

## E. 結論

- 1) パーキンノックインマウスの脳においてドーパミン遊離の低下を主因とするドーパミン代謝異常を観察した。
- 2) パーキンはin vitroで複数のモノユビキチン化を触媒する酵素であることが判明した。パーキン活性中心はRING2ドメインであること、AR-JPの患者ではユビキチンリガーゼ活性の喪失以外の原因で発症する場合あることが判明した。
- 3) in vivoにおいて、パーキンは $\alpha$ シヌクレインと14-3-3 $\eta$ によって正負の活性制御を受けていることが判明した。
- 4) ニューロンでオートファジーを欠損させると神経変性疾患が発症した。
- 5) ニューロンでPAC1を欠損させる（結果的にプロテアソームレベルを低下させる）と神経変性疾患が発症した。

## F. 健康危険情報

無し

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Kitada, T., *et al.* (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, **392**, 605-608.
- (2) Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S., Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K., and Suzuki, S. (2000) Familial Parkinson's disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nature Genet.* **25**, 302-305.
- (3) 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. (2006) Decline of striatal dopamine release in parkin-deficient mice revealed by ex vivo autoradiography. *J. Neurosci, Res.* **84**,1350-1357.
- (4) Matsuda, N., Kitami, T., Suzuki, T., Mizuno, Y., Hattori, N., and Keiji Tanaka (2006) Diverse effects of pathogenic mutations of Parkin that catalyzes multiple mono-ubiquitylation in vitro. *J. Biol. Chem.* **281**, 3204-3209.
- (5) Sato, S., Chiba, T., Sakata, E., Kato, K., Mizuno, Y., Hattori, N., and Tanaka, K., (2006) 14-3-3h is a novel regulator of parkin ubiquitin-ligase. *EMBO J.* **25**, 211-221.
- (6) Komatsu, M., Waguri, S., Ueno, T., Murata, S., Tanida, I., Ezaki, E., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Uchiyama, Y., Kominami, E., Tanaka, K., and Chiba, T. (2005) Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in *Atg7*-deficient mice. *J. Cell Biol.* **169**, 425-434.
- (7) Kominami, E., and Tanaka, K. (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration. *Nature* **441**, 880-884.
- (8) Hirano, Y., Hendil, K.B., Yashiroda, H., Iemura, S., Nagane, R., Hioki, Y., Natsume, T., Tanaka, K., and Murata, S. (2005) A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes, *Nature* **437**, 1381-1385.
- (9) Hirano, Y., Hayashi, H., Iemura, S., Hendil, K.B., Niwa, S., Kishimoto, T., Natsume, T., Kasahara, M., Tanaka, K., and Murata, S. (2006) Cooperation of multiple chaperones required for the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Mol Cell* **24**, 977-984.
- (10) Murata, S., Minami, Y., Minami, M., Chiba, T., and Tanaka, K. CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein. *EMBO Rep.* **2001**; **2**: 1133-1138
- (11) Jana NR, Dikshit P, Goswami A, Kotliarova S, Murata S, Tanaka K, and Nukina N. (2005) Co-chaperone CHIP associates with expanded polyglutamine protein and promotes their degradation by proteasomes. *J Biol Chem.* **280**, 11635-11640
- (12) Sahara N, Murayama M, Mizoroki T, Urushitani M, Imai Y, Takahashi R, Murata S, Tanaka K, and Takashima A. (2005) In vivo evidence of CHIP up-regulation attenuating tau aggregation. *J Neurochem.* **2005**; **94**:1254-1263
- (13) Yoshida, Y., Chiba, T., Tokunaga, T., Kawasaki, H., Iwai, K., Suzuki, T., Ito, Y., Matsuoka, K., Yoshida, M., Tanaka, K., and Tai, T. E3 ubiquitin-ligase that recognizes sugar chains. *Nature* **2002**; **418**: 438-442
- (14) Yoshida, Y., Tokunaga, F., Chiba, T., Iwai, K., Tanaka, K., and Tai, T. Fbs2 is a new member of the E3 ubiquitin ligase family that recognizes sugar chains. *J. Biol. Chem.* **2003**; **278**: 43877-43884
- (15) Mizushima, T., Hirao, T., Yoshida, Y., Lee, S. J., Chiba, T., Iwai, K., Yamaguchi, Y., Kato, K., Tsukihara, T., and Tanaka, K. (2004) Structural basis of sugar-recognizing ubiquitin ligase. *Nature Struct. & Mol. Biol.* **11**, 365-370
- (16) Yoshida, Y., Murakami, A., Iwai, K., and Tanaka, K., (2007) A Neural-specific F-box protein Fbs1 functions as a chaperone suppressing glycoprotein aggregation. *J Biol Chem.* **282**, 7137-7144.
- (17) Mizushima, T., Yoshida, Y., Kumanomidou, T., Hasegawa, Y., Suzuki, A., Yamane, T., and Tanaka, T. (2007) Structural basis for selection of glycosylated substrate by SCF<sup>Fbs1</sup> ubiquitin ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 5777-5781.

## 2. 学会発表

Keiji Tanaka : The Quality Control of Proteins in the Cells. workshop on “Ubiquitin in Cancer and Chronic Diseases” , 2004.5.16-21, Jerusalem (Israel)

Keiji Tanaka : Ubiquitin ligases linked to neurodegeneration. FASEB Summer Conference. 2004.6.26.-7.1, Vermont, U.S.A

Keiji Tanaka : Structure, Function, and Assembly of Proteasome Complex . The 21 COE International Symposium on “Molecular Mechanisms of Cell Proliferation and Evolution”, 2004.10.31-11-2, Fukuoka

Keiji Tanaka : Ubiquitin-Proteasome System Normal Function and Outcome of its Dysfunction in Neurodegeneration. 12th International Winter Conference on Neurodegeneration. 2004.11.29-12.2, Kyoto

Keiji Tanaka : Cellular Apparatus for Proteolysis in Eukaryotes. Large-scale Analysis of Cellular Function -Advanced Technology for Proteomic Biology- January 27-28, 2005 Tokyo, Japan

Keiji Tanaka : Recognition of Glycosylated Substrates by SCF<sup>Fbs</sup> Ubiquitin Ligases. Keystone Symposium “Ubiquitin and Signaling” February 22-27, 2005, Taos Convention Center in Taos, New Mexico, USA

Keiji Tanaka : Structure, Function, and Assembly of Mammalian Proteasomes. The 6th Workshop on Proteasomes. April 24-26, 2005, Clermont-Ferrand (France)

Keiji Tanaka : Uncovering the mystery of the ubiquitin-proteasome system . The 17th Annual Meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology (plenary lecture) October 17-18, 2005. Seoul, Korea

Keiji Tanaka : A multistep-ordered Mechanism for the Assembly of Mammalian 20S Proteasomes . International Symposium on “Life of Proteins” AWAJI YUMEBUTAI (October 30-November 3, 2005. Awaji

Keiji Tanaka : Structure, Assembly and Functions of Mammalian Proteasomes. 2nd Meeting of Bone Biology Forum. November 18-19, 2005, Mishima

Keiji Tanaka : Molecular Mechanism of the Assembly of Mammalian Proteasomes. The 21 era COE Program of Osaka University. Symposium [Dynamics of Biological Systems] . January 12-13, 2006, Osaka, Japan.

Keiji Tanaka, Yuko Hirano, and Shigeo Murata : Multiple Chaperones Assist the Assembly of

Mammalian 20S Proteasomes . The Fourth NIBB-EMBL Symposium “Biology of Protein Conjugation: Structure and Function”. Okazaki Conference Center, Aichi, Japan (October 3-5, 2006), Okazaki.

Keiji Tanaka : Ablation of autophagy causes neurodegeneration. The Movement Disorder Society’s (MDS) 10th International Congress of Parkinson’s Disease and Movement Disorders (November 1, 2006), Kyoto.

Masaaki Komatsu, Keiji Tanaka: Ablation of constitutive autophagy in neural cells causes neurodegeneration in mice, The 4<sup>th</sup> Congress of Federation of Asian-Oceanian Neuroscience Societies November 30-December 4, 2006 Hong Kong, China.

## G. 知的財産権の取得状況

### 1. 特許取得

無し

### 2. 実用新案登録

無し

### 3. その他

無し

#### 研究要旨

常染色体劣性遺伝性パーキンソニズム(AR-JP)の病因遺伝子として同定された Parkin はユビキチンプロテアソーム蛋白質分解系で重要な役割を果たすユビキチンリガーゼであり、蛋白質分解系の破綻がPDの発症に関わることを示す強い証拠を提供している。我々はパーキンの基質蛋白質として構造異常を起こした Pael 受容体(Pael-R)を単離し、Parkin の変異によって分解されなくなった Pael-R が蓄積し、小胞体ストレスを引き起こして神経変性が生じるという仮説を提唱している。この仮説を実証するためには Pael-R の過剰発現によりドーパミン神経選択的宇細胞死を引き起こす動物モデルの作出が必須である。一方 Pael-R の生理的役割の解明も AR-JP の病態理解を進めるためにも重要な課題である。そのため、平成 16 年度は Pael-R のトランスジェニック (Tg) マウスと Pael-R ノックアウト(KO)マウスを作製し、その病理形態学、行動学、神経化学的解析により、Pael-R が線条体のドーパミン代謝を正に制御する役割があることを示した。平成 17 年度は Pael-R を発現するアデノウイルスを作製し、これをパーキンノックアウト (Parkin-KO) マウスの黒質ドーパミンニューロンに導入して細胞死を引き起こす系を確立し、Parkin-KO マウスが野生型に比して Pael-R の毒性により脆弱であることを示した。またその細胞死がチロシン水酸化酵素の阻害剤によって緩和されることから、ドーパミンの存在そのものがPael-Rの毒性を強化する作用があることを見出した。平成18年度はPael-R TgマウスとParkin KOマウスを掛け合わせた二重変異 (Pael-R Tg/Parkin KO) マウスを作製した。Pael-R/Parkin-KO マウスでは黒質、青斑核のカテコールアミン作動性ニューロンが特異的変性し、二年齢で Tg のホモ接合型では 40%の細胞脱落が認められた。また同部位で小胞体ストレス応答および酸化的ストレスが惹起されていた。 $\alpha$ -シヌクレイン陽性封入体は認められなかった。以上より Pael-R Tg/Parkin KO 二重変異マウスはAR-JPのよいモデルになるものと考えられた。

#### A. 研究目的

常染色体劣性若年性パーキンソン病 (AR-JP) の原因遺伝子産物 Parkin は、細胞内タンパク質の分解にかかわるユビキチン・プロテアソーム経路のユビキチンリガーゼ (E3) の活性を持ち、AR-JP 患者でみられる変異体はこのユビキチン

リガーゼ活性が欠失または低下している。このことは、Parkin によって本来分解されるべき基質の神経細胞への蓄積がその病態の原因であることを示唆している。我々が Parkin の基質として同定した膜タンパク質パエル受容体 (Pael-R) は神経系培養細胞内で過剰発現させると、高度

なユビキチン化とともに細胞死が観察される。この原因は Pael-R が折り畳み効率の低いタンパク質であり、ほとんどが小胞体関連分解 (ERAD) で分解されるものの、ERAD の処理能力を超えた発現量が小胞体及び細胞質に蓄積し小胞体ストレスを引き起こすからであると考えられる。

Pael-R をショウジョウバエの脳神経全体に発現させると、加齢とともにドーパミン神経のみ選択的に変性欠落する。このようにミスフォールド化 Pael-R が毒性を発揮するのに対し、正しくフォールディングされた Pael-R の生理的機能についてはほとんどわかっておらず、AR-JP の病態理解の上でも、その解明を進める必要がある。そこで平成 16 年度は Pael-R の生理的役割の解明に取り組んだ。そしてこれらの結果を踏まえ、平成 17 年、18 年には Pael-R アデノウイルスの Parkin-KO マウスへの感染実験および、Pael-R Tg/Parkin-KO 二重変異マウスの作製によるパーキンソン病モデルマウスの作成を試みた。

## B. 研究方法

平成 16 年度は常法に従って Pael-R の exon 1 を欠損するノックアウト (Pael-R-KO) マウスとプリオンプロモーター制御下にヒト Pael-R を過剰発現するトランスジェニックマウス (Pael-R-Tg) を作製し、神経化学的、行動学的解析を加えた。実験は内規に従い、動物倫理に配慮して行なった。

平成 17 年度はヒト Pael-R のコンストラクトを Takara adenovirus expression kit を用いて TPC 法によりアデノウイルスベクターに組み込み (LoxPael-R)、Cre-Lox system を用いてコンディショナルに発現する系を構築した。神経特異的発現を実現するために神経特異的な Cre の発現をドライブするアデノウイルス mSCGNCre を

(大阪市大・木山博資教授より供与) 用いた。Grip78 アデノウイルス (北海道大学・小池達郎教授より供与) は細胞死の抑制実験に用いた。アデノウイルスのマウス線条体への注入は深麻酔下で、定位脳手術的手法により行い、アデノウイルスの逆行性輸送については注射後 12 日後にレポーターとして用いた GFP アデノウイルスの蛍光を観察することによって評価した。ドーパミンの産生を抑える実験は動物を TH の阻害剤である alpha-methyl-DL-Tyrosine (AMPT) の腹腔内投与で前処理することで行った。また細胞死の評価は動物を深麻酔下で 4%パラホルムアルデヒドで固定し、組織切片を作製し、TUNEL 法および活性化カスパーゼ-3 の免疫染色により行った。Parkin<sup>-/-</sup>マウスはエキソン 3 を 2 つの lox-P site ではさまれた PGK-neo カセットで置き換えることによって作製した。ORP150<sup>-/-</sup>マウス、ORP150 トランスジェニックマウスはそれぞれ定法により作製し、すでに金沢大学小川 智教授が発表済みのものを用いた。

平成 18 年度は平成 16 年度に作出した Pael-R Tg マウスに、同じく常法により作製したエキソン 3 を欠損する Parkin KO マウスと掛け合わせ、パーキン欠損のバックグラウンドのもとに non-Tg, hemizygous Tg, homozygous Tg の 3 種類の遺伝子型のマウスを作製し、神経病理学的解析、行動学的解析、神経化学的解析を行った。

## C. 研究結果

平成 16 年度の研究の結果、Pael-R-Tg では線条体のドーパミン量が 20%増加していたのに対し、Pael-R-KO では 40%減少していた。それに対応してオープンフィールドテストでは Pael-R-Tg で活動性が亢進していたのに対し、Pael-R-KO では減少傾向であった。線条体の電気生理学的解析もドーパミン量の変化に一致する所見であった。

平成 17 年度の研究では定位脳手術的手法により線条体に注入した LoxPael-R と mSCGNCre は黒質に到達し、しかも神経特異的発現が確認された。コントロールとして LoxEGFP または LoxLacZ と mSCGNCre を注入した場合は黒質における ORP150 と小胞体シャペロンのレベルに差はなかったが、LoxPael-R と mSCGNCre の場合は ORP150 と小胞体シャペロンの発現レベルの著しい上昇が観察された。同じ力価の LoxPael-R と mSCGNCre を野生型マウスと Parkin<sup>-/-</sup>マウスに注入したところ、Parkin<sup>-/-</sup>マウスのほうでより顕著な細胞死が観察された。注入後 5 日後に TH シグナルの著明な減衰、カスパーゼ-3 の著しい活性化、7 日後には TUNEL 陽性細胞の顕著な増加が見られた。ところが LoxPael-R と mSCGNCre に加え、Grp78 アデノウイルスを共に注入すると、この細胞死は有意に抑制された。さらに ORP150<sup>-/-</sup>マウス、ORP150 トランスジェニックマウスの線条体に LoxPael-R と mSCGNCre を注入したところ、前者では細胞死の表現型が増強され、後者では抑制された。さらにドーパミンが Pael-R による神経細胞死に与える影響を明らかにするため、ドーパミン合成阻害剤 AMPT を投与したところ、線条体のドーパミン含有量は 30% 以下に減少した。それとともに Pael-R による神経細胞死も著しく抑制された。

平成 18 年度に解析した Pael-R Tg/Parkin-KO 二重変異マウスでは、可溶性のみならず、不溶性 Pael-R の発現量が hemizygote で non-Tg の 10 倍以上と顕著に増加しており、その程度はパーキンに関して野生型の Pael-R Tg マウスに比べても有意に増えていた。また選択的に黒質ドーパミンニューロンの脱落が認められ、homozygous Tg では 12 ヶ月で 20%、24 ヶ月の加齢マウスでは約 40% もの減少が観察された。Hemizygous Tg

マウスでは細胞死の程度は Homozygous Tg のちょうど半分程度であった。 $\alpha$ -シヌクレインの抗体で染色する限りではレビー小体、レビーニューライト様の構造は検出できなかった。細胞死は観察されたものの、行動学的にはオープンフィールド試験でもロタロッド試験でも、二重変異マウスとコントロールの間で差は見られなかった。小胞体ストレスの指標では、6 ヶ月齢から BiP、CHOP の発現レベルが持続的に上昇しており、活性化型カスパーゼ 12 及びリン酸化 JNK2 も量も増加していた。また、Pael-R Tg においては、ドーパミン及びその代謝産物である HVA、DOPAC が 6 ヶ月齢でトランスジーンの量依存的に増えていたが、12 ヶ月齢以降、特に homozygote で低下傾向がみられた。さらに中脳では酸化ストレスの指標となるカルボニル化タンパク質のレベルが 6 ヶ月齢から上昇傾向あり、24 ヶ月齢で顕著な差が見られるようになったが、大脳皮質では 24 ヶ月齢でもコントロールとの間に有意な差はみられなかった。最後に 18 ヶ月齢以降、黒質におけるミトコンドリアの複合体 I の活性が特異的に低下した。

#### D. 考察

平成 16 年度の研究結果から、Pael-R はドーパミン量を制御していることが強く示唆された。

Pael-R の量的変化がドーパミン量の変化をもたらしたことは Pael-R が黒質ドーパミンニューロンに高度に発現することに一致する事実として興味深い。

平成 17 年度の結果から、Pael-R の黒質における過剰発現は *in vivo* でもドーパミン神経細胞死をひきおこし、これは我々の SH-SY5Y 細胞におけるデータを裏付ける結果であった。Pael-R による細胞死が GRP78 および ORP150 の過剰発現によって抑制された結果は Pael-R による細胞死には小胞体ストレスの関与が大きいことを強く

支持する。また Pael-R の線条体への注入が顕著な黒質ドーパミン神経細胞死を引き起こしたにもかかわらず、線条体ニューロンはほとんど変性しなかった。このことはドーパミン神経が選択的に Pael-R 毒性に対して脆弱であることを意味する。このドーパミン神経毒性はドーパミンの産生を薬剤で抑えることによって抑制された。このメカニズムの説明の 1 つとしてドーパミンとその前駆体のドーパの代謝の副経路で産生されるドーパミンキノン、ドーパキノンなどが酸化ストレスとして働き組織を障害しやすい環境を作ることが考えられる。このようなキノン体が Pael-R のシステイン残基を修飾し、Pael-R のミスフォールド化をさらに促進することが培養細胞の実験ではすでに示されている。一方我々の Pael-R トランスジェニックマウスの以前の解析で Pael-R の過剰発現が線条体でのドーパミン量を微増させるとのデータが得られている。このようなことから Pael-R の蓄積はその本来のシグナルを増強してドーパミン産生を増やし、ドーパミンからはドーパミンキノンが生成して Pael-R を修飾することによって Pael-R のミスフォールド化を進め、小胞体ストレスをさらに増悪させて、ドーパミン神経特異的細胞死が起こるのではないかと推測された。

平成 18 年度の解析結果で Pael-R Tg/Parkin-KO 二重変異マウスは Parkin-KO とのかけ合わせで更に Pael-R 量が増加することから、Pael-R がパーキンの基質であることが更に裏付けられた。また、二重変異マウスは時間依存的、トランスジーン量依存的な慢性進行性のカテコールアミン作動性ニューロン特異的変性を示し、レビー小体陰性であったことより、ヒト AR-JP のよいモデルになるものと思われた。細胞死が生じたにもかかわらず、行動学的な異常がみられなかったのは、ヒトのパーキンソン病でも 50-60%

以上の細胞死が起こらないと発祥しないという観察事実と一致する。初期の Pael-Tg におけるドーパミン及びその代謝産物の増加は Pael-R がドーパミン代謝にかかわっているという昨年度の我々の研究結果を裏付けるものであった。細胞死の原因はこれまで我々が示してきたように、小胞体ストレスの関与が大きいと考えられる。黒質では更に酸化的ストレスの亢進がみられたが、これはドーパミンの存在、変性にともなうミクログリオシスなどが複合的に関与しているものと想像される。ミトコンドリア複合体 I の選択的活性低下の原因は今後更に検討をすすめていく必要があるが、小胞体ストレスおよびそれに伴う細胞死の下流にミトコンドリア複合体 I の活性低下があることを示唆しており、大変興味深い。

## E. 結論

平成 16 年度は Pael-R が黒質線条体経路のドーパミン代謝を正に制御する役割を持つことが明らかになった。

平成 17 年度はアデノウイルスを用いた Pael-R のマウス線条体での過剰発現は逆行輸送によりドーパミン神経細胞死を引き起こすことが示された。このメカニズムには小胞体ストレスとドーパミンキノンなどを含めたドーパミン毒性が深く関わっているものと考察された。

さらに平成 18 年度の研究結果から、Pael-R Tg/Parkin-KO 二重変異マウスは時間依存的、トランスジーン量依存的な慢性進行性のカテコールアミン作動性ニューロン特異的変性を示し、レビー小体陰性であったことより、ヒト AR-JP のよいモデルとなることが示された。以上 3 年間の成果を総括すると、Pael-R はドーパミン神経においてドーパミン量を制御する大切な役割を担っている一方、ミスフォールド化した Pael-

R はマウスで急性または慢性進行性の小胞体ストレス誘発性細胞死を招いてドーパミン神経細胞死を引き起こすことがわかり、Pael-R の生理的および病態下での役割の理解が大きく進展した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Yokota, T., Miyagishi, M., Hino, T., Matsumura, R., Andria, T., Urushitani, M., Rao, R. V., Takahashi, R., Bredesen, D. E., Taira, K. and Mizusawa, H. (2004) siRNA-based inhibition specific for mutant SOD1 with single nucleotide alternation in familial ALS, compared with ribozyme and DNA enzyme. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 314, 283-91.
- (2) Murakami, T., Shoji, M., Imai, Y., Inoue, H., Kawarabayashi, T., Matsubara, E., Harigaya, Y., Sasaki, A., Takahashi, R., Abe, K. (2004) Pael-R is accumulated in Lewy bodies of Parkinson's disease. **Ann. Neurol.**, 55, 439-42.
- (3) Urushitani, M., Kurisu, J., Tateno, M., Hatakeyama, S., Nakayama, K.I., Kato, S., Takahashi, R. (2004) CHIP promotes proteasomal degradation of familial ALS-linked mutant SOD1 by ubiquitinating Hsp/Hsc70. **J. Neurochem.**, 90, 231-44.
- (4) Hosokawa, Y., Suzuki, H., Suzuki, Y., Takahashi, R., Seto, M. (2004) Anti-apoptotic function of API2-MALT1 fusion protein involved in t(11;14)(q21;q21) MALT lymphoma. **Cancer Res.**, 64, 3452-7.
- (5) Vyas, S., Juin, P., Hancock, D., Suzuki, Y., Takahashi, R., Triller, A., Evan, G. (2004) Differentiation dependent sensitivity to apoptogenic factors in PC12 cells. **J. Biol Chem.**, 279, 30983-93.
- (6) Tateno, M., Sadakata, H., Tanaka, M., Itohara, S., Shin, R-M., Miura, M., Masuda, M., Aosaki, T., Urushitani, M., Misawa, H., Takahashi, R. (2004) Calcium-permeable AMPA receptors promote misfolding of mutant SOD1 protein and development of amyotrophic lateral sclerosis in a transgenic mouse model. **Hum. Mol. Genet.**, 13, 2183-2196
- (7) Yamamoto, A., Friedlein, A., Imai, Y., Takahashi, R., Kahle, P.J., Haass, C. (2005) Parkin phosphorylation and modulation of its E3 ubiquitin ligase activity. **J. Biol. Chem.**, 280, 3390-3399
- (8) Hatakeyama, S., Matsumoto, M., Kamura, T., Murayama, M., Chui, D.H., Planel, E., Takahashi, R., Nakayama, K.I., Takashima, A. (2004) U-box protein

carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein (CHIP) mediates poly-ubiquitylation preferentially on four-repeat Tau and is involved in neurodegeneration of tauopathy. **J Neurochem.**, 91, 299-307.

(9) Kim YJ, Nakatomi R, Akagi T, Hashikawa T, Takahashi R. (2005) Unsaturated fatty acids induce cytotoxic aggregate formation of amyotrophic lateral sclerosis-linked superoxide dismutase 1 mutants. **J. Biol. Chem.**, 280, 21515-21.

(10) Sekine K, Hao Y, Suzuki Y, Takahashi R., Tsuruo T, Naito M (2005) HtrA2 cleaves Apollon and induces cell death by IAP-binding motif in Apollon-deficient cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 330, 279-285

(11) Yang, Y., Gehrke, S., Haque, M.E., Imai, Y., Kosek, J., Yang, L., Beal, M.F., Nishimura, I., Wakamatsu, K., Ito, S., Takahashi, R., Lu, B. (2005) Inactivation of Drosophila DJ-1 leads to impairments of oxidative stress response and PI3K/Akt signaling. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 102, 13670-13675

(12) Sahara N, Murayama M, Mizoroki T, Urushitani M, Imai Y, Takahashi R., Murata S, Tanaka K, Takashima A (2005) In vivo evidence of CHIP up-regulation attenuating tau aggregation. **J. Neurochem.**, 94, 1254-1263

(13) Urushitani, M., Sik, A., Sakurai, T., Nukina, N., Takahashi, R. and Julien, J-P Chromogranin-mediated Secretion of Superoxide Dismutase Mutants as a Novel Pathogenic Pathway for ALS. **Nature Neurosci.**, 9:108-18.

(14) Rezgaoui M, Susens U, Ignatov A, Gelderblom M, Glassmeier G, Franke I, Umy J, Imai Y, Takahashi R., Schaller HC. (2006) The neuropeptide head activator is a high-affinity ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPR37. **J. Cell Sci.** 119, 542-9.

(15) Omura, T., Kaneko, M., Okuma, Y., Orba, Y., Nagashima, K., Takahashi, R., Fujitani, M., Matsumura, S., Hata, A., Kubota, K., Murahashi, K., Uehara, K. and Nomura, Y. (2006) A ubiquitin ligase HRD1 promotes the degradation of Pael receptor, a substrate of Parkin., **J. Neurochem.**, 99, 1456-69

(16) Kitao Y, Imai Y, Ozawa K, Kataoka A, Ikeda T, Soda M, Namekawa K, Kiyama H, Stern DM, Hori O, Wakamatsu K, Ito S, Itohara S, Takahashi R., Ogawa S. (2007) 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.**, 16:50-60.

- (17) Wang H, Imai Y, Kataoka A, Takahashi R. (2007) Cell type-specific upregulation of parkin in response to ER stress. **ARS Forum**, in press.
- (18) Imai, Y. and Takahashi, R. (2004) How do Parkin mutation result in neurodegeneration? **Curr. Opin. Neurobiol.** 14:384-9.
- (19) Imai, Y. and Takahashi, R.: Parkin and ER stress. In *Molecular Mechanisms in Parkinson's disease*, eds by Kahle, P. and Haass, C., Landes Bioscience, 2005
- (20) Suzuki, Y. and Takahashi, R. : Omi/HtrA2, a mitochondrial serine protease regulating cellular life and death. In "Apoptosis and cancer therapy" (eds. Debatin and Fulda), Wiley-VCH, 2006.
- (21) Takahashi, R. (2006) The pathological role of Pael-receptor/GPR37 in AR-JP. *Park. Relat. Disord.*, Suppl 2:S110-3
- (22) Wang, H.Q., Imai, Y. and Takahashi, R. Expanding insights of endoplasmic reticulum stress in Parkinson's disease. **ARS Forum**, in press.

## 2. 学会発表

### 国際学会発表

- (1) Takahashi, R. : The role of misfolded Pael receptor in autosomal recessive juvenile Parkinsonism. Protein kinesis and human disease symposium, Annual Meeting 2004 of Korean Sorean Society for Biochemistry and Molecular Biology, Seoul, South Korea (2004.5.27)
- (2) Takahashi, R.: The role of misfolded Pael receptor in Parkinson's disease. FASEB Summer Research Conference "Protein misfolding, amyloid and conformational disease", Snowmass, Colorado, USA (2004.6.14)
- (3) Takahashi, R. : Familial Parkinson's disease and ER stress – The pathogenetic mechanisms underlying autosomal recessive juvenile parkinsonism. 2<sup>nd</sup> Singapore International Neuroscience Conference, Singapore (2004. 7.23)
- (4) Takahashi, R.: Molecular mechanisms underlying Parkin-related Parkinson's disease. UCSF Neuroscience Seminar, San Francisco, California, USA (2004. 9.22)
- (5) Takahashi, R.: How do Parkin mutations cause dopaminergic neurodegeneration? 2<sup>nd</sup> RIKEN BSI Molecular Neuropathology International Workshop, Tokyo, JAPAN (2004. 10.1)
- (6) Takahashi, R.: The role of GPR37/Pael-R in the

life and death of dopaminergic neurons. Neuroscience seminar at the Parkinson's Institute, Sunnyvale, California, USA (2004.10.28)

(7) Takahashi, R.: Modulators of mutant SOD1 aggregate formation. Symposium by Fondation Andre Delambre "Amyotrophic Lateral Sclerosis: Causes and Therapeutic Perspectives", Montreal, Canada (2005. 9. 9)

(8) Takahashi, R.: The role of GPR37/Pael-R in the life and death of dopaminergic neurons. The 3<sup>rd</sup> Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences, Tokyo, Japan (2005.12. 6)

(9) Takahashi, R.: Modulators of mutant SOD1 aggregate formation. The 21<sup>st</sup>Century COE symposium, Nagoya, Japan(2005.12.01)

(10) Takahashi, R.: The molecular mechanisms of familial parkinsonism. Korean-Japanese Joint Seminar, Okazaki, Aichi (2006.02.09)

(11) Takahashi, R.: The role of GPR37/Pael-R in the life and death of dopaminergic neurons. World Parkinson's Congress, Washington, D.C., U.S.A. (2006. 02.24)

(12) Takahashi, R.: The Role of GPR37/Pael-R in the Life and Death of Dopaminergic Neurons, First Japanese German Workshop Research in Neurodegenerative diseases, Tuebingen, Germany (2006. 3. 24)

(13) Takahashi, R. : "Proteasome inhibition" Workshop "controversies in the pathogenesis of PD", 10<sup>th</sup> International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Kyoto(2007.10.30)

## 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



## 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培養細胞モデル系と *in vivo* 病態モデルにおいて解析を行った。(1) nef 導入により形質転換したミクログリアと、遺伝子変異を持つ不活性型 nef を導入したミクログリアにおいてディファレンシャル 2 次元タンパク質解析法により発現タンパク質の変化を調べ、発現するタンパク質に大きな差があることを見いだした。(2) 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変化すると考えている。本研究では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と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。

HIV が中枢神経系に感染すると神経細胞死や神経機能障害を誘発し痴呆が生じることが知られている。このとき生じる生物反応はパーキン

ソン病などの神経変性疾患が発症する場合にも共通性がみられると考えられている。ミクログリアはこのときに中心的な役割を果たすと考えられているが、その詳細や実体は明らかでない。最近我々は、本来神経保護的に働くミクログリアに HIV 由来 nef 遺伝子を導入することによって神経障害性の活性酸素を産生ようになること (J Biol. Chem.277:42136-43, 2002) を見いだした。多くの神経変性疾患の場合、脳実質内で産生される活性酸素により神経障害が生じることから、nef 遺伝子導入によるミクログリアの形質転換が神経変性の引き金となっている可能性が強く考えられる。そこで、本研究では nef 遺伝子導入によるミクログリアの毒性転換の性質と nef 遺伝子産物の細胞内での作用点である細胞内因子を特定することを目的とし、nef 導入ミクログリアと非導入ミクログリアおよび変異型 nef 導入ミクログリアに於いてそのタンパク質発現を解析した。

つぎに、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化型のみ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 が発現するのみ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 陰性の活性化のみクログリアが観察される。そこでこのシステムを使ってのみクログリアの活性化の評価を行った。

## B. 研究方法

・ nef 導入により形質転換したのみクログリアと、遺伝子変異を持つ不活性化型 nef を導入したのみクログリアにおいて

- 1) NADPH オキシダーゼ phox サブユニットに対する抗体をもちいた免疫沈降により nef タンパク質と相互作用する因子について分析した
- 2) Nef 発現細胞を PMA で刺激し、免疫蛍光染色によって Rac1 タンパク質の挙動を調べた
- 3) ディファレンシャル 2 次元タンパク質解析法により発現タンパク質の変化を調べた。

・ 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 $\mu$ L 局注し、内在性のみ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  $^{11}\text{C}$ -PK11195 12~41MBq をポーラス静注し、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化のみ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 $\mu\text{m}$  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のみクログリアを可視化した。切片上ののみクログリアの位置をスキヤニン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 $\mu\text{m}$  サイズのスポットで活性化のみ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

- ・ nef 遺伝子を導入したのみクログリアは活性酸素産生が増大し、その発現量に伴って神経毒性を発揮した。
- ・ N 末端に変異を持つためにミリストイル化がおこらない nef 変異体 G2A を導入した場合は活性酸素産生の増大や神経毒性の発現がみられなかった。
- ・ nef 導入により形質転換したのみクログリアと、遺伝子変異を持つ不活性化型 nef を導入したのみクログリアにおいてディファレンシャル 2 次元タンパク質解析法により発現タンパク質の変化を調べ、発現するタンパク質に大きな差があること、活性化型 nef 導入細胞で特徴的な塩基性タンパクの集積が見られることを見いだした。活性酸素産生の主体である NADPH オキシダーゼ phox サブユニットに対する抗体をもちいた免疫沈降分析から活性化型 nef はすくなくとも gp91 と Rac1 サブユニットの一部に結合していることがわかった (図 1)。
- ・ Nef 発現細胞を PMA で刺激したとき、Rac1 が膜へ移動することが免疫蛍光染色によって明らかになった (図 2)。
- ・ 活性化型 Nef を高発現する stable clone HS1 および変異型 Nef を発現する G2A のそれぞれを

0.1 $\mu$ g/ml PMA で 30 分処理して活性化したときの 2 次元電気泳動をおこない、PMA 処理により変化するタンパク質についてピックアップして質量分析装置で分析した所、PMA により活性化されたときに量的な変化を示すタンパク質が大きく異なることがわかった (図 3 および表 1)。

- ・ 活性型 Nef を高発現する stable clone HS1 および変異型 Nef を発現する G2A からタンパク質を抽出し疎水性クロマトグラフによりタンパク質の分画用出を行った所、両者で溶出パターンが大きく異なることがわかった。活性型 Nef が高発現している HS1 では対照の G2A 細胞に比べ疎水性の高い分画に多くのタンパク質ピークが見られることがわかった (図 4)。
- ・ そこで、これらについて 2 次元電気泳動を行い、発現に差が見られた 36 スポットについてゲルを切り出し、タンパク質抽出を行った (図 5)。現在、順次質量分析にて解析を行っている (図 6)。
- ・ 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 7b 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 8a)。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 $\alpha$ , IL-1b の発現が確認できた (図 8b)。

#### 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。

それではミクログリアの「よい」「悪い」は何によって決まるのだろうか？一般に食細胞では貪食活性に連動した活性酸素産生がおこるが、ミクログリアにおいても同様で、産生する活性酸素の大部分は  $O_2^-$  であり、phox タンパク質複合体からなる NADPH オキシダーゼによって産生される。そのため両者の違いはこの酵素の発現量の違いである可能性が考えられる。ところが、phox タンパクを western blot 法で分析したところ「よいミクログリア」にも他方と同程度の発現が確認できた。

HIV が中枢神経系に感染すると神経細胞死や神経機能障害を誘発し痴呆が生じることが知ら

れている。このとき生じる生物反応はパーキンソン病などの神経変性疾患が発症する場合にも共通性がみられると考えられている。ミクログリアはこのときに中心的な役割を果たすと考えられているが、その詳細や実体は明らかでない。最近我々は、本来神経保護的に働くミクログリアに HIV 由来 nef 遺伝子を導入することによって神経障害性の活性酸素を産生ようになること (J Biol. Chem.277:42136-43, 2002) を見いだした。多くの神経変性疾患の場合、脳実質内で産生される活性酸素により神経障害が生じることから、nef 遺伝子導入によるミクログリアの形質転換が神経変性の引き金となっている可能性が強く考えられる。そこで、本研究では nef 遺伝子導入によるミクログリアの毒性転換の性質と nef 遺伝子産物の細胞内での作用点である細胞内因子を特定することを目的とし、nef 導入ミクログリアと非導入ミクログリアおよび変異型 nef 導入ミクログリアに於いてそのタンパク質発現を解析した。

今回得られた nef 導入細胞に特徴的に見られるタンパク質はミクログリアの毒性転換に重要な役割を果たしていると考えられるため、今後質量分析法、Western blot 法などで分析して同定する必要がある。また、N 末端に変異を持つ不活性型 Nef ではミクログリアの形質転換作用が見られないことから、Nef の作用もしくは細胞内因子への調節作用 (相互作用) にはそれ自身のミリスチル化が関与すると考えられる。また、ミクログリアの毒性転換において細胞膜、もしくは細胞内膜系への相互作用も考えられ、ミクログリアでの主要な活性酸素産生酵素である NADPH オキシダーゼと nef 遺伝子産物との直接結合および活性化には重要な意味があると考えられる。

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正できた。

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。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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- Ueyama, T., Lennartz, M. R., Noda, Y., Kobayashi, T., Shirai, Y., Rikitake, K., Yamasaki, T., Hayashi, S., Sakai, N., Seguchi, H., Sawada, M., Sumimoto, H. and Saito, N. Superoxide production at phagosomal cup/phagosome through beta1 protein kinase C during FcgammaR-mediated phagocytosis in microglia. *J. Immunol.* 173 (7) 4582-4589 (2004)
- Adachi, K., Yimin, Y., Satake, K., Matsuyama, Y., Ishiguro, N., Sawada, M., Hirata, Y., Kiuchi, K. Localization of cyclooxygenase-2 induced following traumatic spinal cord injury. *Neurosci. Res.* 51(1): 73-80 (2005)
- Himeda, T., Ohara, Y., Asakura, K., Kontani, Y., Murakami, M., Suzuki, H., Sawada, M. A lentiviral expression system demonstrates that L (\*) protein of Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) is essential for virus growth in a murine macrophage-like cell line. *Virus Res.* 108(1-2): 23-28 (2005).
- Hagihara, H., Hara, M., Tsunekawa, K., Nakagawa, Y., Sawada, M. and Nakano, K., Tonic-clonic seizures induce division of neuronal progenitor cells with concomitant changes in expression of neurotrophic factors in the brain of pilocarpine-treated mice, *Brain Res Mol Brain Res* (2005).
- Imamura, K., Hishikawa, N., Ono, K., Suzuki, H., Sawada, M., Nagatsu, T., Yoshida, M. and Hashizume, Y., Cytokine production of activated microglia and decrease in neurotrophic factors of neurons in the hippocampus of Lewy body disease brains, *Acta Neuropathol (Berl)*, 109 (2005) 141-50.
- Ito, S., Sawada, M., Haneda, M., Fujii, S., Oh-Hashi, K., Kiuchi, K., Takahashi, M. and Isobe, K., Amyloid-beta peptides induce cell proliferation and macrophage colony-stimulating factor expression via the PI3-kinase/Akt pathway in cultured Ra2 microglial cells, *FEBS Lett*, 579 (2005) 1995-2000.
- Kaneko, Y.S., Mori, K., Nakashima, A., Sawada, M., Nagatsu, I. and Ota, A., Peripheral injection of lipopolysaccharide enhances expression of inflammatory cytokines in murine locus coeruleus: possible role of increased norepinephrine turnover, *J Neurochem*, 94 (2005) 393-404.
- Nagatsu, T. and Sawada, M., Inflammatory process in Parkinson's disease: role for cytokines, *Curr Pharm Des*, 11 (2005) 999-1016.
- Nakamichi, K., Saiki, M., Sawada, M., Takayama-Ito, M., Yamamuro, Y., Morimoto, K. and Kurane, I., Rabies Virus-Induced Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase and NF- $\kappa$ B Signaling Pathways Regulates Expression of CXC and CC Chemokine Ligands in Microglia, *J Virol*, 79 (2005) 11801-11812.
- Nakamichi, K., Saiki, M., Sawada, M., Yamamuro, Y., Morimoto, K. and Kurane, I., Double-stranded RNA stimulates chemokine expression in microglia through vacuolar pH-dependent activation of intracellular signaling pathways, *J Neurochem* (2005).
- 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 Fumihiko, 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.

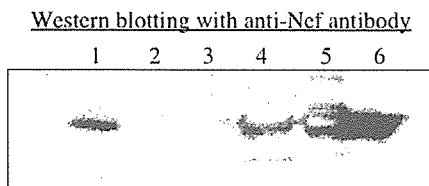
## 2. 学会発表

1. Sawada,M., Suzuki,H.,Ono, K., Kameoka, Y., Klause, K-H and Suzuki, K (2004) Detection of MPO mRNA and activity in activated microglia. 5<sup>th</sup> Int. Peroxidase Meeting, Kyoto.
2. 鈴木弘美、小野健治、澤田誠 (2004) 脳・神経系に特異的な細胞浸潤のイメージング(ミニシンポジウム)第30回東海遺伝子・再生医療研究会、愛知、Feb, 7.
3. 小野健治、吉原賢、鈴木弘美、澤田誠 (2004) 骨髄移植初期に脳内へ移行する細胞の性質に関する解析、第30回東海遺伝子・再生医療研究会、愛知、Feb, 7.
4. 萩原英雄、田中謙二、中野紀和男、澤田誠 (2004) けいれん発作後のグリア細胞の活性化と細胞新生、第30回東海遺伝子・再生医療研究会、愛知、Feb, 7.
5. 川上真紀子、鈴木和男、F.Vilbardt、K-H Krause、澤田誠 (2004) 脳内細胞ミクログリアのMPO(myeloperoxidase)産生、第30回東海遺伝子・再生医療研究会、愛知、Feb, 7.
6. 澤田浩秀、永津俊治、澤田誠 (2004) 神経変性モデルを用いたミクログリアの役割の解析、第30回東海遺伝子・再生医療研究会、愛知、Feb, 7.
7. 外山宏、中根正人、乾好貴、片田和廣、鈴木弘美、澤田誠、大橋正男、増本光、桑山喜文、旗野健太郎、桃崎壮太郎、加藤隆司、伊藤健吾 (2004) ラット脳における11C-PK11195と動物用PETによる活性型ミクログリア画像化の試み、日本核医学会第58回中部地方会、名古屋、Feb, 21
8. 吉原賢、小野健治、臼田信光、瀧井猛将、小野寄菊夫、澤田誠 (2004) 培養血液脳関門モデルによる脳移行性細胞の性質の検討、日本薬学会第125年会、大阪、Mar, 29-31.
9. 澤田誠、鈴木弘美 (2004) ミクログリアの脳保護作用と毒性転換、生体防御機能異常ワークショップ-2004、第7回肝臓生物学研究会合同大会、沖縄、June, 17-18.
10. 小野健治、鈴木弘美、澤田誠 (2004) 骨髄移植後初期に脳実質中へ移行する未分化骨髄細胞の性質に関する解析、第27回日本神経科学・第47回日本神経化学合同大会、大阪、Sep, 21-23.
11. 今井文博、鈴木弘美、二宮敬、澤田 誠 (2004) 脳親和細胞を用いた脳虚血性疾患に対する細胞治療の開発、第63回日本脳神経外科学会総会、名古屋、Oct, 6-8.
12. 外山宏、工藤元、旗野健太郎、鈴木弘美、小野健治、澤田誠、加藤隆司、伊藤健吾 (2004) ラット脳における11C-PK11195と動物用PETによる活性型ミクログリア画像化の試み、第44回日本核医学会総会、京都、Nov, 4-6.
13. 鈴木弘美、小野健治、澤田誠、外山宏、工藤元、旗野健太郎、加藤隆司、伊藤健吾 (2004) 活性型ミクログリアの In Vivo イメージング、第13回バイオイメージング学会、京都、Nov, 6-7.
14. 鈴木弘美、外山宏、工藤元、旗野健太郎、関亦克彦、小野健治、加藤隆司、伊藤健吾、澤田誠(2005)：活性型ミクログリアの In Vivo イメージング、第9回ニューロイメージングカンファランス、2月5日、名古屋
15. 工藤元、関亦克彦、旗野健太郎、外山宏、鈴木弘美、加藤隆司、片田和廣、澤田誠、伊藤健吾 (2005)：「末梢性ベンゾジアゼピン受容体製剤 11C-CB148 と 11C-PK11195 の比較-動物PETによる検討-」、核医学会中部地方会、7月3日、富山
16. 澤田誠、三井健一、鈴木弘美、小野健治、Karl-Heinz Krause、鈴木和男(2005)：HIV-Nefを導入したミクログリア細胞による神経細胞機能障害、第16回日本生体防御学会学術集会、8月4-6日
17. 鈴木弘美、外山 宏、工藤 元、旗野健太郎、関亦克彦、小野健治、中根正人、加藤隆司、伊藤健吾、澤田 誠：活性型ミクログリアの In Vivo イメージング。第14回日本バイオイメージング学会学術集会、2005.10.26-28.(東京)
18. 小野健治、澤田 誠：βアドレナリン受容体を介したミクログリアの神経細胞に対する機能に関する解析。第9回神経伝達物質研究会、2005.9.10.(東京)
19. 関亦克彦、旗野健太郎、外山 宏、鈴木弘美、加藤隆司、片田和廣、澤田 誠、伊藤健吾(2005)：末梢性ベンゾジアゼピン受容体製剤 11C-CB148 と 11C-PK11195 の比較-動物PETによる検討-、第45回日本核医学会総会、11月11-13日、東京都
20. SAWADA Makoto, IMAMURA Kazuhiro, NAGATSU Toshiharu: Microglia activation

- and gene expression of cytokines in Parkinson's disease. Proceedings of 7<sup>th</sup> Interanational Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases (ADPD2005). 2007.
21. 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
  22. 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)
  23. 澤田 誠 : 血液脳関門を壊さない脳標的化薬物送達の手法. 第 15 回東海ニューロサイエンス研究会, 2006.4. (名古屋)
  24. 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)
  25. 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)
  26. 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)
  27. 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. 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. 2006.6. (東京)
  28. 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マイ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
  29. 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
  30. 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
  31. 小野健治, 佐藤愛美, 澤田 誠 : Control of microglial neurotoxicity via  $\beta$  -adrenergic receptors. 第 49 回日本神経化学学会大会抄録号 : 208, 2006
  32. 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)
  33. SATO Chihiro, YABE Uichiro, SAWADA Makoto, KITAJIMA Ken : Clearance of Polysialic acid during LPS-induced activation on microglia cells. 20<sup>th</sup> 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
    - ・国際特許出願「脳移行活性を有するポリペプチド、およびその利用」平成 16 年 8 月 6 日提出、PCT 出願
    - ・国内特許出願 「脳移行性骨髄前駆細胞」、平成 16 年 10 月 12 日提出、特願 2004-298170
    - ・発明の名称 : 「金属コロイド粒子を含有す神経細胞内移行用キャリア」  
国際出願番号 : PCT/JP05/01761  
国際出願日 : 2005/02/07 (優先日 : 2004/08/06)  
【要約】ペプチドを金属コロイド粒子と結合させた分子を、実験動物へ静脈投与した結果、当該分子が脳へ移行し、さらに脳室から脳実質、特に、脳神経細胞(ニューロン)内へも移行することを見出した。金属コロイド粒子へ所望の化合物を結合させることにより、該化合物を脳神経細胞内へ移行させることが可能である。
    - ・発明の名称 : 「脳移行性細胞」  
出願番号 : 特願 2005-246256  
出願日 : 2005/8/26  
【要約】脳移行性配列を発現させた酵母や細胞を脳移行性に変換する技術について。
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

図1 NADPH オキシダーゼサブユニットに対する抗体で免疫沈降した分画の Nef タンパク質の存在

Pull down assay of Nef with Phox protein antibodies



1. Pull down by p91 phox antibody
2. Pull down by p67 phox antibody
3. Pull down by p47 phox antibody
4. Pull down by Rac antibody
5. Pull down by Nef antibody
6. Recombinant nef

図2 PMA 刺激をおこなった nef 発現細胞における Rac1 タンパク質の細胞内局在の変化

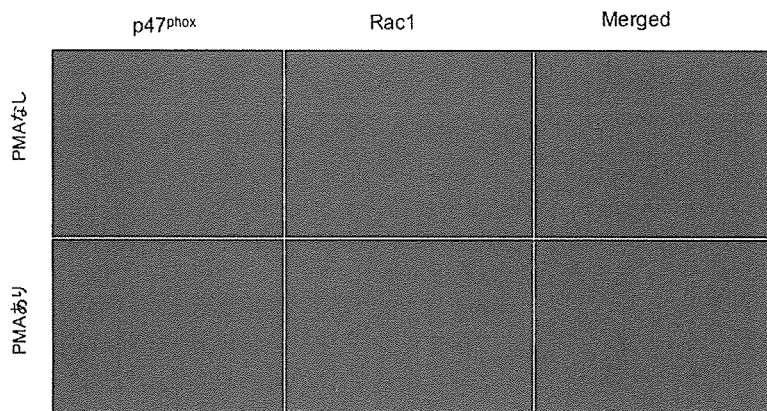


図3 活性型 Nef を高発現する stable clone HS1 を PMA で活性化したときのタンパク質の2次元電気泳動による比較 (タンパク質ディスプレイ)

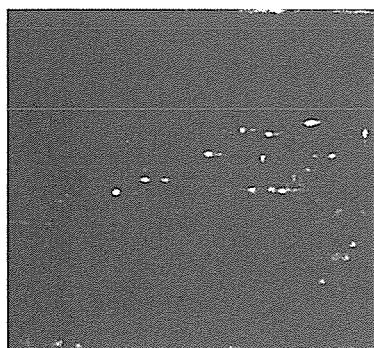




図4 活性型 Nef を高発現する stable clone HS1 および変異型 Nef を発現する G2A の疎水性クロマトグラフによるタンパク質ディスプレイ

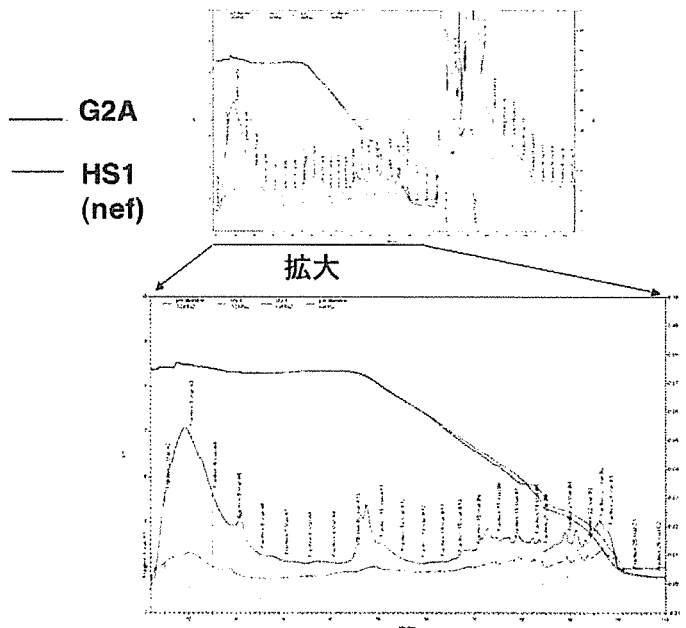


図5 活性型 Nef を高発現する stable clone HS1 に特異的に発現するスポットの分析

Nefと変異型Nef導入によって発現が大きく変化するタンパク質のうち36スポットをピックアップした

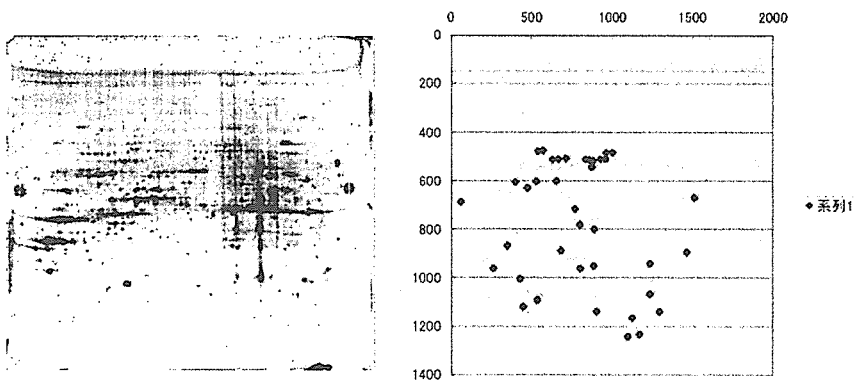
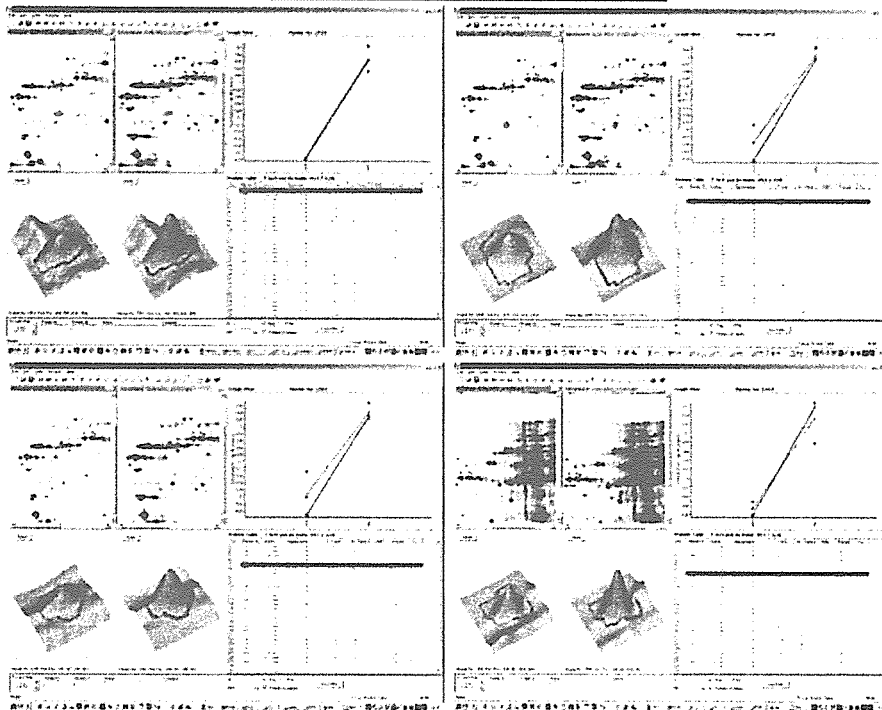
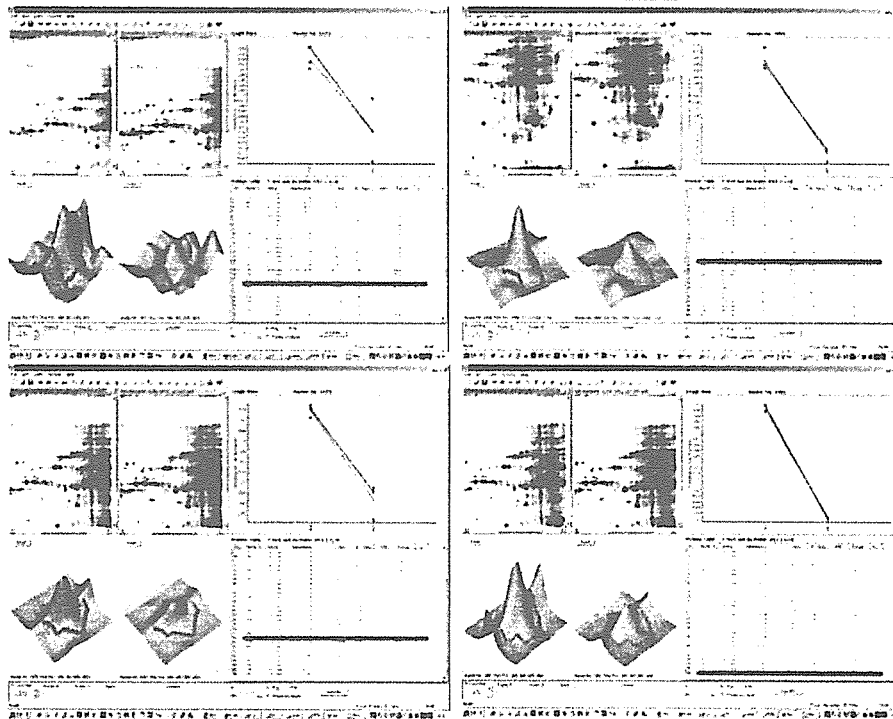


図6 nef発現で変化するマイクログリアタンパク質

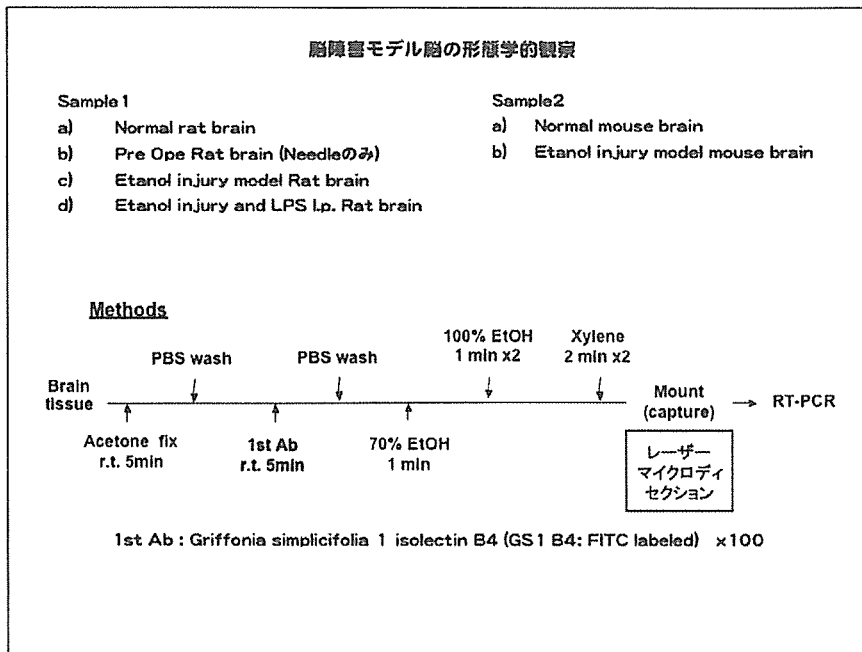
Nef発現で増大するタンパク質の例



Nef発現で減少するタンパク質の例

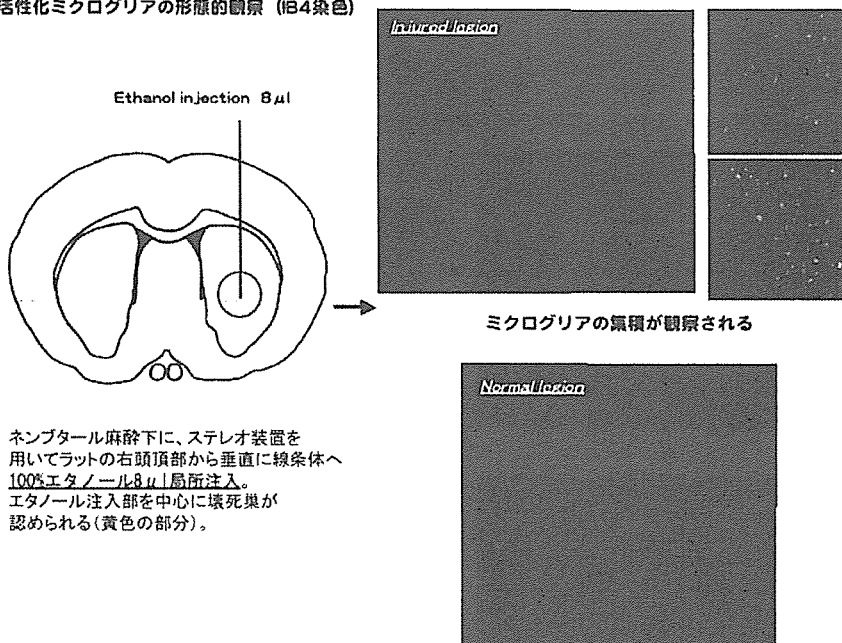


a

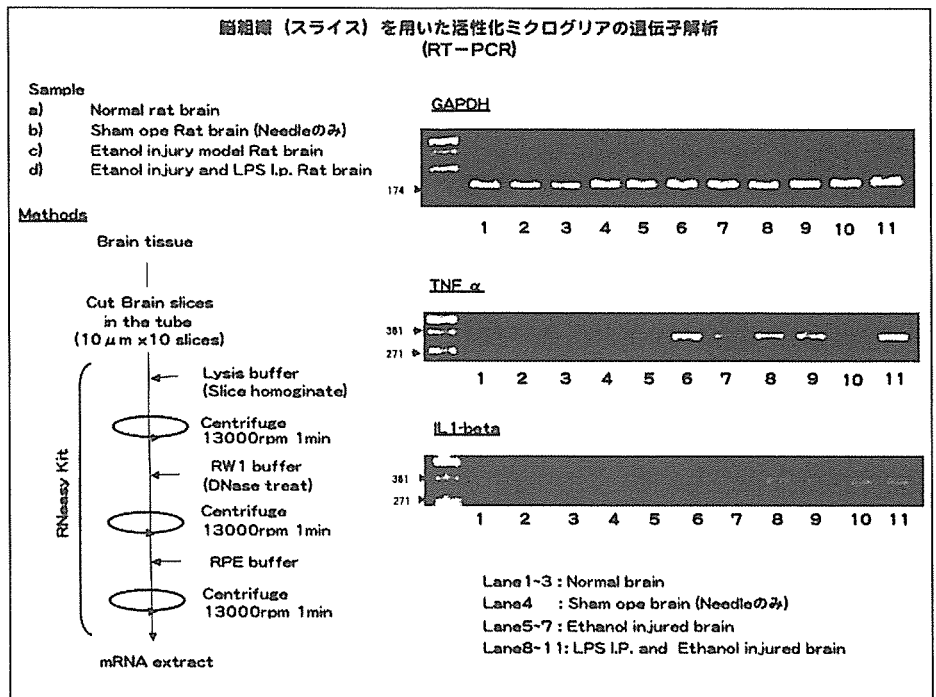


b

活性化ミクログリアの形態学的観察 (IB4染色)



a



b

Microdissection systemを用いたRT-PCR

