

2009 22010A

厚生労働科学研究費補助金

認知症対策総合研究事業

リン酸化タウの凝集阻害及び分解促進を標的とした新しい
アルツハイマー病の根本治療法に関する研究

平成 21 年度 総括研究報告書

主任研究者 武田 雅俊

平成 22 年 (2010 年) 3 月

目 次

I.総括研究報告書

- リン酸化タウの凝集阻害及び分解促進を標的とした新しい
アルツハイマー病の根本治療法に関する研究…………… 1
武田 雅俊

II.分担研究報告書

1. 低分子化合物とワクチン療法によるタウ蓄積制御の試み…………… 7
長谷川 成人
2. 顆粒状タウ凝集体を標的とする治療法に関する研究…………… 11
高島 明彦
3. プロテアソーム・トレランス現象とタウおよび TDP-43 代謝に関する研究…………… 15
工藤 喬
4. 培養細胞内におけるタウの分解過程に関する研究…………… 19
田中 稔久
5. タウ繊維凝集阻害物質の臨床治験を行うための臨床研究プロトコルの作成…………… 23
数井 裕光
6. シャペロン誘導剤のアルツハイマー病への応用に関する研究…………… 28
武田 雅俊

- III.研究成果の刊行に関する一覧表…………… 32

- IV.研究成果の刊行物・別刷…………… 36

厚生労働科学研究費補助金（認知症対策総合研究事業）
総括研究報告書

リン酸化タウの凝集阻害及び分解促進を標的とした新しいアルツハイマー病の
根本治療法に関する研究

主任研究者 武田雅俊 大阪大学大学院医学系研究科

研究要旨：本研究ではリン酸化タウ凝集阻害やその分解促進を行うことでシナプス消失、神経脱落を抑制し、アルツハイマー病(AD)の根本的治療法を確立する事を目的とする。凝集阻害の観点からは、タウオリゴマー、顆粒状タウ凝集体を見出し、その凝集阻害剤の検討とタウワクチンの検討を行った。分解促進の観点からは、プロテアソーム・トランス現象を見出し、プロテアソームの活性化を検討し、シャペロン誘導剤を発見し、その応用について検討した。また、タウオパチーに対する臨床治験に備え、診断プロトコールについて検討を開始した。

キーワード：タウ、神経原線維変化、オリゴマー、プロテアソーム、シャペロン、タウオパチー

分担研究者

高島明彦 独立行政法人理化学研究所・チームリーダー

長谷川成人 東京都精神医学研究所・プロジェクトリーダー

工藤 喬 大阪大学大学院医学系研究科・准教授

田中稔久 大阪大学大学院医学系研究科・講師

数井裕光 大阪大学大学院医学系研究科・講師

ウで構成される NFT 量に相関し、タウ変異による前頭側頭葉型認知症の報告やアミロイド発現マウスの神経細胞死がタウ発現抑制により消去できる報告は、タウの神経変性への直接関与を示唆している。タウはリン酸化、顆粒状凝集物、線維形成が行われ神経原線維変化(NFT)になるが、リン酸化タウはシナプス消失に、顆粒状凝集物は神経脱落に関与するとされる。従って、本研究ではリン酸化タウ凝集阻害やその分解促進を行うことでシナプス消失、神経脱落を抑制し、ADの根本的治療法を確立する事を目的とする。

A. 研究目的

アミロイドワクチンなどの「アミロイドカスケード仮説」に基づくADの治療薬の近年の臨床治験では厳しい結果が続いている。ADの重症度はタ

B. 研究方法

①タウオリゴマー、顆粒状タウ凝集体凝集阻害物質の探索

化合物マイクロアレイに結合しているタウを可視化しタウと結合活性を持つ化合物を得た。得られた化合物の凝集阻害活性をチオフラビン蛍光で測定した。

②低分子化合物とワクチン療法によるタウ蓄積制御

P301L変異タウを発現するトランスジェニックマウスにポリフェノール化合物、フェノチアジン化合物、ポルフィリン化合物を、32週齢まで経口投与し、解析した。また、2種類のリン酸化タウペプチドを34週まで計6回免疫して同様に解析した。

③プロテアソーム・トレランス現象のタウ分解促進への応用

低濃度のプロテアソーム阻害剤で前処理しておくとその後の高濃度の阻害剤に対して抵抗性を示す。このプロテアソーム・トレランス現象のタウやTDP-43の蓄積に対する効果を検討した。

④シャペロン誘導剤のタウ分解促進への応用

ERストレスに対するシャペロンBiPを誘導するコンパウンドを見出し、そのERストレスに対する効果を検証した。

⑤タウオパチーの臨床治験に特化した診断プロトコルの作成

新しい治療薬を開発した後に、その効果を確認するための臨床治験を行うため、アルツハイマー病及びその他のタウオパチーについての診断基準、評価項目、

評価方法について検討し、作成する。

C.研究結果

①タウオリゴマー、顆粒状タウ凝集体凝集阻害物質の探索

理研化合物バンク6600から化合物マイクロアレイを作製し、それらをリコンビナントヒトタウ溶液とインキュベート後、抗タウ抗体によって陽性の化合物を得た。その中から再現性が良く、SPRによって親和性の高い化合物約100種類が得られた。

リバスチグミンをP301L変異タウを安定に発現するN2a細胞株に投与しSDS不溶性タウの形成阻害効果を検討した所、10 μ MでSDS不溶性タウ形成阻害が観察された。

②低分子化合物とワクチン療法によるタウ蓄積制御

薬剤投与終了後に屠殺し、マウスから脊髄を取り出し、その不溶性画分を調製し、タウのリン酸化部位を認識する抗体(pS396抗体)でウエスタンブロット解析した。低分子化合物1% exifone 投与群で約50%程度、0.1% lacmoid で約75%程度のリン酸化タウ蓄積量の減少を認めた。

免疫に使用したリン酸化ペプチドは、報告のあったpS396とpS404がリン酸化されたペプチド p379-408 RENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSRHLと、AD脳に蓄積するタウの異常リン酸化部位で最もC末端側に位置するSer422のリン酸化ペプチド p413-431 STGSIDMVDSPLATLADEを用いた。いずれの抗原を投与したマ

ウスにおいても、免疫したペプチドに対する抗体価の上昇が観察され、用いたリン酸化ペプチドが抗原性を有しており、抗体産生に有効であることが確認された。ワクチンによる治療効果を調べるため、抗原投与群と非投与群について6ヶ月齢から8ヶ月齢までの間、一ヶ月ごとにロタロッド試験を行い運動機能の低下を観察した。その結果、非投与群では2ヶ月の間に約35%程度、徐々に低下したのに対し、p379-408 ワクチン投与群では約20%程度の低下、p413-431 ワクチン投与群では約5%程度の低下にとどまった。

③プロテアソーム・トレランス現象のタウ分解促進への応用

低濃度阻害剤処理後、高濃度の Epoxomicin や Lactacystin を投与し、24時間後の培地中のLDHを測定したところ、前処理をした群は、処理なし群に比して有意にLDHが低値を示し、高い生存性を示し、プロテアソーム・トレランスが獲得されていた。

また、プロテアソーム・トレランスを獲得した HEK293 細胞では、遺伝子導入されたタウおよびTDP-43のタンパク量が、トレランスのない細胞に比べて低下していることが観察された。

④シャペロン誘導剤のタウ分解促進への応用

BIX を神経芽細胞腫 SK-N-SH に投与すると BIX の濃度依存的に BiP を選択的に誘導することが示された。

BIX の ER ストレス保護作用を検討する目的で、BIX を神経芽細胞の培地

に添加し、12 時間後に tunicamycin を投与して ER ストレスをかけた。BIX を投与していない細胞では tunicamycin 投与後 36 時間後より細胞死が観察されたが、BIX 投与細胞では有意な細胞死の減少が観察された。

⑤タウオパチーの臨床治験に特化した診断プロトコールの作成

アルツハイマー病 (AD) の診断基準は、NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders Association and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association) で probable AD の基準を採用した。AD に対しての効果を検証した後は、同じタウオパチーである前頭側頭型認知症 (FTD) , 皮質基底核変性症 (CBD) , 進行性核上性麻痺 (PSP) についても検討する必要があると考え、それぞれの疾患の診断基準について検討し、設定した。被験者選択後の AD 及びその他のタウオパチーの疾患について、それぞれの評価方法を検討し、設定した。

D. 考察

近年 AD の治療薬開発は、「アミロイドカスケード仮説」を基盤にアミロイド・ワクチンや γ セクレターゼ阻害薬などが精力的に開発されてきたが、ここにきて芳しい臨床治験の成果が出ず、足踏み状態である。従って、AD のもう一つの病理である神経原線維変化の中心的存在であるタウ病理についての治療法応用も必要である。

AD 脳では何らかの理由で異常にリン

酸化されたタウが神経細胞内に蓄積し、凝集して神経原線維変化になると考えられている。このリン酸化タウ凝集は、AD以外の神経変性疾患でも認められ、タウオパチーと言われるにいたっている。本研究では、このタウの凝集阻害と分解促進の2観点からタウオパチーの治療を検討している。

本研究で、タウはタウオリゴマー、顆粒状タウ凝集体を経て、神経原線維変化へと変化することが分かり、この中間凝集物への凝集阻害効果を持つ物を検索している。

また、既存の薬剤からタウ凝集を阻害する物質も *exifone* や *lacmoid* といった具体的なものが得られており、早期の臨床応用へ期待が持てる。タウワクチンについては、実際のタウ抗体価の上昇が認められ、タウ代謝への影響について今後検討していかねばならない。

プロテアソーム・トレランスは、プロテアソーム自体の量的変化をもたらし、機能を上昇させる事が示唆されたが、トレランスを獲得している細胞にタウや TDP-43 を細胞導入してやるとそれらタンパクの代謝が促進され散る子考えられた。今後は、プロテアソーム・トレランスを発現する遺伝子を検討し、創薬につなげたいと考える。

我々が見出した BIX は BiP をほぼ選択的に誘導する故知が示されたが、BiP 誘導効果の詳細を検討し、*in vivo* における実験が必要である。

タウオパチーには、AD 以外にも、FTD、CBD、PSP もあるので、AD に対す

る効果の検証の後には、上記のように各疾患の診断基準、評価方法を用い、同様の検討を行う予定である。今回、評価項目を上記の通り設定したが、今後の動物実験等の結果も踏まえ、現在のプロトコルについては臨床研究開始前に再検討する予定である。

上記の②の研究では、既存薬物を使用するところから、早期のヒトへの臨床応用は近いと考えられるので、診断プロトコルを早期にまとめる必要がある。

E. 結論

タウの凝集阻害と分解促進に観点を絞って治療法を検討した結果、タウオリゴマーの凝集阻害物質、タウワクチン、プロテアソーム・トレランス誘導、さらにはシャペロン誘導剤が、候補としてあげられた。

F. 研究発表

論文発表

1. Takashima A. *Acta Neuropath.* (in press), Tauopathy and tau oligomer.
2. Takashima, A (Springer, NY) (in press)
3. Takashima A. *J Alzheimers Dis.* 2009 (17)729-736
4. Kitamura N, et. al. *PLoS One.*2009 4(4):e5159
5. Nonaka T, Arai T, Buratti E, Baralle FE, Akiyama H, Hasegawa M. Phosphorylated and ubiquitinated TDP-43 pathological inclusions in ALS and FTL-D-U are recapitulated in SH-SY5Y cells. *FEBS Lett* 583: 394-400, 2009.

6. Arai T Mackenzie IR, Hasegawa M, 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*. Online Jan 13, 2009.
7. Fujishiro H, Uchikado H, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Yokota O, Tsuchiya K, Togo T, Iseki E, Hirayasu Y. Accumulation of phosphorylated TDP-43 in brains of patients with argyrophilic grain disease. *Acta Neuropathol* 117: 151-158, 2009.
8. Kametani F, Nonaka T, Suzuki T, Arai T, Dohmae N, Akiyama H, Hasegawa M. Identification of casein kinase-1 phosphorylation sites on TDP-43. *Biochem Biophys Res Commun* 382: 405-9, 2009.
9. Nonaka T, Hasegawa M. A Cellular Model To Monitor Proteasome Dysfunction by alpha-Synuclein. *Biochemistry* 48: 8014-22, 2009.
10. Yamashita M, Nonaka T, Arai T, Kametani F, Buchman VL, Ninkina N, Bachurin SO, Akiyama H, Goedert M, Hasegawa M. Methylene blue and dimebon inhibit aggregation of TDP-43 in cellular models. *FEBS Lett* 583: 2419-24, 2009.
11. Nonaka T, Kametani F, Arai T, Akiyama H, Hasegawa M. Truncation and pathogenic mutations facilitate the formation of intracellular aggregates of TDP-43. *Hum Mol Genet* 18: 3353-3364, 2009.
12. Davidson Y, Amin H, Kelley T, Shi J, Tian J, Kumaran R, Lashley T, Lees AJ, Duplessis D, Neary D, Snowden J, Akiyama H, Arai T, Hasegawa M, Bandopadhyay R, Sikkink S, Pickering-Brown S, Mann DM TDP-43 in ubiquitinated inclusions in the inferior olives in frontotemporal lobar degeneration and in other neurodegenerative diseases: a degenerative process distinct from normal ageing. *Acta Neuropathol* 118: 359-69, 2009.
13. Yonetani M, Nonaka T, Masuda M, Inukai Y, Oikawa T, Hisanaga SI, Hasegawa M. Conversion of wild-type alpha -synuclein into mutant-type fibrils and its propagation in the presence of A30P mutant. *J Biol Chem* 284: 7940 -7950, 2009.
14. Masuda M, Hasegawa M, Nonaka T, Oikawa T, Yonetani M, Yamaguchi Y, Kato K, Hisanaga S, Goedert M. (# corresponding author) Inhibition of alpha-synuclein fibril assembly by small molecules: Analysis using epitope-specific antibodies. *FEBS Lett* 583:787-791, 2009.
15. Effect of an Inducer of BiP, a Molecular Chaperone, on Endoplasmic Reticulum (ER) Stress-Induced Retinal Cell Death. Yuta Inokuchi, Yoshimi Nakajima, Masamitsu Shimazawa, Takanori Kurita, Mikiko Kubo, Atsushi Saito, Hironao Sajiki, Takashi Kudo,

- Makoto Aihara, Kazunori Imaizumi, Makoto Araie, and Hideaki Hara Invest Ophthalmol Vis Sci 50: 334-344, 2009
16. Decrease of dynamin 2 levels in late-onset Alzheimer's disease alters A β metabolism. Eiichiro Kamagata, Takashi Kudo, Ryo Kimura, Hitoshi Tanimukai, Takashi Morihara, Md.Golam Sadik, Kouzin Kamino and Masatoshi Takeda Biochem Biophys Res Commun 379: 691-695, 2009
 17. Differential interaction and aggregation of 3-repeat and 4-repeat tau isoforms with 14-3-3zeta protein. Sadik G, Tanaka T, Kato K, Yanagi K, Kudo T, Takeda M. Biochem Biophys Res Commun. 383(1):37-41, 2009
 18. Regulation of ER molecular chaperone prevents bone loss in a murine model for osteoporosis. Hino S-I, Kondo S, Yoshinaga K, Saito A, Murakami T, Kanemoto S, Sekiya H, Chihara K, Aikawa Y, Hara H, Kudo T, Sekimoto T, Funamoto T, Chosa E, and Imaizumi K J Bone Miner Metab 28:131-138, 2010
 19. SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease in a Japanese population. Kimura R, Yamamoto M, Morihara T, Akatsu H, Kudo T, Kamino K, Takeda M. Neurosci Lett. 461(2):177-180, 2009.
 20. The 28-amino acid form of an APLP1-derived A β -like peptide is a surrogate marker for A β 42 production in the central nervous system. Kanta Yanagida, Masayasu Okochi, Shinji Tagami, Taisuke Nakayama, Takashi S. Kodama, Kouhei Nishitomi, Jingwei Jiang, Kohji Mori, Shin-ichi Tatsumi, Tetsuaki Arai, Takeshi Ikeuchi, Kensaku Kasuga, Takahiko Tokuda, Masaki Kondo, Masaki Ikeda, Kentaro Deguchi, Hiroaki Kazui, Toshihisa Tanaka, Takashi Morihara, Ryota Hashimoto, Takashi Kudo, Harald Steiner, Christian Haass, Kuniaki Tsuchiya, Haruhiko Akiyama, Ryozo Kuwano, Masatoshi Takeda EMBO Molecular Medicine 1, 223-235, 2009

G. 健康危険情報

特記すべきことなし。

低分子化合物とワクチン療法によるタウ蓄積制御の試み

研究分担者：長谷川成人¹⁾

研究協力者：増田雅美¹⁾、野中隆¹⁾

¹⁾ 東京都精神医学総合研究所 分子神経生物学研究チーム

研究要旨

アルツハイマー病では、変性する部位の神経細胞やグリア細胞内にリン酸化タウの蓄積を伴い、タウの脳内分布と臨床症状が密接に相関する。タウの凝集、蓄積を抑制することができれば変性を抑制できる可能性がある。そこで試験管内凝集系で効果の見られたいくつかの化合物について、P301L 変異タウを発現するトランスジェニックマウスに経口投与し、その効果を解析した。また2種類のタウのリン酸化ペプチドをワクチンとして投与し、その効果について検討した。結果、化合物投与群でタウの蓄積が少ない傾向が観察された。またワクチン投与群でタウに対する抗体価の上昇を確認した。

A.研究目的

アルツハイマー病（AD）では、変性する神経細胞やグリア細胞内に異常リン酸化されたタウの蓄積を認め、そのタウの脳内分布と臨床症状が密接に相関することが示されている。タウの凝集、蓄積を抑制することができれば変性を抑制できる可能性がある。アミロイドβ蛋白(Aβ)を標的としたADの治験の結果が公表され、期待していたような効果がみとめられないことが示されたことなどから、ADの治療標的として、古くて新しいタウが再度注目を集めるようになってきている。本研究では試験管内凝集系で効果の認められたいくつかの化合物について、P301L 変異タウを発現するトランスジェニックマウスに経口投与し、その効果を解析した。また2種類のタウのリン酸化ペプチドをワクチンとして投与し、抗体価の上昇が認められるかなどを含めた効果について検討した。

B.研究方法

P301L 変異タウを発現するトランスジェニックマウスの hemi 接合体雌マウスの12週齢に、ポリフェノール化合物の exifone, ellagic acid, gossypetin, greentea polyphenol, フェノチアジン化合物とし

て lacmoid, ポルフィリン化合物として hematin をそれぞれ、粉餌に0.05~1%の濃度で混合し、32週齢まで経口投与した。その後、マウスの運動機能障害をロタロッド試験で、脳、脊髄に蓄積するリン酸化タウの量をウエスタンブロット解析で測定した。

(倫理面への配慮)

剖検脳の生化学解析については当研究所の倫理委員会に申請を提出して承認をうけ、実験指針に従って行った。

C.研究結果

1. 低分子化合物によるタウ蓄積制御

薬剤投与後の6ヶ月齢のP301LタウTgマウスの運動機能障害をロタロッド試験で解析した結果、コントロール(薬剤非投与)群では野生型マウスに比べ、約50%程度の運動機能が低下したのに対し、薬剤投与群では運動機能の低下が0~20%程度であり、薬剤投与の有効性が示唆された。続いて、マウス脊髄に蓄積する異常リン酸化タウの量をウエスタンブロットで解析した。P301LタウTgマウスでは12週齢頃から脊髄にリン酸化タウの蓄積が認められ、神経細胞の変性や機能障害

を起こすことが報告されている。そこで薬剤投与終了後に屠殺し、マウスから脊髄を取り出し、その不溶性画分を調製し、タウのリン酸化部位を認識する抗体(pS396 抗体)でウエスタンブロット解析した。不溶性画分の調製は患者脳から不溶性タウを調製する方法と基本的に同じ方法(界面活性剤のサルコシルを用いる方法)で行った。その結果、ばらつきはあるものの、1% exifone 投与群で約50%程度、0.1% lacmoid で約75%程度のリン酸化タウ蓄積量の減少を認めた。一方、1% lacmoid, 1% hematin 投与群ではコントロール群とほぼ同程度のタウの蓄積が観察された。

2. ワクチン療法によるタウ蓄積制御の試み

A β ペプチドをマウスに免疫すると A β 蓄積が抑制されたという報告からアミロイドのワクチン療法による除去の可能性が示唆されているが、細胞内に蓄積するタウについても、リン酸化タウペプチドを免疫した場合に、リン酸化タウに対する抗体が産生され、モデルマウスにおいて、タウの蓄積の有意な減少、運動能力の改善が報告されている(J Neurosci 2007)。そこで、このリン酸化タウペプチドを免疫する方法が有効であるかどうか、P301L タウ Tg マウスに報告のあったタウリン酸化ペプチドと、もう一つ別の種類のリン酸化ペプチドをそれぞれ免疫して検討を試みた。免疫に使用したリン酸化ペプチドは、報告のあった pS396 と pS404 がリン酸化されたペプチド p379-408 RENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSQDTSRHL と、AD 脳に蓄積するタウの異常リン酸化部位で最も C 末端側に位置する Ser422 のリン酸化ペプチド p413-431 STGSIDMVDSPLATLADE を用いた。免疫は 16 週齢からはじめ、2 週-4 週おきに合計 6 回、34 週齢まで免疫した。5 ヶ月齢の時点で採血し、免疫した抗原に対する抗体価の上昇を ELISA 法で測定した。その結果、いずれの抗原を投与したマウスにおいても、免疫したペプチドに対する抗体価の上昇が観察され、用いたリン酸化ペプチドが抗原性を有しており、抗体産生に有効であることが確認された。ワクチンによる治療効果を調べ

るため、抗原投与群と非投与群について 6 ヶ月齢から 8 ヶ月齢までの間、一ヶ月ごとにロタロッド試験を行い運動機能の低下を観察した。その結果、非投与群では 2 ヶ月の間に約 35% 程度、徐々に低下したのに対し、p379-408 ワクチン投与群では約 20% 程度の低下、p413-431 ワクチン投与群では約 5% 程度の低下にとどまった。この結果はリン酸化タウペプチドワクチンの投与によってタウの蓄積が抑制され、運動機能の低下が改善されたことを示唆する。

D. 考察

本解析により、P301L タウ Tg マウスにおいて、低分子化合物の経口投与が、リン酸化タウの蓄積、さらにはタウ蓄積による運動機能低下に有効である可能性が示唆された。ただ今回の解析から、p301L タウ Tg マウスにおけるタウの蓄積が個体間でばらつきがあることが判明したことから、一群の個体数を増やして検討する必要がある。lacmoid は高投与群ではあまり効果が認められなかった理由は不明であるが、lacmoid を 1% 濃度で粉餌に混合した場合、濃度が高すぎて餌を食べなかった可能性が考えられる。ワクチン療法については、今後、脊髄におけるリン酸化タウの蓄積量についても検討を行う必要がある。

E. 結論

タウの線維化を抑制する低分子化合物を P301L タウ Tg マウスに経口投与し、その運動機能低下、脊髄におけるリン酸化タウの蓄積量について解析した結果、ポリフェノール化合物の exifone、フェノチアジン化合物の lacmoid において、タウの蓄積を抑え、運動機能障害を低減する可能性があることが示唆された。またリン酸化タウペプチドを免疫するタウのワクチン療法についてもタウ蓄積による機能障害を改善する効果が示唆された。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

1. 論文発表

- 1). Nonaka T, Arai T, Buratti E, Baralle FE, Akiyama H, Hasegawa M. Phosphorylated and ubiquitinated TDP-43 pathological inclusions in ALS and FTL-D-U are recapitulated in SH-SY5Y cells. FEBS Lett 583: 394-400, 2009.
- 2). Arai T Mackenzie IR, Hasegawa M, 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. Online Jan 13, 2009.
- 3). Fujishiro H, Uchikado H, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Yokota O, Tsuchiya K, Togo T, Iseki E, Hirayasu Y. Accumulation of phosphorylated TDP-43 in brains of patients with argyrophilic grain disease. Acta Neuropathol 117: 151-158, 2009.
- 4). Kametani F, Nonaka T, Suzuki T, Arai T, Dohmae N, Akiyama H, Hasegawa M. Identification of casein kinase-1 phosphorylation sites on TDP-43. Biochem Biophys Res Commun 382: 405-9, 2009.
- 5). Nonaka T, Hasegawa M. A Cellular Model To Monitor Proteasome Dysfunction by alpha-Synuclein. Biochemistry 48: 8014-22, 2009.
- 6). Yamashita M, Nonaka T, Arai T, Kametani F, Buchman VL, Ninkina N, Bachurin SO, Akiyama H, Goedert M, Hasegawa M. Methylene blue and dimebon inhibit aggregation of TDP-43 in cellular models. FEBS Lett 583: 2419-24, 2009.
- 7). Nonaka T, Kametani F, Arai T, Akiyama H, Hasegawa M. Truncation and pathogenic mutations facilitate the formation of intracellular aggregates of TDP-43. Hum Mol Genet 18: 3353-3364, 2009.
- 8). Davidson Y, Amin H, Kelley T, Shi J, Tian J, Kumaran R, Lashley T, Lees AJ, Duplessis D, Neary D, Snowden J, Akiyama H, Arai T, Hasegawa M, Bandopadhyay R, Sikkink S, Pickering-Brown S, Mann DM TDP-43 in ubiquitinated inclusions in the inferior olives in frontotemporal lobar degeneration and in other neurodegenerative diseases: a degenerative process distinct from normal ageing. Acta Neuropathol 118: 359-69, 2009.
- 9). Yonetani M, Nonaka T, Masuda M, Inukai Y, Oikawa T, Hisanaga SI, Hasegawa M. Conversion of wild-type alpha -synuclein into mutant-type fibrils and its propagation in the presence of A30P mutant. J Biol Chem 284: 7940 -7950, 2009.
- 10). Masuda M, Hasegawa M#, Nonaka T, Oikawa T, Yonetani M, Yamaguchi Y, Kato K, Hisanaga S, Goedert M. (# corresponding author) Inhibition of alpha-synuclein fibril assembly by small molecules: Analysis using epitope-specific antibodies. FEBS Lett 583:787-791, 2009.
- 11). 長谷川成人. 企画/編集, 概論-因子から解明される神経変性疾患の分子基盤. 実験医学 27: 1318-1323, 2009.
- 12). 新井哲明, 長谷川成人, 野中隆, 藤城弘樹, 内門大文, 秋山治彦. 神経変性疾患の新規原因分子: TDP-43. 実験医学 27: 1324-1332, 2009.
- 13). 野中隆, 新井哲明, 長谷川成人. 神経変性疾患の細胞病理学. 細胞工学 28: 437-442, 2009.
- 14). 野中隆, 新井哲明, 長谷川成人, 細胞内 TDP-43 蓄積のメカニズム. BRAIN and NERVE 61: 1292-1300
- 15). 野中隆, 新井哲明, 秋山治彦, 長谷川成人. TDP-43 の細胞内封入体形成モデルの作製. Dementia Japan 22: 252-260, 2009.
- 16). 長谷川成人, 野中隆, 新井哲明. 神経変性疾患と TDP-43. 最新医学 64: 125-131, 2009.
- 17). 野中隆, 犬飼由紀, 新井哲明, 長谷川成人. TDP-43 と神経変性疾患. BRAIN and NERVE 61: 161-166, 2009
- 18). 吉田裕孝, 長谷川成人. FTDP-17 の発見と遺伝子変異. Clin Neurosci 27: 271-274, 2009

19). 長谷川成人, 野中隆, 新井哲明, 秋山治彦. TDP-43 proteinopathy -その広がりと病因的意義. Annual Review 神経 2010, 187-195.

2.学会発表

- 1). 長谷川成人 (2009) TDP-43 蓄積症の概念と病態解明への展望. 第 50 回日本神経学会総会, 教育講演, 仙台 [2009/05/22]
- 2). Nonaka T, Kametani F, Arai T, Akiyama H, Hasegawa M (2009) Truncation and pathogenic mutations facilitate the formation of intracellular aggregates of TDP-43. The 12th International Conference on Alzheimer's Disease 2009, Vienna, Austria [2009/07/12]
- 3). Arai T, Mackenzie IRA, Hasegawa M, Fujishiro H, Nonaka T, Niizato K, Tsuchiya K, Kobayashi Z, Iritani S, Onaya M, Akiyama H (2009) Phosphorylated TDP-43 in neurodegenerative disorders. The 12th International Conference on Alzheimer's Disease 2009, Vienna, Austria [2009/07/15]
- 4). 長谷川成人, 増田雅美, 米谷元邦, 野中隆, 筈川貴行, 山口芳樹, 加藤晃一, 久永眞市, Michel Goedert. α シヌクレインの線維化と構造変化. Dementia Japan 23, 220.
- 5). 亀谷富由樹, 野中隆, 新井哲明, 秋山治彦, 長谷川成人. TDP-43 における Casein Kinase-1 によるリン酸化部位の解析. Dementia Japan 23, 215
- 6). 新井哲明, 長谷川成人, 藤城弘樹, 野中隆, 新里和弘, 土谷邦秋, 入谷修司, 女屋光基, 秋山治彦. リン酸化および断片化した TDP-43 の神経変性疾患患者脳における蓄積. Dementia Japan 23, 219
- 7). 吉田眞理, 櫻井信夫, 三室マヤ, 橋詰良夫, 新井哲明, 長谷川成人, 新井誠, 糸川昌成, 秋山治彦. TDP-43 G298S 変異示す認知症を伴う家族性 ALS. Dementia Japan 23, 218
- 8). 辻浩史, 長谷川成人, 新井哲明, 野中隆, 山下万貴子, 亀谷富由樹, 宅間浩, 中馬越清隆, 富所康志, 石井亜紀子, 石井一弘, 渡邊雅彦, 秋山治彦, 玉岡晃. 筋萎縮性側索硬化症に蓄積するリン酸化 TDP-43 に関する検討. Dementia Japan 23, 194

- 9). 山下万貴子, 野中隆, 新井哲明, 亀谷富由樹, 秋山治彦, 長谷川成人. 細胞モデルを用いた TDP-43 凝集体形成阻害化合物の検索. Dementia Japan 23, 179
- 10). 野中隆, 亀谷富由樹, 新井哲明, 秋山治彦, 長谷川成人, 患者脳に蓄積した TDP-43 の C 末端断片の同定とその性質決定. Dementia Japan 23, 178
- 11). 團彩帆, 野中隆, 村山繁雄, 渡邊伸央, 新井孝夫, 長谷川成人. アルツハイマー病におけるタウタンパク質の翻訳後修飾. Dementia Japan 23, 102
- 12). 長谷川成人, 増田雅美, 米谷元邦, 野中隆, 山口芳樹, 加藤晃一, 久永眞市, Goedert M (2009) α シヌクレイン線維化に伴う構造変化. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸 [2009/10/24]
- 13). 野中隆, 山下万貴子, 亀谷富由樹, 新井哲明, 秋山治彦, 長谷川成人 (2009) 細胞内 TDP-43 蓄積モデルの作製とその応用. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸 [2009/10/24]
- 14). 長谷川成人 (2009) 変性疾患に蓄積する異常タンパク質の生化学解析とモデルの構築 [講演]. 神経変性疾患コンソーシアム 2009: TDP-43 プロテオパチー最新の知見, 東京 [2009/09/20]
- 15). 長谷川成人 (2009) プロテオミクス解析から ALS/FTLD の病態解明、治療へ. 第 5 回プロテオミクス・構造生物学講演会, 東京 [2009/11/02]

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

分担研究報告書

顆粒状タウ凝集体を標的とする治療法に関する研究

分担研究者 高島 明彦

理化学研究所 脳科学総合研究センター、アルツハイマー病研究チーム

研究要旨

タウ凝集体である神経原線維変化形成の過程ではリン酸化タウ、タウオリゴマー、顆粒状タウ凝集体、タウ線維が形成され、リン酸化タウ、タウオリゴマーの形成はシナプス消失、顆粒状タウ凝集体形成は神経脱落に関与することが明らかになった。これらタウ凝集阻害を示す化合物を理研化合物バンク 6600 から化合物アレイを用いてタウと結合する化合物を最初にスクリーニングし陽性反応を示す約 100 化合物を得た。アルツハイマー病治療薬であるリバスチグミンは培養細胞を用いた実験でタウ凝集抑制効果があることが見いだされた。

キーワード：タウ、顆粒状凝集体、認知症治療、化合物

A.研究目的

アルツハイマー病、前頭側頭葉認知症を含む神経原線維変化を呈するタウオパチーでは神経原線維変化そのものよりも神経原線維変化形成過程のタウ凝集体にシナプス消失や神経脱落の原因があると考えられる。これまでの検討からリン酸化タウ、タウオリゴマーの形成はシナプス消失、顆粒状タウ凝集体形成は神経脱落に関与することが明らかになった。この課題ではこれらタウ凝集を標的としたタウ凝集阻害剤の検索を目的とする。

B.研究方法

化合物マイクロアレイとリコンビナントヒトタウ溶液をインキュベートし洗浄後、抗タウ抗体によってマイクロアレイに結合しているタウを可視化しタウと結合活性を持つ化合物を得る。得られた化合物は試験管内でリコンビナントヒトタウとヘパリン存

在化でインキュベートし、凝集阻害活性をチオフラビン蛍光で測定する。更にどの段階での凝集阻害であるかを原子間力顕微鏡を用いて決定する。

化合物は P301L 変異タウを安定に発現する N2a 細胞株に投与し SDS 不溶性タウの形成阻害効果を細胞レベルで検討する。

C.研究結果

理研化合物バンク 6600 から化合物マイクロアレイを作製し、それらをリコンビナントヒトタウ溶液とインキュベート後、抗タウ抗体によって陽性の化合物を得た。その中から再現性が良く、SPR によって親和性の高い化合物約 100 種類が得られた。

アルツハイマー病治療薬であるリバスチグミンを P301L 変異タウを安定に発現する N2a 細胞株に投与し SDS 不溶性タウの形成阻害効果を検討した所、 $10 \mu\text{M}$ で SDS 不溶性タウ形成阻害が観察された。試験管内でリコンビナントヒトタウとヘパリン存

在化でインキュベートし、凝集阻害活性をチオフラビン蛍光で測定したが、直接の凝集阻害効果は観られなかった。

D. 考察

100種類のタウ結合化合物はさらに試験管内でリコンビナントヒトタウとヘパリン存在化でインキュベートし、凝集阻害活性をチオフラビン蛍光でタウ凝集阻害活性を調べている。さらに原子間力顕微鏡を用いてその中から顆粒状凝集体形成阻害化合物をスクリーニングし細胞レベル、さらに動物モデルを用いてシナプス消失、神経脱落阻害効果を検討し最終的に認知症治療薬としたい。

リバスチグミンは試験管内タウ凝集系でタウ凝集阻害は観られなかったが、細胞を用いた実験では阻害効果を示した。このことはリバスチグミンは細胞内で間接的にタウ凝集を阻害すると考えられた。

E. 結論

6600から化合物アレイを用いてタウと結合する化合物を最初にスクリーニングし陽性反応を示す約100化合物を得た。アルツハイマー病治療薬であるリバスチグミンは培養細胞を用いた実験でタウ凝集抑制効果があることが見いだされた。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takashima A. Acta Neuropath. (in press), Tauopathy and tau oligomer.
2. Takashima, A (Springer, NY) (in press)
3. Takashima A. J Alzheimers Dis. 2009 (17)729-736
4. Kitamura N, et. al. PLoS One. 2009 4(4):e5159

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

分担研究報告書

顆粒状タウ凝集体を標的とする治療法に関する研究

分担研究者 高島 明彦

理化学研究所 脳科学総合研究センター、アルツハイマー病研究チーム

研究要旨

タウ凝集体である神経原線維変化形成の過程ではリン酸化タウ、タウオリゴマー、顆粒状タウ凝集体、タウ線維が形成され、リン酸化タウ、タウオリゴマーの形成はシナプス消失、顆粒状タウ凝集体形成は神経脱落に関与することが明らかになった。これらタウ凝集阻害を示す化合物を理研化合物バンク 6600 から化合物アレイを用いてタウと結合する化合物を最初にスクリーニングし陽性反応を示す約 100 化合物を得た。アルツハイマー病治療薬であるリバスチグミンは培養細胞を用いた実験でタウ凝集抑制効果があることが見いだされた。

キーワード：タウ、顆粒状凝集体、認知症治療、化合物

A.研究目的

アルツハイマー病、前頭側頭葉認知症を含む神経原線維変化を呈するタウオパチーでは神経原線維変化そのものよりも神経原線維変化形成過程のタウ凝集体にシナプス消失や神経脱落の原因があると考えられる。これまでの検討からリン酸化タウ、タウオリゴマーの形成はシナプス消失、顆粒状タウ凝集体形成は神経脱落に関与することが明らかになった。この課題ではこれらタウ凝集を標的としたタウ凝集阻害剤の検索を目的とする。

B.研究方法

化合物マイクロアレイとリコンビナントヒトタウ溶液をインキュベートし洗浄後、抗タウ抗体によってマイクロアレイに結合しているタウを可視化しタウと結合活性を持つ化合物を得る。得られた化合物は試験管内でリコンビナントヒトタウとヘパリン存

在化でインキュベートし、凝集阻害活性をチオフラビン蛍光で測定する。更にどの段階での凝集阻害であるかを原子間力顕微鏡を用いて決定する。

化合物は P301L 変異タウを安定に発現する N2a 細胞株に投与し SDS 不溶性タウの形成阻害効果を細胞レベルで検討する。

C.研究結果

理研化合物バンク 6600 から化合物マイクロアレイを作製し、それらをリコンビナントヒトタウ溶液とインキュベート後、抗タウ抗体によって陽性の化合物を得た。その中から再現性が良く、SPR によって親和性の高い化合物約 100 種類が得られた。

アルツハイマー病治療薬であるリバスチグミンを P301L 変異タウを安定に発現する N2a 細胞株に投与し SDS 不溶性タウの形成阻害効果を検討した所、 $10\ \mu\text{M}$ で SDS 不溶性タウ形成阻害が観察された。試験管内でリコンビナントヒトタウとヘパリン存

在化でインキュベートし、凝集阻害活性をチオフラビン蛍光で測定したが、直接の凝集阻害効果は観られなかった。

D. 考察

100種類のタウ結合化合物はさらに試験管内でリコンビナントヒトタウとヘパリン存在化でインキュベートし、凝集阻害活性をチオフラビン蛍光でタウ凝集阻害活性を調べている。さらに原子間力顕微鏡を用いてその中から顆粒状凝集体形成阻害化合物をスクリーニングし細胞レベル、さらに動物モデルを用いてシナプス消失、神経脱落阻害効果を検討し最終的に認知症治療薬としたい。

リバスチグミンは試験管内タウ凝集系でタウ凝集阻害は観られなかったが、細胞を用いた実験では阻害効果を示した。このことはリバスチグミンは細胞内で間接的にタウ凝集を阻害すると考えられた。

E. 結論

6600から化合物アレイを用いてタウと結合する化合物を最初にスクリーニングし陽性反応を示す約100化合物を得た。アルツハイマー病治療薬であるリバスチグミンは培養細胞を用いた実験でタウ凝集抑制効果があることが見いだされた。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takashima A. Acta Neuropath. (in press), Tauopathy and tau oligomer.
2. Takashima, A (Springer, NY) (in press)
3. Takashima A. J Alzheimers Dis. 2009 (17) 729-736
4. Kitamura N, et. al. PLoS One. 2009 4(4):e5159

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

厚生労働科学研究費補助金（認知症対策総合研究事業）
分担研究報告書

プロテアソーム・トレランス現象とタウおよび TDP-43 代謝に関する研究

分担研究者 工藤 喬 大阪大学大学院医学系研究科

研究要旨: プロテアソームを非致死的な量の阻害剤で処理しておくこと、プロテアソームの活性上昇を来たすプロテアソーム・トレランス現象が生じる。このトレランスを獲得した細胞では、タウや TDP-43 の代謝が促進されることが示された。従って、このプロテアソーム・トレランス現象のタウオパチー治療への応用が期待される。

キーワード: プロテアソーム、タウ、TDP-43、タウオパチー

A. 研究目的

通常、神経細胞内の異常タンパクはユビキチンの修飾を受け、プロテアソームによって選択的に分解される（UPS: ubiquitin proteasome system）。しかし、異常タンパクの神経細胞内蓄積は UPS に負荷を掛け、その機能を低下させる。UPS 機能の低下はタウオパチーや TDP-43 プロテオノパチーといった神経変性過程への関連が考えられる。すなわち、異常タンパクの蓄積によって UPS、プロテアソーム機能が低下させられ細胞死を引き起こす病態が想定されている。このことから、プロテアソーム機能を活性化することができればこういった神経変性疾患の治療法につながる可能性が考えられる。そこで、我々はプロテアソーム機能を上昇させる方法を検討した。本研究では、非致死的な量のプロテアソーム阻害剤で前処理しておくこと、その後高濃度のプロテアソーム阻害

剤を投与しても、阻害抵抗性を生じる現象を見つけ、「プロテアソーム・トレランス」と名付けた。

B. 研究方法

ヒト神経膠細胞 SH-SY5Y に低濃度 20nM Epoxomicin や 500 nM Lactacystin を添加し、8 時間後に培地中の LDH を測定キットで測定する、これらの濃度では、細胞死が起こらないこと確認の後、培地を交換し、高濃度のプロテアソーム阻害薬を加え、24 時間後の細胞死について、同様に LDH アッセイを行った。

また、プロテアソーム機能を評価するために、GFPu を遺伝子導入した HEK293 細胞にも上記のようにプロテアソーム阻害剤を投与した。

さらに、このプロテアソーム・トレランスを獲得した細胞について、プロテアソームサブユニットの mRNA に関してリアルタイム PCR で解析した。

上記のようにプロテアソーム・トレランスを獲得せしめた HEK293 細胞に、タウや TDP-43 を遺伝子導入し、それらの代謝について検討した。

C. 研究結果

プロテアソームを活性化させる方法を探するため、プロテアソームの機能が促進される現象について検討を行った。細胞をプロテアソーム阻害剤で処理すると濃度依存的に細胞死を起こす。しかし、低濃度のプロテアソーム阻害剤 (Epoxomicin 20nM, Lactacystin 500nM) の 8 時間前処理では、培地中の LDH の有意な上昇は観察されず、非致命的と判断される。この低濃度阻害剤処理後、高濃度の 100 nM Epoxomicin や 500 nM、1 μ M Lactacystin を投与し、24 時間後の培地中の LDH を測定したところ、前処理をした群は、処理なし群に比して有意に LDH が低値を示し、高い生存性を示し、プロテアソーム・トレランスが獲得されていた。

また、同様の処理を GFP^u 導入細胞で行った所、前処理を行った群では GFP^u の分解が行われたのに対し、処理なし群では GFP^u の蓄積が見られた。これは、プロテアソーム・トレランスを獲得した細胞では、プロテアソーム機能が上昇することを示している。

プロテアソーム・トレランスを獲得した細胞では、PSMB1 あるいは PSMB6 といったプロテアソームサブユニットの mRNA が有意に発現上昇していた。

プロテアソーム・トレランスを獲得した HEK293 細胞では、遺伝子導入されたタウおよび TDP-43 のタンパク量が、トレランスのない細胞に比べて低下していることが観察された。これはプロテアソーム・トレランスによりタウや TDP-43 と言ったタンパクの代謝が促進されたことを示している。

D. 考察

アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患には異常タンパクが神経細胞内に蓄積するという共通した病理機序が考えられている。これらタンパクの中には元来 UPS にてプロテアソームで分解されるものが多く、プロテアソーム機能と神経変性の病理過程が注目される。すなわち、プロテアソームの代謝機能を何らかの手段で上昇させれば、これらタンパクが代謝されの蓄積の防止に繋がる可能性がある。

プロテアソーム阻害剤はプロテアソームの機能を止め濃度依存的に細胞死をもたらすが、低濃度の投与にすると、有意な細胞死が観察されない事が明らかとなった。この低濃度のプロテアソーム阻害剤を 8 時間作用させ、その後に高濃度の阻害薬を投与すると、低濃度の前処理によって細胞死が有意に減少することを今回発見し、「プロテアソーム・トレランス」現象と名付けた。

遺伝子導入された GFP^u はプロテアソームが生理的に機能していれば、速やかに UPS で代謝され消失するが、

プロテアソーム阻害剤を作用させておくと、代謝されない GFPu が蓄積する。しかし、予めプロテアソーム・トレランスを獲得しておく、阻害剤による GFPu の蓄積が観察されなかった。すなわち、トレランスはプロテアソームの機能を上昇させることを反映していることが示された。実際、プロテアソームを構成するサブユニットの mRNA の上昇が観察されており、プロテアソームの量的な変化がプロテアソーム・トレランスをもたらしていることが示唆された。

プロテアソーム・トレランスを獲得した細胞にタウや TDP-43 といった神経変性過程で蓄積が観察されるタンパクを遺伝子導入してみたところ、タンパク量の低下が観察された。これは、何らかの方法でトレランスを神経細胞に与えることが、タウオパチーや TDP-43 プロテオノパチーの治療に繋がる事を示唆している。

今後は、プロテアソーム・トレランスをもたらす遺伝子を発現解析し、その遺伝子を誘導する薬剤の探索に移りたいと考えている。

E. 結論

プロテアソーム・トレランスは、プロテアソームの量的な上昇によるプロテアソーム機能の上昇によることを見出し、タウや TDP-43 の代謝を促進することが示された。

F. 研究発表

論文発表

1. Effect of an Inducer of BiP, a Molecular Chaperone, on Endoplasmic Reticulum (ER) Stress-Induced Retinal Cell Death. Yuta Inokuchi, Yoshimi Nakajima, Masamitsu Shimazawa, Takanori Kurita, Mikiko Kubo, Atsushi Saito, Hironao Sajiki, Takashi Kudo, Makoto Aihara, Kazunori Imaizumi, Makoto Araie, and Hideaki Hara Invest Ophthalmol Vis Sci 50: 334-344, 2009
2. Decrease of dynamin 2 levels in late-onset Alzheimer's disease alters A β metabolism. Eiichiro Kamagata, Takashi Kudo, Ryo Kimura, Hitoshi Tanimukai, Takashi Morihara, Md.Golam Sadik, Kouzin Kamino and Masatoshi Takeda Biochem Biophys Res Commun 379: 691-695, 2009
3. Differential interaction and aggregation of 3-repeat and 4-repeat tau isoforms with 14-3-3zeta protein. Sadik G, Tanaka T, Kato K, Yanagi K, Kudo T, Takeda M. Biochem Biophys Res Commun. 383(1):37-41, 2009
4. Association study of the G72 gene with schizophrenia in a Japanese population: a multicenter study. Ohi K, Hashimoto R, Yasuda Y, Yoshida T, Takahashi H, Iike N, Fukumoto M, Takamura H, Iwase M, Kamino K, Ishii R, Kazui H, Sekiyama R, Kitamura Y, Azechi M, Ikezawa K, Kurimoto R, Kamagata E,

Tanimukai H, Tagami S, Morihara T, Ogasawara M, Okochi M, Tokunaga H, Numata S, Ikeda M, Ohnuma T, Ueno S, Fukunaga T, Tanaka T, Kudo T, Arai H, Ohmori T, Iwata N, Ozaki N, Takeda M. *Schizophr Res.* 109(1-3):80-85, 2009

5. Regulation of ER molecular chaperone prevents bone loss in a murine model for osteoporosis. Hino S-I, Kondo S, Yoshinaga K, Saito A, Murakami T, Kanemoto S, Sekiya H, Chihara K, Aikawa Y, Hara H, Kudo T, Sekimoto T, Funamoto T, Chosa E, and Imaizumi K *J Bone Miner Metab* 28:131-138, 2010
6. SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease in a Japanese population. Kimura R, Yamamoto M, Morihara T, Akatsu H, Kudo T, Kamino K, Takeda M. *Neurosci Lett.* 461(2):177-180, 2009.
7. The 28-amino acid form of an APLP1-derived A β -like peptide is a surrogate marker for A β 42 production in the central nervous system. Kanta Yanagida, Masayasu Okochi, Shinji Tagami, Taisuke Nakayama, Takashi S. Kodama, Kouhei Nishitomi, Jingwei Jiang, Kohji Mori, Shin-ichi Tatsumi, Tetsuaki Arai, Takeshi Ikeuchi, Kensaku Kasuga, Takahiko Tokuda, Masaki Kondo, Masaki Ikeda, Kentaro Deguchi, Hiroaki Kazui, Toshihisa Tanaka, Takashi Morihara,

Ryota Hashimoto, Takashi Kudo, Harald Steiner, Christian Haass, Kuniaki Tsuchiya, Haruhiko Akiyama, Ryoza Kuwano, Masatoshi Takeda *EMBO Molecular Medicine* 1, 223-235, 2009

G. 健康危険情報

特記すべきことなし。