期においては上皮系細胞がカスパーゼ依存性のアポトーシスを起こしていた。毛包器官培養系において、TGF-β2 の添加により、成長期毛包においてもカスパーゼ-8、-9、-3 の活性化が明らかとなった。また、こうしたカスパーゼ依存的な細胞死を制御するヒートショック蛋白 (Hsp90) はエストロゲン受容体やシクロスポリン結合蛋白である Cyp40 と複合体形成して毛包で重要な働きをしていることが明らかとなった。

4. 考察

4-1) ERストレス細胞死

カスパーゼ 12 のオートプロセッシングによる切断部位を検討するべく、Kunkel 法に基づき、切断部位と考えられる D318 および D341 をアラニンに変えた変異型コンストラクトを作製した。核内のポリグルタミン凝集は SEK1/JNK および ASK1 経路を活性化するという報告がなされている (Yasuda et al., 1999)。また、ポリグルタミン凝集にともない、カスパーゼ 8 が共凝集し活性化されるとの報告がある (Sanchez et al., 1998, Kouroku et al., 2000)。しかし、ER ストレス細胞死との関係については明らかでなかった。作製したカスパーゼ 12 の活性型に対する抗体 m12D318 と m12D341 を用いて、ポリグルタミン凝集による細胞死を解析したところ、ポリグルタミンは ER ストレスを活性化し、カスパーゼ 12 を活性化していることが明らかとなった (Kouroku et al., 2002)。一方、西頭らもまた、ポリグルタミン凝集が Ire を介して、ASK を活性化することを報告している (Nishitoh et al., 2002)。ER に局在しない核周辺の凝集、細胞質の凝集体が ER ストレスを誘導する分子機構については幾つかの仮説が提出されているが、現在のところいずれも確立されていない。直接か間接かは別にしても ER ストレスによる細胞死がポリグルタミン凝集による細胞死と深く関係していることが明らかとなり、ER ストレスを抑制することにより、ハンチントン病などの神経変性疾患治療薬の可能性がしめされた。現在、この観点から ER ストレスを阻害する化合物のスクリーニングをおこなっている。

4-2) A β によるカスパーゼ 3 依存性細胞死の分子機構

A β が神経細胞毒性を持つことは In vitro および in vivo において認められ、アルツハイマー病の神経変性機構にアポトーシス、特にカスパーゼ 3 が関与する可能性が示唆されている。今回の結果ではカスパーゼ 3 ノックアウトにおいて A β 1-40 の毒性は抑制されたが、高用量では神経細胞死の抑制が不十分であった。アルツハイマー病病因論を議論する上で大きな基礎的意義があると考えられる。A β の主な分子種として A β 40 と A β 42 がある。in vitro では A β 42 のほうが凝集体を形成しやすく、また、A β 40 を巻き込んで凝集体を形成することが確認されている。凝集体で著しく神経毒性がまし、カスパーゼ 3 依存性の細胞死を in vitro 同様 in vivo でも示す。ダウン症中枢神経系細胞がしめす APP の代謝が異常を正常ヒトアストログリア細胞のミトコンドリア人工的障害によっても再現できた。ミトコンドリア機能不全によるエネルギー代謝の低下が引き起こされ、その結果 α -セクレターゼによる APP 代謝が低下し、 β -セクレターゼ代謝経路が上昇すると考えられる。細胞内 A β 1 の蓄積は、その結果である。過度の ROS (reactive oxygen species) は AIF を介するカスパーゼ非依存性の細胞死をもたらすが、軽度の ROS でもミトコンドリアの ATP 産生を低下させ、蛋白分解能を低下させ、細胞内に異常蛋白の蓄積をもたらす、ER ストレスを介しての長期にわたる神経細胞死をもたらす。このように神経変性疾患は ER、リソゾーム、ミトコンドリアの細胞内小器官の機能不全と密接な関係がある。中でも酸化ストレスによるミトコンドリア異常はアルツハイマー病以外にも、トリプレット病、シヌクレオパチー、タウオパチーの変性疾患に共通する潜在的な病変機構である可能性がある。ヒトの AVED の原因遺伝子が α TTP の変異であることは多数の家系で報告されており、また、 α -Toc の大量投与がその神経症状に治療的な効果があることから、 α TTP と α -Toc が神経防護に関与していると思われる。ビタミン E の過剰投与によって、酸化ストレスによる細胞死の抑制とアルツハイマー病の進行の遅延効果が認められる。 α -Toc は in vivo においても細胞死抑制作用をしているものと考えられる。ビタミン E をはじめとする酸化ストレスを抑制する抗酸化剤は変異蛋白凝集をともなうさまざまな神経変性疾患の治療に有効であると考えられる。

4-3) カテプシン B、D 依存性神経細胞死の経路

栄養因子除去後の PC12 細胞の細胞死にはカテプシン B と D で制御される経路が存在することを発見した。また、カテプシン D を欠損するマウスの海馬領域の神経細胞は、虚血負荷に耐性を示すことが分かった。即ち、本研究結果は、カテプシン D が細胞死誘発因子として働

くことを示すと共に、このインヒビターを用いることによって虚血性神経細胞死を防御できる可能性を示している。現在までに、高等動物ではカテプシン D の内在性インヒビターは見い出されていない。特異的なインヒビターは pepstatin を初め知られているが、脳血管関門を通過し、同酵素の活性を抑制できるインヒビターは知られていない。しかし、本研究結果は、このようなインヒビターを開発できれば、虚血性神経細胞死の治療に道が開かれる可能性が高いことを示している。しかし、カテプシン D 欠損マウスの網膜が細胞死することから、治療薬として、神経細胞の変性などの副作用がない誘導体の開発が必要であることを示唆している。

5. まとめ

カスパーゼ 3 欠損マウスやカテプシン D 欠損マウスではそれぞれ、A β の蓄積による細胞死や、虚血による細胞死が抑制された。2) ポリグルタミン凝集は ER ストレスを誘導し、カスパーゼ 12 を活性化し、細胞死を誘導する。3) ROS はミトコンドリアの ATP 産生を低下させ、蛋白分解能を低下させ、長期的に細胞内に異常蛋白の蓄積をもたらす、ER ストレスを誘導する。ROS はアルツハイマー病、トリプレット病、シヌクレオパチー、などの変性疾患に共通する潜在的な病変機構である可能性がある。抗酸化剤であるビタミン E はこうした神経変性疾患の治療に有効である。また、脱毛の原因である毛包での細胞死にカスパーゼ依存性細胞死が関与しており、この細胞死は Hsp90, Cyp40, エストロジェン受容体により調節されている。

6. 研究発表

主任研究者

桃井隆

- 1: Fujita, E., Soyama, A., and Momoi, T., RA175, which is the mouse orthologue of TSLC1, a tumor suppressor gene in human cancer, is a cell adhesion molecule. *Exp. Cell Res.* (In press)
- 2: Momoi, T., Fujita, E., and Urase, K. Region-specific caspase-3-dependent programmed cell death in the developing forebrain. *Neuroreport* 14, 111-115 (2003)
- 3: Jimbo, A., Fujita, E., Kouroku, Y., Ohnishi, J., Inohara, N., Kuida, K., Sakamaki, K., Yonehara, S., and Momoi, T., ER stress induces caspase-8 activation stimulating the cytochrome c release and caspase-9 activation. *Exp. Cell Res.* 283, 156-166 (2003).
- 4: Suzuki H, Yanaka A, Shibahara T, Matsui H, Nakahara A, Tanaka N, Muto H, Momoi T, Uchiyama Y. Ammonia-induced apoptosis is accelerated at higher pH in gastric surface mucous cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 283, 986-995 (2002).
- 5: Nakamoto, Y., Kaneko, S., Fan, H., Momoi, T., Tsutsui, H., Nakanishi, K., Kobayashi, K., and Suda T. Prevention of Hepatocellular Carcinoma Development Associated with Chronic Hepatitis by Anti-Fas Ligand Antibody Therapy. *J. Exp. Med.* 196, 1105-1111 (2002)
- 6: Fukami, T., Satoh, H., Fujita, E., Maruyama, T., Fukuhara, H., Kuramochi, M., Takamoto, S., Momoi, T., and Murakami Y. Identification of the Tslc1 gene, a mouse orthologue of the human tumor suppressor TSLC1 gene. *Gene.* 295, 7-12 (2002)
- 7: Fujita, E., Kouroku, Y., Jimbo, A., Maruyama, K., and Momoi, T. Caspase-12 processing and fragment translocation into nuclei of tunicamycin-treated cells. *Cell Death Differ.* 9, 1108-1114 (2002)
- 8: Kouroku, Y., Fujita, E., Jimbo, A., Kikuchi, T., Yamagata, T., Momoi, M.Y, Kominami E., Kuida, K., Sakamaki, K., Yonehara, S., and Momoi, T. Polyglutamine aggregates stimulate ER stress signals and caspase-12 activation. *Human Mol. Genet.* 11, 1505-1515 (2002)
- 9: Kitanaka, C., Kato, K., Ijiri, R., Sakurada, K., Tomiyama, A., Noguchi, K., Nagashima, Y., Nakagawara, A., Momoi, T., Toyoda, Y., Kigasawa, H., Nishi, T., Shirouzu, M., Yokoyama, S., Tanaka, Y., and Kuchino, Y. Increased ras expression and caspase-independent neuroblastoma cell death: possible mechanism of spontaneous neuroblastoma regression. *J. Natl. Cancer Inst.* 94, 358-368 (2002)
- 10: Daré, E., Tofighi, R., Momoi, T., Mutti, A., and Ceccatelli, S. Styrene 7,8-oxide induces caspase activation and regular DNA fragmentation in neuronal cells. *Brain Res.* 933, 12-22 (2002)
- 11: Fujita, E., Egashira, J., Urase, K., Kuida, K., and Momoi, T. Caspase-9 processing by caspase-3 via a feedback amplification loop in vivo. *Cell Death Differ.* 8, 335-344 (2001)

- 12: Yaginuma, H., Shiraiwa, N., Shimada, T., Nishiyama, K., Hong, J., Wang, S., Momoi, T., Uchiyama, Y., and Oppenheim, R.W. Caspase activity is involved in, but is dispensable for, early motoneuron death in the chick embryo cervical spinal cord. *Mol. Cell Neurosci.* 18, 168-182 (2001)
- 13: Nakagawa-Yagi, Y., Choi, D.K., Ogane, N., Shimada, S., Seya, M., Momoi, T., Ito, T., and Sakaki, Y. Discovery of a novel compound insight into mechanisms for acrylamide-induced axonopathy and colchicine-induced apoptotic neuronal cell death. *Brain Res.* 909, 8-19 (2001)
- 14: Hayashi, Y.K., Tezak, Z., Momoi, T., Nonaka, I., Garcia, C.A., Hoffman, E.P., and Arahata, K. Massive muscle cell degeneration in the early stage of merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 11, 350-359 (2001)
- 15: Takahashi, K., Kamiya, K., Urase, K., Suga, M., Takizawa, T., Mori, H., Yoshikawa, Y., Ichimura, K., Kuida, K., and Momoi, T. Caspase-3-deficiency induces hyperplasia of supporting cells and degeneration of sensory cells resulting in the hearing loss. *Brain Res.* 894, 359-367 (2001)
- 16: Hisahara, S., Yuan, J., Momoi, T., Okano, H., and Miura, M. Caspase-11 mediates oligodendrocyte cell death and pathogenesis of autoimmune-mediated demyelination. *J. Exp. Med.* 193, 111-122 (2001)

分担研究者

磯合 敦

- 1: Fujita, E., Kouroku, Y., Jimbo, A., Isoai, A., Maruyama, K., and Momoi, T. Caspase-12 processing and fragment translocation into nuclei of tunicamycin-treated cells. *Cell Death Differ.* 9, 1108-1114 (2002)
- 2: Isoai, A., Kimura, H., Reichert, A., Schorgendorfer, K., Nikaido, K., Tohda, H., Giga-Hama, Y., Mutoh, N., and Kumagai, H. Production of D-amino acid oxidase (DAO) of *Trigonopsis variabilis* in *Schizosaccharomyces pombe* and the characterization of biocatalysts prepared with recombinant cells. *Biotechnol Bioeng.* 80, 22-32 (2002)
- 3: Fujita, E., Urase, K., Egashira, J., Miho, Y., Isahara, K., Uchiyama, Y., Isoai, A., Kumagai, H., Kuida, K., Motoyama, N., and Momoi, T. Detection of caspase-9 activation in the cell death of the Bcl-x-deficient mouse embryo nervous system by cleavage site-directed antisera. *Dev. Brain Res.* 122, 135-147 (2000)

日比野利彦

- 1: Takeda, A., Kajiya, A., Iwasawa, A., Nakamura, Y., and Hibino, T. Aberrant expression of serpin squamous cell carcinoma antigen 2 in human tumor tissues and cell lines: evidence of protection from tumor necrosis factor-mediated apoptosis. *Biol. Chem.* 383, 1231-1236 (2002)
- 2: Soma, T., Tsuji, Y., and Hibino, T. Involvement of transforming growth factor- β 2 in catagen induction during the human hair cycle. *J. Invest. Dermatol.* 118, 993-997 (2002)
- 3: Foitzik, K., Lindner, G., Mueller-Roever, S., Maurer, M., Botchkareva, N., Botchkarev, V., Handjiski, B., Metz, M., Hibino, T., Soma, T., Dotto, G.P., and Paus, R. Control of murine hair follicle regression (catagen) by TGF- β 1 in vivo. *FASEB J.* 14, 752-760 (2000)

内山安男

- 1: Kawane, K., Fukuyama, H., Yoshida, H., Nagase, H., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., Okada, K., Iida, T., and Nagata, S. Impaired thymic development in mouse embryos deficient in apoptotic DNA degradation. *Nat. Immunol.* 4, 138-144 (2003)
- 2: Shimamura, M., Morishita, R., Endoh, M., Oshima, K., Aoki, M., Waguri, S., Uchiyama, Y., and Kaneda, Y. HVJ-envelope vector for gene transfer into central nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300, 464-471 (2003)
- 3: Shibata, M., Koike, M., Waguri, S., Zhang, G., Koga, T., and Uchiyama, Y. Cathepsin D is specifically inhibited by deoxyribonucleic acids. *FEBS Lett.* 517, 281-284 (2002)
- 4: Uchida, M., Hino, N., Yamanaka, T., Fukushima, H., Imanishi, T., Uchiyama, Y., Kodama, T., and Doi, T. Hepatitis C virus core protein binds to a C-terminal region of NS5B RNA polymerase. *Hepatol Res.* 22, 297-306 (2002)
- 5: Ariga, K., Yonenobu, K., Nakase, T., Kaneko, M., Okuda, S., Uchiyama, Y., and Yoshikawa, H. Localization of cathepsins D, K, and L in degenerated human intervertebral discs. *Spine.* 26, 2666-2672 (2001)

- 6: Waguri, S., Kohmura, M., Kanamori, S., Watanabe, T., Ohsawa, Y., Koike, M., Tomiyama, Y., Wakasugi, M., Kominami, E., and Uchiyama, Y. Different distribution patterns of the two mannose 6-phosphate receptors in rat liver. *J. Histochem. Cytochem.* 49,1397-1405 (2001)
- 7: Uchiyama, Y. Autophagic cell death and its execution by lysosomal cathepsins. *Arch. Histol. Cytol.* 64, 233-246 (2001)
- 8: Yaginuma, H., Shiraiwa, N., Shimada, T., Nishiyama, K., Hong, J., Wang, S., Momoi, T., and Uchiyama, Y., Oppenheim, R.W. Caspase activity is involved in, but is dispensable for, early motoneuron death in the chick embryo cervical spinal cord. *Mol Cell Neurosci.* 18, 168-182 (2001)
- 9: Kawane, K., Fukuyama, H., Kondoh, G., Takeda, J., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., and Nagata, S. Requirement of DNase II for definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver. *Science* 292, 1546-1549 (2001)

森 啓

- 1: Mori, H., Tomiyama, T., Maeda, N., Ozawa, K., and Wakasa, K. Lack of amyloid plaque formation in the central nervous system of a patient with Werner syndrome *Neuropathology* (in press)
- 2: Busciglio, J., Pelsman, A., Wong, C., Pigino, G., Yuan, M., Mori, H., and Yankner, BA. Altered Metabolism of the Amyloid β Precursor Protein Is Associated with Mitochondrial Dysfunction in Down's Syndrome. *Neuron* 33, 677-688 (2002)
- 3: Ishii, K., Klunk, WE., Arawaka, S., Debnath, ML., Furiya, Y., Sahara, N., Shoji, S., Tamaoka, A., Pettegrew, JW., and Mori, H. Chrysamine G and its derivative reduce amyloid β -induced neurotoxicity in mice. *Neurosci. Lett.* 333, 5-8 (2002)
- 4: Taniguchi, T., Kawamata, T., Mukai, H., Hasegawa, H., Isagawa, T., Yasuda, M., Hashimoto, T., Terashima, A., Nakai, M., Mori, H., Ono, Y., and Tanaka, C. Phosphorylation of tau is regulated by PKN. *J. Biol. Chem.* 276, 10025-10031 (2001)
- 5: Kametani, F., Tanaka, K., Usami, M., Maruyama, K., and Mori, M. Human wild presenilin-1 mimics the effect of the mutant presenilin-1 on the processing of Alzheimer's amyloid precursor protein (APP) in PC12D cells. *J. Neurol. Sci.* 188, 27-31 (2001)
- 6: Ishii, K., Lippa, C., Tomiyama, T., Miyatake, F., Ozawa, K., Tamaoka, A., Hasegawa, T., Fraser, PE., Shoji, S., Nee, L.E., Pollen, D.A., St. George-Hyslop, P.H., Ii, K., Ohtake, T., Kalaria, R.N., Rossor, M.N., Lantos, P.L., Cairns, N.J., Farrer, L.A., and Mori, H. Distinguishable effects of Presenilin-1 and APP717 mutations on amyloid plaque deposition. *Neurobiol. Aging* 22, 367-376 (2001)
- 7: Takahashi, K., Kamiya, K., Urase, K., Suga, M., Takizawa, T., Mori, H., Yoshikawa, Y., Ichimura, K., Kuida, K., and Momoi, T. Caspase-3-deficiency induces hyperplasia of supporting cells and degeneration of sensory cells resulting in the hearing loss. *Brain Res.* 894, 359-367 (2001)
- 8: Park, I.H., Jung, M.W., Mori, H., and Mook-Jung, I. Zinc enhances synthesis of presenilin 1 in mouse primary cortical culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285, 680-688 (2001)
- 9: Pigino, G., Pelsman, A., Mori, H., and Busciglio, J. Presenilin 1 mutations reduce cytoskeletal association, deregulate neurite growth and potentiate neuronal dystrophy and tau phosphorylation *J. Neurosci.* 21, 834-842 (2001)

山形崇倫

- 1: Yamagata, T., Aradhya, S., Mori, M., Inoue, K., Momoi, M.Y., and Nelson, D.L. The human secretin gene: fine structure in 11p15.5 and sequence variation in patients with autism. *Genomics* 80,185-194 (2002)
- 2: Aradhya, S., Woffendin, H., Bonnen, P., Heiss, N.S., Yamagata, T., Esposito, T., Bardaro, T., Poustka, A., D'Urso, M., Kenwick, S., and Nelson, DL. Physical and genetic characterization reveals a pseudogene, an evolutionary junction, and unstable Loci in distal Xq28. *Genomics* 79, 31-40 (2002)
- 3: Matsuura, T., Yamagata, T., Burgess, D.L., Rasmussen, A., Grewal, R.P., Watase, K., Khajavi, M., McCall, A.E., Davis, C.F., Zu, L., Achari, M., Pulst, S.M., Alonso, E., Noebels, J.L., Nelson, D.L., Zoghbi, HY., and Ashizawa, T. Large expansion of the ATTCT pentanucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 10. *Nat. Genet.* 26, 191-194 (2000)
- 4: Smahi, A., Courtois, G., Vabres, P., Yamaoka, S., Heuertz, S., Munnich, A., Israel, A., Heiss, N.S., Klauck, S.M., Kioschis, P., Wiemann, S., Poustka, A., Esposito, T., Bardaro, T., Gianfrancesco, F., Ciccodicola, A., D'Urso, M., Woffendin, H., Jakins, T., Donnai, D., Stewart, H., Kenwick, S.J., Aradhya, S., Yamagata, T., Levy, M., Lewis, RA., and Nelson, D.L. Genomic rearrangement in

NEMO impairs NF-kappaB activation and is a cause of incontinentia pigmenti. The International Incontinentia Pigmenti (IP) Consortium. *Nature* 405, 466-472 (2000)

丸山 敬

- 1: Westerman, B.A., Poutsma, A., Maruyama, K., Schrijnemakers, H.F., van Wijk, L.J., and Oudejans, C.B. The proneural genes NEUROD1 and NEUROD2 are expressed during human trophoblast invasion. *Mech. Dev.* 113, 85-90 (2002)
- 2: Shizuka-Ikeda, M., Matsubara, E., Ikeda, M., Kana, i M., Tomidokoro, Y., Ikeda, Y., Watanabe, M., Kawarabayashi, T., Harigaya, Y., Okamoto, K., Maruyama, K., Castano, E.M., St George-Hyslop, P., and Shoji, M. Generation of amyloid beta protein from a presenilin-1 and betaAPP complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292, 571-578 (2002)
- 3: Hattori, C., Asai, M., Oma, Y., Kino, Y., Sasagawa, N., Saido, T.C., Maruyama, K., and Ishiura, S. BACE1 interacts with nicastrin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 1228-1232 (2002)

笠原 忠

- 1: Funakoshi, M., Sonoda, Y., Tago, K., Tominaga, S-I., and Kasahara, T. Differential involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and phosphatidyl inositol 3-kinase in the IL-1-mediated NF-kB and AP-1 activation. *Int. Immunopharmacol.* 1, 595-604 (2001)
- 2: Sonoda, Y., Yamamoto, D., Sakurai, S., Hasegawa, M., Yokota, E-A., Momoi, T. and Kasahara, T. FTY720, a novel immunosuppressive agent, induces apoptosis in human glioma cells. *BBRC* 281, 282-288, 2001
- 3: Funakoshi, M., Tago, K., Sonoda, Y., Tominaga, S-I., and Kasahara, T. A MEK inhibitor, PD98059 enhances IL-1-induced NF-kB activation by the enhanced and sustained degradation of Ikb α . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283, 248-253 (2001)
- 4: Mori, M., Terui, Y., Tanaka, M., Tomizuka, H., Mishima, Y., Ikeda, M., Kasahara, T., Uwai, M., Ueda, M., Inoue, R., Itoh, T., Yamada, M., Hayasawa, H., Furukawa, Y., Ishizaka, Y., Ozawa, K., Hatake, K. Antitumor effect of beta2-microglobulin in leukemic cell-bearing mice via apoptosis-inducing activity: activation of caspase-3 and nuclear factor-kappaB. *Cancer Res.* 61, 4414-4417 (2001)
- 5: Kasahara, T., and Matsushima, K. Macrophage signaling, apoptosis, lectins and leukocyte trafficking. *Trends Immunol.* 22, 593-4 (2001)
- 6: Tago, K., Funakoshi, M., Mano, H., Yanagisawa, K., Hayakawa, M., Kuroiwa, K., Iwahana, H., Kasahara, T., and Tominaga, S-I. Presence of a genistein-responsive inhibitory mechanism on interleukin1 α -induced NF-kB activation. *Eur. J. Biochem.* 268, 6526-33 (2001)

7. 知的所有権の所得状況

1) 特許所得

なし。

2) 実用新案登録

なし。

3) その他

なし。