



戦略的創造研究推進事業
研究領域「脳を守る」

研究課題
「脳虚血により引き起こされる神経細胞死
防御法の開発」

研究期間：平成10年12月1日～平成15年11月30日

研究代表者
遠山 正彌

大阪大学大学院医学系研究科教授

1. 研究実施の概要

研究課題名 “脳虚血により引き起こされる神経細胞死防御法の開発”

「脳虚血における神経細胞死は小胞体の機能異常を起源とする」

神経細胞は低酸素状態で容易く死に至るがアストロサイトは低酸素刺激下を生き残る事は良く知られている。我々はアストロサイトが低酸素刺激を加えられた際に低酸素刺激下を生き残る要素を新たに発現するため低酸素刺激下を生き残りうると思定した。そこで低酸素刺激を加えたアストロサイトが特異的に発現する因子の探索を行い **Oxygen Regulated Protein 150(ORP150)**を同定した。ORP150は熱ショック蛋白群に属するが細胞質に存在するHRP群と異なり小胞体に発現する。ORP150の発現を抑制したアストロサイトは低酸素刺激により容易くアポトーシス様の死に至る。すなわちORP150はアストロサイトが低酸素刺激下を生き残るための必須の因子であることが明らかとされた。またORP150の発現を抑制し低酸素刺激を加えると小胞体からゴルジ装置への蛋白輸送が障害する。即ちORP150は低酸素刺激下で、言い換えるとATP枯渇下で小胞体からゴルジ装置へ蛋白輸送を担いうる最後のシャペロンである。逆に神経細胞にORP150を強制発現すると神経細胞は低酸素刺激下でも生き残る。神経細胞では低酸素負荷時を生き残りうる為のORP150発現が十分ではなく小胞体の機能(ゴルジ装置への物質輸送)を守りきれないため神経細胞死を引き起こすことが明らかとなった。これらの*in vitro*の結果を*in vivo*で確認するため神経細胞に特異的にORP150の発現上昇をきたすトランスジェニック(TG)マウスを作成した。通常のマウスで脳梗塞を引き起こすと幅広く認められる梗塞巣がこのTGマウスでは著しく縮小していた。これらの事実は脳虚血時に神経細胞でのORP150発現をきたす因子を導入できれば脳虚血による神経細胞死を防ぎうる事を意味する。また我々は脳虚血の様な激しい小胞体ストレスを加えるとその情報が小胞体よりミトコンドリアに伝達されミトコンドリアではミトコンドリアATP依存性プロテアーゼLonの発現が高まりミトコンドリアの機能を守るべく働く事を明らかとした。

「孤発性アルツハイマー病(SAD)における神経細胞死は低酸素刺激により発現誘導される因子が小胞体の機能を障害するために引き起こされる」

アルツハイマー病は痴呆をもたらす疾患で高齢社会の現在が克服する最大の課題の一つと言っても過言ではない。しかしながらアルツハイマー病の良い治療薬は未だ開発されていない。その際大の理由はアルツハイマー病で痴呆を引き起こす脳の神経細胞の死の機序が解明されていない点にある。

アルツハイマー病の原因は小胞体の機能異常に起因する

アルツハイマー病は遺伝子の障害にリンクして若年で家族性に発症する家族性アルツハイマー病(FAD)(約5%)と原因は不明で50才以降に主として発症する孤発性アルツハイマー病(SAD)(約95%)に分けられる。FADにリンクする遺伝子としてはプレセニン1(P S 1)遺伝子、プレセニン2(P S 2)遺伝子、アミロイド前駆蛋白遺伝子(APP)の三種の遺伝子の変異が確認されている。しかしながらなぜ痴呆を引き起こす原因となる脳の神経細胞死が引き起こされるかは不明であった。ましてやSADでは原因物質の推測さえなされていなかった。一方アルツハイマー病の病理像は家族性アルツハイマー病と孤発性アルツハイマー病の両者で共通である。即ちこの両者における神経細胞死が共通の機序で引き起こされることが推測される。結果から述べると蛋白質の品質管理にあたっている小胞体の機能障害が

FAD と SAD のいずれにおいても神経細胞死を引き起こす原因となることが明らかとされた。

小胞体の蛋白品質管理機構とは？

リボソームで作成された蛋白質は小胞体で様々な修飾をうけ折り畳まれた蛋白質となる。もしこの折り畳みが正常であればゴルジ装置に輸送される。しかしながら折り畳み不良な蛋白が低酸素、低グルコース、カルシウムイオンの攪乱などにより小胞体で産生されれば小胞体に存在する三種のセンサー、Ire1,ATF6,PERK により感知される。すると Ire1 はリン酸化されまた ATF6 からは 50kDa の断片が切り離される。リン酸化 Ire1 と切り離された ATF6 断片は GRP78 発現を高める。発現上昇した GRP78 は折り畳み不良蛋白を正常にする指令を出す一方 PERK が折り畳み不良蛋白の存在を感知するとリン酸化を受け、リン酸化 PERK は eIF2 α をリン酸化する。リン酸化 eIF2 α は蛋白補運役を抑制しこれ以上折り畳み不良蛋白が小胞体内に蓄積するのを防ぐ。このようにして小胞体内では不良蛋白が蓄積するのを防ぐ。

アルツハイマー病の神経細胞死は小胞体の機能異常を起源とする神経細胞死？

FADでは三種の遺伝子の変異があることは既に述べた。そのうち70%以上を占めるPS1遺伝子の変異を例として検討すると変異したPS1遺伝子より産生される変異PS1蛋白は小胞体のセンサーと結合してその機能を障害することを明らかとした。すなわちFADでは小胞体のセンサー機能が障害されている。このような状態で脳に低酸素や低グルコース、カルシウム環境の変化など小胞体内に不良蛋白を産生させる刺激（小胞体ストレス）が加えられると小胞体内では次々と産生される折り畳み不良蛋白の処理が出来ずに小胞体が膨満し破裂、神経細胞死へと至る。一方SADではエクソン5を欠失するPS2mRNAとこの異常スプライシングをうけたエクソン5を欠損するPS2mRNA遺伝子から産生されるPS2スプライシング変種蛋白がもれなく発現していることを見出した。しかもこのPS2変種蛋白はPS1変異蛋白と同様に小胞体のセンサー機序を障害する。またこのPS2変種蛋白は低酸素刺激に特異的に且つ神経細胞に特異的に発現する。すなわち長年の極小さい梗塞などが存在すれば神経細胞はPS2変種蛋白を産生する。このPS2変種蛋白は小胞体のストレスセンサーを障害する。そこに低酸素や低グルコース、カルシウム環境の変化など小胞体内に不良蛋白を産生させる刺激が加わると細胞死が引き起こされる。

アルツハイマー病における神経細胞死へのミトコンドリアの関与は乏しい？

アルツハイマー病では小胞体の機能異常をきたすと小胞体に局在するカスパー4が活性化し細胞死に至る事を見出した。同じ小胞体の機能異常を起源とする神経細胞死でもアルツハイマー病と脳虚血ではその下流の機序が大きく異なることが解明された。

アルツハイマー病の早期診断薬、根本的治療薬の開発は可能か？

以上の結果はアルツハイマー病の内95%以上を占めるSADの患者脳ではPS2変種蛋白が発現しそこに小胞体ストレスが加わると不良蛋白が過剰蓄積し神経細胞死を引き起こすことを示す。すなわちSADの脳脊髄液中や血中にPS2変種蛋白が漏出する可能性が浮かび上がる。事実、孤発性アルツハイマー病の患者の脳脊髄液中には正常の高齢者と比べて高いPS2変種蛋白の濃度が観察されPS2変種蛋白をマーカーとするSAD早期診断薬の開発に道がひらかれた。血中レベルでの測定が可能となれば患者に苦痛を与えない早期診断薬の開発は可能となる。

早期診断薬の開発が可能となったとしても根本的治療薬が開発されねば患者さんにとって

福音とはいえない。PS2変種蛋白が小胞体の機能を障害し神経細胞死を引き起こす。従って、PS2変種蛋白の発現機序を解明し制御出来る因子を見つけ得ればSADの根本的治療薬の開発につながる。この考えに基づきPS2変種蛋白の発現機序の解明を行った。PS2変種蛋白は低酸素により誘導されるHMGA1aと呼ばれる物質がPS2の前駆体遺伝子エクソン5の3'端の特異構造に結合し、エクソン5をスキップすることにより発現することが明らかとされた。次いで低酸素刺激中にPS2前駆体遺伝子の構造中HMGA1aが結合するエクソン5の特異構造をおとりとして(おとり遺伝子)前もって投与するとこのおとり遺伝子が前もってHMGA1aと結合しその結果HMGA1aはPS2前駆体遺伝子と結合できない。その結果低酸素刺激によりHMGA1aが発現されたとしてもHMGA1aはPS2前駆体mRNAエクソン5と結合できず、その結果PS2変種蛋白の発現は抑制され神経細胞死が救済される。我々が用いたのはおとり遺伝子と呼ばれる核酸であるがこれは分解も早く治療薬としては不向きである。もしこのおとり遺伝子に代わる蛋白性分子が見つければSADの根本的治療薬が開発される。

不可能とされている中枢神経の軸索再生をめざして

上述した戦略で神経細胞を救済し得たとしても失われた神経回路の再建が出来なければ機能再建は望めない。この機能再建の道を閉ざしてきた事実は「末梢神経の軸索は再生するが中枢神経の軸索は再生しない」という事実である。一方神経幹細胞の移植が中枢神経系の機能回復の有力な手段として期待されてきたが移植された神経細胞が腫瘍化すること、また残存神経細胞の軸索再生が不可能なため神経回路の修復がはかれないなどの困難な問題を抱えている。

いずれの課題の克服にも不可能とされている中枢神経の軸索再生が不可欠である。我々は中枢神経の軸索再生の抑制機序を解明し抑制機序の解除因子の探索に成功しこれまで不可能であるとされてきた中枢神経の軸索再生に成功した。

これまでオリゴデンドログリアに発現するMAG,Nogo,Omgpの3種が中枢神経の軸索再生抑制因子として見出されている。我々はこの3種の因子の軸索再生抑制機序を解明した。すなわち3種の因子はすべてからp75受容体を活性化する。Rhoは通常不活性型としてRho-GDI=Rho-GDP複合体を形成して細胞質に存在する。P75が活性化すると複合体のうちRho-GDIがp75のMasutoparan-like domainに結合する。すると複合体からRho-GDPが解離し、解離したRho-GDPは直ちに活性型のRho-GTPに変換される。活性型のRho-GTPはその下流のRhoカインースを活性化し、その結果中枢神経の軸索再生を抑制していることを解明した。次いで我々はこの機序を解除する因子の探索に取り掛かり2種の因子(pep5,p21)の同定に成功した。P75をリン酸化する新規PKAのスプライシングバリエントであるpep5はp75とRHO-GDIとの結合を阻害することによりRhoの活性化を阻害し神経再生を促進する。一方p21はRhoカインースを阻害する。さらに脊髄損傷を引き起こしたマウスにp21を投与するとこれまで不可能とされていた損傷軸索の再生と歩行運動の回復に成功した。これらの事実はpep5,p21などRhoの機能抑制を引き起こす因子が脊髄損傷、脳挫傷などの治療に極めて有効である事を示す。

2. 研究構想

アストロサイトは虚血負荷に耐性を示すが神経細胞は虚血負荷に対して極めて脆弱である。我々はアストロサイトが虚血負荷に対して耐性であるという事実に着目しアストロサイトが虚血負荷時に特異的に発現する因子を同定しその因子を神経細胞に強制発現し得れば虚血に

よる神経細胞死を救いうると考え本研究計画を立案した（ストレス蛋白グループ）。その結果 **ORP150** が我々の求める因子であることをつきとめた。この研究の過程でアルツハイマー病における神経細胞死も虚血が重要な因子である可能性を見出しアルツハイマー病の神経細胞死の機序の解明とその防御が研究の柱として追加された（アルツハイマーグループ）。さらに我々は脳虚血やアルツハイマー病において神経細胞死を防ぎ得たとしても失われた神経回路の再建を果たさなければ真の機能再建は望めない、と考えこれまで不可能とされてきた中枢神経軸索の再生を第三の柱として加えた（再生・機能修復グループ）。

3. 研究実施内容

(1) 研究内容及び成果

ストレス蛋白グループ

i) はじめに

脳血管障害は我が国における成人死亡原因の第3位である。それだけでなく、脳血管障害に起因する神経障害は寝たきりや痴呆状態を作り出し、脳血管障害にかかわる医療費は依然として第1位となっている。高齢者人口が激増し医療環境が充実している中で、いわゆる卒中死を免れたものの片麻痺や痴呆、失語症等の後遺症に苦しむ要介護患者は今日着実に増加している。虚血負荷には熱ショック蛋白(HSPs)などのストレス蛋白の発現が伴い、あらかじめ非致死的な虚血負荷を加えることにより、虚血に対する耐性を誘導しうることなどが報告されている。一方、培養細胞などを低酸素環境に暴露すると小胞体ストレス蛋白が誘導されることから、虚血によるストレスが小胞体を標的とすること、すなわち、虚血という環境が蛋白のホールディング異常を引き起こし、小胞体を起源とする細胞死を起こすことが示されてきた。脳虚血やアルツハイマー病による神経細胞死は複合ストレスに対する細胞応答の最終像であると考えべきであり、従って蛋白のホールディング異常に対するストレス応答の究明はこれら疾患の治療に直結する。

脳はグリア細胞やオリゴデンドロサイト、血管内皮細胞など異なった種類の細胞によって構成されるが、中心的存在である神経細胞は虚血に対してとりわけ脆弱である。したがって、長時間に及ぶ虚血では脳を構成するすべての細胞が壊死に陥るが、虚血が短時間である場合、神経細胞だけが死に到る。これに反してアストログリアや血管内皮細胞は虚血に対して強い抵抗性を示すことが知られている。さらに、アストログリアは虚血などの自らの生存すら危うくしかねないような環境下でも神経細胞に対する保護機作を発揮することが知られている。

本研究では、アストログリアが虚血環境で生き抜くためのいくつかの戦略を解析し、その戦略を利用して、虚血環境にあっても神経細胞死を抑制しうるかをテーマとして研究を進めてきた。また、虚血性神経細胞死だけでなくアルツハイマー病による神経細胞死も小胞体のストレス応答異常による可能性が示されてきた。本研究では、小胞体の機能異常が脳虚血とアルツハイマー病に共通する神経細胞死の経路であるとの認識に立ち、小胞体の機能制御による神経細胞死の抑制に関して研究してきた。

ii) 虚血とは小胞体ストレスである。

虚血を構成する環境因子の中で、もっとも細胞代謝に大きなストレスをもたらすのは酸素濃度の低下である。ストレス蛋白の発現といった見地から低酸素ストレスをとらえると、細胞内には低酸素ストレスによって **Oxygen Regulated Proteins (ORPs)** と総称される一群のストレス蛋白が誘導されることが知られている(4)。ORPsのうち分子量が **94** および **78kDa** のものは

そのアミノ酸配列が腫瘍細胞で誘導される同分子量の glucose regulateprotein (GRP)と同一であることが示された。また 150kDa の Oxygen Regulated Protein (ORP150)も最近クローニングされた。これら GRP/ORPは小胞体に局在する分子シャペロンであり、小胞体内でのunfoldな蛋白の増加によって誘導される。したがって、虚血環境は細胞に小胞体でのホールディング異常を惹起する。実際、培養アストログリアを低酸素環境に暴露すると、アストログリアが虚血環境にきわめて強いことを反映して、分子量 150、94、78 のストレス蛋白が大量に誘導される(図 1)。また、これら蛋白化学的方法だけでなく、differential display など分子生物学的方法を用いても、我々は、低酸素環境によってアストログリア内に誘導されるストレス蛋白の同定を試みてきた。アストログリアでは低酸素暴露によって多くのストレス蛋白が誘導され、その多くが小胞体に誘導される。すなわち、虚血とは、少なくとも、グアストログリアにとっては小胞体ストレスであることが示された。

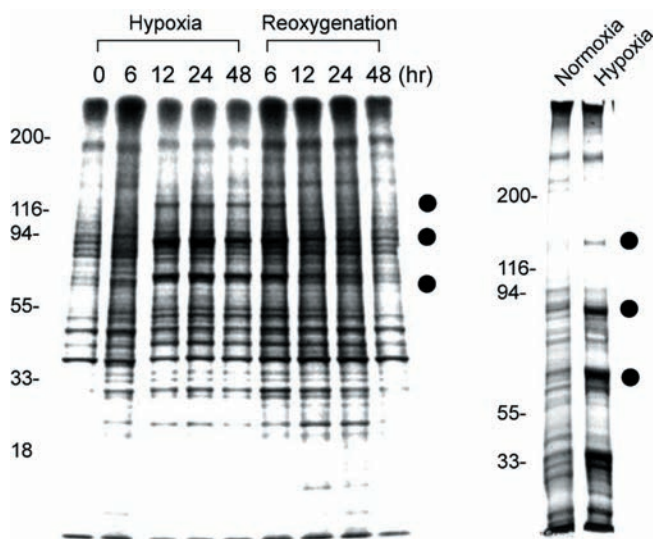


図 1: 培養アストログリアを低酸素暴露後、再酸素化し誘導されるストレス蛋白を ³⁵Sメチオニンによる代謝ラベリング法で見たもの(左)。低酸素により分子量 150、94、78kDa の蛋白が誘導され(●で示す)、その蛋白は、低酸素暴露されたアストログリアを電気泳動により展開、クマシー染色にて検出される(右; ●示す)

iii)ORP150 による神経細胞死の救済

ORP150 (150 kDa Oxygen Regulated Protein)はアストログリアの初代培養系より精製・クローニングされた新規ストレス蛋白である。ORP150 は、砂ネズミなどの脳虚血モデルで強い誘導が見られる(22)。また、虚血耐性を獲得した砂ネズミ海馬 CA1 では ORP150 の発現が明らかに多い。以上の事実は、低酸素によって発現した ORP150 が実際の虚血環境で、細胞死を抑制する因子として働いていることを示している。実際に、HEK (human embrionic kidney)細胞に ORP150 のアンチセンス遺伝子を恒常発現させ、ORP150 欠損株を作成すると、その細胞では、活性酸素や熱などの化学的なストレスには親株と同様の抵抗性を示すのに対し、低酸素に対する抵抗性が著しく低下する(1)。さらに、ORP150 を神経細胞に発現させたトランスジェニックマウスは、明かに脳虚血ストレスに対して抵抗性を示している(図 2; 12)。

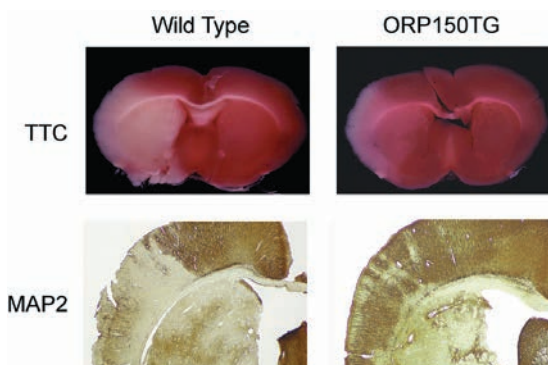


図 2: 小胞体ストレス蛋白による虚血性神経細胞死の救済。

中大脳動脈結紮により脳虚血を負荷し 24 時間後に神経細胞死を TTC および MAP2 染色にて評価したもの。どちらの方法によっても、トランスジェニックマウスで神経細胞死が抑制されているのが観察される。

iv)興奮性アミノ酸による神経細胞死と蛋白のホールディング

グルタミン酸塩受容器とグルタミン酸の結合によって開始される一連の生体反応は、細胞内のカルシウム上昇、さらには、細胞内環境の変化を来し、最終的には神経細胞死に至らしめる。ORP150は興奮性アミノ酸投与によりマウス海馬に誘導され、また、培養海馬培養神経細胞においてもグルタミン酸負荷に反応して発現上昇する(18)。ORP150を強制発現させたトランスジェニックマウス、およびノックアウトマウスにおいて興奮性アミノ酸による神経細胞死を評価すると、ORP150ノックアウトマウスではカイニン酸に対して海馬CA1細胞の脆弱性が亢進、これに対し、ORP150を神経系に過剰発現させたマウスでは、カイニン酸に対する抵抗性がみられた(図3)。興奮性アミノ酸による神経細胞死は虚血だけでなく Alzheimer 病やてんかんなど、多くの神経疾患に共通な神経細胞死機構と考えられ、蛋白のホールディング異常は神経疾患共通の病態生理であり、小胞体環境の改善によって、これらの疾患の治療効果が期待できる。

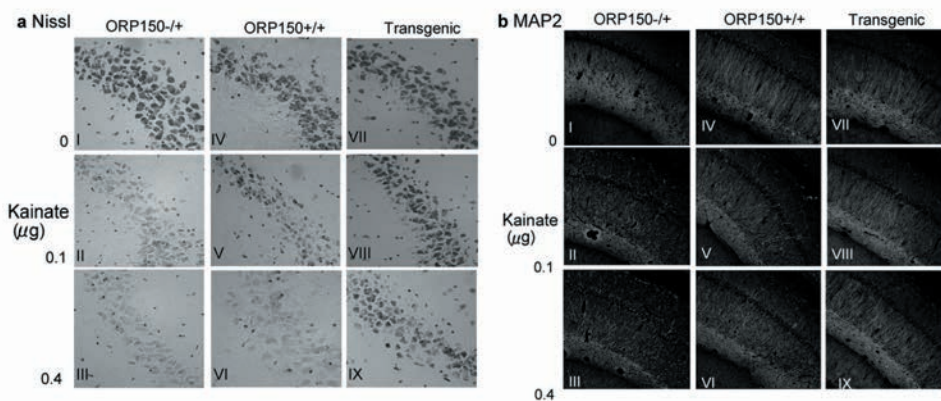


図3: 興奮性アミノ酸は蛋白のホールディング異常をおこす。

興奮性アミノ酸(グルタミン酸アナログであるカイニン酸)投与により、海馬では小胞体での蛋白のホールディング異常が引き起こされ、神経細胞死がおこる。この神経細胞死はORP150ノックアウトマウス(ORP150^{-/-})で野生型マウス(ORP150^{+/+})より加速され、逆にORP150トランスジェニックマウス(ORP150TG)で抑制される。神経細胞の生存をNissl染色法(右)およびMAP2染色法(左)で観察した。

v) 小胞体分子シャペロン ORP150 は遅発性神経細胞死を抑制する。

砂ネズミの一過性総頸動脈結紮によって海馬CA1領域に遅発性神経細胞死(DND)がおこり、この細胞死は虚血耐性を獲得させた個体では起こらない。ORP150は虚血耐性を獲得した砂ネズミCA1領域に極めて強く発現し、また、あらかじめCA1領域にアデノウイルスベクターを用いてORP150を遺伝子導入することにより、神経細胞死を救済することができることを示した。DNDでは1-2週間で神経細胞死が完成する「慢性虚血性神経細胞死モデル」である。このパラダイムにおいてもORP150は神経細胞死を抑制することが示された(22)。

vi) ORP150 は発生段階における神経細胞死を抑制する。

小胞体における小胞体ストレス応答は虚血や変性に伴う神経細胞死に関わることが明らかになっている。マウスにおける小脳発生では神経細胞死がおこることが知られているが、新規小胞体ストレス蛋白であるORP150は、生後4-8日にかけて小脳、特にプルキンエ細胞に強く発現、GRP78、GRP94、HSP70などとは異なった発現パターンを示した。ORP150を過剰発現させたトランスジェニックマウス(TG)では、プルキンエ細胞に強いORP150の発現を認めるとともに、ORP150ノックアウトヘテロ接合体(KO)では、その発現は明らかに減弱していた。

野生型マウスでは生後4日をピークにプルキンエ細胞層で活性化型 Caspase-3 の免疫陽性細胞が見られたが、TG では陽性細胞数が有意に減少していた。Calbindin 染色で評価したプルキンエ細胞数も生後4-20日にかけてTGで多く、KOで減少していた。また、グルタミン酸拮抗薬であるMK-801の投与により、TGと同様の傾向が再現された(23)。ORP150は海馬神経においてグルタミン酸による細胞内Ca⁺⁺上昇を抑え、細胞死を抑制することから小脳発生過程における神経細胞死にも小胞体を介する神経細胞死の関与が示唆される(図4)。

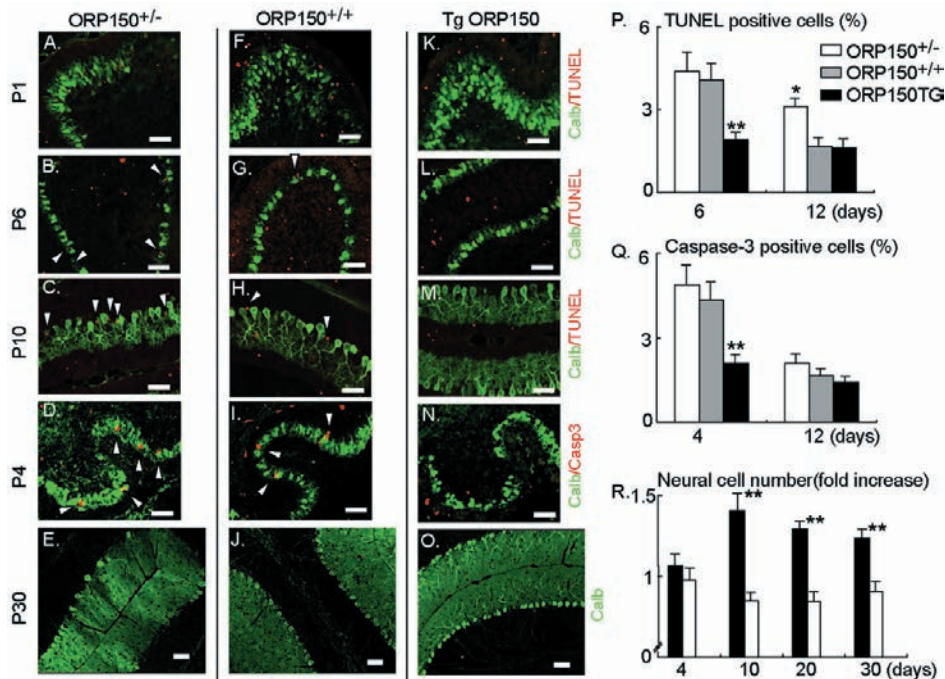


図4: 発生初期の小胞体ストレスが小脳プルキンエ細胞の至適密度を決める。

ORP150 ノックアウトマウスの発生初期の小脳プルキンエ細胞を観察すると、出生後4-6日にかけて、TUNEL法および活性化caspase-3による免疫染色で胞死が検出される。この細胞死は、野生型、ORP150トランスジェニックマウス(Tg ORP150)の順に、すなわち、ORP150の発現が強くなるほど抑制される傾向にあった。さらに、Tg ORP150では、プルキンエ細胞の密度も、明らかに増加していた。ところが、行動テストで評価された小脳の機能は、逆にTg ORP150で傷害されており、発生段階における小胞体ストレスが、ホストのプルキンエ細胞の至適密度を決めると考えられる。

vii) SERP1 のノックアウトマウスの作成

SERP1も低酸素暴露された培養アストログリアよりクローニングされた新規ストレス蛋白である。すでにSERP1の細胞生物学的機能に関しては報告済みであるが、SERP1の機能を実際の脳虚血の場において検討するため、SERP1ノックアウトマウスを作成、すでに遺伝子変異体のホモ接合体を得ている。現時点では、慢性的に小胞体ストレスが存在すると考えられる膵臓B細胞でのインスリン産生低下が明らかとなっている(特許出願準備中)。

viii) 新規ストレス蛋白 Lon (小胞体ストレスのミトコンドリアへのクロストーク)

低酸素暴露した培養ラットアストロサイトより、ミトコンドリアATP依存性プロテアーゼLonのラットホモログをクローニングした。Lonの発現は、虚血・低酸素、或いはいわゆる小胞体ストレスによって約4倍程度上昇した。ミトコンドリア蛋白に対する小胞体ストレスの影響をCytochrome c oxidase (COX)の発現をモデルにして検討した所、小胞体ストレス下において、核DNA由来のCOX IV及びCOX Vの発現は抗原量で約30%に低下し、ミトコンドリア

DNA 由来の COX II は、発現量自身に変化は認めず、その分解が亢進していた。細胞を蛋白合成阻害剤 cycloheximide(Cx)で処理することによっても COX サブユニットの発現に同様のアンバランスが生じ、Lon 或いは他のミトコンドリア ATP 依存性プロテアーゼである Yme1 の発現は上昇した。小胞体ストレスによる Lon の誘導は、蛋白合成抑制のシグナルを伝達する小胞体蛋白 PERK の KO 細胞では認められなかった。さらに、野生型或いはプロテアーゼ中心を変異させた Lon を過剰発現させると、小胞体ストレス下において COX II の、COX I を含む複合体への assembly は亢進し、brefeldin A 或いは低酸素によるミトコンドリアの障害は部分的にはあるが改善された。以上のことより、蛋白合成の抑制により小胞体ストレスはミトコンドリアに伝播されるが、同時にミトコンドリア ATP 依存性プロテアーゼが誘導され、少なくともその一部は分子シャペロンとして働き、ストレス下でのミトコンドリアの機能維持に役立っていると考えられた(21)。

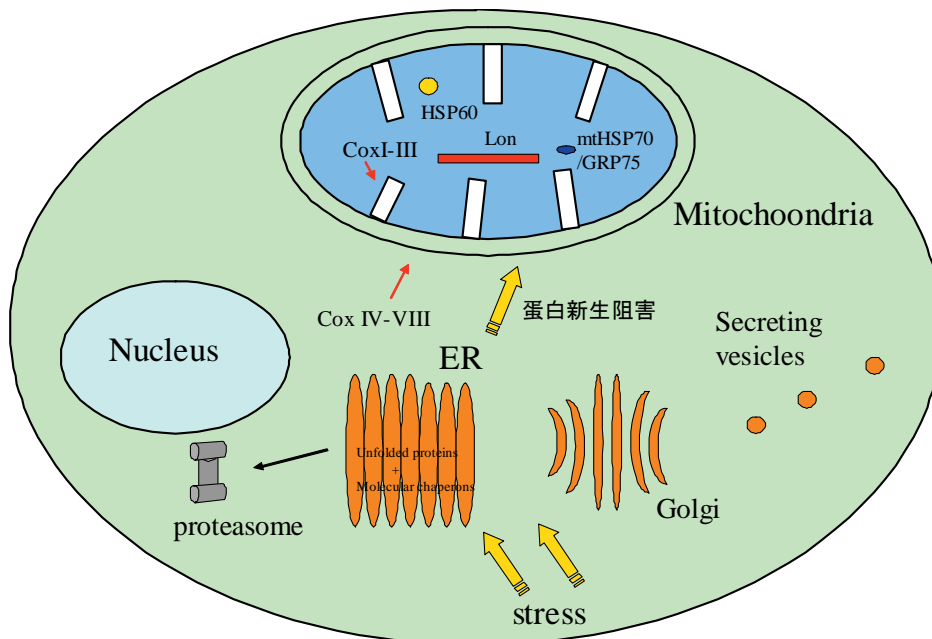


図 5: 虚血は小胞体における蛋白のホールディング異常により神経細胞死を引き起こす。小胞体(ER)では様々な蛋白への高次修飾が行われ、折たためられる。虚血ストレス下では、小胞体折りたたみ(ホールディング)ができなくなり、小胞体内に未熟な蛋白が蓄積、最終的に細胞を死に至らせると考えられる。

(ix) 小胞体環境改善剤のスクリーニング

小胞体ストレス(小胞体内に **unfold** な蛋白が蓄積するようなストレス)により発現が誘導される蛋白 **Herp** は、小胞体膜上に存在するユビキチン様蛋白である。相同組み換え法により、**Herp** 欠損 **F9** 細胞を作製したところ、ツニカマイシンなどの小胞体ストレス誘導剤処理に対し、極めて脆弱になった。**Herp** 欠損 **F9** 細胞は、ツニカマイシン処理後、小胞体ストレス由来シグナル伝達の変化、小胞体の形態変化、カスパーズ上昇を示し、最終的にアポトーシスと考えられる細胞死を呈した。このような変化は野生型の **F9** 細胞では認められなかった。全長型の **Herp** cDNA を細胞内に導入することにより、**Herp** 欠損細胞のストレス脆弱性は改善した。小胞体或いは小胞体ストレス由来の細胞死という概念が近年提唱され、特に、パーキンソン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患、或いは、虚血性神経細胞死などへの関与が指摘されてきている。我々は、この **Herp** 欠損 **F9** 細胞を用いて、小胞体(ストレス)由来神経細胞死のメカニズム解明、及びそれを阻害する薬剤の開発を目指している。これまでに、数種類の既存の薬剤が、**F9 Herp** 欠損細胞において、小胞体ストレス由来細胞死を抑制する事が判明した。今後、より毒性が少なく、有効性の高い薬剤をスクリーニングする事により、上記疾患に対す

る、新たな治療薬の開発を試みる。

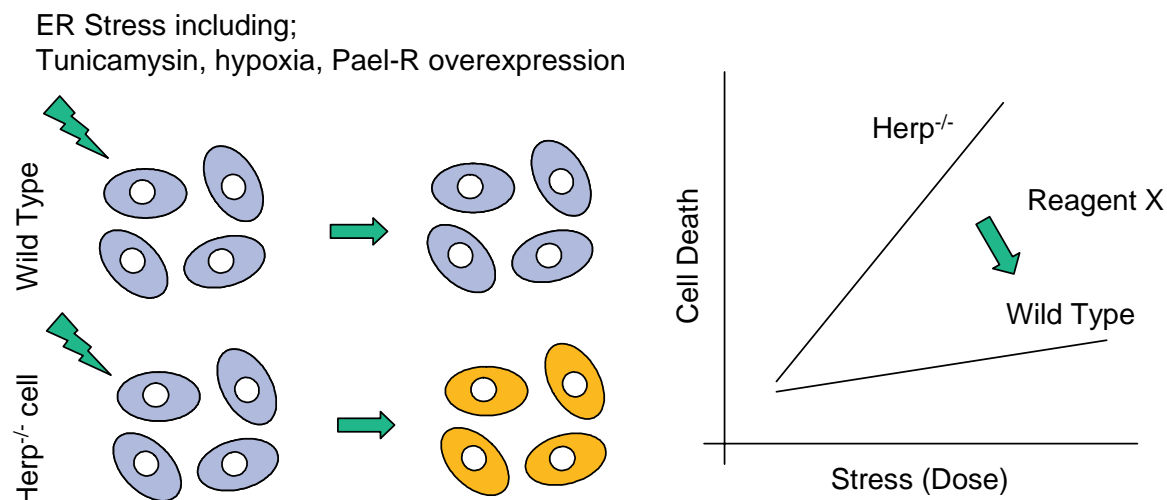


図 6: Herp 欠損 F9 細胞を作製したところ、ツニカマイシンなどの小胞体ストレス誘導剤処理に対し、きわめて脆弱になった。この欠損細胞は遺伝子的にきわめて安定しており、細胞死も再現性に優れている。この細胞を用いて、ER ストレスに対する脆弱性をリバースしうる薬剤のスクリーニングを行っている。

(2)研究成果の今後期待される効果

ORP150 を発現できない HEK 細胞株における低酸素誘導性の細胞死は、蛋白新生を要求する。小胞体を基点とする細胞死の概念は caspase-12、Ca⁺⁺、NF-κB、や ASK1 を解する経路などが提唱されている。遺伝子性疾患による神経細胞死は小胞体を通過する蛋白にアミノ酸変異があるため、小胞体内での正常の蛋白のホールディングができず、小胞体内に異常蛋白が蓄積することによって引き起こされると考えられている。これに対して、虚血性神経細胞死では、虚血という細胞外環境の変化により小胞体内での蛋白の正常ホールディングが出来なくなっていると考えられる。虚血環境下でどのような蛋白ホールディング異常がおこるのか、特異的な蛋白だけにおこるのか、それともすべて蛋白にホールディング異常がおこるのかはまだ明らかではない。しかしながら、小胞体における蛋白のホールディング異常への対策が、虚血だけでなく、多くの神経疾患に共通した治療戦略になることは間違いない。

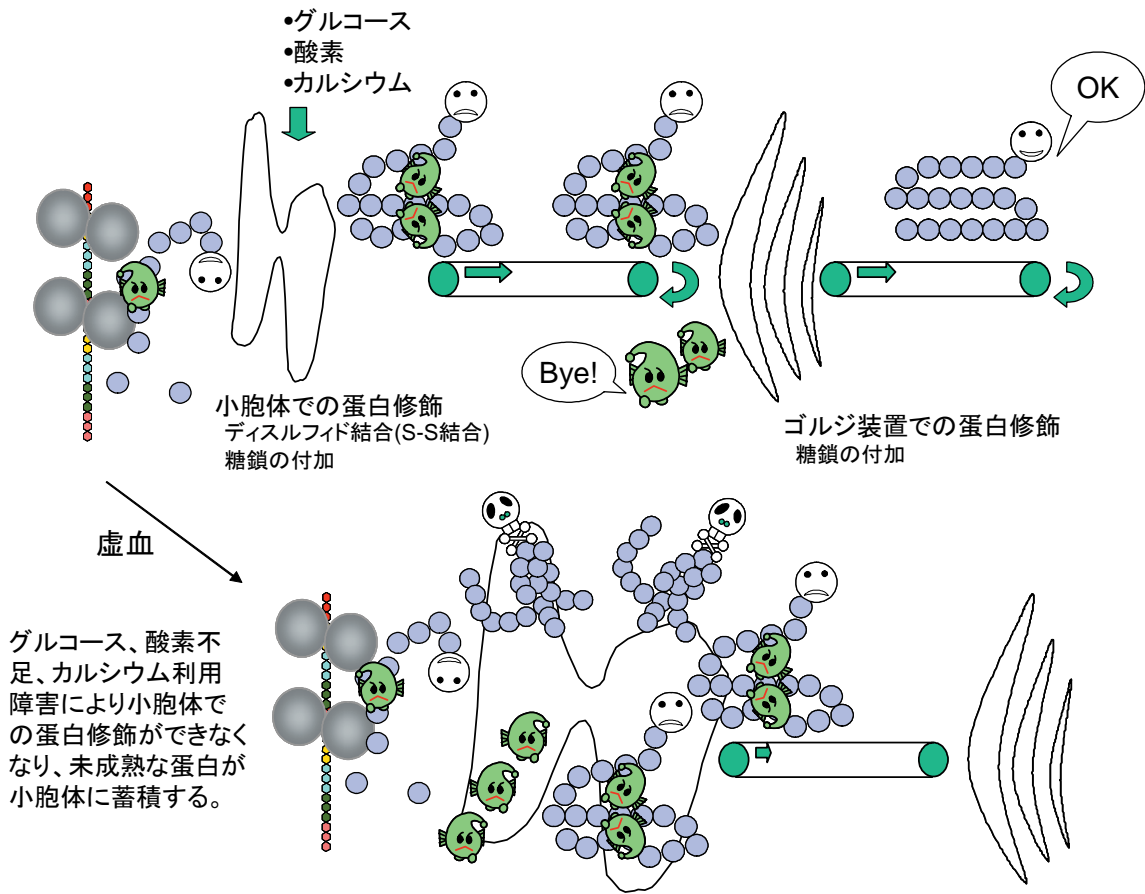


図 7: 神経細胞の生死は小胞体に対する障害系と防御系のバランスで決まる。

研究者らは虚血において神経細胞死を引き起こす最も重要なストレスの1つとして小胞体ストレスを同定した(上図)。虚血だけでなく、興奮性アミノ酸による神経伝達、Pael 受容体などの蛋白合成などが、神経細胞における小胞体ストレスとして小胞体機能を傷害する。これに対して、小胞体ストレス応答(unfolded protein response)や、蛋白分解系(Endoplasmic reticulum dependent protein degradation; ERAD)が防御系として機能している。この障害系、防御系を制御することによって虚血性神経細胞死の新たな戦略が開発しうる。

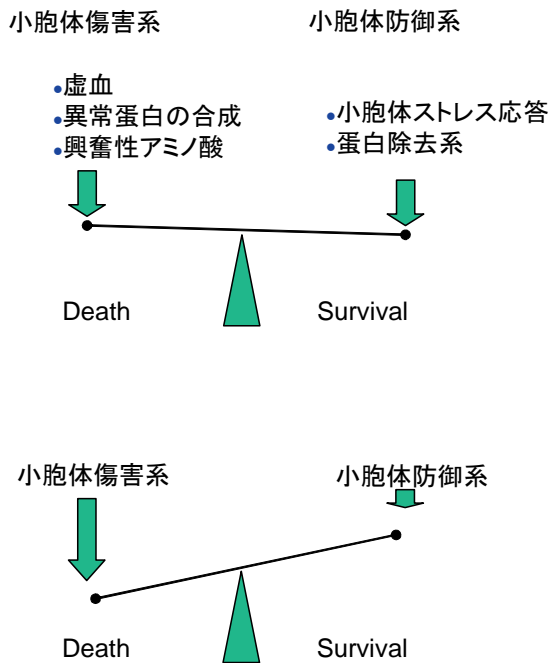
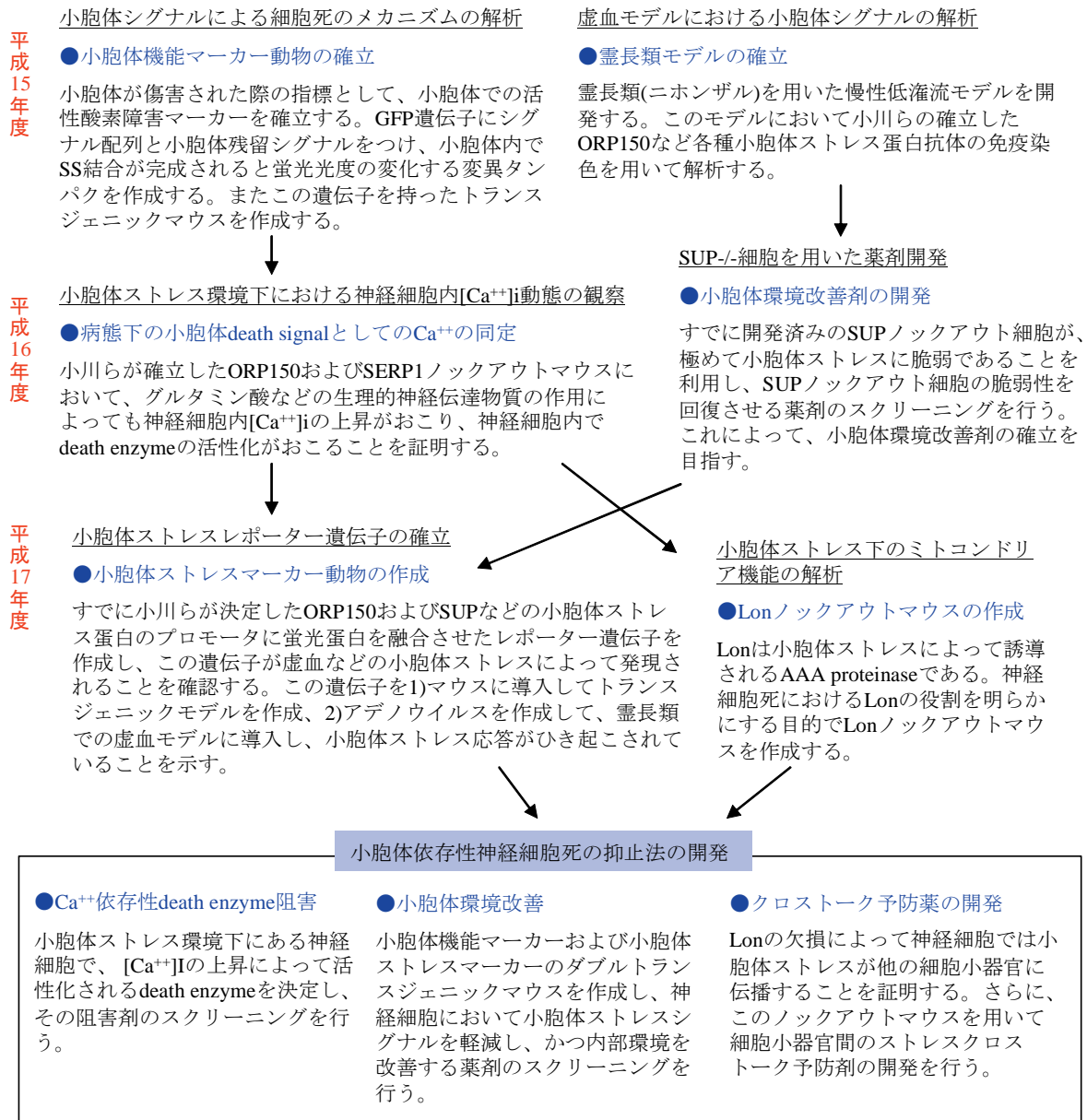


図 8:今後 3 年間の研究戦略



[アルツハイマーグループ]

1) アルツハイマー病の神経細胞死防御機構の開発

高齢化社会を迎え、痴呆の予防と治療方法の確立は急務とされている。特にアルツハイマー病(AD)はわが国においても増加の一途をたどっているが、その詳細な発症原因は未だに解明されておらず、有力な治療法が見つかっていない。ADは患者全体の約5%が遺伝子に変異のある家族性AD(FAD)であるが、残りの95%以上が原因不明の孤発性AD(SAD)である。しかしながら、FAD,SADは最終的には共通した病理所見を呈する。即ち、アミロイドβ(Aβ)の細胞外沈着による老人斑の形成、異常にリン酸化されたタウ蛋白質が本体である神経原線維変化、そして神経細胞死による脳の萎縮である。従ってFADの原因遺伝子の変異によってどの様に上記病理像に向かうのか、そのメカニズムを明らかにすればAD全体の発症機構に迫るので

はないかと言う考えに立って本研究は開始された。そこで私たちは FAD の原因遺伝子として知られる 3 つの遺伝子 (21 番染色体上に存在するアミロイド前駆体蛋白質 ; APP、14 番染色体上のプレセニリン 1 ; PS1、1 番染色体上のプレセニリン 2 ; PS2) のうち、PS1 のミスセンス変異により発症する FAD の割合が最も高いことが知られていることから PS1 変異体の機能解析に着手した。FAD に関連した PS1 変異体を発現する細胞では種々のストレスに対する感受性が增強することが報告されているが、共通して小胞体(ER)に対する負荷を引き起こす刺激であること、及び PS1 が ER に局在することに着目し、PS1 が ER ストレスに対する感受性およびストレス応答機構に対し何らかの関わりを有するの否か検討を行った。

PS1 変異体発現細胞は ER ストレスに対して脆弱になる (10,11,19)

PS1 変異体を構成的に発現する神経芽細胞腫 SK-N-SH を取得し、ER ストレス (糖鎖付加阻害剤 tunicamycin : Tm やカルシウムイオノフォア : A23187) を負荷すると対照群或いは野生型 PS1 発現細胞に比べ、早期に細胞死が始まる。この現象は一過性に PS1 変異体を過剰発現させた HEK293T 細胞、さらに PS1 変異体を生理的なレベルで発現するノックインマウスから得た大脳皮質初代培養神経細胞においても確認され、いずれも野生型 PS1 を発現する細胞と比較して ER ストレスに対し脆弱性を示した。そこで我々は ER ストレスに対する防御機構に対して PS1 変異体が影響を与えているのではないかと仮説をたて、ER ストレスに対する生体の防御機構の一つである unfolded protein response (UPR) の最終産物である GRP78/BiP に注目した。GRP78/BiP は小胞体内腔の分子シャペロンとして小胞体内腔に蓄積する折り畳み不良蛋白質 (unfolded protein) の折り畳みを改善し不良蛋白質がゴルジ体以降に輸送されることを防ぐ蛋白質の品質管理に関わる重要な分子であると考えられている。野生型 PS1 を発現する細胞では ER ストレス後の GRP78/BiP の mRNA の発現上昇に何ら影響を与えなかったが、FAD に関連した PS1 変異体を発現する細胞では ER ストレス後の GRP78/BiP の mRNA の発現上昇が有意に抑制された。さらに PS1 変異体を生理的なレベルで発現しているノックインマウス由来の大脳皮質初代培養神経細胞を用いて同様に ER ストレス後の GRP78/BiP の mRNA の発現上昇を比較したところ、明らかな gene dosage が認められた。

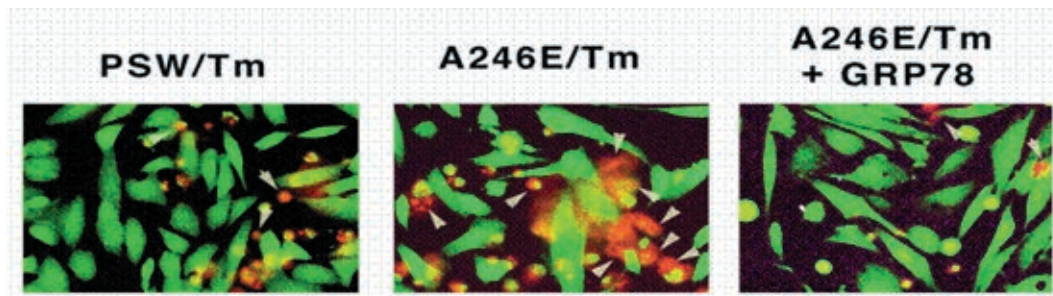
PS1 変異体と IRE1α

PS1 変異体がどのような機構で GRP78/BiP の発現上昇を負に制御するのか明らかにする目的で我々は UPR の最上流に位置する IRE1α に注目した。IRE1α は N 末端を小胞体内腔側に、C 末端側を細胞質側に持つ 1 回膜貫通蛋白質で小胞体内腔に unfolded protein が蓄積するとこれを感知し、2 量体を形成し、C 末端側に存在するキナーゼ部位で自己リン酸化により活性化し、下流にシグナルを伝え、GRP78/BiP の転写を誘導する (今では、IRE1α の C 末端側に存在する RNase 部位によりフレームシフト型転写因子 XBP1 を切断し、切断された活性型 XBP1 が転写因子として GRP78/BiP プロモーターに結合し、GRP78/BiP の発現を促進することが知られている)。そこで IRE1α と PS1 の相互作用について検討したところ、PS1 と IRE1α は小胞体膜上で結合しており、PS1 変異体は野生型 PS1 発現細胞に比べて ER ストレス後の IRE1α の活性化に必要なリン酸化レベルが減弱して GRP78/BiP の発現誘導が抑制されていることが分かったのである。

GRP78/BiP の導入は ER ストレスに対する変異 PS1 発現細胞の反応を正常に回復させる (19)

そこであらかじめ semliki-forest ウィルス (SFV) システムを用い GRP78/BiP を導入すると PS1 変異体発現細胞の ER ストレスに対する応答はほぼ完全に野生型 PS1 発現細胞の反応性にまで回復することが確認された (図 9)。実際に AD 患者脳における GRP78/BiP の発現量は疾患対照群のそれに比べて減少していることも確認した。

以上のことから、PS1 変異体は IRE1α の活性化障害を引き起こし、GRP78/BiP の発現が十分に誘導されず AD に見られる神経細胞死が引き起こされる可能性を見出した。



0.5 μ g/mlのツニカマイシン(Tm)刺激後、40時間のLIVE/DEAD染色による染色像。緑色が生きています細胞、赤色が死んでいる細胞(矢頭)を示す。野生型PS1発現細胞(PS1W: 写真左)に比べ変異PS1発現細胞(A246E: 写真中)は死んでいる細胞が多く観察される。これに対して、GRP78遺伝子を予め導入しておいた変異PS1発現細胞(A246E+GRP78: 写真右)ではPS1W(写真左)の反応性にまで回復していることがわかる。下図は培養上清中のLDH活性を測定した結果。

[図 9]

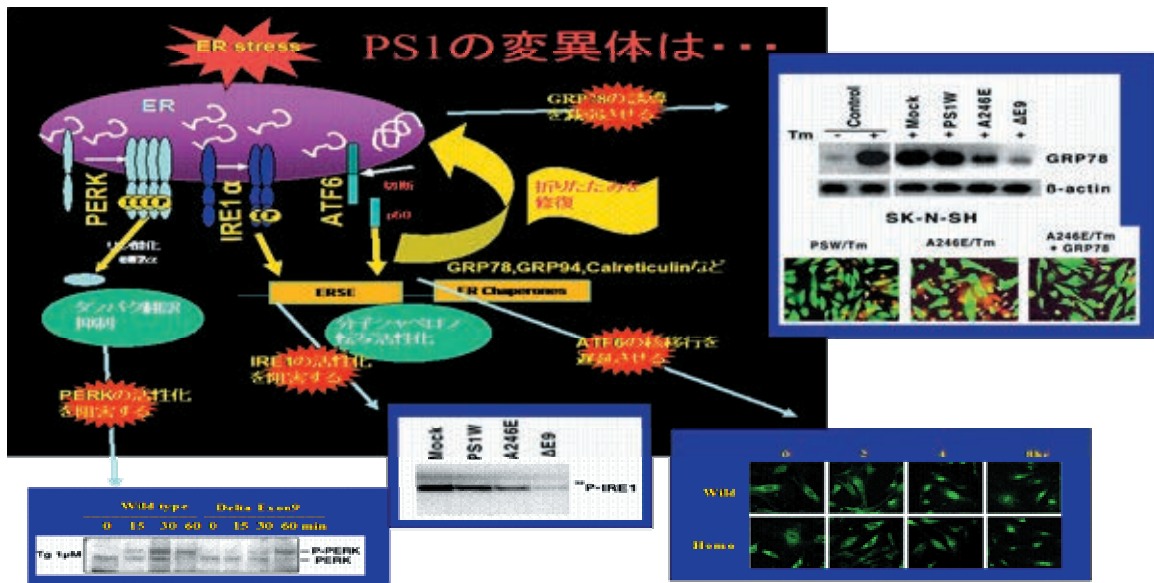
PS1 変異体は他の小胞体ストレストランスデューサーの活性化に影響を与えるか? (10,11,19)

本研究が進むうちに小胞体には unfolded protein が蓄積したことを感知して下流にシグナルを伝えるストレストランスデューサー蛋白質が IRE1 α を含め 3 種類知られるようになった。そこで PS1 変異体が残りの二つのストレストランスデューサー(ATF6,PERK)とどのように関わるのか調べた。ATF6 と呼ばれる小胞体一回膜貫通蛋白質は ER ストレスが加わると S1P,S2P という酵素によって膜近傍で切断され、切断によって生じた細胞質断片 (N 末端断片) 自身が転写因子として核へ移行し、核内で分子シャペロン(GRP78/BiP を代表とする)のプロモーター領域に存在する ERSE 領域に結合して IRE1 α -XBP1 系同様、分子シャペロンの転写誘導を促進し、合成された分子シャペロンはフォールディングを正常に戻す。他方、PERK は不良蛋白質を感知すると多量体を形成し、リン酸化され活性化されると、翻訳開始因子 2 の α サブユニット (eIF2 α) のリン酸化を促進し、新たな蛋白質の翻訳を停止し、生体を ER ストレスから守る。

PS1 変異体を発現する細胞を用いて ER ストレス負荷における ATF6 および PERK の活性化に対する影響を調べたところ ATF6 の ER ストレスに伴う 50kDa バンドの出現と核移行を PS1 変異体は遅延させる様子が観察され、PERK リン酸化も PS1 変異体発現細胞では野生型 PS1 発現細胞に比べ明らかに遅延していることを見出した。これらのことから、PS1 変異体は IRE1 α のみならず ATF6,PERK といった小胞体ストレストランスデューサー群全体の活性化を阻害して、小胞体機能全体を障害していることが明らかとなった。更にこの PS1 変異体による小胞体機能障害が PS1 本来の機能を喪失した結果起きている現象であるのか、或いは PS1 の変異体が新たに獲得した機能によってストレストランスデューサー群の活性化障害をもたらしているのかを明らかにする目的で PS1 ノックアウトマウス由来線維芽細胞、PS1/PS2 ダブルノックアウト細胞、そして γ セクレターゼ活性を喪失させた人為的 PS1 変異体発現細胞を用いて ER ストレスに対する応答を野生型 PS1 発現細胞、FAD に関連した PS1 変異体発現細胞を併せて比較した。

PS1 ノックアウトマウス、PS1/PS2 ダブルノックアウトマウス由来線維芽細胞における ER ストレス負荷後の GRP78/BiP mRNA の発現誘導及び ATF6 のプロセッシング、核移行、PERK、IRE1 α のリン酸化を経時的に調べたが、両者の間に有意な差は認められなかった。更に γ セクレターゼ活性を喪失させた人為的 PS1 変異体発現細胞を用いて同様に ER ストレスに対する反応性を検討したが ER ストレス後の GRP78/BiP mRNA 発現誘導において D257A,D385A いずれの変異体発現細胞も野生型 PS1 発現細胞の反応性と同等であった。ストレストランスデューサー群の活性化状態と細胞死との相関も認められた。以上のことから、PS1 変異体がストレストランスデューサー群の活性化を阻害して GRP78/BiP など分子シャペロンの発現誘導を減弱

させ、最終的に細胞死を引き起こしやすくさせている事実は、PS1 本来の機能を喪失した結果起きている現象ではなく、FAD に関連した PS1 変異によって新たに獲得した機能によって起きている現象であることが明らかになった。下記に全体のまとめの図を記す。〔図 10〕

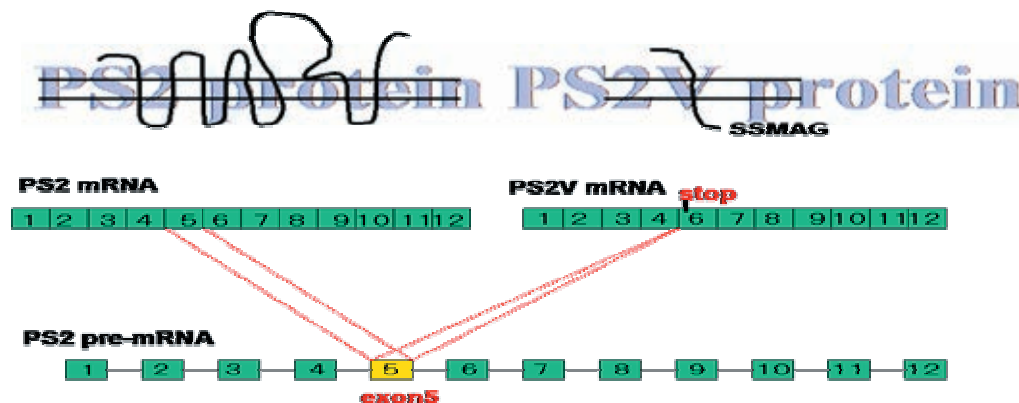


〔図 10〕 家族性アルツハイマー病における神経細胞死の分子機序

孤発性アルツハイマー病患者脳に見られるスプライシング異常蛋白質 (2,7,9,14)

一方、SAD についてはその病理像が FAD と同様であるにも拘わらず発症原因が不明であった。しかしながら、近年、特定遺伝子のスプライシング異常が報告されてきたので、SAD も FAD 原因遺伝子のスプライシング異常により引き起こされている疾患ではないかと仮説を立て、FAD 関連遺伝子のスプライシング変種を検出する目的で PS1,PS2,APP,ApoE の exon 領域を挟む多様な組み合わせのプライマーセットを設計し、AD 患者および疾患対照群脳から抽出した RNA から RT-PCR 法によってスプライシング変種検出を試みた。その結果、PS2 の exon2 と exon7 をはさむプライマーセットを用いた場合においてのみ、SAD 群に高頻度に PS2V が検出されたのである。

PS2V の塩基配列は PS2pre-mRNA の exon5 が欠失し、exon4 のあとに exon6 が続く配列となっている。その結果フレームシフトが起こり、exon6 の途中で停止コドンが出現し、翻訳が停止する。(J.Neurochem., 1999) この配列がコードする蛋白質は本来の PS2 タンパク質とは異なり一回膜貫通のみで SSMAG という 5つのアミノ酸が新たに C 末端に付加される(図 11)。

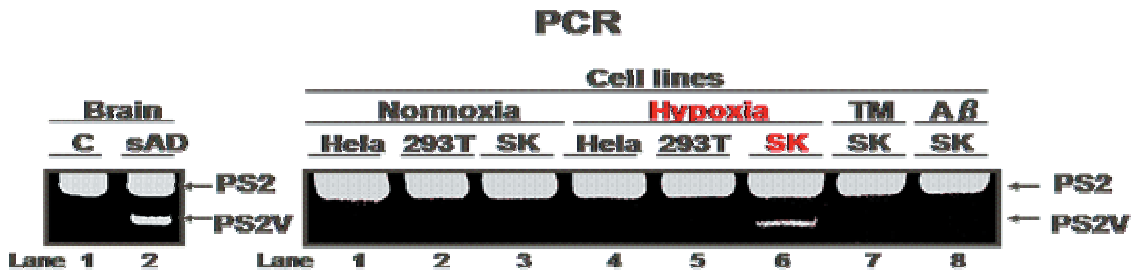


(図 11) PS2 前駆体 mRNA エクソン 5 がスキップした PS2VmRNA が孤発性アルツハイマー病患者で発現する。

そこでSSMAGを特異的に認識するポリクローナル抗体を作成し免疫組織学的にAD脳での発現を検討した結果、PS2VはSAD患者脳に100%検出され、疾患対照群として観察した患者脳には検出されなかった。

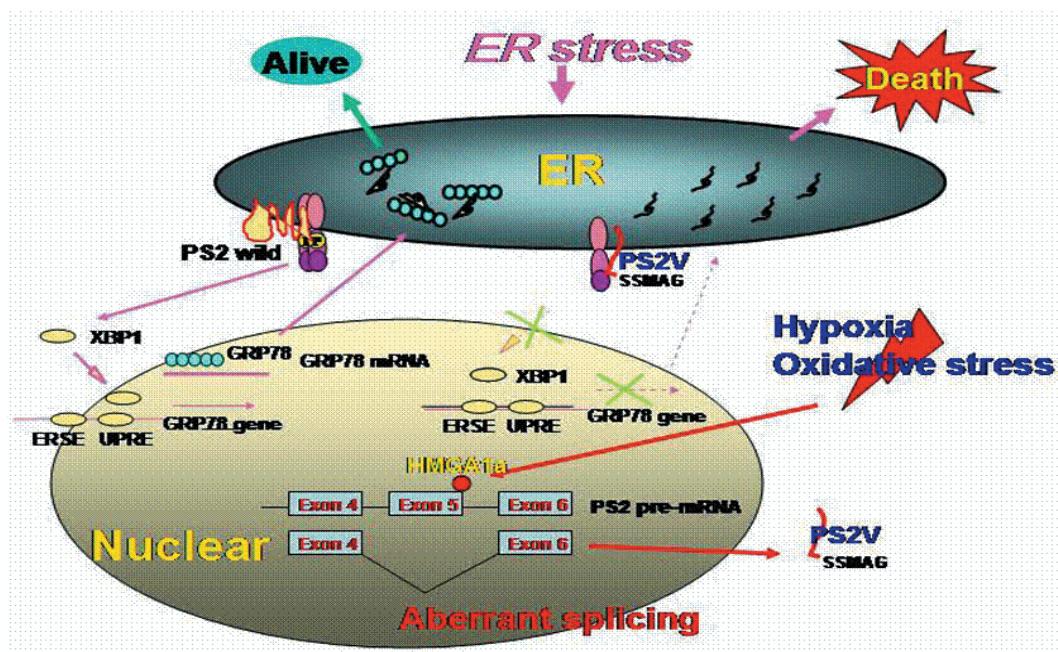
低酸素により異常スプライシングが引き起こされPS2V誘導から細胞が脆弱になる (14)

PS2VがSAD患者脳に特異的に検出されたのでPS2Vの産生される条件を決定するため細胞種、および刺激の種類について検討を行ったところ図12に示すようにPS2Vは低酸素刺激を負荷した神経系の細胞(SK-N-SH)でのみ検出された。



〔図12〕 孤発性アルツハイマー病ではPS2VmRNAが発現している(左)。PS2VmRNAは低酸素刺激特異的かつ神経細胞特異的に発現する。

その後の詳細な解析によりPS2V蛋白質を発現する細胞はAβ1-40、1-42ともに分泌量の増加が見られ、ERストレスに対して特に脆弱になることが分かった。これは図13に示すようにFADにおけるPS1変異体同様、ERストレストランスドューサーIRE1αと小胞体膜上で結合し、IRE1αのリン酸化障害が原因の一つであることが分かった。



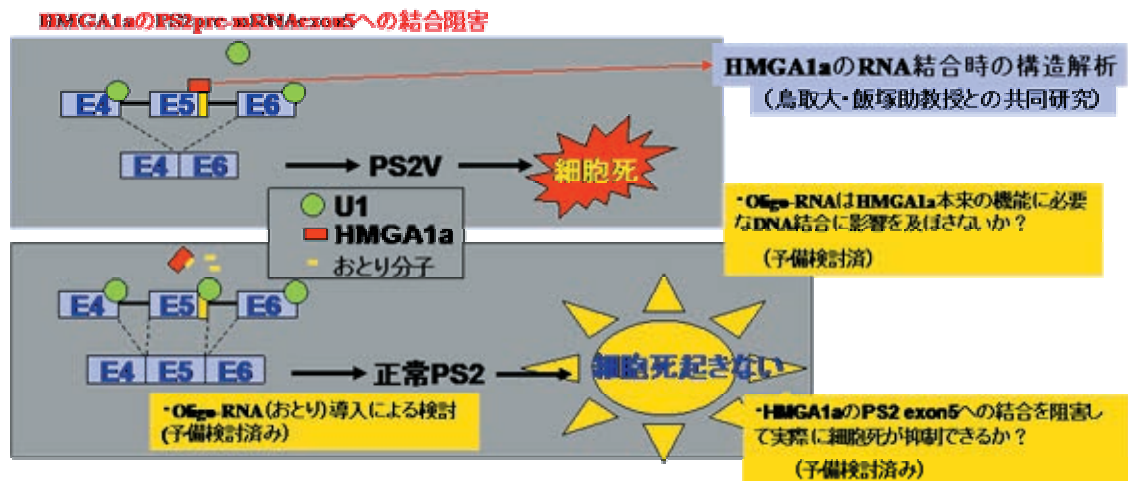
〔図13〕 孤発性アルツハイマー病神経細胞死の分子機序

PS2VがERストレスに対する防御機構を弱めることから、PS2V産生を抑制すれば少なくともERストレスによる脆弱性を回避できる。そこでPS2遺伝子の異常なスプライシングを引

き起こす因子の同定を試みた。すなわち、低酸素により PS2 の exon5 がスキップすることから低酸素刺激時 exon5 に正常なスプライシングを阻害するようなタンパク質が結合するのではないかという仮説を立てた。そこで PS2 の exon5 を含む RNA プローブを合成し、独自の pre-mRNA 結合実験法を構築し試みたところ、低酸素刺激下の神経芽細胞腫 SK-N-SH 細胞核抽出液中に PS2 pre-mRNA に結合する約 18 kDa 蛋白質が存在することが分かったので、この結合蛋白質を上記結合活性を指標に単離精製を行い、ペプチドシーケンスを行ったところ既知の蛋白質 HMGA1a であることが分かった。HMGA1a 蛋白質は NF- κ B の転写を増強するなど DNA 結合タンパク質として多彩な機能を持つことが知られていたが pre-mRNA に結合してスプライシングに影響を与えていることが示された例は初めてである。さらに、HMGA1a は PS2 pre-mRNA exon5 末端に存在する特徴的な配列に特異的に結合していることも明らかとした。HMGA1a と PS2pre-mRNA の結合は低酸素負荷に伴って HMGA1a の発現量の増加に伴って核内のスペックル（スプライシングが行われる場である）に強く発現上昇していることを確認した。さらに低酸素刺激を行っていないにも関わらず、HMGA1a 発現コンストラクトの導入量依存的に PS2V が検出されたので PS2exon5 を欠失させる直接の原因は HMGA1a が PS2pre-mRNA に結合することによることが確かめられた。更に詳細な検討を行った結果、HMGA1a が PS2exon5 の 3'末端の特異的な配列に結合すると正常なスプライシングが行われる際に必須のスプライシング調節因子 U1snRNP14 が本来結合すべき exon-intron 接合部（5'-スプライスサイト）に結合できなくなる、すなわち HMGA1a が PS2pre-mRNA の exon5 末端に結合すると U1-70K が HMGA1a に結合してしまい U1snRNP が 5'-スプライスサイトに結合できなくなる。その結果、exon4 の 3'端から exon6 の 5'端までが大きな intron として切り出されてしまい exon5 が欠失してしまうのではないかと考えられる。実際に孤発性 AD 患者脳において HMGA1a 蛋白質は発現上昇していることを確認した。これら結果から、HMGA1a の全く新しい機能を証明すると共に、SAD 発症メカニズム解明の新たな焦点となる可能性が示唆された (Cell Death Diff., 2002)。また、低酸素のみならず各種金属による酸化ストレスが HMGA1a の誘導を促進し、PS2V 産生が促進されることも見つけた (2)。

HMGA1a-PS2pre-mRNA 結合阻害による PS2V による細胞死を抑制 (7)

HMGA1a 活性制御機構を解明するために、HMGA1a が結合する特異的な配列を決定した。決定した配列に点突然変異あるいは配列欠失変異等を与え、本スプライシング調節因子が結合できなくなることを確認し、仮説どおり exon5 がスキップしないことを確認したので、治療への応用として HMGA1a に直接作用して exon5 をスキップさせない化合物のスクリーニング系構築を目指した。Exon5 の pre-mRNA に HMGA1a が結合する配列を「おとり分子」として細胞に導入し、PS2V 産生、細胞死を抑制できるか否かを検討したところ HMGA1a の本来の機能を発揮するために必要な DNA 結合が上記「おとり分子」によって阻害を受けず、PS2V 産生、細胞死のいずれもを抑制できることを確認した。治療薬評価に用いるために必要である HMGA1a あるいは PS2 スプライシング変種を発現するトランスジェニックマウスの作成を継続している。以上の成果は HMGA1a の発現を制御することにより SAD における神経細胞死を抑制しうること、SAD 根本的治療薬の開発に向けたより具体的な段階に進んだことを示している。



〔図 14〕

2) 小胞体ストレスから始まる神経細胞死に関する研究

ER ストレス状態が長く続くと細胞はアポトーシス様の形態変化をたどり細胞死に至る。この事実は、上記のような防御機構が破綻して、即ち、UPR によっても unfolded protein を排除できない強い刺激、或いは長時間続く刺激によって、ER 内の許容量を超えた時、細胞は死に至ると考えられる。これらの結果はマウス IRE1 α を取得して、詳細に検討した (15)。先に述べた IRE1 α は UPR によって分子シャペロンの誘導を促進して細胞を保護する働きに加えて、ER ストレスの際、TNF レセプターのアダプター分子として知られている TRAF2 を介した JNK シグナリング経路を活性化させることが報告されてきた。我々は JNK 経路について酵母 Two-hybrid システムを用いて IRE1 α の結合パートナーとして JIK(cJun N-terminal inhibitory kinase)や Jab1 (Jun activation domain-binding protein-1) を同定した。JIK はヒト由来細胞において IRE1 α と TRAF2 との両方に結合しており、JIK の発現量依存的に IRE1 α と TRAF2 との結合量を増加させる。このことは JIK が IRE1 α -TRAF2 複合体形成を修飾して ER ストレス時のシグナル伝達を制御している可能性を示唆した (13)。Jab1 は ER ストレス時、IRE1 α との結合解離によってストレス応答を調節し、この解離の阻害 (変異体、環境要因等) は ER ストレス応答を障害することを見つけた (投稿中)。また、ER ストレス特異的に活性化するカスパー 12 が発見され、ER ストレスによる細胞死にカスパーファミリーが関与することが示唆されたので、ER ストレスによる詳細な細胞死経路解明を目指した。その後、Caspase-12 はマウスおよびラットにおいてのみ蛋白質として発現しておらず、ヒト細胞において実際に ER ストレス特異的に応答する機構が存在するの否かについて明らかでは無い状態が続いている。そこで、我々はヒトにおいて ER ストレスによるアポトーシスに関与する分子の同定を試みた。マウス Caspase-12 の配列をプローブとして、ヒト colon cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った結果、caspase-4 が高頻度で得られた。ゲノム上の配列ではマウス caspase-12 の配列に 68% のホモロジーを持つヒト caspase-12 と考えられる配列が存在するが、翻訳領域の途中に重要な一塩基挿入があり、フレームシフトが起こってしまい、caspase-12 として機能することの不可能な蛋白質をコードしてしまうことが分かっている。今回のスクリーニングではこの事実を裏付けるとともに caspase-4 は ICE(interleukin-1 converting enzyme)ファミリーに属すること、マウスでは逆に caspase-4 の存在が知られていないことから、ヒト細胞で ER ストレスによる細胞死を仲介する可能性が示唆された。そこで我々は caspase-4 がヒトにおける ER ストレス応答 caspase としての機能を有しているか否か HeLa 細胞或いは神経芽細胞腫 SK-N-SH 細胞を用いて検討した。その結果、Caspase-4 は特異的抗体を用いた検討によって、ER 膜の外側に存在し、ER 内腔には局在しないこと、ER ストレス誘導剤 tunicamycin (Tm) や thapsigargin (Tg) では活性化断片と思われるバンドが

検出されるが、non-ER ストレスである staurosporine (STS)、etoposide(Etop)、紫外線 (UV) 刺激によってはこの特異的バンドは検出されないことが明らかになった。caspase-4 は前述の通りヒト細胞にしか存在が知られておらず、ノックアウトマウスを作成する事は不可能である。そこで我々は caspase-4 のドミナントネガティブ体の導入および RNAi を用いた gene ノックダウン法による caspase-4 の発現抑制を試みた。caspase-4 の RNAi によって ER 膜における caspase-4 の免疫染色性が減弱し、Tg による細胞死を完全ではないが抑制した。逆に non-ER ストレス Etop による細胞死は抑制しなかった。更に、caspase-4 の RNAi 導入により、SK-N-SH 細胞は A825-35 或いは A81-42 による細胞死が抑制された。またアルツハイマー病患者の脳において細胞死が良く見られる海馬領域の錐体細胞の細胞質で免疫染色性が上昇しており、この脳サンプルのホモジェネートをウェスタンブロットにより解析すると、本来、ヒト脳における caspase-4 の発現は無いと考えられていたにもかかわらず、非常にはっきりと caspase-4 の全長型のバンドが検出された。即ち、AD 脳では caspase-4 の発現自身が上昇していることを示している。以上より caspase-4 がヒトにおける ER ストレス応答 caspase としての機能を持ち、アルツハイマー病で見られる神経細胞死に参与する可能性が示唆された (投稿中)。

以上の結果を含め、ER ストレスが引き起こす細胞死と疾患に目を向けると AD に限らず、パーキンソン病やポリグルタミン病等の神経変性疾患では神経細胞内に変性した異常タンパク質の蓄積が見られることが報告されており、ER 関連分解(ERAD)の研究も盛んに行われるようになってきた。我々もパーキンソン病と ER 機能 (投稿中)、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) と ER 機能 (投稿準備中) について研究進行中であり、このことは ER だけで見ても他の細胞内小器官との関わりが重要であることは明白で、更に進んで各細胞内小器官の機能異常が疾患に関わる可能性を示唆している。細胞内小器官それぞれのもつ許容量を超えた反応が生体の生死に関わり、疾患につながっていくことが想像され、大変興味深い。

3)その他の研究

これらの研究中、見つかった興味ある分子、現象、ストラテジーを元に発展させた研究を簡単に報告する。

- ・網膜視細胞に特異的に発現する新規遺伝子を単離した (仮名: Pal)。この遺伝子がコードする蛋白質は、膜1回貫通型の糖蛋白質で約450個のアミノ酸からなる。細胞外領域には蛋白質-蛋白質の相互作用に重要な働きがあるといわれている luciferin-rich-repeat と Ig ドメインおよび fibronectin like ドメインがあり、この構造から判断して特定の分子のレセプターかあるいは細胞接着に関与している可能性がある。特異的な抗体を作成し、網膜内での局在を検討したところ、視細胞層外節に免疫陽性反応が得られた。免疫電顕による解析の結果、この陽性反応は外節円盤に局在していることが明らかになった。外節円盤は、網膜が光刺激を受け取りロドプシンを活性化して光シグナルを神経細胞に伝達 (phototransduction) を開始させる部位であり、Pal がこの領域に特異的に発現することは視覚機能との関連で非常に興味深い。しかし、その構造から判断して Pal が直接 phototransduction に関連しているとは考えにくく、むしろ外節円盤の形態形成やターンオーバーに関与し、視覚機能の維持に重要な働きをしているのではないかと推察できる。なお、これまで視細胞外節円盤に特異的に出現する分子としては、peripherin/rom-1 と ABC トランスポーターが知られているだけで、それらの機能異常は網膜色素変性症の原因遺伝子になることが報告されている。Pal が網膜色素変性症発症に関わる可能性を示唆した (J.Neuosci., 2000)。
- ・AD や PD のような神経変性疾患では細胞死が観察されるのに対し、統合失調症やうつ病では神経細胞死は観察されない点に着目し、オルガネラ異常と遺伝的情報の両面から研究を進めていた。その結果、2000年、統合失調症の発症には、DISC1 (Disrupted In Schizophrenia 1) 遺伝子の転座が深く関与することをスコットランドの研究グループが明らかにしたのを

きっかけに酵母ツー・ハイブリット法を利用して DISC1 の転座部位を含んで相互作用する蛋白質 FEZ1 (Fasciculation and Elongation protein Zeta-1) を同定した。FEZ1 は突起の伸展や束形成に関わる分子であることが知られている以外その機能はほとんど分かっておらず、DISC1 の機能に至っては全く不明であるが、両分子ともラットの胎生期後半から生直後以降一週間頃までに海馬、大脳皮質の神経細胞に強く発現誘導されるのに対して成熟ラットにおいては発現が下がり、海馬歯状回、嗅球の顆粒細胞で比較的強く発現することが分かった。免疫染色法によって両者は分裂細胞においてはアクチンファイバー上で共局在し、培養神経細胞においては、突起の先端でアクチンと共に局在が見られ、更に PC12 細胞に NGF による突起伸展刺激を与えると発現量の変化なしに DISC1 と FEZ1 の相互作用が増強された。これらのことから統合失調症は神経細胞の発達段階に起因した疾患である可能性が示唆される。我々は DISC1 の転座部位付近の配列をおとりとして大量に発現させると、DISC1 と FEZ1 との相互作用をドミナントネガティブ的に阻害してしまうので、神経細胞の突起が伸長しなくなることも確認した (Mol.Psychiat., 2003, Mol.Brain Res., 2003, in press)。

(2)研究成果の今後期待される効果

高齢化社会を迎え、痴呆患者数は激増している。なかでもアルツハイマー型痴呆症(AD)は増加の一途をたどっている。数年前、AD の進行を遅らせる効果があるエーザイ (東京都) の「アリセプト」(成分名=塩酸ドネペジル) が発売された。AD 患者は国内に 50 万~100 万人、世界では 800 万人以上いるとされるが、これまで有効な治療薬はなく、アリセプトは国内では初の抗 AD 薬となった。海外でも 97 年米、英、独、98 年仏など既に上市済みで現在 40 カ国において発売され一定の評価を得ている。AD では脳内の神経伝達物質アセチルコリンの濃度低下が原因の一つとされるが、アリセプトはアセチルコリンを分解する物質の働きを阻害し、脳内のアセチルコリン濃度の低下を防ぐ働きがある。そのため、症状の根本的な治療はできないが、「軽、中度の AD」に対しては進行を遅らせる効果が期待できるとしている。アリセプトの効果そのものは驚くほど良いわけではないことは多くの医師が認めているが、副作用が小さいこと、他に処方できる薬が少ないことと併せて、市場は急速に拡大している。国内では数年後に年商 1000 億円程度が見込まれる。しかし、重症の患者には効果が見られないこと、服薬を中止するとリバウンドが起きる可能性のあることなど問題点も多い。このような状況の中で AD 病態発症の分子機構を究明し、AD を根治し得る可能性のある治療法が開発されれば「アリセプト」の市場から判断して、年商 1000 億円以上の市場と考えられ、海外においてはこれを更に凌ぐことが予想される。

一方、AD の診断についても全く確立されておらず、AD と考えられる患者から脳脊髄液中の A β 及びタウ蛋白質を測定して診断の補助に使用されているに過ぎないのが現状である。この方法では、患者に非常な苦痛を与え、危険も伴うことから一般的に普及する診断法になり得る可能性はきわめて小さい。我々は AD 患者脳に存在の確認されている PS2V を血液中で検出できる ELISA 系を構築するなど、これまでにない AD の早期診断システムを構築することを目指している。血液中での検出であればほとんど苦痛なく安全にサンプルを採取でき、一般的に広く普及する可能性が高い。従ってその市場性・経済的波及効果は非常に高い。また、本研究は PS2 前駆体 mRNA から PS2VmRNA が産生される機序を解明し、その制御を可能にでき得る。これまで未開発であった SAD 根本的治療薬の開発に直結する。従って、前述の新規早期診断薬の開発によって、早期診断、早期治療が可能システム構築が可能になると考えている。アルツハイマー病の克服についてはどの分野においても国際的競争が激しいが欧米日各グループはいずれもその実現に苦闘している。本研究の成果は我が国から世界に発信しうる成果として保健医療に与える影響ははかり知れない。また SAD における「スプライシング異常産物と神経機能障害」の観点からの研究の成功は他の神経・精神難治疾患の原因解明、治療薬の開発、モデル動物の構築に与える波及効果も極めて大きい。

〔機能修復・再生グループ〕

研究目的

損傷を受けた中枢神経系機能の回復手段として、幹細胞の移植が有望視されている。しかし中枢神経系がシステムとして再稼働するためには、回路の再形成が鍵となるはずであるが、損傷中枢神経の軸索は成熟動物では再生不能である。その原因の一つとして、再生阻害物質の存在が指摘されている。私たちはこれまで軸索の伸展を正と負に制御する因子を同定し、その細胞内シグナル伝達を明らかにしてきた。その結果、中枢神経軸索の伸展を促進する方法の開発に着手するまでに至った。

方法、結論

(1) 中枢神経軸索再生阻害因子受容体の同定 (5,10)

ニューロトロフィンは NGF、BDNF、NT3、NT4/5 からなる神経栄養因子であり、神経細胞の生存や分化に寄与していることが古くから明らかにされていた。チロシンカイネースである Trk 受容体を介するシグナルがこれらの作用を生み出すと考えられてきた。一方神経細胞には、発生期および損傷時に発現の上昇するニューロトロフィン受容体 p75 があるが、その機能については長く不明であった。私たちは数年前からこの p75 の機能解析に取り組み、ニューロトロフィンが、p75 受容体を介して発生期の軸索伸展を促していることを見出した。リガンドが p75 を刺激すると、small GTPase である Rho の不活性化がおり、それにより突起の伸展が促進されるというメカニズムも明らかになった。さらに p75 はニューロトロフィンのシグナルを伝えるのみならず、myelin associated glycoprotein というミエリンの中に存在する糖蛋白からのシグナルをも神経細胞に伝えていることがわかった (Yamashita et al., J. Cell Biol. 2002)。myelin associated glycoprotein は、ニューロトロフィンとは逆に、神経突起の伸展を阻害する作用をもっており、大人の中枢神経の軸索がいったん損傷されると、もはや再生できない原因の一つと考えられている。私たちはこの一連の研究により、p75 は myelin associated glycoprotein のシグナルを伝える因子であり、myelin associated glycoprotein の binding partner であるガングリオシド GT1b と共に、受容体複合を形成していることを明らかにした。また突起伸展阻害は Rho の活性化によるものであった。これらの知見は次のような点で再生研究の進歩に寄与した。

1. 再生阻害蛋白の受容体の同定
2. 一つの受容体が相反するシグナルを細胞に送り、発生期では軸索伸長に、損傷時ではその阻害に働くこと
3. Rho が神経突起伸展制御機序の主役であること

その後、Nogo および OMgp も p75 を介して Rho を活性化することが二つの他のグループからの報告で明らかになり、p75 が全ての再生阻害蛋白のシグナル伝達を担っていることがわかり、p75 による再生阻害の分子メカニズムはこの分野における最も重要な課題であることが明らかになった。

私たちはこの分子メカニズムを現在解析しており、p75 の 5 番目のヘリックスドメインに RhoGDI と Rho の複合体が結合し、Rho の活性化が始まることを明らかにした (18)。さらに 5 番目のヘリックスドメインに特異的に結合するペプチドが、この一連の反応を阻害することもわかってきた。このペプチドは再生治療薬として有望である。

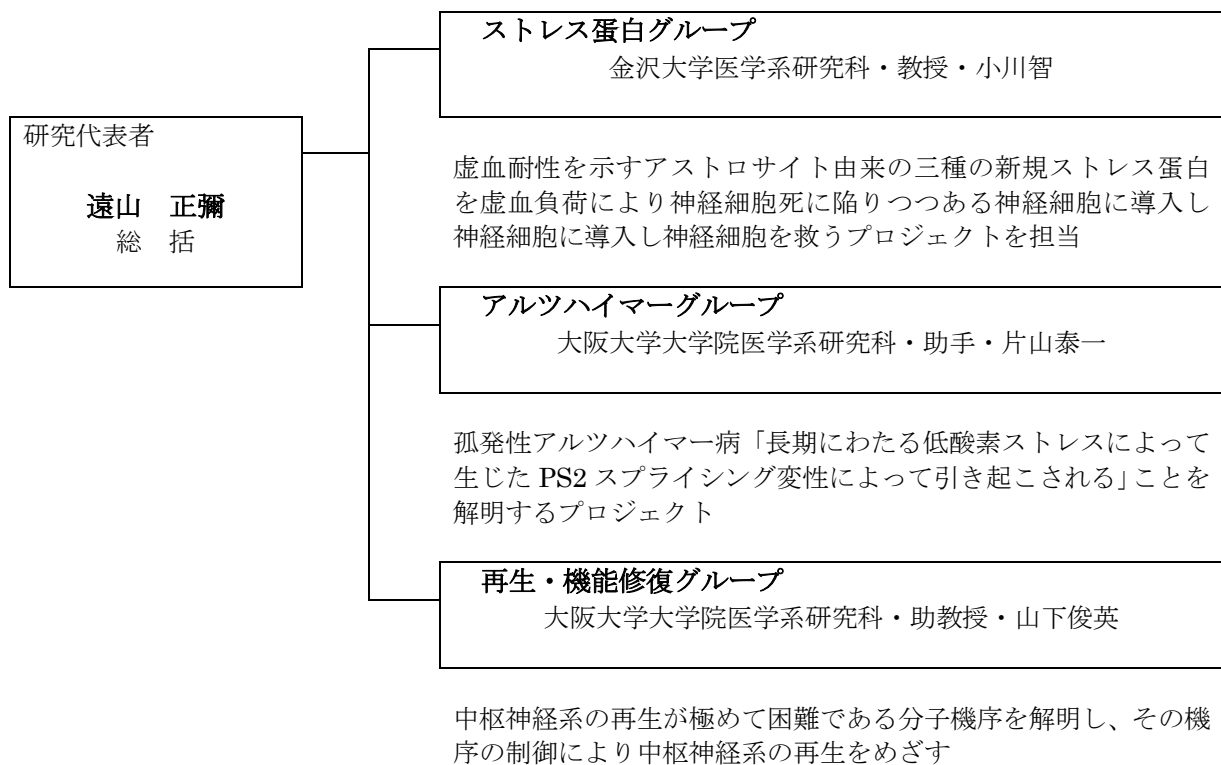
(2) Rho が軸索伸展のキー因子であることの同定

最近の 1 年間は、特に Rho をキーワードに軸索伸長のメカニズムの解明に力を注いできた。その結果、まさに Rho が軸索の形態変化の様々な局面において中心的な役割を果たしていることが明らかになった。

上記のように、再生阻害因子は Rho を活性化することにより軸索の伸展を阻害している。myelin associated glycoprotein のみならず、tumor necrotizing factor という、やはり神経損傷時にグリア系細胞から放出されるサイトカインも Rho を活性化して突起の伸展を抑制しており(ドイツのグループとの共同研究: (Neumann et al., J. Neurosci, 2002)、複数の再生阻害因子が Rho という共通のシグナルを使っていることが示唆された。神経細胞内に Rho の活性を制御する蛋白である FIR と名付けた新規の RhoGEF が神経損傷後に発現上昇し、神経細胞の外側からだけではなく、内側からも突起伸展にブレーキをかけることがわかった(13)。一方面白いことに、この Rho の活性化による突起伸展抑制という作用は成体特有の現象で、幼若な神経細胞では認められない。幼若な神経細胞は再生しやすく、成熟すると再生しにくくなる理由として、阻害因子に対する感受性が変化するのではないかと考えられる。P21(WAF1/Cip1)は通常は核に存在し細胞の分化に関わっているが、これが分化の後に細胞質に出現し、Rho kinase という Rho の下流の因子を阻害することにより、Rho の活性化に基づく反応をブロックすることを発見した(11) (Tanaka et al., J. Cell Biol., 2002)。これが成熟ニューロンと幼若ニューロンの性質の違いであると考えられる。

4. 研究実施体制

(1) 体制



(2) 研究参加メンバー

研究グループ名：ストレス蛋白グループ

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
小川 智	金沢大学	教授	ORP150 TG マウスの解析	H10/12~
堀 修	〃	助手	SERP-1 KO マウスの解析	H10/12~
小澤 健太郎	〃	研究生	神経細胞培養系への遺伝子導入	H10/12~
山口 淳	大阪大学	助手	TG マウスよりの神経細胞培養	H10/12~
谷口 学	〃	技官	MAP2を用いた免疫染色	H10/12~
小山 佳久	大阪大学	技官	神経細胞内 Ca ⁺⁺ の測定	H13/4~
大橋 陽子	科学技術振興事業団	研究補助員	実験補助	H13/5~
原 由美子	科学技術振興事業団	研究補助員	実験補助	H11/2~H15/3
仙波 恵美子	和歌山県立医科大学	教授	ORP150 KO マウスの解析	H10/12~H15/3
野口 光一	兵庫医科大学	教授	ORP150 レポーター動物の解析	H13/1~H15/3
岩田 幸一	日本大学	教授	TG および KO マウスの遺伝子解析	H13/1~H15/3
松山 知弘	兵庫医科大学	講師	SERP-1 KO マウスを用いた脳虚血	H10/12~H15/3
松崎 秀夫	浜松医科大学	助手	ORP150 レポーター動物の作成	H10/12~H15/3
玉谷 実智夫	大阪大学	助手	強制発現ベクターの作成	H10/12~H13/1
蔡 栄浩	〃	大学院生	強制発現ベクターの作成	H10/12~H13/3
三宅 進一	〃	〃	TG マウスの作成	H10/12~H14/3
仲田 公彦	〃	〃	TG マウスを用いた実験的脳虚血の検討	H10/12~H11/5
小山 政一	〃	〃	TG マウスの作成	H10/12~H11/3
内海 真木男	〃	大学院生	三種ストレス蛋白発現増強因	H10/12~H13/3
宮崎 佳代子	科学技術振興事業団	研究補助員	実験補助	H11/1~H11/9
栗山 育子	科学技術振興事業団	研究補助員	事務	H11/1~H11/2
袴田 恭子	科学技術振興事業団	研究補助員	実験補助	H11/11~H12/3
福山 章紀	科学技術振興事業団	研究補助員	実験補助	H14/12~H15/3
満田 憲昭	愛媛大学医学部	助教授	強制発現ベクターの作成	H11/4~H13/3
大久保 信孝	大阪大学	大学院	TG マウスの作成	H11/4~H15/3
山本 麻友香	科学技術振興事業団	研究補助員	実験補助	H11/4~H13/4

研究グループ名：アルツグループ

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
片山 泰一	大阪大学	助手	PS2V のターゲット分子の同定	H10/12~
米田 託成	大阪大学	助手	HMG-I トランスジェニックマウスの作製	H10/12~
森 泰丈	大阪大学	助手	HMG-I 阻害方法の解明	H10/12~
本田 章子	大阪大学	研究生	〃	H10/12~
安田 裕一	大阪大学	研究員	HMG-I トランスジェニックマウスの作製	H12/4~
三好 耕	岡山大学	助手	〃	H10/12~
人見 淳一	大阪大学	大学院	〃	H10/12~
眞部 孝幸	大阪大学	ポスドク	〃	H11/4~
大野 加代子	大阪大学	大学院	〃	H12/4~
宮田 信吾	大阪大学	大学院	HMG-I 阻害方法の解明	H13/4~
馬場 孝輔	大阪大学	大学院	〃	H13/4~

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
松崎 伸介	大阪大学	大学院	〃	H13/4~
松田 理	大阪大学	大学院	〃	H13/4~
山岸 覚	大阪大学	研究員	HMG-Iトランスジェニックマウスの作製	H14/3~
藤原 達司	大阪大学	大学院	HMG-Iトランスジェニックマウスの作製	H14/6~
荒川 明美	科学技術振興事業団	研究補助員	実験補助	H12/1~
服部 剛志	大阪大学	大学院	HMG-Iトランスジェニックマウスの作製	H15/4~
奥田 洋明	大阪大学	大学院	HMG-Iトランスジェニックマウスの作製	H15/4~
今泉 和則	奈良先端科学技術大	助教授	PS2Vのターゲット分子の同定	H10/12~H15/3
金銅 英二	松本歯科大学	教授	〃	H14/4~H15/3
河合 良訓	慈恵医大	教授	〃	H14/4~H15/3
板東 良雄	旭川医科大学	助手	PS2Vのターゲット分子の同定	H12/4~H15/3
加藤 昌哉	大阪大学	研究生	AP測定系の確立	H10/12~H11/5
佐藤 直也	〃	研究生	PS2 スプライシング変種のトランスジェニックマウスの作製	H10/12~H12/3
田辺 勝久	〃	大学院生	ターゲット分子の同定	H10/12~H12/3
鶴川 眞也	名古屋市大	助手	PS2 スプライシング変種のトランスジェニックマウスの作製	H10/12~H11/5
五味 文	大阪大学	助手	HMG-Iトランスジェニックマウスの作製	H10/12~H15/3
岡 晶子	科学技術振興事業団	研究補助員	実験補助	H11/4~H12/3
稲垣 忍	大阪大学	教授	PS2Vのターゲット分子の同定	H12/4~H13/3
坂田 和子	大阪大学	大学院生	PS2Vのターゲット分子の同定	H10/12~H12/3
森原 剛史	大阪大学	基礎系医員	PS2Vのターゲット分子の同定	H10/12~H12/3
由井 大錦	大阪大学	大学院	PS2Vのターゲット分子の同定	H12/3~H13/3
王 亜雲	大阪大学	留学生	PS2Vのターゲット分子の同定	H10/12~H12/3

研究グループ名：再生・機能修復グループ

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
山下 俊英	大阪大学	助教授	MAG受容体の同定	H12/9~
田中 啓之	〃	大学院生	slitのシグナル伝達の解明	H13/4~
水野 龍義	〃	大学院生	MAG受容体の同定	H13/4~
久保 盾貴	〃	研究生	p75のシグナル伝達	H13/4~
辻 隆治	〃	大学院生	p75のシグナル伝達	H14/9~
川北 晃裕	〃	大学院生	nogoのシグナル伝達の解明	H12/4~
青木 美和	大阪大学	修士	MAGのシグナル伝達の解明	H13/5~
羽田 克彦	大阪大学	大学院生	nogoのシグナル伝達の解明	H14/4~
森屋 悦子	科学技術振興事業団	研究事務員	事務	H11/1~
熊本 奈都子	大阪大学	大学院	nogoのシグナル伝達の解明	H15/4~
細見 早苗	大阪大学	大学生	強制発現ベクターの作成	H15/4~
川北 晃裕	大阪大学	〃	TGマウスの作成	H12/4~
トマス・マドゥラ	大阪大学	留学生	TGマウスの作成	H14/4~
樋口 晴久	大阪大学	大学院生	発現系の解析	H12/12~H15/7
吉矢 和久	〃	大学院生	神経新生に関する実験	H13/4~H15/3

河西 克介	〃	大学院生	MAG のシグナル伝達の解明	H12/4~ H15/3
木山 博資	大阪市立大学	教授	神経新生に関する実験	H10/12~ H15/3
塩坂 貞夫	奈良先端科学技術大学院大学	教授	MAG のシグナル伝達の解明	H12/7~ H15/3
加藤 啓子	〃	助手	nogo のシグナル伝達の解明	H12/4~ H15/3
吉田 成孝	旭川医科大学	教授	slit のシグナル伝達の解明	H12/4~ H15/3

5. 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	場所	趣旨	内容	参加人数
平成11年 12月14日	千里ライフサイエンスセンター	千里神経懇話会	脳とレプチン	80
平成12年 1月28日	千里ライフサイエンスセンター	千里神経懇話会	新しい蛋白、ペプチドの分子薬理	90
平成12年 2月28日	千里ライフサイエンスセンター	千里神経懇話会	ペインリサーチにおける新知見-Part2	86
平成12年 5月12日	千里ライフサイエンスセンター	千里神経懇話会	神経可塑性の新展開	68
平成12年 7月10日	千里ライフサイエンスセンター	千里神経懇話会	脳虚血と細胞応答	79
平成12年 9月21日	千里ライフサイエンスセンター	千里神経懇話会	孤束核:new insights in the old structure	56
平成12年 11月21日	千里ライフサイエンスセンター	千里神経懇話会	神経細胞のコンタクト制御機構	68
平成13年 1月26日	千里ライフサイエンスセンター	千里神経懇話会	神経細胞死シグナリング	71
平成13年 2月26日	千里ライフサイエンスセンター	千里神経懇話会	ペインリサーチにおける新知見-Part3	59
平成13年 5月30日	千里ライフサイエンスセンター	千里神経懇話会	神経の可塑的变化における糖鎖シグナルの役割	52
平成13年 9月10日	千里ライフサイエンスセンター	千里神経懇話会	サイトカイン受容体とそのシグナル伝達の新知見	69
平成13年 10月23日	千里ライフサイエンスセンター	千里神経懇話会	神経の発生と再生	74
平成13年 11月26日	千里ライフサイエンスセンター	千里神経懇話会	細胞小器官特異的シグナル応答と神経細胞障害	49
平成14年 1月18日	千里ライフサイエンスセンター	千里神経懇話会	細胞の生と死のバランスの妙	52
平成14年 2月25日	千里ライフサイエンスセンター	千里神経懇話会	ペインリサーチにおける新知見-Part4-ATPと痛み-	57
平成14年 5月24日	千里ライフサイエンスセンター	千里神経懇話会	目で見る神経細胞のダイナミズム	76
平成14年 7月23日	千里ライフサイエンスセンター	千里神経懇話会	ストレスの脳科学:モデル動物における遺伝子発現	82

平成14年 9月27日	千里ライフサイエンスセンター	千里神経懇話会	小胞体から発信される細胞死の新展開	53
平成15年 1月30日	千里ライフサイエンスセンター	千里神経懇話会	Rhoを介した神経軸索制御	61
平成15年 3月20日	千里ライフサイエンスセンター	千里神経懇話会	抹消神経の再生、発生	55
平成15年 4月14日	千里ライフサイエンスセンター	千里神経懇話会	ペインリサーチにおける新知見—Part5	54
平成15年 5月22日	千里ライフサイエンスセンター	千里神経懇話会	アルツハイマー病診断に応用可能な分子マーカーの新知見	82
平成15年 6月30日	千里ライフサイエンスセンター	千里神経懇話会	海馬のシナプス校正接着分子と神経機能	65
平成15年 9月12日	千里ライフサイエンスセンター	千里神経懇話会	生殖・発生から神経系再生にいたる多彩な生命現象を引き起こすDNAのメチル化を勉強しよう！	62
平成15年 11月17日	千里ライフサイエンスセンター	千里神経懇話会	幹細胞バイオロジー	51
平成11年 10月15日	千里ライフサイエンスセンター	千里ライフサイエンスセミナー ブレインサイエンスシリーズ	神経難病の最前線—治療と創薬に向けて—	200～250
平成12年 12月12日	千里ライフサイエンスセンター	千里ライフサイエンスセミナー ブレインサイエンスシリーズ	神経相互接着ダイナミクスとその異常	200～250
平成13年 12月14日	千里ライフサイエンスセンター	千里ライフサイエンスセミナー ブレインサイエンスシリーズ	小胞体ストレスと神経細胞死	200～250
平成14年 12月6日	千里ライフサイエンスセンター	千里ライフサイエンスセミナー ブレインサイエンスシリーズ	運動神経疾患の治療をめざす基礎と臨床の最先端	200～250
平成16年 1月16日	千里ライフサイエンスセンター	千里ライフサイエンスセミナー ブレインサイエンスシリーズ	アルツハイマー病研究の最前線と治療への挑戦	

(2) 招聘した研究者等
なし

6. 研究成果の発表

(1) 論文(原著論文)発表

研究業績

(ストレス蛋白グループ)

(1)論文発表(海外 22 件、国内 0 件)

1. Yan S.D., Zhu Y., Zhu A., Fu J., Zhu H., Zhu Y., Gibson L., Collison K., Mohanna Al., Ogawa S., Roher A., Clarke SG., and Stern D. Role of ERAB/L-3 Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase type II activity in Ab-induced cytotoxicity. *J.Biol.Chem* 1999 274 2145-2156
2. Ozawa K., Kuwabara K., Tamatani M., Yakatsuji K., Tsumakoto Y., Kaneda S., Yanagi H., Stern D., Ogawa S., and Tohyama M. ORP150 (150 kDa oxygen-regulated protein) suppresses hypoxia-induced apoptotic cell death. *J. Biol. Chem.* 1999 274 6397-6404
3. Tamatani M, Che YH, Matsuzaki H, Ogawa S, Okado H, Miyake S, Mizuno T, and Tohyama M. Tumor necrosis factor induces Bcl-2 and Bcl-x expression through NFkappaB activation in primary hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* 1999 274 8531-8538
4. Niitsu Y, Hori O, Yamaguchi A, Bando Y, Ozawa K, Tamatani M, Ogawa S, and Tohyama M. Exposure of cultured primary rat astrocytes to hypoxia results in intracellular glucose depletion and induction of glycolytic enzymes. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1999 74 26-34
5. Yamaguchi A, Hori O, Stern DM, Hartmann E, Ogawa S, and Tohyama M. Stress-associated endoplasmic reticulum protein 1 (SERP1)/Ribosome-associated membrane protein 4 (RAMP4) stabilizes membrane proteins during stress and facilitates subsequent glycosylation. *J. Cell Biol.* 1999 147 1195-1204
6. Kobayashi T, Ogawa S, Yura T, Yanagi H. Abundant expression of 150-kDa oxygen-regulated protein in mouse pancreatic beta cells is correlated with insulin secretion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000 267: 831-837
7. Che YH, Tamatani M, Yamashita T, Gomi F, Ogawa S, Tohyama M. Changes in mRNA of protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase following facial nerve transection. *J. Chem. Neuroanat.* 2000 17 199-206
8. Bando Y, Ogawa S, Yamaguchi A, Kuwabara K, Ozawa K, Hori O, Yanagi H, Tamatani M, and Tohyama M. The 150 kDa Oxygen Regulated Protein (ORP150) functions as a novel molecular chaperone in the protein transport of the MDCK cells. *Am. J. Physiol. (Cell Physiol.)* 2000, 278, (6), C1172-1182
9. Taguchi A, Blood DC, Toro G, Canet A, Lee DC, Qu W, Tanji N, Lu Y, Lalla E, Fu C, Hofmann MA, Kislinger T, Ingram M, Lu A, Tanaka H, Hori O, Ogawa S, Stern DM, and Schmidt AM. Blockade of rage-amphoterin axis suppresses tumor growth and metastases. *Nature* 2000 405: 354-360.
10. Du Yan S, Zhu Y, Stern ED, Hwang YC, Hori O, Ogawa S, Frosch MP, Connolly ES Jr, McTaggart R, Pinsky DJ, Clarke S, Stern DM, and Ramasamy R. Amyloid beta-peptide-binding alcohol dehydrogenase is a component of the cellular response to nutritional stress. *J Biol. Chem.* 2000, 275: 27100-27109
11. Tamatani M, Matsuyama T, Yamaguchi A, Mitsuda N, Tsukamoto Y, Taniguchi T, Che YH, Ozawa K, Hori O, Nishimura H, Yamashita A, Okabe M, Yanagi H, Stern DM, Ogawa S, and Tohyama M. ORP150 protects against hypoxia/ischemia-induced neuronal death. *Nature Med.* 2001, 7; 317-323
12. Tsukamoto Y, Matsuo N, Ozawa K, Hori O, Higashi T, Nishizaki J, Tohnai N, Nagata I, Kawano K, Yutani C, Hirota S, Kitamura Y, Stern D, and Ogawa S. Expression of a novel

- RNA splicing factor, RA301/Tra2beta, in vascular lesions and its role in smooth muscle cell proliferation. *Am. J. Pathol.* 2001, 158; 1685-1694
13. Ozawa K, Tsukamoto Y, Hori O, Kitao Y, Yanagi Stern D, and Ogawa S. Regulation of tumor angiogenesis by ORP150, an inducible endoplasmic reticulum chaperone. *Can. Res.* 2001, 61; 4206-4213
 14. Ozawa K, Kondo T, Hori O, Kitao Y, Stern D, Eisenmenger W, Ogawa S, and Ohshima T. Expression of ORP150 (150 kDa Oxygen Regulated Protein) accelerates wound healing by modulating intracellular VEGF transport. *J. Clin. Invest.* 2001, 108; 41-50.
 15. Sato M, Sugano N, Ohzono K, Nomura S, Kitamura Y, Tsukamoto Y, Ogawa S. Apoptosis and expression of stress protein (ORP150, HO1) during development of ischaemic osteonecrosis in the rat. *J Bone Joint Surg Br* 2001; 83 :751-759.
 16. Vorp DA, Lee PC, Wang DH, Makaroun MS, Nemoto EM, Ogawa S, and Webster MW. Association of intraluminal thrombus in abdominal aortic aneurysm with local hypoxia and wall weakening. *J Vasc Surg* 2001; 34: 291-299
 17. Kitao Y, Ozawa K, Miyazaki M., Tamatani M., Kobayashi T., Yanagi H., Okabe M., Ikawa M., Yamashita T., Tohyama M., Stern D., Hori O., and Ogawa S. Expression of 150 kDa Oxygen Regulated Protein (ORP150), a Molecular Chaperone in the Endoplasmic Reticulum, Rescues Hippocampal Neurons from Glutamate Toxicity. *J. Clin. Invest.* 2001; 108, 1439-1450
 18. Miyagi T, Hori O, Egawa M, Kato H, Kitagawa Y, Konaka H, Ozawa K, Koshida K, Uchibayashi T, Ogawa S, and Namiki M. Antitumor Effect of Reduction of 150-kDa Oxygen-Regulated Protein Expression in Human Prostate Cancer Cells. *Mol. Urol.* 2001; 5, 79-80
 19. Yamaguchi A, Taniguchi M, Hori O, Ogawa S, Tojo N, Matsuoka N, Miyake Si S, Kasai K, Sugimoto H, Tamatani M, Yamashita T, Tohyama M. Peg3/Pw1 Is Involved in p53-mediated Cell Death Pathway in Brain Ischemia/Hypoxia. *J. Biol. Chem.* 2002; 277, 623-629
 20. Hori O, Ichinoda F, Tamatani T, Yamaguchi A, Sato N, Ozawa K, Kitao Y, Miyazaki M, Harding HP, Ron D, Tohyama M, Stern DM, and Ogawa S. Transmission of cell stress from endoplasmic reticulum to mitochondria: expression of Lon protease. *J Cell Biol.* 2002; 157, 1151-1160
 21. Miyazaki M, Ozawa K, Hori O, Kitao Y, Matsushita K, Ogawa S, and Matsuyama T. Expression of ORP150 (150 kDa oxygen regulated protein) in the hippocampus suppresses delayed neuronal cell death. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2002; 22, 979-987
 22. Kitao Y, Hashimoto K, Matsuyama T, Iso H, Tamatani T, Hori O, Stern DM, Kano M, Ozawa K, and Ogawa S. ORP150/HSP12A regulates purkinje cell survival: a role for ER stress in cerebellar development. *J. Neurosci.*, in press, 2003.

(2) 口頭発表

① 学会

国内 32 件, 海外 12 件

②その他

国内 26 件

(アルツハイマーグループ)

1.原著・論文発表(海外20件、国内0件)

1. Onuki R, Bando Y, Suyama E, Katayama T, Kawasaki H, Sugiyama Y, Baba T, Tohyama M,

- Taira K., An RNA-dependent protein kinase is involved in tunicamycin-induced apoptosis and Alzheimer's disease., *EMBO J* 2003, in press
2. Matsuzaki S, Manabe T, Katayama T, Nishikawa A, Yanagita T, Okuda H, Yasuda Y, Miyata S, Meshitsuka S, Tohyama M., Metals accelerate production of the aberrant splicing isoform of the Presenilin-2., *J Neurochem* 2003, in press
 3. Honda A, Miyoshi K, Baba K, Taniguchi M, Koyama Y, Kuroda S, Katayama T, Tohyama M., Expression of fasciculation and elongation protein zeta-1 (FEZ1) in the developing rat brain., *Brain Res Mol Brain Res* 2003, in press
 4. Bando Y, Katayama T, Tamatani M, Kasai K, Taniguchi M, and Tohyama M., GRP94 (94kDa Glucose-Regulated Protein) protects from ischemic neuronal cell death against ischemia/reperfusion injury., *Eur. J. Neurosci.* 2003, 18: 1-13
 5. Miyoshi K, Honda A, Baba K, Taniguchi M, Oono K, Fujita T, Kuroda S, Katayama T, Tohyama M., Disrupted-In-Schizophrenia 1, a candidate gene for schizophrenia, participates in neurite outgrowth., *Mol Psychiatr* 2003, 8(7): 685-694
 6. Katayama T, Imaizumi K, Yoneda T, Taniguchi M, Honda A, Manabe T, Hitomi J, Oono K, Baba K, Miyata S, Matsuzaki S, Takatsuji K, Tohyama M., Role of ARF4L in Recycling between Endosomes and the Plasma Membrane., *Cell Mol Neurobiol* 2003, 23(6):991-1001
 7. Manabe T, Katayama T, Imaizumi K, Sato N, Gomi F, Hitomi H, Yanagita T, Kudo T, Honda A, Mori Y, Matsuzaki S, Mayeda A, Tohyama M., Induced HMGA1a expression causes aberrant splicing of Presenilin-2 pre-mRNA in sporadic Alzheimer's disease., *Cell Death Diff* 2003, 10: 698-708
 8. Yasuda Y, Katayama T, Imaizumi K, Yatera M, Tohyama M, Kudo T, Takeda M., Familial Alzheimer's Disease linked Presenilin-1 mutants impede translation regulation under endoplasmic reticulum stress., *Biochem Bioph Res Co* 2002 Aug 16;296(2):313-8
 9. Manabe T, Katayama T, Sato N, Kudo T, Matsuzaki S, Imaizumi K, Tohyama M., The cytosolic inclusion bodies that consist of splice variants that lack exon 5 of the presenilin-2 gene differ obviously from Hirano bodies observed in the brain from sporadic cases of Alzheimer's disease patients., *Neurosci Lett* 2002, 328(2):198-200
 10. Katayama T, Imaizumi K, Honda A, Yoneda T, Kudo T, Takeda M, Mori K., Rozmahel R, Fraser P, St. George-Hyslop P, Tohyama T., Disturbed activation of ER stress transducers by FAD-linked PS1 mutations., *J Biol Chem* 2001, 276(46): 43446-43454
 11. Imaizumi K, Katayama T, Tohyama M., Presenilin and the UPR., *Nat. Cell Biol.* (Letter) 2001, 3(5): E104
 12. Yui D, Yoneda T, Oono K, Katayama T, Yasuda Y, Imaizumi K, Tohyama M., Interchangeable binding of Bcl-10 to TRAF2 and cIAPs regulates apoptosis signaling., *Oncogene* 2001, 20:4317-4323
 13. Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, Katayama T, Tohyama M., Activation of Caspase-12, an Endoplasmic Reticulum (ER) Resident Caspase, through Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 2-dependent Mechanism in Response to the ER stress., *J Biol Chem* 2001, 276(17): 13935-13940
 14. Sato N, Imaizumi K, Manabe T, Taniguchi M, Hitomi J, Katayama T, Yoneda T, Morihara T, Yasuda Y, Takagi T, Kudo T, Tsuda T, Itoyama Y, Makifuchi T, Fraser PE, St. George-Hyslop P, Tohyama M., Increased production of β -amyloid and vulnerability to ER stress by an aberrant spliced form of presenilin-2., *J Biol Chem* 2001, 276(3): 2108-2114
 15. Morihara T, Katayama T, Sato N, Yoneda T, Manabe T, Hitomi J, Abe H, Imaizumi K and Tohyama M. Absence of endoproteolysis but no effects on amyloid β production by alternative splicing forms of presenilin-1, which lack exon 8 and replace D257A. *Brain Res Mol Brain Res*, 2000, 85(1-2):85-90.

16. Miyoshi K, Katayama T, Imaizumi K, Taniguchi M, Mori Y, Hitomi J, Yui D, Manabe T, Gomi F, Yoneda T & Tohyama M ,Characterization of mouse Ire1 α : cloning, mRNA localization in the brain and functional analysis in a neural cell line. ,*Brain Res Mol Brain Res*, 2000, 85(1-2): 68-76.
17. Mori Y, Imaizumi K, Katayama T, Yoneda T and Tohyama M.,Two cis-acting elements in the 3' untranslated region of α -CaMKII regulate its dendritic targeting .,*Nat Neurosci* 2000 ; 3(11):1079-1084
18. Yoneda T, Imaizumi K, Maeda M, Yui D, Manabe T, Katayama T, Sato N, Gomi F, Morihara T, Mori Y, Miyoshi K, Hitomi J, Ugawa S, Yamada S, Okabe M, Tohyama M. ,Regulatory mechanisms of TRAF2-mediated signal transduction by Bcl10, a MALT lymphoma-associated protein.,*J Biol Chem*. 2000 ;275(15):11114-20.
19. Katayama T, Imaizumi K, Sato N, Miyoshi K, Kudo T, Hitomi J, Morihara T, Yoneda T, Gomi F, Mori Y, Nakano Y, Takeda J, Tsuda T, Itoyama Y, Murayama O, Takashima A, St George-Hyslop P, Takeda M, Tohyama M.,Presenilin-1 mutations downregulate the signalling pathway of the unfolded-protein response.,*Nat Cell Biol*. 1999 ,1(8):479-485.
20. Imaizumi K, Morihara T, Mori Y, Katayama T, Tsuda M, Furuyama T, Wanaka A, Takeda M, Tohyama M. ,The cell death-promoting gene DP5, which interacts with the BCL2 family, is induced during neuronal apoptosis following exposure to amyloid beta protein.,*J Biol Chem*. 1999 ,274(12):7975-81.

2. その他の著作物

総説(海外 1 件、国内 7 件)

1. Kudo T, Katayama T, Imaizumi K, Yasuda Y, Yatera M, Okochi M, Tohyama M, Takeda M. The Unfolded Protein Response Is Involved in the Pathology of Alzheimer's Disease. *Ann NY Acad Sci*. 2002 Nov;977:349-355.
1. 片山泰一、眞部孝幸、遠山正彌
「孤発性アルツハイマー病に関連する分子「HMGA1a」の研究動向」
日本臨床 2003, Vol61, No4: 677-688
2. 片山泰一、眞部孝幸、松崎伸介、遠山正彌
「アルツハイマー病の発症機序について」
メディカル朝日 2002, Vol11, No9: 792-796
3. 工藤喬、今泉和則、片山泰一、遠山正彌、武田雅俊
「小胞体ストレスと神経細胞死」
Bio Clinica 2002, Vol17, No9: 792-796
4. 工藤喬、今泉和則、片山泰一、遠山正彌、武田雅俊
「ER ストレス」
CLINICAL NEUROSCIENCE 2002, Vol20, No6: 647-649
5. 片山泰一、眞部孝幸、遠山正彌
「小胞体機能異常を引き起こすプレセニリン 2 異常スプライシング」
脳 21 2002, Vol5, No2: 31-36
6. 板東良雄、片山泰一
「ポストゲノムのジーンディスカバリー」
脳 21 2001, Vol4, No4: 83-89
7. 片山泰一、遠山正彌
「小胞体はタンパク質の品質管理部門」
ファルマシア 2001, Vol37, No10: 879-883

著書 (海外 2 件、国内 2 件)

1. Katayama,T., Manabe, T., Imaizumi, K., Sato, N., Hitomi J., Kudo T., Yanagita T., Matsuzaki S., Mayeda A., Tohyama, M. : The RNA-binding protein causes aberrant splicing of Presenilin-2 pre-mRNA in sporadic Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology of Alzheimer Disease and Related Disorders*. Takeda M (eds) Basel, Karger, pp1-14, (2003)
2. Kudo,T., Katayama,T., Imaizumi,K., Yasuda,Y., Yatera,M., Okochi,M., Tanaka,T., Kamino,K., Tohyama M, Takeda,M. : Endoplasmic reticulum stress and Alzheimer's disease. *Mapping the Progress of Alzheimer's and Parkinson's Disease*, Mizuno,Y., Fisher,A., Hanin,I. (eds), p95-p100.(2002)
1. 片山泰一、遠山正彌
「神経変性疾患にみられるアポトーシス」
Molecular Medicine 「アポトーシスと疾患」
(一條秀憲編集)、中山書店、東京
2002、Vol.39. No.6:p684-691
2. 片山泰一、遠山正彌
「小胞体ストレスとアポトーシス」
実験医学 (増刊号) 「アポトーシス研究の新たな挑戦」
(辻本賀英編集)、羊土社、東京
2001、Vol.19. No.13: p103-110

(再生・機能修復グループ)

(1) 原著・論文 (海外 24 件、国内 0 件)

1. Nonaka, M., Kohmura, E., Yamashita, T., Yamauchi, A., Fujinaka, T., Yoshimine, T., Tohyama, M. and Hayakawa, T. (1999) Kainic acid-induced seizure upregulates Na(+)/myo-inositol cotransporter mRNA in rat brain. *Mol. Brain Res.* 70, 179-86.
2. Sakata, K., Shimada, S., Yamashita, T., Inoue, K. and Tohyama, M. (1999) Cloning of a bovine orphan transporter and its short splicing variant. *FEBS Lett.* 443, 267-70.
3. Yamashita, T. (corresponding author), Yamauchi, A., Miyai, A., Taniguchi, M., Yoshimine, T. and Tohyama, M. (1999) Neuroprotective role of Na⁺/myo-inositol cotransporter against veratridine cytotoxicity. *J. Neurochem.* 72, 1864-1870.
4. Yamashita, T. (corresponding author), Yamauchi, A., Miyai, A., Taniguchi, M., Yoshimine, T. and Tohyama, M. (1999) Differential regulation of adenine nucleotide translocators by hypertonicity in the brain. *J. Neurochem.* 72, 1259-1265.
5. Yamashita, T., Tucker, K. L. and Barde, Y.A. (1999) Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron* 24, 585-93.
6. Taniguchi, M., Yamashita, T., Kumura, E., Tamatani, M., Kobayashi, A., Yokawa, T., Maruno, M., Kato, A., Ohnishi, T., Kohmura, E., Tohyama, M. and Yoshimine, T. (2000) Induction of aquaporin-4 water channel mRNA after focal cerebral ischemia in rat. *Mol. Brain Res.* 78, 131-137.
7. Che, Y.H., Tamatani, M., Yamashita, T., Gomi, F., Ogawa, S. and Tohyama, M. (2000) Changes in mRNA of protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase following facial nerve transection. *J. Chem. Neuroanat.* 17, 199-206.
8. Tanabe, K., Tachibana, T., Yamashita, T., Che, Y.H., Yoneda, Y., Ochi, T., Tohyama, M., Yoshikawa, H. and Kiyama, H. (2000) The small GTP-binding protein TC10 promotes nerve elongation in neuronal cells, and its expression is induced during nerve regeneration in rats. *J. Neurosci.* 20, 4138-4144.
9. Sakata, K., Yamashita, T., Maeda, M., Moriyama, Y., Shimada, S. and Tohyama, M.

(2001) Cloning of a lymphatic peptide / histidine transporter. *Biochem. J.* 356, 53-60.

1 0. Yamashita, T., Higuchi, H., and Tohyama, M. (2002) The p75 receptor transduces the signal from myelin-associated glycoprotein to Rho. *J. Cell Biol.* 157, 565-570.

1 1. Tanaka, H., Yamashita, T., Asada, M., Mizutani, S., Yoshikawa, H. and Tohyama, M. (2002) Cytoplasmic p21^{Cip1/WAF1} regulates neurite remodeling by inhibiting Rho-kinase activity. *J. Cell Biol.* 158, 321-329.

1 2. Kubo, T., Yamashita, T., Yamaguchi, A., Sumimoto, H., Hosokawa, K. and Tohyama, M. (2002) A novel FERM domain including guanine nucleotide exchange factor is involved in Rac signaling and regulates neurite remodeling. *J. Neurosci.* 22, 8504-8513.

1 3. Kubo, T., Yamashita, T., Yamaguchi, A., Hosokawa, K. and Tohyama, M. (2002) Analysis of genes induced in peripheral nerve after axotomy using cDNA microarrays. *J. Neurochem.* 82, 1129-1136.

1 4. Miyake, S., Yamashita, T., Taniguchi, M., Tamatani, M., Sato, K. and Tohyama, M. (2002) Identification and characterization of a novel mitochondrial tricarboxylate carrier. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295, 463-468.

1 5. Miyake, S., Yamashita, T., Taniguchi, M., Tamatani, M., Sato, K., Kawai, Y., Senba, E., Mitsuda, N., Hori, O., Yamaguchi, A. and Tohyama, M. (2002) Expression of mitochondrial tricarboxylate carrier TCC mRNA and protein in the rat brain. *Mol. Brain Res.* 100, 67-73.

1 6. Che, Y.H., Yamashita, T., Higuchi, H. and Tohyama, M. (2002) Changes in mRNA for choline transporter-like protein following facial nerve transection. *Mol. Brain Res.* 101, 122-125.

1 7. Che, Y.H., Yamashita, T. and Tohyama, M. (2002) Changes in mRNA for VAMPs following facial nerve transection. *J. Chem. Neuroanat.* 24, 147-152.

1 8. Yamashita, T. and Tohyama, M. (2003) The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho GDI. *Nature Neurosci.* 6, 461-467.

1 9. Higuchi, H., Yamashita, T., Yoshikawa, H. and Tohyama, M. (2003) PKA phosphorylates the p75 receptor and regulates its localization to lipid rafts. *EMBO J.* 22, 1790-1800.

2 0. Higuchi, H., Yamashita, T., Yoshikawa, H. and Tohyama, M. (2003) Functional inhibition of the p75 receptor using a small interfering RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 804-809.

2 1. Hosomi, S., Yamashita, T., Aoki, M. and Tohyama, M. (2003) The p75 receptor is required for BDNF-induced differentiation of neural precursor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 1011-1015.

2 2. Kasai, K., Yamashita, T., Yamaguchi, A., Yoshiya, K., Kawakita, A., Tanaka, H., Sugimoto, H. and Tohyama, M. (2003) Induction of mRNAs and proteins for Na/K ATPase α 1 and β 1 subunits following hypoxia/reoxygenation in astrocytes. *Mol. Brain Res.* 110, 38-44.

2 3. Madura, T., Yamashita, T., Kubo, T., Taniguchi, M., Kawakita, A., Hosokawa K. and Tohyama, M. (2003) Expression of FERM domain including guanine nucleotide exchange factor mRNA in adult rat brain. *Mol. Brain Res.* 114, 163-167.

2 4. Kawakita, A., Yamashita, T., Taniguchi, M., Koyama, Y., Kubo, T., Tsuji, L. and Tohyama, M. Developmental regulation of FERM domain including guanine nucleotide exchange factor gene expression in the mouse brain. *Dev. Brain Res.* In press.

(2) 総説 (国内 4 件)

- 1) 山下俊英、遠山正彌: 中枢神経再生への試み、脳 2 1、5: 101-103, 2002
- 2) 山下俊英、遠山正彌: 神経軸索誘導と中枢神経再生、医学のあゆみ、202: 343-346, 2002
- 3) 谷口理章、山下俊英、吉峰俊樹: 脳浮腫、Brain Rescue、4: 16-19, 2003
- 4) 山下俊英、遠山正彌: 中枢神経の軸索再生のメカニズム、脳 2 1、6: 133-136, 2003

(3) 学会発表

アルツハイマーグループ

発表者	学会名	タイトル	月 日
森泰丈 大阪大学	第 108 回日本解剖学会総会	樹状突起における CaMKII mRNA の局所翻訳を可視化するシステムの構築	2003/4/3
松田理 大阪大学	第 108 回日本解剖学会総会	酸化ストレスにて誘導される網膜色素上皮細胞遺伝子群の解析	2003/4/3
人見淳一 大阪大学	第 108 回日本解剖学会総会	小胞体ストレスによって活性化されるカスパー	2003/4/1
米田託成 大阪大学	第108回日本解剖学会総会	ミトコンドリアにおける蛋白質管理機構	2003/4/1
眞部孝幸 大阪大学	The 3 rd Asian Pacific International Congress of Anatomists	Aberrant RNA processing and sporadic Alzheimer's disease	2002/3/31
板東良雄 大阪大学	The 3 rd Asian Pacific International Congress of Anatomists	Gene Discovery using Post-genomic approach	2002/3/31
三好耕 大阪大学	第25回日本神経科学大会 東京	精神分裂病遺伝子候補DISC1の発現解析	2002/7/7
板東良雄 旭川医科大学	第25回日本神経科学大会 東京	小胞体ストレスにおける細胞死促進因子PKRの神経変性疾患への関与	2002/7/7
宮田信吾 大阪大学	第25回日本神経科学大会 東京	ラット海馬の樹状突起における局所的翻訳のリアルタイムな検出	2002/7/7
片山泰一 大阪大学	第45回日本神経化学大会 札幌 (シンポジウム)	The RNA-binding protein causes aberrant splicing of presenilin-2 pre-mRNA in sporadic Alzheimer's disease	2002/7/19
大貫玲子 大阪大学	第45回日本神経化学大会 札幌	小胞体ストレスにおける細胞死促進因子の探索	2002/7/17
板東良雄 大阪大学	第45回日本神経化学大会 札幌	ERストレスによって誘導される因子PKRの神経変性疾患への関与	2002/7/17
本田章子 大阪大学	第45回日本神経化学大会 札幌	Biological activity of neurotrophins is dependent on proper recruitment of Rac1 to lipid rafts	2002/7/18
馬場孝輔 大阪大学	第45回日本神経化学大会 札幌	Morphological changes in mouse neuroblastoma caused by disruption of glycosylation	2002/7/18
森泰丈 大阪大学	第45回日本神経化学大会 札幌	ACaMKII mRNA の3'非翻訳領域に結合し樹状突起への局在を決定する蛋白因子群の同定	2002/7/18
大野加代子 大阪大学	第45回日本神経化学大会 札幌	小胞体ストレストランスデューサーIRE1に相互作用する因子の同定と機能解析	2002/7/18

眞部孝幸 大阪大学	The 8th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders ; Stockholm	Aberrant RNA processing and sporadic cases of Alzheimer's disease	2002/7/24
松崎伸介 大阪大学	The 8th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders ; Stockholm	Aberrant splicing variant of Presenilin-2 observed in sporadic AD is evoked by treatment with some of metals	2002/7/24
人見淳一 大阪大学	第24回日本分子生物学会大会 横浜	小胞体ストレスによって誘導される神経細胞死メカニズムについての解析	2002/12/12
山岸覚 大阪大学	第24回日本分子生物学会大会 横浜	家族性筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子SOD1変異体の解析	2002/12/12
片山泰一 大阪大学	第2回CRESTシンポジウム 東京	孤発性アルツハイマー病に見られるプレセニリン2異常スプライシング変種の産生機構解明とAD治療の可能性	2002/4/26
片山泰一 大阪大学	第5回癌治療増感シンポジウム 奈良	小胞体ストレスとアポトーシス	2003/2/8
片山泰一 大阪大学	International Symposium "Molecular Neurobiology of Alzheimer Disease and Related Disorders" Osaka	The RNA-binding protein causes aberrant splicing of Presenilin-2 pre-mRNA in sporadic Alzheimer's disease	2002/11/2

ストレス蛋白グループ

小川智 金沢大学	第3回北陸実験動物研究会	小胞体機能の制御による神経細胞死抑制	2002/6/12
小川智 金沢大学	第25回日本神経科学大会 東京	発生段階の小脳プルキンエ細胞における小胞体ストレスによる神経細胞死	2002/9/12
堀 修 金沢大学	第75回日本生化学会 京都	小胞体内の新規ユビキチン様蛋白SUPの機能解析	2002/10/18
小川智 金沢大学	Redox京都2002	ORP150 suppresses ischemia-mediated neuronal cell death.	2002/11/7
小川智 金沢大学	2002年度米国細胞生物学会	Overexpression of ORP150 suppresses Purkinje cell death in cerebellar development.	2002/12/18
堀 修 金沢大学	2002年度米国細胞生物学会	Functional analysis of SUP, a novel ubiquitin-like protein in the ER.	2002/12/18

再生・機能修復グループ

水野龍義、 大阪大学	第 25 回日本神経科学大会	ニューロトロフィンによる priming のメカニズムの解析	2002/7/7
青木美和 大阪大学	第 25 回日本神経科学大会	Eph/ephrin の神経分化への関与.	2002/7/7
吉矢和久、 大阪大学	第 25 回日本神経科学大会	ラット頭部外傷後の側脳室周囲における遺伝子発現	2002/7/7
久保盾貴、大阪 大学	第 45 回日本神経化学学会大会	新規軸策誘導因子の同定とその機能解析	2002/7/19
田中啓之、 大阪大学	第 45 回日本神経化学学会大会	幼若ニューロンの再生阻害因子に対する耐性機構	2002/7/19
樋口晴久、大阪 大学	第 45 回日本神経化学学会大会	ニューロトロフィン受容体 p75 を介したシグナル伝達.	2002/7/19
田中啓之、 大阪大学	第 108 回日本解剖学会総会	ラット脊髄損傷モデルにおける p21 投与による軸索再生及び機能回復.	2003/4/1

青木美和、 大阪大学	第 108 回日本解剖学会総会	Ras/MAPK カスケードを介した Eph/ephrin の 神経分化への関与.	2003/4/3
久保盾貴、 大阪大学	第 108 回日本解剖学会総会	新規 Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor は Rac のシグナルを介し神経軸索の伸展を制御する.	2003/4/3
山下俊英 大阪大学	キーストンシンポジウム	The molecular mechanisms of regulation of Rho activity by the p75 receptor	2003/2/15
田中啓之 大阪大学	Society for Neuroscience 32nd Annual Meeting (Orland Florida, USA)	Cytoplasmic p21Cip1/WAF1 regulates neurite remodeling by inhibiting Rho-kinase activity	2003/11/4
樋口晴久 大阪大学	Society for Neuroscience 32nd Annual Meeting (Orland Florida, USA)	cAMP 依存性プロテインキナーゼは神経栄養因子受 容体 p75 をリン酸化し、その細胞膜局在を調節して 下流のシグナルを伝える	2003/11/4

(3) 特許出願 (国内 4件、海外 2件)

平成 11 年出願

新規 ER 蛋白質 SERP1

発明者：堀修、山口淳、小川智、遠山正彌

出願日：平成 11 年 (2000-特願 245474)

出願人：科学技術振興事業団

平成 13 年出願

プレセニン-2 遺伝子エクソン 5 欠損型スプライシング異常の生成に関与する核酸

発明者：遠山正彌、片山泰一、真部孝幸他

出願日：平成 13 年 6 月 27 日 (KJ-13-002,2001-特願 195472)

出願人：科学技術振興事業団、大正製薬

医薬組成物

発明者：遠山正彌、片山泰一、真部孝幸他

出願日：平成 13 年 6 月 27 日 (M-13-003,2001-特願 195417)

出願人：科学技術振興事業団、大正製薬

平成 14 年出願

ニューロトロフィン受容体をリン酸化する新規 Protein Kinase A のスプライスバリエント

発明者：遠山正彌、山下俊英、樋口晴久

出願日：平成 14 年 3 月 29 日 (K-14-001,2002-特願 97058)

出願人：科学技術振興事業団、遠山正彌

ストレス関連小胞体タンパク質 SERP1 遺伝子欠損モデル非ヒト動物

発明者：遠山正彌、堀修、小川智、宮崎真普

出願日：平成 14 年 10 月 17 日 (K-14-0016,2002-特願 302568)

出願人：科学技術振興事業団、大日本製薬株式会社

7. 結び

本研究により我々は脳虚血やアルツハイマー病における神経細胞死が小胞体機能の異常を起源とすることを明らかとした。この視点はミトコンドリアのみが細胞死の起点とする観点を大きく変え、ると共に現在盛んに行われている「小胞体ストレス」研究の国際的先鞭を切り開き得た。また神経機能再建の鍵とされながらも「中枢神経軸索は再生しない」と言う壁にはばまれてた中枢神経軸索再生を「再生しない機序の解明」「再生しない機序の解除因子」の解明を通じて世界で初めて可能とした。これらの成果はいずれも極めて高い国際的評価を受け、本領域の国際的リーダーシップを取り得たと自負している。また本研究の期間中に小川が金沢大学、山下が千葉大学の教授として招聘されるなど若手研究者の育成にも十分な貢献を果たし得た。今後は本研究の成果を基盤として創薬へと大きく歩を進めたい。本プロジェクトにより研究内容、今後の展望、若手育成に多大な果実を得ることができ感謝の念に耐えない。

