

伝子抑制実験を行った。SH-SY5Y, HEK293, HepG2, HeLa 細胞を用い、遺伝子抑制下における細胞活性を測定した結果、細胞死を認めた。特に SH-SY5Y 細胞で強く細胞死が誘導された。この時、SH-SY5Y 細胞においてリソソーム膜タンパク (Lamp1 並びに 2)、リソソーム内酵素 (Cathepsin D 並びに B)、LC3 の継時的な増加がみられ、さらに Cathepsin D のミクロソーム分画への流出を認めた。また電子顕微鏡の観察から細胞内に Finger print 様の異常構造物の蓄積が観察された。

D. 考察

以上の結果より ATP13A2 はリソソーム膜に局在し、病原変異体は小胞体に蓄積することを明らかとした。また ATP13A2 遺伝子抑制により Cathepsin D の局在異常を認め、さらに細胞内に Cathepsin D 欠損マウスの神経細胞内に認められる Finger print 様の異常構造物を認められたことから、ATP13A2 がリソソーム膜においてリソソーム内酵素のトランスポーターの役割を果たしている可能性が考えられた。Cathepsin D はカスパーゼを活性化し、アポトーシスを誘導することが知られており、ATP13A2 遺伝子抑制による細胞死は、細胞質に流出した Cathepsin D による影響である可能性が考えられた。

E. 結論

ATP13A2 はリソソーム膜に局在し、リソソーム内酵素、特に Cathepsin D のリソソーム外への移行を制御している可能性が考えられる。また病原変異体において局在が変化することから、そのタンパク局在異常にてパーキンソン病の発症に影響を与えている可能性があることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表

未発表

2. 学会発表

ATP13A2 分子の細胞内局在

里 史明、久保 紳一郎、水野 美邦、服部 信孝第 49 回日本神経学会総会 横浜 5 月 15 日-17 日 2008 年

Subcellular localization of ATP13A2

Fumiaki Sato, Shin-ichiro Kubo, Satoshi Imai, Yoshikuni Mizuno, Nobutaka Hattori

Movement disorders Chicago, IL, USA June 22-26

Subcellular localization of ATP13A2

Fumiaki Sato, Shin-ichiro Kubo, Satoshi Imai, Yoshikuni Mizuno, Nobutaka Hattori

Neuroscience 2008 Washington DC November 15-19 2008

ATP13A2 分子の細胞内局在と機能に関する検討

里 史明、久保 紳一郎、今井 哲史、水野 美邦、服部 信孝

BMB2008 神戸 12 月 9 日-12 日 2008

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

表題 DJ-1 の細胞内局在の検討

報告者氏名 波田野 琢¹⁾，宇佐見 由希子¹⁾，今井 哲司²⁾，
久保 紳一郎¹⁾，水野 美邦²⁾，服部 信孝¹⁾

¹⁾ 順天堂大学脳神経内科

²⁾ 順天堂大学老人性疾患病態治療研究センター

研究要旨

DJ-1は常染色体劣性遺伝性パーキンソン病の原因蛋白の一つであり、この局在と機能を解析することで、パーキンソン病の病態解明につながる事が期待されるが詳細は不明である。今回、我々はDJ-1の細胞内局在を生化学的分画法、並びに免疫細胞学的染色法で検討したところDJ-1はシナプトソームにも局在し、さらにsynaptic vesicleに関連していることが明らかとなった。また、Rab3Aと共局在していることよりエクソサイトーシスなどの膜輸送に関与している可能性を示した。

A. 研究目的

DJ-1は常染色体劣性遺伝性パーキンソン病の原因蛋白の一つであり、この局在と機能を解析することで、パーキンソン病の病態解明につながる事が期待される。現在までのところ、この蛋白の機能は抗酸化作用、シャペロンとしての機能などが報告されているが詳細については不明である。局在に関してはミトコンドリアが注目されているが、げっ歯類のDJ-1の一部は神経突起に顆粒状に局在し、さらにシナプトソームに局在していることを示唆する報告もなされている。さらにDJ-1ノックアウトマウスではドパミン放出異常やDATの発現に異常をみとめることが報告されている。我々の研究室では他のPD関連蛋白である α -synuclein, Parkin, LRRK2が膜輸送や放出能にかかわっている可能性を示してきており、DJ-1も膜輸送に関連していることが予想され局在を検討した。

B. 研究方法

生化学的分画法を用いて、マウス脳よりシナプトソームを分画しそれぞれの画分をウェスタンブロッティング法にて局在を検討した。シナプトソームのsynaptic cytosol およびsynaptic vesicleの存在する画分(LS1)に関してimmunoisolation法をもち

いてsynaptic vesicleにDJ-1が局在している可能性について検討した。さらに、ショ糖密度勾配分画法をもちいてLS1からsynaptic vesicleを精製細分化しDJ-1の局在するvesicleについて検討した。さらに、SH-SY5Y細胞とマウス胎児脳初代培養細胞に関して免疫組織学的細胞染色を行い、細胞内局在の検討を行った。本実験は当院の動物実験倫理委員会に承認を得て動物実験に関する基本指針に則って実験を行った。

C. 研究結果

シナプトソーム分画による結果、synaptic vesicleの画分であるLP2にもDJ-1が局在していることが示され、ミトコンドリア以外にも局在をとることを明らかにした。Immunoisolation法の結果ではsynaptophysin およびVAMP2陽性の小胞にDJ-1が結合していた。また、synaptophysinとVAMP2は免疫沈降法で相互作用していたが、DJ-1は両方の蛋白とは結合していなかった。さらにショ糖密度勾配法ではsynaptophysinと一部同じ画分に存在しておりそこからもsynaptic vesicleに局在することが確認された。さらに興味深いことにドパミントランスporterやトランスフェリンレセプターもDJ-1と同じ画分に存在しており、これらの蛋白と同

じ vesicle に関与している可能性が示唆された。
また、免疫細胞学的染色法では VAMP2 と共局在していたが、mitotracker や BIP2 とは merge しなかった。さらに、エクソサイトーシスに関連している Rab3A と局在をともにしていた。

D. 考察

以上の結果より DJ-1 の少なくとも一部は synaptic vesicle に局在していることが示唆された。また、シヨ糖勾配法の結果よりドパミントランスポーターやトランスフェリンレセプターと同じ小胞に局在する可能性が考えられた。興味深いことに DJ-1 ノックアウトマウスの電気生理学的検討ではドパミントランスポーターの細胞膜上での発現量に異常をきたしている可能性が報告されている。今回の結果よりドパミントランスポーターの internalization や発現経路に影響を与えている可能性も示唆される。さらに、免疫染色の結果 Rab3A と局在をともにしていることで DJ-1 はエクソサイトーシスの機能に係る可能性も考えられた。

E. 結論

DJ-1 は膜輸送に関連している可能性があり、その機能障害にてパーキンソン病の発症に影響を与えている可能性があることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表

未発表

2. 学会発表

DJ-1 蛋白の細胞膜組織における局在に関する検討
高田由希子, 今井哲司, 里史明, 波田野琢, 久保紳一郎, 服部信孝

第 49 回日本神経学会総会 横浜 5 月 15 日-17 日
2008 年

Possible localization of DJ-1 on the plasma membrane in the mouse brain and cultured cell lines
Satoshi Imai, Yukiko Takata, Taku Hatano, Fumiaki

Sato, Shigeto Sato, Shin-ichiro Kubo, Nobutaka Hattori
Movement disorders Chicago, IL, USA June
22-26

DJ-1 蛋白の細胞膜組織における局在に関する検討
波田野 琢, 今井 哲司, 宇佐見 由希子, 久保 紳一郎, 里 史明, 佐藤 栄人, 水野 美邦, 服部 信孝
第27回日本認知症学会総会 前橋 10月10-11日
2008

Possible localization of DJ-1 on the plasma membrane in the mouse brain and cultured cell lines

Satoshi Imai, Yukiko Takata, Taku Hatano, Fumiaki Sato, Manabu Funayama, Shigeto Sato, Shin-ichiro Kubo, Nobutaka Hattori

Neuroscience 2008 Washington DC November 15-19
2008

家族性パーキンソン病 DJ-1 の細胞膜および細胞内小胞体における局在に関する検討

宇佐見 由希子, 今井 哲司, 里 史明, 波田野 琢, 久保 紳一郎, 服部 信孝

BMB2008 神戸 12月9日-12日 2008

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

パーキン蛋白のミトコンドリア輸送機構

（分担）研究者氏名 梶 龍兒¹⁾

共同研究者氏名 三ツ井貴夫¹⁾²⁾、黒田 由紀子¹⁾

- 1) 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部感覚情報医学講座神経情報医学分野
- 2) 徳島病院臨床研究部

研究趣旨

新規パーキン結合蛋白 KI-42 によるミトコンドリア関連機能に関する影響を検討した。KI-42 は細胞分画においてはミトコンドリアに一致し、特にミトコンドリア内膜の内部に局在していた。精製 KI-42 蛋白は単独でもミトコンドリアへの良好な移行能を有していた。一方、パーキンは単独ではわずかな移行能を示したのみであったが、精製 KI-42 蛋白をパーキンと共に添加するとその移行能は著明に増加した。ノザンプロット法による解析では KI-42 を培養細胞に過剰発現させると、ミトコンドリア由来の RNA の増加が認められた。以上より、KI-42 はパーキンと結合することでパーキンをミトコンドリアまで運搬すること、KI-42 はパーキン協調的に作用し、ミトコンドリア転写を促進しうることが示唆された。

A. 研究目的

我々は家族性パーキン病 PARK2 に関する研究を行う中で、その原因遺伝子であるパーキンの転写産物はミトコンドリアに局在し、ミトコンドリア遺伝子の転写・複製を促進することを明らかにした。パーキンにはミトコンドリアに対するシグナルペプチドが存在しないことから、我々はパーキンに結合し、ミトコンドリアまで運搬する蛋白が存在するとの仮説を立て、それを探索したところ新規の蛋白である Klokin1 を見出した。本研究は、klokin 1 の機能解析を行うことで、パーキン蛋白のミトコンドリアまでの輸送機構を明らかにすることを目的としている。

B. 研究方法

パーキンに結合する蛋白を SH-SY5Y 細胞より作成した cDNA ライブラリーから yeast two-hybrid システムを用いてスクリーニングし、さらに GenBank データベースを用いてホモロジーサーチを行った。さらに、そのリコンビナント蛋白を精製し、パーキン蛋白に対する機能を生化学的に解析した。

C. 研究結果

我々はミトコンドリアまで運搬する新規の蛋白を見出し Klokin1 と命名した。Klokin1 は Chondroitin polymerizing factor (CHPF) 遺伝子のスプライシングにより生じたものであること、このスプライシングにより Klokin1 とは別に CHPF^{Δ996} も生成されることを見出した。Klokin1 はパーキンをミトコンドリアまで運搬するが、CHPF および CHPF^{Δ996} はミトコンドリア外に存在し、パーキン分子の糖化に関係していることが明らかになった。すなわち ChPF/ChPF^{Δ996} を過剰発現させた培養細胞において抗パーキン抗体を用いた免疫沈降を行うと、得られたパーキン蛋白はレクチンに結合した。一方、Klokin1 の過剰発現ではパーキン蛋白のレクチン反応性は軽度であった。また、CHPF および CHPF^{Δ996} を過剰発現した細胞ではミトコンドリアにおける内因性パーキン蛋白の局在が著明に増加した。しかし、ミトコンドリアの電子伝達系複合体やβアクチンのミトコンドリア内発現は CHPF、CHPF^{Δ996} および Klokin1 の導入細胞において明らかな変化は見られなかった(図1)。

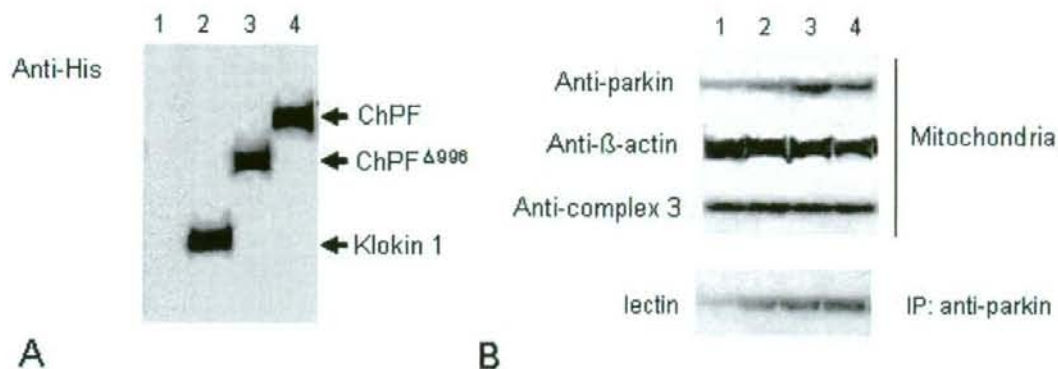


図1 CHPF、CHPF^{Δ996}および Klokin 1 によるミトコンドリア内パーキン発現の変化。培養細胞にイムノブロット分画法による KI-42、パーキン、チトクローム c の細胞内局在。A. 培養細胞に His-CHPF、His-CHPF^{Δ996} および His-Klokin 1 を導入し、抗 His 抗体でイムノブロットを行ったもの。Lane 1, empty vector; Lane 2, His-Klokin; Lane 3, His-CHPF^{Δ996}; Lane 4, His-CHPF。B. A. の細胞のミトコンドリア分画を分離し、パーキン、ミトコンドリア電子伝達系複合体3およびβアクチンのイムノブロットを行ったもの。CHPF および CHPF^{Δ996} を過剰発現した細胞では、内因性パーキン蛋白発現は著明に増加した。しかし、ミトコンドリアの電子伝達系複合体やβアクチンのミトコンドリア内発現に変化はなかった。また ChPF/ CHPF^{Δ996} を過剰発現させた培養細胞において抗パーキン抗体を用いた免疫沈降を行うと、得られたパーキン蛋白はレクチンプロットで強いシグナルが得られた。

D. 考察

Klokin 1 はミトコンドリア移行シグナル(MTS)を有するため、単独でもミトコンドリア内膜内に移行することが可能であるが、パーキンは MTS を欠いており、Klokin 1 と結合することでミトコンドリア内に移行することが可能になるものと考えられた。一方、CHPF および CHPF^{Δ996} は主にミトコンドリア外に局在しており、パーキンのミトコンドリアへの運搬には関与していないと考えられた。しかしながら、本研究により CHPF および CHPF^{Δ996} はパーキン蛋白の糖化を促進することが明らかになった。すなわち、CHPF および CHPF^{Δ996} によりパーキン蛋白は糖化された後に Klokin 1 と結合し、ミトコンドリアまで運搬されることが示唆された。

E. 結論

ミトコンドリア内移行シグナルのないパーキンは Klokin 1 および CHPF ファミリーの存在下でミト

コンドリア内移行が可能となることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

本研究は組換え DNA 実験を含んでいるが、これに対する安全対策として、「大学等における組み換え DNA 実験指針」および「徳島大学遺伝子組換え DNA

実験安全管理規則」に基づき、承認を受けた後に専用施設内にて研究を実施した。

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表

1. Kuroda Y et al. Parkin enhances mitochondrial biogenesis in proliferating cells. Hum Mol Genet. 15(6):883-95, 2006.

2. Kuroda Y et al. Parkin affects mitochondrial function and apoptosis in neuronal and myogenic

cells. Biochem Biophys Res Commun.

348(3):787-93, 2006.

2.学会発表

1. 黒田由紀子, 三ツ井貴夫, 梶 龍児: パーキン結合蛋白による抗アポトーシス作用の検討. 第49回日本神経学会総会, 2008年5月
2. 三ツ井貴夫, 黒田由紀子, 梶 龍児: パーキンと Polynucleotide Phosphorylase, poly (A) polymerase との関連. 第49回日本神経学会総会, 2008年5月

H.知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1.特許取得 (出願中)

- ① 新規なパーキン結合タンパクとその用途 (平成16年9月22日出願, 整理番号 P04015)
- ② パーキン蛋白の新規糖化因子. 発明者: 三ツ井貴夫, 黒田 由紀子. (平成20年3月28日出願, 出願番号: 特願 2008-087534.)

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

リン酸化チロシン水酸化酵素の不溶性凝集体形成とパーキンソン病との関連

長谷川 一子¹⁾

川畑 伊知郎²⁾、一瀬 宏²⁾

国立病院機構相模原病院¹⁾、東京工業大学大学院生命理工学研究科²⁾

研究要旨

我々は、パーキンソン病において黒質線条体系ドーパミンニューロンが特異的に変性する理由を明らかにするために、ドーパミン生合成律速酵素であるチロシン水酸化酵素（TH）に注目して研究を進めている。PC12D 細胞のプロテアソーム活性を MG-132 で阻害したところ、リン酸化 TH タンパク質の不溶性凝集体の蓄積が観察された。TH はリン酸化により活性化されることが知られているが、リン酸化された TH の分解については全く明らかになっていなかった。今回の結果からリン酸化 TH がユビキチン・プロテアソーム系により分解されること、リン酸化 TH が不溶性凝集体を作り易いことが明らかとなった。さらに、脳幹型レビー小体は抗 TH 抗体で免疫陽性となった。パーキンソン病発症初期には、ドーパミンの減少を補うために TH のリン酸化が亢進していることが考えられる。今後、TH タンパク質の不溶化とレビー小体形成との関連をさらに追求していく。

A. 研究目的

パーキンソン病において黒質線条体系ドーパミンニューロンが特異的に変性する理由はまだ明らかになっていない。我々は、ドーパミンニューロン特異的に発現しているテトラヒドロピロブテリン、および、ドーパミン生合成律速酵素であるチロシン水酸化酵素（TH）に注目し、特異的細胞変性とのつながりについて研究を進めている。

TH はドーパミン生合成の律速酵素であり、リン酸化と脱リン酸化、補酵素量、最終産物であるドーパミン量など多くの因子によってその活性が制御され、細胞内でのドーパミン量が一定に保たれている。TH は N 末側の調節ドメインに複数のリン酸化部位をもち、Ser40 番がプロテインキナーゼ A によってリン酸化される。TH は、最終産物であるドーパミンが活性部位に結合して不活性型となるが、Ser40 番のリン酸化により結合していたドーパミンが遊離し、活性型に変化する

ことが知られている。これまでに Ser40 番がリン酸化された TH がプロテイン・ホスファターゼ 2 A（PP2A）によって脱リン酸化され、リサイクルされることが知られているが、リン酸化 TH タンパク質の分解経路については明らかになっていない。また、我々は試験管内での実験から TH タンパク質が、Km 値以下の微量の補酵素の添加で不溶化し凝集体を作る性質をもっていることを明らかにしてきた。TH タンパク質の凝集体形成が細胞内でも起こりうるかを調べるために、以下のような実験を行った。

B. 研究方法

ラット褐色細胞腫由来細胞株である PC12D 細胞を用いた。26S プロテアソーム阻害剤 MG-132 を添加して時間経過によるリン酸化 TH 抗体、および、TH 抗体による免疫反応性の変化、比較対象としてコリンアセチル基転位酵素抗体に対する免疫反応性の変化を調べた。また、MG-132、

あるいは、PP2A 阻害剤であるオカダ酸を培地に添加したときの不溶性リン酸化 TH の量を、ウエスタンブロットングにより定量した。

パーキンソン病患者剖検脳の組織切片を、抗 TH 抗体で免疫組織化学的解析を行った。

(倫理面への配慮)

患者剖検脳の使用にあたっては、国立病院機構相模原病院倫理委員会、および、藤田保健衛生大学倫理委員会の承認のもとに、研究目的での剖検脳の利用について了承の得られている検体について行った。

C. 研究結果

ドーパミンニューロンのモデルとして PC12D 細胞を用いた。26S プロテアソームの阻害剤である MG-132 を培地に 250 nM 添加することにより、スポット状のリン酸化 TH 免疫反応性が、添加後 12 時間から観察された。スポット状のシグナルは時間経過とともに大きくなり凝集体を形成していった (図 1)。

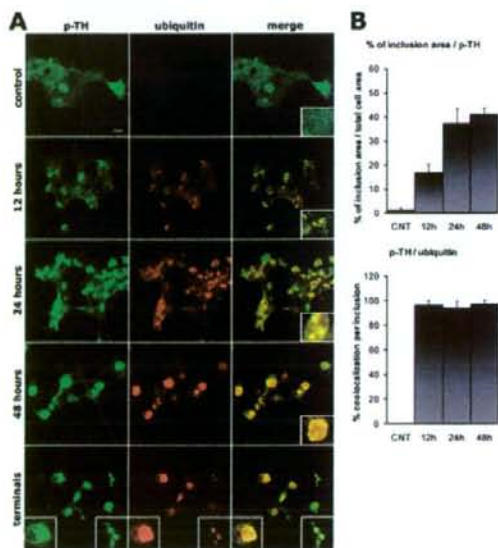


図 1、PC12D 細胞に MG-132 を添加することによる抗リン酸化 TH 抗体、および、抗ユビキチン抗体の免疫反応性の時間変化

このリン酸化 TH の免疫反応性シグナルは、抗ユビキチン抗体と共局在しており、リン酸化 TH がユビキチン化されていることを示唆した。次に、MG-132 処理後の細胞を界面活性剤 TritonX-100 存在下にホモジナイズして、リン酸化 TH タンパク質が可溶性画分にあるか、不溶性画分にあるかをウエスタンブロット解析により検討した。その結果、時間依存的にリン酸化 TH タンパク質が不溶性画分に蓄積していることが明らかとなった (図 2)。

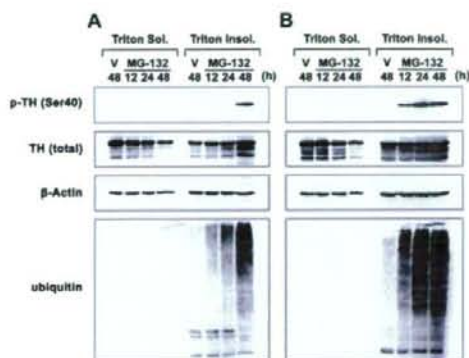


図 2、リン酸化 TH は TritonX-100 不溶性画分に存在する
A は未分化 PC12D 細胞、B は NGF 分化 PC12D 細胞の結果

このようなリン酸化 TH タンパク質の蓄積が、MG-132 の添加によるプロテアソーム阻害の影響であるか、リン酸化 TH がもっている固有の性質であるのかを検証するために、リン酸化 TH の脱リン酸化に働くことが報告されている脱リン酸化酵素 PP2A の阻害剤を用いて、細胞内リン酸化 TH を増加させたときにリン酸化 TH が不溶性凝集体を形成するかどうか検討した。PC12D 細胞の培地に PP2A の阻害剤であるオカダ酸を添加することにより、リン酸化 TH が著明に増加した。このとき、可溶性画分のリン酸化 TH の増加とともに不溶性リン酸化 TH も増加していった。このことは、リン酸化 TH が凝集しやすい性質をもっていることを示唆した。

以上の結果から、細胞内のリン酸化 TH の一部

はPP2Aにより脱リン酸化されて再びTHタンパク質として再利用されているが、過剰なリン酸化THはユビキチン・プロテアソーム系により分解処理されていること、またリン酸化THが不溶化凝集しやすい性質を細胞内でも示すことを示唆した。

リン酸化THの凝集が、パーキンソン病における特徴的病理所見であるレビー小体の形成と関係するかどうか検討するために、ヒトパーキンソン病患者の剖検脳を用いて、レビー小体が抗リン酸化TH抗体、および、抗TH抗体と反応するか調べた。その結果、パーキンソン病患者にみられる脳幹型レビー小体が抗TH抗体に強い反応性を示すことがわかった。抗リン酸化TH抗体はレビー小体と反応しなかったが、レビー小体中ではリン酸化部位がマスクされている可能性もあり、さらなる検討が必要である。

D. 考察

本研究から、リン酸化THがユビキチン・プロテアソーム系により分解されること、また、ユビキチン・プロテアソーム系の機能障害により蓄積したリン酸化THが凝集不溶化を起こしやすいことが明らかとなった。ユビキチン・プロテアソーム系の機能障害は、多くの神経変性疾患発症との関連が示唆されており、パーキンソン病発症にも関与していると考えられる。また、パーキンソン病発症初期にはドーパミンの減少を補うためにTHのリン酸化が亢進していることが考えられる。リン酸化されたTHの増加は、不溶性凝集体の形成につながる。脳幹型レビー小体は抗TH抗体によりよく染色されたので、レビー小体の構成成分としてTHタンパク質が含まれていると考えられる。リン酸化THの不溶化とレビー小体形成との関連を今後さらに追求していきたい。

E. 結論

ドーパミン生合成律速酵素であるTHのリン酸化タンパク質が、ユビキチンプロテアソーム系で分解されていることが明らかとなった。ユビキチン

プロテアソーム系とリン酸化THの凝集、および、レビー小体形成との関連について今後さらに検討していく。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表

A brain-specific decrease of the tyrosine hydroxylase protein in sepiapterin reductase-null mice—as a mouse model for Parkinson's disease. Takazawa C, Fujimoto K, Homma D, Sumi-Ichinose C, Nomura T, Ichinose H, Katoh S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 367, 787-792 (2008)

2. 学会発表

- 1) 12th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders. Formation of insoluble aggregates of phosphorylated tyrosine hydroxylase after proteasomal inhibition in PC12D cells. Kawahata I, Yagishita S, Hasegawa K, Nagatsu I, Nagatsu T, Ichinose H. June 24, 2008 (Chicago, USA)
- 2) プロテアソーム障害によるリン酸化チロシン水酸化酵素の不溶性凝集体の形成、川畑伊知郎、柳下三郎、長谷川一子、Hasan Parvez, 徳岡宏文、永津郁子、永津俊治、一瀬宏、*Neuroscience* 2008 2008年7月9日(東京)

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

LRRK2 変異によるアポトーシス抑制能低下機序の解析

太田悦朗¹⁾、前川達則¹⁾、山元茉莉¹⁾、長谷川一子²⁾、小幡文弥³⁾

¹⁾北里大学大学院医療系研究科臨床免疫学、²⁾国立病院機構相模原病院神経内科、

³⁾北里大学医療衛生学部細胞デザインセンター

研究要旨

本研究では、細胞内分解を受けやすい I²⁰²⁰T 変異型 LRRK2 分子がアポトーシスに及ぼす影響を検証した。その結果、正常型 LRRK2 分子は酸化ストレスに対するアポトーシス抑制能をもつが、I²⁰²⁰T 変異型 LRRK2 分子では細胞内分解による量的な不足によりアポトーシス抑制能が低下する可能性が示唆された。また、細胞内分解はユビキチンプロテアソーム系とリソソーム系の蛋白質分解経路に起因することを明らかにした。

A. 研究目的

近年同定された常染色体優性遺伝性パーキンソン病の原因分子 Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) は、多様な機能が予想される巨大な新規分子である。我々は、LRRK2 の kinase ドメイン内の I²⁰²⁰T 変異で発症する相模原家系患者の発症メカニズムの解明を目的として解析を進め、その結果、I²⁰²⁰T 変異型 LRRK2 分子が細胞内分解を受けやすい可能性を見つけた。本研究では、変異分子の細胞内減少がアポトーシスにどのような影響を及ぼすかを検証した。また、変異分子と蛋白質分解系経路との関連性についても検討した。

B. 研究方法

アポトーシス誘導実験：正常型または I²⁰²⁰T 変異型 LRRK2 発現プラスミド (V5 タグ付) を HEK293 および SH-SY5Y 細胞に導入し、過酸化水素を添加して培養後、アポトーシス誘導した細胞にアネキシン V を結合させ、フローサイトメトリーを用いてアポトーシス陽性率を調べた。また、得られた各細胞抽出液を免疫プロットし、抗 caspase-9 抗体を用いて活性化 caspase-9 の有無を調べた。
蛋白質分解阻害剤を用いた実験：正常型または変異型 LRRK2 を強制発現させた細胞に MG132、lactacystin、chloroquine を各々添加し、免疫プロッ

ト後、抗 V5 抗体を用いて LRRK2 を検出した。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

過酸化水素添加実験において、正常型 LRRK2 発現細胞は遺伝子非導入細胞 (UT) と比べてアポトーシス陽性率が低下していた。一方、I²⁰²⁰T 変異型 LRRK2 発現細胞の陽性率は UT と同じであった (図 1)。

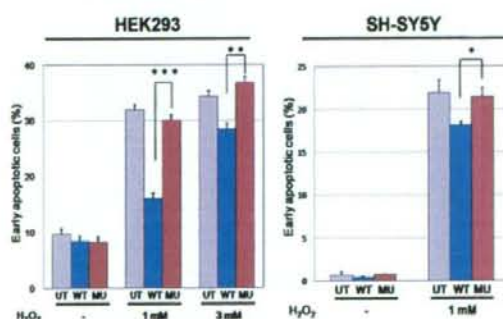


図 1. Percentage of cells showing H₂O₂-induced apoptosis among LRRK2-transfected cells.

*: p<0.05, **: p<0.005, ***: p<0.0005

正常型または変異型 LRRK2 を強制発現させた細胞に蛋白質分解阻害剤を添加した実験から、変異型 LRRK2 分子がユビキチンプロテアソーム系

とリソソーム系の蛋白質分解経路によって分解されることを確認した (図2)。また、3種類の蛋白質分解阻害剤を同時に添加して変異型 LRRK2 の細胞内分解を止めた場合、蛋白質レベルは正常型 LRRK2 分子と同等であることを確認した (図3A)。

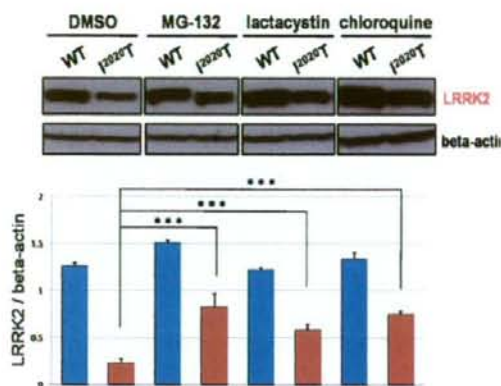


図2. Inhibition of degradation of transfected LRRK2. ***, $p < 0.0005$.

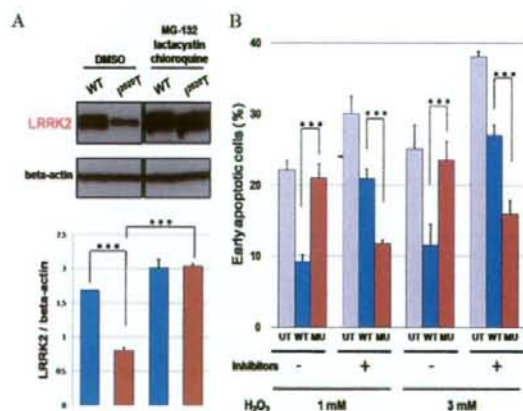


図3. Effect of protease inhibitors on early apoptosis in LRRK2-transfected HEK293 cells.

Inhibitors: MG-132, lactacystin, and chloroquine mixed, ***, $p < 0.0005$.

さらに、変異型 LRRK2 の細胞内分解を止めた場合において過酸化水素を用いたアポトーシス誘導実験を行った結果、アポトーシス陽性率が低下した (図3B)。活性化 caspase-9 を調べた結果も

同様に、正常型 LRRK2 発現細胞と比べて変異型 LRRK2 発現細胞で減少していた (図4)。

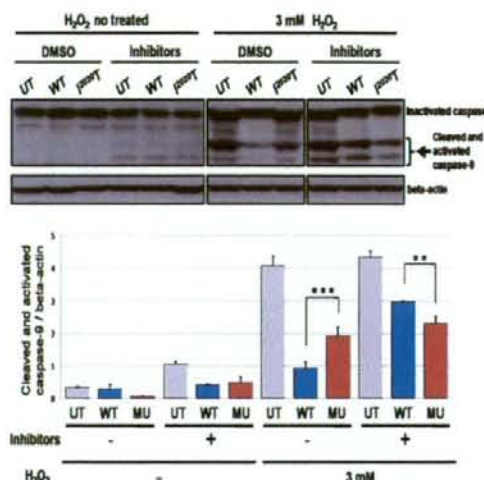


図4. Caspase-9 activation of LRRK2-transfected HEK293 cells against apoptosis.

Inhibitors: MG-132, lactacystin, and chloroquine mixed, **, $p < 0.005$, ***, $p < 0.0005$.

D. 考察

アポトーシス誘導実験の結果から、正常型 LRRK2 分子は酸化ストレスに対するアポトーシス抑制能をもつことが考えられた。一方で、^{i200T} 変異型 LRRK2 分子はアポトーシス抑制能の低下が考えられた。

^{i200T} 変異型 LRRK2 分子のアポトーシス抑制能が低下する原因としては、ユビキチンプロテアソーム系とリソソーム系の蛋白質分解経路による細胞内分解が関与することが示唆された。さらに、蛋白質分解阻害剤の添加により ^{i200T} 変異型 LRRK2 の蛋白質レベルが正常型 LRRK2 と同等になった場合、低下していたアポトーシス抑制能が回復する現象がみられた。このメカニズムの一端としては、変異分子の細胞内分解による量的な不足が蛋白質分解阻害剤の添加により防がれ、その結果としてアポトーシス抑制能の回復に繋がったのではないかと考えられた。

LRRK2 が関与するパーキンソン病発症機序の

概念は、一部の変異体のキナーゼ活性亢進の報告から gain of toxic function が主流である。しかし、I²⁰²⁰T 変異型を含むその他の変異体 LRRK2 ではキナーゼ活性が変化しないことも報告されている。本研究結果から、I²⁰²⁰T 変異型 LRRK2 分子の発症メカニズムの一因は、細胞内分解による量的な不足を生じることから haploinsufficiency が予想された。

E. 結論

正常型 LRRK2 分子は酸化ストレスに対するアポトーシス抑制能をもつが、I²⁰²⁰T 変異型 LRRK2 分子では細胞内分解による量的な不足によりアポトーシス抑制能が低下する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Imai Y, Gehrke S, Wang HQ, Takahashi R, Hasegawa K, Oota E, and Lu B. Phosphorylation of 4E-BP by LRRK2 affects the maintenance of dopaminergic neurons in *Drosophila*. *EMBO J*, 27 (18), 2432-2443, 2008

2. 学会発表

- 1) 太田悦朗、前川達則、長谷川一子、小幡文弥
「家族性パーキンソン病の原因分子 LRRK2 の蛋白質不安定性の検討」一般演題（口演）
第 49 回日本神経学会総会、2008 年
- 2) 太田悦朗、前川達則、長谷川一子、小幡文弥
「家族性パーキンソン病の原因分子 LRRK2 の細胞内分解とアポトーシス抵抗性」一般演題（ポスター）第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008 年

H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

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

パーキンソン病感受性遺伝子としてのゴーシェ病遺伝子変異関連解析

戸田達史¹⁾、水田依久子¹⁾、三井純²⁾、佐竹渉¹⁾、豊田敦³⁾、
山本光利⁴⁾、服部信孝⁵⁾、村田美穂⁶⁾、後藤順²⁾、辻省次²⁾

- ¹⁾ 大阪大学臨床遺伝学、²⁾ 東京大学神経内科、³⁾ 理研ゲノム科学総合研究センター、
⁴⁾ 香川県立中央病院神経内科、⁵⁾ 順天堂大学脳神経内科、
⁶⁾ 国立精神・神経センター病院神経内科

研究要旨

糖脂質代謝疾患スフィンゴリピドーシスのひとつであるゴーシェ病は、リソソーム内の酵素 Glucocerebrosidase (GBA) 欠損により glucosylceramide (GlcCer) が蓄積する、常染色体劣性遺伝疾患である。ゴーシェ病患者および保因者でパーキンソン病 (PD) を発症する例が報告されたことから、GBA が PD の候補遺伝子として注目されている。我々は、PD と GBA 変異の関連解析を行った。GBA 遺伝子の全 11 エクソンとその近傍をリシーケンスして塩基配列変化の有無を調べたところ、PD 患者 534 人中 50 人 (9.4%)、対照 544 人中 2 人 (0.37%) に GBA 変異ヘテロがみられ、PD と GBA 変異は強く関連していることがわかった (Fisher 検定 $p = 6.9 \times 10^{-14}$, オッズ比 28.0)。発症年齢は GBA 変異をもつ PD 患者 (52.5 ± 7.4) は変異を持たない PD 患者 (58.8 ± 10.7) よりも有意に低かった ($p < 0.001$)。GBA 変異ヘテロは PD の確実なリスク因子であるといえる。今後 GBA 変異ヘテロが PD の病態に關与するメカニズムについて解明していく必要がある。

A. 研究目的

糖脂質代謝疾患スフィンゴリピドーシスのひとつであるゴーシェ病は、リソソーム内の酵素 Glucocerebrosidase (GBA) 欠損により glucosylceramide (GlcCer) が蓄積する、常染色体劣性遺伝疾患である。ゴーシェ病患者および保因者でパーキンソン病 (PD) を発症する例が報告されたことから、パーキンソン病における GBA 遺伝子変異の保因者頻度を調べた研究が世界中で行われている。我々は、本邦におけるパーキンソン病と GBA 変異の関連解析を行った。

B. 研究方法

GBA 遺伝子の全 11 エクソンとその近傍をリシーケンスして塩基配列変化の有無を調べた。まず、PD 患者 61 人、対照 47 人で調べたところ有意差

がでたので、解析対象を PD 患者 534 人、対照 544 人に拡大した (図 1)。GBA 変異を持つ PD 患者の臨床的特徴についても考察した。DNA 収集のための研究協力者からの採血の際には「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 13 年 3 月 29 日 文科省・厚労省・経産省告示第 1 号、平成 16 年 12 月 28 日全部改正、平成 17 年 6 月 29 日一部改正)」を遵守し、文書によるインフォームドコンセントを得た。なお、本研究は各研究機関倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

リシーケンスにより、11 種類の疾患原性点変異が同定された。いずれかをヘテロで持つ保因者は PD 患者 534 人中 50 人 (9.4%)、対照 544 人中 2 人 (0.37%) であり、PD と GBA 変異は強く関連

していることがわかった (Fisher 検定 $p = 6.9 \times 10^{-14}$, オッズ比 28.0) (表 1)。PD 患者で同定された変異で多かったのは R120W (15 人)、RecNciI (14 人)、L444P (8 人) であり、日本人ゴーシェ病でみられる変異の分布 (L444P, RecNciI, F213I で 60% 近くを占める) とはかなり異なっていた。臨床的には、GBA 変異をもつ PD 患者の発症年齢 (52.5 ± 7.4) は変異を持たない PD 患者の発症年齢 (58.8 ± 10.7) よりも有意に低かった ($p < 0.001$) (表 2)。さらに、親子または同胞で PD を発症している 34 家系について、今回同定した GBA 変異を調べたところ、5 家系 (14.7%) において、患者と co-segregation する変異がみられた。

D. 考察

GBA 変異と PD との強い関連については、欧米、中国からも同様の報告が相次いでいる。従って、遺伝統計学的に、GBA 変異は確実な PD リスク因子であると言える。

GBA 変異が PD の病態にどのように関与しているのかはまだ明らかではない。参考になる知見として、GBA 保因者である PD の剖検脳で酵素活性を測定し、対照の 43-100% の活性だったという報告がある (Lwin et al., *Mol Genet Metab* 81:70;2004)。また、*in vitro* の実験で、酵素活性が 11-15% まで低下しないと、GlcCer の蓄積は起こらないとの報告もある (Schueler et al., *J Inherit Metab Dis* 27:649;2004)。従って、酵素活性の不足が直接 PD の病態に関与しているとは考えにくい。仮説として、変異 GBA 蛋白が構造異常をおこすため、ライソゾーム系に負担をかけるため α -synuclein の分解が阻害される、または変異 GBA 蛋白が α -synuclein の凝集を促進する、などの機構が考えられている (図 2) (Hruska et al., *J Biomed Biotechnol* 2006:78549;2006)。近年ゴーシェ病以外のリビドーシス患者の剖検脳でも α -synuclein の蓄積がみられることが報告された (Suzuki et al., *Acta Neuropathol*

114:481;2007)。これらの疾患と PD との関連についても、今回のゴーシェ病と同様のアプローチが可能であると考えられる。

E. 結論

GBA 変異ヘテロは確実な PD リスク因子である。この変異ヘテロが PD 発症に関わるメカニズムを解明していくことが、今後の課題である

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

Mitsui J, Mizuta I, Toyoda A, Ashida R, Takahashi Y, Goto J, Fukuda Y, Date H, Iwata A, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, Toda T, Tsuji S. Mutations for Gaucher disease confer a high susceptibility to Parkinson disease. *Arch Neurol*, in press

Tomiyama H, Mizuta I, Li Y, Funayama M, Yoshino H, Li L, Murata M, Yamamoto M, Kubo SI, Mizuno Y, Toda T, Hattori N. LRRK2 P755L variant in sporadic Parkinson's disease. *J Hum Genet* 53:1012-5;2008.

Mizuta I, Tsunoda T, Satake W, Nakabayashi Y, Watanabe M, Takeda A, Hasegawa K, Nakashima K, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, Toda T. *Calbindin 1, fibroblast growth factor 20, and α -synuclein* in sporadic Parkinson's disease. *Hum Genet*. 124:89-94;2008.

Kumazawa R, Tomiyama H, Li Y, Imamichi Y, Funayama M, Yoshino H, Yokochi F, Fukusako T, Takehisa Y, Kashiwara K, Kondo T, Elibol B, Bostantjopoulou S, Toda T, Takahashi H, Yoshii F, Mizuno Y, Hattori N. Mutation analysis of the

PINK1 gene in 391 patients with Parkinson disease. Arch Neurol. 65:802-8; 2008.

2.学会発表

第49回日本神経学会総会

The American Society of Human Genetics 58th Annual Meeting

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

- 1.特許取得 無し
- 2.実用新案登録 無し
- 3.その他 無し

検体

	大阪大保存検体*	東大神経内科検体	計
PD	473	61	534
対照	497	47	544

* 順天大、精神神経センターHsp
香川中央Hsp 大阪大

東大検体でGBAの全11 exonsをリシーケンス
(マイクロアレイ (TKYPD02, TKYPD03) 併用)

PD 6人に変異RecNoil, R120W, R329C, R496あり。対照には無し。

大阪大保存検体で再現性確認CR-RFLP, sequencing)

PD 36人/473人に変異あり

対照2人/497人に変異あり

再現性あり!

他の変異も同定するため、全検体で全 exonsをリシーケンス(理研)

図1 方法

	人数	発症年齢 (変異無し群と の検定)	家族歴有り (親子同胞)	L-DOPA 反応性良	認知症	幻視
GBA変異有り						
全体	50	52.5±7.4 (P = 0.00006)	11/50 (22%)	41/49 (87%)	13/41 (32%)	16/41 (39%)
R120W	16	51.6±8.0 (P = 0.008)	5/16 (31%)	13/15 (87%)	5/15 (33%)	6/15 (40%)
RecNoil	14	53.4±6.3 (P = 0.06)	4/14 (28%)	13/14 (93%)	5/14 (36%)	6/14 (43%)
L444P	8	51.4±7.8 (P = 0.05)	1/8 (13%)	7/8 (88%)	2/8 (25%)	4/8 (5%)
L444P/RecNoil	22	52.8±6.9 (P = 0.007)				
GBA変異無し	484	58.8±10.7				

表2 GBA 変異の有無と PD の臨床像

	GBA 変異		計
	+	-	
PD	50 (9.4%)	484	534
対照	2 (0.37%)	542	544

P = 6.9×10⁻¹⁴
OR = 28.0 (7.3 - 238.3)

表1 PD 患者の 10%弱は GBA 変異ヘテロである

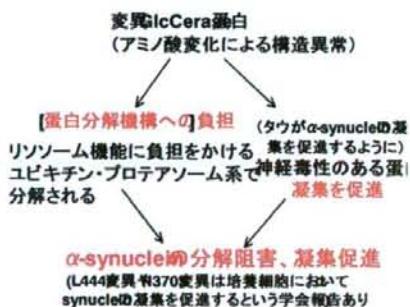


図2 GBA 変異ヘテロの PD 病態メカニズム仮説

Ⅲ. 研究成果に関する一覧表

英文単行本

著者名	論文題名	書名	(編集者名)	発行社名	(発行地名)	出版西暦年	頁
Kanagawa M, Toda T.	Fukutin and Fukuyama congenital muscular dystrophy.	Glycoscience Lab Manual	Taniguchi. N, et.al. eds	Elsevier Japan	Japan	2008	309-312
Kwak S, Hideyama T, Yamashita T	AMPA receptor-mediated neuronal death in motor neuron diseases.	Amino Acid Receptor Research	Paley BF, Warfield TE	Nova Science Publishers Inc	NY	2008	293-310
Inoue, H., Kondo, T., Lin, L., Mi, S., Isacson, O. and Takahashi, R.	Protein Misfolding and Axonal Protection in Neurodegenerative Disease	Protein Folding and Misfolding: Neurodegenerative Diseases	Ovadi, J. and Orosz, F.	Springer	Hungary	2008	97-109

英文原著・症例報告

著者名	論文題名	雑誌名	巻	頁	出版西暦年	GRANTへの 謝辞の有無
Ouyang Y, Segers K, Bouquiaux O, Wang FC, Janin N, Andris C, Shimazaki H, Sakoe K, Nakano J, Takiyama Y.	Novel SACS mutation in a Belgian family with saccin-related ataxia	J Neurol Sci	264	73-76	2008	無
Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, Kametani F, Yoshida M, Hashizume Y, Beach TG, Buratti E, Baralle F, Morita M, Nakano J, Oda T, Tsuchiya K, Akiyama H.	Phosphorylated TDP-43 in Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis	Ann Neurol	64	60-70	2008	無
Shimazaki H, Morita M, Nakano J	Inverse Ocular Bobbing in a Patient with Encephalitis Associated With Antibodies to the N-methyl-D-aspartate Receptor	Arch Neurol	65 (No. 9)	1251	2008	無
Yokota O, Tsuchiya K, Terada S, Ishizu H, Uchikado H, Ikeda M, Oyanagi K, Nakano J, Murayama S, Kuroda S, Akiyama H.	Basophilic inclusion body disease and neuronal intermediate filament inclusion disease: a comparative clinicopathological study	Acta Neuropathol	115	561-575	2008	無
Shimazaki H, Vazifehmand R, Heidari M, Khorram-Khorshid H, R. Saber S, Hejazi S, Aghakhani-Moghadam F, Ouyang Y, Honda J, Nakano J, Takiyama Y.	A Large Family with Spinocerebellar Ataxia Type 6 in Iran: A Clinical and Genetic Study	Archives of Iranian Medicine	11 (4)	459-462	2008	無
Tokui K, Adachi H, Waza M, Katsuno M, Minamiyama M, Doi H, Tanaka K, Hamazaki J, Murata S, Tanaka F, Sobue G	17-DMAG ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron degeneration through well-preserved proteasome function in a SBMA model mouse.	Hum Mol Genet	in press		2008	有
Banno H, Katsuno M, Suzuki K, Takeuchi Y, Kawashima M, Suga N, Takamori M, Ito M, Nakamura T, Matsuo K, Yamada S, Oki Y, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Aitsuta N, Watanabe H, Fujimoto Y, Nakashima T, Tanaka F, Doyu M, Sobue G	Phase 2 trial of leuprorelin in patients with spinal and bulbar muscular atrophy.	Ann Neurol	in press		2008	有
Okada Y, Matsumoto A, Shimazaki T, Enoki R, Koizumi A, Ishii S, Itoyama Y, Sobue G, Okano H	Spatio-Temporal Recapitulation of Central Nervous System Development By Murine ES Cell-Derived Neural Stem/Progenitor Cells.	Stem Cells	in press		2008	有
Suzuki K, Katsuno M, Banno H, Takeuchi Y, Aitsuta 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	有
Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Takeuchi Y, Kawashima M, Tanaka F, Adachi H, Sobue G	Molecular genetics and biomarkers of polyglutamine diseases.	Curr Mol Med	8	221-234	2008	有
Yamamoto M, Tanaka F, Tatsumi H, Sobue G	A strategy for developing effective amyotrophic lateral sclerosis pharmacotherapy: from clinical trials to novel pharmacotherapeutic strategies.	Expert Opin Pharmacother	9	1845-1857	2008	有
Takeuchi Y, Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Kawashima M, Aitsuta N, Ito M, Watanabe H, Tanaka F, Sobue G	Walking capacity evaluated by the 6-minute walk test in spinal and bulbar muscular atrophy.	Muscle Nerve	38	964-971	2008	有

著者名	論文題名	雑誌名	巻	頁	出版西暦年	GRANTへの 謝辞の有無
Yoshioka M, Higuchi Y, Fujii T, Aiba H, <u>Toda T</u>	Seizure-genotype relationship in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy.	Brain Dev	30	59-67	2008	無
Kumazawa R, Tomiyama H, Li Y, Imamichi Y, Funayama M, Yoshino H, Yokochi F, Fukusako T, Takehisa Y, Kashihara K, Kondo T, Elibol B, Bostantjopoulou S, <u>Toda T</u> , Takahashi H, Yoshii F, Mizuno Y, Hattori N.	Mutation analysis of the PINK1 gene in 391 patients with Parkinson's disease.	Arch Neurol	65	802-808	2008	無
Mizuta I, Tsunoda T, Satake W, Nakabayashi Y, Watanabe M, Takeda A, Hasegawa K, Nakashima K, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, <u>Toda T</u> .	Calbindin 1, fibroblast growth factor 20, and α -synuclein in Parkinson's disease.	Hum Genet	124	89-94	2008	有
Sato S, Omori Y, Katoh K, Kondo M, Kanagawa M, Miyata K, Funabiki K, Koyasu T, Kajimura N, Miyoshi T, Sawai H, Kobayashi K, Tani A, <u>Toda T</u> , Usukura J, Tano Y, Fujikado T, Furukawa T.	Pikachurin, a dystroglycan ligand, is essential for photoreceptor ribbon synapse formation.	Nature Neurosci	11	923-931	2008	無
Fujikake N, Nagai Y, Popiel HA, Okamoto Y, Yamaguchi M, <u>Toda T</u> .	Heat shock transcription factor 1 (HSF1)-activating compounds suppress polyglutamine-induced neurodegeneration through induction of multiple molecular chaperones.	J Biol Chem	283	26188-26197	2008	無
Wakayama Y, Inoue M, Kojima H, Yamashita S, Shibuya S, Jimi T, Hara H, Matsuzaki Y, Oniki H, Kanagawa M, Kobayashi K, <u>Toda T</u> .	Reduced expression of sarcospan in muscles of Fukuyama congenital muscular dystrophy.	Histo Histopathol	23	1425-1438	2008	無
Popiel HA, Nagai Y, Fujikake N, <u>Toda T</u> .	Delivery of the aggregate inhibitor peptide QBP1 into the mouse brain using PTDs and its therapeutic effect on polyglutamine disease mice.	Neurosci Lett	in press		2008	無
Mitsui J, Mizuta I, Toyoda A, Ashida R, Takahashi Y, Goto J, Fukuda Y, Date H, Iwata A, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, <u>Toda T</u> , Tsuji S.	Mutations for Gaucher disease confer a high susceptibility to Parkinson disease.	Arch Neurol	in press		2008	無
Tomiyama H, Mizuta I, Li Y, Funayama M, Yoshino H, Li L, Murata M, Yamamoto M, Kubo SI, Mizuno Y, <u>Toda T</u> , Hattori N.	LRKK2 P755L variant in sporadic Parkinson's disease.	J Hum Genet	in press		2008	無
Shikishima C, Hiraishi K, Yamagata S, Sugimoto Y, Takemura R, Ozaki K, Okada M, <u>Toda T</u> , Ando J.	Is g an entity? A Japanese twin study using syllogisms and intelligence tests.	Intelligence	in press		2008	無
Kanagawa M, Nishimoto A, Chiyonobu T, Takeda S, Miyagoe-Suzuki Y, Wang F, Fujikake N, Taniguchi M, Lu Z, Tachikawa M, Nagai Y, Tashiro F, Miyazaki J, Tajima Y, Takeda S, Endo T, Kobayashi K, Campbell KP, <u>Toda T</u> .	Residual laminin-binding activity and enhanced dystroglycan glycosylation in novel model mice to dystroglycanopathy.	Hum Mol Genet	in press		2008	無

著者名	論文題名	雑誌名	巻	頁	出版西暦年	GRANTへの 謝辞の有無	
Okamoto Y, Nagai Y, Fujikake N, Popiel HA, Yoshioka T, Toda I, Inui T.	Surface plasmon resonance characterization of specific binding of polyglutamine aggregate inhibitors to the expanded polyglutamine stretch.	Biochem Biophys Res Commun		in press	2008	無	
Oeda T, Wasaki M, Yamamoto K, Mizuta E, Kitagawa N, Isono T, Taniguchi S, Doi K, Yaku H, Yutani C, Kawamura T, Kuno S, Sawada H	High risk factors for valvular heart disease from dopamine agonists in patients with Parkinson's disease.	J of Neural Transmission		435-1463 (Online)	2008	無	
Kaneko M, Sugiyama N, Sasayama D, Yamaoka K, Miyakawa T, Arima K, Tsuchiya K, Hasegawa K, Washizuka S, Hanihara T, Amano N, Yagishita S	Prion disease causes less severe lesions in human hippocampus than other parts of brain.	Psychiatry and Clinical Neuroscience	62	264-270	2008	無	
Imai Y, Gehrke S, Wang H-Q, Takahashi R, Hasegawa K, Oota E, Lu B	Imai Y, Gehrke S, Wang H-Q, Takahashi R, Hasegawa K, Oota E, Lu B	EMBO		127	2432-43	2008	無
Hasegawa K, Stoszel AJ, Yokoyama T, Kowa H, Wszolek ZK, Yagishita S	Familial parkinsonism: study of original sagamihara Park8 (I2020T) kindred with variable clinicopathologic outcomes.	Parkinsonism Relat Disord		Epub	2008	無	
Nishina K, Unno T, Uno Y, Kubodera T, Kanouchi T, Mizusawa H, Yokota	T-Efficient in vivo delivery of siRNA to the liver by conjugation of α -Tocopherol.	Mol Ther		16(4)	734-740	2008	有
Dadvajantsana B, Aoki M, Warita H, Suzuki N, Itoyama Y	Expression of insulin-like growth factor II receptor in the spinal cord of ALS transgenic rats	Tohoku J Exp Med		214	303-10	2008	有
Mizuno H, Warita H, Aoki M, Itoyama Y.	Accumulation of chondroitin sulfate proteoglycans in the microenvironmental niche for spinal motor neurons in ALS transgenic rats	J Neurosci Res		86	2512-23	2008	有
Kurata T, Hayashi T, Murakami T, Miyazaki K, Morimoto N, Ohta Y, Takehisa Y, Nagai M, Kawarabayashi T, Takao Y, Ohta T, Harigaya Y, Manabe Y, Kamiya T, Shoji M, Abe K.	Differentiation of PA from early PSP with different patterns of symptoms and CBF reduction.	Neurosci Res		30	860-867	2008	有
Ohta Y, Kamiya T, Nagai M, Nagata T, Morimoto N, Miyazaki K, Murakami T, Kurata T, Takehisa Y, Ikeda Y, Asoh S, Ohta S, Abe K.	Therapeutic benefits of intrathecal protein therapy in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.	J Neurosci Res.		86	3028-3037	2008	有
Yamashita T, Deguchi K, Sehara Y, Lukic-Panin V, Zhang H, Kamiya T, Abe K.	Therapeutic Strategy for ischemic Stroke.	Neurochem Res.		Epub	2008	有	
Deguchi K, Hayashi T, Nagotani S, Sehara Y, Zhang H, Tsuchiya A, Ohta Y, Tomiyama K, Morimoto N, Miyazaki M, Huh NH, Nakao A, Kamiya T, Abe K.	Reduction of cerebral infarction in rats by biliverdin associated with amelioration of oxidative stress.	Brain Res.		1188	1-8	2008	有
Zhang H, Kamiya T, Hayashi T, Tsuru K, Deguchi K, Lukic V, Tsuchiya A, Yamashita T, Hayakawa S, Ikeda Y, Osaka A, Abe K.	Gelatin-siloxane hybrid scaffolds with vascular endothelial growth factor induces brain tissue regeneration.	Curr Neurovasc Res.		5	112-117	2008	有