

RNA処理細胞。

これらの結果はMAO-Aが神経毒と結合部位であり、mPT poreを開口し細胞死を惹起する機能を持つ事を示している。

3) 酸化ストレスによる細胞死

MAO-Bを発現させたSH-SY5Y細胞では、ドパミン等のアミンを酸化し水酸化ラジカルを生成する。一方MAO-Aのみを発現している細胞ではドパミンは非酵素的に自動酸化されスーパーオキシドを産生する。このROS生成によりMitの細胞死シグナルが活性化する機序が明らかとなった。即ちドパミンから生成したROSによりMit 内膜の透過性が増加し、Mitが膨張しcytochrome cの細胞質への流出が起り、caspaseの活性化によりアポトーシスが惹起される。同時に膜電位とMitのSH基が減少し、Mit呼吸鎖酵素系特にComplex Iはドパミンキノンにより修飾されquinoproteinとなり活性が低下した。

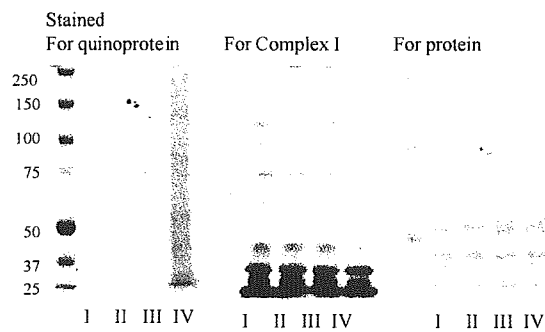


図 3。ドパミンの酸化によりMit complex I にdopaminequinoneとquinoproteinを生成する。単離したMit (I)をneuromelanin (II), Dopamine melanin (III), dopamine (IV)と3時間反応した。Quinoproteinは nitroblue tetrazolium-glycine法により検出した。Complex Iは抗Complex I 抗体で、タンパクはProceau Sにより染色した。

この酸化ストレスによる細胞死シグナルの活性化はアスコルビン酸、カタラーゼ等の抗

酸化剤とN-methyl-male- imide等のSH基修飾剤により阻止された。Bcl-2を過剰発現させたSH-SY5Y細胞では $\Delta\Psi_m$ の低下は認められたが、SH基の修飾とcomplex Iのquinoprotein形成と活性低下は認められずcytochrome cの流出とcaspaseの活性化は見られず、アポトーシスは阻止された。また。

4) Propargylamine による細胞保護

Rasagiline誘導体の構造活性相関の研究からpropargyl基が抗アポトーシス活性に必修であった最近N-propargyl-amineが保護活性を持つ事を証明した。

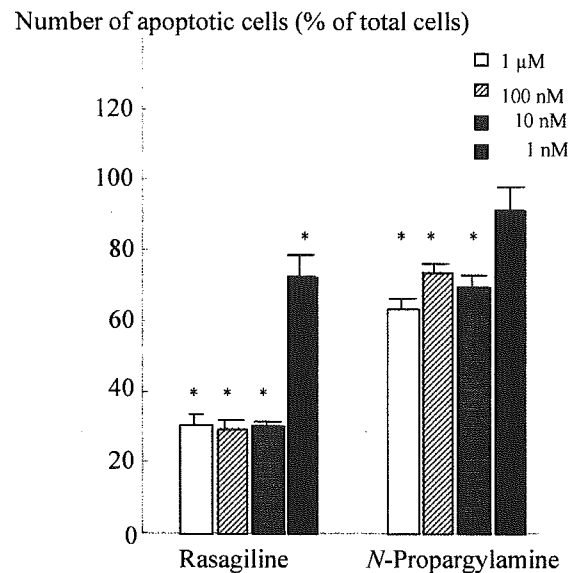


図 4。RasagilineとN-propargylamineによる抗アポトーシス作用。SH-SY5Y細胞を1 μM-1 nMのRasagiline, N-propargylamineの存在下MMRSal (250 μM)と24時間反応後、PI-FACS法でアポトーシスを示す細胞を定量した。

PropargylamineはMAO-Bの基質結合性部位に結合しMAO活性を阻害し、アミンの酸化を阻害しROSの生成を阻害する。また直接Mitの細胞死機構に作用しmPT poreの開口を抑制する事が明らかとなった。即ちMAO-Bの阻害活性を持つpropargylamine (rasagiline, depre

nyl等)はBcl-2と同様のアポトーシス制御作用を持ち、Mit内膜の透過性が増加し膨張するのを阻止することでcytochrome cが細胞質に流出しcaspaseを活性化する事を阻害した。

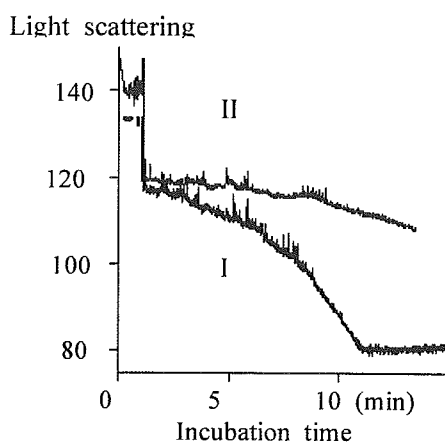


図 5。Rasagiline はNMRSalによるMitの膨張を阻止する。ラット肝臓から調製したMitの容積の変化を光散乱で測定した。I: NMRSal (250  $\mu$ M), II\* rasagiline (25  $\mu$ M) + NMRSal

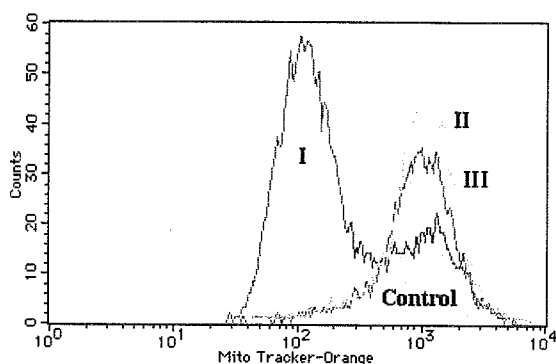


図 6。N-Propargylamine はNMRSalによる $\Delta\Psi_m$ の低下を阻止する。I: NMRSal (250  $\mu$ M)は端

離したMitの $\Delta\Psi_m$ を著明に下げた。II: N-propargylamine (1  $\mu$ M)はこれを防いだ。III: Mit には直接影響しない。

今回の結果はMitにおける細胞死機構にMAOが関与している事を示している。特にMAO-Bが従来云われて来たMAO活性を阻害する事により酸化ストレスの増加を阻止するだけでなく、直接mPTP poreの開口を調節していることを証明した。この結果から最も有効な神経保護活性を持つと現在考えられるrasagiline等の作用機序に全く新たな観点を得られた。またこの作用機序の検討により神経保護剤の活性を定量的に検討する方法が確立した。今後全く新しい構造を持つ神経保護剤をデザインすることが可能と成るであろう。

ミトコンドリアにおける細胞死シグナルの解析から外膜の存在するモノアミン酸化酵素の関与が明らかとなった。A型モノアミン酸化酵素が細胞死誘発の始点である一方、B型酵素が細胞死を阻止する機能をもつことが証明された。この基礎的な結果から既に一部臨床で試みられているRasagiline等の神経保護剤の作用機序が明らかとなってきた。

## F. 研究発表

### 2. 論文発表

- 1) Yi H, Maruyama W, Akao Y, Takahashi T, Iwasa K, Youdim MBH, Naoi M. (2006) N-Propargylamine protects SH-SY5Y cells from apoptosis induced by an endogenous neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol, through

stabilization of mitochondrial membrane and induction of anti-apoptotic Bcl-2. J. Neural Transm.113(1) 21-32

- 2) Yi H, Akao Y, Maruyama W, Chen K, Shih J, Naoi M. (2006) Type A monoamine oxidase is the target of an endogenous dopaminergic neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol, leading

- to apoptosis in SH-SY5Y cells. *J. Neurochem.* 96 (2) 541-549
- 3) Naoi M, Maruyama W, Shamoto-Nagai M, Yi H, Akao Y, Tanaka M. (2005) Oxidative stress in mitochondria: Decision to survival and death of neurons in neurodegenerative disorders. *Mol. Neurobiol.* 31 (1-3) 81-93.
  - 4) Shamoto-Nagai M, Maruyama W, Yi H, Akao Y, Tribl F, Gerlach M, Osawa T, Riederer p, Naoi M. (2006) Neuromelanin induces oxidative stress in mitochondria through release of iron: mechanism behind the inhibition of 26S proteasome. *J. Neural Transm.* In press.
  - 5) Matsumoto K, Akao Y, Hi Y, Shamoto-nagai M, Maruyama W, Naoi M. (2006) Overexpression of amyloid precursor protein induces susceptibility to oxidative stress in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J. Neural Transm.* In press.
  - 6) Youdim MBH, Maruyama W, Naoi M. (2005) Neuropharmacological, neuroprotective and amyloid precursor processing properties of selective MAO-B inhibitor antiparkinsonian drug, rasagiline. *Drugs of Today* 41 (6) 369-391
  - 7) Nakagawa Y, Iinuma M, Matuura N, Yi H, Naoi M, Nakayama T, Nozawa T, Akao Y. (2005) A potent apoptosis-inducing activity of a Sesquiterpene lactone arucanolide, in HL60 cells: a crucial role of apoptosis-inducing factor. *J. Pharmacol. Sci.* 97 (2) 242-252
  - 8) Naoi M, Maruyama W, Shamoto-Nagai M, Kato Y, Tanaka M. (2005) Oxidative stress in mitochondrial: The involvement in neurodegenerative diseases. In: *Oxidative Stress, Inflammation and Health*, Surh Y-J. and Packer L. (eds) MerceL Dekker, New York, 423-444
  - 9) Maruyama W, Akao Y, Nitta A, Naoi M. (2005) Neuroprotection by rasagiline, *N*-propargyl-1*R*(+)- aminoindan, and related propargylamines is mediated by suppression of mitochondrial death signal and induction of anti-apoptotic genes. In: *Oxidative Stress, Inflammation and Health*, Surh Y-J. and Packer L. (eds) MerceL Dekker, New York, 609-630
  - 10) Youdim MBH, Bar Am O, YogeV-Falach M, Weinreb O, Maruyama W, Naoi M, Amit T. (2005) Rasagiline: Neurodegeneration, neuroprotection, and mitochondrial permeability transition. *J. Neurosci. Res.* 79 (1-2) 172-179.
  - 11) Naoi M, Maruyama W, Nagy GM (2004) Dopamine-derived salsolinol derivatives as endogenous monoamine oxidase inhibitors: Occurrence, metabolism and function in human brains. *NeuroToxicol.* 25 (1-2) 193-204.
  - 12) Maruyama W, Nitta A, Shamoto-Nagai M, Hirata Y, Akao Y, Youdim M, Furukawa S, Nabeshima T, Naoi M. (2004) *N*-Propargyl-1(*R*)-aminoindan, rasagiline, increases glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in neuroblastoma SH-SY5Y cells through activation of NF-kappaB transcription factor. *Neurochem. Int.* 44 (6) 393-400.

- 13) Maruyama W, Yi H, Takahashi T, Shimazu S, Ohde H, Yoneda K, Iwasa K, Naoi M. (2004) Neuroprotective function of *R*-(-)-(benzofuran-2-yl)-2-propylamino-pentane, [*R*-(-)-BPAP], against apoptosis induced by *N*-methyl(*R*)salsolinol, an endogenous dopaminergic neurotoxin, in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Life Sci.* 75 (1) 107-117.
- 14) Shamoto-Nagai M, Maruyama W, Akao Y, Osawa T, Tribl F, Gerlach M, Zucca FA, Zecca L, Riederer P, Naoi M. (2004) Neuromelanin inhibits enzymatic activity of 26S proteasome in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *J. Neural Transm.* 111(10-11) 1253-1265.
- 15) . Akao Y, Seki N, Nakagawa Y, Yi H, Matsumoto K, Ito Y, Ito K, Funaoka M, Maruyama W, Naoi M, Nozawa Y. (2004) A highly bioactive lignophenol derivative from bamboo lignin exhibits a potent activity to suppress apoptosis induced by oxidative stress in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Bioorg. Med. Chem.* 12 (18) 4791-4801.
- 16) Naoi M, Maruyama W. (2004) Monoamine oxidase and the inhibitors: Involvement in cell death and survival of neurons. In: *Monoamine Oxidase inhibitors and their role in neurotransmission (drug development)* Török TL, Klebovich I. (eds), Medicina Publishing House, Budapest, 177-193..
- 17) 直井信、丸山和佳子 (2004) 神経毒によるパーキンソン病モデル：細胞死機序の解明と神経保護薬の開発，*脳の科学 増刊「パーキンソン病のすべて」* 26:157-164.
- 18) 丸山和佳子、直井信 (2004) 神経保護薬、内科 93: 709-712
- 19) 丸山和佳子、直井信 (2004) Parkinson 病の発症機序-Up date, *医学のあゆみ*, 208: 477-481
- 20) 丸山和佳子、永井雅代、直井信(2004) 弧発性パーキンソン病におけるドパミン神経選択的細胞死の機序：酸化ストレスとプロテアソーム機能障害を結ぶもの *Prog. Med.* 24: 3054-3058
3. 学会発表
- 1) Naoi M. Possible role of salsolinol and Parkinson's disease. "Dopamine Oxidation and Parkinson's disease" SFN Satellite Meeting, November 11, 2005, Washington DC, USA
- 2) Maruyama W, Shamoto-Nagai M, Yi H, Riederer P, Naoi M. Neuromelanin inhibits 6S proteasome in dopamine neurons via increased oxidative stress in mitochondria by released iron. 9<sup>th</sup> International Symposium on Parkinson Research, November 9-11, 2005, Washington DC, USA
- 3) Naoi M, Maruyama W, Yi H. Dopamine and dopamine quinone activate apoptotic signaling in mitochondria by different mechanisms. 35<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Neuroscience (SFN), November 12-16, 2005, Washington DC, USA

- 4) Maruyama W, Shamoto-Nagai M, Zecca L, Riederer P, Naoi M. Neuromelanin induces mitochondrial dysfunction and neuronal cell death: relevance to the pathogenesis of Parkinson's disease. 35<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Neuroscience (SFN), November 12-16, 2005, Washington DC, USA
- 5) Naoi M, Maruyama W, Shamoto-Nagai M, Yi H, Zecca L. Mechanism underlying cytotoxicity of neuromelanin and dopamine-quinone: Involvement in pathogenesis of Parkinson's disease. 19<sup>th</sup> International Pigment Cell Conference, "A Focus on Human Pigmentary Disease", September 18-22, 2005, Reston, Virginia, USA
- 6) Naoi M, Maruyama W, Nitta M, Nagai-Shamoto M, Youdim M. Propargylamines increase neurotrophic factors, GDNF and BDNF: Analyses of the CSF from parkinsonian patients and studies on cellular and animal models. 16<sup>th</sup> International Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders. June 5-9, 2005, Berlin, Germany
- 7) Maruyama W, Naoi M. The effect of neuromelanin on the proteasome activity in human dopaminergic SH-SY5Y cells. 6<sup>th</sup> International Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders. June 5-9, 2005, Berlin, Germany
- 8) Yi H, Akao Y, Maruyama W, Nagai-Shamoto M, Naoi M. Dopamine induces apoptosis through generation of superoxide and quinone. 6<sup>th</sup> International Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders. June 5-9, 2005, Berlin, Germany
- 9) Nagai M, Maruyama W, Naoi M, Zecca L, Riederer P. Neuromelanin inhibits the proteasome activity through increased oxidative stress. 6<sup>th</sup> International Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders. June 5-9, 2005, Berlin, Germany
- 10) Naoi M, Akao Y, Maruyama W. Dopamine induces apoptosis through generation of superoxide and quinone. 78 回日本生化学会大会 2005年10月19—23日、神戸
- 11) Maruyama W, Shamoto-Nagai M, Naoi M. Neuromelanin induces mitochondrial dysfunction and neuronal cell death through oxidative stress by released iron. 78 回日本生化学会大会 2005年10月19—23日、神戸
- 12) 丸山和佳子、直井信 ニューロメラニンは鉄の放出を介して 26S プロテアソームを阻害する。第5回パーキンソン病フォーラム、2005年8月27日、浦安
- 13) 丸山和佳子 直井信 蛋白質の酸化アルデヒド修飾はパーキンソン病の病因に關与する 第46回日本神経学総会、2005年5月25-27日、鹿児島
- 14) 丸山和佳子、直井信 パーキンソン病における Propargylamine 化合物による

- 神経保護療法：作用機序の解明と臨床応用の可能性 第13回カテコールアミンと神経疾患研究会、2005年4月23日、東京
- 15) Maruyama W, Shamoto-Nagai M, Naoi M. Role of mitochondrial dysfunction and oxidative modification of protein in neurodegeneration of Parkinson's disease. 34<sup>th</sup> Annual Meeting, Society for Neuroscience, October 23, 2004, San Diego, USA
- 16) Naoi M, Maruyama W, Yi H, Shih JC, Chen K. Monoamine oxidase type A is the site to decide cell death and survival. 34<sup>th</sup> Annual Meeting, Society for Neuroscience, October 24, 2004, San Diego, USA
- 17) Naoi M, Maruyama W, Yi H, Akao Y, Chen K, Shih JC Type A monoamine oxidase determines cell death and survival, 11<sup>th</sup> Amine Oxidase Workshop, "Amine Oxidases: Function and Dysfunction", July 25-29, 2004, St. Andrews, Scotland
- 18) Maruyama W, Shamoto-Nagai M, Youdim MBH, Naoi M. Propargylamines protect neuronal cell death through induction of neuroprotective proteins, 11<sup>th</sup> Amine Oxidase Workshop, "Amine Oxidases: Function and Dysfunction", July 25-29, 2004, St. Andrews, Scotland
- 19) Naoi M, Maruyama W, Yi H, Shamoto-Nagai, Akao Y. Oxidative stress in mitochondrial: Decision to survival and death of neurons in neurodegeneration, ISN Satellite Meeting, "Oxidative Stress in Neurodegenerative Disorders", February 7-11, 2004, Guilin, China, p. 28-29.
- 20) Yi H, Maruyama W, Akao Y, Naoi M. Induction of cell death by peroxynitrite: the intracellular mechanism and regulation, ISN Satellite Meeting, "Oxidative Stress in Neurodegenerative Disorders", February 7-11, 2004, Guilin, China. P. 62-64.
- 21) Maruyama W, Nitta A, Nagai-Shamoto M, Naoi M. Mechanism behind neuroprotection by propargylamines. Neuro 2004, September 21-23, 2004, 大阪
- 22) Naoi M, Maruyama W, Nagai-Shamoto M. Involvement of neuromelanin in selective vulnerability of dopamine neurons in Parkinson's disease. Neuro 2004, September 21-23, 2004, 大阪
- 23) Shamoto-Nagai M, Maruyama W, Isobe K, Akao Y, Osawa T, Naoi M. neuromelanin inhibits enzymatic activity of 26S proteasome in dopaminergic SH-SY5Y cells; Involvement in Parkinson's disease. 77回 日本生化学会大会 2004年10月13-16日、横浜
- 24) Maruyama W, Nagai M, Nitta A, Naoi M. Intracellular mechanism of neuroprotection by rasagiline an anti-Parkinson drug 77回 日本生化学会大会、2004年10月13-16日、横浜
- 25) 丸山和佳子、直井信 パーキンソン病のプロテアソーム障害における酸化修飾タンパクの関与 第45回日本神経学会総会、平成16年5月11-14日、東京

- 26) 直井信、丸山和佳子 経口投与可能な  
神経保護薬 rasagiline の作用機序の検討  
第 45 回日本神経学会総会、平成 16 年 5  
月 11-14 日、東京
- 27) 丸山和佳子、永井雅代、直井信 弧発  
性パーキンソン病におけるドパミン神  
経選択的細胞死の機序：酸化ストレス  
とプロテアソーム機能障害を結ぶもの  
第 12 回カテコールアミンと神経疾患  
研究会、平成 17 年 4 月 17 日、東京

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

厚生科学研究補助金（痴呆・骨折研究推進事業）

分担研究報告書

### アミロイド $\beta$ 蛋白産生の分子機構

分担研究者 駒野 宏人 国立長寿医療センター研究所 アルツハイマー病研究部室長

研究要旨： アルツハイマー病ではアミロイド蛋白（ $A\beta$ ）の脳内蓄積機構の解明が重要な課題となっている。しかしながら、 $A\beta$ 産生機構について未だ不明な点が多い。 $A\beta$ はアミロイド前駆体蛋白APPから $\beta$ セクレターゼと $\gamma$ セクレターゼと呼ばれるプロテアーゼによってそれぞれ生成される。このうち、 $\gamma$ セクレターゼについては、家族性アルツハイマー病原因遺伝子翻訳産物プレセニリン(PS)を含む複合体が担う、新しいタイプのプロテアーゼであることが明らかとなってきた。しかしながら、 $\gamma$ セクレターゼの活性調節機構の詳細は不明である。我々は、 $A\beta$ 産生機構を明らかにするため、今年度は、セクレターゼを担うPSの活性制御ドメインを解析した。その結果、PSのTM 8 領域およびC末端領域が $\gamma$ セクレターゼ活性をもつPS複合体形成に必要なPSドメインであること、また、このドメインがPS複合体構成因子APH-1およびニカストリンとの結合に関与していることを明かにした。



## A. 研究目的

アルツハイマー病ではアミロイド蛋白 ( $A\beta$ ) の脳内蓄積機構の解明が重要な課題となっている。しかしながら、 $A\beta$ 産生機構について未だ不明な点が多い。 $A\beta$ はアミロイド前駆体蛋白APPから $\beta$ セクレターゼと $\gamma$ セクレターゼと呼ばれるプロテアーゼによってそれぞれ生成される。 $\beta$ セクレターゼは、新規の膜結合型アスパラギン酸プロテアーゼであることが明らかとなった。一方、 $\gamma$ セクレターゼについては、家族性アルツハイマー病原因遺伝子翻訳産物プレセニリンを含む複合体が担う、これまでにない新しいタイプのプロテアーゼであることが明らかとなってきた。しかしながら、 $\gamma$ セクレターゼの活性調節機構の詳細は不明である。本研究は、 $A\beta$ 産生制御機構の解析と神経保護薬Rasagiline類の $A\beta$ 産生系に及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。

今年度、PS断片の共発現による $\gamma$ セクレターゼ複合体の再構成系を確立し、これを用いてPS内の活性制御ドメインとその役割を明らかにすることを目的とした。

また、AD危険因子として知られているホモシステインについて、Rasagiline類が抑制的に作用するか否かを知るため、まず、ホモシステインの神経細胞の $A\beta$ 産生に及ぼす作用も併せて解析した。

## B. 研究方法

PS複合体構成因子、PEN-2、APH-1、nicastirin は、PCR法によって単離した。レトロウイルスベクターを用いて、PS複合体構成因子の遺伝子を線維芽細胞に導入し、細胞の $A\beta$ 産生に及ぼすこれら遺伝子の影響を解析した。 $A\beta$ の測定は、ELISA法で定量した。遺伝子発現解析は、この遺伝子がコードする蛋白に対する特異抗体を用いてイムノブロット法により行った。また、用いた神経細胞は妊娠マウス17日目の胎児マウスより調整した。

(倫理面への配慮)

本研究で行われた動物実験は、愛護と苦痛の防止に留意し、胎児マウス摘出の際は、適切な麻酔処理を行った。

## C. 研究結果

$\gamma$ セクレターゼ活性に必要なPS複合体の構成因子として、PS以外に、APH-1、ニカストリン(NCT)、PEN-2と命名された膜蛋白が同定されている。しかしながら、細胞中にあるPSのうち、活性をもつPSはわずか数10%であろうと考えられており、その活性制御機構は不明な点が多い。分担研究者は、PS複合体形成機構を解析するため、C末端配列のないPS1断片と、PS1のC末端領域断片とを共発現させることによって、 $\gamma$ セクレターゼ活性を再構成する系を確立した。この系を使って、活性制御に必要なPSドメインを明かにし、その領域と構成因子との結合性との関連を解析した。その結果、PS1の第8膜貫通領域(TM8)を含むC末端68アミノ酸からなる領域(C68)が、ニカストリンおよびAPH-1との結合に関与し、活性型PS複合体を形成するために必要な部位であることが明らかとなった。さらに、C68のうち、膜領域とC末端側7アミノ酸配列部位が、複合体形成に必要な不可欠な領域であることが明らかとなった。

また、AD危険因子として知られているホモシステインについて、Rasagilineが抑制的に作用するか否かを知るため、まず、ホモシステインの初代培養神経細胞の $A\beta$ 産生に及ぼす影響を解析した。その結果、ホモシステインは、1mM濃度で神経細胞死をひきおこし、その結果として $A\beta$ 産生が減少することが明らかとなった。

## D. 考察

PS断片による $\gamma$ セクレターゼ活性の再構成実験から、PSは、TM8およびC末端配列を介してニカストリンとAPH-1と結合し、 $\gamma$ セクレターゼ活性を持つPS複合体を形成していると思われる。したがって、PSのTM8領域やC末端配列と構造が類似したペプチドや

化合物が、PS複合体形成を阻害しA $\beta$ 産生を抑制できる薬剤となりうる可能性が考えられた。

一方、昨年度、神経保護薬、RasagilineおよびTV33261は、弱いA $\beta$ 産生阻害効果（20%程度）が認められたことを報告したが、今年度、Rasagilinについて、AD治療薬としての有効性を見出すため、AD危険因子として知られているホモシステインに着目した。まず、ホモシステインの神経細胞のA $\beta$ 産生に及ぼす影響を解析した結果、ホモシステイン処理は、神経細胞死をひきおこし、A $\beta$ 産生は著しく減少した。したがって、AD危険因子として知られているホモシステインは、A $\beta$ 産生に影響を与えるのではなく、神経細胞死をひきおこし、そのためAD危険因子となっていることが示唆された。したがって、神経保護薬であるRasagilinが、ホモシステインによってひきおこされる神経細胞死に対し抑制的に作用する可能性が考えられる。

#### E. 結論

PS複合体は、PSのTM 8 領域およびC末端配列を介してニカストリンとAPH-1と結合し、 $\gamma$ セクレターゼ活性を持つPS複合体を形成していることが明らかとなった。このことより、PSのTM 8 領域やC末端配列と構造が類似したペプチドや化合物がA $\beta$ 産生阻害剤となりうる可能性が考えられた。

また、神経保護薬、RasagilineおよびTV33261については、昨年度の結果から、これら薬剤は、あまり顕著なA $\beta$ 産生阻害効果があることが認められなかった。ただし、今年度の結果からAD危険因子として知られている高ホモシステイン血症は、A $\beta$ 産生に影響を与えるのではなく、神経細胞死をひきおこし、そのためAD危険因子となっていると考えられた。したがって、神経保護薬であるRasagilinは、高ホモシステイン血症によってひきおこされるAD治療に対し有効である可能性が考えられた。

F. 健康危険情報 該当なし。

G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Nakaya Y., Yamane T., Shiraishi H., Matsubara E., Wang H.-Q., Sato T., Wang R., De Strooper B., Shoji M., Komano H., Yanagisawa K., Ihara Y., Paul E. Fraser P.E., St George-Hyslop P., and Nishimura M.

Random mutagenesis of Presenilin 1 identifies novel mutants exclusively generating longer Amyloid  $\beta$  peptides

J. Biol. Chem. 280:19070-19077, 2005

Shiraishi H., Marutani T., Wang H.-Q., Maeda Y., Kurono Y., Takashima A., Araki W., Nishimura M., Yanagisawa K., and Komano H.

Reconstitution of  $\gamma$ -secretase by truncated presenilin (PS) fragments revealed that PS C-terminal transmembrane domain is critical for formation of  $\gamma$ -secretase complex

Genes to Cells 11:83-93, 2006

Nogalska A., Engel W.K., McFerrin J., Kokame K., Komano H., and Askanas V.

Homocysteine-induced endoplasmic reticulum protein (Herp) is up-regulated in sporadic inclusion-body myositis and in endoplasmic reticulum stress-induced cultured human muscle fibers

J. Neurochem. 96: 1491-1499, 2006

Araki W., Saito S., Takahashi-Sasaki N., Shiraishi H., Komano H., and Murayama K.S.

Characterization of APH-1 mutants with a disrupted transmembrane GxxxG motif

J. Mol. Neurosci. 印刷中 2006

#### 2. 学会発表

駒野宏人

Effects of homocysteine on amyloid

$\beta$ -protein generation

第48回日本神経化学会大会シンポジウム「アルツハイマー病発症の危険因子と防御因子-予防と創薬への展開」2005年9月28日 福岡

丸谷寿裕、白石博久、王華芹、荒木亘、西村正樹、柳澤勝彦、駒野宏人

Characterization of  $\gamma$ -secretase complex reconstituted by truncated presenilin fragments

第48回日本神経化学会大会 2005年9月28日 福岡

鄒 鶴、白石博久、高 美姫、キョウ建生、于 文新、駒野宏人、柳澤勝彦、道川 誠

Deficiency in presenilin-1 and -2 alters overall glycosylation of membrane

proteins in fibroblasts: protein specific up or down regulated maturation by presenilin-1 and -2.

第48回日本神経化学会 2005年9月28日 福岡

丸谷寿裕、白石博久、王華芹、荒木亘、西村正樹、柳澤勝彦、駒野宏人

Analysis of active  $\gamma$ -secretase complex reconstituted by truncated presenilin (PS) fragments

第78回日本生化学会大会 2005年10月22日 神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む） なし

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究）  
分担研究報告書

疎水性ジペプチドのGDNF産生機構および神経保護作用について

分担研究者： 新田淳美<sup>1</sup>

研究協力者： Xiaobo Cen<sup>1</sup>、大谷 晋<sup>1</sup>、丹羽美苗<sup>1</sup>、鈴木麻紀子<sup>2</sup>、斉藤邦明<sup>2</sup>、清島 満<sup>2</sup>、  
野田幸裕<sup>3</sup>、鍋島俊隆<sup>1</sup>

<sup>1</sup>名古屋大学大学院医学系研究科医療薬学・附属病院薬剤部

<sup>2</sup>岐阜大学大学院医学研究科・病態情報解析医学

<sup>3</sup>名城大学薬学部病態解析学教室

---

疎水性ジペプチドのLeu-Ileは、グリア細胞株由来神経栄養因子（glial cell line-derived neurotrophic factor; GDNF）や脳由来神経栄養因子（brain-derived neurotrophic factor; BDNF）の産生を誘導する低分子化合物として見出された。しかし、その神経栄養因子誘導作用や神経保護作用のメカニズムについては、まったくわかっていない。昨年度までに、Leu-IleがHsc70と結合することを明らかにしたが、今年度は、その下流についての検討を行った。その結果、AktやCREBの活性調節を介して、Leu-Ileが神経保護作用やGDNF産生誘導作用を有することを明らかとなった。

---

## A. 研究目的

GDNFは、胎児中胚葉由来ドーパミン作動性神経を始め運動神経細胞、海馬神経細胞、大脳皮質神経細胞などに対して保護作用を持ち(Lin et al., 1993; Wang et al., 1997)、パーキンソン病や脊髄損傷の治療薬としての応用も期待されている。

昨年度の本研究では、パーキンソン病や脊髄損傷などの治療への応用が期待されているGDNFを産生誘導することができるLeu-Ileの作用点や作用機序を調べるために、Leu-Ileの脳内結合タンパク質を同定した。その結果、Leu-IleはHsc70と結合することを明らかにした。しかし、Leu-IleとHsc70が結合することによって、どのような神経伝達がおこり、転写調節がなされた結果、神経保護効果やGDNF産生誘導作用が生じているのかは解明されていなかった。そこで、本年は、神経細胞においてLeu-IleがHsc70に結合した後、どのようなメカニズムを経て、神経保護およびGDNF産生誘導作用に結びつかを検討した。

## B. 方法

### 1、動物

実験には、7週齢ICR雄性マウスまたは17

日齢の胎仔ラット（日本SLC、静岡）を使用した。なお、本研究は名古屋大学医学部動物実験指針およびPrinciples of Laboratory Animal Care (National Institutes of Health Publication 85-23, 1985) に基づいて行った。

### 2、試薬等

Leu-Ile等の疎水性ジペプチドは国産化学（日本、東京）から購入した。FK506は、アステラス薬品株式会社（日本、東京）から恵与された。抗Hsc70、Hsp90、pAkt、Akt、pCREB、CREB、ERK1/2、pERK1/2、pCaMKII $\alpha$  $\beta$ 、pP38MAPK、pSARK/JNK、MAPK 抗体は cell signaling 社（Beverly, MA）のものを使用した。抗PKC、c-Src、actin抗体は、Santa Cruz Biotechnology社製のものを使用した。抗Hsc70抗体および組み換え型Hsc70は、Stressgen Biotechnology社から購入した。抗GDNF抗体は、R&D System から購入した。抗GFAP抗体は、Chemicon社製を用いた。その他の試薬は研究用特級グレードのものを使用した。

### 3、ラット海馬神経細胞初代培養

ラット海馬神経細胞初代培養には、胎生期17日齢の胎子を用い、既報にしたがって行った (Nitta et al 2004)。

4、Leu-Ileの細胞膜透過性について  
さまざまな濃度のFITC標識したLeu-Ileをラット海馬神経細胞初代培養細胞に作用させ

5、免疫沈降  
それぞれの条件で神経細胞の培養を行い、その細胞を粉砕後、タンパク量で500  $\mu$ gを抗Hsp90抗体と反応させた後、プロテインAと結合させた。

6、CREBのアンチセンスオリゴヌクレオチド  
CREBのアンチセンスおよびセンスオリゴヌクレオチドは、それぞれ 5' -GCTCCAGATCCA TGTCAT-3'、  
5' -ATGACCATGGACTCTGGAGC-3' とした。

7、pCREBとCREBの結合活性測定  
BD Trans Factor Extraction Kit を用いて、培養神経細胞の核画分を分離した。pCREB/CREB Transcription Factor Assay Kit でpCREBとCREBの結合活性を測定した

## C. 結果

1、Leu-Ileの膜透過性  
FITCを標識したLeu-Ileは、濃度依存および時間依存的に細胞質に取り込まれた (Figure 1)。FITCそのものも細胞膜を透過したが、Leu-Ileに結合したFITCのほうが透過度は有意に高かった。FITCを標識したLeu-Ileの細胞内移動が特異的なものかどうかを検討するために、過剰量のLeu-IleをFITC-Leu-Ileと共に加えた。FITC-Leu-Ileの細胞内への取り込みは過剰量のLeu-Ileによって阻害された (Figure 1)。

2、Leu-IleによるAktの活性化  
Leu-Ileによって活性化されるシグナル伝達物質を明らかにするために、Leu-Ileで刺激した培養神経細胞について、c-Src、p38MAPK、SARK/JNKおよびAktの活性化について検討を行った (Figure 2)。Leu-Ile (10  $\mu$ g/ml) 作用後20および30分後にAktは、活性化さ

て、検討を行った。FITC標識したLeu-Ileと培養神経細胞を37°Cでインキュベーションを行い、PBSで洗浄をした後、細胞を超音波粉砕し、遠心後、上清中の蛍光 (励起および吸収波長は、それぞれ485および518nm) を測定した。

れたが、他の因子は、変化は観察されなかった。また、Hsp90、Hsc70およびHsc70の発現量も変化にも観察されなかった。

3、Hsp90によって調節されているLeu-IleによるAktの活性化

Hsp90の阻害剤であるゲルダラマイシン (10  $\mu$ M) を3時間作用させた培養神経細胞にLeu-Ileを30分間作用させ、上記と同様にAktの活性化を検討した。Leu-IleによるAktの活性化は、ゲルダラマイシンによって抑制された (Figure 3)。またAktのシグナル伝達の上流のPI3-K阻害剤のLY294002 (15  $\mu$ M) を2時間作用させた神経細胞にLeu-Ileを作用させた際には、Aktの活性化は抑制されなかった。神経細胞をpAktで免疫沈降したタンパク中には、Hsp90の発現が増加していたが、Hsc70の発現は変化していなかった。これらの実験結果から、Leu-IleによるAkt活性化は、Hsp90の直接的な影響を受けていると考えられる。

4、Leu-IleによるCREBの活性化  
CREBは、Aktによって調節を受けている代表的な転写制御因子である。Leu-Ileを作用させて20から30分後にCREBの133番目のSerが有意にリン酸化されていた (Figure 4)。

同じ疎水性ジペプチドであるPro-LeuやIle-Proを同様に培養神経細胞に作用させた場合には、CREBの活性化は観察されなかった (Figure 4)。また、活性化されたCREBは核内において観察された (Figure 4)。これらの結果から、Leu-Ileによって活性化されたCREBは、遺伝子の転写調節に働いている可能性が考えられる。またHsp90阻害剤のゲルダラマイシンを前もって作用させることによって、Leu-IleによるCREBの活性化や核内移動も抑制された。CREBは多くのシグナル伝達物質によって、調節されていることが分かっている

るため、pERK1/2、PKCおよびpCAMK2  $\alpha/\beta$  の活性化についても検討したが、これらの因子は、Leu-Ileによって影響を受けなかった。

#### 5、CREBを介したLeu-IleのGDNFの産生誘導作用

Leu-Ileおよび同じ疎水性ジペプチドのPro-LeuやIle-Pro (いずれも10  $\mu$ g/ml) を24時間作用させたところ、Leu-IleのみがGDNFの産生を誘導した (Figure 5)。またGDNF mRNAの発現もLeu-Ileは誘導した。これらの結果は、我々の既報と一致し、再現性が確認された。GDNFの発現誘導にCREBの活性化が不可欠なものであるかどうかを検討するため、CREBのオリゴヌクレオチドアンチセンスを用いてCREBの発現を抑制した培養神経細胞では、Leu-IleによるGDNFの産生誘導は低下した。また、培養神経細胞の中でも、GDNFが強く発現している細胞では、CREBの核内移行が観察された (Figure 5)。

#### D. 考察

免疫抑制剤のFK506 (タクロリムス) のFKBP12との結合サイト部位との類似構造を持つLeu-Ileが、GDNFの産生誘導およびin vivoとin vitroでの神経保護作用を有することを報告してきた (Nitta et al. 2004) Leu-IleはFK506と異なり、免疫抑制作用やカルシニューリン活性化抑制作用を有しないことから、未知のメカニズムによって、Leu-Ileは、神経保護作用を有していると考えられていた。これら未知の神経保護作用を明らかにするための第1歩として、昨年度の本研究では、Leu-Ileの脳内結合タンパクの同定を試み、Hsc70であることを明らかにした。

昨年度までの本研究で、Leu-Ileが、Hsc70と結合していることを明らかにした。今年度は、Leu-IleがHsc70と結合した後に、どのようなメカニズムを介して、GDNFが産生誘導され、神経保護効果を持つのかを明らかにすることを研究目標とした。その結果、Leu-Ileは、Hsc70と結合した後、Hsp90およびAktを活性化させ、遺伝子転写調節を行うCREBのリン酸化を誘導することによって、GDNFの産生を増大させることを明らかにした。これらの結果は、Leu-Ileの神経保護作用の解明のみならず、GDNFの産生や神経保護には、Aktの

活性化やCREBの制御が重要であることを示唆することが出来る。

#### E. 結論

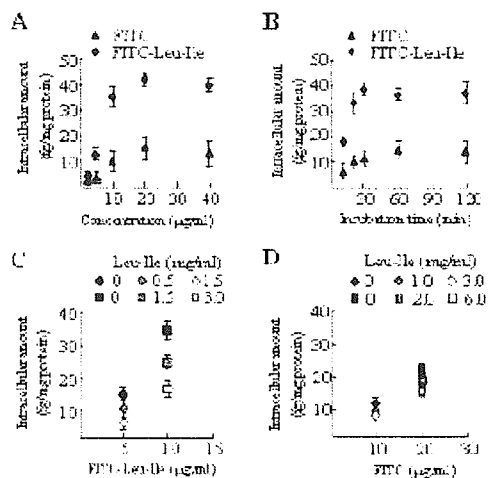
神経保護作用を持つ疎水性ジペプチドのLeu-Ileは、Hsc70と結合し、Hsp90やAktの活性化を経て、CREBの活性化によって、神経保護作用を有することを明らかにした。

#### [参考文献]

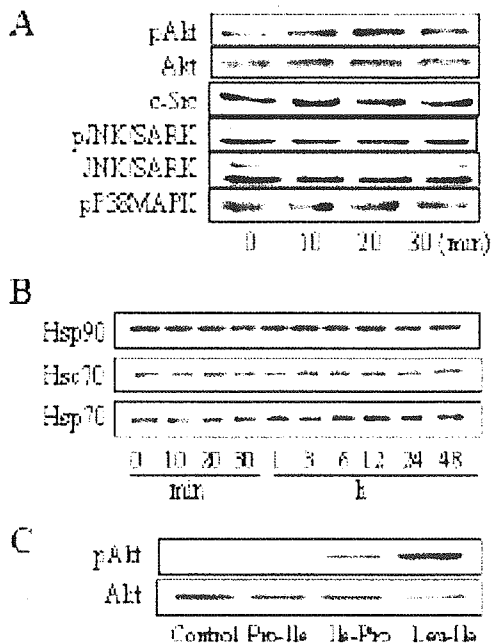
Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F: GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science*, **260**: 1130-1132 (1993)

Nitta A, Nishioka H, Fukumitsu H, Furukawa Y, Sugiura H, Shen L, Furukawa S: Hydrophobic dipeptide Leu-Ile protects against neuronal death by inducing brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor synthesis. *J Neurosci Res*, **78**: 250-258 (2004)

Wang JM, Chao JR, Chen W, Kuo ML, Yen JJ, Yang-Yen HF: The antiapoptotic gene *mcl-1* is up-regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway through a transcription factor complex containing CREB. *Mol Cell Biol*, **197**: 6195-206 (1999)

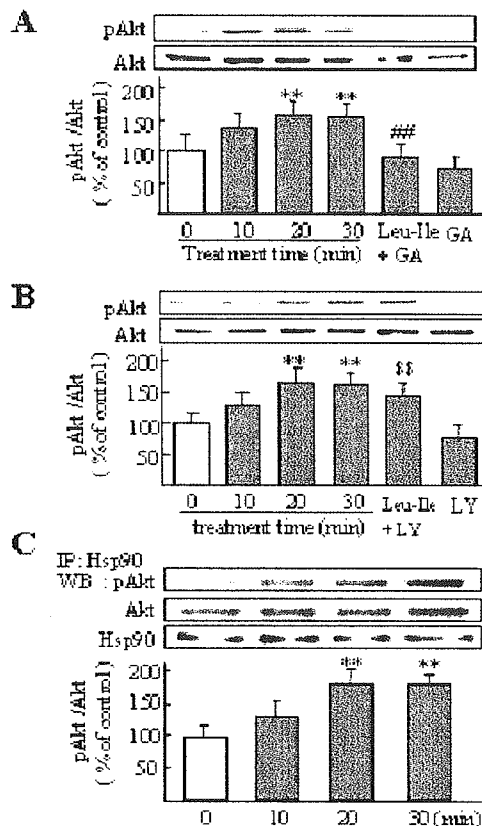


**Figure 1. Transmembrane transport of Leu-Ile.** A, Cultured neurons were exposed to FITC-Leu-Ile or FITC at various concentrations for 30 min, and uptake was analyzed according to intracellular fluorescent densities (n=3). B, Neurons were incubated with 10  $\mu$ g/ml FITC-Leu-Ile or FITC at 37°C for the indicated time periods. Time-course uptake was analyzed (n=3). C, Neurons were exposed to FITC-Leu-Ile for 30 min in the presence of various concentrations of Leu-Ile, which were indicated by different symbols. Penetration of FITC-Leu-Ile was significantly inhibited by competitive Leu-Ile. D, High concentrations of Leu-Ile could not inhibit FITC transport.

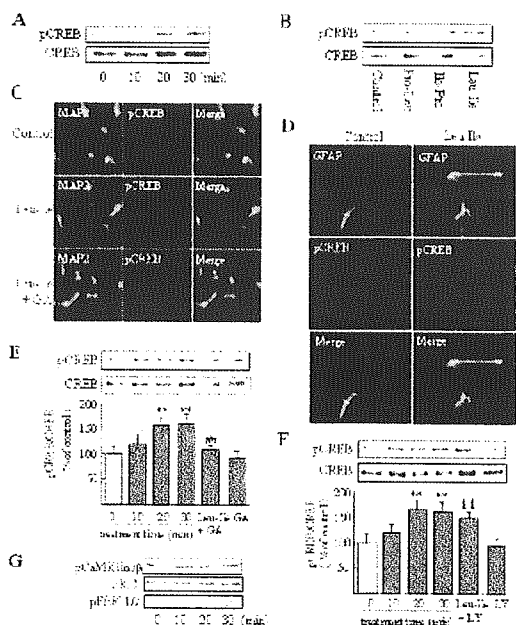


**Figure 2. Leu-Ile stimulates Akt phosphorylation.** A, Neurons were exposed to Leu-Ile (10  $\mu$ g/ml) for the indicated times. Cell lysates were subjected to SDS-PAGE and probed with various antibodies. The representative immunoblots are shown.

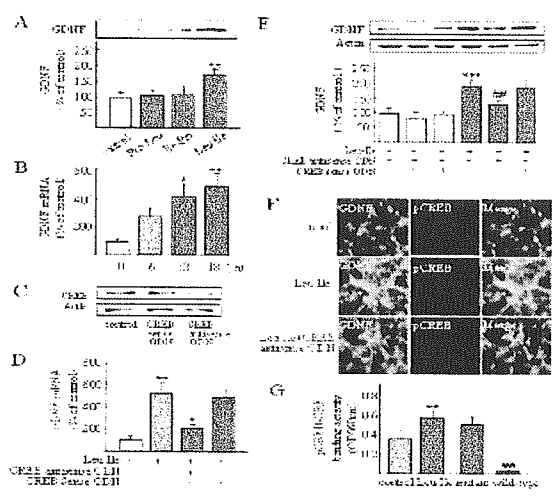
n. B, Neurons were exposed to Leu-Ile (10  $\mu$ g/ml) for the indicated times. Immunoblots were probed with antibodies against Hsp90, Hsp70 and Hsc70. C, Neurons were stimulated with Leu-Ile, Pro-Leu and Ile-Pro (10  $\mu$ g/ml) for 30 min. Cell lysates were subjected to SDS-PAGE and probed with antibodies against pAkt and Akt.



**Figure 3. Akt activation induced by Leu-Ile is mediated by Hsp90.** A-B, Neurons were stimulated with Leu-Ile (10  $\mu$ g/ml) alone for 0, 10, 20 and 30 min, or pre-treated with GA (10  $\mu$ M) for 3 h (A) or LY294002 (15  $\mu$ M) for 2 h (B), followed by Leu-Ile (10  $\mu$ g/ml) treatment for 30 min. Cell lysates were immunoblotted with antibodies against pAkt and Akt. Each column represents the mean  $\pm$  SEM (n=4). Leu-Ile + GA, neurons were pre-treated with GA, followed by Leu-Ile; GA, neurons were pre-treated with GA alone; Leu-Ile+LY, neurons were pre-treated with LY294002, followed by Leu-Ile treatment; LY, neurons were pre-treated with LY294002. \*\* p<0.01 versus control (0 min); ## p<0.01 versus Leu-Ile (30 min); \$\$ p<0.01 versus LY294002. C, Cultures were exposed to 10  $\mu$ g/ml of Leu-Ile for the periods indicated. Cell extracts were immunoprecipitated (IP) with anti-Hsp90 antibody or control rabbit IgG, followed by immunoblotting (WB). Densitometric data are presented as the mean  $\pm$  SEM (n=4). \*\* p<0.01 versus control (0 min).



**Figure 4. CREB is a downstream target of Hsp90/Akt signaling activated by Leu-Ile.** A, Cultured neurons were exposed to 10  $\mu$ g/ml of Leu-Ile for 0, 10, 20 and 30 min, and pCREB was measured by immunoblotting. B, Western blotting with anti-pCREB antibody reveals CREB activation induced by Leu-Ile but not Pro-Leu and Ile-Pro. C, Visualization of CREB phosphorylation (red) in MAP2-positive neurons (green) induced by Leu-Ile. D, Phosphorylated CREB (red) induced by Leu-Ile is not located in GFAP-positive cells (green). E-F, Neurons were treated with Leu-Ile (10  $\mu$ g/ml) for 0 (control), 10, 20 and 30 min respectively, or pre-treated with GA (10  $\mu$ M) for 3 h (E) or LY294002 (15  $\mu$ M) for 2 h (F), followed by Leu-Ile (10  $\mu$ g/ml) treatment for 30min. Each column represents the mean  $\pm$  SEM (n = 4). Leu-Ile+GA, neurons were pre-treated with GA, followed by Leu-Ile; GA, neurons were pre-treated with GA; Leu-Ile+LY, neurons were pre-treated with LY294002, followed by Leu-Ile; LY, neurons were pre-treated with LY294002. \*\* p<0.01 versus control (0 min); ## p<0.01 versus Leu-Ile (30 min); \$\$ p<0.01 versus LY294002. G, PKC, pERK1/2 and pCaMKII were measured after Leu-Ile (10  $\mu$ g/ml) treatment by immunoblotting.



**Figure 5. Leu-Ile increases GDNF expression in CREB-dependent manner.** A, Leu-Ile significantly increased GDNF expression, whereas Pro-Leu and Ile-Pro showed no GDNF-inducing activities. \*\* p<0.01 versus control (n = 4); B, GDNF mRNA levels induced by Leu-Ile for various periods were studied by real-time RT-PCR. \* p<0.05 and \*\* p<0.01 versus control (0 h); C, CREB expression was blocked by CREB antisense ODN, as revealed by Western blotting. D, Neurons were incubated with Leu-Ile (10  $\mu$ g/ml) for 24 h in the presence of CREB antisense ODN or sense ODN. Data are expressed as a percentage of the control (mean  $\pm$  SEM, n = 4). \*\* p<0.01 versus control and \* p<0.05 versus Leu-Ile or Leu-Ile plus CREB sense ODN. E, Neurons were incubated with Leu-Ile (10  $\mu$ g/ml) for 24 h in the presence of CREB antisense ODN or sense ODN. Data are expressed as a percentage of control (mean  $\pm$  SEM, n = 4). \*\*\* p<0.001 versus control; ## p<0.01 versus Leu-Ile or Leu-Ile plus CREB sense ODN. F, Neurons were labeled with anti-GDNF (green) and anti-pCREB antibodies (red). G, CREB-pCREB binding activities were quantified after Leu-Ile treatment for 30 min. \*\* p<0.01 versus control; ### p<0.001 versus mutant ODN (n = 4).



## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Cen X., Nitta A., Ohya S., Zhao Y., Ozawa N., Mouri A., Ibi D., Wang L., Suzuki M., Saito K., Ito Y., Kawagoe T., Noda Y., Ito Y., Furukawa S., and Nabeshima T., (2006) An analogue of dipeptide-like structure of FK506 increases GDNF expression through CREB activated by Hsp90/Akt signaling pathway. *J. Neurosci.* in press

Yan Y., Nitta A., Mizoguchi H., Yamada K., and Nabeshima T., (2006) Relapse of methamphetamine-seeking behavior in C57BL/6J mice demonstrated by a reinstatement procedure involving intravenous self-administration. *Behav Brain Res.* 15, 137-143.

Mizuno T., Kuno R., Nitta A., Nabeshima T., Zhang G., Kawanokuchi J., Wang J., Jin S., Takeuchi H., and Suzumura A., (2005) Protective effects of nicergoline against neuronal cell death induced by activated microglia and astrocytes. *Brain Res.* 1066, 78-85.

Enomoto T., Noda Y., Mouri A., Shin E.J., Wang D., Murai R., Hotta K., Furukawa H., Nitta A., Kim H.C., and Nabeshima T., (2005) Long-lasting impairment of associative learning is correlated with a dysfunction of N-methyl-D-aspartate-extracellular signaling-regulated kinase signaling in mice after withdrawal from repeated administration of phencyclidine. *Mol Pharmacol.* 68, 1765-1774.

Ishikawa K., Nitta A., Mizoguchi H., Mohri A., Murai R., Miyamoto Y., Noda Y., Kitaichi K., Yamada K., and Nabeshima T., (2005) Effects of single and repeated administration of methamphetamine or morphine on neuroglycan C gene expression in the rat brain. *Int J Neuropsychopharmacol.* 7, 1-9

Hashimoto M., Nitta A., Fukumitsu H., Nomoto H., Shen L., and Furukawa S., (2005) Inflammation-induced GDNF improves locomotor function after spinal cord injury. *Neuroreport* 16, 99-102.

Hashimoto M., Nitta A., Fukumitsu H., Nomoto H., Shen L. and Furukawa S. (2005) Involvement of glial cell line-derived neurotrophic factor in activation processes of rodent macrophages. *J. Neurosci.*

*ci. Res.* 79, 476-487.

Miyoshi M., Nadai M., Nitta A., Ueyama J., Shimizu A., Takagi K., Nabeshima T., Takagi K., Saito K. and Hasegawa T. (2005) Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in down-regulation of hepatic cytochrome P450 and P-glycoprotein by endotoxin. *Eur. J. Pharmacol.* 507, 229-237.

### 2. 学会発表

Nabeshima, T., Nakajima, A., Mizoguchi, H., Nitta, A., Noda, Y. and Yamada, K.: The brain areas related to methamphetamine dependence in rats. (symposium047 "Molecular Mechanism of Neurotoxicity and Psychosis Induced by Methamphetamine") 8th World Congress of Biological Psychiatry (Vienna, Austria, Jun.28-Jul.3, 2005)

Nabeshima, T., Ishikawa, K., Nitta, A., Mizoguchi, H., Mohri, A., Murai, R., Miyamoto, Y., Noda, Y., Kitaichi, K. and Yamada, K.: Effects of single and repeated administration of methamphetamine or morphine on neuroglycan C gene expression in the rat brain. 8th World Congress of Biological Psychiatry (Vienna, Austria, Jun.28-Jul.3, 2005)

Mizoguchi, H., Yamada, K., Mizuno, M., Mizuno, T., Nitta, A., Noda, Y. and Nabeshima, T.: Regulation of methamphetamine reward by ERK1/2/Elk-1 signaling pathway via the activation of dopamine receptors. Taiwan-Japan Joint Seminar (Nagoya, Japan, Aug.8, 2005)

Murai, R., Noda, Y., Mouri, A., Nitta, A., Furukawa, H. and Nabeshima, T.: Involvement of glutamatergic system in emotional deficits in repeated phencyclidine-treated mice. Taiwan-Japan Joint Seminar (Nagoya, Japan, Aug.8, 2005)

Cen, X., Nitta, A., Ohya, S., Zhao, Y., Ozawa, N., Mouri, A., Ibi, D., Wang, L., Suzuki, M., Saito, K., Kawagoe, T., Noda, Y., Furukawa, S. and Nabeshima, T.: A dipeptide, Leu-Ile, increases glial cell line-derived neurotrophic factor expression through CREB activated by Hsp90/Akt signaling pathway. Taiwan-Japan Joint Seminar (Nagoya, Japan, Aug.8,

2005)

Niwa, M., Nitta, A., Yamada, Y., Nakajima, A., Saito, K., Seishima, M., Shen, L., Noda, Y. and Nabeshima, T.: Involvement of GDNF and TNF- $\alpha$  in inhibitory effects

of Leu-Ile on methamphetamine-induced dependence.

Taiwan-Japan Joint Seminar (Nagoya, Japan, Aug.8, 2005)

Wang, D., Noda, Y., Tsunekawa, H., Miyazaki, M., Senzaki, K., Nitta, A. and Nabeshima, T.: Behavioral and neurobiochemical changes in olfactory bulbectomized rats: Antidepressive effects of sigma receptor agonist, SA-4503.

Taiwan-Japan Joint Seminar (Nagoya, Japan, Aug.8, 2005)

Mouri, A., Noda, Y., Noda, A., Nitta, A., Furukawa, H. and Nabeshima, T.: Impairment of latent learning is correlated with a dysfunction of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II signaling in mice following withdrawal from repeated administration of phencyclidine.

Taiwan-Japan Joint Seminar (Nagoya, Japan, Aug.8, 2005)

Cen, X., Nitta, A., Ohya, S., Zhao, Y., Ozawa, N., Mouri, A., Ibi, D., Wang, L., Suzuki, M., Saito, K., Ito, Y., Kawagoe, T., Noda, Y., Ito, Y., Furukawa, S. and Nabeshima, T. (Poster presentation): An analogue of dipeptide-like structure of FK506 increases GDNF expression through CREB activated by Hsp90/Akt signaling pathway.

Japan-Canada: Joint Workshop on Brain Science (Tokyo, January 18, 2006)

Niwa, M., Nitta, A., Yamada, Y., Nakajima, A., Saito, K., Seishima, M., Shen, L., Noda, Y., Furukawa, S. and Nabeshima, T. (Poster presentation): An inducer for GDNF and TNF- $\alpha$  protects methamphetamine-induced reward and sensitization.

Japan-Canada: Joint Workshop on Brain Science (Tokyo, January 18, 2006)

新田淳美: 薬剤の適正使用を目指して - 遺伝子・動物・臨床研究すべての統合 -

第10回鶴舞公開セミナー (名古屋, 2005. 4. 21)

丹羽美苗, 新田淳美, 山田裕一郎, 斉藤邦明, 清

島満, Liya S., 野田幸裕, 鍋島俊隆: GDNFの産生誘導剤Leu-Ileのメタンフェタミン依存抑制効果.

第107回日本薬理学会近畿部会 (金沢, 2005. 6. 24)

Yan, Y., Nitta, A., Mizoguchi, H., Yamada, K. and Nabeshima, T.: Relapse of METH dependence in C57BL/6J mice demonstrated by reinstatement of self-administration.

第27回日本生物学的精神医学会・第35回日本神経精神薬理学会合同年会 (大阪, 2005. 7. 6-8)

石川和宏, 新田淳美, 溝口博之, 毛利彰宏, 村井里菜, 宮本嘉明, 野田幸裕, 北市清幸, 山田清文, 鍋島俊隆: メタンフェタミン連続投与による脳内ニューログリカンCの発現変化.

第51回日本薬学会東海支部総会・大会 (岐阜, 2005. 7. 12)

新田淳美, 丹羽美苗, 曾南, 伊東亜紀雄, 野田幸裕, 鍋島俊隆, 平松正行, 三輪将也: 可塑的脳機能障害におけるニコチン性コリン作動性神経系の役割 (Ⅲ) - ストレス誘発うつ病および学習記憶モデル動物の神経機能障害に対するニコチンの作用 -

財団法人喫煙科学研究財団第20回平成16年度助成研究発表会 (東京, 2005. 7. 21)

新田淳美, 本多裕之, 古川昭栄, 古川美子: タバコ成分中のカテコール化合物の神経栄養因子促進と神経保護効果. 財団法人20回平成16年度助成研究発表会 (東京, 2005. 7. 21)

新田淳美 (シンポジウム講演): Actions of hydrophobic dipeptide Leu-Ile on the neuroprotection and drug dependence. (奨励賞受賞シンポジウム)

第48回日本神経化学学会大会 (福岡, 2005. 9. 28-30)

丹羽美苗, 新田淳美, 山田裕一郎, 柴田葉子, 斉藤邦明, 清島満, Liya Shen, 野田幸裕, 鍋島俊隆: A possibility of Leu-Ile as a novel therapeutic agent for morphine-induced dependence.

第48回日本神経化学学会大会 (福岡, 2005. 9. 28-30)

村井里菜, 野田幸裕, 毛利彰宏, 新田淳美, 鍋島俊隆: フェンシクリジン連続投与マウスに認められる情動障害の発現における前頭前皮質グルタミン酸伝達系の関与.

第108回日本薬理学会近畿部会（西宮，2005.11.1  
1)

**G 知的財産権の出願・登録状況**

1、特許取得

Akt刺激薬

（発明者 新田淳美、鍋島俊隆）

国際出願

出願日 平成18年 1月27日

PCT/JP2006?301326

1、 実用新案登録

なし

2、 その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Naoi M, Maruyama W, Shamoto-Nagai M, Kato Y, Tanaka M.	Oxidative stress in mitochondrial: The involvement in neurodegenerative diseases.	Surh Y-J, Packer L	Oxidative Stress, Inflammation and Health	Merck Dekker	New York	2005	423- 444
Maruyama W, Akao Y, Nitta A, Naoi M.	Neuroprotection by rasagiline, N-propargyl-L-1R(+)-aminoindan, and related propargylamines is mediated by suppression of mitochondrial death signal and induction of anti-apoptotic genes	Surh Y-J, Packer L	Oxidative Stress, Inflammation and Health	Merck Dekker	New York	2005	609 - 630
Naoi M, Maruyama W, Shamoto-Nagai M, Kato Y, Tanaka M.	Oxidative stress in mitochondrial: The involvement in neurodegenerative diseases.	Surh Y-J, Packer L	Oxidative Stress, Inflammation and Health	Merck Dekker	New York	2005	423- 444
Takai-Kawakami, K., Kawakami, K., Tomonaga, M., Suzuki, J., Kusaka, F. Okai, T.	Human babies begin to laugh from the beginning.	Izdebski, K.	Voice & Emotions	Plural	San Diego, USA	2006	in press