

Group VIA phospholipase A₂ knockout mice.
XVIIth International Congress of
Neuropathology, Salzburg, Austria, Sep 2010

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

家族性 ALS の凝集体形成機構の解明

研究協力者：谷口直之 大阪大学微生物病研究所疾患糖鎖学¹・教授
共同研究者：松本紋子¹、藤原範子・兵庫医科大学大学生化学

研究要旨：異常タンパク質のミスフォールディングや凝集体形成は、ポリグルタミン病やアルツハイマー病、パーキンソン病に限らず、筋萎縮性側索硬化症(ALS)においてもみられ、それぞれの疾患特有の発症メカニズムと共に、多彩な神経疾患に類似した発症メカニズムも存在すると考えられている。Huntingtin、Tau、Amiloyd β 、 α -SynucleinなどはTransglutaminase (TG)の基質となり、架橋反応により重合体を形成する。また、TGの阻害剤であるCystamineの投与により、ハンチントン病モデルマウスにおいて延命効果が多数報告されている。私達は家族性ALS(FALS)変異型Cu, Zn-superoxide dismutase (SOD1)やアポ型SOD1がTGの基質になることを確認した。SOD1の凝集体形成機構をTGに着目して検討した。また、難溶性凝集体の前駆体である、可溶性オリゴマーSOD1の検出法ならびにSOD活性測定法を確立し、オリゴマーSOD1も活性を保持しているという新たな知見を得た。

A. 研究目的

Transglutaminase (TG: protein-glutamine γ -glutamyltransferase, EC 2.3.2.13)はタンパク質中のグルタミン残基の γ -カルボキシアミド基と各種の一級アミン(L-リジンの ϵ -アミノ基等)との間のアシル基転移反応をカルシウム存在下で触媒する酵素である。現在までに9種類のアイソフォーム(fXIIIa, TG1, TG2, TG3, TG4, TG5, TG6, TG7, Band4.2)が報告されている。タンパク質中のリジン残基がアシル受容体として反応した場合には、タンパク質分子間または分子内に ϵ -(γ -Glu)-Lys 架橋が形成され、これによりタンパク質の重合等が起こる。Huntingtin、Tau、Amiloyd β A4、 α -SynucleinなどはTGの基質となり得ることがin vitroや培養細胞を用いた実験で確認されている。Tissue TG (TG2) 活性の上昇に伴い、基質となる原因タンパク質の多量

体化や、他のタンパク質を含む凝集体の形成が見られることより、ハンチントン病やアルツハイマー病、パーキンソン病などにTGが関与していると考えられている。凝集体には分子シャペロンやユビキチン-プロテアソーム系のタンパク質も検出されており、コンフォメーションの変化に対して分子シャペロンが作用するが、最終的にはプロテアソームによる分解処理が完了せずに凝集体が蓄積するのではないかと考えられている。封入体は細胞内のミスフォールドしたタンパク質を無毒化する為に細胞が防御反応として形成しているとの報告もあり、可溶性の中間体であるオリゴマーなどの方が強い毒性を持つことも報告されている。さらに、TGの阻害剤であるCystamineの投与により、ハンチントン病モデルマウスにおいて延命効果が多数報告されている。

異常タンパク質のミスフォールディングや凝集体形成は ALS おいてもみられるが、TG が関与しているのかどうか報告はない。おそらく TG の基質スクリーニングに野生型 SOD1 も取り上げられたであろうが、基質とならなかったであろう。FALS の病態には変異型 SOD1 が関与しているため、TG の基質特異性を検討した。その結果、私達は FALS でみられる変異型 SOD1 や金属の結合していないアポ型 SOD1 が TG2 の基質になることを確認した。

凝集体検出法のひとつとして、簡便な電気泳動法は頻用されている。SDS-PAGE/Western Blotting にて、共通結合による SOD1 の凝集体は難溶性画分より既に検出されているが、可溶性画分では検出されていない。そこで私たちは、凝集体形成における可溶性中間体であるオリゴマー-SOD1 検出法の確立を試みた。SOD の in gel activity assay への応用も視野にいれ、水素結合や疎水結合などの非共有結合も保持したまま電気泳動が可能であり、Blue Native PAGE の色素を用いない改良型である high resolution clear native PAGE (hrCN-PAGE) を用いることにした。

B. 研究方法

リコンビナント human SOD1 は、バキュロウイルスを用いて Sf9 細胞に過剰発現させ生成した。また 6 番目と 11 番目のシステイン残基に変異を加えた SOD1 は大腸菌にて作成した。Transglutaminase from guinea pig liver はオリエンタル酵母株式会社から購入した。培養細胞は human SOD1 (WT, G37R, G41D, G85R) を発現させた N2a (mouse neuroblastoma) を用いた。Human TG2 は Nucleofector Kit V (Amaxa Biosystems, Germany) を用いて Amaxa III の T-024 プログラム (N2a 用) にてエレクトロポレーションによりトランスフェクトし、72 時間後に細胞を回収した。

Human TG2 の cDNA (pcDNA3.1-tTG) は Dr. G. V. W. Johnson (University of Alabama Birmingham, USA) から供与頂いた。

Blue Native PAGE は Invitrogen のシステムを用いた。グラジエントゲルの作成ならびに hrCN-PAGE は Schagger らの原著論文などを参考にした。Human SOD1 (WT, H46R, F50E/G51E, H80S/D83S, G37R, G41D, G85R, G93A) を COS-1 細胞に過剰発現させた。数量体一多量体 SOD1 の指標は、リコンビナント human SOD1 (Wako) に HCO_3^- と H_2O_2 を反応させて作成した (J. Biol. Chem. 278: 24078-89, 2003)。アポ型 SOD1 は HiTrap Chelating Column (GE) を用いてホロ型と分離した。

C. 研究結果

Human SOD1 のタンパク質表面には多数のリジン残基やグルタミン残基が露出しており、TG の基質になる可能性があり、その結果、SOD1 間や他のタンパク質との間に共有結合による架橋が形成されることが予想される。アポ型 SOD1 やミスフォールディング、アンフォールディングにより立体構造に変化が生じると、FALS の変異 SOD1 だけでなく野生型 SOD1 も TG の基質になるであろうと予想された。そこでリコンビナント human SOD1 を精製し、TG2 と Ca^{2+} 存在下でインキュベートし、SOD1 が TG2 の基質になり得るかどうか検討した結果、FALS 変異 SOD1 は TG2 の酵素反応によって、数一多量体を形成することが確認された。また野生型 SOD1 もアポ型であれば基質になることも確認された。これらの数一多量体は SDS-PAGE の際にサンプルバッファーとして 2 % SDS や還元剤 (5 % β -mercaptoethanol) を含み、100 度で 5 分インキュベートしても残存することより、共有結合であることが示唆された。また TG2 による Ca^{2+} 非依

存性の共有結合による数一多量体の形成には SOD1 の C6A/C111S 変異による影響は見られなかった。次に human SOD と TG2 を共発現させた細胞で検討した。N2a 細胞に G37R を過剰発現させただけでは可溶性画分に数一多量体は検出されなかったが、TG2 も共発現させると数一多量体が検出された。

次に Blue Native PAGE の改変型である hrCN-PAGE を用いて in gel SOD activity assay へと応用できるか検討した。リコンビナント SOD1 を Blue Native PAGE と hrCN-PAGE により電気泳動し、Coomassie 染色にて泳動パターンを比較したところ、同様の泳動パターンであることが確認できた。次に、in gel activity assay へと応用した結果、SOD 活性が確認でき、銀染色レベルの高感度の結果が得られた。また、Blue Native PAGE を用いると、アポ型 SOD1 とホロ型 SOD1 は、異なった移動度のバンドとして検出することができた。COS-1 細胞に過剰発現させた野生型 (WT)、銅結合部位変異型(H46R)、亜鉛結合部位変異型(H80S/D83S)、単量体型(F50E/G51E) の human SOD1 を指標とし、FALS 変異型 SOD1 (G37R, G41D, G85R, G93A) の過剰発現細胞における SOD 1 の形態を Blue Native PAGE/Western blotting で比較検討した。単量体 SOD1 は市販の 4-16% グラジエントゲルでは至適サイズ(約 20~1048 kDa)の検出限界外なので自作グラジエントゲルを用いた。その結果、FALS 変異型 SOD1 では、アポ型、ホロ型の二量体 SOD1 や、単量体、数量体、多量体 SOD1 などが検出できた。FALS 変異型 SOD1 の過剰発現細胞において、SDS-PAGE では WT と差が見られなかったが、Blue Native PAGE を用いると、WT には見られないような単量体、数量体、多量体 SOD1 の形成が確認された。さらに in-gel activity assay により、SOD 活性を保持している数量体も

確認できた。

D. 考察

TG2 には Ca^{2+} 非依存性の PDI 活性があるとの報告がなされたが、TG2 のシステイン残基をアルキル化しても PDI 活性が残存するため、酵素反応の詳細な機構は不明である。最近、TG2 のノックアウトマウスとの比較によって、ミトコンドリア電子伝達系の複合体の形成に Ca^{2+} 非依存性の PDI 活性が関与しているのではないかとの報告もある。私たちの実験においても、精製 TG2 と SOD1 を Ca^{2+} 非存在下で反応させ、非還元条件下で SDS-PAGE/ウエスタンブロッティングで確認すると、S-S 結合由来の数一多量体が FALS 変異型 SOD1 やアポ型 SOD1 において検出された。この数一多量体は還元条件下では確認されなかったことより、 Ca^{2+} 非依存的な TG2 の PDI 活性の関与が示唆される。多くの ALS 関連の論文で、S-S 結合を介する SOD1 の数一多量体の存在が報告されている。TG2 の PDI 活性は生理的な Ca^{2+} 濃度における反応のため、重要であろう。

従来用いられてきた SDS-PAGE では、単量体と二量体 SOD1、ホロ型とアポ型 SOD1 の区別がつかなかったが、Blue Native PAGE を導入することにより、明確に分離することが可能になった。また、Blue Native PAGE は pH7.0 で SDS 非存在下という条件なので、タンパクが複合体を形成した状態で検出ができるので、ALS モデルを一例とした、凝集体形成機構を検討する場合には適した手法だといえる。hrCN-PAGE を用いた in gel activity assay への応用が可能であることが確認でき、オリゴマー SOD の活性測定が可能となった。

E. 結論

FALS 変異型 SOD1 やアポ型 SOD1 は TG2 の基質となり、Ca²⁺依存的に共有結合による SOD1 の数-多量体の形成が認められた。また Ca²⁺非依存的に S-S 結合による SOD1 の数-多量体も確認され、TG2 の PDI 活性によると考えられた。ALS における凝集体形成機構は不明であったが、FALS 変異型 SOD1 やアポ型 SOD1 が特異的に TG の基質となり、数-多量体を形成することが確認できた。

Blue Native PAGE により、アポ型、ホロ型、単量体、数量体、多量体 SOD1 が一度に検出できた。hrCN-PAGE/ in gel activity assay により、数量体-多量体を含む、複合体や凝集体を形成している SOD の活性を検討することができるようになり、オリゴマー-SOD1 も活性を保持しているという新たな知見を得た。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Shirato K, Nakajima K, Korekane H, Takamatsu S, Gao C, Angata T, Ohtsubo K, Taniguchi N. J Clin Biochem Nutr. 48, 20-25, 2011
- (2) Kitazume S, Tachida Y, Kato M, Yamaguchi Y, Honda T, Hashimoto Y, Wada Y, Saito T, Iwata N, Saido T, Taniguchi N. J Biol Chem, 17, 40097-103, 2010
- (3) Takeuchi S, Fujiwara N, Ido A, Ono M, Takeuchi Y, Tateno M, Suzuki K, Takahashi R, Tooyama I, Taniguchi N, Julien JP, Urushitani M. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 69, 1044-56, 2010
- (4) Akasaka-Manyu K, Manyu H, Sakurai Y, Wojczyk BS, Kozutsumi Y, Saito Y, Taniguchi N,

Murayama S, Spitalnik SL, Endo T. Glycobiology, 20, 99, 106, 2010

- (5) Kitazume S, Imamaki R, Ogawa K, Komi Y, Futakawa S, Kojima S, Hashimoto Y, Marth JD, Paulson JC, Taniguchi N. J Biol Chem, 285, 6515-21, 2010
- (6) Takamatsu S, Antonopoulos A, Ohtsubo K, Ditto D, Chiba Y, Le DT, Morris HR, Haslam SM, Dell A, Marth JD, Taniguchi N. Glycobiology, 20, 485-97, 2010
- (7) Taniguchi N. J Biol Chem, 284, 34469-78, 2009
- (8) Kotani K, Koibuchi H, Yamada T, Taniguchi N. Clin Chim Acta, 409, 67-9, 2009
- (9) Takahashi M, Kuroki Y, Ohtsubo K, Taniguchi N. Carbohydr Res 344, 1387-90, 2009
- (10) Taniguchi N, Hancock W, Lubman DM, Rudd PM. J Proteome Res. 8, 425-6, 2009
- (11) Kotani N, Gu J, Isaji T, Udaka K, Taniguchi N, Honke K. Proc Natl Acad Sci USA, 99, 1304-10, 2008
- (12) Park YS, Taniguchi N. Ann NY Acad Sci, 1126, 185-9, 2008
- (13) Taniguchi N. Mol Cell Proteomics, 7, 626-7, 2008

2. 学会発表

- (1) 藤原範子、伊原健太郎、鳥越秀峰、小笹哲夫、金田薫、佐々木澄美、若槻壮市、谷口直之、鈴木敬一、2-メルカプトエタノール修飾型 Cu,Zn-SOD の構造解析と安定性について、第33回日本分子生物学会第83回日本生化学会大会合同大会(BMB2010)、12. 7-10、神戸、2010
- (2) 松本紋子、松本明郎、谷口直之、筋萎縮性側索硬化症(ALS)の凝集体形成におけるトランスグルタミナーゼの関与、トランスグルタミナーゼ研究会、12. 8、神戸、2010

(3) 松本紋子、松本明郎、谷口直之、Improved analysis for the oligomeric SOD1s of familial amyotrophic lateral sclerosis and their SOD activities by high resolution clear native electrophoresis、第 33 回日本分子生物学会第 83 回日本生化学会大会合同大会(BMB2010)、12. 8、神戸、2010

(4) Fujiwara N, Nakano M, Kato S, Yoshihara D, Eguchi H, Sakiyama H, Taniguchi N. and Suzuki K. The 5th Joint Meeting of The Societies For Free Radical Research Australasia and Japan, Sydney, 12. 1-4, 2009.

(5) 藤原範子、伊原健太郎、若槻壮市、谷口直之、鈴木敬一郎、第 82 回日本生化学会大会、10. 21-24、神戸、2009

(6) 伊原健太郎、藤原範子、富本裕介、若槻壮市、谷口直之、鈴木敬一郎、3. 24-25、つくば、2009

(7) 松本紋子、松本明郎、谷口直之、Fridovich, I. 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 (BMB2008)、12. 9-12、神戸、2008

(8) 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, 11. 19-25, Indianapolis, USA. 2008

(9) 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、6. 19-20、京都、2008

(10) 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、6.19-20、京都、2008

(11) 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, 5. 25-30, Lucca, Italy, 2008

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

ALS 病態進行遅延を目指した肝細胞増殖因子発現

研究協力者：野本明男¹⁾⁶⁾

共同研究者：大岡静衣¹⁾²⁾、五十嵐博子¹⁾、千葉妃織¹⁾、端川 勉³⁾、
大谷若葉⁴⁾、船越 洋⁴⁾、中村敏一⁵⁾

¹⁾東京大学大学院医学系研究科微生物学講座、²⁾国立がん研究センター研究所がん幹細胞研究分野、
³⁾理化学研究所研究基盤センター脳形態解析支援ユニット、⁴⁾大阪大学大学院医学系研究科分子再生
医学、⁵⁾大阪大学先端イノベーションセンター、⁶⁾(財)微生物化学研究会・微生物化学研究所

研究要旨：筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の病態進行の遅延効果をもつ物質 (肝細胞増殖因子: HGF) を中枢神経系の運動細胞で発現させるため、運動神経細胞に特異性を持つポリオウイルス (PV) をベクターとして使用した。この3年間、分泌型蛋白質の発現は困難であるとされる PV ベクターを使いこなすために苦労したが、最終的には、成功した。さらに ALS モデルマウスに PV 受容体を持たせ、PV 感受性とした上で、PV の欠陥干渉 (DI) 粒子を基礎に HGF を発現できるベクターを構築し、骨格筋に接種することにより中枢神経系の運動神経細胞で HGF を発現させることに成功した。残念ながら、現在のところ、ALS 病態進行の遅延効果は見られていない。

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・病態進行の遅延を目指した発現ベクターを、運動神経細胞に向性を持つポリオウイルス (PV) に着目し、ALS 病態の改善効果を持つ肝細胞増殖因子 (HGF) 発現ベクターを作製することを目的とした。

これまでに、神経細胞は PV の1回の感染に対しては抵抗性を示すこと、PV による細胞変性効果の中心的役割を持つ PV 蛋白質 2A に対し神経細胞は抵抗性を示すことなどを明らかにしていたので、1回感染のみ起こす PV の欠陥干渉 (DI) 粒子を用いたベクターを作製し、外来 mRNA として、HGF の mRNA を使用する方針を立案した。

また、PV ベクターでは分泌型の蛋白質の発現は困難であることが知られており、この点も改善する必要があった。すなわち、モノシスト

ロニックな PV RNA をジシストロニックな RNA に変える方針を立てた。

次に、PV に感受性を持たない ALS モデルマウスに、PV 受容体を発現させ PV に感受性にする方針を立て、実験系を整備した。

最後に、臨床応用を考え、中枢に直接接種するのではなく、PV の体内伝播を利用して、骨格筋に接種する方法をとることにした。

B. 研究方法

PV 構造蛋白質コード領域を分泌型蛋白質であるヒト HGF のシグナル配列付き mRNA で置換し、この HGF コード領域を PV internal ribosome entry site (IRES) で、PV の RNA 複製用蛋白質コード領域を encephalomyocarditis virus (EMCV) IRES で発現するように設計したジシストロニック型 PV DI プラスミド pDI(HGF)d を作製し、これに由来するウイルス株 DI(HGF)d を得た。

PV 受容体を持つ ALS モデルマウスを作製するために、PV 受容体を持つトランスジェニックマウスと ALS モデルマウスを掛け合わせ、PV 感受性の ALS モデルマウスを作製した。

ALS モデルマウスの大腿部の骨格筋に DI(HGF)d 株を接種し、中枢の神経細胞での HGF 発現および PV 2C 蛋白質の発現を特異的抗体による免疫染色で観察した。同じ抗体は、培養細胞 (HeLa 細胞) への感染実験の際も使用した。

ALS 発症に対する DI(HGF)d 株接種の影響は、ロータロッドテストを行い観察した。

(倫理面への配慮)

動物実験および組換え生物実験に関しては、東京大学の規定に従って行った。

C. 研究結果

ジシストロニック型の RNA を使用することにより、分泌型蛋白質である HGF を HeLa 細胞で発現させることに成功した。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活性を保有していた。

ALS モデルマウスに DI(HGF)d 株を筋肉内接種した場合も、HGF は中枢神経系の α 運動神経細胞で接種 16 時間後に発現していることが観察された。発現持続時間は約 3 時間であった。

HGF を発現させても、ALS モデルマウスの ALS 病態を改善させることは出来なかった。

D. 考察

DI(HGF)d 株を筋肉内接種 16 時間後から、脊髓前角の α 運動神経細胞で PV 抗原ならびに HGF 抗原が観察された。我々は、光感受性の PV を筋肉内に接種すると、16 時間後から脊髓内で PV 力価の上昇が観察され始めることを既に明らかにしているのので、今回の HGF 抗原の

発現の時間に矛盾はない。また、 α 運動神経細胞は筋肉細胞へ直接軸索を伸ばしているものもあることから、DI(HGF)d 株の接種後に α 運動神経細胞で見られた HGF 抗原は、接種された DI(HGF)d ウイルスが感染した運動神経細胞の細胞体で、当ウイルス株が複製したものを検出したと考えられる。

PV ベクターによるマウス脊髓内運動神経細胞で HGF の発現に成功したが、ALS 病態への影響を観察することが出来なかった。一つの接種部位からのベクターの脊髓内到達部位は限られており、ALS 発症に関係している運動神経細胞に到達していなかった可能性、発現量の少ない可能性、および発現時間が短すぎる可能性などが考えられる。

E. 結論

PV 感受性マウスへ DI(HGF)d 株を筋肉内接種すると、脊髓内 α 運動神経細胞で HGF を発現することが明らかとなった。PV DI ベクターの筋肉内接種による、脊髓内運動神経細胞での外来分泌蛋白質発現が可能であることを示すことが出来た。

F. 健康危険情報

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

2A protease is not a prerequisite for poliovirus replication. Igarashi H, Yoshino Y, Miyazawa M, Horie H, Ohka S, Nomoto A. *J. Virol.*, 84(12): 5947-5957, 2010.

Poliomyelitis. Koike S, Nomoto A. *The Picornaviruses*, Chapter 21: 339-351, 2010.

Translation initiation from the ribosomal A site or P site, depending on the conformation of

RNA pseudoknot I in dicistrovirus RNAs. Kamoshita N, Nomoto A, RajBhandary UL. *Mol. Cell*, 35 (2): 181-190, 2009.

Receptor-dependent and -independent axonal retrograde transport of poliovirus in motor neurons. Ohka S, Sakai M, Bohnert S, Igarashi H, Deinhardt K, Schiavo G, Nomoto A. *J. Virol.*, 83(10): 4995-5004, 2009.

Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. Goto M, Honda E, Ogura A, Nomoto A, Hanaki K. *Bio Techniques*, 46: 167-172, 2009.

A major peroxiredoxin-induced activation of Yap1 transcription factor is mediated by reduction-sensitive disulfide bonds and reveals a low level of transcriptional activation. Tachibana T, Okazaki S, Murayama A, Naganuma A, Nomoto A, Kuge S. *J. Biol. Chem.*, 284(7): 4464-4472, 2009.

Comparative aspects on the role of polypyrimidine tract-binding protein in internal initiation of hepatitis C virus and poliovirus RNAs. Nishimura T, Saito M, Takano T, Nomoto A, Kohara M, Tsukiyama-Kohara K. *Comparat Immunol Microbiol Infect Dis.*, 31: 435-448, 2008.

2.学会発表

感染研究の中の真菌。野本明男。第31回関東医真菌懇話会、2010年7月3日、東京。

Molecular mechanisms of poliovirus dissemination pathways. Akio Nomoto. BIT's 1st World Congress of Virus and Infections-2010, July 31-August 3, 2010, Busan, South Korea.

ワクチンの新たな展開。野本明男。フォーラム2010:衛生薬学・環境トキシコロジー、

2010年9月9-10日、東京。

ポリオウイルスの血液脳関門透過機構。二瓶浩一、野本明男。第58回日本ウイルス学会、2010年11月7-9日、徳島。

運動神経初代培養細胞の分離培養系におけるポリオウイルス感染。大岡静衣、金田祥平、藤井輝夫、五十嵐博子、野本明男。第58回日本ウイルス学会、2010年11月7-9日、徳島。

脂肪酸合成酵素を介したパルミチン酸によるC型肝炎ウイルスの複製制御。棟方翼、野本明男、小原道法。第58回日本ウイルス学会、2010年11月7-9日、徳島。

野生型開始 tRNA と延長 tRNA を用いた PSIV IGR IRES 依存性の翻訳開始機構の解析。鴨下信彦、Uttam L. RajBhandary、野本明男。第11回RNAミーティング(第11回日本RNA学会年会)、2009年7月27-28日、新潟。

IRES 依存性翻訳開始における開始コドン AUG と開始 tRNA の果たす役割。鴨下信彦、野本明男。第57回日本ウイルス学会、2009年10月25-27日、東京。

サイクリン依存性リン酸化酵素阻害剤によるC型肝炎ウイルスの複製制御。棟方翼、稲田誠、野本明男、小原道法。第57回日本ウイルス学会、2009年10月25-27日、東京。

カニクイザルを用いたポリオウイルス経口感染実験。大岡静衣、永田典代、小池智、野本明男。第57回日本ウイルス学会、2009年10月25-27日、東京。

トランスフェリンレセプターにおけるウイルス粒子結合部位の解析。二瓶浩一、野本明男。第32回日本分子生物学会年会、2009年12月9-12日、横浜。

Interphase cyclin-dependent kinases regulate hepatitis C virus replication. 棟方翼、稲田誠、

野本明男、小原道法。第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9 - 12 日、横浜。

The molecular basis of poliovirus neurovirulence. Akio Nomoto. The International Symposium Hamamatsu University School of Medicine COE Program Medical Photonics Viruses Shed Light on Neuroscience, Feb. 9, 2008, Hamamatsu.

ウイルスの病原性発現機構。野本明男。第 82 回日本感染症学会総会、2008 年 4 月 17 - 18 日、島根。

Poliovirus receptor (hPVR/CD155)-dependent and -independent axonal retrograde transport of poliovirus in motor neurons. Seii Ohka, Mai Sakai, Stephanie Bohnert, Hiroko Igarashi, Katrin Deinhardt, Giampietro Schiavo, and Akio Nomoto. Europic 2008, May 26-30, 2008, Sitges, Barcelona.

Poliovirus capsid protein causes cytopathic effect in mammalian cells. Norie Matsuda, Hiroko Igarashi, Seii Ohka, Akiko Yanagiya, Hitoshi Horie, Miwako Miyazawa, and Akio Nomoto. IUMS 2008 XIV International Congress of Virology, August 10-15, 2008, Istanbul.

Receptor (hPVR/CD155)-dependent and -independent axonal retrograde transport of poliovirus. Seii Ohka, Mai Sakai, Stephanie Bohnert, Hiroko Igarashi, Katrin Deinhardt, Giampietro Schiavo, and Akio Nomoto. IUMS 2008 XIV International Congress of Virology, August 10-15, 2008, Istanbul.

Negative feed-back regulation of hepatitis C virus replication by TLR3. Tsubasa Munakata, and Akio Nomoto. IUMS 2008 XIV International Congress of Virology, August 10-15, 2008, Istanbul.

ジシストロウイルス IRES は、遺伝子間領

域のシュードノット I の異なる構造に基づき、2 通りの方法で翻訳を開始する。鴨下信彦、Uttam L. RajBhandary、野本明男。第 10 回 RNA ミーティング、2008 年 7 月 23 - 25 日、札幌。

Anti-hepatitis C virus activity of cyclin-dependent kinase inhibitors. Tsubasa Munakata, Makoto Inada, and Akio Nomoto. 第 8 回あわじしま感染症・免疫フォーラム、2008 年 9 月 7 - 11 日、淡路島。

Induction of hepatic TLR3 by E2F1 during hepatitis C viral infection. Tsubasa Munakata, Takaji Wakita, and Akio Nomoto. The 15th international symposium on hepatitis C virus and related viruses, October 5-9, 2008, Texas.

TLR3 は C 型肝炎ウイルス感染を制御する。棟方翼、脇田隆宇、野本明男。第 56 回日本ウイルス学会、2008 年 10 月 26 - 28 日、岡山。

2b 型 HCV MA 株の NS5A 領域を有するキメラウイルスの作製。岡本有加、中村香奈子、棟方翼、脇田隆宇、野本明男。第 56 回日本ウイルス学会、2008 年 10 月 26 - 28 日、岡山。

ポリオウイルス感染神経芽細胞腫由来細胞中で翻訳を持続する宿主遺伝子。鴨下信彦、水本清久、野本明男。第 56 回日本ウイルス学会、2008 年 10 月 26 - 28 日、岡山。

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。千葉妃織、大岡静衣、五十嵐博子、大谷若菜、船越洋、中村敏一、野本明男。第 31 回日本分子生物学会、2008 年 12 月 9 - 12 日、神戸。

ジシストロウイルスの翻訳開始機構。鴨下信彦、Uttam L. RajBhandary、野本明男。第 31 回日本分子生物学会、2008 年 12 月 9 - 12 日、神戸。

ポリオウイルスの新規侵入経路の発見。二

瓶浩一、坂井麻依、三瓶雅迪、神代浩司、大岡静衣、野本明男。第31回日本分子生物学会、2008年12月9-12日、神戸。

TLR3によるC型肝炎ウイルスの認識。棟方翼、岡本有加、野本明男。第31回日本分子生物学会、2008年12月9-12日、神戸。

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。

TDP-43 過剰発現による ALS サルおよびラットモデル動物の作製

研究協力者：水澤 英洋¹⁾

共同研究者：内田 あずさ¹⁾ 田尻美緒¹⁾ 笹栗 弘貴¹⁾ 木村 展之²⁾ 山本 由紀¹⁾

吉田 友教¹⁾ 大久保卓也¹⁾ 佐野達彦¹⁾ 内原俊記³⁾ 横田 隆徳¹⁾

1) 東京医科歯科大学大学院 脳神経病態学

2) 医薬基盤研究所 霊長類医科学センター

3) 東京都神経科学総合研究所 神経内科

研究要旨： Tar DNA-binding protein-43 (TDP-43) は筋萎縮性側索硬化症 (ALS) における神経細胞内のユビキチン陽性封入体の主要構成蛋白として同定された。本研究では、孤発性 ALS の病態における野生型 TDP-43 の役割を明らかにすることを目的として、1) 神経培養細胞において、内因性 TDP-43 の発現抑制によって caspase 依存性にアポトーシスが誘導されることを示した。2) アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いてラットおよびカンクイザルの頸髄前角細胞にヒト野生型 TDP-43 を過剰発現させ、その結果、カンクイザルにおいて進行性の前肢運動麻痺と、TDP-43 の細胞質への異常局在と凝集体形成および核の染色性低下という孤発性 ALS 類似の病理変化の再現に成功した。3) 一方、ラットの脊髄前角細胞では同様の実験にて、過剰発現 TDP-43 は核内に限局しており、TDP-43 の病態には霊長類とげっ歯類で種差が存在することが明らかになった。

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蛋白として同定された。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、核蛋白である TDP-43 の核内染色性が著明に低下していることが報告されている。さらに、孤発性 ALS および家族性 ALS において、TDP-43 遺伝子の点変異が次々と報告され、変異 TDP-43 遺伝子が ALS の原因遺伝子であることが判明しつつある。しかし、孤発性 ALS の病態における野生型 TDP-43 の役割は明らかになっていない。

今回、孤発性 ALS の病態における野生型 TDP-43 の役割を明らかにするため、カンクイ

ザルとフィッシャーラットの頸髄前角細胞にアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いて野生型 TDP-43 を過剰発現させ、神経症状および神経病理学的所見を観察し、ALS モデルとなりうるかを検討した。

B. 研究方法

<TDP-43 shRNA 発現プラスミドの作製>
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 N2a 培養細胞で内陰性 TDP-43 の抑制効率の高かった shRNA 1 を使用した

<AAV プラスミドベクターの作製>
野生型 TDP-43 は CMV プロモーターを含む

human TDP-43 発現ベクタープラスミド (Invitrogen) を用いた。この完全長 human TDP-43 cDNA の N 末端を flag (DYKDDDDK) で標識したものを、AAV2 の ITR を持つプラスミド (pAAV-MCS; Stratagene) に組み込み、野生型 TDP-43 を発現するコンストラクトを作製した。

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 (承認番号 2008-27) を得て行った。

<AAV プラスミドベクター注入>

カニクイザル (6-7歳♂) 4頭、フィッシャーラット (10週齢♂) 10匹に対して抱水クロラル 3.0 ml/kg、ケタミン 0.5 ml/kg にて腹腔麻酔後、椎弓切除術を行って、第6頸髄の1側前角付近に 3.0×10^{12} vg/ml AAVベクター溶液を注入した。

すべての動物実験は医薬基盤研医科学霊長類センター (承認番号(#DS20-45, #DS21-19,) 東京医科歯科大学動物実験倫理委員会の承認 (承認番号81165) を得て行った。

<神経症状評価>

カニクイザルは行動解析とアップルテスト、フィッシャーラットは握力計(MK380CM/F MUROMACHI KIKAD)による筋力測定(週 3回)を行った。

<神経生理評価>

末梢神経伝導検査は、両側の正中神経を手関節部及び肘部で電気刺激し、拇指球筋より複合筋活動電位を、針筋電図は前腕筋電屈筋より MEB 2000 筋電計 (日本光電) で記録した。

<神経病理評価>

脊髄は 10%緩衝ホルマリンまたはザンボーニ液 (4% paraformaldehyde) 固定後パラフィン包埋し、HE 染色、ニッスル染色および免疫染色を行った。

一次抗体は抗 TDP-43 抗体 (Protein Tech) (1 : 3000)、抗 Flag 抗体 (Sigma) (1 : 500) ,

抗ユビキチン抗体(Dako)(1:3000)、抗リン酸化 TDP 抗体(Cosmo Bio)(1 : 1500)、二次抗体は抗 rabbit IgG ヤギ抗体、抗 mouse IgG ウマ抗体 (VECTOR) (1 : 1000)を用いた。

前根は 2 %グルタールで固定後エボン包埋し、トルイジンブルー染色を行った。

C.研究結果

<TDP-43 発現抑制効果>

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、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 caspase 依存性のアポトーシスを示した。

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。

<TDP-43 過剰発現によるモデル動物の神経症状の出現> TDP-43 を過剰発現させた個体 (n=3) では、AAV 注入後約 2 週から注入側前肢に進行性の麻痺を生じ始め、4 週間には上腕は中等度の運動麻痺、手指は完全麻痺となった。アップルテストによる評価では、TDP-43 high dose 個体では術後 1 週、TDP-43 low dose 個体で術後 2 週から 3 週にかけ利き手の交代が見られ始め、最終的に使用する手がほぼ逆転した。

TDP-43 を過剰発現させたラット (n=5) では、AAV 注入後約 2 週から注入側前肢に進行性の麻痺を生じ始め、4 週間には上腕は中等度の運動麻痺手指は完全麻痺となった。握力計においては術後第 2 週から右側に対する左側の有意な筋力低下が認められた。

<神経生理学的評価>

カニクイザル、ラットともに術後第 4-6 週に、前肢屈筋の針筋電図において fibrillation、positive sharp wave の脱神経所見が記録され、複合筋活動電位は徐々に振幅が低下した。

<神経病理学的評価>

TDP-43 を発現する AAV プラスミドベクターを注入したカニクイザルの脊髄において、前角細胞に野生型 human TDP-43 が発現していることを確かめた。抗 flag 抗体により免疫染色を行うと、注入部位付近のほぼ全ての脊髄前角細胞に対し染色性が認められ、野生型 human TDP-43 が過剰発現し多くの前角細胞においては、TDP-43 は細胞質に異常分布していた。また、抗 TDP-43 抗体による免疫染色では、野生型 human TDP-43 が細胞質に過剰発現している前角細胞において、内因性サル TDP-43 の発現低下が観察された。また、それらの細胞の中には、変性突起や TDP-43 の細胞質凝集像が認められるものがあつた。

ラットにおいても Flag-hTDP-43 術後注入群の脊髄 Flag 染色においてはほぼ注入側に限局する陽性像が見られたが、ほぼすべての前角細胞において、その発現は核に限局していた。

カニクイザル、ラットともに Flag-hTDP-43 術後の注入側の前根で、ミエリン球と大径線維の脱落が見られた。

D. 考察

本研究では、カニクイザル、ラットの頸髄前角細胞に野生型 hTDP-43 を過剰発現させることにより、ALS 症例類似の進行性の運動麻痺、筋力低下及び筋萎縮という神経症状および、筋電図における脱神経所見が再現された。

神経病理学的には、カニクイザルで TDP-43 の細胞質への異常局在、凝集体形成および核の染色性低下という弧発性 ALS 類似の病理変化の再現に成功した。一方で、ラットでは神経症状は示したものの、神経病理学的に TDP-43 は核に局在しており、TDP-43 の病態生理に種差を認めた。

実際の ALS の剖検脊髄において TDP-43 の発現が上昇しているか否かは明らかではないが、

タウ陰性のユビキチン陽性前頭側頭葉変性症 (FTLD-U) や運動ニューロン疾患を伴う前頭側頭葉変性症 (FTLD-MND) の剖検前頭葉において TDP-43 mRNA の発現が約 1.5 倍に上昇していたことが報告されている。

以上から野生型 hTDP-43 を過剰発現したカニクイザルはラットより弧発性 ALS のモデルとして有望であり、その分子機序の解明に有力なツールになると期待している。

E. 結論

カニクイザルの頸髄前角細胞に AAV ベクターで野生型 TDP-43 を過剰発現させることにより、進行性の前肢運動麻痺と、TDP-43 の細胞質への異常局在と凝集体形成および核の染色性低下という弧発性 ALS 類似の病理変化の再現に成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sasaguri H, Mitani T, Anzai M, Kubodera T, Saito Y, Yamada H, Mizusawa H, Yokota T. Difference in silencing efficiency among tissues and lack of oversaturation of microRNA pathway in short hairpin RNA transgenic mice. FEBS lett 583: 213-218, 2009
2. Uchida A, Sasaguri H, Kimura N, Ono F, Sakaue F, Hirai T, Tajiri M, Kanai K, Ohkubo T, Sano T, Shibuya K, Kobayashi M, Ueno T, Sunaga F, Ikeda S, Kubodera T, Tomori M, Sakaki K, Kusano K, Enomoto M, Yokota S, Hirai Y, Yasutomi Y, Uchihara T, Kuwabara S, Mizusawa H and Yokota T. Non-human primate model of ALS with cytoplasmic mislocalization of wild-type TDP-43 (in submission)

2.学会発表

1. 渡邊あずさ, 山本由紀, 吉田友教, 笹栗弘貴, 横田隆徳, 水澤英洋. TDP43 タンパクの shRNA 導入における神経細胞死への影響. 第 50 回日本神経学会総会, 2009. 5. 20-22, 仙台
2. 内田あずさ, 佐野達彦, 大久保卓哉, 金井数明, 澁谷和幹, 笹栗弘貴, 久保寺隆行, 平井高志, 草野和正, 榎本光宏, 内原俊記, 桑原 聡, 水澤英洋, 横田隆徳. 孤発性筋萎縮性側索硬化症のモデルラット作製. 第 51 回日本神経学会総会, 2010. 5. 20-22, 東京
3. Uchida A, Sasaguri H, Kimura N, Sakaue F, Uchihara T, Kuwabara S, Mizusawa H and Yokota T. Overexpression of wild type TDP-43 in motoneuron of non-human primate recapitulates ALS. International Conference of Alzheimer Disease 2010.7.10, Honolulu, USA

H.知的所有権の取得状況 (予定を含む)

- 1.特許取得
- 2.実用新案登録
- 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
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	3068-3098	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
Suzuki K, Katsuno M, Banno H, Takeuchi Y, Atsuta N, Ito M, Watanabe H, Yamashita F, Hori N, Nakamura T, Hirayama M, Tanaka F, <u>Sobue G</u>	CAG repeat size correlates to electrophysiological motor and sensory phenotypes in SBMA	Brain	131	229-239	2008
Palazzolo I, Stack C, Kong L, Musaro A, Adachi H, Katsuno M, <u>Sobue G</u> , Taylor JP, Sumner CJ, Fischbeck KH, Pennuto M	Overexpression of IGF-1 in muscle attenuates disease in a mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy	Neuron	63	316-328	2009
Iguchi Y, Katsuno M, Niwa J, Yamada S, Sone J, Waza M, Adachi H, Tanaka F, Nagata K, Arimura N, Watanabe T, Kaibuchi K, <u>Sobue G</u>	TDP-43 depletion induces neuronal cell damage through dysregulation of Rho family GTPases	Hum Mol Genet/ Biol Chem	284	22059-22066	2009
Katsuno M, Adachi H, <u>Sobue G</u>	Getting a handle on Huntington's disease: the case for cholesterol	Nat Med	15	253-254	2009
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, 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	65	140-150	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>	Research Committee on the Neurodegenerative Diseases of Japan: Age at onset influences on wide-ranged clinical features of sporadic amyotrophic lateral sclerosis	J Neurol Sci	276	163-169	2009
Sone J, Niwa JI, Kawai K, Ishigaki S, Yamada SI, Adachi H, Katsuno M, Tanaka F, Doyu M, <u>Sobue G</u>	Dorfin ameliorates phenotypes in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis	J Neurosci Res	88	123-135	2010
Kato T, Emi M, Sato H, Arawaka S, Wada M, Kawanami T, Katagiri T, Tsuburaya K, Toyoshima I, Tanaka F, <u>Sobue G</u> , Matsubara K	Segmental copy-number gain within the region of isopenentenyl diphosphate isomerase genes in sporadic amyotrophic lateral sclerosis	Biochem Biophys Res Commun	402	438-442	2010
Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Takeuchi Y, Kawashima M, Yabe I, Sasaki H, Aoki M, Morita M, Nakano I, Kanai K, Ito S, Ishikawa K, Mizusawa H, Yamamoto T, Tsuji S, Hasegawa K, Shimohata T, Nishizawa M, Miyajima H, Kanda F, Watanabe Y, Nakashima K, Tsujino A, Yamashita T, Uchino M, Fujimoto Y, Tanaka F, <u>Sobue G</u> ; Japan SBMA Interventional Trial for TAP-144-SR (JASMITT) study group	Efficacy and safety of leuprorelin in patients with spinal and bulbar muscular atrophy (JASMITT study): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial	Lancet Neurol	9	875-884	2010

Katsuno M, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Doi H, Kondo N, Mizoguchi H, Nitta A, Yamada K, Banno H, Suzuki K, Tanaka F, <u>Sobue G</u>	Disrupted transforming growth factor-beta signaling in spinal and bulbar muscular atrophy	J Neurosci	30	5702-5712	2010
Senda J, Kato S, Kaga T, Ito M, Atsuta N, Nakamura T, Watanabe H, Tanaka F, Naganawa S, <u>Sobue G</u>	Progressive and widespread brain damage in ALS: MRI voxel-based morphometry and diffusion tensor imaging study	Amyotroph Lateral Scler	12	59-69	2011
Katsuno M, Adachi H, Banno H, Suzuki K, Tanaka F, <u>Sobue G</u>	Transforming growth factor-b signaling in motor neuron diseases	Curr Mol Med	11	48-56	2011
Iida A, Takahashi A, Deng M, Zhang Y, Wang J, Atsuta N, Tanaka F, Kamei T, Sano M, Oshima S, Tokuda T, Morita M, Akimoto C, Nakajima M, Kubo M, Kamatani N, Nakano I, <u>Sobue G</u> , Nakamura Y, Fan D, Ikegawa S	Replication analysis of SNPs on 9p21.2 and 19p13.3 with amyotrophic lateral sclerosis in East Asians	Neurobiol Aging	in press	in press	2011

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
Nagoshi N, Shibata S, Kubota Y, Nakamura M, Nagai Y, Satoh E, Okada Y, Mabchi 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 Bone Marrow, Dorsal Root Ganglia and Whisker Pad of Adult Rodents	Cell Stem Cell	2	392-403	2008
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
Kohyama J, Takatsuka E, Yamashita T, Namiki J, Hsieh J, Gage FH, Namihira M, <u>Okano H</u> , Sawamoto K, Nakashima K	Epigenetic regulation of neural cell differentiation plasticity in the adult mammalian brain	Proc Natl Acad Sci USA	105	18012-18017	2008
Akamatsu W, DeVeale B, <u>Okano H</u> , Cooney AJ, van der Kooy D	Suppression of Oct4 by germ cell nuclear factor restricts pluripotency and promotes neural stem cell development in the early neural lineage	J Neurosci	29	2113-2124	2009
Sasaki E, Suemizu H, Shimada A, Hanazawa K, Oiwa R, Kamioka M, Sotomaru Y, Hirakawa R, Eto T, Shiozawa S, Maeda T, Ito R, Kito C, Yagihashi C, Kawai K, Miyoshi H, Tanioka Y, Tamaoki N, Habu S, <u>Okano H</u> , Nomura T	Generation of transgenic non-human primates with germ line transmission	Nature	459	523-527	2009
Miura K, Okada Y, Aoi T, Okada A, Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Ohnuki M, Ogawa D, Ikeda E, <u>Okano H</u> , Yamanaka S	Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines	Nature Biotechnol	27	743-745	2009
Kumagai G, Okada Y, Yamane J, Kitamura K, Nagoshi N, Mukaino M, Tsuji O, Fujiyoshi K, Okada S, Shibata S, Toh S, Toyama Y, Nakamura M, <u>Okano H</u>	Roles of ES cell-derived gliogenic neural stem/progenitor cells in functional recovery after spinal cord injury	PLOS ONE	4	e7706	2009
Kaneko N, Marin O, Koike M, Hirota Y, Uchiyama Y, Wu JY, Lu Q, Tessier-Lavigne M, Alvarez-Buylla A, <u>Okano H</u> , Rubenstein JL and Sawamoto K	New neurons clear the path of astrocytic processes for their rapid migration in the adult brain	Neuron	67	213-223	2010

Kuwako K., Kakumoto K, Imai T, Igarashi M, Hamakubo T, Sakakibara S, Tessier-Lavigne M, Okano HJ, <u>Okano H</u>	Neural RNA-binding protein Musashi I controls midline crossing of precerebellar neurons through post-transcriptional regulation of Robo3/Rig-1 expression	Neuron	67	407-421	2010
Tsuji O, Miura K, Okada Y, Fujiyoshi K, Nagoshi N, Kitamura K, Kumagai G, Mukaino M, Nishino M, Tomisato S, Higashi H, Ikeda E, Nagai T, Kohda K, Takahashi K, Okita K, Katoh H, Matsuzaki Y, Yuzaki M, Toyama Y, Nakamura M, Yamanaka S and <u>Okano H</u>	Therapeutic effect of the appropriately evaluated 'safe' iPS cells for spinal cord injury	Proc Natl Acad Sci USA	107	12704-12709	2010
Hirota Y, Meunier A, Huang S, Shimozawa T, Yamada O, Kida YS, Inoue M, Ito T, Kato H, Sakaguchi M, Sunabori T, Nakaya M, Nonaka S, Ogura T, Higuchi H, <u>Okano H</u> , Spassky N, Sawamoto K	Planar polarity of the multiciliated ependymal cells includes asymmetric location of basal bodies	Development	137	3037-3046	2010
Kojima T, Hirota Y, Ema M, Takahashi S, Miyoshi I, <u>Okano H</u> , Sawamoto K.	Subventricular zone-derived neural progenitor cells migrate along a blood vessel scaffold toward the post-stroke striatum	Stem Cells	28	545-554	2010
Sawamoto K, Yuki Hirota Y, Alfaró-Cervello C, Soriano-Navarro M, He X, Hayakawa-Yano Y, Yamada M, Hikishima K, Tabata H, Iwanami A, Nakajima K, Toyama Y, Itoh T, Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM, <u>Okano H</u>	Cellular composition and organization of the subventricular zone and rostral migratory stream in the adult and neonatal common marmoset brain	J Comp	519	690-713	2011
Ishizuka K, Kamiya A, Oh EC, Kanki H, Seshadri S, Robinson J, Murdoch H, Dunlop AJ, Kubo K, Furukori K, Huang B, Zeledon M, Hayashi-Takagi A, <u>Okano H</u> , Nakajima K, Houslay MD, Katsanis N, Sawa A	Phosphorylation of serine-710 in DISC1 activates a molecular switch from progenitor proliferation to neuronal migration in the developing cortex	Nature	In Press		

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
Iwata NK, Aoki S, Okabe S, Arai N, Terao Y, <u>Kwak S</u> , 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, <u>Kwak S</u>	Determination of editors of mRNAs with site-selective A-to-I editing positions	Neurosci Res	61	201-206	2008
Buckingham SD, <u>Kwak S</u> , Jones AK, Blackshaw SE, Sattelle DB	Edited GluR2, a gatekeeper for motor neuron survival?	BioEssays	30	1185-1192	2008
<u>Kwak S</u> , Nishimoto Y, Yamashita T	Newly identified ADAR2-mediated editing positions as a useful tool for ALS research	RNA Biology	5	193-197	2008
日出山拓人, 郭 伸	筋萎縮性側索硬化症のAMPA受容体仮説	Annual Review		212-221	2008
awada J, Yamashita T, Aizawa H, Aburakawa Y, Hasebe N, <u>Kwak S</u>	Effects of antidepressants on GluR2 Q/R site-RNA editing in a modified HeLa cell line	Neurosci Res	64	251-258	2009
郭 伸	筋萎縮性側索硬化症	暮らしと健康	64	38-40	2009

Aizawa H, Sawada J, Hideyama T, Yamashita T, Katayama T, Hasebe N, Kimura T, Yahara O, <u>Kwak S</u>	TDP-43 pathology in sporadic ALS occurs in motor neurons lacking RNA editing enzyme ADAR2	Acta Neuropathol	120	75-84	2010
Hideyama T, Yamashita T, Suzuki T, Tsuji S, Higuchi M, Seeburg PH, Takahashi R, Misawa H, <u>Kwak S</u>	Induced loss of ADAR2 engenders slow death of motor neurons from Q/R site-unedited GluR2	J Neurosci	30	11917-11925	2010
Hideyama T, Yamashita Y, Nishimoto Y, Suzuki T, <u>Kwak S</u>	Novel etiologic and therapeutic strategies for neurodegenerative diseases: RNA editing enzyme abnormality in sporadic amyotrophic lateral sclerosis	J Pharmacol Sci	113	9-13	2010
<u>Kwak S</u> , Hideyama T, Yamashita T, Aizawa H	AMPA receptor-mediated neuronal death in sporadic ALS	Neuropathology	30	182-188	2010
日山拓人、郭 伸	孤発性ALS患者運動ニューロンに見出された分子病態RNA editing異常に基づいたモデルマウスの開発	医学のあゆみ	235	246-250	2010

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 SJ, Boillee S, Fujimori-Tonou N, Yamashita H, Gutmann DH, <u>Takahashi R</u> , Misawa H, Cleveland DW	Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis	Nat. Neurosci	11	251-253	2008
Moriwaki Y, Kim YJ, Ido Y, Misawa H, Kawashima K, Endo S, <u>Takahashi R</u>	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, <u>Takahashi R</u> , Mikoshina K, 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 HQ, <u>Takahashi R</u> , Hasegawa K, Oota E, Lu B	Phosphorylation of 4E-BP by LRRK2 affects the maintenance of dopaminergic neurons in Drosophila	EMBO J	27	2432-2443	2008
Wang HQ, Imai Y, Inoue H, Kataoka A, Iita S, Nukina N, <u>Takahashi R</u>	Pael-R 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 HQ, Iwai A, Ikeuchi K, Imai Y, Kataoka A, Nukina N, <u>Takahashi R</u> , 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 LM, Downward J, <u>Takahashi R</u>	Accumulation of HtrA2/Omi in neuronal and glial inclusions in brains with alpha-synucleinopathies	J Neuropathol Exp Neurol	67	984-993	2008
Takeuchi H, Yanagida T, Inden M, Takata K, Kitamura Y, Yamakawa K, Sawada H, Izumi Y, Yamamoto N, Kihara T, Uemura K, Inoue H, Taniguchi T, Akaike A, <u>Takahashi R</u> , Shimohama S	Nicotinic receptor stimulation protects nigral dopaminergic neurons in rotenone-induced Parkinson's disease models	J Neurosci Res	87	576-585	2009
Uemura K, Lill CM, Banks M, Asada M, Aoyagi N, Ando K, Kubota M, Kihara T, Nishimoto T, Sugimoto H, <u>Takahashi R</u> , Hyman BT, Shimohama S, Berezovska O, Kinoshita A	N-cadherin-based adhesion enhances Abeta release and decreases Abeta42/40 ratio	J. Neurochem	108	350-360	2009
Ikeuchi K, Marusawa H, Fujiwara M, Matsumoto Y, Endo Y, Watanabe T, Iwai A, Sakai Y, <u>Takahashi R</u> , Chiba T	Attenuation of proteolysis-mediated cyclin E regulation by alternatively spliced Parkin in human colorectal cancers	Int J Cancer	125	2029-2035	2009
Kitaguchi H, Tomimoto H, Ihara M, Shibata M, Uemura K, Kalaria RN, Kihara T, Asada-Utsugi M, Kinoshita A, <u>Takahashi R</u>	Chronic cerebral hypoperfusion accelerates amyloid beta deposition in APPSwInd transgenic mice	Brain Res	1294	202-210	2009