

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、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、毒性転換に関与するシグナル調節タンパク質について SST-REX 法により同定することを目的とした。

さらに、毒性転換したミクログリアが及ぼす細胞毒性について最近注目されているオートファジー細胞死が誘導されるか否かの検討も行った。

B. 研究方法

ミクログリア遺伝子発現のプロファイル解析：保護的作用を持つミクログリア細胞株と毒性転換した細胞株から total RNA を回収し PROGENEX 法および body mapping 法により発現遺伝子のプロファイリング解析を行った。

SST-REX 法による膜タンパク質発現クローンの作成：保護的作用を持つミクログリア細胞株から回収した mRNA を pMX-SST (レトロウイルスベクター pMX にトロンボポエチン受容体の部分長 (MPL) を導入したもの) に組み込み、IL-3 依存的に増

殖する性質を持つ BaF/3 細胞に導入して MPL と融合したタンパク質を発現する細胞 (膜タンパク質が組み込まれたクローン) を限界希釈法によりクローン化して目的クローンを FACS により同定した。

高次構造を保持した膜タンパク質の Cell Immunization 法による抗体作成と機能調節抗体のスクリーニング：FACS により同定した TREM2b 発現の SST クローンをマウスに免疫し、モノクローナル抗体候補を取得した。抗体のクローンについて活性化したミクログリア細胞に添加し、iNOS 遺伝子の誘導を指標にしてミクログリアに対する機能調節抗体のスクリーニングを行った。

cell viability assay、Ds Red 発現マウスグリオーマ細胞 (GL261) とマウスミクログリア株化細胞を 96 well plate に播種し、共培養の後、蛍光強度を測定した。

Analysis of apoptosis、Ds Red 発現マウスグリオーマ細胞 (GL261) とマウスミクログリア株化細胞を chamber slide に播種し、ヘキスト核染色、TUNEL 染色を行った。

Analysis of autophagy、オートファジーは飢餓時の細胞応答であり、自己細胞質構成成分の分解である。その際、細胞質成分がオートファゴソームと呼ばれる二重膜構造体で包み込まれ、それがライソソームと融合して分解が進むことが特徴である。まず、ライソソーム、オートライソソームなど AV0 (acidic vesicular

organelles)の誘導を、アクリジンオレンジ染色を行い、FACSで定量的に解析した。LC3 蛋白はオートファゴゾームの膜構成蛋白であり、オートファジーの誘導に伴い、細胞質からオートファゴゾームに動員される。その際、LC3- I (18K)から LC3- II (16K)にプロセスされる。この性質を用い、GFP-LC3 融合蛋白発現ベクターを悪性脳腫瘍細胞に遺伝子導入して GFP の動態を経時的に観察し、また、western blottingにより LC3- I (18K)および LC3- II (16K)の定量的な解析を行った。

(倫理面への配慮) 動物実験に関しては名古屋大学の実験動物倫理規定に従い実験を行った。

C. 研究結果

ミクログリアの毒性転換に関する研究：神経保護的作用を持つ状態と毒性転換した状態のミクログリアの遺伝子プロファイル解析から、毒性転換した場合に発現が低下する TREM2b を同定した。TREM ファミリー遺伝子は新規ペア型受容体ファミリーに属する膜受容体タンパク質ファミリーで、内在性リガンドは同定されていないが、NK 細胞や好中球において Fc 刺激やリポポリ多糖による活性化のオン・オフを調節している分子として知られている。ミクログリアにおいても活性化-毒性転換に深く関わる事が予想されるが、内在性リガンドが不明であるため詳細についてはよくわかっていない。そこで、本研究ではミクログリア由来 TREM2b を発

現する SST クローンを用いて免疫を行い、TREM2b のアゴニスティック抗体およびアンタゴニスティック抗体を分離することをスタートした。これまでにミクログリアの活性化を変化させる可能性がある 5 クローンを分種した。

毒性転換したミクログリアによるオートファジー細胞死誘導について：共培養において、未刺激ミクログリアでは抗腫瘍効果は見られなかったが、刺激；LPS(0.1 μ g/ml)と IFN- γ (100unit)を加えると腫瘍細胞に細胞死を誘導することがわかった。同様の効果は NO ドナーの添加によってもみられた。また、NO 阻害剤の添加で抑制されたが、caspase inhibitor で抑制されることはなかった。障害を受けた脳腫瘍細胞の核は形態的に異状を呈したものの、断片化などのアポトーシスの特徴的な所見は見られなかった。また TUNEL 染色でも陰性であった。一方、刺激ミクログリアと共培養された悪性脳腫瘍細胞内には、アクリジンオレンジ染色で染色される dim red の蛍光を呈する小器官の誘導が見られた。さらに、GFP-LC3 導入脳腫瘍細胞では、細胞質に瀰漫性に存在していた LC3-GFP が刺激ミクログリアとの共培養により斑状に凝集することがわかった。抗 GFP 抗体および抗 LC3 抗体を用いた western blotting による解析では、LC3- I (18K)から LC3- II (16K)へのシフトが見られた。

D. 考察

ミクログリア株細胞の活性酸素産生を指標にして毒性状態を誘導し、刺激前後の細胞から mRNA を取得して比較することによってミクログリアの毒性にかかわる遺伝子を検索した。その過程でミクログリア細胞膜表面に存在する TREM2b を同定した。そこで、ミクログリア細胞の cDNA を SST-REX ベクターに導入して TREM2b を高発現する SST クローンを作成した。このクローンを用いて発現構造を維持したままの TREM2b タンパク質に対する抗体を作成してミクログリア細胞に添加して iNOS 誘導性を指標にミクログリア活性の調節能力をスクリーニングし、活性調節抗体候補 5 クローンを分離した。現在、これらの抗体を用いてミクログリアの毒性転換をコントロールできるかどうかについて検討を行っている。今後ミクログリアの毒性転換にかかわる TREM2b の発現を調節することおよび現在取得を試みている活性調節抗体によって神経変性におけるミクログリアの状態をコントロールし、パーキンソン病におけるミクログリアの役割を明らかにするために利用できる。

LPS と IFN γ の刺激によって活性化されたミクログリアは標的細胞に対して NO 賛成に依存したオートファジー様の細胞死を誘導することがわかった。この細胞死はアポトーシスとは異なっており、形態的にも生化学的にも autophagic cell death の特徴を示した。しかし、ミクログリアがオートファジーを誘導するメカニ

ズムについては今後解析を続けていく必要がある。今回確立した *in vitro* での assay 系を用いることによって、ミクログリアの神経毒性をコントロールして神経疾患を治療する薬剤のスクリーニングが可能となる。

E. 結論

ミクログリアの毒性転換モデルの解析から毒性転換にかかわる細胞表面上のタンパク質に絞り SST-REX 法を行って TREM-2b 遺伝子を単離した。この遺伝子産物はリガンド未解明の受容体でこの分子がミクログリアの毒性転換にかかわっていることを証明するため SST クローンを使った刺激抗体・抑制抗体を分離することを行っている。また、ミクログリアが NO を賛成してグリオーマ細胞にオートファジー細胞死を誘導することを見出した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Toshiharu Nagatsu, Makoto Sawada: 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-Supplement* 71: 53-65, 2007.

Sadayuki Hashioka, Han Youn-Hee, Shunsuke Fuji, Takahiro Kato, Akira Monji, Hideo

- Utsumi, Makoto Sawada, Hiroshi Nakanishi, Shigenobu Kanba: Phospholipids modulate superoxide and nitric oxide production by lipopolysaccharide and phorbol 12-myristate-13-acetate-activated microglia. *Neurochemistry International* 50(3): 499-506, 2007.
- Makoto Sawada, Kenji Ono, Hiromi Suzuki: Targeting and imaging of brain-specific cell migration. *Nippon Rinsho* 65(2): 213-218, 2007.
- Fumihiro Imai, Hiromi Suzuki, Jumpei Oda, Takashi Ninomiya, Kenji Ono, Hiroshi Sano, Makoto Sawada: Neuroprotective effect of exogenous microglia in global ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 27(3): 488-500, 2007.
- Sadayuki Hashioka, Youn-Hee Han, Shunsuke Fujii, Takahiro Kato, Akira Monji, Hideo Utsumi, Makoto Sawada, Hiroshi Nakanishi, Shigenobu Kanba: Phosphatidylserine and phosphatidylcholine-containing liposomes inhibit amyloid beta and interferon-gamma-induced microglial activation. *Free Radical Biology & Medicine* 42(7): 945-954: 2007.
- Mika Nakanishi, Takeshi Mori, Kiyonobu Nishikawa, Makoto Sawada, Miyuki Kuno, Akira Asada: The effects of general anesthetics on P2X7 and P2Y receptors in a rat microglial cell line. *Anesthesia and Analgesia* 104(5):1136-1144, 2007.
- Sachiko Ito, Kenya Kimura, Masataka Haneda, Yoshiyuki Ishida, Makoto Sawada, Ken-ichi Isobe: Induction of matrix metalloproteinases(MMP3, MMP12and MMP13) expression in the microglia by Amyloidbeta stimulation via the PI3K/Akt pathway. *Experimental Gerontology* 42(6): 532-537, 2007.
- Hirohide Sawada, Ryohei Hashida, Yoko Hirata, Kenji Ono, Hiromi Suzuki, Sin-ichi Muramatsu, Imaharu Nakano, Toshiharu Nagatsu, Makoto Sawada: 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. *Journal of Neuroscience Research* 85(8): 1752-1761, 2007.
- Sadayuki Hashioka, Klegeris Adls, Akira Monji, Takahiro Kato, Makoto Sawada, McGeer Patrick L, Shigenobu Kanba: Antidepressants Inhibit interferon-gamma-induced microglial production of IL-6 and nitric oxide. *Experimental Neurology* 206(1): 33-42, 2007.
- Valentino Laquintana, Nunzio Denora, Angela Lopodota, Hiromi Suzuki, Makoto Sawada, Mariangela Serra, Giovanni Biggio, Andrea Latrofa, Giuseppe Trapani, Gaetano Liso:N-Benzyl-2-(6,8-dichloro-2-(4-chlorophenyl)imidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)-N-(6-(7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-ylamino)hexyl)acetamide as a New Fluorescent Probe for Peripheral Benzodiazepine Receptor and Microglial Cell Visualization. *Bioconjugate Chemistry* 18(5): 1397-1407, 2007

Hirokazu Morihata, Junko Kawawaki, Masako Okina, Hiromu Sakai, Takuya Notomi, Makoto Sawada, Miyuki Kuno: Early and late activation of the voltage-gated proton channel during lactic acidosis through pH-dependent and -independent mechanisms. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 455(5): 829-838, 2008

Toshiharu Nagatsu, Makoto Sawada: Biochemistry of postmortem brains in Parkinson's disease: historical overview and future prospects. *Journal of Neural Transmission Supplementum* (72):113-120, 2007

Roepstorff Kirstine, Rasmussen Izabela, Makoto Sawada, Cudre-Maroux Christophe, Salomon Patrick, Bokoch Gary, Van Deurs Bo, Vihard Frederik: Stimulus dependent tion of the phagocyte NADPH oxidase by a VAV1, rac 1, and PAK1 signaling axis. *The Journal of Biological Chemistry* 2008 (in press)

Makoto Sawada, Hirohide Sawada, Toshiharu Nagatsu: Effects of aging on neuroprotective and neurotoxic properties of microglia in neurodegenerative diseases. *Neuro-degenerative Diseases* 5(3-4): 254-256, 2008.

澤田 誠 : 老年期痴呆の治療ターゲットとしてのミクログリア. 老年期痴呆研究会誌 14: 59, 2007.

2. 学会発表

招待講演

神澤孝夫 : がんにおけるオートファジーの役割. 名古屋大学群馬大学生体調節研究所第4回合同シンポジウム, 2007, 11. (前橋)

SAWADA Makoto: Neuroprotective and toxic change of microglia in neurodegenerative disease. 3rd International Symposium on Dopaminergic and Nondopaminergic Mechanisms in Parkinson's Disease (INPD), 2007, 11. (大阪)

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. 群馬大学生体調節研究所シンポジウム, 2007, 11. (前橋)

小野健治、澤田誠 : 骨髄中に微量に含まれる脳移行性細胞に関する解析. 第3回生理学研究所・名古屋大学環境医学研究所合同シンポジウム, 2008, 2. (岡崎)

一般演題

神澤孝夫 : 悪性脳腫瘍細胞における新規プログラム細胞死の解析とその意義. 第25回日本脳腫瘍病理学会, 2007, 4. (熊本)

伊藤文隆、工藤 元、外山 宏、鈴木弘美、篠野健太郎、加藤隆司、片田和広、市瀬正則、澤田 誠、伊藤健吾 : 動物PETによるラット線条体障害モデルにおけるミクログリア毒性転換の検討. 日本分子イメージング学会第2回総会・学術集会, 2007, 6. (福井)

小野健治、山本奈穂、鈴木弘美、神澤孝

- 夫、澤田 誠：脳損傷モデルマウスにおける脳移行性骨髄細胞と分化のイメージング. 第50回日本神経化学(横浜)大会、第30回日本神経科学大会、第17回日本神経回路学会大会合同大会, 2007, 9. (横浜)
- AOKI Hiroshi, KANZAWA Takao: Telomere 3' Overhang-Specific DNA Oligonucleotides Induce Autophagy in Human Malignant Glioma Cells In Vitro and In Vivo. 第66回日本癌学会学術総会, 2007, 10. (横浜)
- 神澤孝夫：Autophagic cell death in malignant glioma cells by upregulation of mitochondrial cell death protein BNIP3. 第66回日本癌学会学術総会, 2007, 10. (横浜)
- 神澤孝夫：放射線のラット神経幹細胞に与える影響について. 第66回日本脳神経外科学会総会, 2007, 10. (東京)
- 鈴木弘美、外山 宏、篠野健太郎、工藤元、伊藤文隆、小野健治、加藤隆司、伊藤健吾、澤田 誠：動物PETによるラット線条体障害モデルにおけるミクログリアの毒性転換の検討. 第16回日本バイオイメージング学会学術集会, 2007, 10. (千葉)
- 神澤孝夫：Programmed cell death in cancer therapy. 第25回日本脳腫瘍学会, 2007, 12. (東京)
- 小野健治、山本奈穂、鈴木弘美、佐藤愛美、神澤孝夫、澤田 誠：脳損傷モデルマウスにおける脳移行性骨髄細胞の活性化と分化に関する解析. 第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会合同大会, 2007, 12. (横浜)
- Fatima A. Sehba, Rowena Flores, ONO Kenji, SUZUKI Hiromi, SAWADA Makoto, KANZAWA Takao: Expression of Cytokines and Neurotrophins after acute Subarachnoid Hemorrhage. 2008 International Stroke Conference, 2008, 2. (New Orleans)
- 神澤孝夫：急性期クモ膜下出血：全脳虚血モデルにおける新しいプログラム細胞死の解析. 第33回日本脳卒中学会総会, 2008, 3. (京都)
- H. 知的財産権の出願、登録
1. 特許取得：該当なし
 2. 実用新案登録：該当なし
 3. その他：該当なし

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
Yasuda T, Fukuda-Tani M, Nihira T, Wada K, Hattori N, Mizuno Y, Mochizuki H.	Correlation between levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor in the striatum of patients with Parkinson's disease.	Exp Neurol.	206(2)	308-17	2007
Fukae J, Mizuno Y, Hattori N.	Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease.	Mitochondrion.	7(1-2)	58-62	2007
Ihara M, Yamasaki N, Hagiwara A, Tanigaki A, Kitano A, Hikawa R, Tomimoto H, Noda M, Takanashi M, Mori H, Hattori N, Miyakawa T, Kinoshita M.	Sept4, a Component of Presynaptic Scaffold and Lewy Bodies, Is Required for the Suppression of alpha-Synuclein Neurotoxicity.	Neuron.	53(4)	519-33	2007
Kagohashi M, Nakazato T, Yoshimi K, Moizumi S, Hattori N, Kitazawa S.	Wireless voltammetry recording in unanesthetised behaving rats.	Neurosci Res.	60(1)	120-7	2007
Tamo W, Imaizumi T, Tanji K, Yoshida H, Takanashi S, Wakabayashi K, Takahashi R, Hattori N, Satoh K.	Parkin is expressed in vascular endothelial cells.	Neurosci Lett.	419(3)	199-201	2007
Fukae J, Mizuno Y, Hattori N.	Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease.	Mitochondrion.	7(1-2)	58-62	2007
Mogi M, Kondo T, Mizuno Y, Nagatsu T.	p53 protein, interferon-gamma, and NF-kappaB levels are elevated in the parkinsonian brain.	Neurosci Lett.	27;414(1)	94-7	2007
服部信孝, 久保紳一郎	ここまでわかったパーキンソン病(PD)の成因 遺伝性PDの病態からわかったこと	臨床神経学	47巻11号	774-778	2007
服部信孝	【薬物と神経筋障害 診断と治療の進歩】薬物副作用による神経・筋障害 抗パーキンソン薬の副作用	日本内科学会雑誌	96巻8号	1614-1620	2007
服部信孝	序論, 特集【パーキンソン病】	最新医学	62巻7号	1577-1578	2007

	ン病-最近の進歩-]				
服部信孝	【ふるえの臨床】パーキンソン病の振戦	Clinical Neuroscience	25巻3号	285-287	2007
服部信孝, 村田美穂, 佐藤健一, 鈴木正彦	内科医のためのパーキンソン病診療】パーキンソン病治療のこれから	内科	99巻5号	884-894	2007

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
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, K.	Structural basis for selection of glycosylated substrate by SCF ^{Fbs1} ubiquitin ligase.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA	104	5777-5781	2007
Murata, S., Sasaki, K., Kishimoto, T., Niwa, S., Hayashi, H., Takahama, Y., and Tanaka, K.	Regulation of CD8 ⁺ T cell Development by Thymus-specific Proteasomes.	Science	316	1349-1353	2007
Komatsu M., Wang QJ., Holstein GR., Friedrich VL., Iwata JI., Kominami E., Chait BT., Tanaka K., Yue Z.	Essential role for autophagy protein Atg7 in the maintenance of axonal homeostasis and the prevention of axonal degeneration.	Proc Natl Acad Sci USA	104	14489-14494	2007
Hamazaki J., Sasaki, K., Kawahara, H., Hisanaga, S., Tanaka, K., and Murata, M.	Rpn10-mediated degradation of ubiquitinated proteins is essential for mouse development.	Mol. Cell. Biol.	27	6629-6638	2007
Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y., Ueno, T., Hara, T., Mizushima, N., Iwata, J., Ezaki, J., Murata, S., Hamazaki, J., Nishito, Y., Iemura, S., Natsume, N., Yanagawa, T., Uwayama, J., Warabi, E., Yoshida, H., Ishii, T., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Yue, Z., Uchiyama, Y., Kominami, E., and Tanaka, K.	Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice.	Cell	131	1149-1163	2007

Koike, M., Shibata, M., Tadakoshi, M., Gotoh, K., Komatsu, M., Waguri, S., Kawahara, N., Kuida, K., Nagata, S., Kominami, E., Tanaka, K., and Uchiyama, Y.	Inhibition of Autophagy Prevents Hippocampal Pyramidal Neuron Death after Hypoxic-Ischemic Injury.	Am. J. Pathol.	172	454-469	2008
Yashiroda, H., Mizushima, T., Okamoto, K., Kameyama, T., Hayashi, H., Kishimoto, T., Kasahara, M., Kurimoto, E., Sakata, E., Suzuki, A., Yuko Hirano, Y., Murata, S., Kato, K., Yamane, T., and Tanaka, K.	Crystal Structure of a Chaperone Complex that Contributes to the Assembly of Yeast 20S Proteasomes.	Nature Struct. Mol. Biol.	15	228-236	2008
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	14	887-894	2007
Saeki, Y, and Tanaka, K. (2007)	Unlocking the proteasome door.	Mol Cell	27	865-867	2007

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Takahashi, R.	The molecular pathway to neurodegeneration in parkin-related parkinsonism.	Mayer, R.J., Ciechanover, A.J. Rechsteiner, M.	In Protein Degradation, eds.	Wiley-VCH, Weinheim	Germany	2007	195-210

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
Yamashita, H., Kawamata, J., Okawa, K., Kanki, R., Nakamizo, T., Hatayama, T., Yamanaka, K., Takahashi, R., 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	102(5)	1497-505.	2007
Murakami, T., Moriwaki, Y., Kawarabayashi, T., Nagai, M., Ohta, Y., Deguchi, K., Kurata, T., Takehisa, Y., Matsubara, E., Ikeda, M., Harigaya, Y., Shoji, M., Takahashi, R., Abe, K.	PINK1, a gene product of PARK6, accumulates in {alpha}-synucleinopathy brains.	J Neurol Neurosurg Psychiatry,	78(6)	653-54.	2007
Wang, H., Imai, Y., Kataoka, A., Takahashi, R.	Cell type-specific upregulation of parkin in response to ER stress.	Antioxid. Redox Signal.	9(5)	533-42.	2007
Wang, H.Q., Takahashi, R.	Expanding insights on the involvement of endoplasmic reticulum stress in Parkinson's disease.	Antioxid. Redox Signal.	9(5)	553-61.	2007
Kitaguchi, H., Ihara, M., Saiki, H., Takahashi, R., Tomimoto, H.	Capillary beds are decreased in Alzheimer's disease, but not in Binswanger's disease.	Neurosci Lett	417(2)	128-31.	2007
Igaki, T., Suzuki, Y., Tokushige, N., Aonuma, H., Takahashi, R., Miura, M.	Evolution of mitochondrial cell death pathway: Proapoptotic role of HtrA2/Omi in Drosophila.	Biochem Biophys Res Commun	356(4)	993-7.	2007

Iwasato, T., Katoh, H., Mishimaru, H., Ishikawa, Y., Inoue, H., Saito, Y. M., Ando, R., Iwama, M., Takahashi, R., Negishi, M., Itohara, S.	Rac-GAP α -Chimerin Regulates Motor-Circuit Formation as a Key Mediator of EphrinB3/EphA4 Forward Signaling.	Cell	130(4)	742-53	2007
Imai, Y., Inoue, H., Kataoka, A., Wang, H.Q., Masuda, M., Ikeda, T., Tsukita, K., Soda, M., Kodama, T., Fuwa, T., Honda, Y., Kaneko, S., Matsumoto, S., Wakamatsu, K., Ito, S., Miura, M., Aosaki, T., Itohara, S., Takahashi, R.	Pael receptor is involved dopamine metabolism in the nigrostriatal system.	Neurosci Res	59(4)	413-25.	2007
Yamanaka, K., Chun, S.J., Boillee, S., Fujimori-Tonou, N., Yamashita, H., Gutmann, D.H., Takahashi, R., Misawa, H., Cleveland, D.W.	Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis.	Nat Neurosci	11(3)	251-253	2008
Moriwaki, Y., Kim, Y.J., Ido, Y., Misawa, H., Kawashima, K., Endo, S., Takahashi, R.	L347P PINK1 mutant that fails to bind to Hsp90/cdc 37 chaperones is rapidly degraded in a proteasome- dependant manner.	Neurosci Res			in press

研究成果の刊行に関する一覧表（澤田 誠）

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
澤田 誠	老年期痴呆の治療 ターゲットとしての のミクログリア		老年期痴呆研 究会誌			2007	14:59

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
S. Hashioka, Han Y-H, S Fuji, T Kato, A Monji, H Utsumi, M Sawada, H Nakanishi, S Kanba	Phospholipids modulate superoxide and nitric oxide production by lipopolysaccharide and phorbol 12-myristate-13- acetate-activated microglia.	Neurochemistry International	50(3)	499-506	2007
F Imai, H Suzuki, J Oda, T Ninomiya, K Ono, H Sano, M Sawada	Neuroprotective effect of exogenous microglia in global ischemia	Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism	27(3)	488-500	2007
S Hashioka, Y-H Han, S Fujii, T Kato, A Monji, H Utsumi, M Sawada, H Nakanishi, S Kanba	Phosphatidylserine and phosphatidylcholine- containing liposomes inhibit amyloid beta and interferon-gamma-induced microglial activation.	Free Radical Biology & Medicine	42(7)	945-954	2007
S Ito, K Kimura, M Haneda, Y Ishida, M Sawada, Ken- ichi Isobe	Induction of matrix metalloproteinases (MMP3 , MMP12 and MMP13) expression in the microglia by Amyloid beta stimulation via the PI3K/Akt pathway	Neuroscience Research	42(6)	532-537	2007
H Sawada, R Hishida, Y Hirata, K Ono, H Suzuki, S Muramatsu, I Nakano, T Nagatsu, M Sawada	Activated microglia affect the nigro-striatal dopamine neurons differently in neonatal and aged mice treated with 1-methyl-4-phenyl- 1,2,3,6-tetrahydro pyridine	Journal of Neuroscience Research	85(8)	1752-1761	2007
S Hashioka, K Adls, A Monji, T Kato, M Sawada, McGeer P, S Kanba	Antidepressants inhibit interferon-gamma-induced microglial production of IL-6 and nitric oxide.	Experimental Neurology	206(1)	33-42	2007
Hi Morihata, J Kawawaki, M	Early and late activation of the voltage-gated proton channel during lactic	Pflügers Archiv-	455(5)	829-838	2008

Okina, T Notomi, M Sawada, M Kuno	acidosis through pH- dependent and - independent mechanisms.	European Journal of Physiology			
T Nagatsu, M Sawada	Biochemistry of postmortem brains in Parkinson's disease: historical overview and future prospects.	Journal of Neural Transmission Supplementum	(72)	113-120	2008
Roepstorff Kirstine, Rasmussen Izabela, Makoto Sawada, Cudre-Maroux Cristophe, Salomon Patrick, Bokoch Gary, Van Deurs Bo, Vihardt Frederik	Stimulus dependent tion of the phagocyte NADPH oxidase by a VAV1, rac 1, and PAK1 signaling axis.	The Journal of Biological Chemistry	In press		2008
M Sawada, H Sawada, T Nagatsu	Effects of aging on neuroprotectiveand neurotoxic properties of microglia in neurodegenerative diseases.	Neuro- degenerative Diseases	5(3-4)	254-256	2008

研究成果の刊行物・別刷り

Review

Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease

Jiro Fukae, Yoshikuni Mizuno, Nobutaka Hattori *

Department of Neurology, Juntendo University School of Medicine, 2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421, Japan

Received 19 April 2006; accepted 19 October 2006

Available online 13 December 2006

Abstract

Parkinson's disease (PD) is one of the most common neurodegenerative disorders characterized by resting tremor, rigidity, and bradykinesia. The primary cause of PD is still unknown, but oxidative stress and mitochondrial dysfunction have been implicated as important contributors to neuronal death in substantia nigra (SN) of PD. Considering neurons as post-mitotic cells, neurons could have error-avoiding mechanism against oxidative DNA damage. Indeed, several DNA repairing enzymes such as MTH1, OGG1, and MUTYH express in human brain. All the three enzymes up-regulated in the SN of PD patients, suggesting these three enzymes cooperate in mitochondrial DNA repairing in PD brain.

© 2007 Elsevier B.V. and Mitochondria Research Society. All rights reserved.

Keywords: Parkinson's disease; Oxidative stress; Mitochondrial dysfunction; MPTP; MTH1; OGG1; MUTYH

1. Introduction

Parkinson's disease (PD) is one of the most common progressive neurodegenerative disorders with a prevalence of 2% in the population over the age of 65 (de Rijk et al., 1997). Neuropathologically, PD is characterized by loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra (SN) and appearance of Lewy bodies in the remaining neurons. Although the primary pathogenesis of PD remains unknown, there has been growing environmental and genetic evidences that mitochondrial dysfunction and oxidative stress contribute to pathogenesis of PD. Since discovery of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) as environmental factor, a number of studies have revealed that mitochondrial dysfunction(s) play important roles in the selective dopaminergic neuronal loss (Langston et al., 1983; Heikkila et al., 1984). In addition, the identification of genetic mutations in several familial forms of PD has given new insights into the mechanism of neuronal loss in the SN. Interestingly, DJ-1 and PINK1, which have been identified from autosomal recessive form of PD, are consid-

ered to affect mitochondrial function and oxidative stress (Bonifati et al., 2003a,b; Valente et al., 2004).

2. Environmental evidences of mitochondrial dysfunction in PD

Mitochondria are intracellular organelles in which ATP is synthesized and such synthesis requires oxygen. In the mid 1980s, accidental injection of MPTP by heroin addicts led to find that MPTP causes parkinsonism in human (Davies et al., 1979; Langston et al., 1983). MPTP toxicity produces loss of dopaminergic neurons in a similar distribution to the pathology of PD. This discovery has given to great insight into research of mitochondrial dysfunction in the PD patients. MPTP is converted to 1-methyl-4-phenyl-pyridinium ion (MPP⁺) by glial monoamine oxidase B in brain and then MPP⁺ is selectively taken up into neurons via dopamine transporter. Within neurons, MPP⁺ enters mitochondria and inhibits complex I of mitochondrial respirator chain (Heikkila et al., 1984; Mizuno et al., 1987). Furthermore, other environmental neurotoxins such as rotenone and paraquat are also inhibitors of complex I and able to induce dopaminergic loss. The inhibition of complex I induce energy crisis and generation of free

* Corresponding author. Tel.: +81 3 5802 1073; fax: +81 3 5800 0547.
E-mail address: nhattori@med.juntendo.ac.jp (N. Hattori).

5. DNA repairing enzymes in PD

Oxidized DNA such as 8-oxoguanine is so mutagenesis that induce G:C to T:A transversion mutation. MtDNA is more vulnerable to oxidative stress than nuclear DNA, because mtDNA is directly exposed to ROS leaked from electron transport chain and the lack of a histone coat for mtDNA. Since mtDNA encodes several components of respiratory chain, accumulation of mtDNA mutation could induce mitochondrial dysfunction(s). Indeed, the levels of 8-hydroxyguanine and 8-hydroxy-2-deoxyguanosine, one of the oxidized forms of guanine, are increased in the SN of PD brains (Alam et al., 1997a; Shimura-Miura et al., 1999; Zhang et al., 1999). Therefore, mtDNA repair enzymes are very important to maintain mitochondrial function(s). There are three major enzymes associated with error-avoiding mechanisms against oxidative DNA damage: MTH1, OGG1, and MUTYH (Fig. 1B). We previously investigated the expression levels of these three enzymes in the PD patients.

First enzyme is MTH1, which maintains lower spontaneous mutation rate by sanitizing the intracellular nucleotide pools. MTH1 hydrolyzes oxidized purine nucleoside triphosphates such as 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine triphosphate (8-oxo-dGTP), thereby protects cell damage caused by their misincorporation into DNA (Fig. 1B) (Fujikawa et al., 1999). Previously, we performed immunohistochemical examination for MTH1 in the SN of PD patients and control subjects. The results demonstrated that MTH1 was markedly increased in the SN of patients with PD, especially within mitochondria (Fig. 2A and B) (Shimura-Miura et al., 1999). Recent report revealed that MTH1-null mice exhibited a greater accumulation of 8-oxoG in mitochondrial DNA accompanied by a more significant decrease TH and dopamine transporter (DAT)

immunoreactivities in striatal terminal fibers of dopamine neurons after chronic exposure to MPTP (Yamaguchi et al., 2006). These findings indicate that MTH1 protects the dopamine neurons from oxidative damage in the nucleic acids, especially in the mitochondrial DNAs of striatal nerve terminals of dopamine neurons.

Second enzyme is 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1), which removes 8-oxoguanine paired with cytosine in DNA to avoid accumulation of oxidative damage in DNA (Fig. 1B). In human tissue, there are two major isoforms of OGG1 (Nishioka et al., 1999). While OGG1-1a contributes to repair DNA in nucleus, OGG1-2a is associated with repairing mitochondrial DNAs. We examined immunohistochemical and biochemical study for OGG1-2a in the PD patients and found that higher expression levels of OGG1-2a in the SN of PD patients compared with aged-matched control subjects (Fig. 2C and D) (Fukae et al., 2005). The most plausible explanation is that OGG1-2a is up-regulated in the PD patients secondary to mtDNA oxidative damage to neurons to protect neurons from mutagenesis. Indeed, overexpression of OGG1 within the mitochondria enhances the repair of mtDNA errors and rescues the cells from oxidative stress in the cultured cell experiments (Dobson et al., 2000; Rachek et al., 2002). Furthermore, expression of OGG1-2a was greatly increased in early stage but not in advance stage of PD patients. These findings indicate that a different time course of compensatory mechanism of mtDNA oxidation.

Third enzyme is human MutY homolog (hMUTYH), which has been identified as adenine DNA glycosylase. MUTYH excises adenine misincorporated opposite 8-oxoG during replication (Fig. 1B) (Ohtsubo et al., 2000). The hMUTYH was up-regulated in the mitochondria of the SN of PD patients (Arai et al., 2006) (Fig. 2E and F). The levels of all three enzymes were increased in the SN

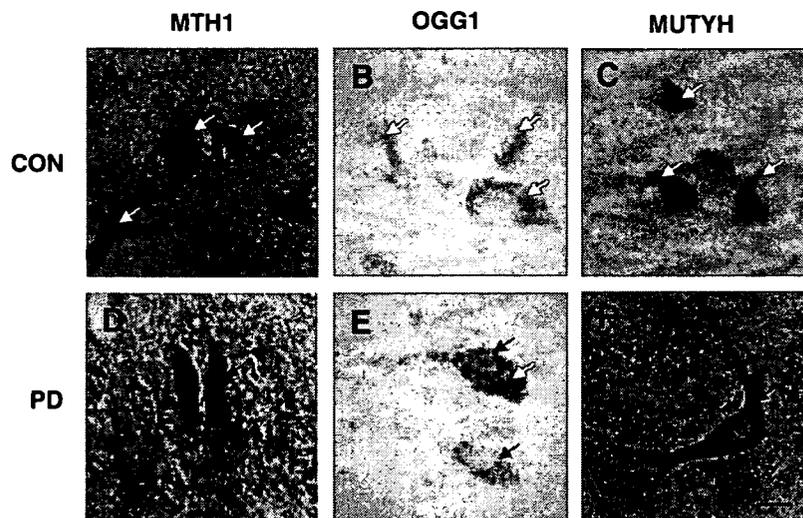


Fig. 2. Immunohistochemistry for MTH1 (A and D), OGG1 (B and E), and MUTYH (C and F) in the SN. A–C Control subjects; D–F PD; Note homogeneous staining for MTH1 and MUTYH (black arrows) and the granular staining for OGG1 (black arrows) in the cytoplasm of SN neurons in PD but control shows no staining. Neuromelanin (white arrows). Bar 10 µm.

of PD patients, suggesting that the DNA repair enzymes could play the protective roles against oxidative stress within the mitochondria of the SN in PD.

6. Conclusion

Although primary cause of sporadic PD is still unknown, multiple factors could be associated with nigral neurons degeneration in the PD. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress may contribute to protein aggregation and impairment in protein degradation. To avoid accumulation of mtDNA somatic mutations could maintain mitochondrial function(s). The levels of the enzymes, hMTH1 and hOGG1, and hMUTYH, were increased in the SN of PD patients, suggesting that these three enzymes cooperate in the mitochondrial DNA repairing and beneficial targets for gene therapies aiming at neuroprotection in PD.

Acknowledgements

We are grateful to all the patients. We thank Prof. Y. Nakabeppu for supporting our studies.

References

- Alam, Z.I., Jenner, A., Daniel, S.E., Lees, A.J., Cairns, N., Marsden, C.D., Jenner, P., Halliwell, B., 1997a. Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. *J. Neurochem.* 69, 1196–1203.
- Alam, Z.I., Daniel, S.E., Lees, A.J., Marsden, D.C., Jenner, P., Halliwell, B., 1997b. A generalised increase in protein carbonyls in the brain in Parkinson's but not incidental Lewy body disease. *J. Neurochem.* 69, 1326–1329.
- Arai, T., Fukae, J., Hatano, T., Kubo, S., Ohtsubo, T., Nakabeppu, Y., Mori, H., Mizuno, Y., Hattori, N., 2006. Up-regulation of hMUTYH, a DNA repair enzyme, in the mitochondria of substantia nigra in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* 112, 139–145.
- Bonifati, V., Rizzu, P., van Baren, M.J., Schaap, O., Breedveld, G.J., Krieger, E., Dekker, M.C., Squitieri, F., Ibanez, P., Joosse, M., van Dongen, J.W., Vanacore, N., van Swieten, J.C., Brice, A., Meco, G., van Duijn, C.M., Oostra, B.A., Heutink, P., 2003a. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 299, 256–259.
- Bonifati, V., Rizzu, P., Squitieri, F., Krieger, E., Vanacore, N., van Swieten, J.C., Brice, A., van Duijn, C.M., Oostra, B., Meco, G., Heutink, P., 2003b. DJ-1 (PARK7), a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism. *Neurol. Sci.* 24, 159–160.
- Cadenas, E., Davies, K.J., 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 222–230.
- Clark, I.E., Dodson, M.W., Jiang, C., Cao, J.H., Huh, J.R., Seol, J.H., Yoo, S.J., Hay, B.A., Guo, M., 2006. *Drosophila pink1* is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature* 441, 1162–1166.
- de Rijk, M.C., Tzourio, C., Breteler, M.M., Dartigues, J.F., Amaducci, L., Lopez-Pousa, S., Manubens-Bertran, J.M., Alperovitch, A., Rocca, W.A., 1997. Prevalence of parkinsonism and Parkinson's disease in Europe: the EUROPARKINSON Collaborative Study. European community concerted action on the epidemiology of Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 62, 10–15.
- Davies, G.C., Williams, A.C., Markey, S.P., Ebert, M.H., Caine, E.D., Reichert, C.M., Kopin, I.J., 1979. Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res.* 1, 249–254.
- Deng, H., Jankovic, J., Guo, Y., Xie, W., Le, W., 2005. Small interfering RNA targeting the PINK1 induces apoptosis in dopaminergic cells SH-SY5Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 337, 1133–1138.
- Dexter, D.T., Wells, F.R., Agid, F., Agid, Y., Lees, A.J., Jenner, P., Marsden, C.D., 1987. Increased nigral iron content in postmortem parkinsonian brain. *Lancet* 8569, 1219–1220.
- Dobson, A.W., Xu, Y., Kelley, M.R., LeDoux, S.P., Wilson, G.L., 2000. Enhanced mitochondrial DNA repair and cellular survival after oxidative stress by targeting the human 8-oxoguanine glycosylase repair enzyme to mitochondria. *J. Biol. Chem.* 275, 37518–37523.
- Fukae, J., Takanashi, M., Kubo, S., Nishioka, K., Nakabeppu, Y., Mori, H., Mizuno, Y., Hattori, N., 2005. Expression of 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathol.* 109, 256–262.
- Fujikawa, K., Kamiya, H., Yakushiji, H., Fujii, Y., Nakabeppu, Y., Kasai, H., 1999. The oxidized forms of dATP are substrates for the human MutT homologue, the hMTH1 protein. *J. Biol. Chem.* 274, 18201–18205.
- Heikkila, R.E., Hess, A., Duvoisin, R.C., 1984. Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine in mice. *Science* 224, 1451–1453.
- Gu, M., Cooper, J.M., Taanman, J.W., Schapira, A.H., 1998. Mitochondrial DNA transmission of the mitochondrial defect in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 44, 177–186.
- Kim, R.H., Smith, P.D., Aleyasin, H., Hayley, S., Mount, M.P., Pownall, S., Wakeham, A., You-Ten, A.J., Kalia, S.K., Horne, P., Westaway, D., Lozano, A.M., Anisman, H., Park, D.S., Mak, T.W., 2005. Hypersensitivity of DJ-1-deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 5215–5220.
- Langston, J.W., Ballard, P., Tetrud, J.W., Irwin, I., 1983. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219, 979–980.
- Mizuno, Y., Saitoh, T., Sone, N., 1987. Inhibition of mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase activity by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 143, 294–299.
- Nishioka, K., Ohtsubo, T., Oda, H., Fujiwara, T., Kang, D., Sugimachi, K., Nakabeppu, Y., 1999. Expression and differential intracellular localization of two major forms of human 8-oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced OGG1 mRNAs. *Mol. Biol. Cell.* 10, 1637–1652.
- Ohtsubo, T., Nishioka, K., Imaiso, Y., Iwai, S., Shimokawa, H., Oda, H., Fujiwara, T., Nakabeppu, Y., 2000. Identification of human MutY homolog (hMYH) as a repair enzyme for 2-hydroxyadenine in DNA and detection of multiple forms of hMYH located in nuclei and mitochondria. *Nucleic Acids Res.* 28, 1355–1364.
- Park, J., Lee, S.B., Lee, S., Kim, Y., Song, S., Kim, S., Bae, E., Kim, J., Shong, M., Kim, J.M., Chung, J., 2006. Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature* 441, 1157–1161.
- Rachek, L.I., Grishko, V.I., Musiyenko, S.I., Kelley, M.R., LeDoux, S.P., Wilson, G.L., 2002. Conditional targeting of the DNA repair enzyme hOGG1 into mitochondria. *J. Biol. Chem.* 277, 44932–44937.
- Saggiu, H., Cooksey, J., Dexter, D., Wells, F.R., Lees, A., Jenner, P., Marsden, C.D., 1989. A selective increase in particulate superoxide dismutase activity in parkinsonian substantia nigra. *J. Neurochem.* 53, 692–697.
- Schapira, A.H., Cooper, J.M., Dexter, D., Jenner, P., Clark, J.B., Marsden, C.D., 1989. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* 8649, 1269.
- Shimura-Miura, H., Hattori, N., Kang, D., Miyako, K., Nakabeppu, Y., Mizuno, Y., 1999. Increased 8-oxo-dGTPase in the mitochondria of substantia nigral neurons in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 46, 920–924.
- Shoffner, J.M., Brown, M.D., Torroni, A., Lott, M.T., Cabell, M.F., Mirra, S.S., Beal, M.F., Yang, C., Gearing, M., Salvo, R., Watts, R.L., Juncos, J.L., Hansen, L.A., Crain, B.J., Fayad, M., Reckord, C.L., Wallace, D.C., 1993. Mitochondrial DNA variants observed in