

ルマウスを使用して、構築したポリオウイルスベクターのALSに対する効果(治療効果、発症遅延効果、病態進行遅延効果)を検討していきたい。

E. 結論

細胞変性効果発現の主役と考えられてきたPV特異的な2Aプロテアーゼは、神経細胞にとって毒性は低い。特に1回の感染では、ほとんど細胞毒性を発揮しないことが明らかとなった。

PVのゲノムをジシストロニックとすると、第一シストロンに挿入する外来遺伝子は、分泌型の蛋白質を発現しても、ウイルスに対する毒性を示さないことが判明した。

PVはウイルスベクターとしての範囲が大きく拡大され、今後重要なベクターとして重要な位置を占める可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Establishment of a poliovirus oral infection system in human poliovirus receptor-expressing transgenic mice that are deficient in alpha/beta interferon receptor. *J. Virol.* 81:7902-7912, 2007.
- 2) Molecular aspect of poliovirus pathogenesis. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* 83:266-275, 2007.

2. 学会発表

- 1) ポリオウイルス感染による神経細胞変性効果(CPE)発現機構の研究. 第55回日本ウイルス学会 10月20-23日, 札幌
- 2) ポリオウイルスの運動神経軸索逆行性輸送機構 第55回日本ウイルス学会 10月21-23日, 札幌

H. 知的所有権の取得状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Angiogenin を標的とした筋萎縮性側索硬化症モデルマウス作製の試み

研究協力者：水澤 英洋 (東京医科歯科大学脳神経病態学 教授)

共同研究者：横田 隆徳¹⁾, 笹栗 弘貴¹⁾, 山本 由紀¹⁾,
安齋 政幸²⁾, 三谷 匡²⁾

¹⁾東京医科歯科大学脳神経病態学, ²⁾近畿大学先端技術総合研究所

研究要旨：Angiogenin (ANG) を標的としたモデル動物を作製することの意義として、①Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) に続く第2の筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に関連する血管新生因子であり、これらの血管因子がALSの病態に関与している可能性が強く示唆され、これまで殆ど分かっていない血管新生因子とALSとの関連を解明するモデルとなりうる、②孤発性ALS患者でもANG変異が報告されており、またANG変異を伴うALS患者は典型的なALSの経過を示すことが多いことから、孤発性ALSのモデル動物となる可能性がある、などが挙げられる。

A. 研究目的

Angiogenin (ANG) を標的としたモデル動物を作製することの意義として、①Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) に続く第2の筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に関連する血管新生因子であり、これらの血管因子がALSの病態に関与している可能性が強く示唆され、これまで殆ど分かっていない血管新生因子とALSとの関連を解明するモデルとなりうる、②孤発性ALS患者でもANG変異が報告されており、またANG変異を伴うALS患者は典型的なALSの経過を示すことが多いことから、孤発性ALSのモデル動物となる可能性がある、などが挙げられる。

ANGは、隣RNase A superfamilyに属し、血管新生に関与する遺伝子として知られている。最近ANGが家族性および孤発性ALSの新しい原因遺伝子の候補として報告された (Greenway et al, Nat Genet 06)。報告されたミスセンス変異の殆どがANGの機能に重要な部分に認められ、またこれらの変異ANGでは本来の血管新生能やRNA分解能が低下していることから、ANGのloss of functionがALSの病態に関与している可能性が考えられている (Crabtree et al, Biochemistry 07, Wu et al, Ann Neurol 07)。ANG

とALSの病態の関連を解析する方法としてノックアウトマウスの作製が考えられるが、これまでマウスでは少なくとも6つのANGが報告されており、全てのANGのノックアウトマウスを作製することは不可能である。そこで我々は配列特異的に標的遺伝子を抑制できるRNA干渉の特性を利用し、複数のANGの発現を一度に抑制するANG- small interfering (si) RNAトランスジェニック (Tg) マウスの作製を試み、ALSの新しいモデル動物となるか検証することとした。

B. 研究方法

1) ANG-siRNA の設計と抑制効果の評価

各マウスANGの中で比較的相同性の高い部位を標的としたsiRNAを設計し、それぞれのANG-short hairpin (sh) RNA発現ベクターを作製した。また、マウスのANG1~6とマーカー遺伝子である*Renilla luciferase*を融合したmRNAを発現するベクター (hRL-ANG発現ベクター) を作製した。マウス神経芽細胞腫由来細胞株であるNeuro-2a (N2a) 細胞にANG-shRNA発現ベクター及びhRL-ANG発現ベクターを共発現し、各siRNAによるANG抑制効果をルシフェラーゼアッセイにより確認した。複数のANGを高い効率で抑制する

siRNA を選択した。

2) ANG-shRNA 発現ES細胞クローンの作製と抑制効果の評価

選択した shRNA 発現DNA断片をエレクトロポレーションによりマウス129系ES細胞に導入した。約50のESクローンに対し、hRL-ANG発現ベクターを導入し、ルシフェラーゼアッセイにより各クローンでのANG抑制率を評価した。また、内因性ANG1 mRNAの抑制効果を定量的RT-PCRにより評価した。

3) ANG-shRNA Tgマウスの作製

得られたES細胞クローンの中から抑制効果の異なる5つのES細胞クローンを選択し、マウス胚盤胞期胚にマイクロインジェクションにより導入して、キメラマウスを作製した。

C. 研究結果

1) ANG-siRNA の設計と抑制効果の評価

設計した計12種類のANG-siRNAの抑制効果は、N2aに共発現させた標的がANG1の場合とANG3の場合で異なり、両方を80%程度まで効率よく抑制するsiRNAはANG-siRNA B-3であった。このANG-siRNA B-3の、ANG2、ANG4、ANG6に対する抑制効果を、同様にルシフェラーゼアッセイで評価したところ、ANG2、ANG4は80%程度抑制したが、標的配列が2塩基異なるANG6に対しては殆ど抑制効果を示さなかった。しかし、複数のANG6プライマーセットを用いたRT-PCRで、マウス大脳や脊髄でANG6の発現は確認されなかったため、このANG-siRNA B-3を用いてTgマウス作製を行うことで目的は達成できると考えられた。

2) ANG-shRNA 発現ES細胞クローンの作製と抑制効果の評価

ANG-siRNA B-3を導入したES細胞クローンでは、トランスジーン導入部位やコピー数によってANG抑制効果が異なる。その抑制効果をルシフェラーゼアッセイにより評価したところ、ESクローンによって1~90%まで様々な抑制効果を示した。内因性ANG1 mRNAの定量的RT-PCRの結果でも同様の結果が得られ、ルシフェラーゼアッセイと定量的RT-PCRの結果

の相関は比較的良好であった。

3) ANG-shRNA Tgマウスの作製

ANGの抑制が胎生致死になる可能性も考慮して、これらのES細胞クローンの中から抑制効果の異なる5つのES細胞クローンを選択し、マウス胚盤胞期胚にマイクロインジェクションにより導入して、キメラマウスの作製に成功した。現在、このキメラマウスと野生型C57BL/6Jマウスを交配させ、ANG-siRNA Tgマウスを作製中である。

D. 考察

配列特異的に標的遺伝子を抑制できるというRNA干渉の特性を利用して、培養細胞およびES細胞でマウスに存在する複数のANGを抑制することに成功した。以前、我々が作製したSOD1-siRNA Tgマウスにおいて、ES細胞でみられたSOD1抑制効果と、Tgマウスの各臓器におけるSOD1抑制効果はほぼ同等であり、中枢神経系でも十分な抑制効果が得られたことから(Saito *et al*, JBC 05)、この複数のANG抑制効果もTgマウスで再現されるものと期待される。

ANGはVEGFに続く、第2のALSに関連する血管新生因子である(Lambrechts *et al*, Trend Mol Med 06)。これらの血管新生因子が、神経細胞内でどのような機能を発揮するのかはまだ不明であるが、これまでVEGFには血管新生能以外に神経細胞保護効果があることが報告され、ALSモデル動物である変異SOD1 Tgマウスに投与することで、その発症を遅延させ、寿命を延長することが示されている(Storkebaum *et al*, Nat Neurosci 05)。血管内皮細胞においては、VEGFが血管新生能を発揮するにあたってANGが必要であるという報告もあり(Kishimoto *et al*, Oncogene 05)、VEGFとANGが共通の経路を有している可能性もある。今後、ANG-siRNA Tgマウスを用いて、ALSの病態とこれら血管新生因子との関連を明らかにしていきたい。

E. 結論

マウスに複数存在するANGを同時に効率よく抑制するsiRNAを設計し、ANG-siRNA Tgマウスのキメラマウスを作製することに成功し

た。現在、このキメラマウスと野生型C57BL/6Jマウスを掛け合わせ、Tgマウス(F1)を作製中である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yokota T, Sasaguri H, Saito Y, Yamada H, Unno N, Yamamoto T, Kubodera T, Anzai M, Mitani T, Mizusawa H. Increase of disease duration of amyotrophic lateral sclerosis in a mouse model by transgenic small interfering RNA. *Arch Neurol* 64; 145-146, 2007
- 2) 久保寺隆行, 横田隆徳, 水澤英洋. ALSの遺伝子治療, *Clinical neuroscience* 26, 2008 (印刷中)

2. 学会発表

- 1) 笹栗弘貴, 横田隆徳, 水澤英洋, Angiogenin (ANG) を標的とした筋萎縮性側索硬化症 (ALS) モデルマウス作製の試み. 第48回日本神経学会総会, 名古屋. 2007年5月
- 2) H. Sasaguri, T. Yokota, Y. Saito, M. Anzai, T. Mitani, H. Mizusawa. siRNA transgenic mice as a tool for studying neurological diseases. Neuroscience 2007, the 37th annual meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, USA. Nov, 2007

H. 知的所有権の取得状況(予定を含む)

1. 特許取得

横田隆徳, 水澤英洋, 他. あらゆる遺伝子を標的とすることを可能としたsiRNAトランスジェニックマウス(ノックダウンマウス)の新規作製方法(特許出願番号2007-118962)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

IV. 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

祖父江 元 (名古屋大学神経内科)

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻/号	ページ	出版年
Suzuki K, Katsuno M, Banno H, Takeuchi Y, Atsuta N, Ito M, Watanabe H, Yamashita F, Hori N, Nakamura T, Hirayama M, Tanaka F, Sobue G	CAG repeat size correlates to electrophysiological motor and sensory phenotypes in SBMA.	Brain	131	229-239	2008
Adachi H, Waza M, Tokui K, Katsuno M, Minamiyama M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G	CHIP Overexpression Reduces Mutant Androgen Receptor Protein and Ameliorates Phenotypes of the Spinal and Bulbar Muscular Atrophy Transgenic Mouse Model.	J Neurosci	27	5115-5126	2007
Jiang Y, Yamamoto M, Tanaka F, Ishigaki S, Katsuno M, Adachi H, Niwa J, Doyu M, Yoshida M, Hashizume Y, Sobue G	Gene expressions specifically detected in motor neurons (dynactin 1, early growth response 3, Acetyl-CoA transporter, death receptor 5, and cyclin C) differentially correlate to athologic markers in sporadic amyotrophic lateral sclerosis.	Neuropathol Exp Neurol	66	617-627	2007
Niwa J, Yamada S, Ishigaki S, Sone J, Takahashi M, Katsuno M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G	Disulfide bond mediates aggregation, toxicity, and ubiquitylation of familial amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1.	J Biol Chem	282	28087-28095	2007
Katsuno M, Bannno H, Suzuki K, Takeuchi Y, Minamiyama M, Waza M, Adachi H, Tanaka F, Sobue G	Therapeutic strategies for spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA).	Drugs of the Future	32	907-917	2007
Sahashi K, Masuda A, Matsuura T, Shinmi J, Zhang Z, Takeshima Y, Matsuo M, Sobue G, Ohno K	In vitro and in silico analysis reveals an efficient algorithm to predict the splicing consequences of mutations at the 5' splice sites.	Nucleic Acids Res	35	5995-6003	2007
Sobue G	Scientific highlights. 17th International Symposium on ALS/MND Yokohama, Japan, November 30, 2006 through December 2, 2006	Amyotroph Lateral Scler	(2)	121-123	2007
Adachi H, Waza M, Katsuno M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G	Pathogenesis and molecular targeted therapy of spinal and bulbar muscular atrophy.	Neuropathol Appl Neurobiol	33	135-151	2007
Yang Z, Chang YJ, Yu IC, Yeh S, Wu CC, Miyamoto H, Merry DE, Sobue G, Chen LM, Chang SS, Chang C	ASC-J9 ameliorates spinal and bulbar muscular atrophy phenotype via degradation of androgen receptor.	Nature Med	13	348-353	2007
Ishigaki S, Niwa J, Yamada S, Takahashi M, Ito T, Sone J, Doyu M, Urano F, Sobue G	Dorfin-CHIP chimeric proteins potently ubiquitylate and degrade familial ALS-related mutant SOD1 proteins and reduce their cellular toxicity.	Neurobiology of Disease	25	331-241	2007

糸山 泰人 (東北大学神経内科)

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻/号	ページ	出版年
Sasaki S, Nagai M, Aoki M, Komori T, Itoyama Y, Iwata M	Motor neuron disease in transgenic mice with an H46R mutant SOD1 gene.	J Neuropathol Exp Neurol	66	517-24	2007

Yamashita S, Koyama Y, Katayama T, Taniguchi M, Hitomi J, Kato M, Aoki M, <u>Itoyama Y</u> , Kato S, Tohyama M	An in vitro model for Lewy Body-like Hyaline Inclusion/Astrocytic Hyaline Inclusion: Induction by ER stress with an ALS-linked SOD1 Mutation.	PLoS One	2	e1030	2007
Ishigaki A, Aoki M, Nagai M, Warita H, Kato S, Kato M, Nakamura T, Funakoshi H, <u>Itoyama Y</u>	Intrathecal delivery of HGF from the ALS onset suppresses disease progression in a rat ALS model.	J Neuropathol Exp Neurol	66	1037-44	2007

岡野 栄之 (慶應義塾大学生理学)

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻/号	ページ	出版年
Yamada M, Tanemura K, Ozawa M, Ohyama R, Kitamura N, Kawano M, Tan-Takeuchi K, Mizuno H, Okada S, Iwanami A, Nakamura M, Ishitsuka C, Nagai A, Miyawaki A, Takashima A, Ogawa M, <u>Okano H</u> ,	Electrical stimulation modulates fate determination of differentiating embryonic stem cells.	Stem Cells	25	562-570	2007
Hayakawa-Yano Y, Nishida K, Fukami S, Gotoh Y, Hirano T, Nakagawa T, Shimazaki T, <u>Okano H</u>	EGF-signaling mediated by Gab1 is required for the spatiotemporally regulated proliferation of Olig2-expressing progenitors in the embryonic spinal cord.	Stem Cells	25	1410-1412	2007
<u>Okano H</u> , Sakaguchi M, Ohki K, Suzuki N, Sawamoto K	Regeneration of the central nervous system using endogenous repair mechanisms.	J Neurochem	102	1459-1465	2007
<u>Okano H</u> , Kaneko S, Okada S, Iwanami A, Nakamura M, Toyama Y	Regeneration-based therapies for spinal cord injuries.	Neurochem Int	85	2332-2342	2007
Kitamura K, Iwanami A, Nakamura M, Yamane J., Kota W, Suzuki Y, Miyakawa D, Shibata S, Funakoshi H, Miyatake S, Coffin R, Nakamura T, Toyama Y, <u>Okano H</u>	Hepatocyte growth factor promotes endogenous repair and functional recovery after spinal cord injury.	J Neurosci Res	85	2332-2342	2007
Adachi K, Mirzadesh Z, Sakaguchi M, Yamashita T, Nikolcheva T, Gotoh Y, Peltz G, Gong L, Kawase T, Alvarez-Buylla A, <u>Okano H</u> , Sawamoto K	b-catenin signaling promotes proliferation of progenitor cells in the adult mouse subventricular zone.	Stem Cells	25	2827-2836	2007
Fujiyoshi K, Yamada M, Nakamura M, Yamane J, Kato H, Kitamura K, Kawai K, Okada S, Momoshima S, Toayama Y, <u>Okano H</u>	In vivo tracing of neural tracts in the intact and injured spinal cord of marmosets by diffusion tensor tractography.	J Neurosci	27	11991-11998	2007
Appleyard SM, Marks D, Kobayashi K, <u>Okano H</u> , Low MJ, Andresen MC	Visceral afferents directly activate catecholamine neurons in the solitary tract nucleus.	J Neurosci	27	13292-13302	2007
Hirota Y, Oshima T, Iwasato T, Kulkarni AB, Mikoshiba K, <u>Okano H</u> , Sawamoto K.	Cyclin-dependent kinase 5 is required for neuroblast migration in the adult brain.	J Neurosci	27	12829-12838	2007
Ozawa Y, Nakao K, Shimazaki T, Shinmura S, Kurihara T, Ishida S, Yoshimura A, Tsubota K, <u>Okano H</u>	SOCS3 is required to temporally fine-tune photoreceptor cell differentiation.	Dev Biol	303	591-600	2007

Masuda H, Maruyama T, Hiratsu E, Yamane J, Iwanami A, Nagashima T, Ono M, Ito M, Miyoshi H, Okano HJ, <u>Okano H</u> , Matsuzaki Y, Yoshimura Y	Successful reconstruction of human endometrium from singly dispersed endometrial cells in the severe immunodeficient mouse: its potential application as endometriosis model.	Proc Natl Acad Sci USA	104	1925-1930	2007
Koide Y, Morikawa S, Mabuchi Y, Muguruma Y, Hiratsu E, Hasegawa K, Kobayashi M, Ando K, Kinjo K, <u>Okano H</u> , Matsuzaki Y.	Two distinct stem cell lineages in murine bone marrow.	Stem Cells	25	1213-1221	2007

郭 伸 (東京大学神経内科)

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻/号	ページ	出版年
Ishiura H, Morikawa M, Hamada M, Watanabe T, Kako S, Chiba S, Motokura T, Hangaishi A, Shibahara J, Akahane M, Goto J, <u>Kwak S</u> , Kurokawa M, Tsuji S	Lymphomatoid Granulomatosis Involving Central Nervous System Successfully Treated with Rituximab Alone.	Arch Neurol		in press	
日出山拓人、郭 伸	孤発性ALSと興奮性アミノ酸	Clinical Neuroscience		印刷中	
日出山拓人、郭 伸 (編集者 柳澤信夫 他)	筋萎縮性側索硬化症のAMPA受容体仮説	Annual Review 神経 2008	中外医学社	212-221	2008
Pan W, Ohashi K, Yamamoto Y, <u>Kwak S</u>	Power-law temporal autocorrelation of activity reflects severity of parkinsonism.	Mov Disord	22	1308-1313	2007
相澤仁志、郭 伸	ALSと興奮性アミノ酸	Brain and Nerve	59	1117-1127	2007
山下雄也、郭 伸 (編集者 高橋良輔)	グルタミン酸受容体と神経細胞死	神経変性疾患のサイエンス	南山堂	91-102	2007

高橋 良輔 (京都大学神経内科)

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻/号	ページ	出版年
Yamanaka K, Chun S J, Boillee S, Fujimori-Tonou N, Yamashita H, Gutmann D H, <u>Takahashi R</u> , Misawa H, Cleveland D W	Astrocytes as determinantsof disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis.	Nature Neurosci		in press	2008
Moriwaki Y, Kim Y J, Ido Y, Misawa H, Kawashima K, Endo S, <u>Takahashi, R</u>	L347P PINK1 mutant thatfails to bind to Hsp90/cdc37 chaperones is rapidlydegraded in a proteasome-dependant manner.	Neurosci Res		in press	2008
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	102 (5)	1497-1505	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, <u>Takahashi R</u> , Abe K	PINK1, a gene product ofPARK6, accumulates in {alpha}-synucleinopathy brains.	J Neurol Neurosurg Psychiatry	78(6)	653-654	2007
Wang H, Imai Y, Kataoka A, <u>Takahashi R</u>	Cell type-specific upregulation of parkin in response to ER stress.	Antioxid. Redox Signal	9(5)	533-542	2007

Wang H.Q, <u>Takahashi R</u>	Expanding insights on the involvement of endoplasmic reticulum stress in Parkinson's disease.	Antioxid. Redox Signal	9(5)	553-561	2007
Igaki T, Suzuki Y, Tokushige N, Aonuma H, <u>Takahashi R</u> , Miura M	Evolution of mitochondrial cell death pathway: Proapoptotic role of HtrA2/Omi in Drosophila.	Biochem Biophys Res Commun	356 (4)	993-997	2007
Iwasato T, Katoh H, Mishimaru H, Ishikawa Y, Inoue H, Saito Y. M, Ando R, Iwama M, <u>Takahashi R</u> , 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, <u>Takahashi R</u>	Pael receptor is involved dopamine metabolism in the nigrostriatal system.	Neurosci Res	59(4)	413-25	2007
Kuzuya A, Uemura K, Kitagawa N, Aoyagi N, Kihara T, Ninomiya H, Ishiura S, <u>Takahashi R</u> , Shimohama S	Presenilin 1 is involved in the maturation of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 (BACE1).	J Neurosci Res	85(1)	153-165	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 conditions of dopamine intoxication.	Hum Mol Genet	16(1)	50-60	2007
Wang H, Imai Y, Kataoka A, <u>Takahashi R</u>	Cell type-specific upregulation of parkin in response to ER stress.	ARS Forum	9(5)	533-542	2007

田中 啓二（東京都臨床医学総合研究所）

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻/号	ページ	出版年
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, <u>Tanaka K</u>	Crystal Structure of a Chaperone Complex that Contributes to the Assembly of Yeast 20S Proteasomes.	Nature Struct Mol Biol		in press	
Murata S, Takahama Y, <u>Tanaka K</u>	Thymoproteasome: probable role in generating positively selecting peptides.	Curr Opin Immunol		in press	
Takahama Y, <u>Tanaka K</u> , Murata S	Modest cortex and promiscuous medulla for thymic repertoire formation.	Trends in Immunology		in press	
Sakata E, Yamaguchi Y, Miyauchi Y, Iwai K, Chiba T, Saeki Y, Matsuda N, <u>Tanaka K</u> , 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
Mizushima T, Yoshida Y, Kumanomidou T, Hasegawa Y, Suzuki A, Yamane T, <u>Tanaka K</u>	Structural basis for selection of glycosylated substrate by SCFFb1 ubiquitin ligase.	Proc Natl Acad Sci USA	104	5777-5781	2007

Murata S, Sasaki K, Kishimoto T, Niwa S, Hayashi H, Takahama Y, <u>Tanaka K</u>	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, <u>Tanaka K</u> , 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
Yao I, Takagi H, Ageta H, Kahyo T, Sato S, Hatanaka K, Fukuda Y, Chiba T, Morone N, Yuasa S, Inokuchi K, Ohtsuka T, MacGregor GR, <u>Tanaka K</u> , Setou M	SCRAPPER-dependent Ubiquitination Zone Protein RIM1 Regulates Release	Cell	130	943-957	2007
Hamazaki J, Sasaki K, Kawahara H, Hisanaga S, <u>Tanaka K</u> , 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, <u>Tanaka K</u>	Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice.	Cell	131	1149-1163	2007
Sanjuan M A, Dillon C P, Tait S W G, Moshiah S, Dorsey F, Connell S, Komatsu M, <u>Tanaka K</u> , Cleveland J L, Withoff S, Green D R	Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis.	Nature	450	1253-1257	2007
Komatsu M, Ueno T, Waguri S, Uchiyama Y, Kominami E, <u>Tanaka K</u>	Constitutive autophagy: Vital role in clearance of unfavorable proteins in neurons.	Cell Death Differ	14	887-894	2007
Saeki Y, <u>Tanaka K</u>	Unlocking the proteasome door.	Mol Cell	27	865-867	2007

中野 今治 (自治医科大学神経内科)

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻/号	ページ	出版年
Ishikawa T, Morita M, <u>Nakano I</u>	Constant blood flow reduction in premotor frontal lobe regions in ALS with dementia —a SPECT study with 3D-SSP.	Acta Neurol Scand	116	340-344	2007
Shimazaki H, Ando Y, <u>Nakano I</u> , Dalmau J	Reversible limbic encephalitis with antibodies against the membranes of neurons of the hippocampus.	J Neurol Neurosurg Psychiatry	78	324-325	2007
Shimazaki H, Sakoe K, Nijima K, <u>Nakano I</u> , Takiyama Y	An unusual case of a spasticity-lacking phenotype with a novel SACS mutation.	J Neurol Sci	255	87-89	2007
河又千鶴、森田光哉、柴田亮行、 <u>中野今治</u>	新しいSOD1遺伝子変異をみとめた家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) の症例：剖検結果をふまえて。	臨床神経学	45	211-216	2007
石川剛久、森田光哉、 <u>中野今治</u>	認知症を伴うALSの脳血流画像。	BARAIN and NERVE	59	1093-1098	2007
吉村まどか、中瀬浩史、 <u>中野今治</u> 、河村 満	痙性歩行発症14年後に認知症症状を合併した全経過27年の89歳女性例	BRAIN and NERVE	59	79-92	2007

船越 洋 (大阪大学分子組織再生)

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻/号	ページ	出版年
Suzuki Y, <u>Funakoshii H</u> , Machide M, Matsumoto K, Nakamura T.	Regulation of cell migration and cytokine production by HGF-like protein (HLP)/macrophage stimulating protein (MSP) in primary microglia.	Biomed Res	29	in press	
Akita H, Takagi N, Ishihara N, Takagi K, Murotomi K, <u>Funakoshi H</u> , Matsumoto K, Nakamura T, Takeo S	Hepatocyte growth factor improves synaptic localization of the NMDA receptor and intracellular signaling after excitotoxic injury in cultured hippocampal neuron.	Exp Neurol	210 (1)	83-94	2008
Ohya W, <u>Funakoshi H</u> , Kurosawa T, Nakamura T	Hepatocyte growth factor (HGF) promotes oligodendrocyte progenitor cell proliferation and inhibits its differentiation during postnatal development in the rat.	Brain Res	1147	51-65	2007
Kitamura K, Iwanami A, Nakamura M, Yamane J, Watanabe K, Suzuki Y, Miyazawa D, Shibata S, <u>Funakoshi H</u> , Miyatake S, Coffin R S, Nakamura T, Toyama Y, Okano H	Hepatocyte growth factor promotes endogenous repair and functional recovery after spinal cord injury.	J Neurosci Res	85	2332-2342	2007
Nakano M, Takagi N, Takagi K, <u>Funakoshi H</u> , Matsumoto K, Nakamura T, Takeo S	Hepatocyte growth factor promotes the number of PSD-95 clusters in young hippocampal neurons.	Exp Neurol	207	195-202	2007
Kadoyama K, <u>Finakoshi H</u> , Ohya W, Nakamura T	Hepatocyte growth factor (HGF) attenuates gliosis and motoneuronal degeneration in the brainstem motor nuclei of a transgenic mouse model of ALS.	Neurosci Res	59	446-456	2007
Ishigaki A, Aoki M, Nagai H, Warita S, Kato S, Kato M, Nakamura T, <u>Finakoshi H</u> , Itoyama Y	Intrathecal delivery of hepatocyte growth factor from amyotrophic lateral sclerosis onset suppresses disease progression in rat amyotrophic lateral sclerosis model.	J Neuropathol Exp Neurol	66	1037-1044	2007

阿部 康二 (岡山大学神経内科)

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻/号	ページ	出版年
Morimoto N, Nagai M, Ohta Y, Miyazaki K, Kurata T, Morimoto M, Murakami T, Takehisa Y, Ikeda Y, Kamiya T, <u>Abe K</u>	Increased autophagy in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene.	Brain Res	1167	112-182	2007
Murakami T, Nagai M, Miyazaki K, Morimoto N, Ohta Y, Kurata T, Takehisa Y, Kamiya T, <u>Abe K</u>	Early decrease of mitochondrial DNA repair enzymes in spinal motor neurons of presymptomatic transgenic mice carrying a mutant SOD1 gene.	Brain Res	1150	182-189	2007

加藤 信介 (鳥取大学脳神経病理)

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻/号	ページ	出版年
<u>Kato S</u>	Amyotrophic lateral sclerosis models and human neuropathology: similarities and differences.	Acta Neuropathol	115 (1)	97-114	2008

Suzuki M, Sugimoto Y, Ohsaki Y, Ueno M, <u>Kato S</u> , Kitamura Y, Hosokawa H, Davies JP, Ioannou YA, Vanier MT, Ohno K, Ninomiya H	Endosomal accumulation of Toll-like receptor 4 causes constitutive secretion of cytokines and activation of signal transducers and activators in Niemann-Pick disease type C (NPC) fibroblasts: a potential basis for glial cell activation in the NPC	J Neuroscience	27(8)	1879-1891	2007
Kitamura Y, Okazaki T, Nagatsuka Y, Hirabayashi Y, <u>Kato S</u> , Hayashi K	Immunohistochemical distribution of phosphatidylglucoside using anti-phosphatidylglucoside monoclonal antibody (DIM21).	Biochem Biophys Res Commun	362 (2)	252-255	2007
Ishigaki A, Aoki M, Nagai M, Warita H, <u>Kato S</u> , Kato M, Nakamura T, Funakoshi H, Itoyama Y	Intrathecal delivery of hepatocyte growth factor from amyotrophic lateral sclerosis onset suppresses disease progression in rat amyotrophic lateral sclerosis model.	J Exp Neurol Neuropathol	66 (11)	1037-1044	2007
Yamagishi S, Koyama Y, Katayama T, Taniguchi M, Hitomi J, Kato M, Aoki M, Itoyama Y, <u>Kato S</u> , Tohyama M	An in vitro model for Lewy Body-like Hyaline Inclusion/Astrocytic Hyaline Inclusion: Induction by ER stress with an ALS-linked SOD1 Mutation.	PLoS One	2(10)	e1030	2007
Fujiwara N, Nakano M, <u>Kato S</u> , Yoshihara D, Ookawara T, Eguchi H, Taniguchi N, Suzuki K	Oxidative modification to cysteine sulfonic acid of cys111 in human copper-zinc superoxide dismutase.	J Biol Chem	282 (49)	35933-35944	2007

加藤 丈夫 (山形大学生命情報内科)

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻/号	ページ	出版年
Wada M, Nagasawa H, Kurita K, Koyama S, Arawaka S, Kawanami T, Tajima K, Daimon M, <u>Kato T</u>	Microalbuminuria is a risk factor for cerebral small vessel disease in community-based elderly subjects.	J Neurol Sci	255	27-34	2007

菊地 誠志 (国立病院機構札幌南病院神経内科)

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻/号	ページ	出版年
Tashiro J, <u>Kikuchi S</u> , Shinpo K, Kishimoto R, Tsuji S, Sasaki H	Role of p53 in Neurotoxicity Induced by the Endoplasmic Reticulum Stress Agent Tunicamycin in Organotypic Slice Cultures of rat Spinal Cord.	J Neurosci Res	85(2)	395-401	2007

佐古田 三郎 (大阪大学神経内科)

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻/号	ページ	出版年
Watanabe S, Nagano S, Duce J, Kiaei M, Li QX, Tucker SM, Tiwari A, Brown RHJ, Beal MF, Hayward LJ, Culotta VC, Yoshihara S, <u>Sakoda S</u> , Bush AI	Increased affinity for copper mediated by cysteine 111 in forms of mutant superoxide dismutase 1 linked to amyotrophic lateral sclerosis.	Free Radic Biol Med	42	1534-1542	2007

谷口 直之 (大阪大学微生物病研究所)

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻/号	ページ	出版年
Park YS, Kim J, Misonou Y, Takamiya R, Takahashi M, Freeman MR, <u>Taniguchi N</u>	Acrolein Induces Cyclooxygenase-2 and Prostaglandin Production in Human Umbilical Vein Endothelial Cells: Roles of p38 MAP Kinase.	Arterioscler Thromb Vasc Biol	27(6)	1319-1325	2007
Fujiwara N, Nakano M, Kato S, Yoshihara D, Ookawara T, Eguchi H, <u>Taniguchi N</u> , Suzuki K	Oxidative modification to cysteine sulfonic Acid of cys111 in human copper-zinc superoxide dismutase.	J Biol Chem.	282	35933-35944	2007

野本 明男 (東京大学微生物学)

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻/号	ページ	出版年
Ohka S, Igarashi H, Nagata N, Sakai M, Koike S, Nochi T, Kiyono H, <u>Nomoto A</u>	Establishment of a poliovirus oral infection system in human poliovirus receptor-expressing transgenic mice that are deficient in alpha/beta interferon receptor.	J Virol	81(15)	7902-7912	2007
<u>Nomoto A</u>	Molecular aspect of poliovirus pathogenesis.	Proc Jpn Acad Ser B	83	266-275	2007

水澤 英洋 (東京医科歯科大学神経内科)

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻/号	ページ	出版年
Yokota T, Sasaguri H, Yamada H, Unno T, Yamamoto T, Kubodera T, Anzai M, Mitani T, <u>Mizusawa H</u>	Increase of disease duration of amyotrophic lateral sclerosis in a mouse model by transgenic small interfering RNA.	Arch Neurol	64	145-146	2007

V. ワークショップ・班会議プログラム

平成19年度「筋萎縮性側索硬化症の画期的診断・治療法に関する研究」班

ワークショップ プログラム
ALS研究の最前線

■日程■

平成19年 **9月7日(金)**

12:50～16:15

■会場■

学術総合センター2F 中会議室3.4

東京都千代田区一ツ橋2-1-2 TEL 03-4212-6321

主任研究者 祖父江 元

【事務局】

〒466-8550 名古屋市昭和区鶴舞町65

名古屋大学大学院医学系研究科神経内科

TEL 052-744-2386 FAX 052-744-2393

E-mail:brain@med.nagoya-u.ac.jp

12:50~13:00 挨拶

13:00~14:45

I. ALS研究の最近のトピックス

座長：阿部 康二（岡山大学神経内科）、佐古田三郎（大阪大学神経内科）

13:00~13:35

(1) ゲノム解析に基づく孤発性ALSの病因解明

飯田 有俊（理化学研究所遺伝子多型研究センター・薬理遺伝学研究チーム）

孤発性ALSの病因の解明、治療法の開発を目的として、大規模ゲノム関連解析によるALS感受性遺伝子の単離・同定を試みている。具体的には、遺伝子産物の質や量に直接影響を与え、疾患易罹患性や薬物による副作用に関係すると言われていた一塩基多型（SNP）を用いて解析を行った。現在までに、ヒトゲノムを広くカバーする約5万ヶ所のSNPについてALS症例と日本人一般集団由来のDNAを用いて関連解析を行い、 $P < 0.00001$ レベルの相関を認める複数のSNPを同定した。本ワークショップでは、大規模ゲノム関連解析による候補遺伝子領域同定の過程、並びに現状等について報告する。

13:35~14:10

(2) ゲノム解析に基づく孤発性ALSの病因解明

長谷川成人（東京都精神医学総合研究所・分子神経生物学研究チーム）

ALSにおけるTDP-43の蓄積の意義

前頭側頭葉変性症（FTLD）に出現するタウ陰性ユビキチン陽性封入体の構成成分としてTAR DNA-binding protein of 43 kDa（TDP-43）が同定された。これをきっかけに、それまで不明であった筋萎縮性側索硬化症（ALS）の変性運動ニューロンに出現するユビキチン陽性封入体の構成蛋白質も、同じTDP-43であることが明らかとなった。FTLD、ALSのユビキチン陽性封入体におけるTDP-43の同定の経緯を説明し、ALSとFTLDの関係やALSにおけるTDP-43の蓄積の意義について考察したい。

14:10~14:45

(3) ALSの免疫療法

漆谷 真（滋賀医科大学分子神経科学研究センター・神経遺伝子解析分野）

近年のトランスジェニックアプローチによって、変異SOD1による運動ニューロン死はnon-cell-autonomousに生じることが明らかとなった。我々はSOD1がER-Golgi系にも存在し、神経分泌タンパクであるクロモグラニンA,Bが変異SOD1特異的に結合して調節的に細胞外分泌されることや、変異SOD1の細胞外分泌がミクログリアの活性化や運動ニューロン毒性作用を有し、家族性ALSの病理やnon-cell-autonomousな運動ニューロン死を説明しうることを報告した。さらに本仮説に基づいて細胞外変異SOD1をターゲットとした免疫療法を試み、有意な治療効果を得た。本ワークショップではこれまでの経過に加え、現在進行中の変異SOD1特異的認識抗体を用いた他動免疫療法など、免疫療法についての最新知見も紹介する。

14:45~14:55 休憩

14:55~16:15

II. 神経変性疾患に対する新たなアプローチ

座長：高橋 良輔（京都大学神経内科）、中野 今治（自治医科大学神経内科）

14:55~15:35

(1) 酵母プリオン研究からみた蛋白質凝集体の意義

田中 元雅（理化学研究所・病因遺伝子研究グループ）

蛋白質凝集をもたらす表現型や病理的結果は、特定のミスフォールド形態に強く依存している。この顕著な例が、同じアミノ酸配列をもつ蛋白質からなるプリオン粒子が異なる遺伝性の状態を生み出す「プリオン株」という現象である。ミスフォールドしたタンパク質のコンフォメーション変化がなぜ生理学的効果を変えるのかは、いまだに十分に理解されていない。今回我々は、酵母プリオン株の表現型が、限られた量の可溶性蛋白質に対する競合、コンフォメーションに依存したプリオンの成長と分割速度の差異の間の動的な相互作用からどのようにして生じるかを説明する解析モデルを構築し、その妥当性を実験的に調べることで蛋白質凝集体の意義について検討した。

15:35~16:15

(2) 神経変性疾患における神経細胞死の分子機構

岡澤 均（東京医科歯科大学 難治疾患研究所・神経病理学分野）

神経変性疾患は進行の速いALSでさえも多くは数年以上の経過をとる。神経症状出現と神経細胞機能障害の関連がアルツハイマー病やポリグルタミン病では疑われている。一方、細胞死が変性疾患の病理的特徴であることは明白である。多くの遺伝性変性疾患では胎生期から疾患遺伝子産物が発現していることを考え合わせると、緩慢に進行する神経細胞死はどのようなものと考えられるのだろうか？私たちはポリグルタミン病と転写障害を対象に研究を行ってきたが、この中で活性化アポトーシスシグナルが阻害された時に起きる非典型的細胞死を認識するに至った。同様な非典型的細胞死はこれまでも繰り返し報告があり、近年では基礎生物学においてオートファジックセルデスとの関連も含めて注目されている。今後、変性疾患の細胞死の分子のかたちについて再評価がなされることを期待したい。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

**筋萎縮性側索硬化症の画期的診断・
治療法に関する研究班**

（課題番号 H17 - 難治 - 一般 - 044）

平成 19 年度 班会議プログラム・抄録

日 時：平成 20 年 1 月 18 日(金) 10:00～15:30

場 所：都市センターホテル 6階 601

東京都千代田区平河町 2-4-1

TEL 03-3265-8211

発表：口演時間 15 分（質疑・討論含む）

主任研究者 祖父江 元

（事務局） 〒 466-8550

名古屋市昭和区鶴舞町 65

名古屋大学大学院医学系研究科 神経内科

TEL 052-744-2386、FAX 052-744-2393

E-mail: brain@med.nagoya-u.ac.jp

プログラム

10:00 主任研究者挨拶

10:05 厚生労働省疾病対策課御挨拶

10:10~10:55

セッションⅠ【病態】

座長：谷口 直之（大阪大学微生物病研究所）

1. ALS 患者の脳脊髄液中シスタチン C の検討

菊地 誠志¹⁾、○辻 ^{つじ}幸子²⁾、佐々木秀直²⁾

1) 国立病院機構札幌南病院神経内科

2) 北海道大学神経内科

2. Transglutaminase によるタンパク質凝集促進と神経変性疾患：ALS 病態 解明への応用

○松本 ^{まつもと}紋子¹⁾、藤原 ^{あやこ}範子²⁾、谷口 直之³⁾

1) 大阪大学大学院医学系研究科生化学

2) 兵庫医科大学生化学

3) 大阪大学微生物病研究所疾患糖鎖学

3. 変異 SOD1 の修飾を介した神経毒性発現機構の解析

○長野 ^{ながの}清一、岸上 ^{せいち} 仁、佐古田三郎

大阪大学大学院医学系研究科神経内科学

10:55～11:40

セッションⅡ 【病因・治療薬】

座長：高橋 良輔（京都大学神経内科）

4. 孤発性筋萎縮性側索硬化症患者ゲノムの CNV (copy number variation) 解析

○加藤 丈夫¹⁾、佐藤 秀則^{1), 2)}、川並 透¹⁾、栗田 啓司¹⁾、
江見 充^{1), 2)}

1) 山形大学医学部生命情報内科（第三内科）

2) ヒュービット・ジェノミックス

5. キサンチン脱水素酵素阻害作用を有しかつプリンサルベージ回路の基質とならない化合物を含有することを特徴とする ALS 治療薬の開発とその基礎研究

○加藤 信介¹⁾、加藤 雅子²⁾、阿部 泰子³⁾、西野 武志³⁾

1) 鳥取大学医学部脳神経病理部門

2) 鳥取大学医学部分子病理学教室

3) 日本医科大学医学部生化学第一教室

6. 胚性幹細胞と低分子化合物ライブラリーを用いた筋萎縮側索硬化症の治療法の研究

○井上 治久¹⁾、村上 学¹⁾、月田香代子¹⁾、高橋 良輔¹⁾、
中辻 紀夫²⁾、上杉 志成³⁾、饗庭 一博⁴⁾、浅井 康行⁵⁾

1) 京都大学大学院医学研究会臨床神経学

2) 京都大学物質一細胞統合システム拠点

3) 京都大学化学研究所生体機能化学研究系

4) 幹細胞創薬研究所

5) (株)リプロセル