

平成15年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

目 次

課題番号

<p>20030895A KH21009</p>	リン脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	西島正弘 …… 1
<p>896A KH21010</p>	低酸素センサーを介する虚血性および変性性神経疾患の機序解明と新規治療薬開発	芝崎 太 …… 6
<p>897A KH21011</p>	細胞内情報伝達分子を標的とした抗ウイルス剤および抗癌剤の開発	松田道行 …… 19
<p>898A KH21012</p>	抗動脈硬化性リポ蛋白質HDLの代謝制御機構	新井洋由 …… 25
<p>899A KH21013</p>	ゲノム修復と細胞分裂に関連する因子の構造機能解析と応用に関する研究	葛西正孝 …… 33
<p>900A KH21014</p>	難治性疼痛に関与するATP受容体の機能解析と医療への応用	井上和秀 …… 39
<p>901A KH21015</p>	動脈硬化症進展阻止のための血管内皮細胞特異的発現EDG受容体作働薬・拮抗薬の開発	望月直樹 …… 47
<p>902A KH21016</p>	天然物由来シグナル伝達制御物質の探索と創薬への応用に関する研究	上原至雅 …… 51
<p>903A KH21017</p>	肥満／糖尿病発症予防のためのターゲット遺伝子の同定と制御法の開発	江崎 治 …… 55
<p>904A KH21018</p>	ゲノム情報にもとづいた移植免疫抑制にかかわる遺伝子の検索と創薬への応用に関する研究	絵野沢 伸 …… 59
<p>905A KH21019</p>	神経・免疫・内分泌相関による生体防御機構の解明と創薬	田平 武 …… 62
<p>906A KH21020</p>	レクチン機能を利用した血管における生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 …… 67
<p>907A KH21021</p>	感染症に関連した免疫異常の解析と新規制御物質の開発	鈴木和男 …… 74
<p>908A KH21022</p>	自己免疫性膵炎発症に関連するIgG 4型抗体の認識する自己抗原の検索、ならびに特異的診断システムの開発	川 茂幸 …… 84
<p>909A KH21024</p>	動物細胞におけるラフト等の脂質膜ドメインを介した生体機能調節機構の解析と疾病関連因子探索への応用	北川隆之 …… 89
<p>910A KH21025</p>	新規サイトカインの炎症性疾患における役割の解析と創薬への応用	山越 智 …… 95
<p>911A KH21026</p>	マイクロアレイDNAチップを用いた各種病態関連発現遺伝子の解析	辻本豪三 …… 104
<p>912A KH21027</p>	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	桃井 隆 …… 111
<p>913A KH22071</p>	ウイルスの侵入および発芽過程を標的とした次世代抗インフルエンザ薬の開発	鈴木康夫 …… 118
<p>914A KH22072</p>	サイトカインシグナル制御分子による慢性関節リウマチの治療薬の開発	吉村昭彦 …… 121
<p>915A KH22073</p>	T細胞の活性化およびヘルパーT細胞サブセットの分化を特異的に制御する手法の樹立	宮武昌一郎 …… 125
<p>916A KH22082</p>	変異型HB-EGFノックインマウスによる循環器疾患の解析	目加田英輔 …… 133

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

主任研究者 桃井 隆

要旨

遺伝性（非遺伝性）神経変性疾患に共通する病変機構として変異蛋白、酸化ストレス、ミトコンドリアの機能不全が誘導する ER ストレスの可能性が示唆された。CEP1104 や ER ストレス細胞死を抑制する新規化合物の治療薬としての可能性が示唆された。

分担研究者

大阪大学大学院医学系研究科情報伝達医学
専攻機能形態学講座 内山 安男
大阪市立大学大学院医学研究科脳神経科学
講座 森 啓
自治医科大学小児科 山形 崇倫
国立水俣病研究センター 臼杵扶佐子
旭硝子（株）中央研究所 磯合 敦
（株）資生堂ライフサイエンス研究所
日比野利彦

A. 研究目的

蛋白のフォールディングの異常は小胞体（ER）ストレスを誘導し、過度のERストレスは細胞死を誘導する。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）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。また、ER associated degradation (ERAD)系のユビキチン/プロテアゾーム系で分解できなかった異常蛋白の蓄積がストレスシグナルとして細胞死を誘導することが明らかになっており、これら神経変性疾患とERストレス細胞死との関係が注目されている。一方、虚血、酸化ストレス、有機水銀、UV ストレスでもストレス

シグナルを介してアポトーシス、ネクローシス細胞死への関与が指摘されている。また、アポトーシスの実行をになう因子として知られているカスパーゼも様々なストレス刺激によりミトコンドリア、ERで活性化される。こうした様々なストレスシグナルに対し、カテプシン、プロテアゾーム、カスパーゼがクロストークし、あるいは独立にストレスに対応し、細胞死を誘導すると考えられるが、その分子機構は明らかでない。本研究はさまざまな遺伝性、非遺伝性（環境）ストレス刺激によるカスパーゼ依存性、非依存性の細胞死経路の相互作用について研究をおこない、特に酸化ストレス、ERストレスによる細胞死のシグナル伝達系を明らかにすることにより、細胞死の経路を直接阻害するのではなく、細胞死の経路の前で、すなわち、ストレスシグナルの発生を抑制し、シグナル伝達系を抑制する新たな創薬の可能性の探索を試みた。

B. 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

イ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、あるいはツニカマイシン処理を施した 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。

2) カスパーゼ 9, 12 の活性型抗体を用いた、酸化ストレス、ER ストレス細胞死阻害剤のスクリーニング

パーキンソン病、ポリグルタミン病をはじめとする神経変性疾患ではコンフォメーション異常がもたらす ER ストレス細胞死との関係が注目されている。一方、孤発例のパーキンソン病では酸化ストレスによるミトコンドリア細胞死経路の活性化が示唆されている。酸化ストレス、ER ストレス細胞死の実行に関与するカスパーゼ 9, 12 の活性化を指標として、作成したカスパーゼ 9, 12 の活性型に特異的な抗体による免疫染色法を用いて、約 10 万種の化合物をスクリーニングし、カスパーゼ 9, 12 の上流で細胞死を抑制する阻害剤を見出した。そのうちのひとつはツニカマイシンやポリグルタミン凝集などが誘導するカスパーゼ 12 の活性化を抑制し、細胞死を抑制した。

3) ポリグルタミン凝集が誘導するオートファジー形成の解析

オートファジーの検出には、LC3 抗体を用いたイムノプロット法 (12% SDS-アクリルアミドゲルにて泳動し、ニトロセルロースフィルターにブロッティングした。抗体と反応させた後、二次抗体としてアルカリホスファターゼ結合ヤギ抗ラビットイムノグロブリンを用い、発色液で反応させた) により解析を行った。EGFP-Tag を付加したポリグルタミンを導入した C2C5 細胞または ER ストレス誘導薬剤処理を施した C2C5 細胞を 2% パラホルムアルデヒドを含む PBS にて固定後、LC3 抗体を用いた免疫染色法を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

5) 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°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°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。

(倫理面での配慮)

本研究での動物実験は、ウサギを用いており、各研究施設にて設定されている動物取り扱いマニュアルに沿って行った。本研究で行う動物実験はいずれもカテゴリー A、B (下に明記) に属するものであり、実験に際しては、動物への恐怖感、苦痛をさけるため、エーテル麻酔下で行い、動物に対する倫理面での十分な配慮を行った。また、マウス各組織の採取に際しては、深いエーテル麻酔の無痛下で二度と覚せいしないよう、安楽死させてから行い、苦痛の無いように十分な配慮を行った。カテゴリー A：脊椎動物に対し全く苦痛や不快感を与えないと期待される実験あるいは瞬間的なわずかな苦痛、不快感しかおこさない処理。カテゴリー B：脊椎動物に対し限局的な短時間継続する軽いあるいは中程度の痛みを起す処置。

また、MELAS 細胞および組織実験については、分子生化学的、病理学的、遺伝学的診断と研究を共同して行い、診断と研究について家族に説明し、個人情報の倫理面を配慮した承諾書を用いて、すでに家族よりインフォームドコンセントを得ている。

C. 研究結果

1) ER ストレス細胞死 (桃井)

作製したカスパーゼ 12 の活性化型に対する抗体 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 を活性化しているところが明らかとなった。一方、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ことから、カスパーゼ 8 の活性化と ER ストレス細胞死との関係について解析したところ、ER ストレスによりカスパーゼ 12 の活性化以外にカスパーゼ 8 の活性化を介して、ミトコンドリア経路である 9、3 の活性化がおこることが明らかになった。このように、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。

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行った結果、ER ストレスを誘導するツニカマイシンやポリグルタミン凝集による細胞死を抑制する新規化合物を化合物ライブラリーから見い出すことができた (図 1)

2) プレセニン変異と細胞死 (森)

家族性アルツハイマー病の原因遺伝子として同定されたプレセニン 1 (PS1) は A β の細胞内代謝を明らかにする上で、最も重要な役割を担っているが、その変異による細胞死がアポトーシスであるという報告以来、プレセニン、A β 、細胞死の 3 者の関係が最重要な課題となってきた。原因遺伝子である PS1 と APP の変異による細胞内代謝異常とこれに関連するアポトーシスについて、マウスと培養細胞のレベルで検討した。野生型および変異型 PS1 を発現する PC12 神経細胞株を樹立した。変異による障害は小胞膜輸送過程でおこり、結果として A β によりカスパーゼ 3 を含む複数の細胞死の経路が活性化し、神経細胞死が誘導されることが示唆された。また動物モ

デルレベルでは培養細胞と異なった遅延性のアポトーシスによる細胞死が生じていることを見出した。今後は、個体老化という側面からの検証も視野に入れた解析も重要な方向性である。

3) ミトコンドリア機能不全と細胞死 (山形)

MELAS 筋細胞におけるグルコース欠乏条件下での細胞死は約 80% 異常の変異ミトコンドリア(mt)DNA を含むクローンにおいて誘導され、カスパーゼ 9-3 を介した細胞死経路が存在することが明らかとなった。ジクロル酢酸ナトリウムはグルコース欠乏による細胞死を抑制した。MELAS 解明における細胞死とその抑制系の検討は、治療を行なう上で必要不可欠であり、今回我々の用いた筋細胞クローンの実験系はその解明に有用であり、この細胞死の抑制系の検討は治療の可能性を見出すものと期待される。

4) 6-ヒドロキシドーパミン(6OHDA)が誘導する神経細胞死とリン酸化阻害剤 CEP11004 による抑制 (桃井)

6OHDA を投与したマウスでは TH 陽性神経細胞が選択的なアポトーティックな細胞死をしめすことから、パーキンソン病のモデル動物として用いることが可能である。JNK の活性化、カスパーゼ 9 の活性化を指標として解析したところ 6OHDA 投与により、TH 陽性の黒質神経細胞で JNK の活性化とカスパーゼ 9 の活性化をともなう細胞死が観察された。こうした 6OHDA で誘導された細胞死とカスパーゼ 9 の活性化は JNK の上流に位置する MLK の阻害剤である CEP11004 により抑制された (図 2)

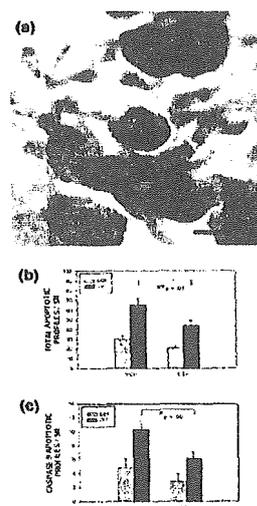


図2. 60HDA投与による黒質神経細胞のカスパーゼ9活性化と細胞死

カスパーゼ9の活性化型抗体と細胞死の形態を指標として解析したところ、60HDA投与により、黒質神経細胞でカスパーゼ9の活性化をともなう細胞死が観察された(A)。60HDAで誘導された細胞死(B)とカスパーゼ9の活性化(C)はJNKの上流に位置するMLKの阻害剤であるCEP11004により抑制された。

5) メチル水銀中毒症と細胞死(臼杵)

神経障害をひきおこすことが知られているメチル水銀は、高濃度ではネクローシスをおこすが低濃度ではアポトーシスを誘発する。メチル水銀の細胞毒性に酸化ストレス傷害が重要であることをモデル細胞系、メチル水銀中毒モデルラットを用いて明らかにしてきた。本研究ではメチル水銀曝露後早期に、酸化ストレスによるミトコンドリアエネルギー産生系の低下、ミトコンドリア機能の抑制が生じ、その後小胞体ストレスによるカスパーゼ12を介した細胞死が観察された。メチル水銀中毒モデルラットを用いた検討では、抗酸化剤のみではメチル水銀中毒を完全に抑制できないことから、酸化ストレスが引き金となって生じる、新たな生体ストレス応答、シグナル伝達活性化により、さらに細胞傷害が進んでいくと思われる。

6) 神経変性疾患とオートファジー形成(磯合、桃井)

神経変性疾患にみられる細胞死は、異常蛋白質のモノマーやオリゴマーが形成され、それをプロテアソームが分解するが、それでも異常蛋白質のモノマーやオリゴマーが蓄積してくるとVCPによる排出機能が低下し、ER内での蛋白蓄積がERストレスを引き起こし、それによりオートファジー形成が誘導され、凝集した異常蛋白質を分解しようとする。分解が間に合わず、さらに凝集形成が進行すると過度のERストレス状態になり、それにより、アポトーシスと平行してオートファジック細胞死が起こると考えられた。

7) 表皮におけるカスパーゼ14の活性化

正常表皮の角層ではほとんど全てのカスパーゼ-14が活性化されていることを明らかにした。しかしながら、通常の単層培養系ではいかなる分化刺激においても活性化は起こらず、

この変化は角層(角質細胞)形成に伴うものであることが示唆された。

しかし、ERストレス細胞死の機構は複雑であり、細胞によってはカスパーゼ12の活性化以外にカスパーゼ8の活性化がおり、Bidの活性化にともない、ミトコンドリア経路の活性化(チトクロームC/カスパーゼ9活性化)がおこることも明らかになった。

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PC12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。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かとなった。カテプシンDを欠損するマウスを用いて、hyoxia-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。

D. 考察

4-1) ER ストレス細胞死と神経変性疾患

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。しかし、ポリグルタミン凝集と 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 の活性化型に対する抗体 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 を活性化しているところが明らかとなった。西頭らは、ポリグルタミン凝集が ER ストレスを誘導し、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。ER ストレスを阻害する化合物のスクリーニングにして発見した新規化合物のひとつは ER ストレス細胞死のみならず、ポリグルタミン凝集による細胞死をも抑制した。今後この化合物の構造展開し、さまざまなコンフォメーション病に対する効果を検討するとともに、標的蛋白を同定し、細胞死抑制の分子機構を明らかにすることが重要である。

4-2) 酸化ストレスと神経変性疾患

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、パーキンソン病、メチル水銀中毒症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。

一方、60HDA によるパーキンソンモデル動物を用いて解析したところ、60HDA が誘導する JNK、カスパーゼ 9 の活性化を MLK の阻害剤である CEP11004 が抑制した。こうした結果から、酸化ストレスは MLK を活性化し、JNK を活性化し、ミトコンドリア経路であるカスパーゼ 9 を活性化することが示唆された。しかし、水銀中毒症ではミトコンドリア経路以外にも ER ストレス細胞死の実行に関与するカスパーゼ 12 が活性化することから、こうした酸化ストレスによるミトコンドリア細胞死の経路と ER ストレス細胞死の経路との接点が非常に重要であり、創薬の開発が望まれる。

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見出した。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。

E. 結論

1) ツニカマイシン、ポリグルタミン凝集などが誘導する細胞死の経路としてカスパー

ーゼ12以外にカスパーゼ8、9、3の経路が明らかになった。2) パーキンソン病のモデルとして、6-OHDAはMLK/JNKを介してミトコンドリア経路であるカスパーゼ9を活性化するが、MLKの阻害剤であるCEP1004はカスパーゼ9の活性化と細胞死を抑制し、神経変性疾患の治療に有効である。

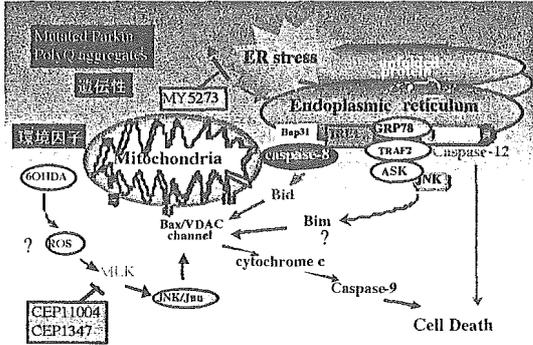


図2 神経変性疾患に見られる神経細胞死の機構と抑制剤

6. 研究発表

1. 論文発表

主任研究者

桃井 隆

- 1: Ganguly, A., Oo, T. F., Rzhetskaya, M., Pratt, R., Yarygina, O., Momoi, T., Kholodilov, N., Burke, R. E. CEP1004, a novel inhibitor of the mixed lineage kinases, suppresses apoptotic death in dopamine neurons of the substantia nigra induced by 6-hydroxydopamine. *J. Neurochem.* 2004, 88, 469-480.
- 2: Yoneda, K., Furukawa, T., Zheng, Y. J., Momoi, T., Izawa, I., Inagaki, M., Manabe, M., Inagak-I, N. An autocrine/paracrine loop linking keratin 14 aggregates to TNF α -mediated cytotoxicity in a keratinocyte model of epidermolysis bullosa simplex. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 7296-7303
- 3: Urase, K., Kouroku, Y., Fujita, E., Momoi, T., Region of caspase-3 activation and programmed cell death in the early development of the mouse forebrain. *Dev. Brain Res.* 2003, 145, 241-248.
- 4: Yamashita, T., Tonchev, A. B., Tsukada, T., Tada, M., Saido, T. C., Imajoh-Ohmi, S., Momoi, T., Kominami, E. Sustained Calpain Activation and Lysosomal Rupture Prevailing Apoptosis Cascade, Execute Necrosis of the Postischemic CA1 Neurons

in Primates. *Hippocampus* 2003, 13, 791-800.

- 5: Momoi, T., Fujita, E., Urase, K. Regionspecific caspase-3-dependent programmed cell death in the developing forebrain. *Neuroreport* 2003, 14, 111-115.
- 6: Jimbo, A., Fujita, E., Kouroku, Y., Ohnishi, J., Inohara, N., Kuida, K., Sakamaki, K., Yonehara, S., Momoi, T., ER stress induces caspase-8 activation stimulating the cytochrome c release and caspase-9 activation. *Exp. Cell Res.* 2003, 283, 156-166.

分担研究者
内山安男

- 1: koike, M., Shibata, M., Ohsawa, Y., Nakanishi, H., Koga, T., Kametaka, S., Waguri, S., Momoi, T., Kominami, E., Peters, C., Figura, K. von, Saftig, S., Uchiyama, Y. Involvement of two different cell death pathways in retinal atrophy of cathepsin D-deficient mice. *Mol. Cell. Neurosci.* 2003, 22 (2), 146-61
- 2: Ezaki, J., Takeda-Ezaki, M., Koike, M., Ohsawa, Y., Taka H., Mineki, R., Murayama, K., Uchiyama, Y., Ueno, T., Kominami, E. Characterization of Cln3p, the gene product responsible for juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis, as a lysosomal integral membrane glycoprotein. *J. Neurochem.* 2003, 87, 296-1308.
- 3: Kawane K, Fukuyama H, Yoshida H, Nagase H, Ohsawa Y, Uchiyama Y. Okada K, Iida T, Nagata S. Impaired thymic development in mouse embryos deficient in apoptotic DNA degradation. *Nat Immunol.* 2003, 4(2), 38-44
- 4: Shimamura, M., Morishita, R., Endoh, M., Oshima, K., Aoki, M., Waguri, S., vector Uchiyama, Y., Kaneda, Y. HVJ-envelope for gene transfer into central nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003, 300, 464-471.

森 啓

- 1: Mori, H., Tomomiyama, T., Maeda, N., Ozawa, K., Wakase, K., Lack of amyloid plaque formation in the central nervous system of a patient with Werner syndrome. *Neuropathology.* 2003, 23(1), 51-6.
- 2: Takuma, H., Arawaka, S., Mori, H. Isoform Changes of tau protein during development in various species. *Dev. Brain Res.* 2003, 142(2), 121-127.
- 3: Hebert, S. S., Godin, C., Tomiyama, T., Mori, H., Levesque, G. Dimerization of presenilin-1 in vivo: suggestion of novel regulatory mechanisms leading to

- higher order complexes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003, 301(1), 119-26.
- 4: Minami, M., Mizutani, T., Kawanishi, R., Suzuki, Y., Mori, H. Neuronal expression of α B crystallin in cerebral infarction. Acta Neuropathol. 2003, 105(6), 549-54.
- 5: Hashimoto, Y., Tomiyama, T., Yamano, Y., Mori, H. Mutation (D472Y) in the type 3 Repeat domain of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) affects its early vesicle trafficking in ER and induces apoptosis. Am J. Pathol. 2003, 163(1), 101-10.
- 6: Kametani, F., Usami, M., Tanaka, K., Kume, H., Mori, H. Mutant presenilin (A260V) Affect its Ra8 in PC12D cell Neurochem Int. 2004, 44(5), 313-20.
- 7: Kanemitsu, H., Tomiyama, T., Mori, H. Human neprilysin is capable of degrading amyloid β peptide not only in the monomeric form but also the pathological oligomeric form. Neurosci. Lett. 2003, 350, 113-6.
- 8: Uchihara, T., Nakamura, A., Nakayama, H., Arima, K., Mori, H., Mizushima, S. Three-dimensional analysis of cotton wool plaques triple-immunofluorolabeled with two rabbit polyclonal and a mouse monoclonal antibodies. J. Histochem Cytochemistry. 2003, 51(9), 1201-6.
- 9: Takuma, H., Tomiyama, T., Kuida, K., and Mori, H. Amyloid β peptide-induced cerebral neuronal loss is mediated by caspase-3 in vivo. J. Neuropathol Exp. 2004 (in press)

山形 崇倫

- 1: Aradhya, S., Woffendin, H., Bonnen, P., Heiss, NS., Yamagata, T., Esposito, T., Bardaro, T., Poustka, A., D'Urso, M., Kenwick, S., Nelson, DL. Physical and genetic characterization reveals a pseudogene, an evolutionary junction, and unstable Loci in distal Xq28. Genomics. 2002, 79, 31-40.

臼杵 扶佐子

- 1: Takeshita, Y., Sasagawa, N., Usuki, F., Ishiura, S. Decreased Expression of α B crystallin in C2C12 cells that express human DMPK/160 CTG repeats. Basic Appl. Myol. 2003, 13:305-308
- 2: Usuki F, Yasutake A, Umehara F Higuchi I. Beneficial effects of mild lifelong dietary restriction on skeletal muscle: prevention of age-related mitochondrial damage, morphological changes, and vulnerability to a chemical toxin. Acta Neuropathologica. 2004 (in press)

日比野利彦

- 1: Soma, T., Dohrmann, C. E., Hibino, T., Raftery, L. Profile of transforming growth factor- β responses during the murine hair cycle. J. Invest. Dermatol. 2003, 121, 969-975
- 2: Tsuji, Y., Soma, T., Denda, S., Raftery, L., Hibino, T. A potential suppressor of TGF- β delays catagen progression in hair follicles. J. Invest. Dermatol. Symposium Proceedings. 2003, 8, 65-68
- 3: Hibino, T., Nishiyama, T. Role of transforming growth factor- β 2 in the human hair cycle. (review article) J. Dermatol. Sci. 2003 (In press)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

平成15年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

平成16年9月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社