

20041019

厚生労働省科学研究研究費補助金

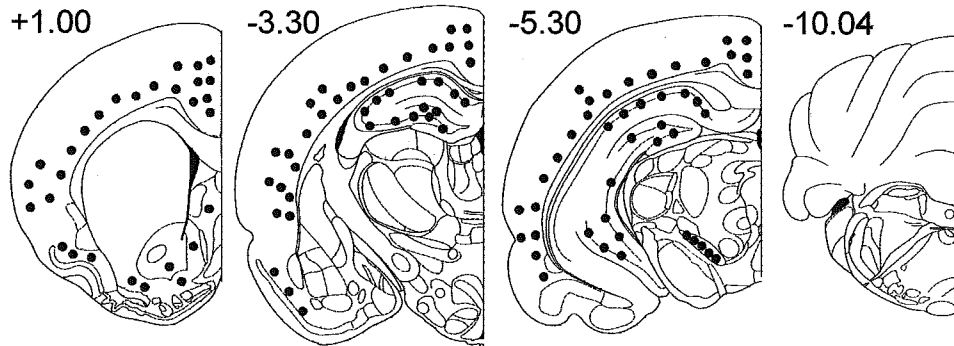
こころの健康科学研究事業

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15-17年度 総合研究報告書

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15-17年度 総合研究報告書  
主任研究員 小川 智  
平成18(2006)年 5月

目次

I. 総合研究報告書

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. 参考資料

1. 神経発生における小胞体ストレスに関する研究 小川 智	7
2. 慢性小胞体負荷による神経細胞死モデル動物の確立 小川 智、堀 修	10
3. 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	15
4. 霊長類における神経細胞死機構の解明 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
6. 小胞体環境とオートファジー 経路の解明 内山 安男	28

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	31
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷り	32
------------------	----

総合研究報告書

小胞体制御による神経細胞死抑制・神経変性治療

主任研究者 小川 智

金沢大学大学院医学系研究科・教授

研究要旨

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。本研究では、脳病態における小胞体の機能異常に注目し、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した。本研究では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。

分担研究者

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

研究協力者

桃井 隆  
国立精神神経センター・室長

堀 修  
金沢大学大学院医学系研究科・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<sup>++</sup>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(図参照)

●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制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

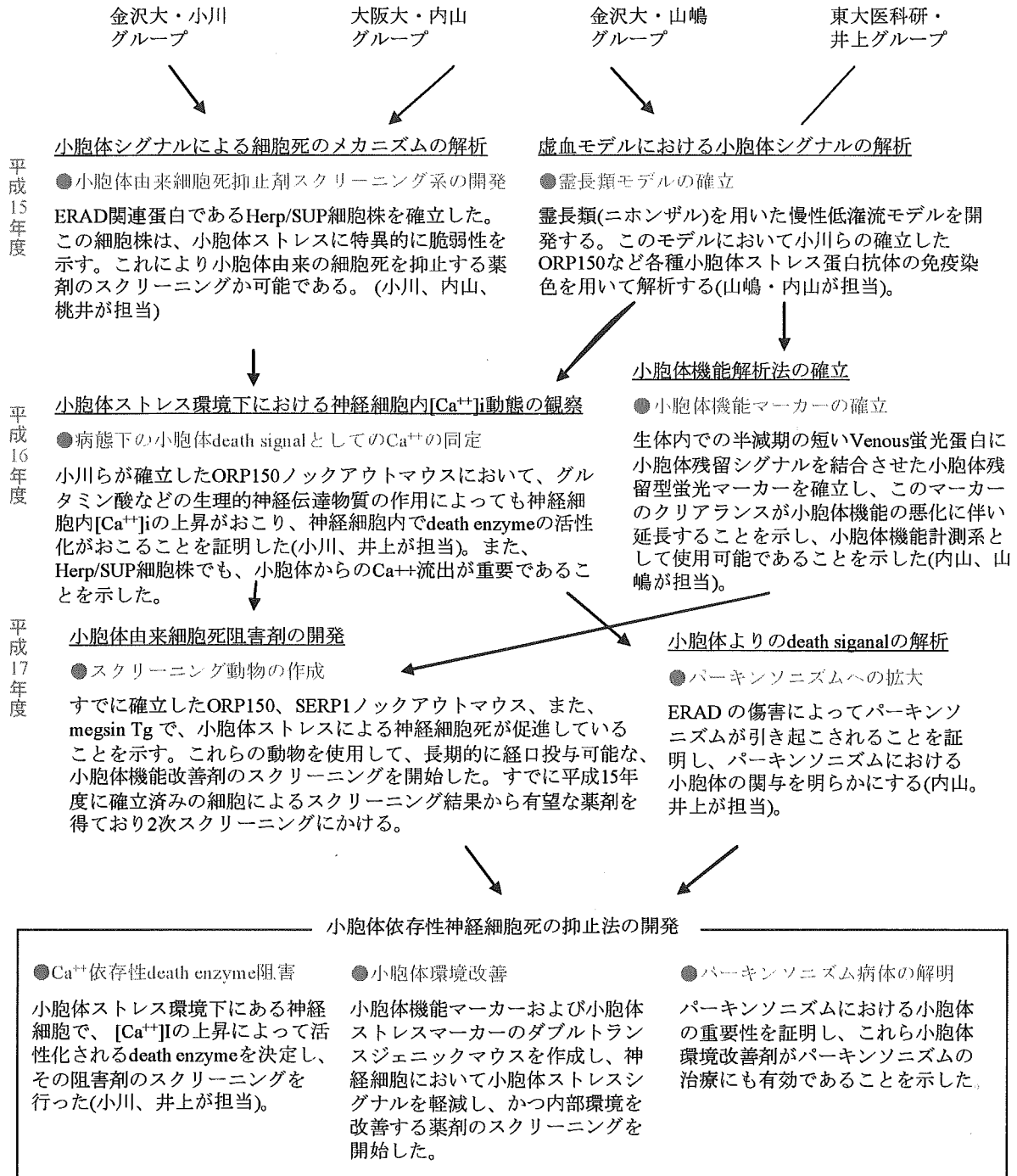


図:本研究チームの3年間の研究実績ロードマップ

脆弱性を示す。これにより小胞体由来の細胞死を抑止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<sup>++</sup>]<sub>i</sub>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<sup>++</sup>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<sup>++</sup>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<sup>++</sup>]<sub>i</sub>の上昇がおこり、神経細胞内でdeath enzymeの活性化がお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  
小胞耐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ジスクリーニング、神経芽細胞による2ジ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	97件
原著論文による発表	24件
それ以外(レビュー等)の発表	21件

2)海外

口頭発表	32件
原著論文による発表	74件
それ以外(レビュー等)の発表	5件
そのうち主なもの 論文発表	

●小川 智(金沢大学)

Miyazaki M, Ozawa K, Hori O, Kitao Y, Matsushita K, Ogawa S, and Matsuyama T. Expression of ORP150 (150 kDa oxygen regulated protein) in the hippocampus suppresses delayed neuronal cell death. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2002; 22, 979-987

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.

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

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.

●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  $\alpha$ -secretase ( $\alpha$ -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

●桃井隆(国立精神神経センター)

Momoi, T. Caspases involved in ER stress-mediated cell death. *J Chem Neuroanat.* 28, 101-105, 2004

Nakamoto Y, Suda T, Momoi T, Kaneko S. Different procarcinogenic potentials of lymphocyte subsets in a transgenic mouse model of chronic hepatitis B. *Cancer Res.* 64, 3326-3333, 2004

Ganguly A., Oo TF, Rzhetskaya M, Pratt R, Yarygina O, Momoi, T, Kholodilov N, Burke RE, CEP11004, a novel inhibitor of the mixed lineage kinases, suppresses apoptotic death in dopamine neurons of the substantia nigra induced by 6-hydroxydopamine. *J Neurochem.* 8, 8469-8480, 2004.

Yoneda K, Furukawa T, Zheng YJ, Momoi T, Izawa I, Inagaki M, Manabe M, Inagaki N. An autocrine/paracrine loop linking keratin 14 aggregates to tumor necrosis factor alpha-mediated cytotoxicity in a keratinocyte model of epidermolysis bullosa simplex. *J Biol Chem.* 279, 7296-7303, 2004.

●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. Ca<sup>2+</sup>-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 Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> in the dendrite of mouse cerebellar Purkinje cells evoked by parallel fiber stimulation. *European Journal of Neuroscience*, 18:2677-2689 (2003).

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)

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

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

神経発生における小胞体ストレスに関する研究

主任研究者 小川 智

研究要旨

ORP150は、生後4-8日にかけて小脳、特にプルキンエ細胞に強い発現パターンを示した。ORP150を過剰発現させたトランスジェニックマウス(TG)では、プルキンエ細胞に強いORP150の発現を認めるとともに、ORP150ノックアウトヘテロ接合体(KO)では、その発現は明らかに減弱していた。ORP150の強制発現によってこの時期における細胞死が抑制され、逆にORP150ノックアウトマウスでは、神経細胞死が加速された。ORP150は海馬神経においてグルタミン酸による細胞内Ca<sup>++</sup>上昇を抑え、細胞死を抑制することから小脳発生過程における神経細胞死にも小胞体を介する神経細胞死の関与が示唆される。

A. 研究目的

脳はグリア細胞やオリゴデンドロサイト、血管内皮細胞など異なった種類の細胞によって構成されるが、中心的存在である神経細胞は虚血に対してとりわけ脆弱である。したがって、長時間に及ぶ虚血では脳を構成するすべての細胞が壊死に陥るが、虚血が短時間である場合、神経細胞だけが死に到る。これに反してアストログリアや血管内皮細胞は虚血に対して強い抵抗性を示すことが知られている。さらに、アストログリアは虚血などの自らの生存すら危うくしかねないような環境下でも神経細胞に対する保護機作を発揮することが知られている。

本研究では、アストログリアが虚血環境で生き抜くためのいくつかの戦略を解析し、その戦略を利用して、虚血環境にあっても神経細胞死を抑制しうるかをテーマとして研究を進めてきた。また、虚血性神経細胞死だけでなくアルツハイマー病による神経細胞死も小胞体のストレス応答異常による可能性が示されてきた。本研究では、小胞体の機能異常が脳虚血とアルツハイマー病に共通する神経細胞死の経路であるとの認識に立ち、小胞体の機能制御による神経細胞死の抑制に関して研究してきた。

B. 研究方法

野生型マウス(WT)、ORP150トランスジェニックマウス(TG)、ORP150ノックアウトマウス

ウスヘテロ接合体(KO)より生後1-10日にかけて小脳を分離しNP-40(1%)にて蛋白を抽出後、SDS-PAGEで分離し、ORP150、GRP78、HSP70、GAD133、による抗体を用いてWestern blotを行った。また、各のマウスを灌流固定し上記抗体による免疫組織染色を行った。小脳プルキンエ細胞のマーカーはCalbindin<sub>D28k</sub>を用いた。神経細胞死は活性化Caspase-3抗体による免疫染色およびTUNEL法によって行った。

マウスの行動テストはRotor Rodにて評価した。また、小脳プルキンエ細胞の神経回路形成の評価は電気生理学的に行った。

C. 研究結果

マウスにおける小脳発生では神経細胞死がおこることが知られているが、新規小胞体ストレス蛋白であるORP150は、生後4-8日にかけて小脳、特にプルキンエ細胞に強く発現、GRP78、GRP94、HSP70などとは異なった発現パターンを示した。ORP150を過剰発現させたトランスジェニックマウス(TG)では、プルキンエ細胞に強いORP150の発現を認めるとともに、ORP150ノックアウトヘテロ接合体(KO)では、その発現は明らかに減弱していた。野生型マウスでは生後4日をピークにプルキンエ細胞層で活性化型Caspase-3の免疫陽性細胞が見られたが、TGでは陽性細胞数が有意に減少していた。Calbindin染色で評価したプルキンエ細胞数も生後4-20日にか



けてTGで多く、KOで減少していた。また、グルタミン酸拮抗薬であるMK-801の投与により、TGと同様の傾向が再現された(23)。ORP150ノックアウトマウスの発生初期の小脳プルキンエ細胞を観察すると、出生後4-6日にかけて、TUNEL法および活性化caspase-3による免疫染色で胞死が検出される。この細胞死は、野生型、ORP150トランスジェニックマウ(TG)の順に、すなわち、ORP150の発現が強くなるほど抑制される傾向にあった。さらに、TGでは、プルキンエ細胞の密度も、明らかに増加していた。ところが、行動テストで評価された小脳の機能は、逆にTGで傷害されていた。

#### D. 考察

グルタミン酸塩受容器とグルタミン酸の結合によって開始される一連の生体反応は、細胞内のカルシウム上昇、さらには、細胞内環境の変化を来し、最終的には神経細胞死に至

らしめる。ORP150は興奮性アミノ酸投与によりマウス海馬に誘導され、また、培養海馬培養神経細胞においてもグルタミン酸負荷に応答して発現上昇する。発生段階の小脳プルキンエ細胞においても、グルタミン酸入力回路の増加が生後4-8日におこると報告されており、ORP150の発現のピークと一致する。砂ネズミの一過性総頸動脈結紮によって海馬CA1領域に遅発性神経細胞死(DND)がおり、この細胞死は虚血耐性を獲得させた個体では起こらない。ORP150は虚血耐性を獲得した砂ネズミCA1領域に極めて強く発現し、また、あらかじめCA1領域にアデノウイルスベクターを用いてORP150を遺伝子導入することにより、神経細胞死を救済することができる。DNDでは1-2週間で神経細胞死が完成する「慢性虚血性神経細胞死モデル」である。このパラダイムにおいてもORP150は神経細胞死を抑制することが示されている。

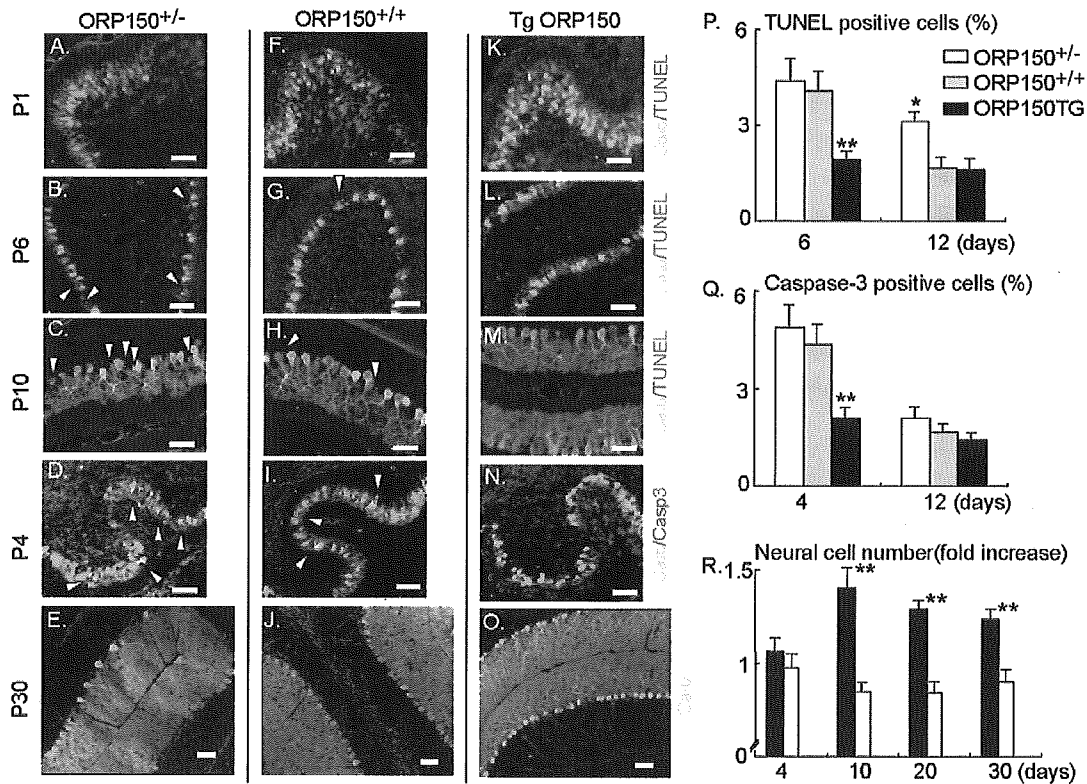


図: 発生初期の小胞体ストレスが小脳プルキンエ細胞の至適密度を決める。

ORP150ノックアウトマウスの発生初期の小脳プルキンエ細胞を観察すると、出生後4-6日にかけて、TUNEL法および活性化caspase-3による免疫染色で胞死が検出される。この細胞死は、野生型、ORP150トランスジェニックマウ(Tg ORP150)の順に、すなわち、ORP150の発現が強くなるほど抑制される傾向にあった。さらに、Tg ORP150では、プルキンエ細胞の密度も、明らかに増加していた。ところが、行動テストで評価された小脳の機能は、逆にTg ORP150で傷害されており、発生段階における小胞体ストレスが、ホストのプルキンエ細胞の至適密度を決めると考えられる。

#### E. 結論

発生段階におけるORP150の発現は、発生と  
いうより慢性的な変化における小胞体スト  
レスの存在を示している。急性虚血だけでなく  
ヒトに見られるような慢性虚血、さらには慢  
性的に進行する神経変性疾患においても小胞  
体ストレスの重要性が示唆される。

#### F. 参考文献

1. Ikematsu K, Tsuda R, Kondo T, Kondo H, Ozawa K, Ogawa S, and Nakasono I. The expression of a novel stress protein '150-kDa oxygen regulated protein' in sudden infant death. *Leg Med (Tokyo)*. 2003 ;5: 15-9
2. Miyagi T, Koshida K, Hori O, Konaka H, Katoh H, Kitagawa Y, Mizokami A, Egawa M, Ogawa S, Hamada H, Namiki M. Gene therapy for prostate cancer using the cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase suicide system. *J Gene Med*. 2003; 5: 30-37
3. 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
4. Yatabe N, Kyo S, Maida Y, Nishi H, Nakamura M, Kanaya T, Tanaka M, Isaka K, Ogawa S, Inoue M. HIF-1-mediated activation of telomerase in cervical cancer cells. *Oncogene*. 2004, in press.
5. 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 to Cells*, 2004, in press.
6. Okada K, Minamino T, Tsukamoto Y, Liao Y, Hirota A, Yutani A, Ozawa K, Ogawa S, Tomoike H, Hori M, and Kitakaze M. Prolonged ER Stress in Hypertrophic and Failing Heart Following Aortic Constriction: Possible Contribution of ER Stress to Cardiac Myocyte Apoptosis. *Circulation*, 2004, in press.
7. Bando Y, Tsukamoto Y, Katayana T, Ozawa K, Kitao Y, Hori O, Stern D, Yamauchi A, and Ogawa S. ORP150/HSP12A protects renal tubular epithelium from ischemia-induced cell death. *FASEB J.*, 2004, in press.

分担研究報告書

慢性小胞体負荷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であるTH(チロシン水酸化酵素)の著しい免疫源性の低下が認められた。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

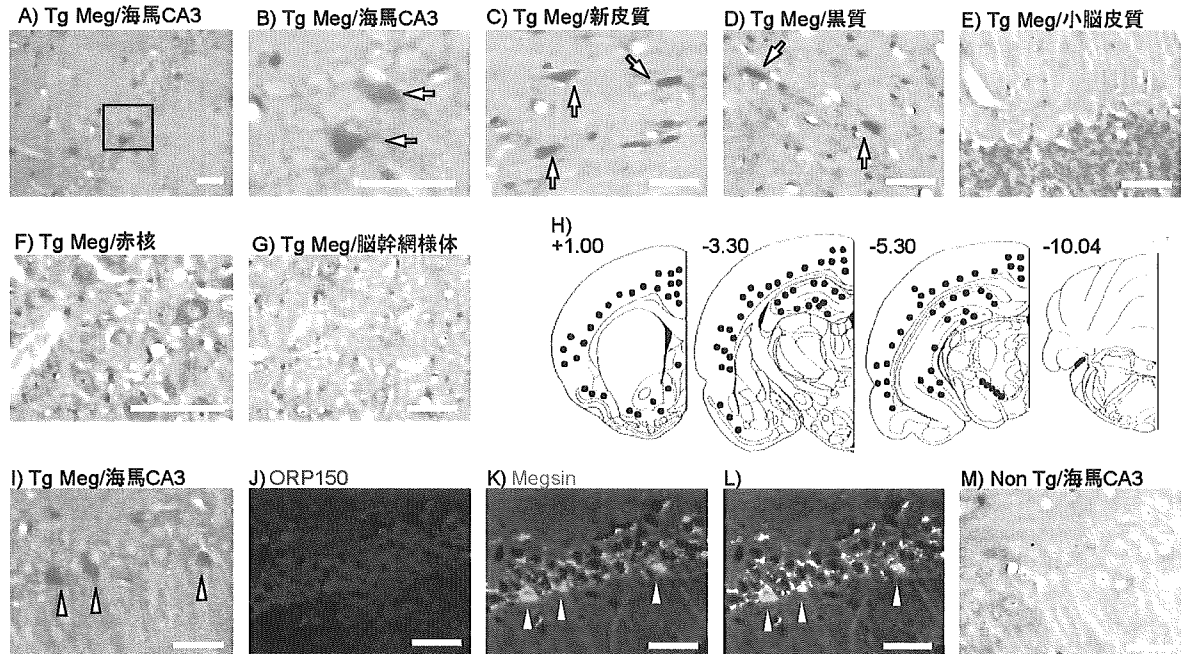


図1: メグシンを過剰発現させたラット(Tg meg)におけるPAS陽性封入体の分布。  
Tg meg (4ヶ月齢)では、海馬CA1(A、Aの□内の拡大をBに示す)、大脳新皮質(C)、黒質(D)にPAS染色陽性の封入体を認めた。新小脳(E)、赤核(F)、脳幹網様体(G)には封入体はみられなかった。脳全体のPAS陽性封入体の分布をHに示す。数字はBregmaからの位置。●は、強視野(ほぼ $1\text{mm}^2$ )に1個のPAS陽性封入体に相当。Tg megの海馬CA3領域(I)は、ORP150強陽性であり(J)、PAS陽性の封入体には強いmegsinの免疫源性が見られた(K及びL)。一方、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 $100\mu\text{m}$ 。

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 $170\text{cm}$ 、深さ $45\text{cm}$ の水槽を用い、その中に直径 $12\text{cm}$ 、高さ $30\text{cm}$ の透明アクリル製の円柱プラットフォームを、壁から $25\text{cm}$ 離れたところに設置した。水深は、プラットフォーム+ $1\text{cm}$ 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 $10\text{cm}$ 、高さ $100\text{cm}$ 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。

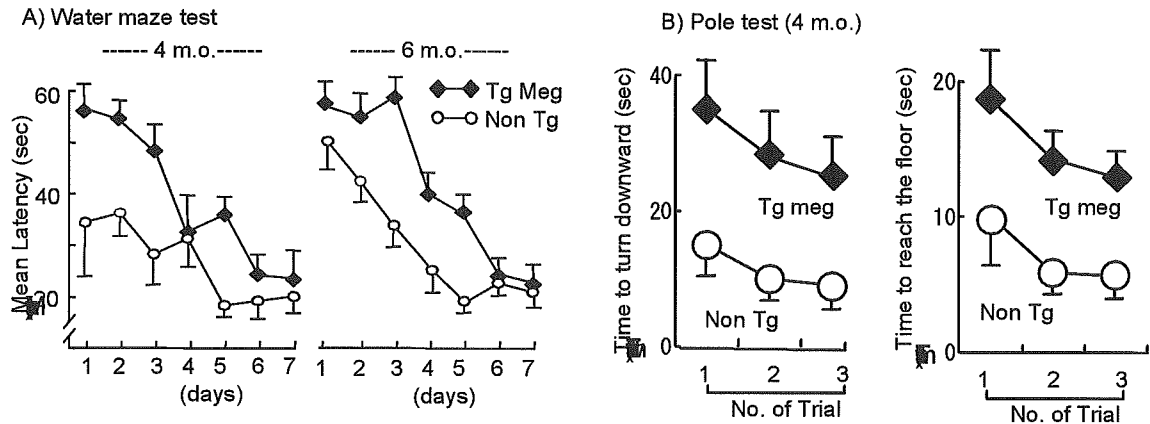


図3: メグシンラットにおける行動異常

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。

### 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megsin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

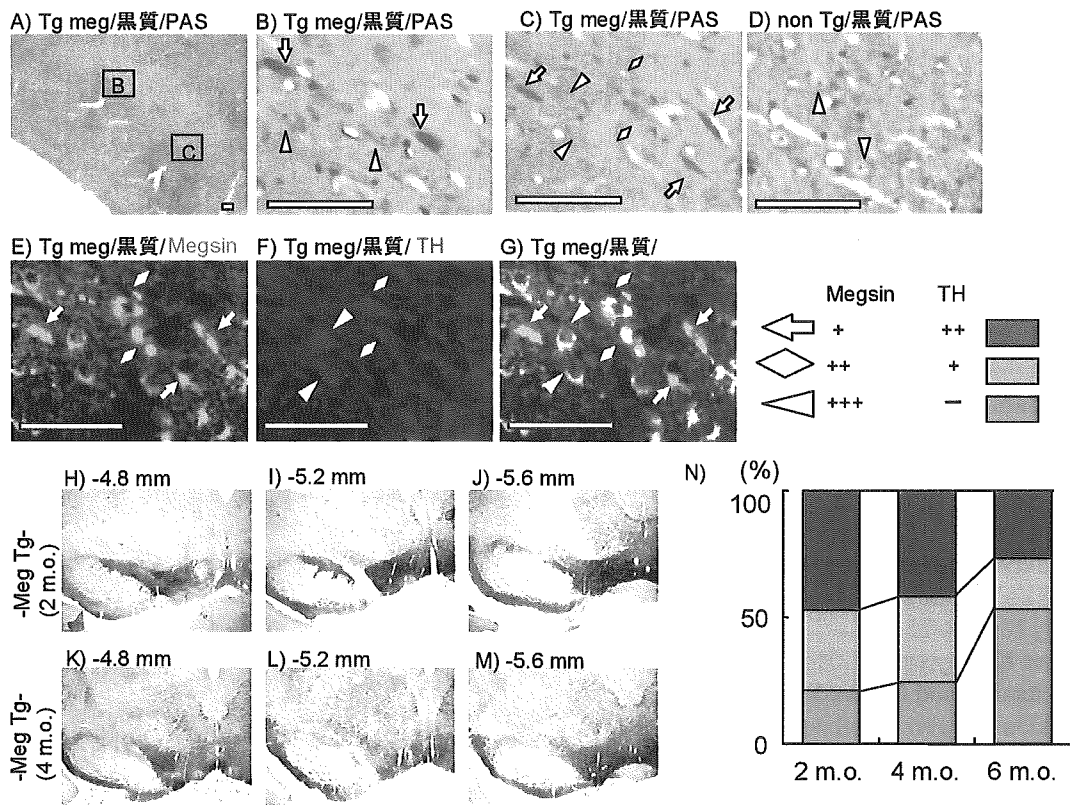


図2: メグシンラット(Tg meg)に見られる黒質変性。

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ーである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ーである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 $\mu$ m。

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. 参考文献

- 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.

# 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-プロテアソーム系)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、 $\alpha$ -tocopherolや $\beta$ -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



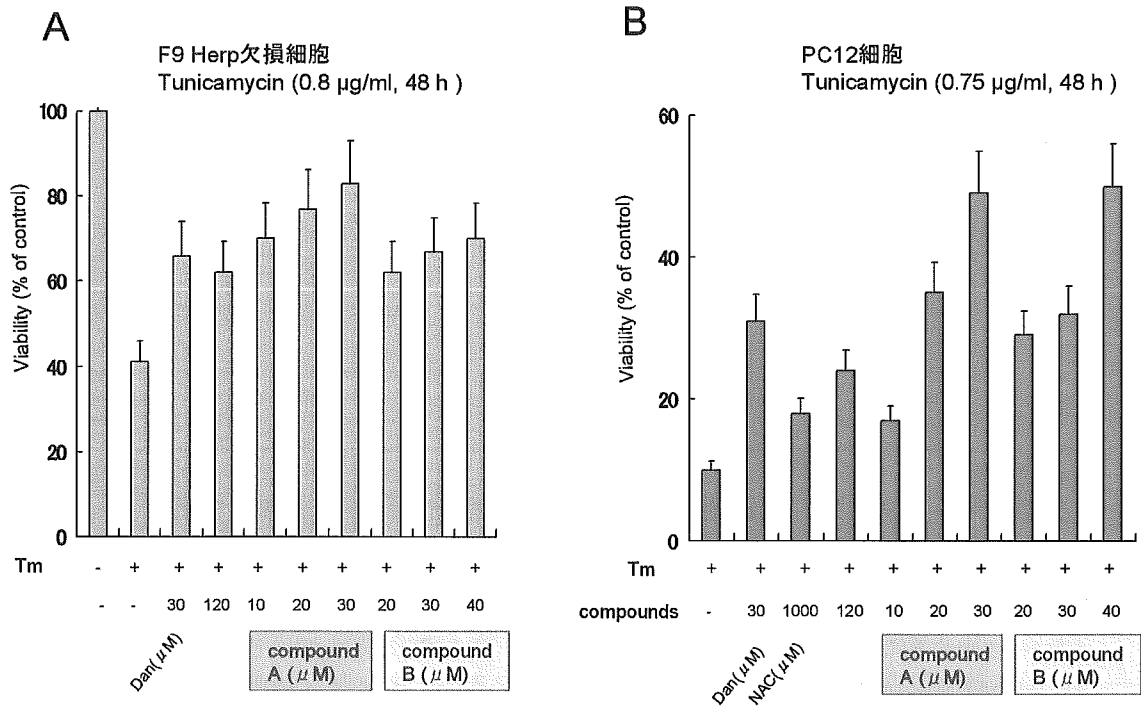


図1 compound A, Bの小胞体ストレス由来細胞死抑制効果

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

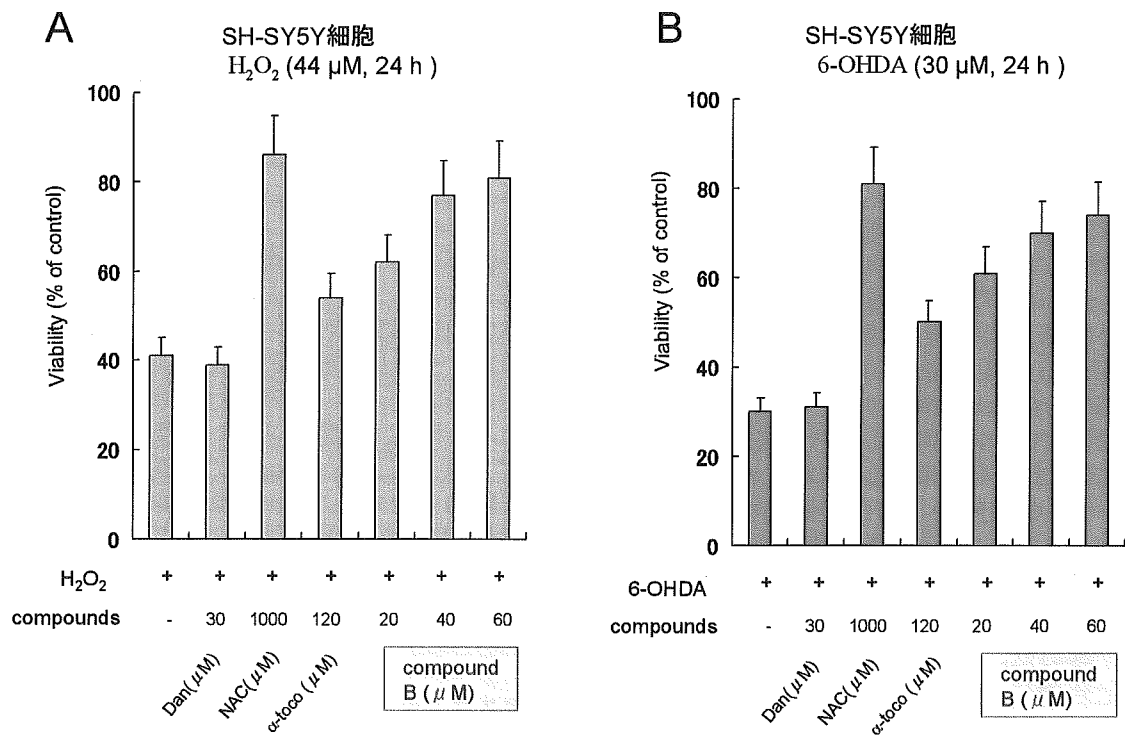


図2 compound Bの酸化ストレス由来細胞死抑制効果

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H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (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、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (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

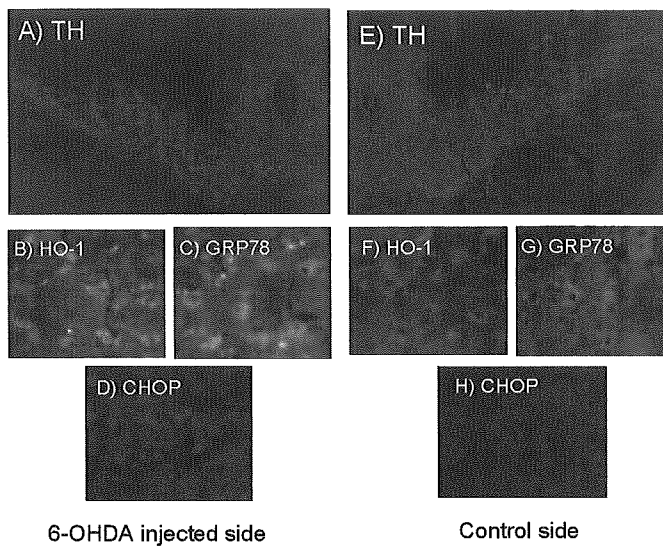


図3 6-OHDAマウス片側脳内投与後の、黒質緻密層における変化  
6-OHDAマウス片側脳内投与5日後の、TH、HO-1、GRP78、CHOPの発現を免疫染色法により評価した。6-OHDA投与側に、THの減少とGRP78、HO-1、CHOPの増加を認める。

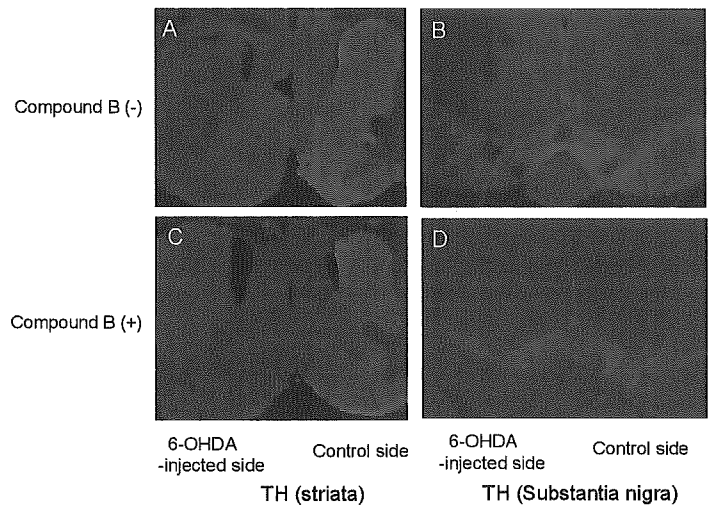


図4 6-OHDAマウス片側脳内投与に対するcompound Bの効果  
compound Bを6-OHDAマウス片側脳内投与3日前より、投与後3日目まで連日マウス腹腔内に投与した(C, D)。コントロールマウスには、溶解液のみを投与した(A, B)。6-OHDA投与後5日目で灌流固定し、線状体 (A, C) 及び黒質緻密層 (B, D) におけるTH抗原量を比較した。

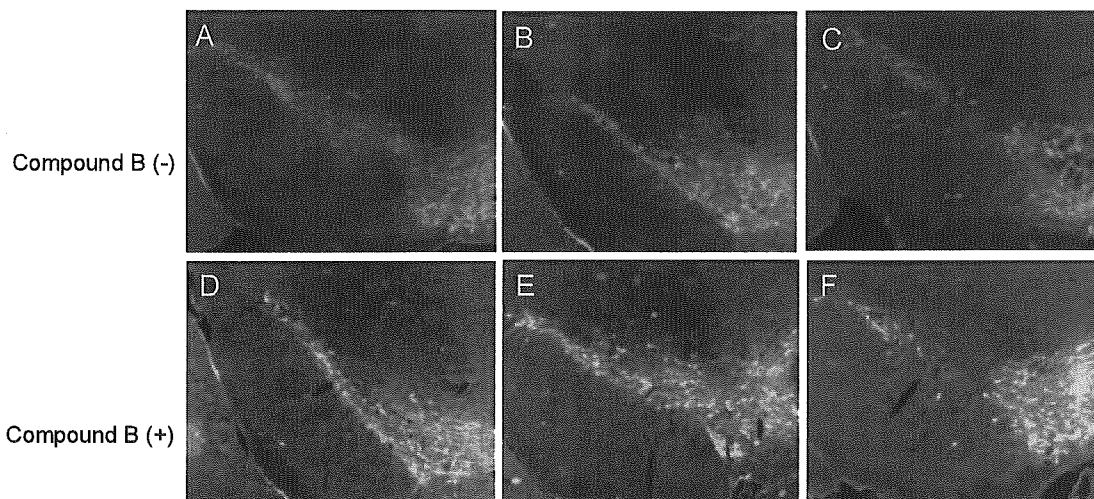


図5 マウスMPTP投与モデルに対するcompound Bの効果  
compound BをMPTP投与3日前より、投与後3日目まで連日マウス腹腔内に投与した(D, E, F)。コントロールマウスには、溶解液のみを投与した (A, B, C)。MPTP投与後5日目で灌流固定し、黒質緻密層におけるTH抗原量を比較した。

カマイシン (0.8 $\mu$ 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 $\mu$ M) または6-OHDA (30 $\mu$ 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 $\mu$ g/ $\mu$ l x 1.5 $\mu$ 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 $\mu$ 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 1 A 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認めた。

#### 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認めた (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、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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、① 6-OHDA (4 µg/µl x 1.5 µl) のマウス片側脳内投与 (medial forebrain bundle: MFB に注入)、及び ② MPTP (20 mg/kg x 2 回/day) のマウス腹腔内投与と実験を行った。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 1 B)、さらに、compound B には、強い抗酸化作用も存在した (図 2 A)。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 の効果を調べたところ、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。① compound 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。② compound A は、eIF2a 及び Nrf2 のシグナルを活性化させる。③ compound 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、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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. 参考文献

- 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.