

神経変性疾患でのミクログリアの毒性転換のメカニズムに関する研究

研究代表者：澤田 誠 名古屋大学環境医学研究所 教授

研究要旨 神経変性疾患でのミクログリアの毒性転換について *in vivo* 病態モデルにおいて解析を行った。ラット線条体の傷害モデルにおいて活性が集積するミクログリアを新規に開発した座標再現装置付きレーザーマイクロディセクション顕微鏡をもちいて細胞一つ一つを切り出し、mRNA 発現について調べた。

A. 研究目的

脳に器質性および機能性の障害が生じたときにミクログリアは活性化され様々な生体応答を生じる。このとき、ミクログリアの活性化には2相性があり、脳内細胞を保護するような活性化とダメージを受けた細胞を積極的に排除するような活性化の両者が見られる。これまでの研究から、ミクログリアの活性化には2段階のステップ、軽度な活性化では神経保護的な作用を示すミクログリアが、何らかの因子の作用を受けて神経毒性を持つようになると考えている。これまでの研究で培養ミクログリアに外来遺伝子を導入して毒性転換させるモデルにより解析した結果をもとに本年度は脳に人為的に損傷を誘導したときの *in vivo* のミクログリアの変化を新たに創出した単一細胞解析システムで検証することを目的に行った。

ラット線状体に末梢の炎症細胞が浸潤しないように、EtOH 注入による傷害を起こすと、その傷害部位の周囲に広範囲に活性型のミクログリアが集積することが観察できるが、損傷部位に接している部分では iNOS の mRNA が発現する

ミクログリアが観察できる。しかし、それ以外の周辺部では iNOS 陰性の活性化ミクログリアが観察される。このようにミクログリアが脳内で休止型から活性型に形態変化すると種々の変化が誘導される。末梢型ベンゾジアゼピン受容体(PBR)の発現もその一つであり、ポジトロンCT(PET)で PBR を画像化すれば、脳内活性型ミクログリアの評価が可能となる。そこで本年度は人為的脳損傷モデルを作製して個体レベルでミクログリアの活性化を PET により特定したのち新規に開発した座標再現装置付きレーザーマイクロディセクション顕微鏡をもちいて細胞一つ一つを切り出し、mRNA 発現について調べることによって、ミクログリアの活性化と毒性転換についての評価を行った。

B. 研究方法

ステレオ装置を用いて麻酔下にラットの右側線条体へエタノール 5 μ L 局注し、内在性ミクログリア活性化モデルを作製した。3 日後麻酔下に 1.5T MRI 装置にリストコイルを使用し、T2 強調像を撮像して線条体の障害の程度を評価した。4 日後麻酔下に、ポジトロン標識した末梢

セイベンゾジアゼピン受容体アンタゴニストである¹¹C-PK11195 12~41MBqをボーラス静注し、動物用 PET 装置で 60 分間ダイナミックスキャンを撮像した。PBR の定量的評価として、小脳を参照部位とし、線条体の normalized distribution volume (V^*)(min)を算出し、比較した。PET スキャン終了後、ラット脳を灌流固定後特異抗体で活性型ミクログリアを染色し、PET の集積部位と比較した。コントロールとしてエタノールを注入していないラットについても同様に動物用 PET で評価した。

PET 撮像後に麻酔下灌流脱血し脳を摘出、OCT 包埋剤に封入して凍結した。凍結ブロックから 10 μ m の切片を作製し、迅速にアセトンで固定後、フルオレッセイン標識 IB4 により染色して活性化ミクログリアを可視化した。切片上のミクログリアの位置をスキャンニングサイトメーターで同定解析し、その座標を座標再現装置でレーザーマイクロディセクション顕微鏡上で再現し、7.5 μ m サイズのスポットで活性化ミクログリアの細胞質部分を切り出して回収し mRNA の発現解析に用いた

(倫理面への配慮) 動物実験に関しては名古屋大学および国立長寿医療研究センターの実験動物倫理規定に従い実験を行った。

(謝辞) 本研究の推進にあたって MRI および PET 撮像において藤田保健衛生大学放射線科外山助教授、工藤助手、伊藤医師、ならびに国立長寿医療研究センター伊藤部長、旗野室長、加藤室長にご協力いただきました。

C. 研究結果

- ・ MRI でエタノールによる損傷を確認したラット(n=12)では、エタノール注入側は非注入側に比べて V^* は有意に高かった(5.2 \pm 1.0 vs.4.8 \pm 0.9, $P<0.001$)。エタノール注入ラットはコントロールラット(n=7)に比べて V^* のエタノール注入側/非注入側線条体比は有意に高かった(1.1 \pm 0.1 vs.1.0 \pm 0.1, $P<0.0005$)。組織的にエタノール注入側の線条体に活性型ミクログリアを多く認め、動物用 PET の所見と一致した。
- ・ 図 1b のように、障害を受けた周囲ではミクログリアの活性化がおこり、脳切片を用いて mRNA 発現を調べると炎症性サイトカインの発現が確認できた(図 2a)。しかし活性化され

たミクログリアは部域によって形態的な様相が異なるため、どのミクログリアがどのような活性を持っているかはわからない。そこで活性化したミクログリアについてレーザーマイクロディセクションシステムで細胞単離してミクログリアの活性化を検討した。

- ・ IB4 陽性となるミクログリアをレーザーマイクロディセクションシステムで細胞単離して mRNA を抽出して解析したところ炎症性サイトカインの TNF α , IL-1b の発現が確認できた(図 2b)。

D. 考察

アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性を伴う疾患だけでなく、脳腫瘍やてんかん、統合失調症に至るほとんどすべての脳疾患においてミクログリアの活性化が見られることが報告されている。脳全体に広汎に存在するいわゆる休止ミクログリアはその検出が難しいが、活性化ミクログリアはマクロファージ様の性質を持つようになるため、マクロファージを認識する種々の抗体で検出でき、脳疾患の病理像では疾患部位に集積した活性化ミクログリアが多数観察することができる。しかもそれらがあたかも神経変性や炎症などの疾患の原因を引き起こしているようにさえ見える。さらに、単離したミクログリアが細胞傷害性をもつ因子を産生すること、活性化したミクログリアが病理切片においても培養下においても細胞傷害性のマクロファージと区別が付けることが難しいことから、種々の脳疾患において、ミクログリアが病変を形成する「悪役」として考えられてきた。しかし、より多くの抗体や染色法が開発され、それらを用いた疾患脳の検索が行われた結果、ミクログリアの活性化は病変部に限局しているわけではなく、正常な組織像を呈する部分にも出現していることも明らかになりつつある。このようなミクログリアは少なくとも病態形成とは無関係であり、「悪いミクログリア」とは明らかに異なる作用をしていると考えられる。

セイベンゾジアゼピン受容体アンタゴニストである¹¹C-PK11195 12~41MBqをボラス静注し、動物用 PET 装置で 60 分間ダイナミックスキャンを撮像した。PBR の定量的評価として、小脳を参照部位とし、線条体の normalized distribution volume (V^*)(min)を算出し、比較した。PET スキャン終了後、ラット脳を灌流固定後特異抗体で活性化型ミクログリアを染色し、PET の集積部位と比較した。コントロールとしてエタノールを注入していないラットについても同様に動物用 PET で評価した。

PET 撮像後に麻酔下灌流脱血し脳を摘出、OCT 包埋剤に封入して凍結した。凍結ブロックから 10 μ m の切片を作製し、迅速にアセトンで固定後、フルオレッセイン標識 IB4 により染色して活性化ミクログリアを可視化した。切片上のミクログリアの位置をスキャンニングサイトメーターで同定解析し、その座標を座標再現装置でレーザーマイクロディセクション顕微鏡上で再現し、7.5 μ m サイズのスポットで活性化ミクログリアの細胞質部分を切り出して回収し mRNA の発現解析に用いた

(倫理面への配慮) 動物実験に関しては名古屋大学および国立長寿医療研究センターの実験動物倫理規定に従い実験を行った。

(謝辞) 本研究の推進にあたって MRI および PET 撮像において藤田保健衛生大学放射線科外山助教授、工藤助手、伊藤医師、ならびに国立長寿医療研究センター伊藤部長、旗野室長、加藤室長にご協力いただきました。

C. 研究結果

- ・ MRI でエタノールによる損傷を確認したラット(n=12)では、エタノール注入側は非注入側に比べて V^* は有意に高かった(5.2 \pm 1.0 vs.4.8 \pm 0.9, P <0.001)。エタノール注入ラットはコントロールラット(n=7)に比べて V^* のエタノール注入側/非注入側線条体比は有意に高かった(1.1 \pm 0.1 vs.1.0 \pm 0.1, P <0.0005)。組織的にエタノール注入側の線条体に活性化型ミクログリアを多く認め、動物用 PET の所見と一致した。
- ・ 図 1b のように、障害を受けた周囲ではミクログリアの活性化がおこり、脳切片を用いて mRNA 発現を調べると炎症性サイトカインの発現が確認できた(図 2a)。しかし活性化され

たミクログリアは部域によって形態的な様相が異なるため、どのミクログリアがどのような活性を持っているかはわからない。そこで活性化したミクログリアについてレーザーマイクロディセクションシステムで細胞単離してミクログリアの活性化を検討した。

- ・ IB4 陽性となるミクログリアをレーザーマイクロディセクションシステムで細胞単離して mRNA を抽出して解析したところ炎症性サイトカインの TNFa, IL-1b の発現が確認できた(図 2b)。

D. 考察

アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性を伴う疾患だけでなく、脳腫瘍やてんかん、統合失調症に至るほとんどすべての脳疾患においてミクログリアの活性化が見られることが報告されている。脳全体に広汎に存在するいわゆる休止ミクログリアはその検出が難しいが、活性化ミクログリアはマクロファージ様の性質を持つようになるため、マクロファージを認識する種々の抗体で検出でき、脳疾患の病理像では疾患部位に集積した活性化ミクログリアが多数観察することができる。しかもそれらがあたかも神経変性や炎症などの疾患の原因を引き起こしているようにさえ見える。さらに、単離したミクログリアが細胞傷害性をもつ因子を産生すること、活性化したミクログリアが病理切片においても培養下においても細胞傷害性のマクロファージと区別が付けることが難しいことから、種々の脳疾患において、ミクログリアが病変を形成する「悪役」として考えられてきた。しかし、より多くの抗体や染色法が開発され、それらを用いた疾患脳の検索が行われた結果、ミクログリアの活性化は病変部に限局しているわけではなく、正常な組織像を呈する部分にも出現していることも明らかになりつつある。このようなミクログリアは少なくとも病態形成とは無関係であり、「悪いミクログリア」とは明らかに異なる作用をしていると考えられる。

実際に脳内に人為的に傷害を作製すると性質の異なるミクログリアが出現することが今回のレーザーマイクロディセクション顕微鏡による解析により実証できた。

以上の結果から、ミクログリアの活性化には2段階のステップがあるのではないかと考えられる。つまり、もともと神経保護的に作用するミクログリアが、何らかの作用を受けて毒性転換 toxic change すると考えられる。軽度な活性化では神経保護的な作用を示すミクログリアが、何らかの因子の作用を受けて神経毒性を持つように変化する。ミクログリアの活性化は脳神経疾患の治療における標的として重要であるが、nef 発現ミクログリアが毒性転換することから、nef が作用する細胞質内因子がこのような活性化の状態を制御している可能性がある。このミクログリアの活性化のメカニズムに関わる細胞内因子が同定できれば、新規な薬剤開発ターゲットが分子レベルで明らかになる可能性がある。

E. 結論

ミクログリアの活性化には2段階のステップがあると考えられる。つまり、もともと神経保護的に作用するミクログリアが、何らかの作用を受けて毒性転換 toxic change すると考えられる。軽度な活性化では神経保護的な作用を示すミクログリアが、何らかの因子の作用を受けて神経毒性を持つように変化する。パーキンソン病における神経変性の一部にもミクログリアが関与していると考えられるため、その活性化のメカニズムに関わる因子が同定できれば、新規な薬剤開発ターゲットが分子レベルで明らかになる可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

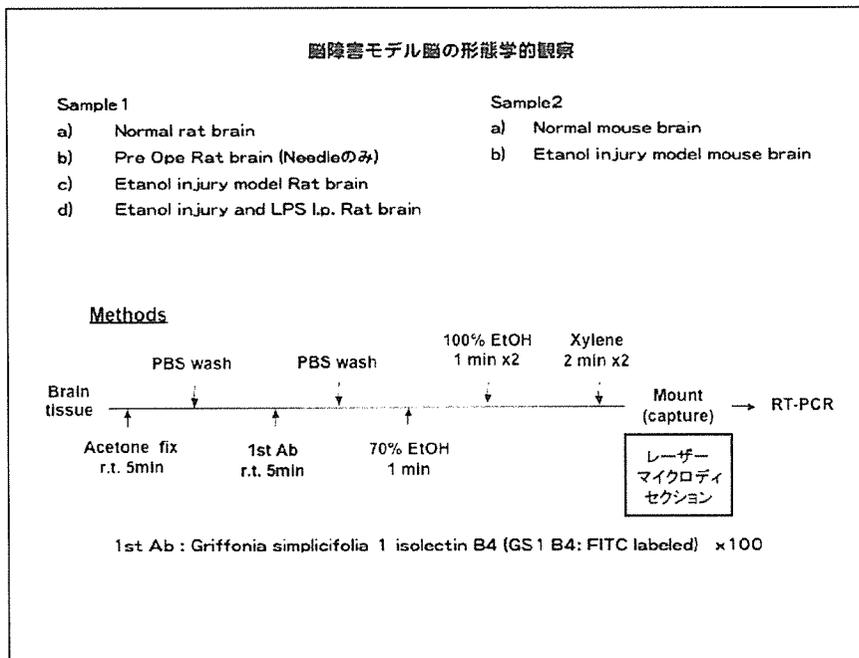
- NAGATSU Toshiharu, SAWADA Makoto: Cellular and Molecular Mechanisms of Parkinson's Disease: Neurotoxins, Causative Genes, and Inflammatory Cytokines. Cellular and Molecular Neurobiology 26(4-6): 781-802, 2006.
- SAKURABA Hitoshi, SAWADA Makoto, MATSUZAWA Fumio, AIKAWA Sei-ichi, CHIBA Yasunori, JIGAMI Yoshifumi, ITOU Kouji: Molecular pathologies of and enzyme replacement therapies for lysosomal diseases. CNS & Neurological Disorders-Drug Targets 5(4): 401-413, 2006.
- HAYASHI Yoshinori, TOMIMATSU Yoshirou, SUZUKI Hiromi, YAMADA Jun, WU Ziqiang, YAO Hngping, KAGAMIISHI Yoshifumi, TATEISHI Narito, SAWADA Makoto, NAKANISHI Hiroshi: The intra-arterial injection of microglia protects hippocampal CA1 neurons against global ischemia-induced functional deficits in rats. Neuroscience, 142(1): 87-96, 2006.
- Yamada Jun, Sawada Makoto, Nakanishi Hiroshi: Cell cycle-dependent regulation of kainate-induced inward currents in microglia. Biochemical and Biophysical Research Communications 349(3): 913-919, 2006.
- ITO Sachiko, SAWADA Makoto, HANEDA Masataka, ISHIDA Yoshi, ISOBE Ken-ichi: Amyloid-beta peptides induce several chemokine mRNA expressions in the primary microglia and Ra2 cell line via PI3K/Akt and/or ERK pathway. Neuroscience Research 56(3): 294-299, 2006.
- SAWADA Makoto, IMAMURA Kazuhiro, NAGATSU Toshiharu: Role of cytokines in inflammatory process in Parkinson's disease. Journal of Neural Transmission Supplement 70: 373-381, 2006.
- HASHIOKA Sadayuki, HAN Youn-Hee, FUJII Shunsuke, KATO Takahiro, MONJI Akira, UTSUMI Hideo, SAWADA Makoto, NAKANISHI Hiroshi, KANBA Shigenobu: Phospholipids modulate superoxide and nitric oxide production by lipopolysaccharide and phorbol 12-myristate-13-acetate-activated microglia. Neurochemistry International 50(3): 499-506, 2007.
- IMAI Fumihito, SUZUKI Hiromi, ODA Jumpei, NINOMIYA Takashi, ONO Kenji, SANO Hiroto, SAWADA Makoto: Neuroprotective effect of exogenous microglia in global brain ischemia. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism 27: 488-500, 2007.
- ITO Sachiko, KIMURA Kenya, HANEDA Masataka, ISHIDA Yoshiyuki, SAWADA Makoto, ISOBE Ken-ichi: Induction of matrix metalloproteinases (MMP3, MMP12 and MMP13) expression in the microglia by Amyloid-beta stimulation via the PI3K/Akt pathway. Experimental Gerontology. In press.

2. 学会発表

1. SAWADA Makoto, IMAMURA Kazuhiro, NAGATSU Toshiharu: Microglia activation and gene expression of cytokines in Parkinson's disease. Proceedings of 7th Interanational Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases (ADPD2005). 2007.
 2. 澤田 誠 : よいミクログリアと悪いミクログリア. 第 29 回日本神経科学大会プログラム : 58, 2006
 3. 澤田 誠 : ミクログリアイメージングの意義. 第 18 回日本脳循環代謝学会総会. 2006.11. (東京)
 4. 澤田 誠 : 血液脳関門を壊さない脳標的化薬物送達的手法. 第 15 回東海ニューロサイエンス研究会, 2006.4. (名古屋)
 5. 澤田 誠 : 脳特異的な薬物・遺伝子導入技術の開発. 第 11 回鶴舞公開セミナー. 2006.4. (名古屋)
 6. 澤田 誠 : 血液脳関門を壊さない脳標的化ドラッグデリバリー. 科学説話会. 2006.6 (名古屋)
 7. 澤田 誠 : microglia の起源, 疾患との関連. 第 112 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2007.3. (大阪)
 8. SAWADA Hirohide, HISHIDA Ryohei, HIRATA Yoko, ONO Kenji, SUZUKI Hiromi, MURAMATSU Shin-ichi, NAKANO Imaharu, TSUCHIDA Kunihiko, NAGATSU Toshiharu, SAWADA Makoto : Activated microglia affect the nigro-striatal dopamine neurons differently in neonatal and aged mice treated with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. 2006.6. (東京)
 9. 久野みゆき, 森畑宏一, 川脇順子, 翁 昌子, 澤田 誠, 酒井 啓 : 乳酸アシドーシス環境におけるミクログリアのプロトンチャンネル活性化. 第 29 回日本神経科学大会 : 157, 2006
 10. 澤田浩秀, 菱田良平, 平田洋子, 小野健治, 鈴木弘美, 村松慎一, 中野今治, 土田邦博, 永津俊治, 澤田 誠 : ミクログリアの活性化が MPTP 投与による黒質線条体ドーパミン神経細胞に及ぼす影響は新生児マウスと老齢マウスとは異なる. 第 29 回日本神経科学大会プログラム : 205, 2006
 11. 鈴木弘美, 外山 宏, 旗野健太郎, 工藤 元, 伊藤文隆, 小野健治, 加藤孝司, 伊藤健吾, 澤田 誠 : Imaging of activated microglia in brain injury. 第 49 回日本神経化学学会大会抄録号 : 132, 2006
 12. 小野健治, 佐藤愛美, 澤田 誠 : Control of microglial neurotoxicity via β -adrenergic receptors. 第 49 回日本神経化学学会大会抄録号 : 208, 2006
 13. 伊藤文隆, 工藤 元, 外山 宏, 鈴木弘美, 旗野健太郎, 中根正人, 大橋正夫, 加藤隆, 片田和広, 市瀬正則, 澤田 誠, 伊藤健吾 : 1.5T MRI による定位的ラット脳線条体撮像- 定位脳固定具を用いない撮像法の開発-. 日本分子イメージング学会設立総会及び第 1 回学術集会 2006.5. (京都)
 14. SATO Chihiko, YABE Uichiro, SAWADA Makoto, KITAJIMA Ken : Clearance of Polysialic acid during LPS-induced activation on microglia cells. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. 2006.6. (東京)
- ## H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

図 1

a



b

活性化ミクログリアの形態学的観察 (IB4染色)

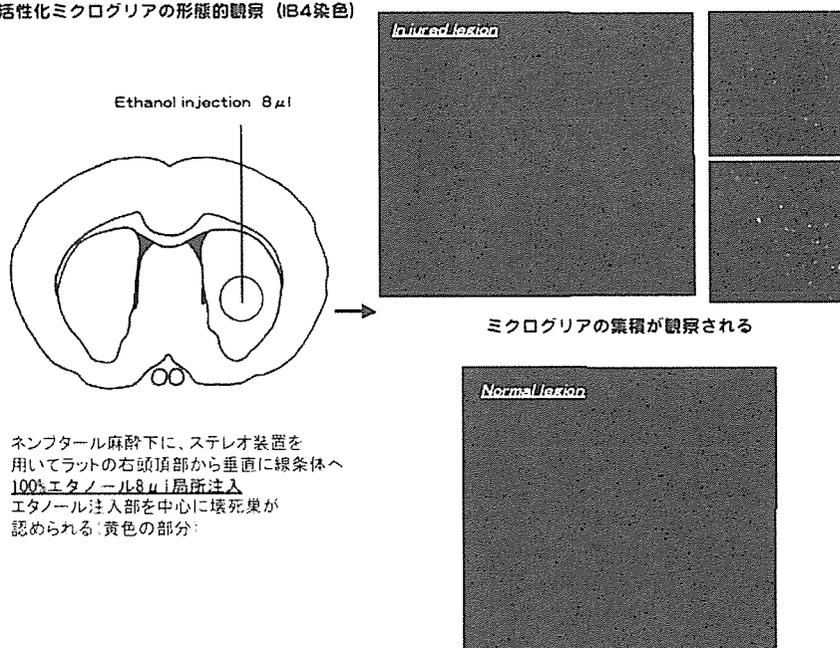
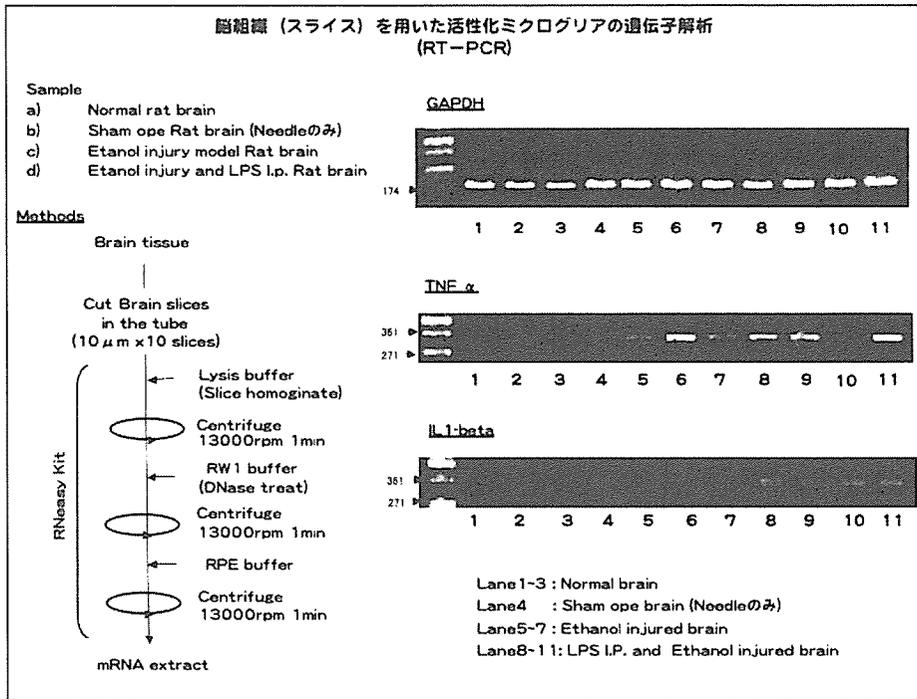


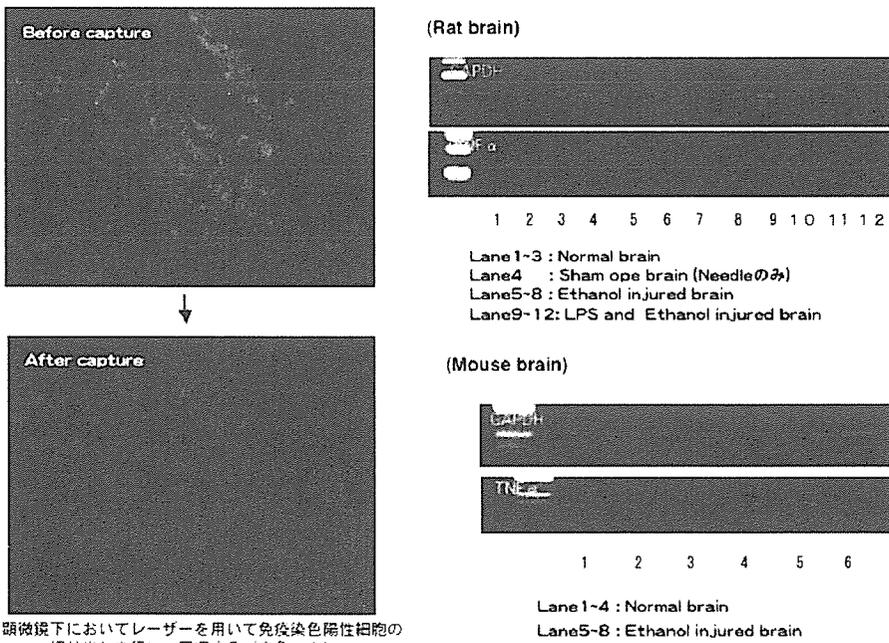
図 2

a



b

Microdissection systemを用いたRT-PCR



研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表 (服部信孝)

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamamoto S, Fukae J, Mori H, Mizuno Y, <u>Hattori N</u>	Positive immunoreactivity for vesicular monoamine transporter 2 in Lewy bodies and Lewy neurites in substantia nigra	Neurosci Lett	396	187-191	2006
Kitami MI, Kitami T, Nagahama M, Tagaya M, Hori S, Kakizuka A, Mizuno Y, <u>Hattori N</u>	Dominant-negative effect of mutant valosin-containing protein in aggresome formation	FEBS Lett	580	474-478	2006
Nishioka K, Hayashi S, Farrer MJ, Singleton AB, Yoshino H, Imai H, Kitami T, Sato K, Kuroda R, Tomiyama H, Mizoguchi K, Murata M, Toda T, Imoto I, Inazawa J, Mizuno Y, <u>Hattori N</u>	Clinical heterogeneity of alpha-synuclein gene duplication in Parkinson's disease	Ann Neurol	59	298-309	2006
Matsuda, N., Kitami, T., Suzuki, T., Mizuno, Y., Hattori, N., and Tanaka, K.	Diverse effects of pathogenic mutations of Parkin that catalyzes multiple mono-ubiquitylation in vitro	J. Biol. Chem.	281	3204-3209	2006
Sato, S., Chiba, T., Sakata, E., Kato, K., Mizuno, Y., Hattori, N, and Tanaka, K.	14-3-3h is a novel regulator of parkin ubiquitin-ligase	EMBO J	25	211-221	2006
Tomiyama H, Li Y, Funayama M, Hasegawa K, Yoshino H, Kubo S, Sato K, Hattori T, Lu C-S, Inzelberg R, Djaldetti R, Melamed E, Amouri R, Gouider-Khouja N, Hentati F, Hatano Y, Wang M, Imamichi Y, Mizoguchi K, Miyajima H, Obata F, Toda T, Farrer MJ, Mizuno Y, <u>Hattori N</u>	Clinicogenetic study of mutations in LRRK2 exon 41 in Parkinson's disease patients from 18 countries	MovDiord	21	1102-1108	2006
Kubo S, <u>Hattori N</u> , Mizuno Y	Recessive Parkinson's disease	Mov Disord	21	885-893	2006
Akagawa M, Ito S, Toyoda K, Ishii Y, Tatsuda E, Shibata T, Kawai Y, Ishino K, Kishi Y, Adachi T, Tsubata T, Takasaki Y, <u>Hattori N</u> , Matsuda T, Uchida K	Bispecific antibodies against modified protein and DNA with oxidized lipids	Proc Natl Acad Sci	103	6160-6165	2006
Ishihara L, Gibson RA, Warren L, Amouri R, Lyons K, Wielinski C, Hunter C, Swartz JE, Elango R, Akkari A, Leppert D, Surh L, Reeves KH, Thomas S, Ragone L, <u>Hattori N</u> , Pahwa R, Jankovic J, Nance M, Freeman A, Gouider-Khouja N, Kefi M, Bouar M, Sassi SB, Yahmed SB, Euch-Fayeche EG, Middleton L, Burn DJ, Watts RL, Hentati F	Clinical features of Parkinson's patients with and without LRRK2 mutations	Arch Neurol	63	1250-1254	2006
Maraganore DM, de Andrade M, Elbaz A, Farrer MJ, Ioannidis JP, Kruger R, Rocca WA, Schneider NK, Lesnick TG, Lincoln SJ, Hulihan MM, Aasly JO, Ashizawa T, Chartier-Harlin	Genetic Epidemiology of Parkinson's Disease (GEO-PD) Consortium Collaborative analysis of alpha-synuclein gene promoter variability and Parkinson disease	JAMA	296	661-670	2006

MC, Checkoway H, Ferrarese C, Hadjigeorgiou G, <u>Hattori N</u> , Kawakami H, Lambert JC, Lynch T, Mellick GD, Papapetropoulos S, Parsian A, Quattrone A, Riess O, Tan EK, Van Broeckhoven C.					
Mizuta I, Satake W, Nakabayashi Y, Ito C, Suzuki S, Momose Y, Nagai Y, Oka A, Inoko H, Fukae J, Saito Y, Sawabe M, Murayama S, Yamamoto M, <u>Hattori N</u> , Murata M, Toda T.	Multiple candidate gene analysis identifies alpha-synuclein as a susceptibility gene for sporadic Parkinson's disease	Hum Mol Genet	15	1151-1158	2006
Nakamura A, Kitami T, Mori H, Mizuno Y, <u>Hattori N</u>	Nuclear localization of the 20S proteasome subunit in Parkinson's disease	Neurosci Lett	406	43-48	2006
Sato, S., Chiba, T., Nishiyama, S., Kakiuchi, T., Tsukada, H., Hatano, T., Fukuda, T., Yasoshima, Y., Kai, N., Kobayashi, K., Mizuno, Y., Tanaka, K., and <u>Hattori, N.</u>	Decline of striatal dopamine release in parkin-deficient mice revealed by ex vivo autoradiography	J. Neurosci, Res	84	1350-1357	2006
Manabu Funayama, Yuanzhe Li, Hiroyuki Tomiyama, Hiroyo Yoshino, Yoko Imamichi, Mitsutoshi Yamamoto, Miho Murata, Tatsushi Toda, Yoshikuni Mizuno, <u>Nobutaka Hattori</u>	LRRK2 G2385R variant is a risk factor for Parkinson disease in Asian population	NeuroReport			in press
<u>Hattori N</u> , Machida Y, Sato S, Noda K, Iijima-Kitami M, Kubo S, Mizuno Y	Molecular mechanisms of nigral neurodegeneration in Park2 and regulation of parkin protein by other proteins	J Neural Transm Suppl	70	205-208	2006
Mizuno Y, <u>Hattori N</u> , Yoshino H, Hatano Y, Satoh K, Tomiyama H, Li Y.	Progress in familial Parkinson's disease	J Neural Transm Suppl	70	191-204	2006
<u>服部信孝</u>	Question & Answer Parkinson病 うつ病とパーキンソン病について教えてください	Mebio Brain & Mind, メジカルビュー社		197-199	2006
<u>服部信孝</u> , 西岡健弥, 佐藤栄人.	第2章病因・病理と病態整理 病因・発症機序. 最新医学別冊 新しい診断と治療のABC	最新医学社, パーキンソン病, 水野美邦・編	39	24-33	2006
船山 学, <u>服部信孝</u>	Parkinson 病の遺伝的要因. 医学のあゆみ	医歯薬出版株式会社	217(9)	909	2006
富山弘幸, <u>服部信孝</u> , 水野美邦	ミトコンドリア異常とその他の疾患 パーキンソン病	CLINICAL NEUROSCIENCE	24(6)	688-690	2006
<u>服部信孝</u> .	パーキンソン病の薬物療法	脳神経外科ジャーナル	15(11)	737-740	2006
茂泉俊次郎, 和田 真, 吉見建二, <u>服部信孝</u> , 中里泰三, 北澤 茂	時間順序判断に対する MPTP 投与の効果	順天堂医学	52	479	2006
<u>服部信孝</u>	第 47 回日本神経学会総会 セミナー パーキンソン病の発症機序 遺伝性パーキンソン病は黒質神経変性の鍵を握るか?	Pharma Medica	24(11)	91-97	2006

研究成果の刊行に関する一覧表（高橋良輔）

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kitajima, K., Takahashi, R., Yokota, Y.	Localization of Id2 mRNA in the adult mouse brain.	Brain Res	1073-1074	93-102	2006
Mitsueda-Ono, T., Ikeda, A., Noguchi, E., Takaya, S., Fukuyama, H., Shimohama, S., Takahashi, R.	Epileptic polyopia with right temporal lobe epilepsy studied by FDG-PET and MRI: A case report.	J Neurol Sci	247(1)	109-11.	2006
Hitomi, T., Ikeda, A., Matsumoto, R., Kinoshita, M., Taki, J., Usui, K., Mikuni N., Nagamine, T., Hashimoto, N., Shibasaki H. Takahashi, R.	Generators and temporal succession of giant somatosensory evoked potentials in cortical reflex myoclonus: Epicortical recording from sensorimotor cortex.	Clin Neurophysiol	117(7)	1481-6	2006
Arai, R., Yoshikawa, S., Murayama, K., Imai, Y., Takahashi, R., Shirouzu, M., Yokoyama, S.	Structure of human ubiquitin-conjugating enzyme E2 G2 (UBE2G2/UBC7).	Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun	62(4)	330-4.	2006
Shirakashi, Y., Kawamoto, Y., Tomimoto, H., Takahashi, R., Ihara, M.	<u>alpha-Synuclein is colocalized with 14-3-3 and synphilin-1 in A53T transgenic mice.</u>	Acta Neuropathol (Berl)	<u>112(6)</u>	<u>681-9.</u>	2006
Nakaji, K., Ihara, M., Takahashi, C., Itoharu, S., Noda, M., Takahashi, R., Tomimoto, H.	<u>Matrix metalloproteinase-2 plays a critical role in the pathogenesis of white matter lesions after chronic cerebral hypoperfusion in rodents.</u>	Stroke	<u>37(11)</u>	<u>2816-23.</u>	2006

研究成果の刊行に関する一覧表（田中啓二）

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sato, S., Chiba, T., Sakata, E., Kato, K., Mizuno, Y., Hattori, N., and Tanaka, K.	14-3-3h is a novel regulator of parkin ubiquitin-ligase	EMBO J	25	211-221	2006
Matsuda, N., Kitami, T., Suzuki, T., Mizuno, Y., Hattori, N., and Tanaka, K.	Diverse effects of pathogenic mutations of Parkin that catalyzes multiple mono-ubiquitylation in vitro	J. Biol. Chem.	281	3204-3209	2006
Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., and Tanaka, K.	Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration	Nature	441	880-884	2006
Sato, S., Chiba, T., Nishiyama, S., Kakiuchi, T., Tsukada, H., Hatano, T., Fukuda, T., Yasoshima, Y., Kai, N., Kobayashi, K., Mizuno, Y., Tanaka, K., and Hattori, N.	Decline of striatal dopamine release in parkin-deficient mice revealed by ex vivo autoradiography	J. Neurosci, Res.	84	1350-1357	2006
Hamazaki, J., Iemura, S., Natsume, T., Yashiroda, H., Tanaka, K., and Murata, S.	A novel proteasome interacting protein recruits the deubiquitinating enzyme UCH37 to 26S proteasomes	EMBO J.	25	4524-4536	2006
Hirano, Hayashi, H., Iemura, S., Hendil, K.B., Niwa, S., Kishimoto, T., Natsume, T., Kasahara, M., Tanaka, K., and Murata, S.	Cooperation of multiple chaperones required for the assembly of mammalian 20S proteasomes	Mol Cell	24	977-984	2006
Erika Isono, E., Nishihara, K., Saeki, Y., Yashiroda, Y., Kamata, N., Ge, L., Ueda, T., Kikuchi, Y., Tanaka, K., Nakano, A., and Toh-e, A.	The assembly pathway of the 19S regulatory particle of the yeast 26S proteasome	Mol Biol Cell	18	569-580	2007
Sakata, E., Yamaguchi, Y., Miyauchi, Y., Iwai, K., Chiba, T., Saeki, Y., Matsuda, N., Tanaka, K., and Kato, K.	Direct interactions between Nedd8 and ubiquitin E2 conjugating enzymes contribute to up-regulation of cullin-based E3 ligase activity	Nature Struct. Mol. Biol.	14	167-168	2007
Yoshida, Y., Murakami, A., Iwai, K., and Tanaka, K.	A Neural-specific F-box protein Fbs1 functions as a chaperone suppressing glycoprotein aggregation	J Biol Chem.	282	7137-7144	2007
Mizushima, T., Yoshida, Y., Kumanomidou, T., Hasegawa, Y., Suzuki, A., Yamane, T., and Tanaka, T.	Structural basis for selection of glycosylated substrate by SCF ^{Fbs1} ubiquitin ligase	Proc. Natl. Acad. Sci. USA	104	5777-5781	2007
Komatsu, M., Ueno, T., Waguri, S., Uchiyama, Y., Kominami, E., and Tanaka, K.	Constitutive autophagy: Vital role in clearance of unfavorable proteins in neurons	Cell Death and Differentiation		in press	2007

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
------	---------	---------------	-------	------	-----	-----	-----

Tanaka, K., Yashiroda, H., and Murata, S.	Ubiquity and diversity of the proteasome system.	(Eds. By Mayer, R. J., Ciechanover, A., and Rechsteiner, M.)	Protein Degradation	Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim,	Germany	2006	129-156
---	--	---	------------------------	--	---------	------	---------

Omura, T., Kaneko, M., Okuma, Y., Orba, Y., Nagashima, K., <u>Takahashi, R.</u> , Fujitani, M., Matsumura, S., Hata, A., Kubota, K., Murahashi, K., Uehara, K. Nomura, Y.	ubiquitin ligase HRD1 promotes the degradation of Pael receptor, a substrate of Parkin.	J Neurochem.	99(6)	1456-69	2006
<u>Kinoshita, M.</u> , <u>Ikeda, A.</u> , <u>Taki, J.</u> , <u>Usui, K.</u> , <u>Mikuni, N.</u> , <u>Takahashi, J.B.</u> , <u>Matsumoto, R.</u> , <u>Fukuyama, H.</u> , <u>Hashimoto, N.</u> , <u>Takahashi, R.</u>	<u>Heterogeneous epileptogenicity and cortical function within malformations of cortical development: A case report.</u>	J Neurol Sci.	251(1-2)1	129-33.	2006
<u>Kuzuya, A.</u> , <u>Uemura, K.</u> , <u>Kitagawa, N.</u> , <u>Aoyagi, N.</u> , <u>Kihara, T.</u> , <u>Ninomiya, H.</u> , <u>Ishiura S.</u> , <u>Takahashi, R.</u> , <u>Shimohama, S.</u>	<u>Presenilin 1 is involved in the maturation of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme1 (BACE1).</u>	J Neurosci Res	85(1)	153-65	2007
Kitao, Y., Imai, Y., Ozawa, K., Kataoka, A., Ikeda, T., Soda, M. Namekawa, K., Kiyama, H., Stern, D.M., Hori, O., Wakamatsu, K., Ito, S., Itohara, S., <u>Takahashi, R.</u> , Ogawa, S.	Pael Receptor Induces Death of Dopaminergic Neurons in the Substantia Nigra via Endoplasmic Reticulum Stress and Dopamine Toxicity, which is Enhanced under Condition of Parkin Inactivation.	Hum Mol Genet.	16(1)	50-60	2007
Ohtani, R., Tomimoto, H., Wakita, H., Kitaguchi, H., Nakaji, K., Takahashi, R.	Expression of S100 protein and protective effect of arundic acid on the rat brain in chronic cerebral hypoperfusion.	Brain Res	1135(1)	195-200.	2007

Kawamoto, Y., Akiguchi, I., Shirakashi, Y., Honjo, Y., Tomimoto, H., <u>Takahashi, R.</u> , Budka, H.	Accumulation of Hsc70 and Hsp70 in glial cytoplasmic inclusions in patients with multiple system atrophy.	Brain Res	1136(1)	219-227.	2007
Yamashita, H., Kawamata, J., Okawa, K., Kanki, R., Nakamizo, T., Hatayama, T., Yamanaka, K., <u>Takahashi, R.</u> , Shimohama, S.	Heat-shock protein 105 interacts with and suppresses aggregation of mutant Cu/Zn superoxide dismutase; clues to a possible strategy for treating ALS.	J Neurochem.			in press
Murakami, T., Moriwaki, Y., Kawarabayashi, T., Nagai, M., Ohta, Y., Deguchi, K., Kurata, T., Takehisa, Y., Matsubara, E., Ikeda, M., Harigaya, Y., Shoji, M., <u>Takahashi, R.</u> , Abe, K.	PINK1, a gene product of PARK6, accumulates in {alpha}-synucleinopathy brains.	J Neurol Neurosurg Psychiatry,			in press
Wang, H., Imai, Y., Kataoka, A., <u>Takahashi, R.</u>	Cell type-specific upregulation of parkin in response to ER stress.	ARS Forum			in press

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kim Y-J, Nakatomi R, Akagi T, Hashikawa T, Takahashi R.	Unsaturated fatty acids induce Cytotoxic aggregate formation of amyotrophic lateral sclerosis-linked Superoxide dismutase 1 mutants.	Journal of Biological Chemistry	280 (22)	21515-21521	2005
Yang Y, Gehrke S, Haque ME, Imai Y, Kosek J, Yang L, Beal MF, Nishimura I, Wakamatsu K, Ito S, Takahashi R, Lu B.	Inactivation of Drosophila DJ-1 leads to impairments of oxidative stress response and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling.	Proc Natl Acad Sci U S A.	102 (38)	13670-13675	2005
Urushitani M, Sik A, Sakurai T, Nukina N, Takahashi R, Julien JP.	Chromogranin-mediated secretion of mutant superoxide dismutase proteins linked to amyotrophic lateral sclerosis.	Nat Neurosci	9 (1)	108-118	2006
Rezgaoui M, Susens U, Ignatov A, Gelderblom M, Glassmeier G, Franke I, Urny J, Imai Y, Takahashi R, Schaller HC.	The neuropeptide head activator is a high-affinity ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPR37.	J Cell Sci.	119 (3)	542-549	2006

研究成果の刊行に関する一覧表（澤田誠）

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>NAGATSU</u> Toshiharu, <u>SAWADA Makoto</u>	Cellular and Molecular Mechanisms of Parkinson's Disease: Neurotoxins, Causative Genes, and Inflammatory Cytokines.	Cellular and Molecular Neurobiology	26(4-6)	781-802	2006
SAKURABA Hitoshi, <u>SAWADA Makoto</u> , MATSUZAWA Fumio, AIKAWA Sei-ichi, CHIBA Yasunori, JIGAMI Yoshifumi, ITOU Kouji	Molecular pathologies of and enzyme replacement therapies for lysosomal diseases	CNS & Neurological Disorders-Drug Targets	5(4)	401-413	2006
HAYASHI Yoshinori, TOMIMATSU Yoshirou, SUZUKI Hiromi, YAMADA Jun, WU Ziqiang, YAO Hngping, KAGAMIISHI Yoshifumi, TATEISHI Narito, <u>SAWADA Makoto</u> , NAKANISHI Hiroshi	The intra-arterial injection of microglia protects hippocampal CA1 neurons against global ischemia-induced functional deficits in rats	Neuroscience	142(1)	87-96	2006
Yamada Jun, <u>Sawada Makoto</u> , Nakanishi Hiroshi	Cell cycle-dependent regulation of kainate-induced inward currents in microglia	Biochemical and Biophysical Research Communications	349(3)	913-919	2006
<u>ITO Sachiko</u> , <u>SAWADA Makoto</u> , HANEDA Masataka, ISHIDA Yoshi, ISOBE Ken-ichi	Amyloid-beta peptides induce several chemokine mRNA expressions in the primary microglia and Ra2 cell line via PI3K/Akt and/or ERK pathway	Neuroscience Research	56(3)	294-299	2006
<u>SAWADA Makoto</u> , IMAMURA Kazuhiro, <u>NAGATSU Toshiharu</u>	Role of cytokines in inflammatory process in Parkinson's disease	Journal of Neural Transmission Supplement	70	373-381	2006

NAGATSU Toshiharu, <u>SAWADA Makoto</u>	Molecular mechanism of the relation of monoamine oxidase B and its inhibitors to Parkinson's disease: possible implications of glial cells	Journal of Neural Transmission(Suppl)	71	53-65	2006
HASHIOKA S, HAN YH, FUJII S, KATO T, MONJI A, UTSUMI H, <u>SAWADA M</u> , NAKANISHI H, KANBA S	Phospholipids modulate superoxide and nitric oxide production by lipopolysaccharide and phorbol 12-myristate-13-acetate-activated microglia	Neurochem Int	50	499-506	2007
IMAI Fumihito, SUZUKI Hiromi, ODA Jumpei, NINOMIYA Takashi, <u>ONO Kenji</u> , SANO Hirotoshi, <u>SAWADA Makoto</u>	Neuroprotective effect of exogenous microglia in global brain ischemia	Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism	27	488-500	2007
HASHIOKA S, HAN YH, FUJII S, KATO T, MONJI A, UTSUMI H, <u>SAWADA M</u> , NAKANISHI H, KANBA S	Phosphatidylserine and phosphatidylcholine-containing liposomes inhibit amyloid beta and interferon-gamma-induced microglia activation	Free Radic Biol Med.	42	945-954	2007

研究成果の刊行物・別刷り

Clinical Heterogeneity of α -Synuclein Gene Duplication in Parkinson's Disease

Kenya Nishioka, MD,¹ Shin Hayashi, MD,² Matthew J. Farrer, PhD,³ Andrew B. Singleton, PhD,⁴ Hiroyo Yoshino, BS,⁵ Hisamasa Imai, MD,⁶ Toshiaki Kitami, MD,¹ Kenichi Sato, MD,¹ Ryu Kuroda, MD,⁷ Hiroyuki Tomiyama, MD,^{1,7} Koichi Mizoguchi, MD,⁷ Miho Murata, MD,^{8,9} Tatsushi Toda, MD,^{9,10} Issei Imoto, MD, PhD,² Johji Inazawa, MD, PhD,² Yoshikuni Mizuno, MD,^{1,5} and Nobutaka Hattori, MD, PhD^{1,5,9}

Objective: Recently, genomic multiplications of α -synuclein gene (*SNCA*) have been reported to cause hereditary early-onset parkinsonism. The objective of this study was to assess the frequency of *SNCA* multiplications among autosomal dominant hereditary parkinson's disease (ADPD). **Methods:** We screened 113 ADPD probands and 200 sporadic PD cases by quantitative polymerase chain reaction and confirmed *SNCA* multiplications by fluorescence in situ hybridization (FISH) and comparative genomic hybridization array. **Results:** Two families (two patients from Family A and one from Family B) with *SNCA* duplication were identified among ADPD patients. Even though they had the same *SNCA* duplication, one patient had dementia. Because there was exactly the same difference between the regions originated from each patient, the finding suggests that the phenotype of *SNCA* multiplication may be also influenced by the range of duplication region. We also detected asymptomatic carriers in the families of both patients. Interestingly, the penetrance ratio was 33.3% (2/6) in one kindred, indicating that the ratio was very much lower than expected. **Interpretation:** These two newly identified Japanese patients with *SNCA* duplication and the five previously identified American and European families with *SNCA* triplication or duplication mutations indicate that the incidence of *SNCA* multiplication may be more frequent than previously estimated.

Ann Neurol 2006;59:298–309

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder next to Alzheimer's disease (AD). Although the exact cause for PD remains to be elucidated, genetic factors could contribute to the pathogenesis of PD. Indeed, six causative genes and four chromosomal loci for familial PD (FPD) have been identified.^{1–13} *α -Synuclein*, *UCH-L1*, and *LRRK2* have been identified as causative genes for autosomal dominant forms of FPD (ADPD), whereas *parkin*, *PINK1*, and *DJ-1* have been identified as causative genes for autosomal recessive forms of FPD (ARPD).^{1,10,14} The presence of several causative genes and loci for FPD indicates that the pathogenic mechanisms of sporadic PD are also multifactorial. Studies of FPD are important as they enhance our understanding of nigral neuronal death. Furthermore, it has been

proposed that the gene products for FPD are components of common pathways in sporadic PD. As testament, missense mutations such as A30P,¹⁵ E46K,¹⁶ and A53T,⁹ in the N-terminal of α -synuclein gene (*SNCA*) have been linked to a rare form of FPD, and α -synuclein subsequently was confirmed to be a major component of Lewy bodies (LBs) and Lewy neurites, the pathological hallmark of sporadic PD and dementia with LBs (DLB).¹⁷ Based on large population-based studies, missense mutations of *SNCA* are infrequent.¹⁸ In particular, the *SNCA* A53T mutations identified in patients with FPD originate from a single founder. To date, *SNCA* A30P and E46K mutations have been found in only one family each, suggesting that missense mutations are a very rare cause of parkinsonism. Recently, *SNCA* multiplications in FPD have been re-

From the ¹Department of Neurology, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan; ²Department of Molecular Cytogenetics, Medical Research Institute and Graduate School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan; ³Department of Neuroscience, Mayo Clinic, Jacksonville, FL; ⁴Laboratory of Neurogenetics, National Institute on Aging, Neurogenetics Branch, National Institute of Neurological Disorders and Stroke, Genetic Diseases Research Branch, National Institute of Health, Bethesda, MD; ⁵Research Institute for Disease of Old Ages, Juntendo University School of Medicine; ⁶Department of Neurology, Tokyo Rinkai Hospital, Tokyo; ⁷Department of Neurology, Shizuoka Institute of Epilepsy and Neurological Disorders, Shizuoka; ⁸Department of Neurology, Musashi Hospital, National Center of Neuro-

logy and Psychiatry, Kodaira; ⁹CREST, Japan Science and Technology Corporation, Kawaguchi, Saitama; and ¹⁰Division of Functional Genomics, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Japan.

Received Aug 10, 2005, and in revised form Oct 19. Accepted for publication Oct 22, 2005.

Published online December 15, 2005 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/ana.20753

Address correspondence to Dr Hattori, Department of Neurology, Juntendo University School of Medicine, 2-1-1 Hongo, Bunkyo, Tokyo 113-8421, Japan. E-mail: nhattori@med.juntendo.ac.jp