

(14) Li W, et al. *Glycobiology*. 2008; 18: 114-24.

(15) Kim YS, et al. *Mol Cell Proteomics*. 2008; 7: 1-14.

2. 学会発表

(1) 松本紋子、松本明郎、谷口直之、Fridovich, I. BMB2008 (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、2008.12.9-12、神戸)

(2) Okado-Matsumoto A, Nagai M, Morimoto N, Matsumoto A, Abe K, Taniguchi N. The 15th Meeting of the Society of Free Radicals Biology and Medicine, 2008. 11. 19-25, Indianapolis, USA.

(3) 松本紋子、松本明郎、谷口直之、Fridovich, Irwin. 第61回日本酸化ストレス学会、2008. 6. 19-20、京都

(4) 藤原範子、中の三弥子、大河原知水、吉原大作、横江俊一、加藤信介、谷口直之、鈴木敬一郎. 第61回日本酸化ストレス学会学術集会、2008. 6.19-20、京都

(5) Fujiwara N, Nakano M, Yoshihara D, Ookawara T, Eguchi H, Taniguchi N and Suzuki K. The Gordon Research conference on Thiol-based Redox Regulation and Signaling, 2008. 5. 25-30, Lucca, Italy

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

A L S 病態進行遅延を目指した肝細胞増殖因子発現 ポリオウイルスベクターの開発

研究協力者：野本 明男 東京大学大学院医学系研究科教授

研究要旨：運動神経細胞特異的な疾患である筋萎縮性側索硬化症の治療・発症遅延・病態進行遅延を目的としたウイルスベクターとして、運動神経細胞に感染するポリオウイルスの利用を検討している。ポリオウイルスをベクターとして利用するには、ポリオウイルスが持つ神経毒性を抑える必要がある。研究の過程で、神経細胞はポリオウイルスの1回感染には抵抗性を示し、感染から回復する能力を持つことを発見した。そこで、ウイルスのキャプシド蛋白質領域のゲノム部位を欠損させ、感染により子ウイルス粒子が産生されないベクターを使用することとした。ゲノム欠損部位には、ALS の発症を遅延させることが知られている HGF (hepatocyte growth factor) の mRNA を挿入し、神経細胞特異的に発現させることにした。ポリオウイルスベクターによって分泌型蛋白質を発現させることは困難であるとの報告があるので、ジシストロニックゲノムとして、第一シストロンからは HGF、第二シストロンはウイルスゲノム複製用蛋白質を発現させ、分泌シグナルの影響をウイルス複製に及ぼさないようにした。HGF 発現には成功したが、ALS モデルマウスを使用した動物実験では効果を見る事が出来ていない。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は運動神経細胞の異常により発症する疾患である。そこで、ALS 治療・発症遅延・病態進行遅延ベクターとして、運動神経細胞に向性を持つポリオウイルス (PV) に着目した。

これまで、神経細胞は PV の 1 回感染に対し抵抗性を示すこと、細胞変性効果の中心的役割を持つ PV 特異的蛋白質 2A プロテアーゼの単独発現にも抵抗性を示すことなどを明らかにしてきた。

そこで、1 回感染のみで終わる PV 欠損株を用い、外来 mRNA として HGF mRNA をゲノム欠損部位 (ウイルスキャプシド蛋白質領域) に挿入することとした。

ただし、分泌蛋白質は PV ベクターでは発現しないという報告があったことから、外来 mRNA は PV ゲノム本体からは独立させ、別のシストロンで発現させることにした。すなわちジシストロニック RNA を構築し、これをゲノムとする PV ベクターを構築した。

今年度は、このような PV ベクターによる発現実験を細胞、およびモデル動物を用いて行った。

B. 研究方法

PV ゲノムのキャプシド蛋白質コーディング

領域を欠損させ、そこに HGF mRNA を挿入した。RNA 複製用蛋白質領域は EMCV の IRES で発現するように設計した。さらに、この RNA を、PV のキャプシド蛋白質を発現するプラスミドと共に細胞にトランスフェクションし、ウイルス粒子として回収した。このウイルス粒子をさらに同様な方法で増幅し、大量の発現 PV ベクター粒子を得た。

使用した細胞は HeLa 細胞である。HGF 発現 PV ベクター粒子を感染させた後、感染細胞を固定し、PV の 2C 蛋白質に対する抗体と HGF 抗体とで染色した。また、発現した HGF が正常にプロセスされているかを調べるためウエスタンブロット解析を行った。さらに HGF 活性を確認するため、発現した HGF による HGF 受容体のリン酸化が起こるかを調べた。

次にモデルマウスを使用して、脊髄内接種による HGF 発現を検討した。さらに、ロータロッドテストなどで ALS 発現に影響を与えるか否かを検討した。

(動物実験は東京大学の定める動物実験規定を遵守した)

C. 研究結果

構築した HGF 発現 PV ベクターは、感染細胞内で HGF を発現し、その HGF は分泌され細胞外でプロセスされていた。さらにこの HGF は HGF 受容体をリン酸化することが明らかと

なった。すなわち、活性のある HGF を発現するベクターであった。

モデルマウスの脊髄に接種した場合も、脊髄内で発現し、HGF が産生されることが明らかとなった。発現持続時間は、約 3 時間であった。ただし、ALS 発症を遅らせるなどの効果を観察できなかった。

D. 考察

HGF 発現 PV ベクターによる HGF 発現を検出することができた。しかし、ALS の治療、発症遅延効果、病態進行遅延効果については明らかでなく、今後の問題である。発現持続時間は短いなどの問題があるかもしれないと考えている。

E. 結論

HGF は、分泌型蛋白質であるが、これまでの報告と異なり、PV ベクターにより、活性のある蛋白質として分泌されることが明らかとなった。

動物実験でも HGF は発現することが明らかとなった。しかしながら、ALS 発症に対する効果を示すことが出来なかった。今後、投与方法などを検討する方針である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Comparative aspects on the role of polypyrimidine tract-binding protein in internal initiation of hepatitis C virus and picornavirus RNAs. *Comparat Immunol Microbiol Infect Dis.* 31:435-448, 2008.

Colorimetric detection of loop-mediated isothermal

amplification reaction by using hydroxy naphthol blue.

BioTechniques 46: in press

A major-peroxiredoxin-induced activation of Yap1 transcription factor is mediated by reduction-sensitive disulfide-bonds and reveals a low level of transcriptional activation.

J. Bio. Chem. 284, 2009 (on line)

2. 学会発表

The molecular basis of poliovirus neurovirulence.

The International Symposium Hamamatsu University School of Medicine COE Program Medical Photonics Virus Shed Light on Neuroscience, Feb. 9, Hamamatsu

ウイルスの病原性発現機構

第 82 回日本感染症学会総会 4 月 17-18 日、鳥根

Poliovirus receptor (hPVR/CD155) -dependent and-independent axonal retrograde transport of poliovirus in motor neurons.

Europic 2008, May 26-30, 2008, Barcelona, Spain

ダイシストロニック型分泌蛋白質発現ポリオウイルスベクターの開発

第 31 回日本分子生物学会年会 12 月 9-12 日、神戸

H. 知的所有権の取得状況 (予定も含む)

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

変異 TDP-43 による神経細胞死の機序について

研究協力者：水澤 英洋 東京医科歯科大学大学院 脳神経病態学・教授
共同研究者：山本 由紀、吉田 友教、横田 繁史、笹栗 弘貴、渡辺 あずさ、横田 隆徳
東京医科歯科大学大学院 脳神経病態学

研究要旨：近年、TDP-43 遺伝子変異による家族性 ALS の存在が明らかとなった。その変異 TDP-43 の gain of function に加え、loss of function も病態の原因となる可能性が推測されるため、神経系細胞培養において変異 TDP-43 による細胞死の影響を検討した。その結果、変異 TDP-43 の過剰発現によって caspase 依存性のアポトーシス形態の細胞死が誘導された。また内因性 TDP-43 の発現を抑制することで、同じように細胞死を誘導することが確認された。さらにその細胞死は野生型 TDP-43 を過剰発現することで回復されたが、変異 TDP-43 ではその回復機能が失われていた。以上の結果から、変異 TDP-43 による内因性 TDP-43 の loss of function が変異 TDP-43 毒性の機序に関与すると推測されたが、その結論にはさらなる実証が必要である。

A. 研究目的

TDP-43 は筋萎縮性側索硬化症（ALS）や前頭側頭葉変性症（FTLD-U）の神経細胞内のユビキチン陽性封入体の主要構成タンパクとして同定され、さらに近年変異 TDP-43 による家族性 ALS の存在が明らかになった。ALS 症例の剖検脳において TDP-43 による細胞質内封入体が存在する神経細胞では、核タンパクである TDP-43 の核内染色性が著明に低下しているとの報告から、変異 TDP-43 の gain of function に加え、loss of function もその病態の可能性として考えられる。

今回 ALS における TDP-43 タンパクと神経変性との関連を明らかにするために、神経系培養細胞において、変異 TDP-43 と神経細胞死の関係について検討した。

B. 研究方法

TDP-43 の野生型プラスミドは、pCMV-SPORT6-mouse TDP-43 variant3 及び、human TDP-43 発現ベクター(Invitrogen)を用いた。変異 TDP-43 は上述のプラスミドに、1 塩基置換を行い作製した。また、pEGFP-C2(clontech)の N 末端に野生型及び、変異 TDP-43 の cDNA を融合したプラスミドを作製した。Short hairpin

RNA(shRNA)はマウス TDP-43 に対する shRNA を設計し、pUC19 ベクターの human U6 promoter の下流に挿入した。shRNA は 5 種類作製し、その中でノックダウン効率の高かった shRNA 1 (5'-GAGAAGGTTTG

ATTATTAATTCAGAGATTTAATGATCAAA TCCTCTCTTTT-3')

及び shRNA 2 (5'-GATTGATGGAAGGAGTTCTGTTCAGAG ACAGAATTCCTTCCACCAGTCTTTT-3')を使用した。コントロール shRNA として、G93A の SOD1 に対する shRNA を使用した。

細胞死判定法は神経系培養細胞であるマウス神経芽細胞腫細胞(Neuro2a)および、ヒト神経芽細胞腫細胞(SH-SY5Y)において行った。細胞を 24 ウェルプレートに播き、1 ウェルにつき 500 ng のプラスミドをリポフェクション法でトランスフェクションし 48 時間で細胞死の判定を行った。

判定方法として、断片化した核を染めるヘキスト染色法と培養上清中の LDH 活性を測定する方法を用いた。さらに、アポトーシスの一つの指標となる caspase の関与を調べるためトランスフェクション後の細胞に 100 μ M の caspase inhibitor I (z-VAD-fmk)を添加し、アポトーシスの抑制を観察した。

(倫理面への配慮)

すべての DNA 組換え実験は東京医科歯科大学遺伝子組換え倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

本研究では、近年発見された TDP-43 のミスセンス変異である A315T、Q331K 2 つの変異 TDP-43 を用いた。まず、Neuro-2a において野生型、変異 TDP-43 を過剰発現させ TDP-43 タンパクの増加を調べた。その結果、野生型、変異型が同レベルで発現していることが観察された。次に変異 TDP-43 を過剰発現させた条件下において、Neuro2a への細胞毒性を調べた。その結果、変異 TDP-43 を発現させた細胞に形態異常が確認された (図 1-A)。ヘキスト染色と LDH assay を用いて解析した結果、コントロールに比べ変異 TDP-43 を過剰発現している細胞は有意にアポトーシス率と LDH 活性が増加していることが明らかになった。その死細胞は核の断片化が見られアポトーシスの形態が観察された (図 1-B-D)。その細胞死が caspase 依存性であるか検証するために caspase inhibitor (z-VAD-fmk) を用いてアポトーシス抑制法を試みた。その結果、caspase を阻害することで有意に細胞死を抑制することが確認できた (図 1-E と F)。

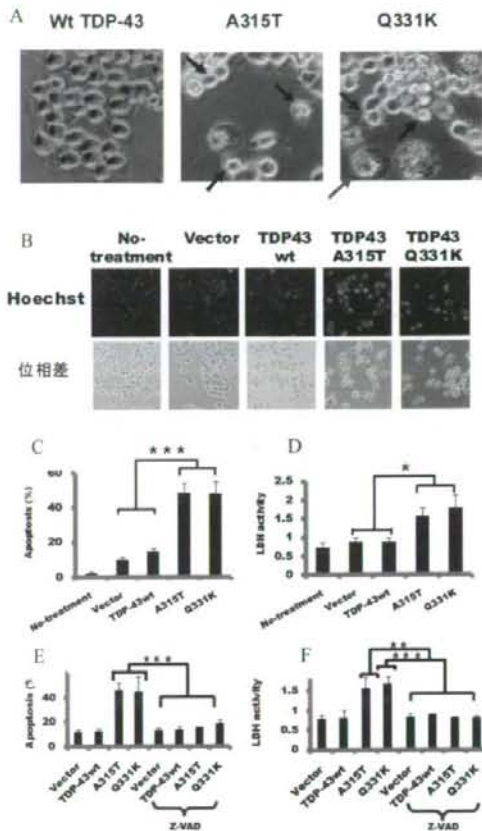


図1. Neuro2a細胞における変異TDP-43による神経細胞死の誘導 (A)変異TDP-43をトランスフェクションした細胞の萎縮が観察された(黒矢印)。少数の細胞に膨化がみられた(赤矢印)。(BとC)ヘキスト染色による細胞死判定。変異TDP-43に核の断片化がみられる。(D)LDH活性測定でも変異TDP-43による細胞死がみられた。(EからG)caspase inhibitor (z-VAD-fmk)添加による細胞死の抑制はヘキスト染色、FはLDH活性測定。*** $P < 0.001$ 、** $P < 0.01$ 、* $P < 0.05$ 。

以上の結果と、ALS 症例の剖検脳の神経細胞において細胞質に TDP-43 の封入体が存在する細胞では、核内 TDP-43 の染色性が低下していることから、変異 TDP-43 の存在により核内の TDP-43 量が低下していることが推測された。

そのため、内因性 TDP-43 の発現抑制が神経系細胞に与える影響を細胞死判定法で評価した。shRNA により Neuro-2a の内因性 TDP-43 の発現が抑制されたことを確認した後 (図 2-A)、細胞死判定法を行った結果、shRNA により TDP-43 を発現抑制された細胞はコントロール shRNA と比較して有意にアポトーシス率 (図 2-B と C)

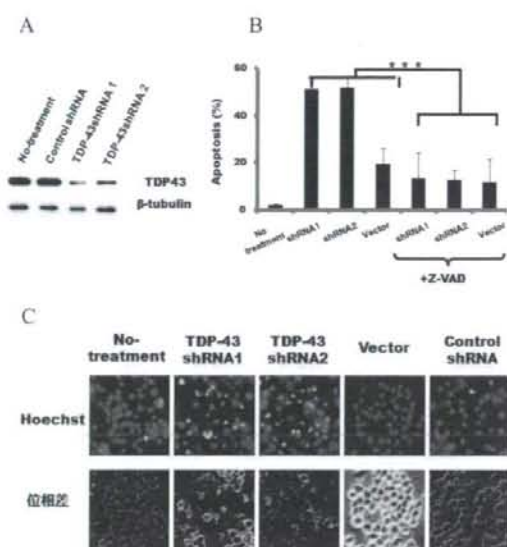


図2. Neuro2a細胞におけるTDP-43 shRNAによる神経細胞死誘導。(A)ウエスタンブロット法によるトランスフェクション後48時間におけるTDP-43shRNA1, 2による内因性TDP-43の発現の抑制。(BとC)ヘキスト染色での細胞死の判定。Z-VAD添加により細胞死を抑制している(B)。***P<0.001。

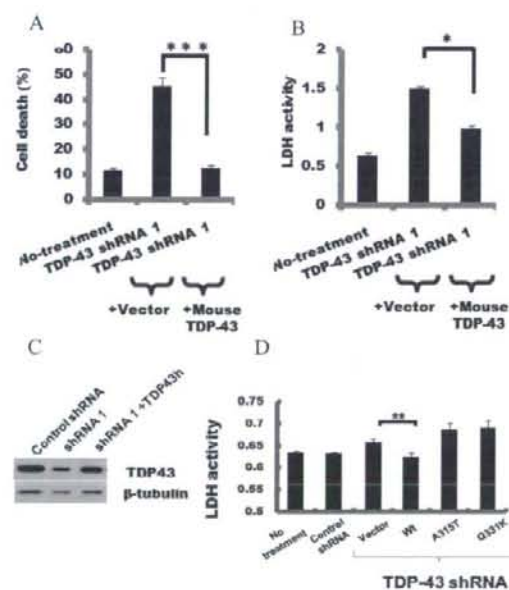


図3.野生型TDP-43における神経細胞死の回復(AとB)shRNAによる発現抑制で誘導した細胞死を野生型TDP-43で回復。Aはヘキスト染色、BはLDH活性測定。(C)野生型TDP-43の過剰発現はTDP-43 shRNAによる内因性TDP-43の発現低下を回復させる。(D)変異型TDP-43はTDP-43発現抑制による細胞死を回復できなかった。*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001。

とLDH活性が増加していることが明らかとなった。加えて、変異TDP-43による細胞死と同じように、caspase依存性のアポトーシスであることが確認された(図2-B)。

また、shRNAによる発現抑制で誘導された細胞死が野生型TDP-43を共発現することで回復することができたが(図3-A,B)、変異TDP-43ではその効果が失われていた(図3-D)。さらに変異TDP-43で誘導された細胞死は、野生型TDP-43を共発現することによって軽減した(図4)。

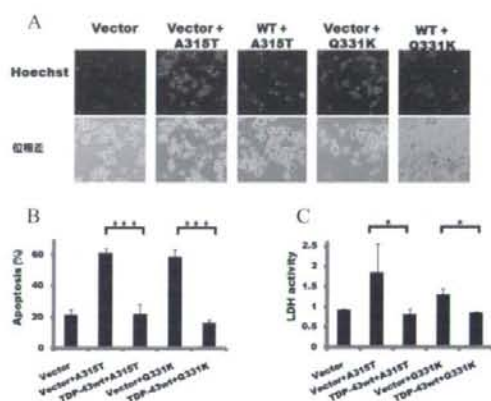


図4.野生型TDP-43における変異TDP-43による神経細胞死の回復(AからC)Neuro-2aに変異TDP-43と野生型TDP-43もしくはpCMVSPORT6ベクターを共発現し、ヘキスト染色(AとB)、LDH assay(B)を行った。*P<0.05, **P<0.001。

D. 考察

ALSにおけるTDP-43のメカニズムは、核内のTDP-43機能低下あるいはTDP-43毒性負荷の可能性が示唆されている。今回の結果では、変異TDP-43での細胞死誘導が確認され、加えてTDP-43の発現抑制によっても細胞死を誘導することが確認された。その細胞死が野生型TDP-43を補うことで回復され、変異TDP-43ではその機能が失われていた。さらに、ALS症例の剖検脳においてTDP-43封入体が存在する細胞の核内TDP-43の染色性が低下していることから、神経系培養細胞の細胞死は核内TDP-43

の loss of function である可能性が推測された。

現在、変異 TDP-43 過剰発現時の核内内因性 TDP-43 発現量の検討を行っている。

E. 結論

神経系培養細胞において、変異 TDP-43 の過剰発現で細胞死が誘導され、その形態はアポトーシスを示し、caspase 依存性であった。また、内因性 TDP-43 の発現抑制によっても細胞死が誘導され、野生型 TDP-43 の共発現によって細胞死が軽減したが、変異 TDP-43 ではその効果は失われていた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

久保寺隆行、横田隆徳、水澤英洋：ALS の遺伝子治療. Clin Neurosci 26:337-339,2008

2. 学会発表

山本由紀ら：TDP43 タンパクの shRNA 導入における神経細胞死への影響. 第 49 回日本神経学会総会、横浜

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

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
Katsuno M, Adachi H, <u>Sobue G</u>	The case for cholesterol.	Nature Medicine		in press	2009
Banno H, Katsuno M, Suzuki K, Takeuchi Y, Kawashima M, Suga N, Takaomori M, Ito M, Nakamura T, Matsuo K, Yamada S, Oki Y, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Atsuta N, Watanabe H, Fujimoto Y, Nakashima T, Tanaka F, Doyu M, <u>Sobue G</u>	Phase 2 trial of leuprorelin in patients with spinal and bulbar muscular atrophy.	Ann Neurol		in press	2009
Senda J, Ito M, Watanabe H, Atsuta N, Kawai Y, Katsuno M, Tanaka F, Naganawa S, Fukatsu H, <u>Sobue G</u>	Correlation between pyramidal tract degeneration and widespread white matter involvement in amyotrophic lateral sclerosis: A study with tractography and diffusion-tensor imaging.	Amyotroph Lateral Scler		in press	2009
Atsuta N, Watanabe H, Ito M, Tanaka F, Tamakoshi A, Nakano I, Aoki M, Tsuji S, Yuasa T, Takano H, Hayashi H, Kuzuhara S, <u>Sobue G</u>	Age at onset influences on wide-ranged clinical features of sporadic amyotrophic lateral sclerosis.	J Neurol Sci.	276	163-169	2009
Tokui K, Adachi H, Waza M, Katsuno M, Minamiyama M, Doi H, Tanaka K, Hamazaki J, Murata S, Tanaka F, <u>Sobue G</u>	17-DMAG ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron degeneration through well-preserved proteasome function in an SBMA model mouse.	Hum Mol Genet	18	898-910	2008
Okada Y, Matsumoto A, Shimazaki T, Enoki R, Koizumi A, Ishii S, Itoyama Y, <u>Sobue G</u> , Okano H	Spatio-Temporal Recapitulation of Central Nervous System Development By Murine ES Cell-Derived Neural Stem/Progenitor Cells.	Stem Cells	26	3086-3098	2008
Takeuchi Y, Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Kawashima M, Atsuta N, Ito M, Watanabe H, Tanaka F, <u>Sobue G</u>	Walking capacity evaluated by the 6-minute walk test in spinal and bulbar muscular atrophy.	Muscle Nerve	38	964-971	2008
Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Takeuchi Y, Kawashima M, Tanaka F, Adachi H, <u>Sobue G</u>	Molecular genetics and biomarkers of polyglutamine diseases.	Curr Mol Med	8	221-234	2008
Suzuiki K, Katsuno M, Banno H, Takeuchi Y, Atsuta N, Ito M, Watanabe H, Yamashita H, Hori N, Nakamura T, Hirayama M, Fumiaki T, <u>Sobue G</u>	CAG repeat size correlates to electrophysiological motor and sensory phenotypes in SBMA.	Brain	131	229-239	2008
Yamamoto M, Tanaka F, Tatsumi H, <u>Sobue G</u>	A strategy for developing effective amyotrophic lateral sclerosis pharmacotherapy: from clinical trials to novel pharmacotherapeutic strategies.	Expert Opin Pharmacother	9	1845-1857	2008

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
Mizuno H, Warita H, Aoki M, <u>Itoyama Y</u>	Accumulation of chondroitin sulfate proteoglycans in the microenvironment of spinal motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis transgenic rats	J Neurosci Res	86	2512-2523	2008
Tanaka K, Okada Y, Kanno T, Otomo A, Yanagisawa Y, Shouguchi-Miyata J, Suga E, Kohiki E, Onoe K, Osuga H, Aoki M, Hadano S, <u>Itoyama Y</u> , Ikeda JE	A dopamine receptor antagonist L-745,870 suppresses microglia activation in spinal cord and mitigates the progression in ALS model mice	Exp Neurol	211	378-386	2008
Dagvajantsan B, Aoki M, Warita H, Suzuki N, <u>Itoyama Y</u>	Up-regulation of insulin-like growth factor-II receptor in reactive astrocytes in the spinal cord of amyotrophic lateral sclerosis transgenic rats	Tohoku J Exp Med	214	303-310	2008
Takahashi Y, Seki N, Ishiura H, Mitsui J, Matsukawa T, Kishino A, Onodera O, Aoki M, Shimozawa N, Murayama S, <u>Itoyama Y</u> , Suzuki Y, Sobue G, Nishizawa M, Goto J, Tsuji S	Development of a high-throughput microarray-based resequencing system for neurological disorders and its application to molecular genetics of amyotrophic lateral sclerosis	Arch Neurol	65	1326-1332	2008

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
Ogawa D, Okada Y, Nakamura M, Kanemura Y, Okano HJ, Matsuzaki Y, Shimazaki T, Ito M, Ikeda E, Tamiya T, Nagao S, <u>Okano H</u>	Evaluation of human fetal neural stem/progenitor cells as a source for cell replacement therapy for neurological disorders: properties and tumorigenicity after long-term in vitro maintenance.	J. Neurosci. Res. Oct 28. [Epub ahead of print] In Press		in press	2009
Naka H., Nakamura S., Shimazaki T., <u>Okano H</u>	Requirement for COUP-TFI and II in the temporal specification of neural stem cells in central nervous system development.	Nature Neurosci.	11	1014-1023	2008
Okada Y., Matsumoto A., Shimazaki T., Enoki R., Koizumi A., Ishii S., Itoyama Y., Sobue G., <u>Okano H</u>	Spatio-temporal recapitulation of central nervous system development by ES cell-derived neural stem/progenitor cells.	Stem Cells	26	3086-3098	2008
Nagoshi N., Shibata S., Kubota Y., Nakamura M., Nagai Y., Satoh E., Okada Y., Mabuchi Y., Katoh H., Okada S., Fukuda K., Suda T., Matsuzaki Y., Toyama Y., <u>Okano H</u>	Ontogeny and Multipotency of Neural Crest-Derived Stem Cells in Mouse Bone Marrow, Dorsal Root Ganglia and Whisker Pad.	Cell Stem Cell	2	392-403	2008

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
Pan W, Soma R, <u>Kwak S</u> , Yamamoto Y	Improvement of motor functions by noisy vestibular stimulation in central neuro-degenerative disorders.	J Neurol DOI 10.1007/s00415-008-0950-3		in press	

Iwata NK, Aoki S, Okabe S, Arai N, Terao Y, Kwak S, Abe O, Kanazawa I, Tsuji S, Ugawa Y	Evaluation of corticospinal tracts in ALS with diffusion tensor MRI and brainstem stimulation.	Neurology	70	528-532	2008
Nishimoto Y, Yamashita T, Hideyama T, Tsuji S, Suzuki N, Kwak S	Determination of editors of mRNAs with site-selective A-to-I editing positions.	Neurosci Res	61	201-206	2008
Ishiura H, Morikawa M, Hamada M, Watanabe T, Kako S, Chiba S, Motokura T, Hangaishi A, Shibahara J, Akahane M, Goto J, Kwak S, Kurokawa M, Tsuji S	Lymphomatoid Granulomatosis Involving Central Nervous System Successfully Treated with Rituximab Alone.	Arch Neurol	65	662-665	2008
Massie A, Cnops L, Smolders I, McCullumsmith R, Kwak S, Arckens L, Michotte Y	High-affinity Na ⁺ /K ⁺ -dependent glutamate transporter EAAT4 is expressed throughout the rat fore- and midbrain.	J comp Neurol	511	155-172	2008
Buckingham SD, Kwak S, Jones AK, Blackshaw SE, Sattelle DB	Edited GluR2, a gatekeeper for motor neuron survival?	BioEssays	30	1185-1192	2008
Kwak S, Nishimoto Y, Yamashita T	Newly identified ADAR2-mediated editing positions as a useful tool for ALS research.	RNA Biology	5	193-197	2008
Kwak S, Hideyama T, Yamashita T	AMPA receptor-mediated neuronal death in motor neuron diseases.	Amino Acid Receptor Research	Nova Science Publishers Inc	293-310	2008

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, Takahashi R, Misawa H, Cleveland D W	Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis.	Nature Neurosci	11	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/cdc37 chaperones is rapidly degraded in a proteasome-dependant manner.	Neurosci Res	61	43-48	2008
Ogawa, M., Mizuguchi, K., Ishiguro, A., Koyabu, Y., Imai, Y., Takahashi, R., Mikoshina, K. and Aruga, J.	Rines/RNF180, a novel RING finger gene-encoded product, is a membrane-bound ubiquitin ligase.	Gene Cells	13	397-409	2008
Imai, Y., Gehrke, S., Wang, H.Q., 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	2432-2443	2008
Wang, H.Q., Imai, Y., Inoue, H., Kataoka, A., Iita, S., Nukina, N. and Takahashi, R.	Parkin transgenic mice crossed with parkin deficient mice displayed progressive and selective catecholaminergic neuronal loss.	J. Neurochem.	107	171-185	2008
Fujiwara, M., Marusawa, H., Wang, H.Q., Iwai, A., Ikeuchi, K., Imai, Y., Kataoka, A., Nukina, N., Takahashi, R. and Chiba, T.	Parkin as a tumor suppressor gene for hepatocellular carcinoma.	Oncogene	27	6002-6011	2008

Kawamoto, Y., Kobayashi, Y., Suzuki, Y., Inoue, H., Tomimoto, H., Akiguchi, I., Budka, H., Martins, L.M., Downward, J, and Takahashi, R.	Accumulation of HtrA2/Omi in neuronal and glial inclusions in brains with alpha-synucleinopathies.	J. Neuropathol Exp Neurol.	67	984-993	2008
Inoue, H., Kondo, T., Lin, L., Mi, S., Isacson, O. and <u>Takahashi, R.</u>	Protein Misfolding and Axonal Protection in Neurodegenerative Disease	Protein Folding and Misfolding: Neurodegenerative Diseases	27	97-109	2008

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
Tokui, K., Adachi, H., Waza, M., Katsuno, M., Minamiyam. M., Doi, H., Dantumac, N. P., Hamazaki, J., <u>Tanaka, K.</u> , 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 Gent		in press	2009
Kimura, Y., Yashiroda, H., Kudo, T., Koitabashi, S., Murata, S., Kakizuka, A., and <u>Tanaka, K.</u>	An inhibitor of deubiquitinating enzyme regulates ubiquitin homeostasis.	Cell		in press	2009
<u>Tanaka, K.</u>	The proteasome: Overview of Structure and Functions.	Proc. Jpn. Acad. Ser B Phys Biol Sci.	85	12-36	2009
Matsuda, N. <u>Tanaka, K.</u>	Does impairment of ubiquitin-proteasome system predispose to neurodegenerative disorders?	J Alz D		in press	2009
Yue, Z., Friedman, L., Komatsu, M., <u>Tanaka, K.</u>	The cellular pathways of neuronal autophagy and their implication in neurodegenerative diseases.	Biochem Biophys Acta – Mol Cell Res.		in press	2009
Koike, M., Shibata, M., Tadakoshi, M., Gotoh, K., Komatsu, M., Waguri, S., Kawahara, N., Kuida, K., Nagata, S., Kominami, E., <u>Tanaka, K.</u> , Uchiyama, Y.	Inhibition of Autophagy Prevents Hippocampal Pyramidal Neuron Death after Hypoxic-Ischemic Injury.	Am. J. Pathol.	172	454-469	2008
Ichimura Y, Kumanoimidou T, Sou YS, Mizushima T, Ezaki J, Ueno T, Kominami E, Yamane T, <u>Tanaka K.</u> , Komatsu M.	Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy.	J Biol Chem.	283	22847-22857	2008
Sou, Y., Waguri, S., Iwata, J., Ueno, T., Fujimura, T., Hara, T., Sawada, N., Yamada, A., Mizushima, N., Uchiyama, Y., Kominami, E. <u>Tanaka, K.</u> , Komatsu, M.	The Atg8 conjugation system is indispensable for proper development of autophagic isolation membranes in mice.	Mol Biol Cell	19	4762-4775	2008
Ichimura, Y., Kominami, E., <u>Tanaka, K.</u> , Komatsu, M.	Selective turnover of p62/a170/Sqstm1 by autophagy.	Autophagy	4	1063-1066	2008

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
Ouyang Y, Segers K, Bouquiaux O, Wang FC, Janin N, Andris C, Shimazaki H, Sakoe K, Nakano I, Takiyama Y.	Novel SACS mutation in a Belgian family with saccin-related ataxia.	J. Neurol. Sci.	264:	73-76	2008
Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, Kametani F, Yoshida M, Hashizume Y, Beach T.G, Buratti E, Baralle F, Morita M, Nakano I, Oda T, Tsuchiya K, Akiyama H.	Phosphorylated TDP-43 in fronto temporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis.	Ann Neurol	64	60-70	2008
Shimazaki H, Morita M, Nakano I.	Inverse ocular bobbing in a patient with encephalitis associated with antibodies to the N-methyl-D-aspartate receptor.	Arch Neurol.	65	1251	2008
Yokota O, Tsuchiya K, Terada S, Ishizu H, Uchikado H, Ikeda M, Oyanagi K, Nakano I, 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
Shimazaki H, Vazifehmand R, Heidari M.H, Khorram-Khorshid H.R, Saber S, Hejazi S, Aghakhani-Moghadam F, Ouyang Y, Honda J, Nakano I, Takiyama Y.	A large family with spinocerebellar ataxia type 6 in Iran: A Clinical and Genetic study.	Archives of Iranian Medicine	11	459-462	2008

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
Tanaka S, Miyata T, Fujita T, Kawahara E, Tachino K, Funakoshi H, Nakamura T	Differing responses of satellite cell activity to exercise training in rat skeletal muscle.	J. Phys. Ther. Sci.		in press	2009
Kanai M, Nakamura T, Funakoshi H	Identification and characterization of novel variants of the tryptophan 2,3-dioxygenase gene: differential regulation in the mouse nervous system during development.	Neurosci Res.	85	in press	2009
Suzuki Y, Funakoshi H, 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	2008
Akita H, Takagi N, Ishihara N, Takagi K, Murotomi K, Funakoshi H, 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 neurons.	Exp Neurol.	210 (1)	83-94	2008
Takeo S, Takagi N, Takagi K, Date I, Ishida K, Bessho S, Nakamura T, Tanonaka K.	Hepatocyte growth factor suppresses ischemic cerebral edema in rats with microsphere embolism.	Neurosci Lett.	448	125-129	2008

漆谷 真 (滋賀医科大学分子神経科学研究センター)

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻/号	ページ	出版年
漆谷 真	ALSモデルマウスの免疫療法と今後の展望	Brain and Nerve	60	643-651	2008
Gros-Louis F, Kriz J, Kabashi E, McDearmid J, Millicamps S, <u>Urushitani M</u> , Lin L, Dion P, Zhu Q, Drapeau P, Julien J-P, Rouleau GA	Als2 mRNA splicing variants detected in KO mice rescue severe motor dysfunction phenotype in Als2 knock down zebrafish	Hum Mol Genet	17	2691-2702	2008
<u>Urushitani M</u> , Abou Ezzi S, Matsuo A, Tooyama I, Julien JP	The endoplasmic reticulum-Golgi pathway is a major target for translocation and aggregation of mutant superoxide dismutase linked to ALS.	FASEB J	22	2476-2487	2008

長谷川 成人 (東京都精神医学研究所)

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻/号	ページ	出版年
Yonetani M, Nonaka T, Masuda M, Inukai Y, Oikawa T, Hisanaga S, <u>Hasegawa M</u> .	Conversion of wild-type a-synuclein into mutant-type fibrils and its propagation in the presence of A30P mutant.	J Biol Chem		in press	2009
Masuda M, <u>Hasegawa M</u> , Nonaka T, Oikawa T, Yonetani M, Yamaguchi Y, Kato K, Hisanaga S, Goedert M.	Inhibition of a-synuclein fibril assembly by small molecules: analysis using epitope-specific antibodies.	FEBS Lett		in press	2009
Nonaka T, Arai T, Buratti E, Baralle FE, Akiyama H, <u>Hasegawa M</u> .	Phosphorylated and ubiquitinated TDP-43 pathological inclusions in ALS and FTL-DU are recapitulated in SH-SY5Y cells.	FEBS Lett	583	394-400	2009
Arai T Mackenzie IR, <u>Hasegawa M</u> , Nonaka T, Niizato K, Tsuchiya K, Iritani S, Onaya M, Akiyama H,	Phosphorylated TDP-43 in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies	Acta Neuropathol.	117	125-136	2009
Fujishiro H, Uchikado H, Arai T, <u>Hasegawa M</u> , Akiyama H, Yokota O, Tsuchiya K, Togo T, Iseki E.	Accumulation of phosphorylated TDP-43 in brains of patients with argyrophilic grain disease.	Acta Neuropathol.	117	151-158	2008
Schwab C, Arai T, <u>Hasegawa M</u> , Yu S McGeer PL,	Colocalization of TDP-43 and Huntingtin in inclusions of Huntington's disease	J Neuropathol Exp Neurol	67	1159-1165	2008
Inukai Y, Nonaka T, Arai T, Yoshida M, Hashizume Y, Beach TG, Buratti E, Baralle FE, Akiyama H, Hisanaga S, <u>Hasegawa M</u> .	Abnormal phosphorylation of Ser409/410 of TDP-43 in FTL-DU and ALS.	FEBS Lett	582	2899-2904	2008
<u>Hasegawa M</u> , Arai T, Nonaka T, Kametani F, Yoshida M, Hashizume Y, Beach TG, Buratti E, Baralle F, Morita M, Nakano I, Oda T, Tsuchiya K, Akiyama H,	Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis.	Ann Neurol	64	60-70	2008

山中 宏二 (理化学研究所脳科学総合研究センター)

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻/号	ページ	出版年
Cleveland DW, <u>Yamanaka K</u> , Bomont P.	Gigaxonin controls vimentin organization through tubulin chaperone-independent pathway.	Hum Mol Genet			in press
Ilieva H, <u>Yamanaka K</u> , Malkmus S, Kakinohana O, Yaksh T, Marsala M, Cleveland DW.	Mutant dynein (Loa) triggers proprioceptive axon loss that extends survival only in the SOD1 ALS model with highest motor neuron death.	Proc Natl Acad Sci USA	105	12599-12604	2008
Furukawa Y, Kaneko K, <u>Yamanaka K</u> , O'Halloran, TV, Nukina N.	Complete loss of post-translational modifications triggers fibrillar aggregation of SOD1 in familial form of ALS.	J Biol Chem	283	24167-24176	2008
<u>Yamanaka K</u> , Boillee S, Roberts EA, Garcia ML, McAlonis-Downes M, Miske OR, Cleveland DW, Goldstein LSB.	Mutant SOD1 in cell types other than motor neurons and oligodendrocytes accelerates onset of disease in ALS mice.	Proc Natl Acad Sci USA	105	7594-7599	2008

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
Ohta Y, Kamiya T, Nagai M, Nagata T, Morimoto N, Miyazaki K, Murakami T, Kurata T, Takehisa Y, Ikeda Y, Asoh S, Ohta S, <u>Abe K</u>	Therapeutic benefits of intrathecal protein therapy in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.	Journal of Neuroscience Research	86	3028-3037	2008

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
Sumi H, <u>Kato S</u> , Mochimaru Y, Fujimura H, Etoh M, Sakoda S	Nuclear TAR DNA binding protein 43 Expression in spinal cord neurons correlates with the clinical course in amyotrophic lateral sclerosis.	J Neuropathol Exp Neurol	68 (1)	37-47	2009
<u>加藤信介</u>	ALS1の神経病理と発症機序	Clinical Neurosci	26(3)	319-322	2008

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
川並透, <u>加藤丈夫</u>	ALSの診断基準とその問題点.	Clin Neurosci	26(3)	280-282	2008

佐々木 秀直 (北海道大学神経内科)

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻/号	ページ	出版年
Tsuji-Akimoto S, Yabe I, Niino M, Kikuchi S, <u>Sasaki H</u>	Cystatin C in cerebrospinal fluid as a biomarker of ALS.	Neuroscience Letters	452	52-55	2009

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
Sumi H, Kato S, Mochimaru Y, Fujimura H, Etoh M, <u>Sakoda S</u>	Nuclear TAR DNA binding protein 43 expression in spinal cord neurons correlates with the clinical course in amyotrophic lateral sclerosis.	J Neuropathol Exp Neurol	68	37-47	2009

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
Kotani N, Gu J, Isaji T, Udaka K, <u>Taniguchi N</u> , Honke K.	Biochemical visualization of cell surface molecular clustering in living cells.	Proc Natl Acad Sci USA	99(7)	7405-7409	2008
Park YS, <u>Taniguchi N</u> .	Acrolein induces inflammatory response underlying endothelial dysfunction: a risk factor for atherosclerosis.	Ann NY Acad Sci	1126	185-189	2008

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
Goto M, Honda E, Ogura A, <u>Nomoto A</u> , Hanaki K	Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue.	Bio Techniques	46		in press
Tachibana T, Okazaki S, Murayama A, Naganuma A, <u>Nomoto A</u> , Kuge S	A major-peroxiredoxin-induced activation of Yap1 transcription factor is mediated by reduction-sensitive disulfide-bonds and reveals a low level of transcriptional activation.	J. Bio. Chem.	284		2009 (on line)
Nishimura T, Saito M, Takano T, <u>Nomoto A</u> , Kohara M, Tsukiyama-Kohara K	Comparative aspects on the role of polypyrimidine tract-binding protein in internal initiation of hepatitis C virus and picornavirus RNAs.	Comparat Immunol Microbiol Infect Dis.	31	435-448	2008

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
久保寺 隆行、横田 隆徳、水澤 英洋	ALSの遺伝子治療	Clinical Neuroscience 別冊 (中外医学社)	26	337-339	2008

V. ワークショップ・班会議プログラム

平成20年度「筋萎縮性側索硬化症の病態に基づく画期的治療法の開発」

ワークショップ プログラム
筋萎縮性側索硬化症研究の進歩
TDP-43をめぐって

■日程■

平成20年 **9月25日** (木)
13:00 ~ 16:30

■会場■

日本都市センター6F 601
東京都千代田区平河町2-4-1 TEL 03-3265-5211

研究代表者 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学
TEL 052-744-2386 FAX 052-744-2393
E-mail:brain@med.nagoya-u.ac.jp

13:00~13:10 挨拶

13:10~13:35 座長：郭 伸（東京大学神経内科）

1. TDP-43オーバービュー

長谷川成人（東京都精神医学総合研究所）

筋萎縮性側索硬化症（ALS）の分子病態は長い間不明であったが、変性する運動神経に出現するユビキチン陽性構造物の主要構成蛋白質としてTDP-43が同定されたことをきっかけに、新しい展開をみせている。今春、家族性及び孤発性ALSの患者さんにTDP-43遺伝子の変異が発見され、TDP-43の異常が多くのALSの発症に深く関与している可能性が強まった。今後、TDP-43の異常を中心とした病態解明、さらにはTDP-43を標的とした治療法の開発が望まれる。

13:35~14:50 座長：中野 今治（自治医科大学神経内科）

2. TDP-43凝集体：「ALSおよびそれ以外の神経変性疾患について」

孤発性ALS（SALS）、認知症を伴うALS（ALS-D）、
前頭側頭葉変性症（FTLD-U）におけるTDP-43凝集体

吉田 眞理（愛知医科大学加齢医科学研究所）

SALS、ALS-D、FTLD-Uではタウやシヌクレインに陰性、ユビキチンにのみ陽性を示す封入体（UI）が病理学的指標であったが、2006年Araiら、NeumannらによってUIが核蛋白であるTAR-DNA-binding protein 43（TDP-43）で構成されていることが同定された。SALSやALS-Dの下位運動ニューロンのskein-like inclusion, hyaline inclusion、ALS-DやFTLD-Uの前頭側頭葉皮質や海馬歯状回顆粒細胞の胞体内封入体（NCI）、変性神経突起（DN）、核内封入体（NII）はTDP-43陽性を示す。ALS-Dでは前頭側頭葉皮質にNCI優位の凝集体を形成し少数例ではDNを示す。FTLD-Uは主としてDNを形成する例や、NIIを示す例が存在する。SALS、ALS-D、FTLD-UはTDP-43蛋白の変性を共通基盤とする疾患のスペクトラムと考えられ、臨床病理像と封入体の形態や分布、形成機序との関連性が示唆されている。

孤発性および家族性 ALS における TDP-43 病理学

高橋 均（新潟大学脳研究所 病理学分野）

ALSは、神経難病の代表的疾患であり、その多くは孤発性である。その病因に直結するはずの細胞病理とされてきた所見は、侵された下位運動ニューロン胞体内における特徴的な封入体（プニナ小体およびユビキチン陽性封入体）の出現である。最近、この孤発性ALSで認められるユビキチン陽性封入体の構成タンパクがTDP-43と同定された。今回、孤発性および家族性ALSにおいて、これまで明らかにされてきたTDP-43の病理学を概説する。それは、ALSとはどのような疾患か？を超えて、改めて神経変性疾患とはどのような疾患か？を教えてくださいのような気がする。

ALSおよびそれ以外の神経変性疾患について

新井 哲明 (東京都精神医学総合研究所)

TDP-43は、ALSおよび前頭側頭葉変性症に出現するユビキチン陽性封入体の主要構成蛋白であり、これらの疾患はTDP-43 proteinopathyと総称されるようになった。患者脳に蓄積したTDP-43にはリン酸化や断片化などの翻訳後修飾がみられ、このようなTDP-43の異常が病態に関与すると予想される。TDP-43の蓄積は、tauopathyや α -synucleinopathyを含めた他の多くの神経変性疾患にも観察されている。神経変性疾患患者脳に蓄積したTDP-43の免疫組織化学的・生化学的性状について検討し、神経変性におけるTDP-43の意義について考察する。

14:50~14:55 休憩

14:55~15:45 座長：船越 洋 (大阪大学分子組織再生分野)

3. TDP-43変異を伴う家族性ALS

小野寺 理 (新潟大学脳研究所)

2006年Araiら、Neumannらのグループにより、ALSのユビキチン陽性のskein like inclusionの構成蛋白がTAR DNA binding protein-43 (TDP-43) であることが解明された。我々はSALSと同じ病理所見を示すFALSにおいてTDP-43の343番目のアミノ酸GlnがArgへと置換される変異を見いだした。この家系の発症年齢は、52-75歳であり、球麻痺を主体とし、発症後2-3年で呼吸不全を来たすが、四肢の症状が軽度であった。また認知症は認めなかった。病理では、残存する前角細胞にBunina小体、ubiquitin陽性TDP-43陽性のskein-like inclusionを認めた。TDP-43陽性inclusionは非運動系神経細胞やグリアなど広範囲に認めた。剖検脊髄で約25kDaの断片型TDP-43、さらに43kDaより高分子量のTDP-43を検出した。TDP-43変異を伴うFALSの発見は本症の発症機序にTDP-43が直接関与することを示唆する。

4. TDP-43による神経変性機序—動物モデルの作成に向けて

井口 洋平 (名古屋大学神経内科)

TDP-43はALSのユビキチン陽性封入体の主要構成蛋白として報告されているが、それが神経変性にどのように関わっているのかよく解っていない。ALSにおいて、封入体が存在する神経細胞では核に存在するはずのTDP-43が染色されないことからTDP-43のloss of functionの検討がgain of functionと同様に重要と考えられる。今回我々は、TDP-43のloss of functionを検討し、新しい知見を得たので報告する。