

7,777,777,777

厚生労働省科学研究研究費補助金

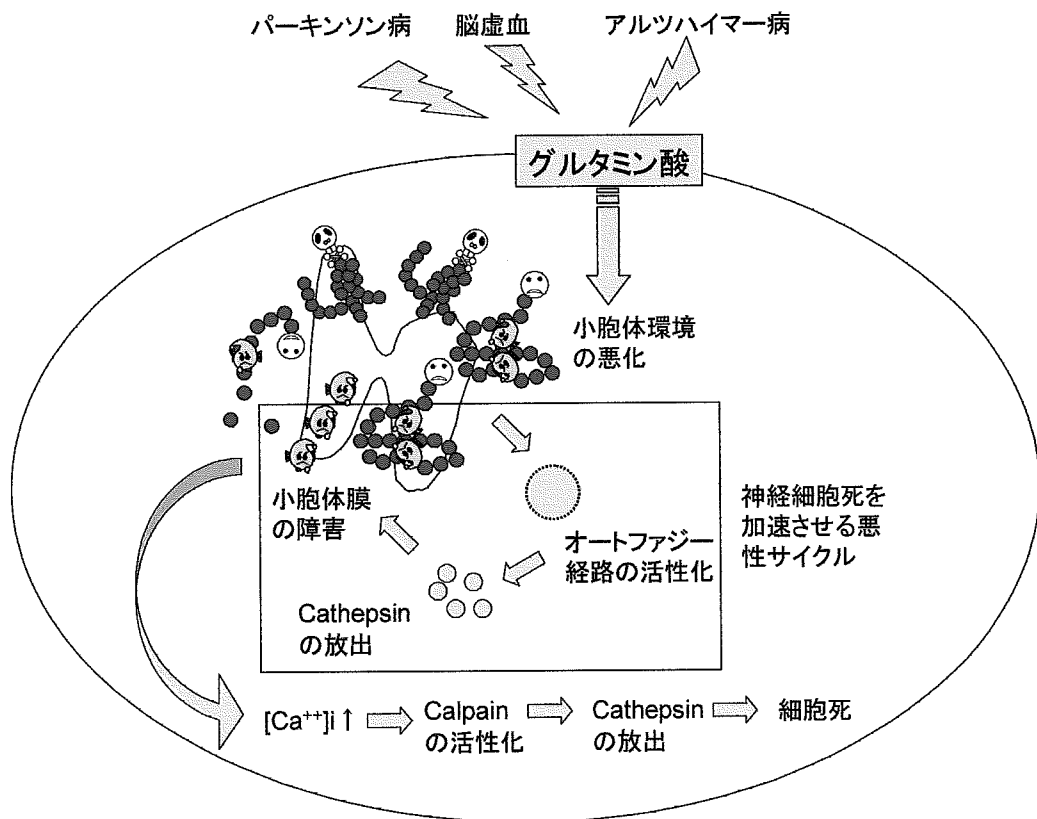
こころの健康科学研究事業

小胞体制御による神経細胞死抑制・神経変性治療に関する研究

平成17年度 総括研究報告書

主任研究員 小川 智

平成18(2006)年 5月



厚生労働省科学研究研究費補助金

こころの健康科学研究事業

小胞体制御による神経細胞死抑制・神経変性治療に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究員 小川 智

平成18(2006)年 5月

目次

I. 総括研究報告書

小胞体制御による神経細胞死抑制・神経変性治療に関する研究 小川智	2
-------------------------------------	---

II. 分担研究報告

1. 慢性小胞体付加による神経細胞死モデル動物の確立 小川 智	5
2. 小胞体ストレス制御物質の探索と、その神経保護作用について 堀 修	11
3. 小胞体環境とオートファジー 経路の解明 内山安男	16
4. 神経細胞死による高次脳機能障害に対する多価不飽和脂肪酸の効果 山嶋哲盛	20
5. 神経細胞樹状突起における小胞体からのカルシウム放出機構の解析 井上 貴文	23

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	28
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷り	29
------------------	----

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）研究成果抄録（平成17年度終了課題）

研究課題：小胞体制御による神経細胞死抑制・神経変性治療
課題番号：H15-こころ-018

主任研究者： 所属施設 金沢大学大学院医学系研究科・教授
氏名 小川 智

分担研究者

堀 修
金沢大学大学院医学系研究科・助教授

内山安男
大阪大学大学院医学系研究科・教授

山嶋哲盛
金沢大学大学院医学系研究科・助教授、

井上貴文
東京大学医科学研究所・助教授

1. 研究目的

虚血性神経細胞死だけでなく神経変性疾患にも共通する細胞死のメカニズムとして小胞体の機能異常が注目されている。活性酸素やNOなどにより小胞体に折りたたみ異常蛋白が蓄積すると、神経細胞は①ORP150に代表されるストレス蛋白の発現、②蛋白新生の抑制、③蛋白分解系の活性化などの経路により小胞体の付加を軽減しようとする。これら一連の負荷応答が不成功に終わった場合、神経細胞死が起こると考えられる。

研究者らは、1)パーキンソン病、虚血、アルツハイマー病などが小胞体に負荷を与えること、2)これが小胞体環境の悪化をきたし、3)小胞体近傍でのオートファジー経路の活性化により、4)さらなる小胞体障害を引き起こす、ことを示してきた（悪性サイクル：青で囲んでしめす）。さらに、小胞体環境改善剤とERからのCa⁺⁺放出制御剤を見いだすことによって、脳虚血だけでなく神経変性疾患にも共通する神経細胞死機構の制御を目指す。

2. 研究方法および結果

●小胞体シグナルによる細胞死のメカニズムの解析と小胞体由来細胞死抑止剤スクリーニング系の

開発

ERAD関連蛋白であるHerp/SUP細胞株を確立した。この細胞株は、小胞体ストレスに特異的に脆弱性を示す。これにより小胞体由来の細胞死を抑制する薬剤のスクリーニングを開始、複数のリード化合物を得た。（小川、内山が担当）

●脳虚血モデルにおける小胞体シグナルの解析（霊長類モデルの確立による）
霊長類（ニホンザル）を用いた慢性低灌流モデルを開発する。このモデルにおいて小川らの確立したORP150など各種小胞体ストレス蛋白抗体の免疫染色を用いて解析した（山嶋・内山が担当）。

●小胞体ストレス環境下における神経細胞内[Ca⁺⁺]_i動態の観察
慢性的小胞体負荷が存在するHerp/SUP細胞株でも、小胞体からのCa⁺⁺流出が重要であることを示した。

●病態下の小胞体death signalとしてのCa⁺⁺の同定
小川らが確立したORP150ノックアウトマウスにおいて、グルタミン酸などの生理的神経伝達物質の作用によっても神経細胞内[Ca⁺⁺]_iの上昇が起こり、神経細胞内でdeath enzymeの活性化が起こることを証明した（小川、井上が担当）。

●小胞体機能マーカーの確立
生体内での半減期の短いVenous蛍光蛋白に小胞体残留シグナルを結合させた小胞体残留型蛍光マーカーを確立し、このマーカーのクリアランスが小胞体機能の悪化に伴い延長することを示し、小胞体機能計測系として使用可能であることを示した（内山、山嶋が担当）。

●スクリーニング動物の作成
すでに確立したORP150、SERP1ノックアウトマウス、また、megsin Tgで、小胞体ストレスによる神経細胞死が促進していることを示した。これらの動物を使用して、長期的に経口投与可能な、小胞体機能改善剤のスクリーニングを開始した。

すでに平成15年度に確立済みの細胞によるスクリーニング結果からリード化合物を2次スクリーニングにかけ、in-vivoのモデルでも有望な結果を得た。

●小胞体理論のパーキンソニズムへの拡大
小胞体環境維持システムの傷害によってパーキンソニズムが引き起こされることを証明し、パーキンソニズムにおける小胞体の関与を明らかにした(内山、小川が担当)。

●小胞体ストレスからオートファジーに至る経路の証明
カテプシンノックアウトマウスを用いて、虚血だけでなく神経変性疾患においても、小胞体ストレスからオートファジーへ至る経路を抑制することによって、神経細胞死が阻止されることを示した。

4. 評価 (研究成果)

1) 達成度について

小胞体から神経細胞死に至る経路、オートファジーの役割、小胞体機能を計測する分子ツールの開発、薬剤のスクリーニング系など、研究班発足時にたてた目標のほとんどを達成した。

2) 研究成果の学術的意義について

小胞体から細胞死に至る経路が虚血だけでなく、種々の神経変性疾患においても基幹経路であるこ

とを示した。従来のミトコンドリアを起点とする細胞死だけでなく、小胞体の病態における意義を明示した点で画期的である(図)。

3) 研究成果の行政的意義について

小胞体理論に基づき、F9細胞による1次スクリーニング、神経芽細胞による2次スクリーニングにより、複数のリード化合物を得た。現在、動物モデルによる3次スクリーニングを試行、有効な成果を得ている。これらの薬剤は極めて安全で、すでに健康食品などとして使用されているものもある。このような安全な薬剤が、小胞体期限の神経細胞死に有効であることを示した点で、国民の厚生福祉に多大な貢献をするものである。

4) その他特記すべき事項について

小胞体理論に基づき、preliminaryではあるが、薬剤の開発まで到達した点は特記すべきである。さらにこの研究にて開発された小胞体機能解析のための種々の分子ツールによって、病態下における詳細な小胞体機能が解析可能となった。

5. 結論

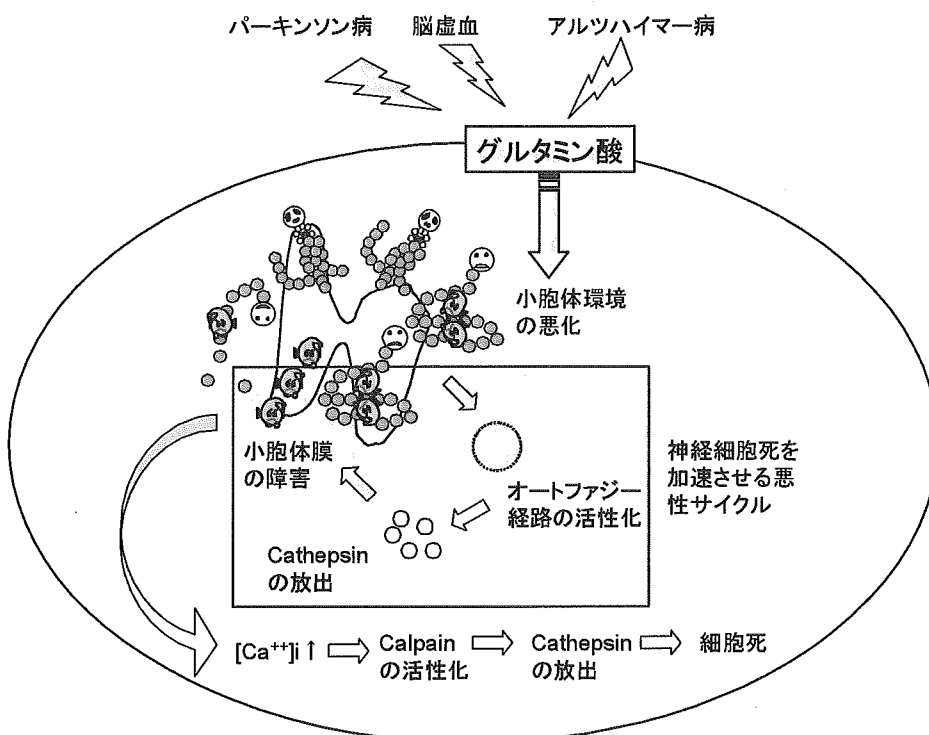
神経疾患を小胞体機能の異常として理解し、その進行を抑制する薬剤のスクリーニングに成功した。神経疾患の革新的な治療法への第一段階として画期的な業績を上げたと確信している。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表

23件



図小胞体理論に基づく神経細胞死。

本研究では、虚血だけでなく、グルタミン酸を経由する神経細胞死(アルツハイマー病)、ドパミンを介する神経細胞死(パーキンソニズム)にも共通する神経傷害の機構であることを示した。また、小胞体に不可の救済経路であるオートファジー経路が神経細胞では逆に細胞死を加速させることを示した。これら小胞体理論に基づく神経細胞保護剤の開発を行っている。

原著論文による発表 12 件
それ以外 (レビュー等) の発表 16件

2)海外

口頭発表 12件
原著論文による発表 36件
それ以外 (レビュー等) の発表 2件

そのうち主なもの

論文発表

●小川 智(金沢大学)

Kitao Y, Hashimoto K, Matsuyama T, Iso H, Tamatani T, Hori O, Stern DM, Kano M, Ozawa K, and Ogawa S. ORP150/HSP12A regulates Purkinje cell survival: a role for endoplasmic reticulum stress in cerebellar development. *J Neurosci.* 2004; 24: 1486-96
Hori O, Ichinoda F, Yamaguchi A, Taniguchi M, Koyama Y, Tohyama M, Stern D, Ozawa K, Kitao Y, Ogawa S. Role of Herp in the endoplasmic reticulum (ER) stress response. *Genes Cells.* 2004; 9: 457-469
Bando Y, Tsukamoto Y, Katayama T, Ozawa K, Kitao Y, Hori O, Stern DM, Yamauchi A, Ogawa S. ORP150/HSP12A protects renal tubular epithelium from ischemia-induced cell death. *FASEB J.* 2004; 18: 1401-1403.

Nakatani Y, Kaneto H, Kawamori D, Yoshiuchi K, Hatazaki M, Matsuoka TA, Ozawa K, Ogawa S, Hori M, Yamasaki Y, Matsuhisa M. Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *J Biol Chem.* 2005; 280(1): 847-851
Ozawa K, Miyazaki T, Hori O, Kitao Y, Tamatani T, and Ogawa S. The ER chaperone 150 kDa Oxygen Regulated Protein (ORP150) improves insulin resistance in Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes.* 2005; 54(3): 657-663

●内山安男(大阪大学)

Koike M, Shibata M, Waguri S, Yoshimura K, Tanida I, Kominami E, Gotow G, Peters C, Figura K, Mizushima N, Saftig P and Uchiyama Y (2005) Participation of autophagy in storage of lysosomes in neurons from mouse models of neuronal ceroid-lipofuscinoses (Batten disease). *Am J Pathol* 167:1713-1728

Yoshida H, Kawane K, Koike M, Mori Y, Uchiyama Y, Nagata, S (2005) Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells. *Nature* 434: 754-758

Tomiyama Y, Waguri S, Kanamori S, Kametaka S, Wakasugi M, Shibata M, Ebisu S, Uchiyama Y (2004) Early-phase redistribution of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor by U18666A treatment in HeLa cells. *Cell Tissue Res* 317: 253-264

Kametaka S, Shibata M, Moroe K, Kanamori S, Ohsawa Y, Waguri S, Sims PJ, Emoto K, Umeda M, Uchiyama Y. (2003) Identification of phospholipid scramblase 1 as a novel interacting molecule with α -secretase (α -site amyloid precursor protein (APP) processing enzyme (BACE)). *J Biol Chem.*

278:15239-15245

○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. (2003) Involvement of two different cell death pathways in retinal atrophy of cathepsin D-deficient mice. *Mol. Cell. Neurosci.* 14:142-155

●山嶋哲盛(金沢大学)

Yamashima T, Tonchev AB, Vachkov IH, Popivanova BK, Seki T, Sawamoto K, Okano H. Vascular adventitia generates neuronal progenitors in the monkey hippocampus after ischemia. *Hippocampus* 2004, 14(7):861-875.

Yamashima T. Ca²⁺-dependent proteases in ischemic neuronal death: a conserved 'calpain-cathepsin cascade' from nematodes to primates. *Cell Calcium* 2004, 36(3-4):285-293.

Tonchev AB, Yamashima T, Zhao L, Okano HJ, Okano H. Proliferation of neural and neuronal progenitors after global brain ischemia in young adult macaque monkeys. *Mol Cell Neurosci.* 2003, 23 (2):292-301.

Tonchev AB, Yamashima T, Zhao L, Okano H. Differential proliferative response in the postischemic hippocampus, temporal cortex and olfactory bulb of young adult monkeys. *Glia* 2003, 42(3):209-224.

Yamashima T, Tonchev AB, Tsukada T, Saido TC, Imajoh-Ohmi S, Momoi T, Kominami E. Sustained calpain activation associated with lysosomal rupture executes necrosis of the postischemic CA1 neurons in primates. *Hippocampus* 2003, 13(7):791-800.

●井上貴文(東京大学)

Hiroko Bannai, Kazumi Fukatsu, Akihiro Mizutani, Tohru Natsume, Shin-ichiro Iemura, Tohru Ikegami, Takafumi Inoue (Corresponding Author), Katsuhiko Mikoshiba. An RNA-interacting protein SYNCRIP (heterogeneous nuclear ribonuclear protein Q1/NSAP1) is a component of mRNA granule transported with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 mRNA in neuronal dendrites. *The Journal of Biological Chemistry*, 279:53427-53434 (2004).

Kazumi Fukatsu, Hiroko Bannai, Songbai Zhang, Hideki Nakamura, Takafumi Inoue (Corresponding Author), Katsuhiko Mikoshiba. Lateral diffusion of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 is regulated by actin filaments and 4.1N in neuronal dendrites. *The Journal of Biological Chemistry*, 279:48976-48982 (2004).

Iskandar Ismailov, Djanenkhodja Kalikulov, Takafumi Inoue, Michael J. Friedlander. The kinetic profile of intracellular calcium predicts long-term potentiation and long-term depression. *The Journal of Neuroscience*, 24:9847-9861 (2004).

Hiroko Bannai, Takafumi Inoue (Corresponding Author), Tomohiro Nakayama, Mitsuharu Hattori, Katsuhiko Mikoshiba. Kinesin dependent, rapid, bidirectional transport of inositol-1,4,5-trisphosphate receptor containing particles in the dendrite of

hippocampal neurons. *Journal of Cell Science*, 117:163-175 (2004).

Akinori Kuruma, Takafumi Inoue (Corresponding Author), Katsuhiko Mikoshiba. Dynamics of Ca²⁺ and Na⁺ in the dendrite of mouse cerebellar Purkinje cells evoked by parallel fiber stimulation. *European Journal of Neuroscience*, 18:2677-2689 (2003).

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む。）

●小川 智（金沢大学）Herp欠損F9細胞をもちいた薬剤スクリーニング系（特許出願中：特願2004-57717）

分担研究報告書

慢性小胞体付加による神経細胞死モデル動物の確立

主任研究者 小川 智
分担研究者 堀 修

研究要旨

ヒトにおけるFENIB (familial encephalopathy with neuroserpin inclusion bodies)は変異したneuroserpin蛋白が小胞体内に蓄積することによっておこる神経変性疾患である。Neuroserpin近縁蛋白であるmegsinを強制発現させたラット(Tg meg)では、PAS染色によって陽性を示す封入体が新皮質深層、海馬CA3領域、黒質緻密層の神経細胞内に見られた。Tg megの海馬領域ではORP150をはじめとする小胞体ストレス蛋白の強い発現が見られた。また、黒質緻密層でも、黒質線条体ニューロンに強い小胞体ストレス蛋白の発現が見られ、同時に加齢に伴って黒質線条体乳一論のマーカーであるTH(チロシン水酸化酵素)の著しい免疫源性的低下が認められた。海馬、および黒質の両方においてPAS染色陽性の封入体にはmegsinの染色性が認められた。さらにTg megでは、加齢に伴って水迷路試験による記憶力の低下、ポールテストによる共同運動性の低下が明らかになった。以上から、Tg megが小胞体ストレスによって神経細胞死を起こす綿製変性疾患のモデルであることが示された。

A. 研究目的

Tissue plasminogen activatorとその阻害蛋白 Plasminogen activator inhibitor (PAI)に代用されるように、serine proteinaseとその阻害蛋白serine proteinase inhibitors (serpinsと総称される)は生体内における種々の生命現象に関わっている。一般に、Serpinsは複雑な蛋白構造を持ち、小胞体内で高次修飾され、細胞外に運ばれるため、serpinsの変異は小胞体内に異常なserpin蛋白の蓄積をもたらし、結果、serpinopathyと呼ばれる疾患群を引き起こす。中枢神経系でも神経回路の可塑性に関与するセリンプロテアーゼが存在するが、その阻害蛋白はneuroserpinと呼ばれている。Neuroserpinの変異はFENIBと呼ばれる神経変性疾患を呈する。FENIBは中高年で初発する痴呆を主病態とする神経変性疾患であり、小胞体内に変異したneuroserpinが蓄積しPAS陽性の封入体を形

成することが病理学的特徴である。PAS陽性の封入体の分布は一様でなく、大脳皮質深層、海馬、黒質緻密層などに偏在することが知られている。

メグシンは東海大学の宮田らによって腎糸球体上皮細胞において発現しているセリンプロテアーゼ阻害ペプチドとしてクローニングされた。メグシンを全身に強制発現させたトランスジェニックラットのホモ接合体では、加齢に伴って、糖尿病、腎不全、低蛋白血症、呼吸器障害などを呈し12週齢以前に死亡する。これに対して、Tg Megのヘテロ接合体では生後12ヶ月を経ても主たる臓器異常は見られない。ところが中枢神経系の詳細な観察では、大脳新皮質深層、海馬CA3領域、黒質を中心にPAS (periodic acid Schiff)染色陽性の封入体が散在し、その局在はヒトのFENIBにおけるそれとよく一致していた。Tg megは、ヒトFENIBのモデ

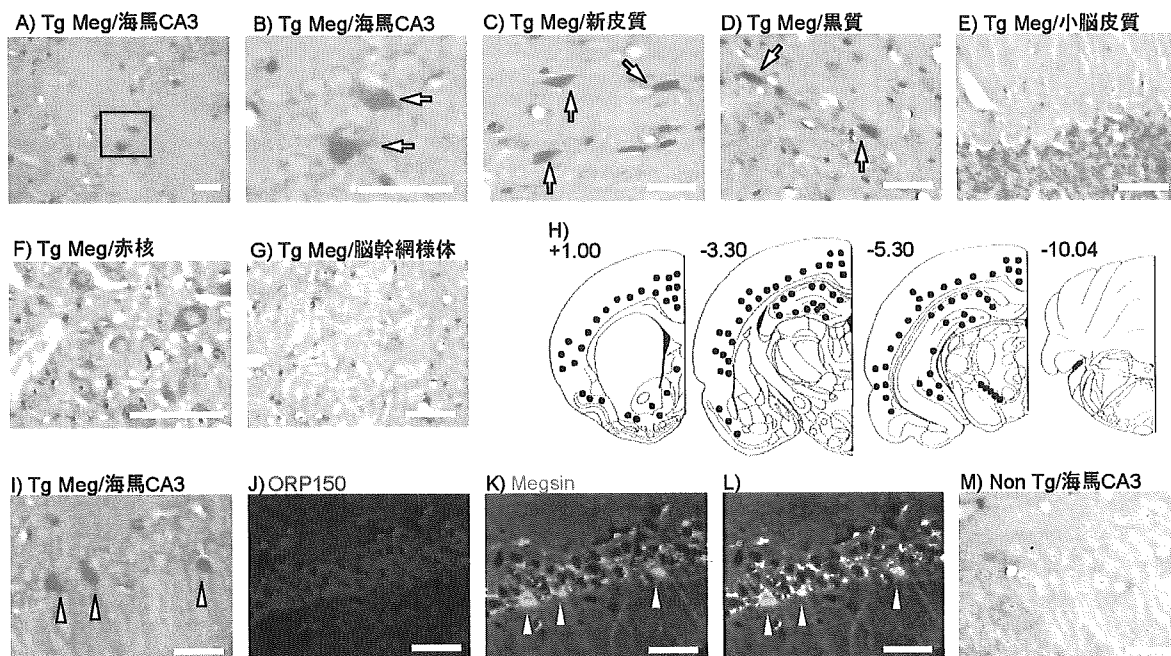


図1: メグシンを過剰発現させたラット(Tg meg)におけるPAS陽性封入体の分布。
Tg meg (4ヶ月齢)では、海馬CA1(A、Aの口内の拡大をBに示す)、大脳新皮質(C)、黒質(D)にPAS染色陽性の封入体を認めた。新小脳(E)、赤核(F)、脳幹網様体(G)には封入体はみられなかった。脳全体のPAS陽性封入体の分布をHに示す。数字はBregmaからの位置。●は、強視野(ほぼ1mm²)に1個のPAS陽性封入体に相当。Tg megの海馬CA3領域(I)は、ORP150強陽性であり(J)、PAS陽性の封入体には強いmegsinの免疫源性が見られた(K及びL)。一方、野生型のラット(Non Tg)では、PAS陽性の封入体はみられなかった(M)。スケールバーは100μm。

ルであるだけでなく、神経細胞に均一に小胞体負荷がかかった場合、特定の神経回路が選択的に脆弱性を示すことがわかる。

B. 研究方法

1) PAS染色、ERストレス蛋白、細胞死マーカーを用いた免疫組織染色

Tg Mrgヘテロ接合体ラット(以下、Tg Megと略す)およびコントロールとしてメグシントランスジーンを持たない野生型ラット(Non Tgと略す)を用い、生後2ヶ月、4ヶ月、6ヶ月の時点で灌流固定し、Bregmaを任意の位置でスライス標本を作成し、免疫組織染色(抗ORP150抗体、抗megsin抗体)を用いた免疫組織染色を行った。また、切片をPAS染色に供した。黒質線条体ニューロンの細胞死は、TH(チロシン水酸化酵素)による免疫阻止染色を行って評価した。

2) ラット行動テスト

海馬神経回路の機能は、Morris水迷路試験によって評価した。直径170cm、深さ45cmの水槽を用い、その中に直径12cm、高さ30cmの透明アクリル製の円柱プラットフォームを、壁から25cm離れたところに設置した。水深は、プラットフォーム+1cmとした。ランダムな3個のスタート地点からプラットフォームにたどり着くまでの時間(mean latency)を、1日目から7日目まで計測し、くり返しのあるANOVA法によって統計検定した。また、協調運動の評価はポールテストによった。直径10cm、高さ100cmの円柱材に滑り止めとして金網をはり、最上部にラットを上向きに捉まらせ、回転し下を向くまでの時間(time to turn around)と、床面に付くまでの時間(time to reach the floor)を計測した。推計学的評価は同様に、くり返しのあるANOVA法によった。

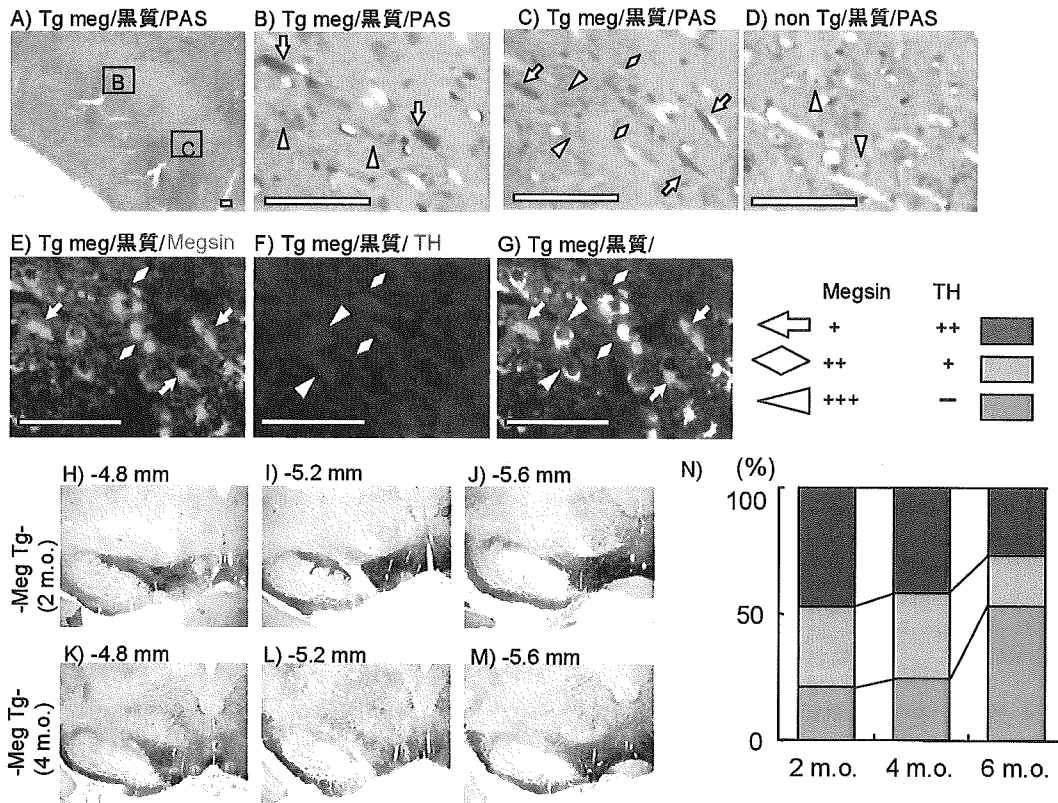


図2: メグシンラット(Tg meg)に見られる黒質変性。

Tg meg (4ヶ月齢)では、黒質緻密層を中心にPAS陽性の封入体が見られた。AはPAS染色による弱拡大像、A中のBおよびCをそれぞれ拡大(BおよびC)したものを示す。Dに、野生型(Non Tg)のPAS染色像を示す。切片Cを抗megin抗体(E: 緑)および抗TH抗体(F: 赤)で染色したもの、およびそれらの合成画像を示す(G)。図中のシンボルは、1) 黒質線条体神経細胞のマーカであるTHが強陽性でmeginが弱陽性の神経細胞(矢印)、2)TH、megin共に陽性の細胞(ひし形)、3)THの免疫原性を既に失っているが、meginが強陽性であるもの(三角)を示す。2ヶ月齢のTg meg (H-J)および、4ヶ月齢(K-M)のDAB法によるTH染色像を示す。図中の数字は、Bregmaよりの位置を示す。また、Nには、黒質緻密層錐体細胞の染色パターンを解析し、1) 黒質線条体神経細胞のマーカであるTHが強陽性でmeginが弱陽性の神経細胞(赤)、2)TH、megin共に陽性の細胞(オレンジ)、3)THの免疫原性を既に失っているが、meginが強陽性であるもの(緑)のしめる割合を経時的に2ヶ月齢から6ヶ月齢まで計測したものを示す。スケールバーは100 μ m。

C. 研究結果

1)PAS陽性の封入体の分布(図1)

Tg Mrgでは、野生型ラット(Non Tg)と比較して、生後4ヶ月で、PAS陽性の封入体が認められた。その分布は一様でなく、海馬CA3領域、大脳新皮質深層、黒質緻密層などにみられ、基底核、視床、小脳皮質、赤核、および脳幹にはPAS陽性の封入体は見られなかった。また、Tg meg

の海馬CA3神経細胞では、Non Tgと比しORP150が強く発現しており、慢性的な小胞体負荷状況にあることが示唆された。PAS陽性の封入体は神経細胞内に局在し、抗megin抗体で強陽性に染色された。2)黒質緻密層に於けるPAS陽性封入体と神経細胞死(図2) 黒質では、生後4ヶ月で緻密層を中心にPAS陽性の封入体が観察された。黒質緻密層の錐体細胞にPAS陽性の封入体が見られ、網様層の細胞に封入体はほとんど見ら

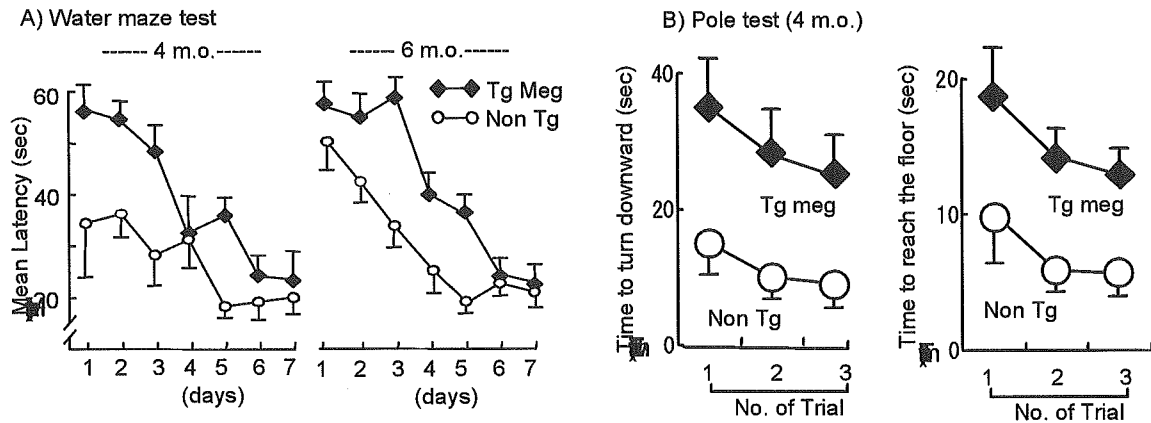


図3: メグシンラットにおける行動異常

4ヶ月齢および6ヶ月齢のTg megのMorris水迷路試験の結果をしめす(◆: Tg megおよび、○: Non Tg)。同様に4ヶ月齢におけるポールテストの結果を示す。

れなかった。また、野生型ラット(non Tg)でも黒質緻密層の錐体細胞にPAS陽性の封入体は見られなかった。一方、Tg megの黒質緻密層の錐体細胞は1)黒質線条体神経細胞のマーカーであるTHが強陽性でmegsinが弱陽性の神経細胞、2)TH、megsin共に陽性の細胞、3)THの免疫源性を既に失っているが、megsinが強陽性であるもの、の3群に分かれた。また、Tg megの加齢に伴って、より3)を示す神経細胞の割合が増加した。これらは、慢性的に進行する神経細胞死も、megsinが小胞体に貯留しおこる神経細胞死のくり返しであることを示している。また、黒質緻密層ではTH染色陽性細胞が加齢に伴って著減し、黒質神経細胞の変性がTg megで進むことが示された。3)Tg megにおける記憶および協調運動障害(図3)

Tg megでは、海馬CA3領域、および黒質緻密層がPAS陽性封入体の出現とともに神経変性を起こす事実と一致して、水迷路で記憶力の低下を示した。また、ポールテストでは、生後4ヶ月齢のラットで、協調運動障害を認めた。これらは、組織学的に見られた神経変性だけでなく、神経回路としても機能に異常を来していることを示している。

D. 考察

昨年度の報告書で、アストロサイトを用い

た実験系で、発現されたmegsinが過剰な小胞体ストレスによって小胞体内に蓄積し、細胞死を起こすことを示している。さらに、今年度は神経細胞死に均一にmegsinを発現しているTg megでも、神経細胞死の起こり方は神経領域に特異的であることを示した。すなわち、同様な小胞体ストレスが存在しながら、大脳皮質深層部、海馬CA3領域、さらに黒質緻密層などは選択的脆弱性を示す。これらの部位がなぜ、選択的に神経細胞死を引き起こすかは明確ではない。しかし、我々は海馬領域にはグルタミン酸などの興奮性アミノ酸などにより潜在的な小胞体ストレスが存在することを示している。また、黒質線条体ニューロンにおいてもPael (Parkin associated endothelin like) 受容体など、小胞体ストレス関連蛋白の発現が報告されている。

E. 結論

メグシントランスジェニックラット(Tg Meg)において、PAS陽性の封入体が脳の特異的部位に見られ、かつ神経変性を伴っていることを示した。このことは、Tg megにおける神経変性がヒトのFENIBのそれと極めて一致していることを示している。さらに、均一に小胞体ストレスが負荷されていても、脳の特異部位が神経変性をきたすことは、今後、小胞体理論に基づくアルツハイマー病やパーキンソン病との関連にお

いて本動物が有力なモデルになりうることを示している。

F. 健康危機情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Nakatani Y, Kaneto H, Kawamori D, Yoshiuchi K, Hatazaki M, Matsuoka TA, Ozawa K, Ogawa S, Hori M, Yamasaki Y, Matsuhisa M. Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *J Biol Chem.* 2005; 280(1): 847-851

Bando Y., Katayama T., Taniguchi M., Matsuo N., Ishibashi T., Ogawa S., Tohyama M. RA410/Sly1 suppresses MPP+ and 6-hydroxydopamine induced cell death in SH-SY5Y cells. *Neurobiology of Disease* 2005; 18: 143-151

Ozawa K, Miyazaki T, Hori O, Kitao Y, Tamatani T, and Ogawa S. The ER chaperone 150 kDa Oxygen Regulated Protein (ORP150) improves insulin resistance in Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes.* 2005; 54(3): 657-663

Aleshin AN, Sawa Y, Kitagawa-Sakakida S, Bando Y, Ono M, Memon IA, Tohyama M, Ogawa S, and Matsuda H. 150-kDa oxygen-regulated protein attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2005; 38(3): 517-25.

Inagi R, Onogi H, Nangaku M, Ueyama H, Kitao Y, Ogawa S, Kurokawa K, Couser WG, and Miyata T. Involvement of endoplasmic reticulum (ER) stress in podocyte injury associated with a novel transgenic model of serpinopathy. *Kidney International.* 2005; 68: 2639-2650

Nakatani Y, Kaneto H, Hatazaki M, Yoshiuchi Y, Kawamori D, Sakamoto K, Matsuoka T, Ogawa S, Yamasaki Y, and Matsuhisa M. Increased stress protein ORP150 autoantibody production in Type 1 diabetic patients. *Diabet. Med.* 2006; 23: 216-219

Hori O, Miyazaki M, Tamatani T, Ozawa K, Takano K, Okabe M, Ikawa M, Hartmann M, Mai P, Stern M, Kitao Y, and Ogawa S. Deletion of SERP1/RAMP4, a component of the endoplasmic reticulum (ER) translocation sites, leads to ER stress. 2006. *Mol. Cell. Biol.*

In press.

2. 学会発表

小川智ほか、Modulation of cellular biosynthetic properties by ER-stress. 国際レドックス会議 2005年10月京都。ほか

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

厚生労働省科学研究補助金(こころの健康科学研究事業)

分担研究報告書

小胞体ストレス制御物質の探索と、その神経保護作用について

分担研究者：堀 修

研究要旨

小胞体ストレスに対し脆弱性を示すF9 Herp欠損細胞及びPC12細胞を用いて、小胞体ストレス制御物質の探索を行った。約300種類の化合物(天然物100, 合成物200)のうち、2種類の化合物(compound A:天然物, compound B:合成物)に小胞体ストレス由来細胞死抑制作用を認めた。このうちcompound Bには強力な抗酸化作用も存在し、SH-SY5Y細胞における、 H_2O_2 や6-OHDA誘導性の細胞死を阻害した。また、マウスパーキンソン病モデル(6-OHDA及びMPTP投与モデル)に於いても、compound Bは黒質緻密層の神経細胞に対する保護作用を示した。以上の事より、compound Bは、小胞体ストレス及び酸化ストレスを制御する新しい神経保護物質として、今後、神経変性疾患の予防・治療への新たなターゲットになる可能性が示唆された。

A. 研究目的

パーキンソン病やアルツハイマー病、ポリグルタミン病と言った、神経変性疾患の少なくとも一部において、酸化ストレスや蛋白分解系(ユビキチン-プロテアゾーム系)の異常と共に、小胞体ストレス・小胞体ストレス由来細胞死の関与が示唆されている。我々は、これまでに、小胞体ストレス関連疾患をターゲットにした、新たな薬剤スクリーニング系を開発した(特願2004-57717)。これは、F9Herp欠損細胞が小胞体ストレスに脆弱性(Genes to Cells, 2004, 9, 457-469)を示すことを利用して、小胞体ストレス由来細胞死を抑制する化合物を探索するもので、昨年度の結果より、小胞体からの Ca^{++} 流出を抑制するDantroleneや、 α -tocopherolや β -carotene等、一部の抗酸化剤にもHerp欠損細胞に於ける小胞体ストレス由来細胞死を抑制する効果を認めた。本年度は、実際に約300種類の化合物についてスクリーニングを行い、得られた化合物について、その神経保護効果を検討した。

B. 研究方法

1) 被験物質

約100種類の天然物、及び約200種類の合成化合物を、明治乳業 山田 昌司氏、岐阜薬科大学 飯沼 宗和教授、福山大学 日比野 俐教授より御供与頂いた。

2) 1次スクリーニング(F9 Herp欠損細胞)

96穴、或いは24穴カルチャープレートにゼラチンコートした後、F9 Herp欠損細胞、及びコントロールとして野生型F9細胞を播種した。2日後、小胞体ストレス条件下(例えばツニカマイシン $0.8\mu\text{g/ml}$ で細胞処理)で、被験物質を加えて48時間培養し、細胞生存率をcell counting-8 assayにより測定した。

3) 2次スクリーニング(PC12, SH-SY5Y細胞)

1次スクリーニングにてポジティブコントロールと同等以上の細胞保護効果を認めた化合物について、その神経保護作用をPC12細胞にて検討した。小胞体ストレスとしてツニ

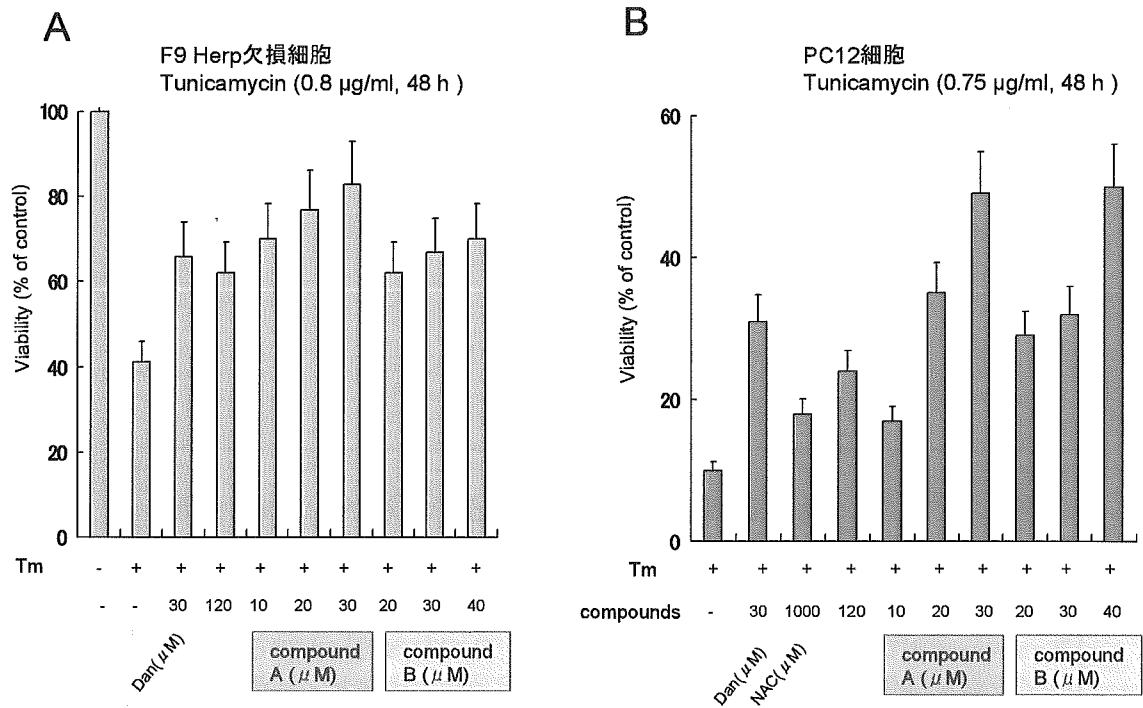


図1 compound A, Bの小胞体ストレス由来細胞死抑制効果

A, F9 Herp欠損細胞における効果。ツニカマイシン及び被験物質を同時投与し、48時間後に生存細胞数をcell counting-8 assay kitで測定した。グラフは、ツニカマイシン非存在時の細胞数に対する%で示している。B, PC12細胞における効果。ツニカマイシン及び被験物質を同時投与し、48時間後に生存細胞数をMTT assayで測定した。グラフは、ツニカマイシン非存在時の細胞数に対する%で示している。Dan: Dantrolene, a-toco: a-tocopherol, NAC: N-acetyl cysteine

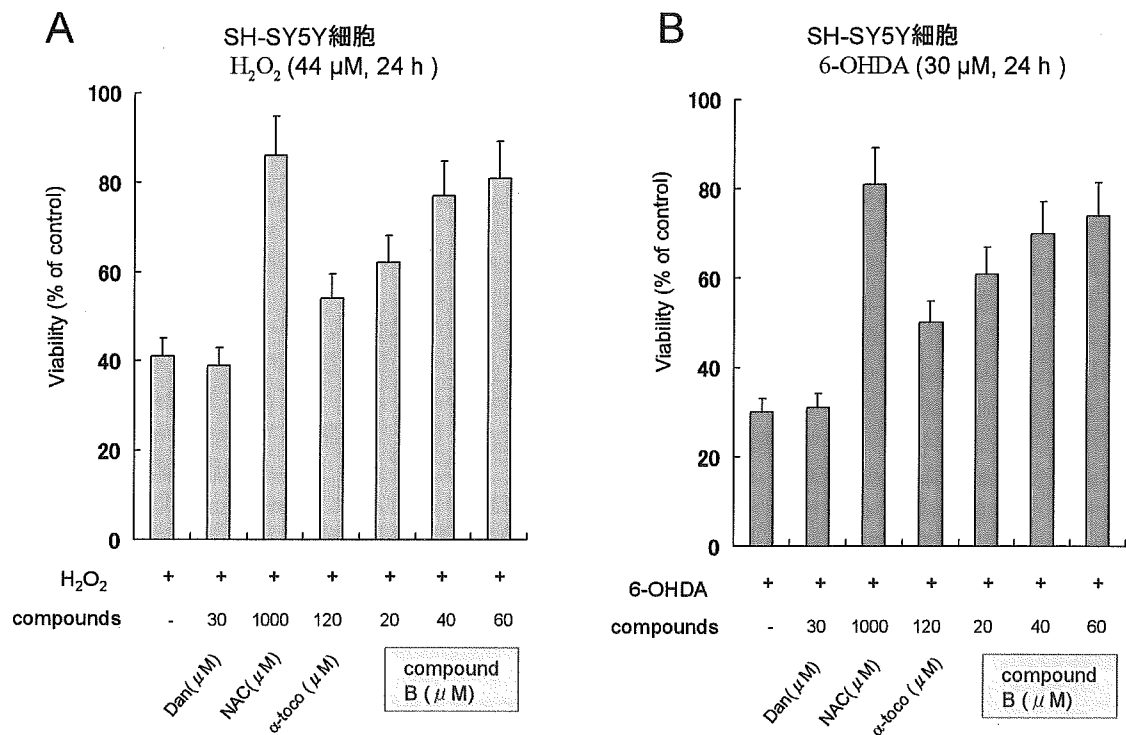


図2 compound Bの酸化ストレス由来細胞死抑制効果

神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞を被験物質で24時間前処理し、その後H₂O₂ (A)又は6-OHDA (B)と被験物質を同時投与した。24時間後に、生存細胞数をMTT assayで測定し、H₂O₂ (A)又は6-OHDA (B)非存在時の細胞数に対する%で示した。Dan: Dantrolene, a-toco: a-tocopherol, NAC: N-acetyl cysteine

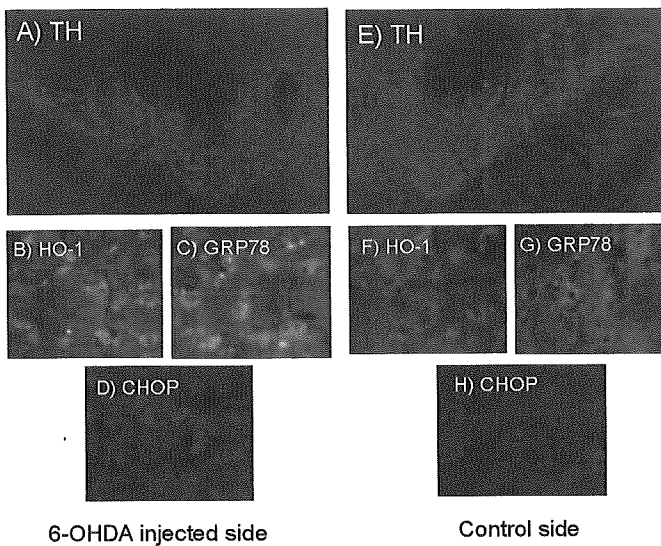


図3 6-OHDAマウス片側脳内投与後の、黒質緻密層における変化
6-OHDAマウス片側脳内投与5日後の、TH、HO-1、GRP78、CHOPの発現を免疫染色法により評価した。6-OHDA投与側に、THの減少とGRP78、HO-1、CHOPの増加を認める。

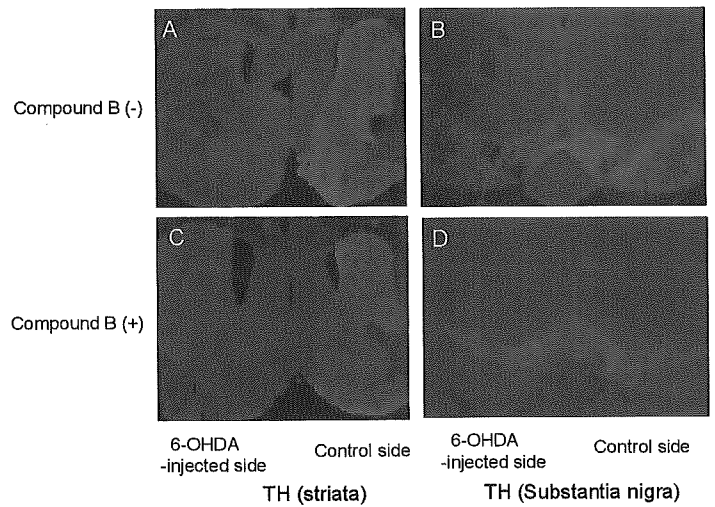


図4 6-OHDAマウス片側脳内投与に対するcompound Bの効果
compound Bを6-OHDAマウス片側脳内投与3日前より、投与後3日目まで連日マウス腹腔内に投与した(C, D)。コントロールマウスには、溶解液のみを投与した(A, B)。6-OHDA投与後5日目で灌流固定し、線状体(A, C)及び黒質緻密層(B, D)におけるTH抗原量を比較した。

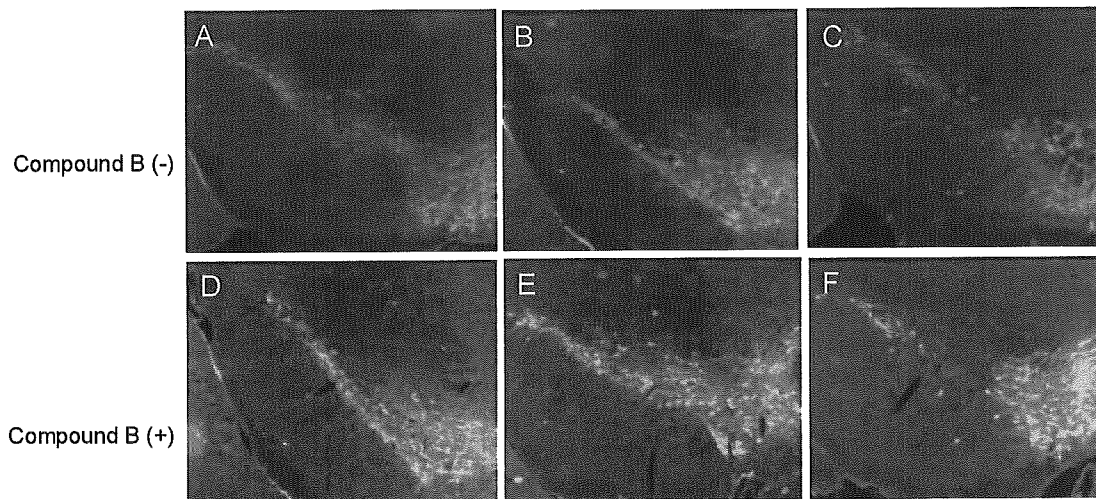


図5 マウスMPTP投与モデルに対するcompound Bの効果
compound BをMPTP投与3日前より、投与後3日目まで連日マウス腹腔内に投与した(D, E, F)。コントロールマウスには、溶解液のみを投与した(A, B, C)。MPTP投与後5日目で灌流固定し、黒質緻密層におけるTH抗原量を比較した。

カマイシン (0.8 μ g/ml) を用いた。さらに、SH-SY5Y細胞を用いて、酸化ストレスに対する神経保護作用を検討した。被験物質を24時間前に前投与した後、H2O2 (44 μ M) または6-OHDA (30 μ M) 及び被験物質を投与し、24時間後に細胞生存率をMTT assayにより判定した。

4) 3次スクリーニング (マウスパーキンソン病モデル)

C57BL/6マウス (雄、25-30g) に対し、① 6-OHDA (4 μ g/ μ l x 1.5 μ l) のマウス片側脳内投与 (medial forebrain bundle: MFB に注入)、或いは② MPTP (20mg/kg x 2回/day) のマウス腹腔内投与を行った。5日後灌流固定し、20 μ m の厚さで切片を作製した。被験物質の投与は、6-OHDA 或いは MPTP 投与3日前から compound B (10mg/kg/day; 1mg/ml in 10% cremophor / 90% saline) 又はコントロール (10% cremophor / 90% saline) を連日腹腔内投与し、

6-OHDA或いはMPTP投与後3日目まで続けた。Compound Bの神経保護効果は、黒質及び線状体におけるTH(tyrosine hydroxylase)の抗原性の強さにより評価した。また、酸化ストレス、小胞体ストレス関連遺伝子の発現も、免疫学的手法により検討した。

C. 研究結果

1) 1次スクリーニング (F9 Herp欠損細胞)

約300種類の化合物(天然物100, 合成物200)について、F9 Herp欠損細胞におけるツニカマイシン誘導性細胞死に対する細胞保護効果を測定した。その結果、2種類の化合物(compound A:天然物, compound B:合成物)に細胞死抑制効果を認めた。図1Aに、F9 Herp欠損細胞における、ツニカマイシン誘導性細胞死の抑制効果を示す。Compound A(天然物)は、ポジティブコントロールのダントロレン以上の細胞死抑制効果を示し、compound B(合成物)は、ダントロレンとほぼ同等の効果を確認した。

2) 2次スクリーニング (PC12, SH-SY5Y細胞)

次に神経系細胞株であるPC12細胞で同様の実験をしたところ、やはりcompound A, B共ダントロレン以上の細胞死抑制効果を確認した(図1B)。さらにcompound Bは、ドーパミン作動性の神経芽細胞種SH-SY5Yにおいて、H₂O₂及び6-OHDA誘導性細胞死を強力に抑制した(図2A,B)。これらのことより、compound Bは小胞体ストレス及び酸化ストレスのいずれに対しても、細胞保護効果を示すと考えられた。

3) 3次スクリーニング (マウスパーキンソン病モデル)

マウスパーキンソンモデルにおけるcompound Bの神経保護効果を調べるために、①6-OHDA(4µg/µl x 1.5µl)のマウス片側脳内投与(medial forebrain bundle:MFBに注入)、及び②MPTP(20mg/kg x 2回/day)のマウス腹腔内投与実験を行った。まず、6-OHDA脳内注入後5日目における、黒質緻密層(SNpc)でのTH陽性細胞の変化と、各種ストレスマーカーの発現を検討した。その結果、TH陽性細胞の減少(脱落)と、同部位での酸化ストレスマーカーHeme Oxygenase-1(HO-

1)、小胞体ストレスマーカーGRP78、CHOPの発現増加を認めた(図3)。MPTP投与後も、同様の変化を認めた。これらの事より、マウスパーキンソン病モデルにおいて、酸化ストレス及び小胞体ストレス両方が増加していることが示唆された。

次に、6-OHDA投与3日前より投与後3日まで、連日compound Bを腹腔内投与してみると、6-OHDA投与により引き起こされる、線状体及び黒質緻密層でのTH免疫原性の減少が抑制された(図4)。Compound Bによる、同様の神経保護効果は、MPTP投与モデルにおいても確認された(図5)。

D. 考察

本年度行った小胞体ストレス制御物質の探索により、compound A, Bと言う2つの化合物を見いだした。両化合物とも、その小胞体ストレスに対する効果は、神経系細胞株PC12細胞においても確認され(図1B)、さらに、compound Bには、強い抗酸化作用も存在した(図2A)。予備実験の結果から、実験的パーキンソン病薬剤6-OHDAやMPTPをマウスに投与した場合、酸化ストレスのみならず小胞体ストレスも引き起こされる事が確認されたため(図3)、それらの系に対するcompound Bの効果調べたところ、いずれのモデルにおいても、黒質緻密層、線状体におけるTHレベルの低下(脱落)を抑制した(図4, 5)。

Compound A, Bの小胞体ストレスに対する作用メカニズムについては現在探索中であるが、これまでに以下のことが示唆されている。①compound A, Bとも軽度に細胞内蛋白合成を低下させ、小胞体における負荷を軽減している。②compound Aは、eIF2a及びNrf2のシグナルを活性化させる。③compound Bの小胞体ストレス制御作用は、抗酸化作用と関連しており、小胞体におけるredoxのバランスを制御している可能性がある。また、compound Bの抗酸化作用の一部は、radical scavengerとしての作用による可能性が示唆されている。今後、これらの化合物の細胞保護効果を様々な病態モデルで確認することにより、神経変性疾患予防・治療のための新たな戦略が見いだされると考えられる。

E. 結論

F9 Herp欠損細胞を用いて小胞体ストレス制御物質の探索を行い、2種類の化合物 (compound A, B) を得た。このうち compound Bには強い抗酸化作用も認め、H₂O₂ やパーキンソン病のモデル薬剤6-OHDAにより誘導される神経細胞死を抑制した。マウスにおいても、6-OHDAやMPTP投与モデルにおいて、黒質緻密層・線状体のTH陽性細胞の減少を抑制した。これらのことより、compound Bは、小胞体ストレス及び酸化ストレスを制御する、新しい神経保護物質であると考えられた。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文

1 Hori O, Miyazaki M, Tamatani T, Ozawa K, Takano K, Okabe M, Ikawa M, Hartmann E, Mai P, Stern DM, Kitao Y, and Ogawa S. Deletion of SERP1/RAMP4, a component of the endoplasmic reticulum (ER) translocation sites, leads to ER stress. 2006. Mol. Cell. Biol. In press

2 Ozawa K, Miyazaki M, Matsuhisa M, Takano K, Nakatani Y, Hatazaki M, Tamatani T, Yamagata K, Miyagawa J, Kitao Y, Hori O, Yamasaki Y, Ogawa S. The endoplasmic reticulum chaperone improves insulin resistance in type2 diabetes. *Diabetes*. 2005 Mar;54 (3):657-63.

2. 学会発表

1. Hori O, Ogawa S. et al., Regulation of endoplasmic reticulum (ER) stress at translocational site into the ER The American Society for Cell Biology, 2005

2. Tabata Y, Hori O, Ogawa S. et al., A screening system for compounds to protect cells against endoplasmic reticulum (ER) stress The American Society for Cell Biology, 2005

3. Takano K., Hori O, Ogawa S. et al., OVEREXPRESSION OF MEGSIN INDUCES NEURONAL DEGENERATION: ROLE OF THE ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS RESPONSE The American Society for Cell Biology, 2005

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。) 特になし

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

厚生労働省科学研究補助金(こころの健康科学研究事業)

分担研究報告書

小胞体環境とオートファジー 経路の解明

分担研究者 内山安男

研究要旨

低酸素-脳虚血負荷後の海馬CA1領域における遅延型神経細胞死とリソソームカテプシンDおよびオートファジーとの関連を検討し、オートファジーが誘導されたCA1錐体細胞が細胞死に陥ることを見いだした。死に行く細胞にはたくさんのオートファジー小体が見られることは、カテプシンD欠損マウスとgreen fluorescent protein (GFP)とオートファジー関連タンパク質であるmicrotubule associated protein 1 light chain 3 (LC3)を融合したタンパク質 (GFP-LC3)を発現するトランスジェニックマウスを用いた検討、電子顕微鏡による観察でも明らかとなった。今回オートファジーを伴う遅延型神経細胞死が細胞死の実行因子であるカスパーゼ3依存性か否か検討するためカスパーゼ3欠損マウスを用いて低酸素-脳虚血負荷後の海馬を観察したところ、対照群と少なくとも同程度のTUNEL陽性の神経細胞が出現することが分かった。

A. 研究目的

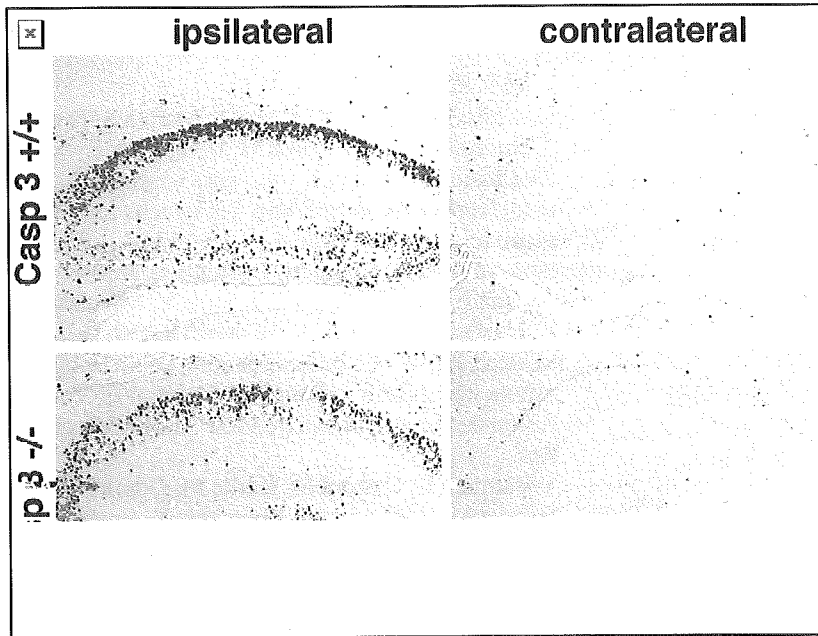
オートファジーは、細胞が自らの構成成分を小胞体様の隔離膜で囲い込み、一般細胞質から隔離し、リソソームと融合することによって分解する現象であり、正常の細胞では代謝の恒常性維持に必須の現象である。通常、オートファジーの亢進に基づくリソソームの活性化は、細胞の生存を維持するために必要なアミノ酸や生理活性のあるモノマーの供給源として機能することが推測されている。しかし、胎生期の一部の神経細胞の死やある種の神経疾患による細胞死は、明らかにアポトーシスやネクローシスの像と異なり、細胞質にオートファゴソームが充満した形態で死に至る。この死は、オートファジー性細胞死 (II型神経細胞死 ; Clarke, P. (1991)) と呼ばれる。近年、多くの神経変性疾患でポリグルタミン鎖に代表されるように細胞内封入体の形成と細胞死との関係が報告されている。細胞内の不要なポリペプチド鎖は、可溶性であればユビキチン-プロテアソーム系で分解され、不溶性であればオートファジー (自食作用) によりリソソーム系で分解されることが

予想される。実際、多くの神経細胞死でオートファジーが誘導される。しかし、その構造を正確に把握し、分子レベルでオートファゴソームであることを指摘した研究はほとんどない。

私達は、小胞体ストレスとの関連性が高い、短時間脳虚血に伴う遅延型神経細胞死では、リソソーム/オートファジーが関与する積極的細胞死であることを指摘した

(Nitatori et al., 1995)。また、オートファジー/リソソームに注目して、細胞死の分子機構をラット褐色細胞腫由来のPC12細胞で検討した結果、血清除去に基づくPC12細胞の細胞死には、カスパーゼ依存性の経路と独立して、オートファジーと、その下流でリソソームカテプシンDとBで制御される細胞死の経路が存在することを明らかにした

(Shibata et al., 1998; Isahara et al., 1999)。私達はさらに、生後1週齢のマウスの低酸素-虚血負荷を受けた神経細胞で電子顕微鏡的にオートファゴソームがたくさん認められること、オートファジーのマーカータンパク質であるLC3は細胞質タイプのLC3-Iから膜結合型のLC3-IIへの変換が起り、顆粒状の局在を



カスパーゼ3欠損(Casp 3 -/-)および対照群(Casp 3 +/+)マウスの45分の低酸素-脳虚血負荷36時間後の海馬領域のTUNEL染色像。両群とも海馬全体にTUNEL陽性細胞が出現している。
スケールバー:100 μm

生後1週齢のC57BL/6J系統の野生型マウスおよびC57BL/6J系統にバッククロス済みのカスパーゼ3欠損マウス用い、低酸素-脳虚血(H-I)負荷をかけ、そ

呈することを明らかにしてきた。

しかし現在のところ、オートファジーが誘導されることで細胞死が起きる時に、オートファジー現象によって細胞死が起きるのか、オートファジーによって次の何かが誘発されて細胞死に繋がるのか、全く不明である。私達は、これまでの実験から、リソソームカテプシンDがオートファジーと関連して細胞死に関わるプロテアーゼと推測している。一方従来の報告によると、げっ歯類の低酸素-虚血負荷モデルではカスパーゼ3をはじめとするアポトーシスの実効因子がその神経細胞死に関わることが報告されてきた。しかし、オートファジー性細胞死はその形態像がいわゆる典型的なアポトーシス像と異なることからカスパーゼ非依存性である可能性がある。そこで低酸素-虚血負荷モデルにおいてカスパーゼ依存性の細胞死とオートファジー依存性の細胞死の寄与の度合いを比較検討することはそのメカニズムにせまる上で重要である。

アポトーシスの代表的な実効因子であるカスパーゼ3の欠損マウスは当初の解析では胎生致死となるとされたが(Kuida et al., 1996)、C57BL/6系統にバッククロスすることにより出生し、繁殖力を持つことが分かっている(Leonard et al., 2002)。そこで本研究ではこの系統のマウスを低酸素-虚血負荷をかけ、神経細胞死の程度を対照群と比較検討することを試みた。

B. 研究方法

の後の海馬CA1領域の錐体細胞の変化を観察した。これらマウスの片側総頸動脈を結紮し、1時間放置後37度に保温した容器(酸素濃度8%、窒素濃度92%に調節)に同マウスを45分間放置し、経時的にこれらマウスを免疫組織化学用(4%パラホルムアルデヒド溶液、0.1 Mリン酸緩衝液、pH 7.4)に灌流固定した後、海馬領域を含む脳を取り出し、それぞれパラフィンないしOCTコンパウンドに包埋し、光学顕微鏡用の連続切片を作製した。光学顕微鏡用切片を用いて、ヘマトキシリンエオシン染色、TUNEL染色、TUNEL染色と活性型カスパーゼ3ないし7に対する抗体による2重染色を行なった。

C. 研究結果

カスパーゼ3欠損マウスおよび対照群の野生型マウスを用いて、低酸素-虚血負荷後36時間の時点で、同領域の錐体細胞でTUNEL陽性となる細胞数を比較検討した。図に示す如く、海馬CA1錐体細胞でTUNEL陽性の細胞数は対照群と全く変化がなかった。カスパーゼ7はカスパーゼ3と酵素活性が類似しているアポトーシスの実効因子であるが、活性型カスパーゼ7に対する特異抗体を用いて免疫染色を行なった結果、野生型、カスパーゼ欠損マウスともにカスパーゼ7陽性細胞を認めなかった。

D. 考察

低酸素-虚血負荷による海馬錐体細胞の神経細胞死におけるカスパーゼ3の役割についてその欠損マウスを用いた実験により検討を行った。その結果、カスパーゼ3が無くても野生型と同様虚血による神経細胞死が誘導されることが判明した。またカスパーゼ3類似の分子であるカスパーゼ7が代償的に活性化されている可能性も否定された。最近、カスパーゼ3と7のダブルノックアウトマウスの細胞を用いた実験結果が発表されたが、それによると、この2酵素を欠失した線維芽細胞は、ミトコンドリアを介したアポトーシスと細胞死受容体を介したアポトーシスの両方に強い耐性を示すことが分かった。さらに従来カスパーゼ非依存性細胞死に関わるとされてきたApoptosis Inducing Factor (AIF)の核への移行も完全に抑えた(Lakhani et al., 2006)。この知見と今回得られた実験結果を考え合わせると、低酸素-虚血負荷による海馬錐体細胞の神経細胞死においては、カスパーゼ3による典型的なアポトーシスの寄与はほとんどないことが分かる。また近年、低酸素-虚血負荷においても、AIFがカスパーゼ非依存性の細胞死の因子とする報告が散見されるが、このAIFを私達がカスパーゼ3欠損マウスで見いだしたカスパーゼ非依存性の細胞死の実効因子と考えることは、上記ダブルノックアウトマウス報告からすると困難である。最近、神経系特異的にオートファジーを起こさないノックアウトマウス(Atg7ノックアウトマウス)が作成された(Komatu et al., in press)。現在私達はこのマウスを用いてカスパーゼ3欠損マウスと同様低酸素-虚血負荷を行ない、オートファジー性細胞死の寄与を検討しているところである。

E. 結論

低酸素-虚血負荷実験による海馬錐体細胞の神経細胞死はカスパーゼに全く依存していないことがアポトーシスの代表的な実効因子であるカスパーゼ3欠損マウスを用いた実験から明らかとなった。

F. 健康危機情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K (in press) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration. *Nature*
- Ishii M, Iwai K, Koike M, Ohshima S, Kudo-Tanaka E, Ishii T, Mima T, Katada Y, Miyatake K, Uchiyama Y, Saeki Y (in press) RANKL-induced expression of tetraspanin CD9 in lipid raft membrane microdomain is essential for cell fusion during osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res.*
- Yoshimura K, Shibata M, Koike M, Gotoh K, Fukaya M, Watanabe M, Uchiyama Y (in press) Effects of RNA interference of Atg4B on the limited proteolysis of LC3 in PC12 cells and expression of Atg4B in various rat tissues. *Autophagy*
- Zhu C, Xu F, Wang X, Shibata M, Uchiyama Y, Blomgren K, Hagberg H (in press) Different apoptotic mechanisms are activated in male and female brains after neonatal hypoxia-ischaemia. *J Neurochem.* 96:1016-27.
- Shimamura M, Sato N, Waguri S, Uchiyama Y, Hayashi T, Iida H, Nakamura T, Ogihara T, Kaneda Y, Morishita R (2006) Gene transfer of HGF gene improves learning and memory in the chronic stage of cerebral infarction. *Hypertension* 47:742-51
- Sasaki T, Gotow T, Shiozaki M, Sakaue F, Saito T, Julien JP, Uchiyama Y, Hisanaga S (2006) Aggregate formation and phosphorylation of neurofilament-L Pro22 Charcot-Marie-Tooth disease mutants. *Hum Mol Genet.* 2006 15:943-52.
- Shacka J, Klocke BJ, Shibata M, Uchiyama Y, Datta G, Schmidt RE, Roth KA (2006) Bafilomycin A1 Inhibits Chloroquine-Induced Death of Cerebellar Granule Neurons. *Mol Pharmacol.* 69:1125-36.
- Shin HW, Kobayashi H, Kitamura M, Waguri S, Suganuma T, Uchiyama Y, and Nakayama K (2005) Roles of ARFRP1 (ADP-ribosylation factor-related protein 1) in post-Golgi membrane trafficking. *J Cell Sci* 118: 4039-4048
- Koike M, Shibata M, Waguri S, Yoshimura K, Tanida I, Kominami E, Gotow G, Peters C, Figura Kv, Mizushima N, Saftig P and Uchiyama Y (2005) Participation of autophagy in storage of lysosomes in neurons from mouse models of neuronal ceroid-lipofuscinoses (Batten disease). *Am J Pathol* 167:1713-1728
- Oonuki Y, Yoshida Y, Uchiyama Y, Asari A (2005) Application of fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis to analysis of

disaccharides and oligosaccharides derived from glycosaminoglycans. *Anal Biochem* 343: 212-222
Yu WH, Cuervo AM, Kumar A, Peterhoff CM, Schmidt SD, Lee JH, Mohan PS, Mercken M, Farmery MR, Tjernberg LO, Jiang Y, Duff K, Uchiyama Y, J Näslund, Mathews PM, Cataldo AM, Nixon RA (2005) Macroautophagy—a novel amyloid- β (A β) peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 171: 87-98

Takemoto M, Koike M, Mori Y, Yonemoto S, Sasamoto Y, Kondo K, Uchiyama Y, Yamanishi K (2005) Human herpesvirus 6 ORF14 protein and cellular p53 interact with each other and are contained in the virus. *J Virol* 79: 13037-13046
Yoshida H, Kawane K, Koike M, Mori Y, Uchiyama Y, Nagata, S (2005)

Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells. *Nature* 434: 754-758

Shimizu, T., Hayashi, Y., Yamada, J., Zhang, J., Yamasaki, J., Ukai, K., Koike, M., Mine, K., Figura, K., Peters, C., Saftig, P., Fukuda, T., Uchiyama, Y., Nakanishi, H. (2005) Proteolytic Degradation of Glutamate Decarboxylase Mediates Disinhibition of Hippocampal CA3 Pyramidal Cells in Cathepsin D-deficient Mice. *J Neurochem* 94:680-690

Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, Ezaki J, Mizushima N, Ohsumi Y, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K, Chiba T (2005) Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol* 169: 425-434

2. 学会発表

Yasuo Uchiyama. Roles of lysosomal proteinases in autophagic cell death. . 2005 Gordon Research Conference on "Autophagy in Stress, Development & Disease", 2005年4月、Il Ciocco
後藤邦仁、堂野恵三、廬震輝、丸橋繁、宮本敦史、武田裕、永野浩昭、梅下浩司、内山安男、門田守人「ラット肝移植における冷保存再灌流傷害へのオートファジーの関与について」第41回日本移植学会総会、2005年10月、朱鷺メッセ

Charleen T. Chu, Yasuo Uchiyama, Ronald L. Hamilton, Jian-hui Zhu. EXTRACELLULAR SIGNAL REGULATED PROTEIN KINASE ACTS UPSTREAM OF BOTH AUTOPHAGY AND CELL DEATH IN MPP+ TREATED NEURONS. 35th Annual Meeting Society for Neuroscience, 2005年11月、ワシントン
John J. Shacka, Barbara J. Klocke, Masahiro Shibata, Yasuo Uchiyama, Kevin A. Roth. BAFILOMYCIN A1 PREVENTS

CHLOROQUINE-INDUCED NEURONAL CELL DEATH. 35th Annual Meeting Society for Neuroscience, 2005年11月、ワシントン
Yasuo Uchiyama, Masato Koike, Masahiro Shibata. Participation of autophagy in storage of lysosomes in neurons from mouse models of neuronal ceroid-lipofuscinoses (Batten Disease) International conference on serine-carboxyl peptidases 2005, 2005年11月、京都工芸繊維大学

内山安男、「神経系におけるオートファジーの破綻」、第11回グリアクラブ、2006年2月、ニセコ東山プリンスホテル新館

尾山廣、石垣睦、横山いずみ、柴田昌宏、内山安男、小田耕平「放線菌が生産するタンパク性カテプシンD阻害物質(CDI)」農芸化学会2006年度大会口演、2006年3月、京都女子大学

柴田昌宏、内山安男「RNAi法」第111回日本解剖学会総会・全国学術集会、2006年3月、北里大学相模原キャンパス

内山安男「リソソームの実態：特に、リソソームプロテアーゼを欠損するマウスを解析して」第111回日本解剖学会総会・全国学術集会、2006年3月、北里大学相模原キャンパス

ほか

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他