

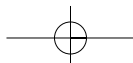
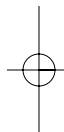
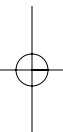
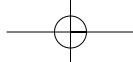
文部科学省科学研究費補助金 平成 23 - 27 年度  
**「新学術領域研究」研究成果報告書**

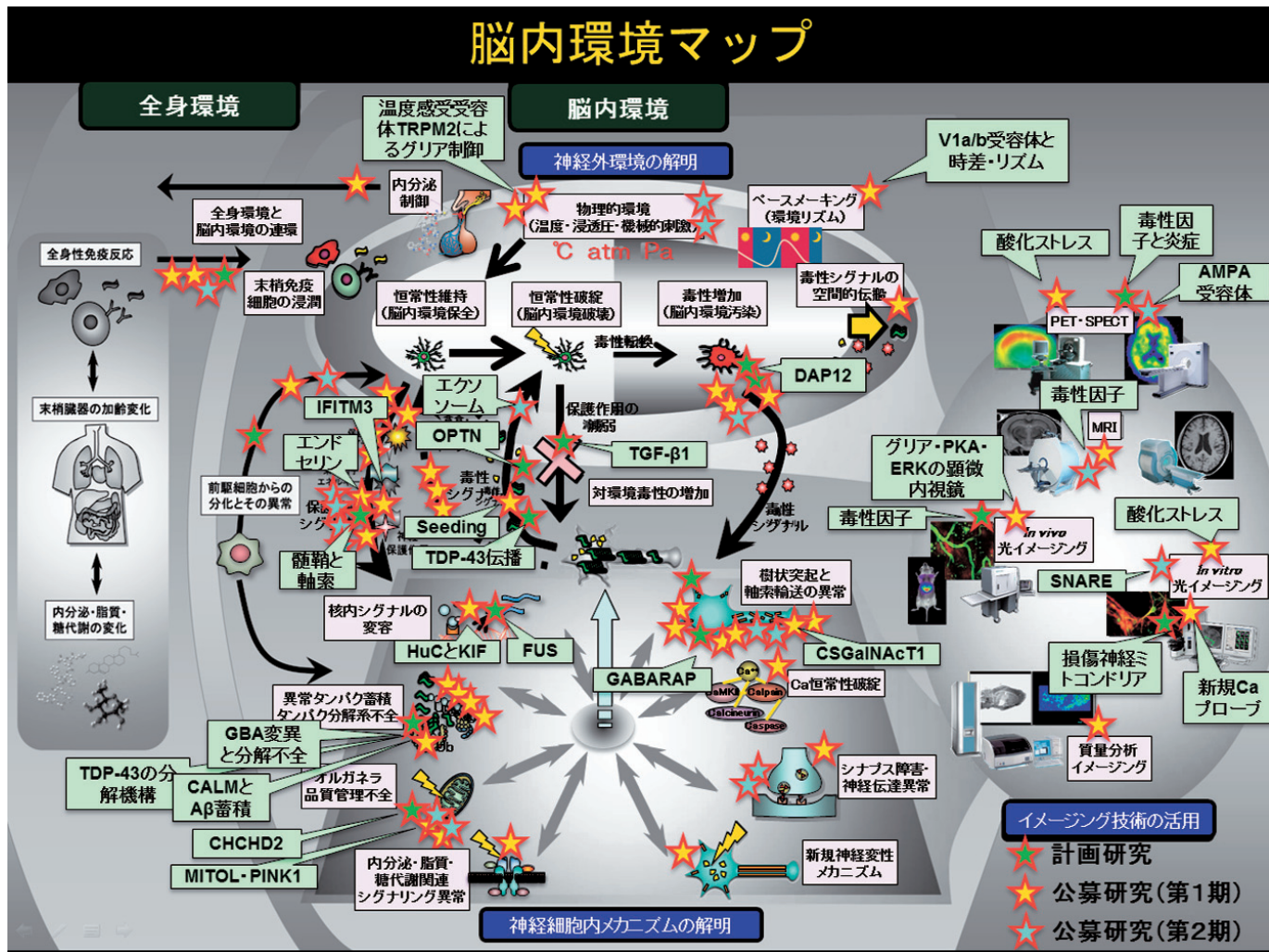
領域略称名：脳内環境（領域番号：3302）

## **脳内環境：恒常性維持機構とその破綻**

領域代表者 高橋 良輔  
京都大学・大学院医学研究科・教授

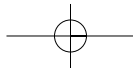
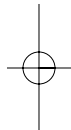
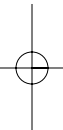
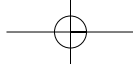
平成 29 年 3 月





「脳内環境マップ」

新学術領域研究「脳内環境」における、各班員の連携研究ならびに班員同士の共同研究により、「脳内環境」の恒常性維持と破綻のメカニズムが明らかにされてきた。こうしたメカニズムが、「脳内環境」を構成する様々な種類の細胞にどのような影響を及ぼしているのかを俯瞰的に示したものが「脳内環境マップ」である。「脳内環境マップ」では、各々の計画班（緑色星印）と第1期公募班（黄色星印）、第2期公募班（水色矢印）の取り組みをマップ上に配置し、領域研究で明らかになったメカニズム、鍵分子や成果を吹き出し（緑）で表示している。



文部科学省科学研究費補助金  
平成23-27年度

「新学術領域研究（研究領域提案型）」  
研究成果報告書

# 脳内環境：恒常性 維持機構とその破綻

**目 次**

はじめに	3
研究領域の目的および概要	4
研究組織	5
研究費交付額	8
研究領域の設定目標とその達成度	8
研究組織（公募研究を含む。）と各研究項目の連携状況	12
研究成果の公表	13
領域推進のための企画	17
本研究領域の評価の状況	17
プロモーション（昇進）の状況	20
当該学問分野及び関連学問分野への貢献度	21
研究代表者による研究成果報告書	23
班会議・領域シンポジウム	149
論文業績一覧	171

## 1

## はじめに

新学術領域研究「脳内環境」は平成23年—27年の5年間にわたって、「脳は神経細胞と周囲の多彩な非神経細胞からなる多細胞コミュニティである」との観点から、脳内環境の恒常性維持機構とその破綻としての疾患発症のメカニズムの理解の深化をめざして研究を推進した。3つのサブ領域に分かれ、基礎、臨床の研究者が一体となり、「A01 細胞内メカニズム」では脳内環境破綻をきたす細胞内メカニズム解明、「A02 神経外環境」では脳内環境破綻と毒性転換の伝搬メカニズム理解、「A03 イメージング」ではイメージング技術の活用による脳内環境の可視化を目指して、数多くの共同研究を行いながら、研究を推進した。この研究に関わった計画班員は分担者を含め11名、公募班員は前期48名、後期22名にものぼる。また、領域アドバイザーの故金澤一郎先生、田中啓二先生、岡野栄之先生、Jean-Pierre Julien先生、Gena Raivich先生には温かい激励と適確なご指導を頂いた。この5年間の研究で、「脳内環境学」というべき新たな学問領域が創成され、我々の脳内環境の理解とそれに基づく疾患の解明は著しく進んだものと自負している。本領域の事後評価は「研究領域の設定目的に照らして、期待通りの成果があった」（評価結果A）であった。評価結果所見では「今後、本研究領域での成果をもとに、「脳内環境」という研究領域の更なる確立、発展を図るとともに、神経疾患における基礎研究として、世界をリードしていくことが期待される」とのコメントを頂戴した。これはその成果報告書である。同時にこれらの成果をもとに班員が執筆する「脳内環境辞典」（メディカル・ドゥ）を上梓する予定である。これらの成果がまた新たな脳機能と脳疾患の理解を進める新たな飛躍につながることを期待している。最後に本報告書に加えて「脳内環境辞典」のとりまとめの労をとってくださった名古屋大学環境医学研究所長・山中宏二教授、ならびに事務・連絡担当者としてご尽力いただいた丸山純子氏に心より御礼申し上げます。

「脳内環境」領域代表  
京都大学医学研究科教授

高橋良輔

## 2

## 研究領域の目的および概要

## 【本領域の目的】

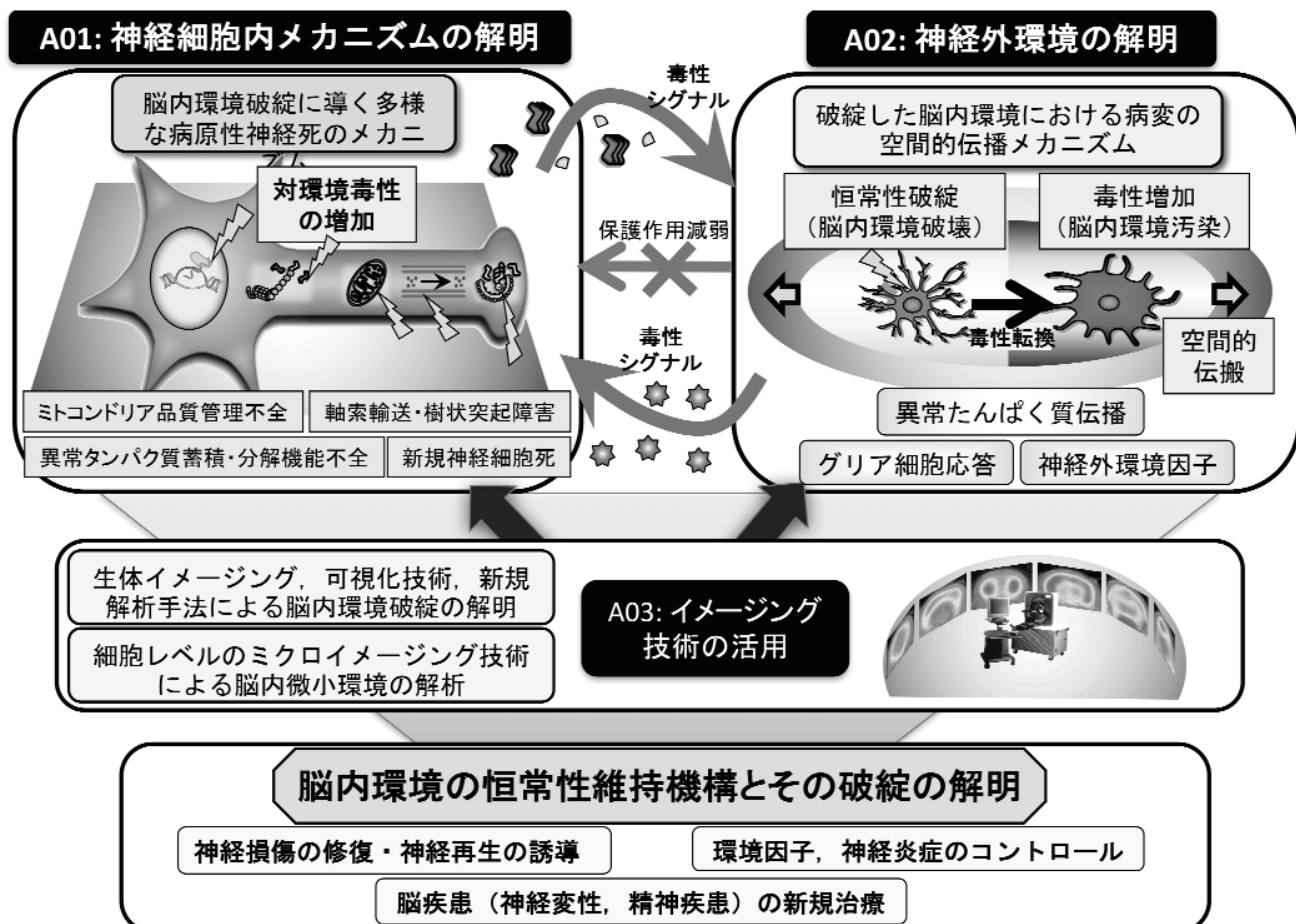
脳は多彩な細胞群からなる臓器であり、神経細胞は、その周囲にあるグリア細胞などからの機能性分子の授受などにより支えられて正常に機能している。したがって神経細胞、ひいては脳健康は、このような神経細胞をとりまく「脳内環境」が健全であることにより維持されていると言える。これまでの脳神経科学の研究の主役は神経細胞でした。アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患では、「なぜ神経細胞が死ぬのか」という問題に研究の焦点があてられ、その過程で異常タンパク質の蓄積、オルガネラの機能障害などの神経変性メカニズムが明らかになってきた。

ところが脳疾患では、グリア細胞の応答異常により病態が悪化することが判明した。また、異常タンパク質が神経細胞から周囲の環境に放出されることによって、病巣が他の神経細胞や脳部位に広がっていくことも明らかになった。これら細胞外環境の攪乱が病態に関与するという予想外の新知見から、脳病態の理解には神経細胞内外を包括した「脳内環境」がどのように維持されているかを明らかにすることが極めて重要であると考えられる。

このような背景から、本領域では従来の脳疾患研究が注目してこなかった「脳内環境」の解明に焦点をあて、多彩な神経疾患・損傷モデルや分子イメージング手法を駆使する様々な分野の脳疾患研究者と、グリア神経生物学、神経発生・再生医学、神経内分泌学等の基礎神経科学者を交えた融合研究領域を創出し、これまでに「脳内環境」の恒常性維持メカニズムを明らかにしてきた。同時に、脳内環境破綻の視点から精神・神経疾患を中心とした脳病態解明を推進してきた。

## 【本領域の内容】

本領域では、脳内環境の破綻をきたす神経細胞内メカニズムの解明を目指すA01「神経細胞内メカニズム」、脳内環境維持・破綻と環境破壊の伝播メカニズムの解明を目指すA02「神経外環境」、新たなイメージング技術による脳内環境維持・破綻の可視化による解明を目指すA03「イメージング」の3つの研究グループにより構成される。これらの研究グループを構成する様々な分野の研究者による有機的連携を通じて、上述の領域目標の達成を目指してきた。





## 3

## 研究組織

## 平成23年度～平成27年度

## 総括班

- X00 脳内環境：恒常性維持機構とその破綻  
高橋 良輔（京都大学・大学院医学研究科・教授）

## 計画研究 計8件

- A01 タンパク分解系障害による脳内環境変調と神経変性メカニズム  
高橋 良輔（京都大学・大学院医学研究科・教授）
- A01 脳内環境における封入体形成のメカニズム：封入体と神経細胞死の関連性について  
服部 信孝（順天堂大学・医学部・教授）
- A01 神経軸索におけるタンパク分解機構とその破綻  
内山 安男（順天堂大学・医学部・特任教授）
- A01 神経細胞におけるRNA障害と脳内環境の関連研究  
内匠 透（理化学研究所・脳科学総合研究センター・シニアチームリーダー）
- A02 脊髄環境の恒常性維持とその破綻：グリアー神経連関からみた神経変性機序の解明  
山中 宏二（名古屋大学・環境医学研究所・教授）
- A02 脳内環境の破綻を制御する新たなグリアー・神経間応答機構の探索とその機能解析  
木山 博資（名古屋大学・大学院医学系研究科・教授）
- A02 オプチニューリン遺伝子異常による脳内環境の変化と神経変性の関わりの解明  
川上 秀史（広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授）
- A03 毒性伝達機構の分子イメージングを基軸とした神経変性疾患研究  
樋口 真人（量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所・チームリーダー）

## 公募研究計70件

## 平成24年度～25年度

- A01 後シナプスでのタンパク質代謝とミクログリアによる監視機構  
鶴田 文憲（筑波大学 生命環境系 助教）
- A01 脳内環境を維持するためのオートファジーの役割  
田中 敦（山形大学医学部 メディカルサイエンス推進研究所・助教）
- A01 リン酸化プロテオミクスに基づくリン酸化神経病態学の確立  
五十嵐道弘（新潟大学・大学院医歯学総合研究科・教授）
- A01 グリア細胞内のカルシウム調節破綻を介した神経変性過程の解明  
木下 彩栄（京都大学・大学院医学研究科・教授）
- A01 樹状突起の異常交差に起因する“てんかん様症状”の発症機構の追究  
碓井 理夫（京都大学・大学院生命科学研究所・助教）
- A01 時差症候群の分子機構の解明とその治療に関する研究  
岡村 均（京都大学・大学院薬学研究所・教授）
- A01 ミクログリアの活性酸素産生と亜鉛シグナル調節因子としてのプロトンチャンネル  
岡村 康司（大阪大学・大学院医学系研究科・教授）
- A01 脳内環境の恒常性の維持機構におけるネクチンとアフアディンの機能  
萬代 研二（神戸大学・大学院医学研究科・特命准教授）
- A01 神経疾患における細胞内輸送の障害：細胞質ダイニンの制御と破綻  
広常 真治（大阪市立大学・大学院医学研究科・教授）
- A01 遅発性小脳失調モデル動物を用いた軸索変性機序の解明  
岡野 ジェイムズ洋尚（東京慈恵会医科大学・医学部・教授）
- A01 ミトコンドリア機能と破綻による神経疾患  
柳 茂（東京薬科大学・生命科学部・教授）
- A01 海馬歯状回の恒常性維持機能の理解とその神経細胞内メカニズムの解明  
宮川 剛（藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・教授）
- A01 転写因子NF- $\kappa$ Bを介した新たな神経維持・変性機構の解明  
山中 智行（同志社大学・脳科学研究科・特任准教授）
- A01 ストレス条件下における選択的オートファジーの制御機構

- 松本 弦 (長崎大院・医歯薬学総合研究科・講師)
- A01 新規レビー小体型認知症モデルマウスを用いたワクチン療法の開発  
橋本 款 (東京都医学総合研究所・パーキンソン病研究室・副参事研究員)
- A01 神経変性における細胞内 TDP-43 凝集体の意義の解明  
野中 隆 (東京都医学総合研究所・認知症プロジェクト・副参事研究員)
- A01 パーキンソン病発症を予防するミトコンドリアストレス応答機構の解析  
松田 憲之 (東京都医学総合研究所・ユビキチンプロジェクト・プロジェクトリーダー)
- A01 軸索変性の分子細胞生物学的解析とその治療応用に関する研究  
若月 修二 (国立精神・神経医療研究センター神経研究所・疾病研究第五部・室長)
- A01 シナプス活動を介した神経原線維変化形成機構  
高島 明彦 (学習院大学理学部・生命科学科・教授)
- A02 シナプス可塑性の恒常的維持機構の解明と神経機能再建への応用  
宮井 和政 (大阪府立大学・大学院総合リハビリテーション学研究所・教授)
- A02 胎児期における脳内環境の破綻と育児放棄の発症機序の解明  
下川 哲昭 (高崎健康福祉大学・健康栄養学部・教授)
- A02 てんかん発症に伴う脳内温度環境変化と病態悪化のクロスリンク  
柴崎 貢志 (群馬大学・大学院医学系研究科・准教授)
- A02 神経-ミクログリア接触シグナルによる脳内環境制御メカニズムの解明  
大西 浩史 (群馬大学・大学院保健学研究科・教授)
- A02 小脳バーグマングリア微小突起によるシナプス修飾の維持・破綻に関する研究  
大倉 正道 (埼玉大学・大学院理工学研究科・准教授)
- A02 神経炎症反応によって制御される脳内アミロイド代謝システムの分子機構  
富田 泰輔 (東京大学・大学院薬学系研究科・教授)
- A02 アストログリア細胞のエンドサイトーシスの障害による神経発達障害  
山田 清文 (名古屋大学・医学部附属病院・教授)
- A02 脳内環境におけるガングリオシド糖鎖の分別的役割の解明  
大海 雄介 (中部大学・生命健康科学部・助手)
- A02 ミクログリアの毒性転換の制御による神経変性疾患の新規治療法開発  
竹内 英之 (横浜市立大学・医学部・准教授)
- A02 末梢神経損傷により中枢移行する免疫系細胞とグリア細胞連関による中枢神経機能変化  
中川 貴之 (京都大学医学部附属病院・准教授)
- A02 グリア細胞の貪食作用による脳内環境の維持機構とその破綻  
華山 力成 (金沢大学・医学系・教授)
- A02 変性疾患における神経細胞、ミクログリアの相互作用、インフラマゾームを中心に  
望月 秀樹 (大阪大学・大学院医学系研究科・教授)
- A02 アストロサイトの部位特異的プロファイルがもたらす脳内環境と神経保護  
浅沼 幹人 (岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授)
- A02 海馬神経細胞の生存維持と神経新生におけるドラキシンの機能解析  
田中 英明 (熊本大学・大学院生命科学部・教授)
- A02 脳老化と神経変性疾患発症の分子機構の解明  
田口 明子 (国立長寿医療研究センター・部長)
- A02 内在性Nogo受容体アンタゴニストLOTUSによる脳内環境制御  
竹居光太郎 (横浜市立大学・大学院生命医科学研究科・教授)
- A02 シーディングによる脳内環境の破綻伝播メカニズムの解明  
古川 良明 (慶應義塾大学・理工学部・准教授)
- A02 シナプス伝達維持におけるアストロサイト・ニューロン間エネルギー共生機構の解明  
加藤 総夫 (東京慈恵会医科大学・医学部・教授)
- A02 脳内環境破綻時のアストロサイトNaxチャンネルの役割  
檜山 武史 (基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部門・助教)
- A02 グリア細胞操作を起点とする神経活動変化と伝播様式解析  
田中 謙二 (慶應義塾大学・医学部・准教授)
- A02 海馬グリア細胞の環境応答機構の解明  
桑原 知子 (国立研究開発法人産業技術総合研究所 (AIST) 創薬基盤研究部門 主任研究員 (兼) 国立研究開発法人 筑波大学 グローバル教育院 (協同大学院) 准教授)
- A02 脳内温度・浸透圧の感知メカニズムとその破綻  
富永 真琴 (岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授)
- A03 シヌクレイノパチーの分子イメージング  
武田 篤 (国立病院機構仙台西多賀病院・院長)
- A03 脳内環境変化による興奮性シナプス制御の分子イメージング解析  
林 崇 (国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・室長)

- A03 パーキンソン病および関連神経変性疾患のPET 酸化ストレスイメージング  
米田 誠（福井県立大学・看護福祉学部・教授）
- A03 フッ素MR画像法と光画像法によるアミロイドオリゴマーのin vivo病態解析  
遠山 育夫（滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・教授）
- A03 内因性チャンネルを用いた脳内レドックス環境イメージングと老化・病態脳研究への応用  
柿澤 昌（京都大学・薬学研究科・准教授）
- A03 質量分析イメージングによる脳内環境の可視化  
矢尾 育子（浜松医科大学・光先端医学教育研究センターフォトンクス医学研究部光イメージング研究室・准教授）
- A03 脳内環境のミクロ解析を可能にする顕微内視鏡システムの開発  
船曳 和雄（先端医療センター研究所 上席研究員）

#### 平成26年度～27年度

- A01 ミスフォールドタンパク質の核外排出分子機構の解析  
村田 茂穂（東京大学・薬学系研究科・教授）
- A01 時差時における脳内時間環境の恒常性を担う神経分子メカニズムの解明  
山口 賀章（京都大学・薬学研究科・助教）
- A01 プロトンチャンネルノックアウトマウスを用いた摂食中枢機構の維持とその破綻の理解  
岡村 康司（大阪大学大学院医学系研究科・教授）
- A01 脳内環境を制御する神経幹細胞の恒常性変化  
菅田 浩司（慶應義塾大学・医学部・専任講師）
- A01 遅発性小脳失調モデル動物を用いた軸索変性機序の解明  
岡野 ジェイムズ洋尚（東京慈恵会医科大学・医学部・教授）
- A01 ミトコンドリア機能異常と神経疾患  
柳 茂（東京薬科大学・生命科学部・教授）
- A01 PINK1の作動機構解明からミトコンドリアホメオスタシスと神経変性の核心に迫る  
松田 憲之（東京都医学総合研究所・ユビキチンプロジェクト・プロジェクトリーダー）
- A01 細胞内異常タンパク質凝集体形成のメカニズムの解明  
野中 隆（東京都医学総合研究所・認知症プロジェクト・副参事研究員）
- A01 軸索変性の分子細胞生物学的解析とその治療応用に 関する研究  
若月 修二（国立精神・神経医療研究センター神経研究所・疾病研究第五部・室長）
- A02 間葉系幹細胞による脳内環境の維持および破綻からの回復メカニズムの解明  
平井 宏和（群馬大学・医学系研究科・教授）
- A02 てんかんの病態悪化に関与するアストロサイト亜種の性質  
柴崎 貢志（群馬大学・大学院医学系研究科・准教授）
- A02 白質ミクログリアを制御する細胞間接触シグナルの解析  
大西 浩史（群馬大学・大学院保健学研究科・教授）
- A02 炎症反応に呼応する神経外環境因子によるアミロイドβタンパク代謝制御機構の解明  
富田 泰輔（東京大学・大学院薬学系研究科・教授）
- A02 脳神経系の形成と発達を制御する脳内環境の解明  
河崎 洋志（金沢大学・脳・肝インターフェイスメディスン研究センター・教授）
- A02 中枢神経傷害後の脳内環境変化による髄鞘修復の促進  
村松里衣子（大阪大学大学院・医学系研究科・准教授）
- A02 パーキンソン病における神経系エクソソームの役割  
華山 力成（金沢大学・医学系・教授）
- A02 内在性Nogo受容体アンタゴニストLOTUSによる多発性硬化症治療法の開発  
竹居光太郎（横浜市立大学・大学院生命医科学研究科・教授）
- A02 脳内環境破綻時のNaxチャンネルの生理機能の解明  
檜山 武史（基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部門・助教）
- A02 脳内温度・浸透圧の感知メカニズムとその破綻  
富永 真琴（岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授）
- A03 脳内環境がスパイン形態可塑性に与える影響の解析  
野口 潤（国立精神・神経医療研究センター神経研究所・微細構造研究部・室長）
- A03 ケミカルシフトの違いを利用したフッ素MR画像による複数の脳内異常蛋白の同時解析  
遠山 育夫（滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・教授）
- A03 新規イメージング技術による疾患モデルマウスの解析  
高橋 琢哉（横浜市立大学医学部生理学・教授）

## 4

## 研究費交付額

計画 公募	平成23年度		平成24年度		平成25年度		平成26年度		平成27年度		平成28年度	
	直接経費 (千円)	間接経費 (千円)	直接経費 (千円)	間接経費 (千円)	直接経費 (千円)	間接経費 (千円)	直接経費 (千円)	間接経費 (千円)	直接経費 (千円)	間接経費 (千円)	直接経費 (千円)	間接経費 (千円)
総括班	7,600	2,280	5,200	1,560	6,000	1,800	4,900	1,470	7,100	2,130	3,000	900
計画研究合計	214,900	64,470	153,400	46,020	154,800	46,440	146,800	44,040	144,700	43,410	0	0
公募研究合計	0	0	224,400	67,320	220,500	66,150	85,000	25,500	85,000	25,500	0	0
総計	222,500	66,750	383,000	114,900	381,300	114,390	236,700	71,010	236,800	71,040	3,000	900

※交付内定額を記載しておりますので、交付申請時及び交付決定後の変更は反映されておりません。

## 5

## 研究領域の設定目標とその達成度

本研究領域が設定した研究対象は、1) 既存の学問分野の枠に収まらない新興・融合領域の創成、2) 異なる学問分野の研究者が連携して行う共同研究等の推進により当該研究領域の発展、3) 多様な研究者による新たな視点や手法による共同研究等の推進により当該研究領域の新たな展開、を目指すものである。その目標達成のため、従来型の脳疾患研究を転換・発展させ、健康ないしは病的な脳内環境の解明という新たな視点で、脳疾患研究者と脳科学、神経科学、生命科学の基礎研究者との融合研究を可能にする新学術領域を構築、推進してきた。領域研究では、①脳内環境の破綻を引き起こす神経細胞内メカニズムの解明、②脳内環境の破綻と毒性転換・病態伝播メカニズムの解明、③イメージング技術の活用による脳内環境の解析に焦点を当てて、3つの研究項目(A01、O2、O3)を設定し、主に遺伝子改変マウスを用いたインビボ解析を進めてきた。

領域全体としては以下の項目に焦点をあて、計画班員と公募班員の協力のもと目覚ましい成果が得られた。①新たな神経細胞内環境を形成する神経細胞やグリア細胞内の新規遺伝子やシグナルパスウェイの同定、②神経細胞内環境でのオルガネラダイナミクスとその分子機序、③得られた神経内環境因子の変調を再現するパーキンソン病や筋萎縮性側索硬化症の新たなモデル動物の開発、④神経細胞と周辺細胞を繋ぐ新たな神経細胞外環境因子(メディアーター)の同定と、その破綻による神経細胞外環境崩壊のメカニズムの解明、⑤神経細胞外環境の悪化(汚染)の伝播のメカニズム、⑥アルツハイマー病のMRIやPET画像診断を可能にした新規プローブの開発、グルタミン酸受容体のヒトPETプローブ開発。これらの研究によって、今まで漠然として考えられていた脳内環境という概念が、神経細胞内と神経細胞外の分子実体を伴って多角的に理解できるようになり、その破綻が多くの神経疾患の原因となることも明らかとなった。本領域研究の成果は「脳内環境学」という新たな研究領域の創成に大きく貢献したと考えられる。また、領域内の共同研究は49課題に及び、その成果は国際一流誌に多くの論文に発表された。また研究代表者82名のうち12名がプロモーションを受け8名が教授に就任した。領域全体若手研究者のうち79名のプロモーション(うち9名が教授)が得られ、若手研究者の育成という目標も十分達成された。以下に、研究対象の達成度を示す具体的な研究成果を紹介する。

## 【計画班員】

**神経内環境グループ(A01)**：本グループでは、脳内環境の破綻を引き起こす神経細胞内メカニズムを以下に示す4つの機序を中心に解明した。さらに、新たな病態モデル動物を開発し、神経変性疾患の新たな原因遺伝子を同定することで領域目標の達成に貢献した。

①**神経細胞内への蛋白質の異常蓄積が恒常性破綻と神経疾患に至るメカニズム**：高橋は既知の疾患原因遺伝子変異をメダカに導入することにより、パーキンソン病の病態に示唆を与える脊椎動物モデルの開発に世界で初めて成功し、GBA機能不全によるパーキンソン病病態にオートファジーが関与することを示した(PLoS Genet, 2015)。さらに、脊髄運動ニューロン特異的なRtg3ノックアウトマウスの作製・解析を通じてALSの運動ニューロン変性に26Sプロテアソーム機能障害が一義的に重要であることを証明し、新たな孤発性ALS動物モデルを提唱するに至った(J Biol Chem, 2012)。漆谷はさらにジスルフィド架橋剤を利用したReCLIP法を用いて病原TDP43に対する新規のE3リガーゼの候補とその機能不全とオリゴドンドロサイトの封入体形成の関連を明らかにした(Sci Rep, 2016)。またTDP-43のRNA結合ドメインの構造解析により、病原構造を誘発する鍵配列と、病原構造で分子外に露出するエピトープを同定し、病原型TDP43特異的モノクローナル抗体の開発に成功した(J Biol Chem, 2013)。

②**神経細胞内環境破綻におけるミトコンドリアの役割**：服部は、常染色体優性遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子としてCHCHD2を同定した。CHCHD2の遺伝子産物はN末にミトコンドリア移行シグナルを有しミトコンドリアに局在することから、パーキ

ンソン病の病態としてミトコンドリアの関与が強く示唆された (Lancet Neurol, 2015)。PINK1/parkin 介在性 mitophagy における膜電位低下ミトコンドリアへの parkin 局在分子機構について解析した結果、1) parkin は膜電位の低下した損傷ミトコンドリアをオートファジーの発動によって分解し、細胞内の環境維持に貢献していること、2) マイトファジーが誘導されるための分子機構、すなわち parkin が損傷ミトコンドリアを認識する際に膜電位依存的に PINK1 が parkin の Ubl ドメイン (Ser65) をリン酸化することがミトコンドリア分解の契機になることを明らかにした (Sci Rep 2012)。

- ③**神経変性における RNA 代謝異常の関与機構：山中(宏)**は、ALS の病因タンパク質 TDP-43 が核内のスプライソソーム因子の成熟の場である Gem に集積し、小児運動ニューロン病の脊髄性筋萎縮症 (SMA) の遺伝子産物 SMN や、遺伝性 ALS の病因遺伝子産物 FUS/TLS と結合することを発見し、ALS と SMA に共通する運動神経変性メカニズムとしてのスプライシング異常の存在を見いだした (EMBO Mol Med, 2013)。**内匠**は新規の時計遺伝子 Chrono を同定した。Chrono が概日リズムの分子機構としてのいわゆる転写翻訳のフィードバックループの抑制エレメントに働き、ストレス刺激等に直接反応して脳内視床下部での遺伝子発現も増加することを明らかにした (PLoS Biol, 2014)。iCLIP 法により、ALS 原因遺伝子 FUS/TLS および TDP-43 が新生 RNA に結合すること、FUS がクラスターを作らずに RNA の長い領域にわたって結合することを明らかにした。また、野生型と FUS<sup>-/-</sup>マウスの胎生 18 日脳でスプライシングのパターンが異なる神経発生や神経変性に関連する遺伝子を見いだした (Sci Rep 2012)。
- ④**オートファゴゾーム・リソソームの神経細胞内輸送と局在：内山**は中枢には殆ど局在しないとされていたカテプシン C の大脳辺縁系、特に海馬 CA2 領域の錐体細胞における特異的な局在を明らかにした (Eur J Neurosci 2013)。リソソームに存在する DNase II に対する抗体を作り、同酵素がマクロファージ・ミクログリアに局在すること、DNase II は粗面小胞体で 45 kDa の前駆体として合成され、ゴルジ体を介してリソソームに輸送され、そこで 30 kDa の長鎖と 23 kDa の重鎖へと切断、活性化されることを明らかにした (PLoS ONE 2013)。さらに、Atg8 のほ乳類ホモログの一つとして知られる GABARAP の Tg マウスを作製・解析し、GABARAP が LC3 の局在 (細胞体と樹状突起) と異なり、神経細胞の軸索初節に強く局在することを示した (PLoS ONE 2013)。Atg9A をマウス中枢神経系で欠損すると、神経突起の伸長不全、脳梁や前交連の形成不全を呈して 4 週までに死亡した。Atg7 欠損脳と異なり、Atg9A 欠損脳では、神経細胞体に比べ、軸索/終末部の異常が著明であった。神経突起の伸長不全は Atg7 をノックダウンしても見られ、オートファジーとは独立した作用であると考えられた。(Autophagy, in press)。

**神経外環境グループ (A02)：**本グループでは、グリア細胞などの非神経細胞やそれらが放出するメディエーターによる神経細胞周囲環境の恒常性維持機構とその破綻時において周囲環境が毒性転換に至るメカニズムを解明してきた。以下のように、多くのメディエーター・鍵分子を同定し、機能を明らかにした。

- ①**神経-ミクログリア・アストロサイト・炎症の連関：山中(宏)**は、運動神経細胞の周囲環境としてのグリア細胞の異常が ALS を進行させるメカニズムとして、活性化したアストロサイトが放出する TGF- $\beta$  1 が病巣のミクログリアや Tリンパ球による神経保護性の環境を阻害して ALS マウスの病態を増悪することを初めて証明した。TGF- $\beta$  1 の増加は ALS 患者でも認められ、TGF- $\beta$  1 シグナルの抑制による新たな治療法開発の可能性を示した (Cell Rep 2015)。**三澤**は、強力な免疫・炎症修飾物質として知られるオステオポンチン (OPN) が、ALS で変性抵抗性の運動神経に特異的に発現し、運動神経変性に伴って周囲に放出されて神経炎症を修飾することを見出すとともに、ALS 病態後期で起こる脆弱性獲得転換 (第二波の運動神経変性) に重要な因子となること証明した。さらに、この時に関与する OPN 受容体を同定することで、第二波の運動神経変性を遅延させる新たな創薬ターゲットの可能性を示した (Sci Rep 2016)。**川上**は自らが同定した ALS 原因遺伝子 Optineurin (OPTN) の変異が IRF3 の抑制効果を喪失することを示し、OPTN 変異により神経炎症が増悪する機序の一端を明らかにした (Neurosci Lett 2012)。**木山**は、神経損傷にตอบสนองしてミクログリアで発現する遺伝子 DAP12 を同定した。DAP12 欠失により損傷神経細胞の生存率が向上した。損傷運動神経にとって、ミクログリアの DAP12 シグナルは炎症を遷延し、細胞毒性を惹起する因子であることが明らかになった (Glia 2015)。
- ②**神経-シュワン細胞・オリゴデンドロサイト連関：木山**は、神経軸索障害時にシュワン細胞から分泌される PAP-III/Reg-III が、約 10nm 径の線維状の構造を形成し、軸索が伸展する上で足場として機能することを見いだした (J Biol Chem 2013)。さらに、オリゴデンドロサイトの髄鞘接着部位や神経軸索の電気活動が軸索内を移動するミトコンドリアの動態に影響することを示した (J Neurosci 2011)。**木山**は、自身が同定した神経損傷関連プロテアーゼである ECEL1/DINE が先天性多発性関節拘縮症 (Arthroglyposis:AMC) の遠位 5D 型の原因遺伝子であることをノックインマウスで実証し、DINE のプロテアーゼ活性がシュワン細胞の分化に影響を与え運動神経軸索の筋肉内分枝形成に必要であることを示した (Acta Neuropathol 2015, J Neurosci 2016)。

**イメージンググループ (A03)：**本グループでは、脳内環境の主要事象を細胞レベルから個体レベルでアセスメント可能なイメージング技術の開発と、イメージング標的分子の挙動や機能に関する生態・病態研究が発展した。蛍光イメージングは個々の細胞を可視化する有用な技術だが、生体脳でも二光子レーザー顕微鏡や、新規技法である蛍光顕微内視鏡が実現した。特に二光子レーザーは蛍光寿命計測に発展し、顕微内視鏡は覚醒マウスの行動時でのイメージングに応用された。全脳を可視化する技術としては、ケミカルシフトを利用し多分子を同時に画像化するフッ素 MRI や、微量プローブで高感度のイメージングを可能にする PET・SPECT を駆使した研究成果が得られた。特に新規 PET プローブはヒトに応用され、モデル動物とヒトの脳内環境を相互に比較可能となった。これらの技術を基軸として、以下に挙げるように、脳内環境汚染物質である毒性因子、神経外環境の主要因子であるグリアの炎症性変化、神経内あるいはグリア内のレドックス環境、さらには神経伝達系のシグナリング経路である開口放出・神経受容体・細胞内シグナリングをくまなく可視化し、脳内環境のダイナミックな変化をモニタリングする系の構築が実現した。

- ①**毒性因子蓄積のイメージング：樋口**は、脳老化と、認知症をはじめとする神経変性病態の原因物質と考えられているタンパク凝集体蓄積のイメージングとして、タウトランスジェニック (Tg) マウスひいてはヒト (高齢者、各種認知症患者) で、タウタンパク病変の PET にいち早く成功した。この際に新規開発されたプローブ PBB3 は、PET と蛍光イメージングの両方に利用可能なマルチモーダルプローブで、Tg マウスのインビボ二光子レーザー顕微鏡により、個々のタウ病変の可視化が実現した (Neuron 2013)。服部らとの共同研究で、タウ変異による家族性疾患患者のタウ PET を実施しえた (投稿中)。A  $\beta$  も主要な毒性因子で、これまで PET で可視化が行われていたが、計画班は普及性の高い SPECT によりアミロイド前駆体タンパク Tg マウスの A  $\beta$  蓄積を画像化しえた (J Nuc Med 2015)。また、A  $\beta$  病変の多様性を、PET・SPECT プローブの反応性に基づき明らかにした。

- ②**炎症性グリアのイメージング**：**樋口**は、ミトコンドリア外膜に局在するTSPOが、ミクログリアの炎症性変化と毒性転換を反映するバイオマーカーであることを、タウおよびアミロイド前駆体タンパクTgマウスのPETで明らかにした。これに続き、TSPOを高いコントラストで可視化する新規PETプローブを開発した。炎症変化に関わるトリプトファン・キヌレニン代謝やモノアシルグリセロールリパーゼを可視化するPETプローブも新たに開発した (J Neurosci 2011, Theranostics 2015, J Neuroinflammation 2016)。
- ③**神経伝達系のイメージング**：**樋口**は、代謝賦活型グルタミン酸受容体5型の新規PETプローブ[11C]E-ABP688を開発し、上記Tgマウスやヒトでイメージングに成功した (投稿中)。AMPA受容体の新規プローブによるマウス・サル・ヒトのPETも実現し、公募班・高橋との共同により、さらに高コントラストで可視化しうるプローブ開発も行った。自由行動に相当する最小拘束・覚醒下でのマウス脳ドーパミンD2受容体PET、ヒスタミンH3受容体の新規PETプローブ開発と、マウス・サル・ヒトでのイメージング、マンガン造影MRIによる $\alpha$ CaMKII欠損マウスの神経活性イメージングなど、PETを中心とする神経伝達・神経機能イメージングが発展した。さらに神経機能・回路を検証するための制御手段として、DREADDによるマウス・サルの脳機能制御と、DREADDのPETによる可視化を成し得た (J Neurosci 2016)。

## 【公募班員】

**神経内環境グループ (A01)**：**松田**は、PINK1はSer228とSer402の自己リン酸化を介して活性化して「ミトコンドリア異常シグナル」を伝達すること (Nat Commun 2012)、PINK1によってリン酸化されたユビキチンがParkin活性化因子であること (Nature 2014)、さらにPINK1によってリン酸化されたユビキチン鎖が異常ミトコンドリア上のParkin受容体であること (J Cell Biol 2015) を明らかにした。**柳**は、ミトコンドリアユビキチンリガーゼMITOLの基質としてミトコンドリア融合因子であるMitofusin2を同定した。MITOLはMitofusin2をユビキチン化することによりMitofusin2を活性化することを明らかにし、活性化したMitofusin2は小胞体とミトコンドリアの接着を促進することを示した (Mol Cell 2013)。**岡野**は、軸索変性により遅発性小脳失調を呈する遺伝子改変マウスの解析により、神経特異的RNA結合タンパク質HuCが翻訳調節により複数のモータータンパク質の発現量を統合的に調節し、軸索輸送を制御することによりニューロンの恒常性を維持することを明らかにした (Neuron 2012)。**岡村(均)**は概日時計の中核である視交叉上核 (SCN) のV1aとV1b受容体が時差時の再同調を担うことを示すために、浸透圧ポンプを用いてV1aとV1bのアンタゴニストを野生型マウスのSCNへと局所持続投与することで克服した (Science 2013)。**野中**は、ALSなどの患者脳に蓄積した不溶性TDP-43が、プリオン病における異常プリオンタンパク質と同様な性質を有することを見いだし、TDP-43凝集体が細胞から細胞へと伝播する可能性を示した (Cell Rep 2013)。**碓井**は同一の感覚ニューロンが、刺激の強さに応じて質的に異なる発火パターンを臨機応変に作り出すことを通して、個体の行動パターン選択を柔軟に調節していることを初めて示した (eLife 2016)。**山中(智之)**は、転写因子NF-Yをマウス大脳神経細胞で欠損すると、全く新しい小胞体病態を示すことを明らかにした (Nat Commun 2014)。**五十嵐**は、神経成長・再生の阻害因子であるコンドロイチン硫酸 (CS) 合成の律速酵素CSGalNAcT1のKOマウスが、脊髄損傷時に顕著な軸索再生を示すことを証明した (Nat Commun 2013)。**若月**は、活性酸素が細胞内で情報伝達因子として作用することによってZNR1を活性化すること、ZNR1の活性化は細胞死と軸索崩壊の両方を引き起こすことを、脳卒中・パーキンソン病・神経損傷のモデルマウスにおいて示した (JCB 2015)。**村田**は、プロテアソームにはユビキチン化タンパク質受容体が2つ存在するが、各欠損マウスの解析により、両者は主に縮重的に働いているが、各受容体にもみ捕捉されるタンパク質も存在することを明らかにした (Plos Genet 2015)。**宮川**は脳の海馬歯状回の新しい神経細胞が記憶の忘却を促進することを発見し、幼児期健忘の脳内メカニズムの解明に貢献した (Science 2014)。**岡村(康)**は、電気信号 (細胞膜電位) を利用して体内の各種細胞が水素イオンの流れを制御する電位センサー型水素イオンチャネルのかたちを原子レベルで解明し、必要な時だけうまく水素イオンを通す仕組みを明らかにした (Nat Struct Mol Biol 2013)

**神経外環境グループ (A02)**：特に神経細胞外環境を形成するグリアと神経細胞の連関に関する分子探索やその機能、またそれらの異常による非細胞自律性の神経細胞死に関連する代表的な成果の一部として：マクロファージによる神経外環境制御 (**富永** PNAS2012) (**中川** J Neurosci 2012)、ミクログリアによる神経外環境制御 (**中川** Glia 2015)、アストロサイトによる神経外環境制御 (**柴崎** J Biol Chem 2014) (**浅沼** Neurobiol Dis 2013, J Neurochem 2016) (**山田** Glia 2013) (**田中** Cell Reports 2014) (**加藤総夫** J Neurosci 2014)、脳弓下器官による神経外環境制御 (**檜山** Cell Metab 2013) が上げられる。これらは全て新たな神経外環境因子の同定とその機能解明として高く評価される。また、神経外環境破綻の空間的伝播のメカニズムの解明については、神経細胞由来のエクソソームによる神経毒性や情報の伝播 (**華山** Sci Rep 2015)、Seeding現象の解明 (**古川** JBC 2013, FEBS Lett 2013, BBRC 2015) などの成果が上げられる。一方、神経外環境の研究を推進する上で必要なツールとして、特定の分子を各種グリア特異的発現あるいは欠損を可能にするマウス (**田中** Cell Report 2012) や高感度Ca<sup>2+</sup>プローブの開発 (**大倉** Curr Biol 2013)、神経損傷特異的Creドライバーマウスの開発 (**木山** Sci Rep 2016) が実現し、いずれも班員間の共同研究に供されている。**富永**は、温度感受性TRPM2チャンネルが過酸化水素によって酸化されて機能増強を起こし、マクロファージ機能増強に大きく寄与することや (PNAS 2012)、感覚神経細胞において、TRPV1, TRPA1がCa<sup>2+</sup>活性化Clチャンネルanoctamin 1と複合体を作り、痛み増強につながることを明らかにした (PNAS 2015)。**中川**は、末梢神経損傷により、マクロファージや脊髄ミクログリアで発現誘導される活性酸素種のセンサーTRPM2が神経障害性疼痛の発症に関与することを初めて明らかにした (J Neurosci 2012)。**華山**は、神経細胞から活動電位依存的に放出されるエクソソームが、ミクログリアにおける補体の発現を上昇させ、シナプス刈り込みを促進することを見出した (Sci Rep 2015)。アストロサイトに関連した神経外環境として、**加藤(総夫)**は、延髄孤束核神経において、細胞外グルコース除去によるシナプス伝達抑制が細胞外乳酸の補給によって減弱し、その効果がモノカルボン酸トランスポーター (MCT) 阻害によって消失する事実を示した (J Neurosci 2014)。**山田**は、周産期疑似ウイルス感染モデルマウスの神経発達障害には、アストロサイト特異的に発現誘導されるインターフェロン誘導性膜タンパク質IFITM3が関与することを証明した (Glia 2013)。**柴崎**は、TRPV4を発現するアストロサイトが、アラキドン酸放出に反応してグリオトランスミッター放出を引き起こすことを見出した (JBC 2014, **富永との共同研究**)。**檜山**は、脳内のナトリウム濃度センサーNaxを発現するグリア細胞にエンドセリン受容体ETBRが発現しており、エンドセリン-3によってNaxの開口が制御されることを見出した (Cell Metab 2013)。**大倉**は、高感度高性能な緑色蛍光Ca<sup>2+</sup>プローブG-CaMP6~8を開発し、ゼブラフィッシュ脳のシナプスCa活動の可視化に成功した (Curr Biol 2013)。**田中**は、光感受性タンパク質の遺伝子を特定の細胞種に効率よく発現させるシステムを開発し、グリア細胞の機能を光で制御可能な遺伝子改変マウスを作製し、さらに、超高感度のCa<sup>2+</sup>センサーをアストロサイト内に十分に発現させ、in vivo二光子顕微鏡でグリア細胞の活動を観察する技術を開発した (Cell Reports 2012, 2014)。**富田**は、自閉症関連のシ

ナプス接着分子Neurologinが神経活動依存性に切断されることを見出した (Neuron 2012)。また、アルツハイマー病の発症予防因子と考えられるCALMタンパク質の役割を解明した (Nat Commun 2014)。**大西**は、心臓奇形などを伴うヌーナン症候群の原因遺伝子 Shp2 が、脳においてシナプス伝達を抑制し、行動制御や記憶形成に係わることを発見した (Mol Cell Biol 2015、**柴崎、平井との共同研究**)。**大海**は、ガングリオシドによる神経外環境制御機序を示した (J Neuroinflamm 2014)。**竹居**は、神経回路形成因子であるLOTUSが、神経難病の多発性硬化症の病勢に従い脳脊髄液中で顕著に変動し、バイオマーカーとして有用であることを発見した (JAMA Neurol 2015)。

**イメージンググループ (A03) : ①毒性因子蓄積イメージング**：**武田**は、毒性因子と炎症性グリア活性化のイメージングと制御として、 $\alpha$ シヌクレイン蓄積のPETと蓄積・伝播メカニズムを解明した (PLoS One 2011)。**遠山**は、 $A\beta$ ・タウ蓄積同時解析を可能にするケミカルシフト・フッ素MRIと類似化合物による $A\beta$ 凝集阻害を実現し (特許出願; Neurobiol Aging 2015)、毒性因子蓄積の可視化が可能となった。

**②炎症性グリア・レドックス環境のイメージング**：**船曳**は、新開発の蛍光顕微内視鏡によるマイクログリア遊走の長期追跡を実現し (Eur J Neurosci 2012)、これらの成果により、毒性因子蓄積が、グリアを主とする神経外環境に及ぼす影響を及ぼすか、計画研究と合わせて様々なスケールで経時評価可能となった。酸化ストレスのモニタリングとして、**柿澤**によるリアノジン受容体を利用したレドックス環境の蛍光細胞イメージング (EMBO J 2012) と、**米田**による酸化ストレスのPET (Nucl Med Biol 2012; Neurology 2015) が可能になり、細胞レベルから個体レベルを網羅する評価系が構築された。

**③神経伝達系のイメージング**：**林**による全反射蛍光顕微鏡によるグルタミン受容体の画像化 (PLoS One 2013)、**高橋(琢)**によるAMPA受容体の送達機構解明に基づく新規PETプローブ開発 (特許出願; Cereb Cortex 2016)、**矢尾**による質量顕微鏡による組織レベルでの神経伝達物質イメージング (Anal Bioanal Chem 2012) などにより、個別のシナプスから脳全体の事象を相互につなぐアセスメントが可能となった。神経伝達の細胞メカニズムとして、**野口**はプレシナプスにおける開口放出を担うSNARE複合体の二光子蛍光寿命イメージングにも成功した (Nat Commun 2015)。さらに上記蛍光顕微内視鏡にFRET蛍光センサーを組み合わせ、**船曳**は神経受容体刺激の下流にあるprotein kinase A (PKA) やextracellular signal-regulated kinase (ERK) の活性化を、タスク下のマウス生体脳で捉えることに成功した (PNAS 2015a; 2015b)。

## 6

## 研究組織（公募研究を含む。）と各研究項目の連携状況

本研究領域は、脳の主体である神経細胞とそれ以外のグリア細胞や血管周辺細胞などが共に形成する脳の状態を一つの環境としてとらえ、環境の維持による脳の機能保持や環境の悪化による脳機能の崩壊についてそのメカニズムを生理的病的に迫るものである。そのため、主体の神経細胞の細胞内の環境を研究するA01グループ（神経細胞内メカニズム）、神経細胞と周辺細胞の相互作用によりもたらされる環境を形成する神経細胞外環境を研究するA02グループ（神経外環境）。さらにそれらの研究のためイメージングに焦点をあてた新たな研究ツール開発を進めるA03グループ（イメージング）が配置され、それらを総括班が統括している。（参照：2. 研究領域の目的及び概要）

研究の推進にあたっては、以下の目的を掲げ各班独自および班間共同研究を推進した。

- 1) 脳内環境の破綻を引き起こす神経細胞内メカニズムの解明（主にA01が担当）
- 2) 脳内環境の恒常性維持とその破綻ならびに毒性転換・病態伝播メカニズムの解明（主にA02が担当）
- 3) 脳内環境と神経細胞内メカニズムのクロストーク機構の解明（A01班とA02班の共同研究）

以上により神経細胞内外のメカニズムの中で鍵となる素過程を同定し、素過程間の因果関係を明らかにすることにより脳内環境の全体像を捉える。その際に、

- 4) 最新の分子イメージング技術を駆使して主要な素過程を生体脳で可視化することにより時空間座標の中で素過程同士の因果関係を検証する。（主にA03が担当A01,A02との共同研究）

上記の目的を達成するため、A01～03の8つの計画研究が主体となり研究を進めたが、本領域をより層の厚い広範なものとするため、前期に48課題、後期に22課題の公募研究がそれぞれのグループに属し、総括班の統括下に連携研究を展開した。実際に、計画班と公募班による研究領域内共同研究は43件に上り、そのうち異なる研究グループ間の共同研究は17件に上った。計画・公募班員間の風通しを良くし情報交換を促進するために、通常の班会議やワークショップ・若手シンポジウムを頻繁に行なう他、「脳内環境マップ」（後述）をHP上に作成し、脳内環境研究のどの部分でどのような研究成果が上がっているかを可視化し逐次班員に周知した。さらに班員全員で「脳内環境フォーラム」をネット上に構築し、「脳内環境」関連領域の国内外の研究成果にアンテナをはりめぐらし情報の収集と共有に努めた。このような仕組みによる研究体制の連携強化は、大きな相乗効果をもたらし、前述のように極めて多くの成果の発表に繋がり、いわば「脳内環境学」ともいえる新たな研究領域の創成に至った。

**総括班** 領域運営の重要事項について議論し、領域全体の研究が発展するように意思決定を行った。具体的には、定期的な班会議・ワークショップの開催により班員同士の情報交換と交流促進を行い、共同研究の促進に繋げた。この班会議とワークショップには、国際アドバイザーグループに参加を依頼し、施策や運営、研究の進捗に関して諮問を行い、領域運営に反映させた。また、計画研究に相乗効果をもたらすよう公募研究の選定を行った。さらに、領域のホームページを立ち上げ、研究活動内容の発信を行ったと共に、「脳内環境フォーラム」を立ち上げた。本フォーラムでは、本領域に関連する95編の注目論文が紹介され、活発な討議が行われた。また、班員の成果をマップ上に示す「脳内環境マップ」の作成運営にもあたった。

**A01：神経細胞内メカニズム** 神経細胞の恒常性維持機能として重要な、a) ユビキチン・プロテアソーム系やオーファジーをはじめとするタンパク分解系による異常な毒性タンパクの蓄積防止、b) ミトコンドリアをはじめとするオルガネラの機能保持と品質管理、c) メッセンジャーRNAのプロセッシング、d) 神経細胞に特有である樹状突起と軸索に沿ったオルガネラ・タンパク・メッセンジャーRNAの輸送ならびに情報伝達、を中心に研究を展開した。各班員は神経病態でこれらの恒常性維持機能が障害される際に鍵となる素過程ならびに分子を明らかにし、その上で、障害が生じた神経細胞が毒性シグナルを外部に放出し、脳内環境に及ぼす影響を検討する中で、多くの共同研究があった。グループ内の代表的な共同研究：高橋良(計)―内山(計)、漆谷(計)―鶴田(公)、高橋良(計)―田中敦(公)、内山(計)―山中智(公)、服部(計)―松田(公)、柳(公)―宮川(公)、柳(公)―若月(公)、宮川(公)―木下(公)、宮川(公)―橋本(公)

**A02：神経外環境** 神経細胞の恒常性維持機能が障害されて毒性シグナルを放出した際の脳内環境の変化に注目して研究を行った。すなわち、グリア細胞が恒常性を維持しようとする細胞保護的な働きや、逆に恒常性の破綻時にグリア細胞が毒性転換して正常な神経細胞を攻撃したり、毒性シグナルを放出したりするようになる過程である。この一連のメカニズムを検証し、その中で鍵を握る素過程と分子を同定した。グループ内の代表的な共同研究：川上(計)―木山(計)、川上(計)―山中宏(計)、木山(計)―山田(公)、山中宏(計)―三澤(計)―古川(公)、三澤(計)―加藤総(公)、柴崎(公)―富永(公)、大西(公)―柴崎(公)―平井(公)、華山(公)―望月(公)、田口(公)―竹内(公)、

**A03：イメージング** 多様な生体分子を標的とする複数のプローブをポジトロン断層撮影（PET）と組み合わせることにより、脳内環境の破綻過程を同一個体で時空間的に観察した。アルツハイマー型認知症での病態分子や、ミクログリアを捉えるプローブの開発に成功し、他研究グループの研究推進に貢献した一方で、将来的に臨床応用が望める成果を挙げた。グループ内の代表的な共同研究：樋口(計)―高橋琢(公)

**その他A01,A02,A03グループ間の共同研究** A01-A02間での共同研究：木山(計)―高橋良(計)、高橋良(計)―山中宏(計)、内山(計)―山中宏(計)、山中宏(計)―柴崎(公)、菅田(公)―岡野J(公)、宮川(公)―富永(公)、宮川剛(公)―柴崎(公)、五十嵐(公)―大倉(公)、檜山(公)―大倉(公)、岡村康(公)―村松(公)、岡村康(公)―富永(公)、

A01-A03間での共同研究：樋口(計)―高橋良(計)、樋口(計)―村田(公)、遠山(公)―野中(公)

A03-A02間での共同研究：遠山(公)―浅沼(公)、船曳(公)―田中謙(公)、柿沢(公)―大倉(公)

#### 総説の発表や講演

本領域の班員の研究成果について分かりやすく解説した以下書籍を出版した。

・脳内環境―維持機構と破綻がもたらす疾患研究（高橋良輔／編集 漆谷真／編集 山中宏二／編集 樋口真人／編集、遺伝子医学MOOK 26、メディカルドゥ社、2014年11月）

さらに、領域研究の集大成として、班員による研究成果および脳内環境に関する用語を解説する「脳内環境辞典」を出版予定である。



## 7

## 研究成果の公表

【論文発表】：「論文業績一覧」の項参照

【アウトリーチ活動】 合計169件から主要なものを抜粋

1. 高橋良輔：大手前高校2年生50名が研究室を訪問し講義を行った。2013年—2015年
2. 高橋良輔：天王寺高校2年生50名と亀岡育親中学2年生50名が研究室を訪問し講義を行った。2015年
3. 高橋良輔：順天堂大学で高校生向けに講義を行った。2016年3月29日
4. 内匠 透：世界脳週間にあわせた高校生理科教室で講演。2013年8月9日
5. 内匠 透：市民公開講座で講演を行った。2013年11月4日
6. 内匠 透：理研一般公開日に研究室の成果を一般市民に紹介。2014年4月19日
7. 内匠 透：埼玉県大宮高等学校の学生に研究紹介。2014年12月17日
8. 内匠 透：理研一般公開日に研究室の成果を一般市民に紹介。2015年4月18日
9. 服部信孝：あきらめないパーキンソン病を目指して～いつまでも元気にいられるために～、神経疾患ブレインバンク 第14回市民講演会、国立精神・神経医療研究センター ユニバーサルホール、2015年2月8日、東京
10. 服部信孝、下泰司、馬場康彦：「こんなときは神経内科に行こう！」、パーキンソン病の脳・神経の病気を知るセミナー in 東京、東京ミッドタウン、2015年4月、東京
11. 服部信孝：あきらめないパーキンソン病治療をめざして、市民公開講座【パーキンソン病】、第56回日本神経学会学術大会「にいがた神経内科ウィーク」、新潟日報メディアシップ2F 日報ホール、2015年5月21日、新潟
12. 服部信孝：パーキンソン病の治療と展望について、市民公開講座 平成27年度「神経難病医療講演会」、東京都庁財一本庁舎、2015年8月、東京
13. 服部信孝：PD患者会講演、パーキンソン病の治療と展望について、江戸川区パーキンソン病友の会講演会、グリーンパレス（江戸川区民センター）、2015年9月、東京
14. 服部信孝：パーキンソン病の治療と展望について、市民公開講座 平成27年度「神経難病医療講演会」埼玉県狭山市市民交流センター、2015年9月、埼玉県狭山市
15. 服部信孝：パーキンソン病の次世代治療について、第33回日本神経治療学会総会、市民公開講座、パーキンソン病とりハビリテーション医学の新たな可能性を考える「神経疾患の次世代治療について」、名古屋国際会議場・白鳥ホール北、2015年11月28日、名古屋
16. 「高校生・高卒生のための春休み特別セミナー」（文科省学術研究費補助金新学術領域「脳内環境」「オートファジー」合同）2016年3月29日、順天堂大学、講師：高橋良輔、樋口真人、服部信孝、小松雅明、久万亜紀子、斉木臣二（約100名）
17. 木山博資：「脳と心と環境」、富山市立山室中学校講演会、2013年11月22日、山室中学校体育館、富山（生徒、教員、保護者：約720名参加）
18. 木山博資：「神経組織の修復メカニズム、疲労を科学する」第17回鶴舞公開セミナー、2012年4月19日、名古屋大学病院講堂、名古屋
19. 木山博資：「慢性ストレスが引き起こす細胞の過労死」第21回名古屋大学博物館企画展、「ミクロの美術館？顕微鏡で見た人体の世界？」一般市民向け特別講演会、2011年10月4日、名古屋大学博物館、名古屋
20. 山中宏二：「神経難病の病態解明に向けて」研究室訪問した埼玉県産業労働部職員（約30名）向けに講演。2011年12月7日、理化学研究所。
21. 山中宏二：「神経難病の病態解明に向けて」研究室訪問した日本赤十字看護大学学生、教員（11名）向けに講演。2012年2月22日、理化学研究所。
22. 山中宏二：「神経難病の病態解明に向けて」世界脳週間2012夏休み高校生理科教室、高校生10名に講演、および研究室見学を行った。2012年8月24日、理化学研究所
23. 山中宏二：「ALSの未来治療」2014年11月3日、千葉県市川市、千葉県のALS患者・医療者団体に対して脳内環境における研究内容の講演。（約100名）
24. 樋口真人：「20歳から始まる？脳の老化と認知症のイメージング」、文部科学省研究費補助金新学術領域「脳内環境」「オートファジー」合同 高校生のための春休み特別セミナー、2016年3月29日、東京都
25. 三澤日出巳：慶應義塾の授業に出かけよう：講義入門2012、2012年9月23日、慶應義塾大学 三田キャンパス、高校生向けの模擬講義 講義タイトル：脳に効く薬のメカニズム（参加者：120名）
26. 鶴田文憲：Fuminori Tsuruta Molecular basis of neurodegeneration mediated by defect of RNA splicing. AAAs 2015 (2015.2.12 - 2.26, San Jose, USA)
27. 田中 敦：「ミトコンドリアと疾患生物学」内閣府NPO PRIP-Tokyo 主催セミナー（対象：難病患者等、製薬企業、研究者）での講演、2012年9月 サピア東京
28. 五十嵐道弘：第一回新潟大学医学部学外講義 講演（新潟市民プラザ；参加者200名）2013年3月
29. 木下彩栄：京都市下京区修徳学区における認知症専門医による物忘れ相談会、介護予防講演会、2013-2016年 年に1～2度開催、現在も継続中。
30. 宮川 剛：日本科学未来館において、およそ月1回の割合で一般の方に対し、「ネズミで探る？！遺伝子のヒミツ」と題して、領域研究のこれらの領域研究成果の解説を行った。（2012年4月？2014年1月、全29回、各回10名）。
31. 宮川 剛：2013年8月には中高生も対象として、脳やゲノムに関する実験を体験する企画「リアル研究者体験」を7日間に渡って日本科学未来館において開催し、同様に領域研究成果の解説を行った。（2013年8月、7日間、各日10名）。

32. 松田憲之：「老化の鍵を握るミトコンドリアの秘密に迫る」一般向けのサイエンスカフェ in 上北沢において講演。2014年3月16日
33. 松田憲之：東京都医学総合研究所見学の学芸大付属高等学校生徒に向けて話題提供（研究概要を説明）。2016年2月2日
34. 松田憲之：「神経変性疾患とは」一般向けの都民講座を一橋講堂に於いて主催して講演（平成27年度第8回都医学研都民講座）2016年2月5日
35. 柴崎貢志：世界脳週間において高崎高校の学生に対する培養アストロサイトのカルシウムイメージング実験の体験指導。平成24年～平成27年度
36. 大西浩史：「脳とストレス」前橋市商工会議所と群馬大学が共催する市民講座での講演 2012年9月20日、前橋まちなかキャンパス（前橋プラザ元気21・群馬県前橋市）参加者数：58名
37. 大西浩史：「神経とストレスの関係」前橋市商工会議所と群馬大学が共催する市民講座での講演 2014年10月31日、前橋まちなかキャンパス（前橋プラザ元気21・群馬県前橋市）参加者数：23名
38. 富田泰輔：国際誌に論文を投稿するのは四苦八苦 英語論文セミナー 2013年7月5日 東大TV
39. 中川貴之：「末梢神経障害の研究手法と発症機構の解明、新たな治療戦略の開発」技術情報協会、2016年3月25日、東京
40. 中川貴之：「痛み・しびれ治療薬開発に向けて ～病態理解と適切な動物モデル・評価法、標的候補分子および求められる新薬像～」情報機構、2015年9月18日、東京
41. 中川貴之：「疼痛・しびれ治療薬開発のための病態理解および動物モデル/評価系の選択ポイント」R&Dサポートセンター セミナー、2015年7月8日、大阪
42. 中川貴之：「疼痛治療薬開発のために最適な疼痛モデルとその評価系の選択ポイント」技術情報協会、2015年4月3日、東京
43. 中川貴之：「新しい薬ができるまでの道のり」第27回健康科学市民公開講座、2014年11月8日、京都大学医学研究科
44. 中川貴之：「痛み・しびれ治療薬開発に向けて ～病態理解と適切な動物モデル・評価法、標的候補分子および求められる新薬像～」情報機構、2014年6月13日、東京
45. 中川貴之：「疼痛治療薬開発のための疼痛モデルの定量評価ポイントと痺れ動物モデルの作製・評価法 ～客観的指標から主観を定量評価するために～」技術情報協会、2013年8月26日、東京
46. 中川貴之：「漢方薬はマウスのモルヒネ耐性及び身体依存を抑制する」KAMPO SEMINAR in Kyoto、2013年8月4日、メルパルク京都
47. 中川貴之：「しびれ治療薬開発のための動物モデル作製とそのメカニズムの解析」?技術情報協会、2013年6月25日、東京
48. 中川貴之：「慢性疼痛の発症機序と鎮痛薬開発の標的分子」TH企画セミナーセンター、2013年5月15日、東京
49. 中川貴之：「慢性疼痛の発症機構と鎮痛薬開発の標的分子」情報機構、2013年2月19日、東京
50. 中川貴之：「しびれ治療薬開発のための動物モデル作製とその発症機構の解析」技術情報協会、2012年11月28日、東京
51. 中川貴之：「しびれ動物モデルの構築とその治療標的分子としてのTRPA1」DSANJ疾患別商談会、2015年8月28日、大阪産業創造館
52. 望月秀樹：「パーキンソン病 up to date 発症機序に迫る」沖縄パーキンソン病医療講演会、2013年4月5日、沖縄
53. 望月秀樹：「パーキンソン病をあきらめないiPS細胞など最新的话题を含めて」大阪パーキンソン病市民フォーラム 2013年6月9日、大阪
54. 田口明子：「すこやかに過ごすための食事と睡眠ー健康長寿は誰でも実現できるのか？アンチエイジングのための食事と栄養」宮崎大学主催市民公開講座 一般人50名、2012年7月26日
55. 田口明子：「生活習慣で気をつけたいことベスト5から糖尿病とアルツハイマー型まで」宮崎県東臼杵郡門川町糖尿病予防教室 一般人45名、2013年3月13日
56. 田口明子：「老化予防は普段の生活習慣から！健康長寿を目指すために今できることとは？」宮崎県年金協会主催福祉講座 一般人150名、2013年10月2日
57. 竹居光太郎：高校生向け授業：横浜市立金沢高校にて高大連携授業、2015年10月26日
58. 竹居光太郎：イベント参加：理研?市大一般公開にてブース出展、2015年8月29日
59. 加藤総夫：東京学芸大学附属国際中等教育学校にて、高校2～3年生を対象に「世界の脳研究ー研究の世界への誘い」講義にて研究成果の一部を紹介、2012年12月14日および2013年12月13日
60. 村田茂穂：ノートルダム清心女子高校 研究室見学および模擬講義
61. 村田茂穂：西大和高校 研究室見学および模擬講義
62. 山口賀章：京都大学オープンキャンパスにて、高校生を対象に、概日時計の脳内環境恒常性と時差によるその破綻について研究紹介を行った。2014年8月、2015年8月
63. 菅田浩司：中学3年生に再生医療に関する説明、質疑応答（岡山県立操山中学校；大学に来訪）
64. 菅田浩司：JST「グローバルサイエンスキャンパス事業」において、高校1年生の受け入れと1年間の研究指導（2014年10月-2015年9月）受講生は2015年9月の全国受講生研究ポスター発表会において、受講生代表として英語での口頭発表に選出されるとともに、優秀賞を受賞した。全私学新聞に受講生及び菅田のインタビュー記事が掲載された 2015年11月3日
65. 平井宏和：群馬大学公開講座「世界脳週間2014」2014年7月19日
66. 平井宏和：小中学生ための医学研究者体験教室 2014年8月19日
67. 平井宏和：群馬大学公開講座「世界脳週間2015」2015年4月29日
68. 平井宏和：小中学生ための医学研究者体験教室 2015年8月17日
69. 河崎洋志：文系や理系を問わず金沢大学の1年生に対して、脳神経系の基本を説明し、また顕微鏡による脳観察を行った。
70. 河崎洋志：北陸学院高等学校の高校生の研究室訪問を受け入れて、脳神経系の基本を説明し、また顕微鏡による脳観察を行った。
71. 野口 潤：他分野研究者に対する講演 電気学会「統合化バイオサーキット技術調査専門委員会」研究会 2014年12月22日、東京医科歯科大学生体材料研究所

## 【プレスリリース】

(全44件から代表的なリリースを抜粋)

1. A01高橋良輔(京都大学)、A01内山安男(順天堂大学) 2016年2月、PLoS Genetics ゴーシェ病の原因遺伝子の異常がパーキンソン病を起こすメカニズムを解明～メダガモデルの有用性～
2. A01漆谷真、高橋良輔、(京都大学) 2016年1月、Scientific Reports ALSの原因蛋白質TDP-43がオリゴペプチドで封入体を形成するメカニズムを発見～ALSの新たな病態の発見と分子標的治療の可能性を開く～
3. A01山口賀章、A01岡村均(京都大学) 2016年1月、Journal of Biological Rhythms 時計遺伝子発現の周期的振動をリアルタイムに捉えることに成功
4. A01若月修二(国立精神・神経医療研究センター) 2015年12月、Journal of Cell Biology 酸化ストレスを神経変性に変換する仕組み
5. A02山中宏二(名古屋大学) 2015年5月、Cell Reports 神経難病ALSの進行にグリア細胞由来のTGF- $\beta$  1が関与—ALSの進行を制御する治療標的として期待—
6. A02大西浩史(群馬大学) 2015年3月、Molecular and Cellular Biology 心臓奇形、がんの原因遺伝子が脳機能を制御することを発見
7. A01服部信孝(順天堂大学)、A01内山安男(順天堂大学) 2015年2月、Lancet Neurology ミトコンドリアで働く分子の遺伝子異常がパーキンソン病の原因となることを発見
8. A02華山力成(大阪大学) 2015年2月、Scientific Reports ニューロンから放出される小胞エクソソームが軸索・シナプス剪定の促進に関与
9. A03樋口真人(放射線医学総合研究所) 2015年1月、Journal of Nuclear Medicine アルツハイマー病の脳の病理を生体内で高感度に可視化する新規薬剤を開発—安価で客観的な認知症画像診断の普及に道筋
10. A02山中宏二(名古屋大学)、A01高橋良輔(京都大学)、A02三澤日出巳(慶應義塾大学) 2014年8月、Molecular Brain 長寿遺伝子産物SIRT1(サーチュイン)の活性化で神経難病ALSマウスが延命
11. A03遠山育夫(滋賀医科大学) 2014年8月、Neurobiology of Aging 開発したアルツハイマー病MR画像診断薬に認知症治療効果を発見
12. A02柴崎貢志(群馬大学) 2014年5月、The Journal of Biological Chemistry 神経活動を調節する特殊な細胞集団を発見—TRPV4陽性アストロサイトを介した神経活動の増強—
13. A01松田憲之(東京都医学総合研究所)、田中啓二(同、領域アドバイザー) 2014年5月、Nature パーキンソン病の発症を抑制する細胞内の小分子を発見～病理解析や診断マーカーの開発につながる発見～
14. A01宮川 剛(藤田保健衛生大学) 2014年5月、Science 「脳の海馬歯状回の新しい神経細胞が記憶の忘却を促進することを発見—幼児期健忘の脳内メカニズムの解明に前進—」
15. A02富田泰輔(東京大学) 2014年3月、Nature Communications アルツハイマー病の発症を予防する因子CALMの機能を解明
16. A01山中智行(順天堂大学) 2014年3月、Nature Communications 大脳神経細胞の生存に関わる必須遺伝子の同定—小胞体異常を示す神経変性疾患の病態解明につながる可能性—
17. A01岡村康司(大阪大学) 2014年3月、Nature Structure & Molecular Biology 電気信号により制御される水素イオンチャンネルの形を原子レベルで解明—創薬研究から分子デバイスへの応用まで、大きな波及効果に期待—
18. A02富永真琴(岡崎統合バイオサイエンスセンター) 2014年2月、FASEB Journal 脳脊髄液分泌に関わる新しいメカニズムの発見—TRPV4-アノクタミン1相互作用を介した水分分泌の促進—
19. A01宮川 剛(藤田保健衛生大学) 2013年11月、Molecular Brain 抗うつ薬によって大脳皮質前頭葉の成熟した神経細胞が成熟前の状態に戻ることを発見—抗うつ薬の作用メカニズム解明に前進
20. A01岡村 均(京都大学) 2013年10月、Science—海外旅行などの不眠治療薬開発に期待—
21. A03樋口真人(放射線医学総合研究所) 2013年9月、Neuron ポジトロン断層撮影によるタウタンパク蓄積の生体イメージング
22. A01野中 敦(東京都医学総合研究所) 2013年9月、Cell Reports ALSなどのコンフォメーション病の発症メカニズムの解明・治療法開発に期待
23. A03林 崇(東京大学) 2013年7月、PLoS One IL1RAPL1が大脳皮質神経細胞の興奮性シナプスを制御する機構を解析
24. A02檜山武史(基礎生物学研究所) 2013年4月、Cell Metabolism エンドセリンによるNaxチャンネルの開閉調節
25. A01宮川 剛(藤田保健衛生大学) 2013年2月、Neuropsychopharmacology 「統合失調症に似た特徴を持つ遺伝子改変マウスを確立—モデルマウスを使って患者の新しい予防・診断・治療法へ道—」
26. A01宮川 剛(藤田保健衛生大学) 2013年1月、Neuropsychopharmacology 「正常な生体マウスの大脳皮質で、神経細胞を新生させることに成功」
27. A02山中宏二(理化学研究所) 2013年1月、EMBO Molecular Medicine 神経難病ALSとSMAに共通した病態メカニズムを発見
28. A02柴崎貢志(群馬大学) 2013年1月、PLoS One 特定のグリア細胞が分化する際の目印を発見—小脳に存在する3種類のアストロサイトの分化様式—
29. A02山中宏二(理化学研究所) 2012年12月、The Journal of Biological Chemistry TDP-43タンパク質の安定化が神経難病ALSの発症時期のカギ
30. A02望月秀樹(大阪大学) 2012年11月、Journal of Neuroscience  $\alpha$ -シヌクレインの集積はSNARE複合体の機能異常が関係
31. A02富田泰輔(東京大学) 2012年10月、Neuron 自閉症関連分子Neuroiginの神経活動依存性代謝が神経細胞シナプス形成を制御する
32. A01高橋良輔(京都大学)、A01内山安男(順天堂大学)、A01漆谷真(滋賀医科大学)、A02三澤日出巳(慶應義塾大学)

2012年10月、The Journal of Biological Chemistry 神経難病・筋萎縮性側索硬化症の原因に蛋白質分解異常が関与する可能性：遺伝子改変マウスでの知見から

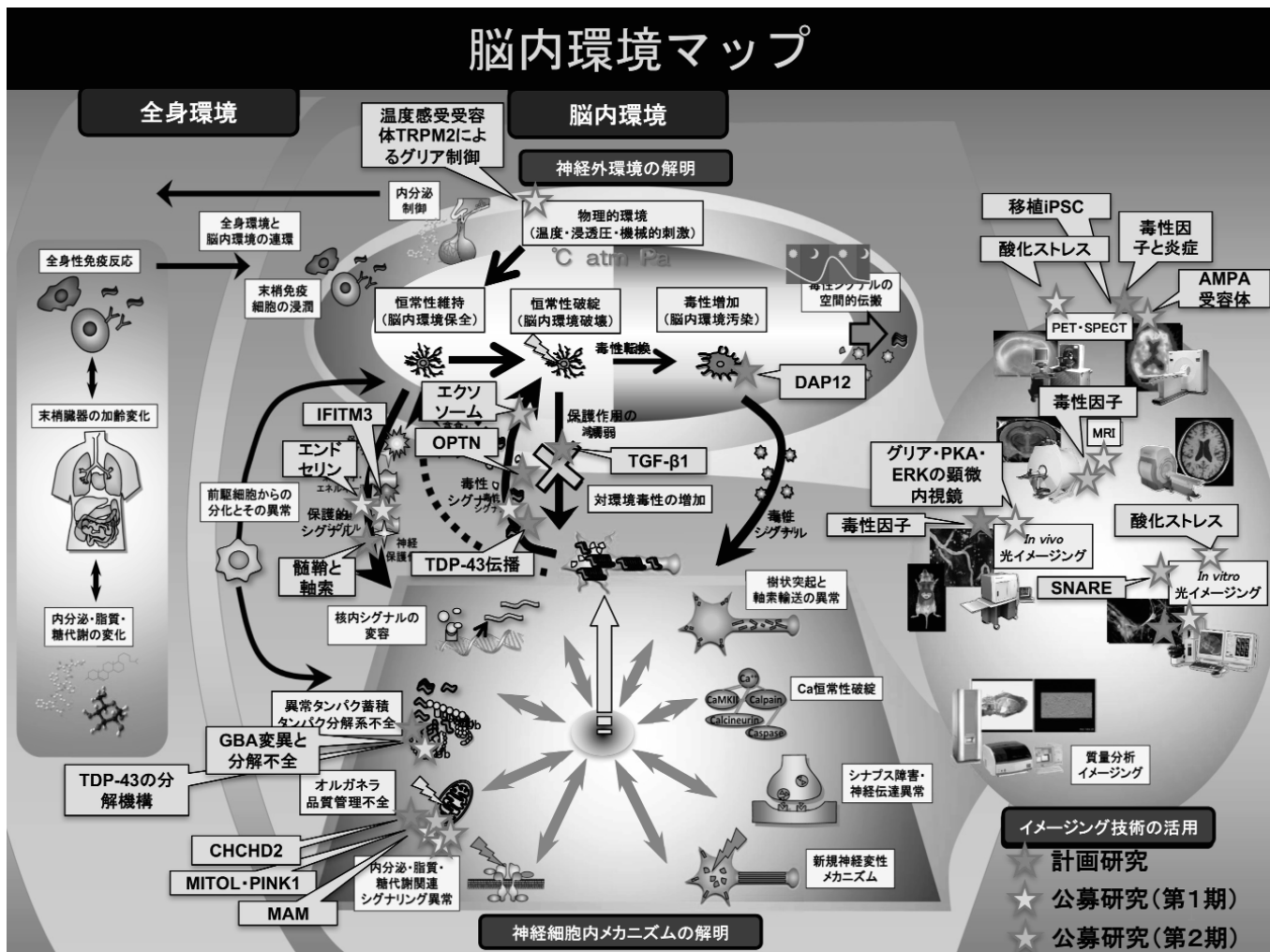
33. A01 松田憲之（東京都医学総合研究所）2012年8月、Nature Communications PINK1の自己リン酸化を介したミトコンドリア品質管理機構
34. A02 田中謙二（慶應義塾大学）2012年7月、Cell Reports 生きたままマウスの体の中の中の特定の細胞を狙い、その活動を“光”で操作（光操作）することができる遺伝子改変マウスを開発
35. A01 木下彩栄（京都大学）2012年5月、The Journal of Biological Chemistry アルツハイマー病の記憶障害に対しては、運動療法のほうが食事療法より効果がある：モデルマウスの解析から

【プレスリリースのマスコミ掲載件数】

テレビ 17 件、新聞 99件、雑誌 17件、その他 47件

【脳内環境マップによる班員の研究成果のまとめと情報発信】

本領域の特色として、総括班は研究テーマを網羅する脳内環境マップを作製し、各班員の研究課題や成果の位置づけを確認すると共に、領域で何を強化すべきか俯瞰し方向づけを行った。当該マップは論文成果の表示などさらなる改訂を随時行い、領域ホームページに掲載している。脳内環境マップ（下図）では、A01からA03の代表的な成果が、脳内環境マップのどこに位置づけられるかを示している。計画研究・公募研究で重点的に取り組まれた「異常タンパク蓄積と分解系不全」「オルガネラ品質管理不全」「神経外からの保護的シグナル」に加えて、「毒性シグナルの拡散による環境汚染」のような主要プロセスの解明がなされたことを示している。さらに物理的環境など、当初の想定を超えた新たな環境要因の重要性も見出された。イメージングについても、モダリティ・スケールをまたぐ各分野で目立った成果が得られた。



## 8

## 領域推進のための企画

- ① 平成23年度冬の班会議、熱海、2012.1.28-29
- ② 平成24年度夏のワークショップ、仙台、2012.7.23-24
- ③ 第1回若手国際シンポジウム、京都、2012.11.17
- ④ 平成24年度冬の班会議、京都、2013.1.16-17
- ⑤ 平成25年度夏のワークショップ、京都、2013.8.29-30
- ⑥ 平成25年度冬の班会議、東京、2014.1.8-9
- ⑦ 平成26年度夏のワークショップ、名古屋、2014.7.24-25
- ⑧ 平成26年度若手シンポジウム・冬の班会議、広島、2015.1.8-9
- ⑨ 平成27年度夏のワークショップ、軽井沢、2015.9.24-25
- ⑩ 平成27年度冬の班会議・第2回若手国際シンポジウム、京都、2016.1.7-8

【プログラム】：「班会議」の項参照

## 9

## 本研究領域の評価の状況

中間評価においては、**A（研究領域の設定目標に照らして、期待通りの進展が認められる）**の高い評価を受けた。以下、科研費審査部会における総合所見を記載する（原文通り）。

本研究領域は、脳を神経細胞と周囲のさまざまな非神経細胞（グリア細胞）などの多細胞から形成されるコミュニティとして捉え直し、神経疾患の病因として細胞内だけでなく、これらの細胞から放出されるメディエータを介する応答の場を含めた「脳内環境」の破たんに着目し、その恒常性維持及び破綻に至るメカニズムを、イメージング技術なども駆使して、分子病態を明らかにしようとする意欲的な領域である。

基礎研究と臨床医学、形態学と生理・薬理などの機能学、さらには、脳における細胞内環境－細胞外環境、それら相互の影響などを有機的に連携した「脳内環境学」が順調に進展している。すでに異分野連携による共同研究も生まれており、また、ヒトに限らず新たな生体機能分子のイメージング手法を得意とする研究者を集結し、新規PET用製剤によるイメージング等の新手法を開発するなど、研究は概ね順調に進展している。

一方、公募研究が多数になった結果として、領域の目指す方向性とはいささか異なる研究も散見されることから、2回目の公募研究選定の際は、応募内容をより精査する必要があると思われる。また、研究成果の多くは既存の神経科学の範疇にとどまっているため、領域として掲げる「脳内環境」に合致した研究のさらなる推進が望まれるとの意見もあった。

事後評価においては、**A（研究領域の設定目的に照らして、期待どおりの成果があった）**

の高い評価を受けた。以下、科研費審査部会における総合所見を記載する（原文通り）。

本研究領域は、神経細胞内メカニズム、神経外環境、イメージングの3つの研究項目において、それぞれの設定目標に到達し、脳内環境の恒常性維持機構に注目する新学術領域の創成に大きく貢献したと評価される。また、パーキンソン病や筋萎縮性側索硬化症の病態悪化に関わる新たな物質の探索に成功し、将来臨床応用も視野に入れたイメージングプローブの開発まで行ったことは期待どおりの成果と言える。

中間評価での指摘については、研究領域の目指す方向性を踏まえ、公募研究の絞り込みを行うなど、適切に対応された。

研究成果については、国際的に評価の高い学術雑誌を含む多くの国際雑誌に論文が掲載され、メディアでのプレスリリースを数多く行ったりするなどアウトリーチ活動も熱心に行われた。また、研究領域内での会議やワークショップだけでなく、「脳内環境マップ」や「脳内環境フォーラム」において、研究者相互の情報交換の場が作られたことにより、領域内共同研究が43件、グループをまたぐ共同研究が17件も生まれたことは、総括班による連携マネジメント力の高さを示している。さらに、若手国際シンポジウムの開催、国際学会参加助成など、若手研究者の支援・育成に大きく貢献した点も評価に値する。

パーキンソン病や筋萎縮性側索硬化症のみならず、他の神経疾患、精神疾患にも応用できるメカニズムや波及効果が期待されることから、今後、本研究領域での成果をもとに、「脳内環境」という研究領域の更なる確立、発展を図るとともに、神経疾患における基礎研究として、世界をリードしていくことが期待される。

領域アドバイザー（総括班評価者）による評価は下記の通りである（原文通り）。

#### **東京都臨床医学総合研究所・所長 田中啓二先生**

高齢化社会に突入した今日、加齢に伴う様々な脳神経疾病は増加の一途を辿っている。これらの高次脳機能障害を伴った老人性疾患の発症原因を解明し、その早期診断・予防・治療法を開発することは、医学・生命科学領域における急務の課題となっている。このためには脳の基礎的理解が不可欠であり、脳科学研究は21世紀における最大のテーマである。これまでの脳科学・脳疾病研究は、主としてニューロンを対象にしてきたが、依然として全貌解明には程遠い状況である。このような状況を踏まえ、本新学術研究「脳内環境」は、単にニューロンの世界に止まらず、ニューロンとニューロンを取り巻く多彩な細胞群から構成されたコミュニティとして脳を研究することが、脳とその不全による脳疾病の包括的な理解に必須との認識で構想されたものである。全く斬新な切り口であり、新学術研究らしい魅力に溢れたプログラムであったと総括できる。実際、計画班員のみならず公募班員が一丸となって「脳内環境」の仕組みを明らかにすることを目指し、脳の恒常性維持機構の解明に専念してきた。その結果、多くの画期的な成果を挙げてきたことは、優れた論文を数多く上梓してきたことから首肯できる。その他、広報・学会活動やアウトリーチ活動を積極的に推進してきたことも、本事業の卓越した成果として高く評価できる。

#### **慶應義塾大学医学部・教授、医学研究科委員長 岡野栄之先生**

本研究領域は、神経病学を専門とする研究代表者の高橋良輔教授の強力なリーダーシップの下、神経病の病態メカニズムさらには革新的な治療法を脳内環境の破綻という側面から理解しようという意欲的かつ斬新的な取り組みをしている。特に、脳内環境破綻を来す神経細胞内（cell-autonomousな）メカニズムの解明を目指すA01班（神経細胞内メカニズム）、non cell-autonomousなメカニズム（即ち脳内環境破綻と毒性転換の伝播メカニズム）の解明を目指すA02班（神経外環境）、さらにはイメージング技術の活用による様々な脳内環境破綻の可視化を目指すA03班（イメージング）という有機的なグループの組み方には感嘆すべきものがある。これらのいわゆる3つの矢を用いた神経病の病態解明が重要であることは疑いの余地もないが、1つの研究グループが単独に3つの矢を実行するには、技術的にも人材的にも極めて困難であるのが実情である。このような有機的な研究チームを組んで、研究を進めて行くシステムを構築した事は、まさに新学術領域のお手本として高く評価出来る。これ迄本研究領域のメンバー間の共同研究やinteractionも活発であり、中間評価以降も順調に業績が伸び、服部らの新規の家族性パーキンソン病原因遺伝子に関する論文（Lancet Neurol, 2015）、岡村らのバゾプレッシン受容体1a, 1b遺伝子と時差ぼけに関する論文（Science, 2013）、松田らによるパーキンソン病産物の機能解析に関する論文（Nature Communication, 2012; Nature, 2014）、山中らによるALS病態におけるアストロサイト由来のTGF- $\beta$  1の役割に関する論文（Cell Report, 2015）など、本研究領域のメンバーが中心的な役割を果たした優れた論文が数多く発表された事は、高く評価できると考えられる。

#### **Prof. Jean-Pierre Julien (Laval University, Canada)**

The Young Investigator Symposium was very interesting with topics (neuro-glia communication, mouse models, imaging of AD pathology and mitochondria) of high relevance to the theme Brain Environment. I was also very impressed by the overall quality of presentations during the two days meeting. I found that the science in this program was wide in scope and at the leading edge in the field. The work carried out by investigators addressed fundamental mechanisms associated with neurodegenerative and neurodevelopmental diseases including protein misfolding and aggregation, genetic mutations, role of exosomes, proteasome, autophagy, synaptic plasticity, astrocytes, immune cells etc... The studies covered many human disorders including ALS, Alzheimer, Parkinson, dementia, spinocerebellar ataxia, autism, epilepsy etc... Moreover, I noted that several new and useful animal models and stem cell lines have been generated by investigators in this Program. Important advances have been made with imaging of pathological changes by MR or PET. The Brain Environment Program has provided an ideal training environment for trainees who have been exposed to biological problems from different angles. Such wide scope formation is the best recipe to stimulate creativity and innovation. Clearly, the research activities and the overall productivity of the Brain Environment Program have been outstanding. I noticed that the communication skills in English of Japanese investigators were quite good and that there was an enthusiastic participation of researchers during question periods after the speaker presentations. This Program has succeeded in promoting scientific excellence and multidisciplinary formation in leading edge research in neuroscience. It is my hope that financial support of this program will be pursued perhaps with an emphasis on therapeutic development and imaging techniques for diagnostic tool as brain diseases represent major health problems in Japan and worldwide.

#### **Prof. Gena Raivich (University College of London, UK)**

First, I am delighted to perform the final review on the achievements of the Grant Program for Scientific Research into Brain Environment, funded by the Japanese Government and headed by Professor Ryosuke Takahashi.

Overall, it was an exciting, well-fitting and coordinated program, at the cutting edge of international neuroscience research into causes of brain diseases and I very much wish that this work will continue. In the last 5 years, all sub-groups of the research programme ? (1) neuronal mRNA/protein synthesis and degradation (intraneuronal environment), (2) interaction of neurons with neighboring glia (extra-neuronal environment), and (3) in vivo/in vitro imaging of these processes - have shown very good progress and with many publications in top general (Cell, Science, Nature, PNAS, EMBO J) and specialist journals (Neuron, Brain, Lancet Neurol Cell, J Neurosci).

Part 1 — groups led by Professors Takahashi (Kyoto), Urushitani (Shiga), Uchiyama and Hattori (Juntendo) and Takumi (RIKEN), the main emphasis and achievement has been to create and explore animal models with neuronal defects in mRNA splicing (TLS/FUS, TDP43), organelle phagocytosis (autophagy, PINK/Parkin-associated mitophagy) and proteasome-linked protein degradation. This successful research has been critical to reproduce severe neurodegenerative disease ? amyotrophic lateral sclerosis, neuronal lipofuscinosis and Parkinson disease, as well as their disease specific defects in molecular machinery, resulting in high impact publications in Nature,

Nat Commun, J Biol Chem, J Neurosci, Sci Rep, Plos One and Hum Mol Gen (as well as many other journals).

Part 2 groups, led by Professors Yamanaka (RIKEN), Kiyama (Nagoya), Kawakami (Hiroshima) and Kato (Saitama) work on dysregulated glia-neuron network in promoting neurodegenerative disease, by targeting molecular signals such as TGFbeta1, Neuregulin, pap3gamma and adhesion/matrix factors and their cellular receptors (DAP12, osteopontin, optineurin). Another exciting avenue has been the newly won ability to program development of iPS cells into forebrain neurons using TET1 demethylase. This critical work produced high impact publications in J Biol Chem, J Neurosci, Hum Mol Gen and EMBO Mol Med.

Finally, it's not enough to gather insight into the pathogenic mechanisms? one needs to identify disease early on in the living human organism, using imaging with positron-emitting tomography (PET). Here Part 3 studies led by Professor Higuchi have demonstrated successful PET detection of microgliosis, calpain-calpastatin, amyloid and tau pathology, now published in J Neurosci (2), Neuron and in J Nucl Med.

In summary, the research program has covered a critical area in Molecular Neurology and Psychiatry, with very good leadership and excellence from all the contributing groups. It is organically structured and focused, and has been very successful? so much so that I dearly wish that this program will continue.

#### 国際医療福祉大学大学院長 金澤一郎先生

我々の領域活動の成果のご評価と方向性につき貴重なご意見とご助言を頂いておりました金澤一郎先生は、病氣御療養中のところ平成28年1月20日にご逝去されました。生前のご指導に班員全員心より深謝し、ご冥福をお祈りいたします。(金澤先生には中間評価にて、我々の研究成果、アウトリーチ、若手研究者の育成に高いご評価と製薬企業の研究者に向けたセミナー開催のご提言をいただき、それらは後半の班活動の推進方針に反映させた)。以下、中間評価の原文である。

本学術領域は、京大高橋良輔教授の強いリーダーシップの下に、脳を構成する「細胞達」の相互作用によって維持されている脳内環境が、どのようにしてニューロンの機能を発揮することを可能にしているかを解明することを通して、精神・神経疾患の病態解明や治療法の開発に資することを目指している。神経細胞内メカニズム研究グループは、細胞内の蛋白質の異常蓄積、ミトコンドリアやRNAの異常などについて、新たな破綻メカニズムを発見した。神経外環境研究グループは、ミクログリアを初めとする各グリア細胞の、脳内環境維持についての新しい関与をいくつか発見した。また、イメージング開発グループは、ミクログリア、酸化ストレスなどの可視化に成功するなど、研究の進展があった。さらに、班員間の連携も非常に多く行われており、さらなる成果が期待出来るであろう。北米神経科学会への派遣も含めて、有望な若手研究者の育成にも力を入れているが、今後もより多くの若者が育つことに期待する。成果の発信などについても、積極的に行っていることを認めるが、今後は製薬企業の研究者に向けたセミナーなども企画すると良いかも知れない。

## 10 プロモーション（昇進）の状況

本研究領域の、計画班員、公募班員のうち12名が昇進し、うち8人が教授になった。また研究代表者の属する研究室からは、総勢80人が昇任したが、うち9人が教授になり、本領域の活動が若手の育成に大きく貢献したことを伺わせる。昇任は、多数であるため、教授になったものののみ以下に示す。

漆谷 真 京都大学大学院医学系研究科・准教授から滋賀医科大学・医学部・教授  
 山中 宏二 理化学研究所脳科学総合研究センター・チームリーダーから名古屋大学・環境医学研究所・教授  
 加藤 英政 埼玉医科大学・講師から愛媛大学大学院医学系研究科・准教授  
 下川 哲昭 群馬大学大学院医学系研究科・准教授から高崎健康福祉大学・健康福祉学部・教授  
 大西 浩史 群馬大学・生体調節研究所・准教授から同大学院・保健学研究科・教授  
 富田 泰輔 東京大学大学院薬学系研究科・准教授から同薬学系研究科・教授  
 華山 力成 大阪大学免疫学フロンティア研究センター・特任准教授から金沢大学医学系・教授  
 浅沼 幹人 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科神経情報学・准教授から同研究科脳神経制御学・教授

### 研究室から

#### 高橋良輔研究室

京都大学大学院医学研究科臨床神経学・講師から和歌山県立医科大学神経内科・教授  
 同講師から同研究科人間健康科学系専攻・教授  
 同・准教授から研究科 てんかん・運動異常生理学講座・特定教授  
 同・准教授から滋賀医科大学 神経内科・教授

#### 内山 安男研究室

順天堂大学大学院医学研究科神経機能構造学・前任准教授から同大学医学研究科・教授

#### 五十嵐 道弘研究室

新潟大学医歯学系・神経生化学・准教授から愛知医科大学医学部・生物学・教授

#### 富永 真琴研究室

自然科学研究機構 生理学研究所・准教授から名古屋大学 環境医学研究所・教授

#### 平井 宏和研究室

群馬大学大学院医学系研究科 准教授から保健学研究科 教授



## 11

## 当該学問分野及び関連学問分野への貢献度

高齢化社会に突入した今日、加齢に伴う様々な疾病が急増しているが、中でも脳・神経系の破綻を原因とする老人性疾患は増加の一途を辿っている。実際、神経難病についても有病率の上昇が確実視されるなか、病気の進行に伴う生活の質の激しい低下と付随する介護費用は大きな社会問題となっている。今後予想される社会的損失を軽減させるには予防や診断法の開発が有効であることは国内外での学術的分析から指摘されている。これまでの研究を鑑みると個々の疾患、臓器、細胞へのアプローチが中心で多数の知見が集積しつつあるも、未だ十分な成果があったとは言い難い。

このような状況を踏まえると、本プロジェクト「脳内環境・恒常性維持機構とその破綻」は脳が多様な細胞群からなるコミュニティであることを前提としており、個々の神経細胞の健全性はそれを取り巻くグリア細胞・神経細胞の相互作用に由来するとし、その恒常性の維持機構とその破綻に焦点を絞った非常にユニークで時宜にかなった優れたプログラムであり、その研究成果の社会への波及効果が大きく期待される。本事業の拠点組織は、(1) 神経細胞内メカニズム：脳内環境を破綻に導く病原性神経細胞死のメカニズムの解明 (2) 神経外環境：グリア等が形成する神経細胞外環境の破綻による非細胞自律性の神経細胞死の機序とその環境破綻の空間的伝播メカニズムの解明 (3) イメージングによる脳内環境の恒常性とその破綻の解明の3課題にカテゴライズされたグループから構成されているが、相互に情報交換や技術の提携が合理的に運営され、相加的・相乗的效果を育んでいる。このような研究体制の確立と人的育成は今後の脳研究に副次的な効果をもたらすことが予想され、着実に新分野が形成されつつある。

特筆される研究成果として例を挙げると、遺伝性パーキンソン病の研究では、世界で研究が進んでいるPINK1とParkinがリン酸化を介してミトコンドリアの品質管理に関与することの解明に成功した。不良なミトコンドリアの蓄積は、細胞の機能不全を招き、癌・変性疾患など様々な病態発症の原因となる。特に、老化に伴って亢進した活性酸素の産生は、ミトコンドリアの機能異常ひいては細胞内環境に悪影響を引き起こす。従って、損傷ミトコンドリアをクリアランスして自律的なミトコンドリア増殖を促し、健全なミトコンドリアを維持する品質管理は他の疾患にも応用が可能である。さらには新規なパーキンソン病原因遺伝子CHCHD2の発見、世界初のメダカモデルの導入によってパーキンソン病の病態にオートファジーやリソソームが関与することを明らかにするなど総じてして世界を先導する研究となっている。さらに軸索輸送に伴った神経特異的な分解機構の解明、運動ニューロン疾患ではTDP-43の封入体形成メカニズムや、そのスプライシング異常が病態に関与すること、神経細胞外では活性化したアストロサイトが放出するTGF- $\beta$  1やOPNが神経の炎症を修飾しALSを進行させていることから創薬ターゲットと成りうること、臨床治療に有用な脳障害の可視化による新規画像診断法の開発などが挙げられる。そして成果の項で述べた優れた研究が、実に多くの論文として数々の上流誌に発表され、細胞生物学を始めとした生命科学諸領域の発展から難病研究に至る医学分野まで幅広い波及効果が見込まれる。今後さらに本研究の連携が合理的に機能すれば、様々な神経難病の発症機序解明と予防・治療法開発へ向けての大きく展開することが期待される。



# 研究代表者による 研究成果報告書





計画

# タンパク分解系障害による脳内環境 変調と神経変性メカニズム

(平成23年度～平成27年度)

代表 **高橋 良輔**  
分担 **漆谷 真**

京都大学・医学研究科・教授

滋賀医科大学・内科学講座神経内科・教授



## 研究の背景と目的

遺伝性神経変性疾患の主要なものは病原タンパク質の構造が変異により異常化し蓄積するコンフォメーション病である。 $\alpha$ シヌクレイン、タウ、TDP-43などが、遺伝性・孤発性疾患に共通して蓄積することが判明し、タンパク質の分解障害仮説は遺伝性・孤発性神経変性疾患に共通する有力な病態仮説である。

本研究では運動ニューロンにおけるユビキチンプロテアソーム系(UPS)の破綻をタンパク質分解障害仮説に基づく孤発性ALSのモデルとみなし、異常タンパク質の神経細胞内蓄積が如何にして脳内環境に変調を来し、神経変性に至るのか、その分子基盤を明らかにする。さらにALSの病原蛋白質の一つであるTDP-43が発症に関わる構造に転化する構造背景を明らかにし、その同定と除去によるALSの先制治療法の開発を目指した。さらにパーキンソン病研究については、そのリスク遺伝子として同定されたグルコセレブロシダーゼ(GBA)遺伝子の機能不全が脊椎動物においてパーキンソン病を再現しうるかを検証した。

## 研究成果

(1) 運動ニューロンにおけるユビキチンプロテアソーム系(UPS)の破綻をタンパク質分解障害仮説に基づく孤発性ALSのモデルとみなし、異常タンパク質の神経細胞内蓄積が如何にして脳内環境に変調を来し、神経変性に至るのか、その分子基盤を明らかにする研究を行った。

Cre-loxシステムによって、26SプロテアソームのRpt3サブユニットとオートファジーの必須分子Atg7を運動ニューロン特異的に欠損するマウスを作製したRpt3-CKO、Atg7-CKOマウス。

Rpt3-CKOマウスは進行性の四肢筋萎縮と筋力低下を呈し、ALS患者で出現する多くの封入体の出現に加え、ミクログリアやアストロサイトの病巣への集積、運動ニューロン死を伴う等ALSと類似した表現型を示すことが判明した。一方、Atg7-CKOマウスでは、ユビキチン化封入体やP62等のオートファジー関連タンパク質の蓄積を認めたものの、運動麻痺や運動ニューロン変性は全く認めず、ALS病態にはプロテアソームを

介したタンパク質分解が直接的に関与することを、動物を用いて初めて証明し、新たな孤発性ALSのモデルマウスを確立した(文献2, 4)。

(2) パーキンソン病研究については、そのリスク遺伝子として同定されたグルコセレブロシダーゼ(GBA)遺伝子のノックアウトメダカを作製・解析した。また、 $\alpha$ -syn欠失メダカを作製し、GBA欠失メダカと交配し表現型を解析した。GBA欠失メダカは2ヶ月齢で行動異常を示し、3ヵ月齢までに死亡した。脳病理では非選択的な神経細胞死とミクログリアの顕著な浸潤がみられた。また免疫染色にて脳内に $\alpha$ -synが蓄積していた。免疫電顕で、オートファゴソームが蓄積した軸索に一致して $\alpha$ -synが蓄積していることが確認できた。次に、 $\alpha$ -syn欠失( $\alpha$ -syn $^{-/-}$ )メダカをGBA変異メダカと交配し、GBA/ $\alpha$ -syn二重欠失メダカを解析したが、生存期間、神経細胞脱落の程度は変化せず、本モデルにおける $\alpha$ -syn蓄積の病態への関与は確認できなかった。一因として、GBA欠失メダカにおいてはゴーシェ病としての表現型が強く、 $\alpha$ -syn蓄積毒性が確認しにくくなっている可能性を考えた。(文献9)

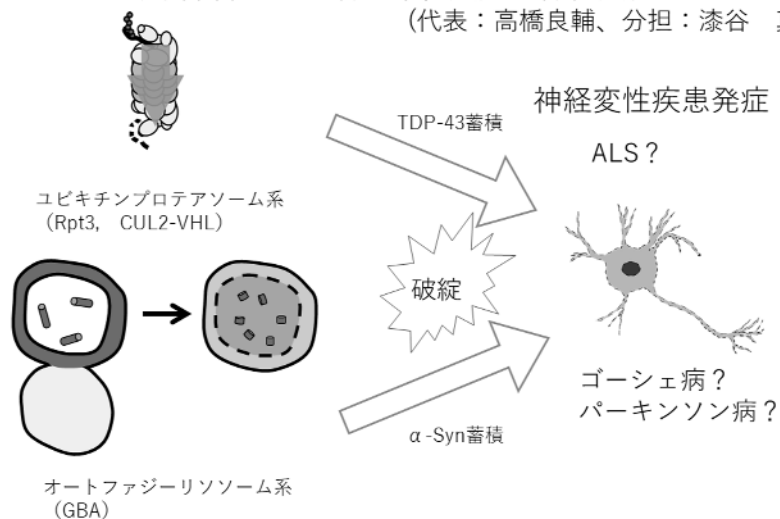
(3) TDP-43のRNA結合ドメイン(RRM1, RRM2)の構造解析により、病原構造に至る責任ドメインを明らかにし、RNA結合ドメインの特定のアミノ酸に対するモノクローナル抗体の開発に成功した(文献3))。さらにRRM1ドメインの特定の $\beta$ シート構造がストレス下のTDP-43の異常会合に寄与することを明らかにし、TDP-43病原性獲得の分子基盤である可能性を指摘しin vitroの新たなALSのモデルを確立した(文献6)。さらに我々はCUL2複合体がミスフォールドしたTDP-43のユビキチンリガーゼであり、基質認識蛋白質であるVHLがオリゴデンドロサイトのTDP-43封入体形成に関わっていることを発見した(文献10)。

## 結語

我々の研究成果は、プロテアソームとオートファジーという

## タンパク分解系障害による脳内環境変調と神経変性メカニズム

(代表：高橋良輔、分担：漆谷 真)



2つの重要な細胞内分解系が、ALSとパーキンソン病という代表的な神経変性疾患において、異なる関与をしていることを、遺伝子改変動物を用いて明確に証明した。また病原蛋白質の認識メカニズムの発見と特異抗体の開発は病原構造の除去に向けた先制治療への道を開いた。

## 主要研究成果

### 原著論文

- Okamoto Y, Ihara M, Urushitani M, Yamashita H, Kondo T, Tanigaki A, Oono M, Kawamata J, Ikemoto A, Kawamoto Y, Takahashi R, Ito H. (2012) An autopsy case of SOD1-related ALS with TDP-43 positive inclusions. *Neurology*. 77:1993-5. DOI: 10.1212/WNL.0b013e31823a0cfc. Epub 2011 Nov 16.
- Tashiro Y, Urushitani M, Inoue H, Koike M, Uchiyama Y, Komatsu M, Tanaka K, Yamazaki M, Abe M, Misawa H, Sakimura K, Ito H, Takahashi R. (2012) Motor Neuron-specific Disruption of Proteasomes, but not Autophagy, Replicates Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Biol Chem*. 287:42984-94. DOI: 10.1074/jbc.M112.417600. Epub 2012 Oct 24.
- Shodai A, Morimura T, Ido A, Uchida T, Ayaki T, Takahashi R, Kitazawa S, Suzuki S, Shirouzu M, Kigawa T, Muto Y, Yokoyama S, Takahashi R, Kitahara R, Ito H, Fujiwara N, Urushitani M. (2013) Aberrant assembly of RNA-recognition motif 1 links to pathogenic conversion of TAR DNA-binding protein-43 (TDP-43) *J Biol Chem*. 288:14886-14905. DOI:10.1074/jbc.M113.451849
- Iguchi Y, Katsuno M, Niwa J, Takagi S, Ishigaki S, Ikenaka K, Kawai K, Watanabe H, Yamanaka K, Takahashi R, Misawa H, Sasaki S, Tanaka F, Sobue G. (2013) "Loss of TDP-43 causes age-dependent progressive motor neuron degeneration. *Brain*. 136:1371-82. DOI: 10.1093/brain/awt029.
- Akizuki M, Yamashita H, Uemura K, Maruyama H, Kawakami H, Ito H, Takahashi R. (2013) Optineurin suppression causes neuronal cell death via NF- $\kappa$ B pathway. *J Neurochem*. 126:699-704. DOI: 10.1111/jnc.12326. Epub 2013 Jun 17. PMID:23721573
- Shodai A, Ido A, Fujiwara N, Ayaki T, Morimura T, Oono M, Uchida T, Takahashi R, Ito H, Urushitani M. (2012) Conserved acidic amino acid residues in a second RNA recognition motif regulate assembly and function of TDP-43. *PLoS One*. 7 (12) :e52776. DOI: 10.1371/journal.pone.0052776. Epub 2012 Dec 26.
- Oono M, Okado-Matsumoto A, Shodai A, Ido A, Ohta Y, Abe K, Ayaki T, Ito H, Takahashi R, Taniguchi N, Urushitani M. (2013) Transglutaminase 2 accelerates neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis through interaction with misfolded superoxide dismutase 1. *J Neurochem*. DOI: 10.1111/jnc.12441. [Epub ahead of print] PMID:24032595 [PubMed - as supplied by publisher]
- Kondo T, Funayama M, Tsukita K, Hotta A, Yasuda A, Nori S, Kaneko S, Nakamura M, Takahashi R, Okano H, Yamanaka S, Inoue H. (2014) Focal Transplantation of Human iPSC-Derived Glial-Rich Neural Progenitors Improves Lifespan of ALS Mice. *Stem Cell Reports*. 2014 Aug 12;3 (2): 242-9. DOI: 10.1016/j.stemcr.2014.05.017. Epub 2014 Jun 26..
- Uemura N, Koike M, Ansai S, Kinoshita M, Ishikawa-Fujiwara T, Matsui H, Naruse K, Sakamoto N, Uchiyama Y, Todo T, Takeda S, Yamakado H,

Takahashi R (2015) Viable neuronopathic Gaucher disease model in Medaka (*Oryzias latipes*) displays axonal accumulation of alpha-synuclein. *PLoS Genet.*, 2015 Apr 2; 11(4): e1005065. doi: 10.1371/journal.pgen.1005065. eCollection 2015 Apr

- Uchida T, Tamaki Y, Ayaki T, Shodai A, Kaji S, Morimura T, Banno Y, Nishitsuji K, Sakashita N, Maki T, Yamashita H, Ito H, Takahashi R, Urushitani M. (2016) CUL2-mediated clearance of misfolded TDP-43 is paradoxically affected by VHL in oligodendrocytes in ALS. *Sci Rep*. 2016 Jan 11;6:19118..

### 総説

- Matsui H, Uemura N, Yamakado H, Takeda S, Takahashi R. (2014) Exploring the pathogenetic mechanisms underlying Parkinson's disease in medaka fish. *J Parkinsons Dis*. 4(2): 301-10. DOI: 10.3233/JPD-130289



# 脳内環境における封入体形成のメカニズム

(平成23年度～平成27年度)

計画

服部 信孝

順天堂大学・神経学講座・教授



## 研究の背景と目的

パーキンソン病の約10%は遺伝性であり、その原因遺伝子がコードするタンパク質の機能解析が進んでいる。遺伝性パーキンソン病のなかでもPINK1/Parkinは協調して異常なミトコンドリアのクリアランスに関与することが判明し、その分子基盤が解明されつつある。一方、稀な遺伝性パーキンソン病に属するKufor-Rakeb syndrome (KRS) は若年発症パーキンソン病に認知症、錐体外路症状、ミオクローヌスを合併する原因不明の疾患である。2006年にATP13A2 (PARK9) が原因遺伝子として単離されたが、その機能については不明な点が多い。本研究課題は遺伝性パーキンソン病と孤発性パーキンソン病には共通の病態が存在するとの仮説のもと、原因遺伝子産物の解析から分子病態の全容を解明することを目的とする。

## 研究成果

### (1) ATP13A2 遺伝子変異と機能解析

ATP13A2はリソソームに局在し、すべての臓器にわたり広範囲に発現する一方で、その機能についてはほとんどが謎であった。しかし遺伝子の変異によって異なる局在を呈することが判明した。即ち、変異の導入によりERに留まるタイプと、従来のリソソームに局在するタイプからなる。本邦の家系から発見されたF182Lの変異体はERに留まるタイプの変異であった。常染色体劣性の遺伝形式を呈することから病態としてはLoss of functionが推測された。また、解析の一端として恒常的にATP13A2を欠損した安定細胞株を採取し解析を行ったところ神経系の細胞で脆弱性を示した。このことはATP13A2が神経において重要な機能を有していることを示唆している。

### (2) ATP13A2 ノックアウトマウスの解析

さらにATP13A2の機能を明らかにするために脳特異的に

ATP13A2を欠損するコンディショナルノックアウトマウスを作製し解析を行った。マウスは高齢化に伴い運動機能障害を呈した。リソソームの関与を検討したところ、電顕観察ではfinger printと呼ばれる膜様構造物が見られた。機能的にはリソソームの代表的な分解酵素であるカテプシンDの活性低下を認めた。ATP13A2はリソソーム膜に局在するATPaseであることからリソソームの機能維持に重要な働きをしているものと推測された。脳内にはsynucleinやミトコンドリアの構成成分であるサブユニットCが蓄積しており、カテプシンDの活性低下を含めたリソソームの機能不全がパーキンソン病に見られるタンパク質の蓄積と封入体形成に関与していることを見出した (Am. J. Pathol. 2016)。

(下図参照)

### (3) ミトコンドリア品質管理の分子機構の解明

遺伝性パーキンソン病の病態にオートファジー誘導不全による異常ミトコンドリアの蓄積が病態として急速な展開を遂げつつあり、ミトコンドリア分解機構の破綻が神経変性において重要な要因となってきた。Parkinは膜電位の低下した損傷ミトコンドリアをオートファジーの発動によって分解し、細胞内の環境維持に貢献している。ミトファジーが誘導されるための分子機構、すなわちParkinが損傷ミトコンドリアを認識する際に膜電位依存的にPINK1がParkinのUblドメイン (Ser65) をリン酸化することがミトコンドリア分解の契機になることを明らかにした (Sci. Rep. 2012)。

### (4) パーキンソン病の新規原因遺伝子の同定

遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子としてCHCHD2遺伝子変異 (T61I, R145Q) を本邦の常染色体優性遺伝形式を呈する4家系から同定した。CHCHD2は151アミノ酸からなるタ

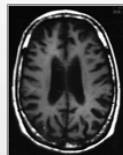
## 若年発症パーキンソン病(PARK9)の原因はリソソームの機能不全にある(1)

ATP13A2の変異はリソソーム機能不全を引き起こす

< PARK9の家系は本邦にも存在する >

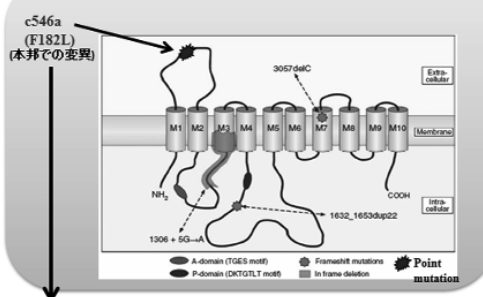
- 1) 若年発症のパーキンソン病
- 2) 認知症、精神症状を合併する
- 3) ATP13A2が原因遺伝子

< 進行期患者のBrain MRI >

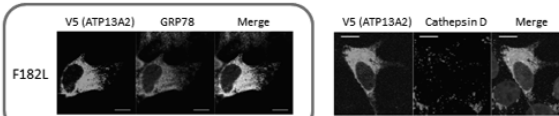


広範囲な脳萎縮を認める

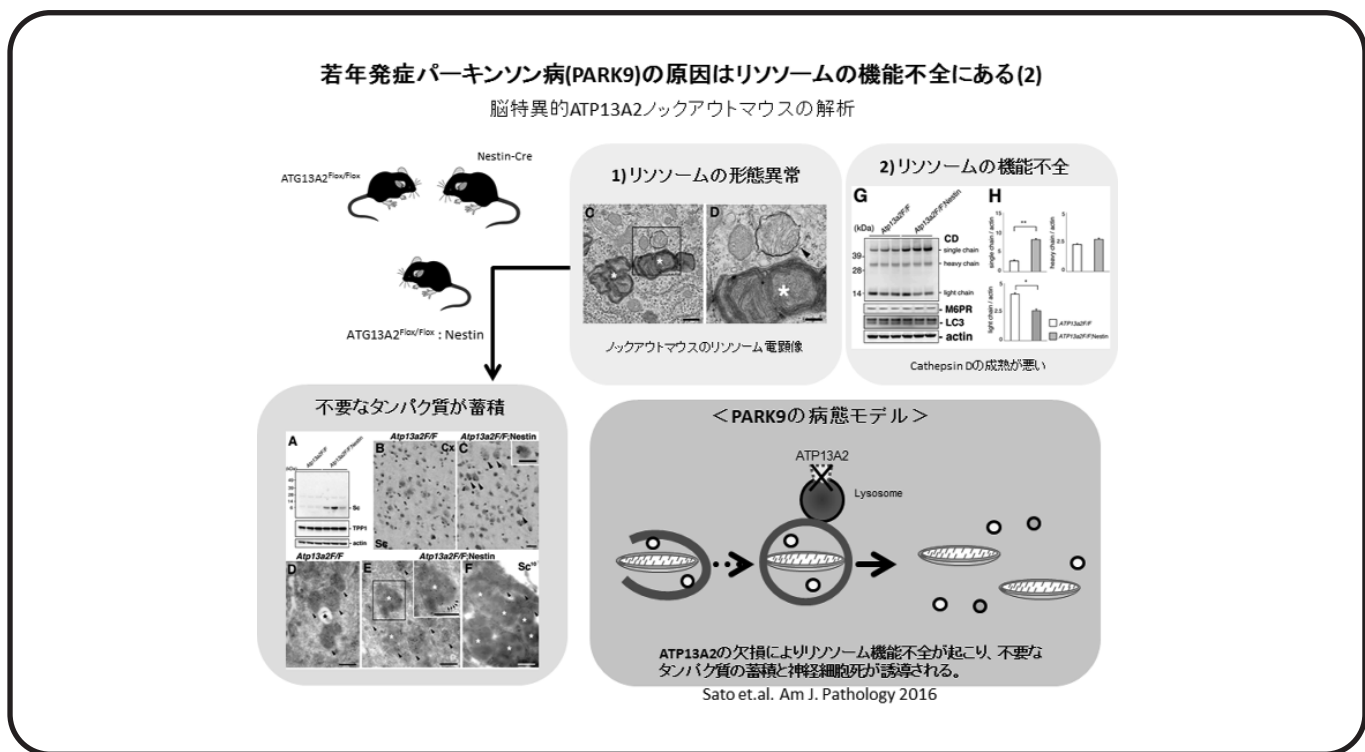
< ATP13A2はリソソームに局在するタンパク質 >



変異体はリソソームに局在できずに本来の機能が果たせない



変異体は小胞体に局在



ンパク質で、N末にミトコンドリア移行シグナル、C末にcoiled-coil domain (CHCHD) という構造モチーフを有する。その局在はミトコンドリアが有力であり、機能については現在解析中である (Lancet Neurol. 2015)。

## 結語

本邦にもPARK9家系が存在し、その変異を含めた機能解析からATP13A2変異はリソソームの機能障害を引き起こすことが判明した。また、PARK22 (CHCHD2が原因遺伝子) についてはミトコンドリアへの関与が強く示唆され興味深い。若年発症遺伝性パーキンソン病の病態の一端が明らかになるにつれオートファジーリソソーム系の破綻と不良ミトコンドリアの関与が病態として浮かび上がってきた。

## 主要研究成果 原著論文

1. T, Uchiyama Y, Hattori N. Lysosomal Storage of Subunit c of Mitochondrial ATP Synthase in Brain-Specific Atp13a2-Deficient Mice. **Am J Pathol.** 186: 3074-3082 (2016)
2. Matsumoto T, Fujimori K, Andoh-Noda T, Ando T, Kuzumaki N, Toyoshima M, Tada H, Imaizumi K, Ishikawa M, Yamaguchi R, Isoda M, Zhou Z, Sato S, Kobayashi T, Ohtaka M, Nishimura K, Kurosawa H, Yoshikawa T, Takahashi T, Nakanishi M, Ohyama M, Hattori N, Akamatsu W, Okano H. Functional Neurons Generated from T Cell-Derived Induced Pluripotent Stem Cells for Neurological Disease Modeling. **Stem Cell Reports.** 6: 422-35 (2016)
3. Funayama M, Ohe K, Amo T, Furuya N, Yamaguchi J, Saiki S, Li Y, Ogaki K, Ando M, Yoshino H, Tomiyama H, Nishioka K, Hasegawa K, Saiki H, Satake W, Mogushi K, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Toda T, Mizuno Y, Uchiyama Y, Ohno K, Hattori N. CHCHD2 mutations in autosomal dominant late-onset Parkinson's disease: a genome-wide linkage and sequencing study. **Lancet Neurol.** 14: 274-82 (2015)
4. Maraschi A, Ciammola A, Folci A, Sassone F, Ronzitti G, Cappelletti G, Silani V, Sato S, Hattori N, Mazzanti M,

Chieragatti E, Mulle C, Passafaro M, Sassone J. Parkin regulates kainate receptors by interacting with the GluK2 subunit. **Nat Commun.** 5: 5182 (2014)

5. Amo T, Saiki S, Sawayama T, Sato S, Hattori N. Detailed analysis of mitochondrial respiratory chain defects caused by loss of PINK1. **Neurosci Lett.** 580: 37-40 (2014)
6. Furuya N, Ikeda S, Sato S, Soma S, Ezaki J, Oliva Trejo JA, Takeda-Ezaki M, Fujimura T, Arikawa-Hirasawa E, Tada N, Komatsu M, Tanaka K, Kominami E, Hattori N, Ueno T. PARK2/Parkin-mediated mitochondrial clearance contributes to proteasome activation during slow-twitch muscle atrophy via NFE2L1 nuclear translocation. **Autophagy** 10: 631-41 (2014)
7. Matsui H, Sato F, Sato S, Koike M, Taruno Y, Saiki S, Funayama M, Ito H, Taniguchi Y, Uemura N, Toyoda A, Sakaki Y, Takeda S, Uchiyama Y, Hattori N, Takahashi R. ATP13A2 deficiency induces a decrease in cathepsin D activity, fingerprint-like inclusion body formation, and selective degeneration of dopaminergic neurons. **FEBS Lett.** 587: 1316-25 (2013)
8. Shiba-Fukushima K, Imai Y, Yoshida S, Ishihama Y, Kanao T, Sato S, Hattori N. PINK1-mediated phosphorylation of the Parkin ubiquitin-like domain primes mitochondrial translocation of Parkin and regulates mitophagy. **Sci Rep.** 2: 1002 (2012)

## 総説

1. Hattori N. Movement disorders: advances in 2015. **Lancet Neurol.** 15: 8-9 (2016)



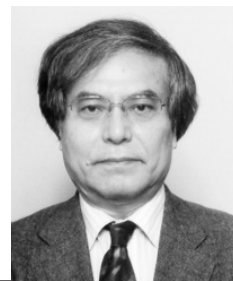
# 神経軸索におけるタンパク質分解機構とその破綻

(平成23年度～平成27年度)

計画

内山 安男

順天堂大学・大学院医学研究科・特任教授



## 研究の背景と目的

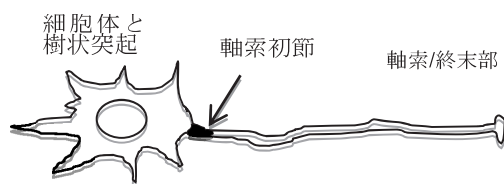
オートファジーとは古くなって不要な細胞の構成要素を一部の細胞質と共に小胞様構造の隔離膜によって包み込み（オートファゴソームの形成）、リソソームの酵素を受けて分解する機構である。神経軸索の主要な役割は興奮の伝達であり、終末部で伝達物質を放出して、シナプス後膜に興奮を伝達する。興味あることに、興奮を伝える側と受ける側のタンパク質代謝に関する環境は大きく異なるが、その詳細は不明な点が多い。軸索/シナプス前領域は、非常に限られた空間の中で起こる物質代謝、特に、必要な物質の供給と不要な物質の排出によって恒常性の維持がなされている。タンパク質代謝を考えると、軸索/シナプス前領域は、オートファゴソームの形成についても不明な点が多い。この恒常性が障害されると、軸索変性と神経変性のトリガーとなり、脳内環境の破綻につながると想定されることから、これらの実態と調節機構の分子レベルにおける解析は、脳内環境の品質管理を知る上で重要である。

本研究の目的は、1) 非常に限定された空間である軸索/シナプス前領域におけるオートファゴソームの形成機構の解析、2) オートファゴソームに取り込まれた不要な物質が、軸索内でリソソーム酵素による分解を受けるのか、あるいは細胞体に逆行輸送された後に分解されるのか、3) 軸索/シナプス前領域における、正常と異常なオートファゴソーム形成などについて解析する。このため本研究では、Atg9Aのノックアウト(KO) マウスやノックインマウスを作成し、また、カテプシンDKO マウス、Atg7KO マウスを用いて生化学的・神経細胞生物学的に検討した。

## 研究成果

### (1) カテプシンD (CD) 欠損マウスの解析

CDを欠損するマウスは、CDの基質であるミトコンドリアATP合成酵素のサブユニットcを蓄えた異常なリソソーム (granular osmiophilic deposits, GROD) やオートファゴソームが神経細胞に蓄積する。このマウスの表現型はヒトの神経性セロイドリポフスチ蓄積症 (neuronal ceroid-lipofuscinosis, NCL) に類似し、そのモデルマウスとして知られる。マウスモデルの発見後、6年してヒトでも見いだされ、CDは10番目の原因遺伝子CLN10とされた。蓄積するオートファゴソームには異常なリソソーム (GROD) が取り込まれている。オートファゴソーム形成を、Atg7を欠損するマウスと掛け合わせることで抑制すると、オートファゴソームは消失し、



細胞体内のリソソーム系のタンパク質分解はバルクおよび選択的オートファジーによる  
p62/NBR1は軸索初節を超えて軸索に入れない

物質の処理はバルクオートファジーによる。オートファゴソームは逆行性に細胞体に輸送され、リソソームと癒合して分解される

GRODの数も有意に減少した。

### (2) p62とNBR1の局在

CD欠損マウス脳、CDとAtg7のダブルKOマウス脳、野生型マウス脳より得た抽出液を可溶性分画と不溶性分画に分けてwestern blotし、p62、NBR1、optineurin、NDP52、ubiquitin、LC3の変化を検討した。LC3は、CDKO脳で、特に不溶性分画でLC3-IIが増加した。Atg7KO脳では、LC3のII型への変換は起こらない。ubiquitin、p62とNBR1は不溶性分画で増加したが、optineurinやNDP52は可溶性に多く、KO脳と野生型で量的な差は認められなかった。

NBR1、p62、ubiquitinをCDKO脳で免疫染色して調べたところ、細胞体ではubiquitin陽性の顆粒にp62/NBR1も局在したが、軸索や神経終末部では、ubiquitinは陽性であったが、p62/NBR1のシグナルは認められなかった。細胞体での局在にはLC3も共存した。免疫電顕法を用いてp62/NBR1/ubiquitinの局在をCDKOニューロンで解析したところ、GRODの膜表面にp62とubiquitin、NBR1とubiquitinが局在することが分かった。この局在は、CDKOのみならず、オートファジーのできないCD-/-Atg7-/-ニューロンでも同様にGRODの膜表面にp62/NBR1/ubiquitinが局在することが明らかとなった。

### (3) 初代培養大脳皮質神経細胞(PCN)を用いたp62/NBR1の局在の検証

初代培養大脳皮質神経細胞(PCN)でp62/NBR1の局在をみると、軸索初節を超えて抹消には局在しない。この機構を調べてみるとp62もNBR1もC末端領域に細胞体への局在に必要な領域があることが分かった。この領域を使って、これらタンパク質はホモあるいはヘテロオリゴマーを形成する。これら領域を欠損させると、これらタンパク質は軸索の抹消まで侵入する。軸索が伸びる細い溝のついたmicrofluid chamberを用いてPCNを2週間培養して、軸索や終末部でのリソソーム (ライソトラッカーやカテプシンD陽性顆粒) の局在を調べたが、全く局在しないことが分かった。即ち、これらの結果は、軸索ではバルクオートファジーによってオートファゴソームが形成され、逆行性に細胞体まで運ばれて、リソソームと結合して分解が始まることを示している。

### (4) ATG9Aの役割

ATG9Aは、オートファジー関連因子の中で唯一膜タンパク質で、前期オートファジー過程に関与する因子である。Atg9aを中枢神経特異的に欠損させると、メンデルの法則に従って生まれるが、生後1週までの間に約半数が死に至る。生後2週になると、けいれん発作やrotarodへの滞留時間が有意に減少した。体重はこの時期から増加せず、全ての新生仔が死に至る生後28日まで、体重曲線は平坦なままであった。細胞体には、早期からp62/NBR1/ubiquitin陽性顆粒が光顕的にも電顕的にも認められた。この顆粒が2週を過ぎると減少し、western blotで解析しても、有意に減ることが分かった。しかし、軸索・終末部では異常な膜系が沈着し、軸索の拡大、終末部の拡大が起きるとともに、光顕的にはスポンジ様変性を示すことが分かった。生後4週になると協調運動失調、けいれん発作が見られ、死に至ることが分かった。また、脳梁や前交連線維形成



不全が認められ、Atg9a欠損PCNは突起の身長が不良であった。

5. 内山安男、小池正人「リソソームプロテアーゼの多様性とその病態生理学的役割」実験医学増刊号29(12): 1903-1908; 2011

## 結語

本研究では、神経軸索や終末部におけるオートファジー・リソソーム系の正常と異常について解析し、細胞体では体細胞と同様にバルクおよび選択的オートファジーが働き、軸索・終末部ではバルクオートファジーにより不要な物質をオートファゴソームに取り込み逆行性に細胞体に輸送して、リソソームと癒合して分解処理する。この破綻によって、細胞体と軸索では異なる変化を呈して死に至る。

## 主要研究成果

### 原著論文

1. Sunabori T, Koike M, Asari A, Oonuki Y, Uchiyama Y (2016) Suppression of ischemia-induced hippocampal pyramidal neuron death by hyaluronan tetrasaccharide through inhibition of toll-like receptor 2 signaling pathway. *Am J Pathol* 186: 2143-2151
2. Sato S, Koike M, Funayama F, Ezaki J, Fukuda T, Uenn T, Uchiyama U, Hattori N (2016) Lysosomal storage of subunit c of mitochondrial ATP synthase in brain-specific Atp13a2-deficient mice. *Am J Pathol* 186: 3074-3082
3. Furuta A, Kikuchi H, Fujita H, Yamada D, Fujiwara Y, Kabuta T, Nishino I, Wada K, Uchiyama Y (2015) Property of Lysosomal Storage Disease associated with Midbrain Pathology in the CNS of LAMP-2-deficient Mice. *Am J Pathol* 185: 1713-1723, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.02.015>
4. Tanida I, Ueno T, Uchiyama Y (2015) A Super-Ecliptic, pHluorin-mKate2, Tandem Fluorescent Protein-Tagged Human LC3 for the Monitoring of Mammalian Autophagy. *PLoS ONE* 9: e110600. doi: 10.1371/journal.pone.0110600
5. Koike M, Tanida I, Nanao N, Tada N, Iwata J, Ueno T, Kominami E, Uchiyama Y (2013) Enrichment of GABARAP relative to LC3 in the axonal initial segments of neurons. *PLoS One* 8:e63568 (\*equally contributed)
6. Ohkouchi S, Shibata M, Sasaki M, Koike M, Safig P, Peters C, Nagata S, Uchiyama Y (2013) Biogenesis and proteolytic processing of lysosomal DNase II. *PLoS One*, 8: e59148

## 総説

1. 内山安男 (2014) 「神経系におけるオートファジー・リソソーム系を介するタンパク質分解とその破綻」脳内環境?維持機構と破綻がもたらす疾患研究 (高橋良輔他編集) メディカルドゥ 第1章 pp 37-42
2. Uchiyama Y, Kominami E (2013) Autophagy regulates lipid droplet formation and adipogenesis. In: *Lipid metabolism*. Ed by Rodrigo Valenzuela Baez. InTech, Chapter 7, pp149-162
3. Komatsu M, Koike M, Ichimura Y, Uchiyama Y (2012) Genetic mouse models for elucidation of autophagy-lysosomal systems in neurons under physiologic and pathologic conditions. In Ed. Zhenyu yue, Charleen T Chu: *Autophagy of the nervous system? Cellular self-digestion in neurons and neurological diseases*. World Scientific, Chapter 8, pp175-204
4. 内山安男、小池正人「リソソーム内の分解機構」オートファジー 生命をささえる細胞の自己分解システム (水島昇・吉森保編集) (化学同人), 67-76, 2012



# 神経細胞における RNA 障害と脳内環境の関連研究

(平成23年度～平成27年度)

計画

内匠 透

理化学研究所・脳科学総合研究センター・シニアチームリーダー



## 研究の背景と目的

研究代表者らは統合失調症の薬理モデルマウスの解析の中で RNA 結合タンパク質である TLS/FUS (Translocated in liposarcoma / Fused in sarcoma) を同定し、神経細胞、特に樹状突起における機能解析を行ってきた。TLS はアミノ酸 526 残基の DNA/RNA 結合蛋白質であり、主に核内に存在するが、細胞質内でも行き来している。TLS は mRNA の転写、mRNA のスプライシング、核外への RNA の輸送などを含め、非常に多彩な作用を持つことが知られている。

研究代表者らは、TLS が神経細胞において核のみならず樹状突起シャフト及びスパインに存在し、スパインの形態形成に重要なこと、グルタミン酸シグナル依存的に樹状突起からスパインに移行すること、またスパイン形態に関与する mRNA を運搬し、それらの輸送にはアクチンモーターである myosin-Va が関与することなどを明らかにしてきた。

2009年に TLS/FUS が筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因遺伝子であることが報告された後、世界中で TLS の研究が盛んになったが、応募者らはそれ以前から TLS の神経系での機能解析に取り組む世界で唯一の独自グループである。DNA/RNA 結合タンパク質 TDP-43 も同様に ALS の原因遺伝子であることを考えると RNA プロセッシングと神経変性の関係の新しいパラダイムが考察される。

TLS/FUS は ALS の原因遺伝子の一つであり、その機能として mRNA のスプライシングを調節することなどが知られているが、ALS の発症メカニズムは明らかになっていない。

TLS ノックアウトマウス (KO) 脳におけるスプライシングの変化を網羅的に探索するとともに、その変化を受ける標的と TLS 及び神経変性との関連を解析することを目的とする。

## 研究成果

### (1) TLS のスプライシングターゲットの同定

TLS knockout (KO) マウス脳におけるスプライシングの変化を網羅的に同定した。

### (2) TLS のスプライシングターゲット Mena と TLS の関連解明

TLS KO マウス脳あるいは TLS KO MEF では、TLS WT と比較して RT-PCR で Mena insert の発現が有意に増加していた。

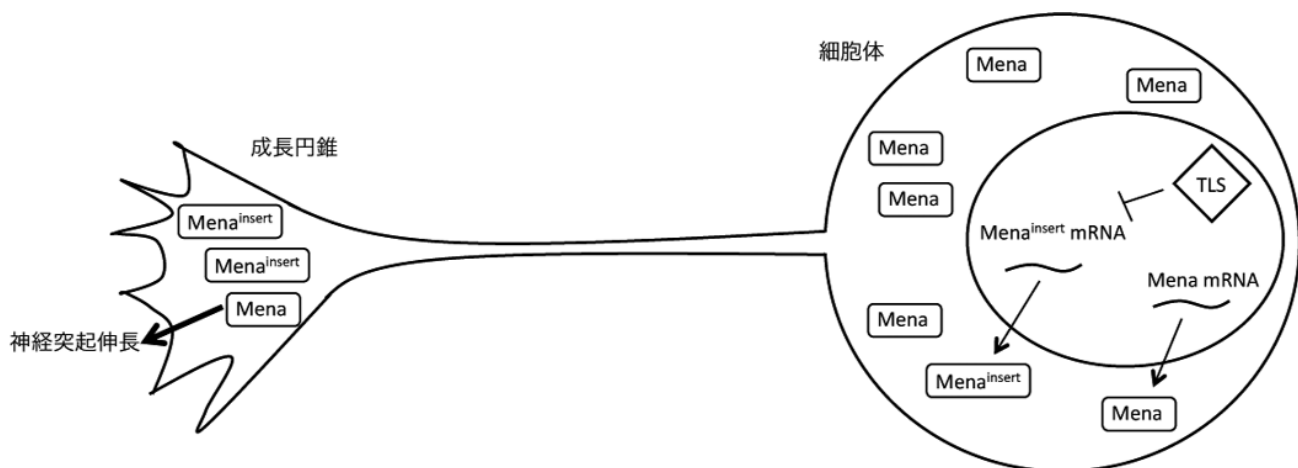
Mena と Mena insert の細胞内局在に関して、TLS WT MEF と比較して TLS KO では、Mena の filopodia などへの集積が目立たなくなるのに対して、Mena insert の集積は TLS KO でも WT と変わらず同等だった。EVH2 ドメインのみのトランスフェクション実験では、TLS WT, KO に因らず、Mena (EVH2) よりも Mena (EVH2) insert で filopodia などへの集積が目立つ結果を示した。これらの結果から、Mena の正常な細胞内局在には TLS が必要であること、及び EVH2 ドメインへの spliced insertion が filopodia などへの集積を促進していることが示唆された。

MEF の運動能を解析した実験では、TLS WT ではコントロールに比べて Mena, Mena insert いずれのトランスフェクションでも運動能を低下させる作用が認められたが、TLS KO では Mena は運動能に影響を与えず、Mena insert のみが運動能を低下させた。この結果から、細胞内局在だけでなく、Mena の細胞運動抑制作用にも TLS が必要であることが示唆された。

神経細胞における細胞内局在に関して、TLS の有無に関わらず、Mena よりも Mena insert で突起先端部への集積が目立つ結果を示した。また、神経突起の伸長に関しては、Mena は TLS WT において突起伸長を促進させる傾向が見られたが、TLS KO では有意な差は認めなかった。この結果から Mena の神経突起伸長作用にも TLS が関与している可能性が示唆された。

## 結語

本研究では、TLS 変異によって RNA スプライシング異常を受ける標的 RNA を網羅的に同定した。また、そのうちのひとつ Mena に関して、細胞生物学的、生化学的解析を行う事により、



細胞骨格アクチンとの関係を明らかにした。

## 主要研究成果

### 原著論文

1. Sugiura T, Matsuda S, Kurosaka S, Nakai N, Fukumoto K, Takahashi T, Maruyama H, Imaizumi K, Matsumoto M, Takumi T. Translocated in liposarcoma regulates the distribution and function of mammalian enabled, a modulator of actin dynamics. **FEBS J** 283: 1475-1487, (2016).
2. Kino Y, Washizu C, Kurosawa M, Yamada M, Doi H, Takumi T, Adachi H, Katsuno M, Sobue G, Hicks GG, Hattori N, Shimogori T, Nukina N. FUS/TLS acts an aggregation-dependent modifier of polyglutamine disease model mice. **Sci Rep** 6: 35236, (2016).
3. West JA, Mito M, Kurosaka S, Takumi T, Tanegashima C, Chujo T, Yanaka K, Kingston RE, Hirose T, Bond C, Fox A, Nakagawa S. Structural, super-resolution microscopy analysis of paraspeckle nuclear body organization. **J Cell Biol** 241: 817-830, (2016).
4. Katayama Y, Nishiyama M, Shoji H, Ohkawa Y, Kawamura A, Sato T, Suyama M, Takumi T, Miyakawa T, Nakayama KI. CHD8 haplosufficiency results in autistic-like phenotypes in mice. **Nature** 537: 675-679, (2016).
5. Liu X, Homma A, Sayadi J, Yang S, Ohashi J, Takumi T. Sequence features associated with the cleavage efficiency of CRISPR/Cas9 system. **Sci Rep** 6: 19675, (2016).
6. Liu X, Tamada K, Kishimoto R, Okubo H, Ise S, Ohta H, Ruf S, Nakatani J, Kohno N, Spitz F, Takumi T. Transcriptome profiling of white adipose tissue in a mouse model for 15q duplication syndrome. **Genom Data** 5: 394-396, (2015).
7. Tanoue S, Fujimoto K, Myung J, Hatanaka F, Kato Y, Takumi T. DEC2-E4BP4 heterodimer represses the transcriptional enhancer activity of the EE element in the Per2 promoter. **Front Neurol** 6: 166, (2015).
8. Myung J, Hong S, DeWoskin D, De Schutter E, Forger DB, Takumi T. GABA-mediated repulsive coupling between circadian clock neurons in the SCN encodes seasonal time. **Proc Natl Acad Sci U S A** 112: E3920-3929, (2015).
9. Kishimoto R, Tamada K, Liu X, Okubo H, Ise S, Ohta H, Ruf S, Nakatani J, Kohno N, Spitz F, Takumi T. Model mice for 15q11-13 duplication syndrome exhibit late-onset obesity and altered lipid metabolism. **Hum Mol Genet** 24: 4559-4572, (2015).
10. Kino Y, Washizu C, Kurosawa M, Yamada M, Miyazaki H, Akagi T, Hashikawa T, Doi H, Takumi T, Hicks GG, Hattori N, Shimogori T, Nukina N. FUS/TLS deficiency causes behavioral and pathological abnormalities distinct from amyotrophic lateral sclerosis. **Acta Neuropathol Commun** 3: 24, (2015).
11. Piochon C, Kloth AD, Grasselli G, Titley HK, Nakayama H, Hashimoto K, Wan V, Simmons DH, Eissa T, Nakatani J, Cherskov A, Miyazaki T, Watanabe M, Takumi T, Kano M, Wang SS, Hansel C. Cerebellar plasticity and motor learning deficits in a copy-number variation mouse model of autism. **Nat Commun** 6: 6014, (2014).
12. Isshiki M, Tanaka S, Kuriu T, Tabuchi K, Takumi T, Okabe S. Enhanced synapse remodeling as a common phenotype in mouse models of autism. **Nat Commun** 5: 4742, (2014).
13. Goriki A, Hatanaka F, Myung J, Kim JK, Yoritaka T, Tanoue S, Abe T, Kiyonari H, Fujimoto K, Kato Y, Todo T, Matsubara A, Forger D, Takumi T. A novel protein, CHRONO, functions as a core component of the mammalian circadian clock. **PLoS Biol** 12: e1001839, (2014).
14. Matsumura R, Matsubara C, Node K, Takumi T, Akashi M. Nuclear receptor-mediated cell-autonomous oscillatory expression of the circadian transcription factor, neuronal PAS domain protein 2 (NPAS2). **J Biol Chem** 288: 36548-36553, (2013).
15. Nalavadi VC, Griffin LE, Picard-Fraser P, Swanson AM, Takumi T, Bassell GJ. Regulation of zipcode binding protein 1 transport dynamics in axons by myosin Va. **J Neurosci** 32: 15133-15141, (2012).
16. Rogelj B, Easton LE, Bogu GK, Stanton LW, Rot G, Curk T, Zupan B, Sugimoto Y, Modic M, Haberman N, Tollervey J, Fujii R, Takumi T, Shaw CE, Ule J. Widespread binding of FUS along nascent RNA regulates alternative splicing in the brain. **Sci Rep** 2: 603, (2012).
17. Myung J, Hong S, Hatanaka F, Nakajima Y, De Schutter E, Takumi T. Period coding of Bmal1 oscillators in the suprachiasmatic nucleus. **J Neurosci** 32: 8900-8918, (2012).

### 総説

1. Nakai N, Otsuka S, Myung J, Takumi T. Autism spectrum disorder model mice: Focus on copy number variation and epigenetics. **Sci China Life Sci** 58: 976-984, (2015).
2. Liu X, Takumi T. Genomic and genetic aspects of autism spectrum disorder. **Biochem Biophys Res Commun** 452: 244-53, (2014).
3. Nomura J, Takumi T. Animal models of psychiatric disorders that reflect human copy number variation. **Neural Plast** 2012: 589524, (2012).
4. Takumi T. The neurobiology of mouse models syntenic to human chromosome 15q. **J Neurodev Disord** 3: 270-281, (2011).

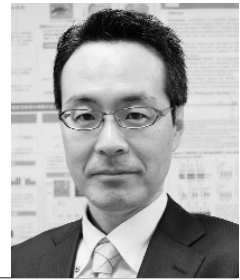


計画

## 脊髄環境の恒常性維持とその破綻：グリアー神経連関からみた神経変性機序の解明

(平成23年度～平成27年度)

代表 **山中 宏二** 名古屋大学・環境医学研究所・教授  
 分担 **三澤 日出巳** 慶應義塾大学・薬学部・教授



### 研究の背景と目的

運動神経の細胞死を特徴とする神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症(ALS)に関する最近の研究などを通じて、神経変性の過程で活性化し、細胞傷害性サイトカインなどの異常放出を引き起こすグリア細胞は、神経疾患の病態に積極的に関与する細胞群として注目されている。本研究では、1) 神経変性におけるグリア細胞の認識・応答機構の解明、2) グリア応答調節を標的とした神経変性制御法の開発、の研究目標を掲げ、ALSにおける運動神経周囲の細胞環境の制御に関わる鍵分子やシグナル経路を明らかにすることを通じて、脳内環境という視点から神経変性疾患の病態解明を目指すことを目的とする。

### 研究成果

(1) ALSにおける自然免疫経路の関与：Toll様受容体のアダプター分子であるMyD88, TRIF経路のALS病態への関与についてSOD1マウスを用いて検討した。MyD88欠失SOD1G93A, TRIF欠失SOD1G93A, SOD1G93Aマウスの発症、生存期間を比較したところ、MyD88欠失はSOD1G93Aマウスの発症時期、生存期間に有意な変化を来さなかったが、TRIF欠失SOD1G93Aマウスは、SOD1G93Aマウスと比較して、発症時期は不変であったが、罹病期間が約50%短縮し、疾患進行の著しい加速と生存期間の著明な短縮が見られた。そこで、SOD1G93A/TRIFマウスの脊髄における発現分子、グリア、免疫細胞のプロファイルと比較解析した。TRIF欠失により、CD8T細胞、NK細胞、ナチュラルキラーT細胞などの細胞性免疫を担う免疫細胞の脊髄内浸潤の顕著な低下とケモカインの発現低下を認めた。また、TRIF欠損ALSマウス脊髄においてNox2の発現が上昇し異常な形態を持つアストロサイトが増加していることを見いだした。グリア細胞におけるTRIF依存性シグナルは、ケモカインの産生誘導、細胞性免疫担当細胞の脊髄内浸潤を調節し、グリア細胞の機能維持を通じて脊髄内環境を神経保護的に維持している可能性が考

えられた(投稿中)。

### (2) TGF-β 1のグリア応答に関する役割：

TGF-β 1 (Transforming Growth Factor-β 1)は、免疫系細胞の抑制作用や神経保護作用を有する多機能性サイトカインであり、孤発性ALS患者の脳脊髄液中上昇することが報告されている。SOD1-ALSマウスや孤発性ALS患者の脊髄組織における発現を検討した結果、アストロサイトにおいてTGF-β 1の発現の上昇を認めた。そこで、アストロサイト特異的にTGF-β 1を過剰発現するALSマウスを作製して発症時期や罹病期間への効果を検討したところ、疾患進行が加速し生存期間が約10日短縮した。その病態機序を免疫組織染色、フローサイトメトリーで検討したところ、病巣におけるミクログリアの活性低下および浸潤T細胞数減少をきたし、変性運動ニューロンに対する保護作用が減弱したことが考えられた。さらに実験的治療として、ALSマウスにTGF-βシグナル阻害剤を発症後より投与するとマウスの生存期間が延長した。本研究を通じて、グリア細胞を標的とするALSの疾患進行を遅延させる治療法開発が期待される(Endo et al., Cell Rep, 2015)。

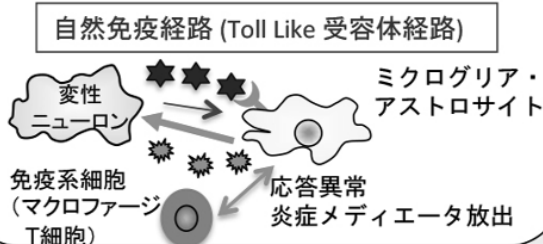
### (3) ALS運動神経の選択的脆弱性へのオステオポンチンの関与：

オステオポンチン(OPN)はALS抵抗性のスロー運動神経(MN)サブタイプ(FR/S)に発現し、病態進行に伴い細胞外に放出され、ECMに蓄積した。FR/S MNは、ALSの病態初期(第1波神経変性)にdenervationするファーストMN(FF)を代償し、本来FF MNが投射しているType IIb筋線維にリモデリング・シナプス再結合する。このときOPNは受容体を介してMMP-9の発現を誘導・活性化し、FR/S MNを脆弱化させることでALSにおける第2波の神経変性に関与することを見出した(Morisaki et al., Sci Rep, 2016)。

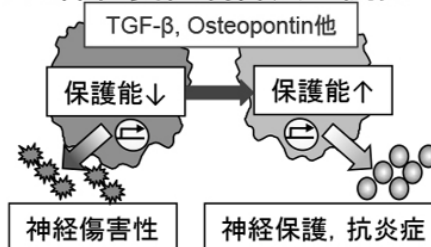
## 脊髄環境の恒常性維持とその破綻：グリアー神経連関からみた神経変性機序の解明

(代表：山中宏二，分担：三澤日出巳)

### 1. 神経変性におけるグリア細胞の認識・応答機構の解明



### 2. グリア応答調節を標的とした神経変性制御法の開発



グリア細胞応答から脳内環境の恒常性維持・破綻機構の解明と制御へ

(4) **運動神経内における病態メカニズムの解明**：領域内共同研究を通じて、ALSにおけるスプラインソーム異常 (Tsuiji et al. *EMBO Mol Med*, 2013) や、小胞体・ミトコンドリア膜間領域の異常 (Watanabe et al. *EMBO Mol Med*, 2016) などの分子病態を見いだした。

#### 結語

神経変性疾患のなかで特にALSの細胞群特異的な病態解明に注力して、アストロサイトやミクログリアといったグリア細胞における病態増悪因子やシグナル経路を見いだした。さらに、その実験的制御法の開発も行うことができた。また、領域内共同研究を通じて、運動神経の恒常性維持とその破綻に関する主要な因子を同定し、本研究班の目的である、神経変性疾患にける脳内環境の恒常性破綻メカニズムの解明に迫ることができた。

#### 主要研究成果

##### 原著論文

1. Watanabe S, Ilieva H, Tamada H, Nomura H, Komine O, Endo F, Jin S, Mancias P, Kiyama H, Yamanaka K. Mitochondria-associated membrane collapse is a common pathomechanism in SIGMAR1- and SOD1-linked ALS. *EMBO Mol Med* 8:1421-1437, (2016).
2. Morisaki Y, Niikura M, Watanabe M, Onishi K, Tanabe S, Moriwaki Y, Okuda T, Ohara S, Murayama S, Takao M, Uchida S, Yamanaka K, Misawa H. Selective Expression of Osteopontin in ALS-resistant Motor Neurons is a Critical Determinant of Late Phase Neurodegeneration Mediated by Matrix Metalloproteinase-9. *Sci Rep* 6: 27354, (2016).
3. Lasiene J, Komine O, Fujimori-Tonou N, Powers B, Endo F, Watanabe S, Jin S, Ravits J, Horner P, Misawa H, Yamanaka K. Neuregulin 1 confers neuroprotection in SOD1-linked amyotrophic lateral sclerosis mice via restoration of C-boutons of spinal motor neurons. *Acta Neuropathol Commun* 4: 15 (2016).
4. Chhangani D, Endo F, Amanullah A, Upadhyay A, Watanabe S, Mishra R, Yamanaka K, Mishra A. Mahogunin ring finger 1 confers cytoprotection against mutant SOD1 aggresomes and is defective in an ALS mouse model. *Neurobiol Dis* 86:16-28, (2016).
5. Endo F, Komine O, Fujimori-Tonou N, Katsuno M, Jin S, Watanabe S, Sobue G, Dezawa M, Wyss-Coray T, Yamanaka K. Astrocyte-derived TGF- $\beta$ 1 accelerates disease progression in ALS mice by interfering with the neuroprotective functions of microglia and T cells. *Cell Rep*, 11:592-604 (2015).
6. Watanabe S, Hayakawa T, Wakasugi K, Yamanaka K. Cystatin C protects neuronal cells against mutant copper-zinc superoxide dismutase- mediated toxicity. *Cell Death Dis* 5: e1497 (2014).
7. Watanabe S, Ageta-Ishihara N, Nagatsu S, Takao K, Miyakawa T, Misawa H, Takahashi R, Kinoshita M, Yamanaka K. SIRT1 overexpression ameliorates a mouse model of SOD1-linked amyotrophic lateral sclerosis via HSF1/HSP70i chaperone system. *Molecular Brain* 7: 62, (2014).
8. Austin JA, Wright GSA, Watanabe S, Grossmann JG, Antonyuk SV, Yamanaka K, Hasnain SS. Aggregation resistant TDP-43 RRM domain disease mutants have increased stability and half-life. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 111: 4309-14, (2014).
9. Iguchi Y, Katsuno M, Niwa JI, Takagi S, Ishigaki S, Ikenaka K, Kawai K, Watanabe H, Yamanaka K, Takahashi R, Misawa H, Sasaki S, Tanaka F, Sobue G. Loss of TDP-43 causes age-dependent progressive motor neuron degeneration. *Brain* 136: 1371-1382, (2013).
10. Tsuiji H, Iguchi Y, Furuya A, Kataoka A, Hatsuta H, Atsuta N, Tanaka F, Hashizume Y, Akatsu H, Murayama S, Sobue G, Yamanaka K. Spliceosome Integrity is defective in Motor Neuron Diseases, ALS and SMA. *EMBO Mol Med* 5: 221-234, (2013).
11. Watanabe S, Kaneko K, Yamanaka K. Accelerated disease onset with stabilized familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS) -linked mutant TDP-43 proteins. *J Biol Chem* 288: 3641-3654, (2013).

#### 総説

1. Endo F, Komine O, Yamanaka K. Neuroinflammation in motor neuron disease. *Clin Exp Neuroimmunol* 7: 126-138 (2016).
2. Komine O, Yamanaka K. Neuroinflammation in motor neuron disease. *Nagoya J Med Sci*, 77: 537-549, (2015).
3. Heneka MT, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*, 14: 388-405 (2015)



# 脳内環境の破綻を制御する新たなグリア・神経間応答機構の探索とその機能解析

(平成23年度～平成27年度)



計画

木山 博資

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

## 研究の背景と目的

神経細胞が自らの原因で自律的に細胞死を引き起こす神経細胞自律的細胞死だけでは、神経損傷時や変性疾患の神経細胞死を十分に説明できない。そこで、本研究では神経細胞死の原因の一端は神経細胞自律的ではなくグリアなど周辺細胞との相互作用の不具合であるという「神経細胞非自律的細胞死」仮説のもと、この相互作用にかかる新たなメディエーターの同定を試みる(研究項目1)。このため、独自のマウス運動神経傷害モデルを用いて解析した。また、本実験のツールとして、神経損傷特異的に遺伝子発現を制御できるマウスの作成をおこなった(研究項目2)。

## 研究成果

### (1) 研究項目1：神経損傷時に発現する神経・グリア間の新たな因子の探索と機能解析

#### ① 神経?Schwann細胞間の因子 (PAP-III)

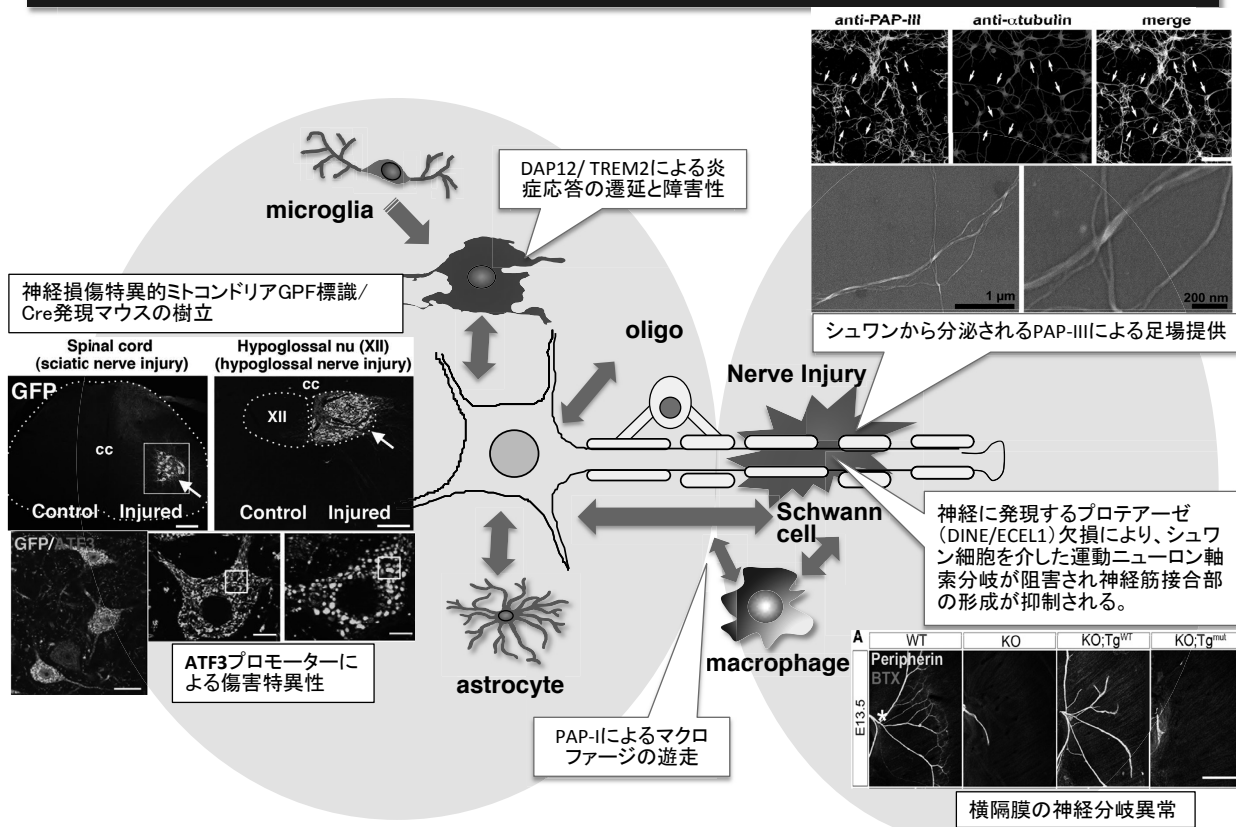
損傷運動神経で発現する分子探索から、C-typeレクチン様分子のPAP-III/Reg-III $\gamma$ が得られた。PAP-IIIはSchwann細胞で産生・分泌される。分泌後、PAP-IIIはそのN-末の11アミノ酸がトリプシン様プロテアーゼによりプロセッシングされた後、重合し中間径線維に近い約10nmの線維を形成する。この線維は線維間でメッシュ状の構造を形成し、神経細胞の突起はPAP-III線維に沿って突起を伸展することが明らかになった

(Konishi, JBC 2013)。神経損傷によりSchwann細胞から放出されたPAP-IIIは神経の軸索再生の足場を提供することを示した。

#### ② 神経?Schwann細胞間の因子 (DINE/ECEL1)

以前我々が同定した神経損傷特異的プロテアーゼ damage induced neuronal endopeptidase (DINE) の遺伝子をノックアウトすると、運動神経は標的の骨格筋に到達するが骨格筋内で通常の分岐ができず神経筋接合部の形成不全が生じた(Nagata, J Neurosci 2010)。本研究では、このプロテアーゼの酵素活性がNMJの形成に必要などうかを検討するために、酵素活性に関与する部分の1アミノ酸あるいは複数のアミノ酸を置換したDINEのトランスジェニックマウス (Tg) を作成し、ノックアウトマウスと交配した。その結果、いずれの変異型でも標的骨格筋内での神経分岐形成の異常が見られた。このメカニズムとして、シュワン細胞の分化の抑制と、軸索とシュワン細胞の接着性の低下が明らかとなった(Matsumoto, J Neurosci 2016)。また先天性間接拘縮症の一部の患者(DA5D)ではDINE/ECEL1の変異が報告されており、この患者に見られる変異を導入したノックインマウスを作成したところ、同様の表現型が見られ、遠位の筋ほどNMJの形成が悪かった(Nagata, Acta Neuropathol 2016)。以上よりDINEは筋内での神経分岐やNMJの形成に重要な分子であり、先天性間接拘縮症(DA5D)の原因遺伝子であることが明らか

## 神経損傷修復時の神経-グリア間新規メディエーターの同定とその機能解明



になった。

### ③神経とミクログリア間因子 (DAP12/TREM2)

遺伝子探索の結果、炎症応答に関連する受容体様分子として知られるDAP12、TREM2が、運動神経損傷後にミクログリアで発現していることが明らかになった。TREM2は膜上に発現する受容体様分子であるが、細胞内情報伝達には同じく膜分子のDAP12と共役する必要である。DAP12ノックアウトマウスではミクログリアの活性化が早期に減弱し、損傷運動神経の生存を遷延させた。このことから、DAP12を介するシグナルはミクログリアの炎症応答を遷延させること、さらに損傷運動神経の細胞死を加速することが明らかになった (Kobayashi, *Glia* 2014)。また、神経障害性疼痛において、DAP12/TREM2は疼痛の増悪因子であることも明らかになった (Kobayashi, *J Neurosci* 2016)。

### (2) 研究項目2:神経損傷時の神経?グリアネットワーク解析ツール動物の開発

中枢/末梢神経軸索損傷時に高い特異性で発現応答する転写因子ATF3に着目し、ATF3プロモーターの下流でCre蛋白とミトコンドリア蛍光標識蛋白を発現するBAC Tgを作製した。このTgマウスにより、神経損傷後の軸索内のミトコンドリアサイズが変化し、ミトコンドリアの軸索内移動動態が変化することが明らかになった。さらにミトコンドリアの分裂を制御するDrp1のFloxマウスとの交配により、ミトコンドリアの分裂が抑制されると損傷神経細胞は細胞死に至ることが明らかになった (Kiryu-Seo, *Sci Rep* 2016)。

### 結語

本研究により、新たなグリア・神経間応答機構が明らかになり、脳内環境を形成・維持する新たなメカニズムが解明された。また、本研究で得られたTgマウスは今後の神経再生研究にとってきわめて有用なツールである。

### 主要研究成果

#### 原著論文

1. Kobayashi M, Konishi H, Sayo A, Takai T, Kiyama H, (2016) TREM2/DAP12 signal elicits pro-inflammatory response in microglia and exacerbates neuropathic pain, **J Neurosci** 36 (43):11138-11150
2. Watanabe S, Ilieva H, Tamada H, Nomura H, Komine O, Endo F, Jin S, Mancias P, Kiyama H, Yamanaka K. Mitochondria-associated membrane collapse is a common pathomechanism in SIGMAR1- and SOD1-linked ALS. **EMBO Mol Med**, (2016) in press
3. Tamada H, Kiyama H, (2016) Suppression of c-Kit signaling induces adult neurogenesis in the mouse intestine after myenteric plexus ablation with benzalkonium chloride, **Sci Rep** 6: 32100.
4. Kiryu-Seo S, Tamada H, Kato Y, Yasuda K, Ishihara N, Nomura M, Mihara K, Kiyama H (2016) Mitochondrial fission is an acute response against injury-induced neurodegeneration, **Sci Rep**, 6: 28331.
5. Nakashima H, Ohkawara B, Ishigaki S, Fukudome T, Ito K, Tsushima M, Konishi H, Okuno T, Yoshimura T, Ito M, Masuda A, Sobue G, Kiyama H, Ishiguro N, Ohno K, (2016), R-spondin 2 promotes acetylcholine receptor clustering at the neuromuscular junction via Lgr5, **Sci Rep** 6: 28512.
6. Matsumoto S, Kiryu-Seo S, Kiyama H (2016) Motor nerve arborization requires proteolytic domain of Damage-induced neuronal endopeptidase (DINE) during development, **J Neurosci** 36(17): 4744-4757.
7. Nagata K, Kiryu-Seo S, Tamada H, Okuyama-Uchimura F, Kiyama H\*, Saido TC\*, (\*co-corresponding author) (2016) ECEL1 mutation implicates impaired axonal

arborization of motor nerves in the pathogenesis of distal arthrogryposis, **Acta Neuropathol**, 132(1):111-26.

8. Kobayashi M, Konishi H, Takai T, Kiyama H, (2015) A DAP12-Dependent Signal Promotes Pro-Inflammatory Polarization in Microglia Following Nerve Injury and Exacerbates Degeneration of Injured Neurons, **Glia** 63 (6): 1073-1082.
9. Yin X, Kiryu-Seo S, Kidd GJ, Feltri ML, Wrabetz L, Trapp BD. (2015) Proteolipid protein cannot replace PO protein as the major structural protein of peripheral nervous system myelin, **Glia**. 63(1): 66-77
10. Taguchi T, Katanosaka T, Yasui M, Hayashi K, Yamashita M, Wakatsuki K, Kiyama H, Yamanaka A, Mizumura K (2015) Peripheral and spinal mechanisms of nociception in a rat reserpine-induced pain model, **Pain** 156(3): 415-27.
11. Yasui M, Yoshimura T, Takeuchi S, Tokizane K, Tsuda M, Inoue K, Kiyama H, (2014) A chronic fatigue syndrome model demonstrates mechanical allodynia and muscular hyperalgesia via spinal microglial activation, **Glia** 62(9): 1407-1417
12. Nagata K, Hama I, Kiryu-Seo S and Kiyama H, (2014) microRNA-124 is down regulated in nerve injured motor neurons and it potentially targets mRNAs for KLF6 and STAT3, **Neuroscience** 256: 426-432.
13. Konishi H, Matsumoto S, Namikawa K, Kiyama H, (2013) N-terminal Cleaved Pancreatitis-Associated Protein-III (PAP-III) Serves as a Scaffold for Neurites and Promotes Neurite Outgrowth, **J Biol Chem**, 288 (15): 10205-13.

### 総説

1. Kiryu-Seo S, Kiyama H, (2011) The nuclear events guiding successful nerve regeneration **Front Mol Neurosci.**; 4: 53.



計画

## オプチニューリン遺伝子異常による脳内環境の変化と神経変性の関わり の 解明

(平成23年度～平成27年度)

代表 **川上 秀史**  
分担 **加藤 英政**

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授  
愛媛大学・医学系研究科・准教授



### 研究の背景と目的

我々の発見した筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因遺伝子オプチニューリン (OPTN) は、孤発性 ALS 患者や変異型 SOD1 による家族性 ALS 患者の下位運動ニューロン内でそれぞれ見られる TDP-43、SOD1 陽性の封入体に局在することがわかっており、変異型 OPTN が原因ではない ALS にも深く関わっている。また OPTN 変異型 ALS 患者の脊髄運動ニューロンで TDP-43 封入体が出現することがわかっており、孤発性 ALS に共通する病態が考えられる。OPTN は多様な分子機構に関与しており、NF- $\kappa$ B に関連した炎症調節機能をはじめとして、ユビキチン結合能を介してオートファジーのアダプタータンパクとして働き、また細胞内輸送にも関与することが知られている。OPTN 変異マウスを作成することにより、オプチニューリン遺伝子異常による神経変性メカニズムと周辺環境に及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。

### 研究成果

#### (1) OPTN ノックアウトマウスの作製

筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子として同定した optineurin の機能を解析し、モデル動物を作成するため、optineurin のノックアウトマウスを作成した。マウス ES 細胞に、相同組み替えを用いて、1つのアレルに置いて、OPTN 欠損させた。その ES 細胞をマウス受精卵とキメラを作成し、マウス個体にし、OPTN 欠損マウスを得た。以下は、ホモの決算マウスにおいて実験を行った。

#### (2) OPTN 欠損マウスの行動解析

コントロールと OPTN 欠損マウスを体重と運動機能 (ロータロッド試験、把握試験) について 24 ヶ月に渡って経時的に測定したが、両者の間で有意な差を認めなかった。また 24 ヶ月の時点で、寿命に差を認めなかった。

#### (3) OPTN 欠損マウスの病理学的解析

OPTN 欠損マウスの運動神経細胞を病理学的に解析した。24 ヶ月齢では、運動神経細胞内に封入体を認めた。一部は TDP-43 陽性であり、また p62 抗体陽性の封入体も認めた。運動神経細胞において、ゴルジ装置のフラグメント化を認めた。また座骨神経内においても、同様な封入体を認めたが、その出現は運動神経細胞質に出現するより早く、軸索でのオートファジー障害または軸索輸送障害が封入体出現のトリガーになっていると考えられた。

### 結語

OPTN 欠損マウスを作製した。24 ヶ月でも表現系に変化を認めなかったが、病理学的検索により、運動神経細胞内で TDP-43 また p62 陽性の封入体を認めた。またゴルジ装置の断片化も認め、合わせてヒトの OPTN 変異 ALS の病理学的特徴を再現した。また運動神経細胞質に先立って、座骨神経内に封入体を認め、末梢神経発の神経変性の機序が考えられた。

今後、早期発症の系を確立することにより、病態モデルとしてのみならず、治療薬の評価にも使かわれることが期待される。

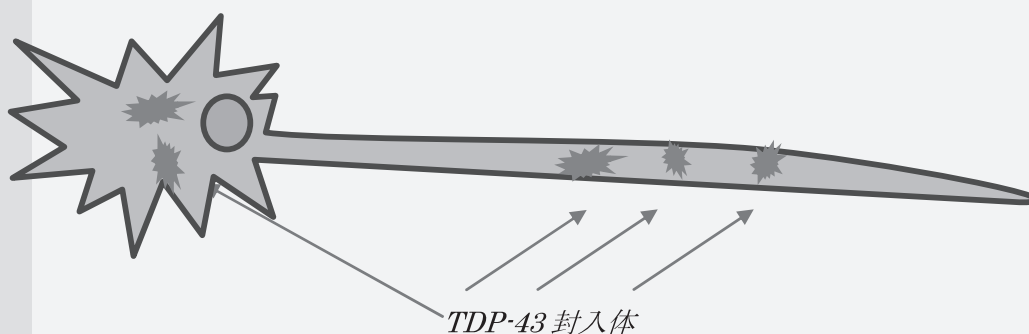
### 主要研究成果

#### 原著論文

1. Nakazawa S, Oikawa D, Ishii R, Ayaki T, Takahashi H, Takeda H, Ishitani R, Kamei K, Takeyoshi I, Kawakami H, Iwai K, Hatada I, Sawasaki T, Ito H, Nureki O, Tokunaga F. Linear ubiquitination is involved in the pathogenesis of optineurin-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Commun.* 2016; 7:12547.
2. Ishida Y, Kawakami H, Kitajima H, Nishiyama A, Sasai Y, Inoue H, Muguruma K. Vulnerability of Purkinje Cells Generated from Spinocerebellar Ataxia Type 6 Patient-Derived iPSCs. *Cell Rep.* 2016; 17:1482-1490.

## オプチニューリン遺伝子異常による脳内環境の変化と神経変性の関わり の 解明

(代表：川上秀史、分担：加藤英政)





3. Kohda M, Tokuzawa Y, Kishita Y, Nyuzuki H, Moriyama Y, Mizuno Y, Hirata T, Yatsuka Y, Yamashita-Sugahara Y, Nakachi Y, Kato H, Okuda A, Tamaru S, Borna NN, Banshoya K, Aigaki T, Sato-Miyata Y, Ohnuma K, Suzuki T, Nagao A, Maehata H, Matsuda F, Higasa K, Nagasaki M, Yasuda J, Yamamoto M, Fushimi T, Shimura M, Kaiho-Ichimoto K, Harashima H, Yamazaki T, Mori M, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y. A Comprehensive Genomic Analysis Reveals the Genetic Landscape of Mitochondrial Respiratory Chain Complex Deficiencies. **PLoS Genet.** 2016;12(1): e1005679.
4. Morino H, Matsuda Y, Muguruma K, Miyamoto R, Ohsawa R, Ohtake T, Otobe R, Watanabe M, Maruyama H, Hashimoto K, Kawakami H. A mutation in the low-voltage-gated calcium channel CACNA1G alters the physiological properties of the channel, causing spinocerebellar ataxia. **Mol Brain.** 2015; 8:89.
5. Muguruma K, Nishiyama A, Kawakami H, Hashimoto K, Sasai Y. Self-organization of polarized cerebellar tissue in 3D culture of human pluripotent stem cells. **Cell Rep.** 2015 Feb 3;10(4): 537-50.
6. Ayaki T, Ito H, Fukushima H, Inoue T, Kondo T, Ikemoto A, Asano T, Shodai A, Fujita T, Fukui S, Morino H, Nakano S, Kusaka H, Yamashita H, Ihara M, Matsumoto R, Kawamata J, Urushitani M, Kawakami H, Takahashi R. Immunoreactivity of valosin-containing protein in sporadic amyotrophic lateral sclerosis and in a case of its novel mutant. **Acta Neuropathol Commun.** 2014 2:172.
7. Morino H, Pierce SB, Matsuda Y, Walsh T, Ohsawa R, Newby M, Hiraki-Kamon K, Kuramochi M, Lee MK, Klevit RE, Martin A, Maruyama H, King MC, Kawakami H. Mutations in Twinkle primase-helicase cause Perrault syndrome with neurologic features. **Neurology.** 2014;83(22): 2054-61.
8. Mochizuki Y, Kawata A, Maruyama H, Homma T, Watabe K, Kawakami H, Komori T, Mizutani T, Matsubara S. A Japanese patient with familial ALS and a p.K510M mutation in the gene for FUS (FUS) resulting in the totally locked-in state. **Neuropathology.** 2014;34(5): 504-9.
9. Kamon M, Katano M, Hiraki-Kamon K, Hishida T, Nakachi Y, Mizuno Y, Okazaki Y, Suzuki A, Hirasaki M, Ueda A, Nishimoto M, Kato H, Okuda A. Identification of Ccr4-not complex components as regulators of transition from partial to genuine induced pluripotent stem cells. **Stem Cells Dev.** 2014;23(18): 2170-9.
10. Yagi R, Miyamoto R, Morino H, Izumi Y, Kuramochi M, Kurashige T, Maruyama H, Mizuno N, Kurihara H, Kawakami H. Detecting gene mutations in Japanese Alzheimer's patients by semiconductor sequencing. **Neurobiol Aging.** 2014;35(7): 1780.e1-5.
11. Mochizuki Y, Kawata A, Hashimoto T, Akiyama H, Kawakami H, Komori T, Oyanagi K, Mizutani T, Matsubara S. An autopsy case of familial amyotrophic lateral sclerosis with FUS R521G mutation. **Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.** 2014;15(3-4): 305-8.
12. Kamada M, Izumi Y, Ayaki T, Nakamura M, Kagawa S, Kudo E, Sako W, Maruyama H, Nishida Y, Kawakami H, Ito H, Kaji R. Clinicopathologic features of autosomal recessive amyotrophic lateral sclerosis associated with optineurin mutation. **Neuropathology.** 2014;34(1): 64-70.
13. Morino H, Miyamoto R, Ohnishi S, Maruyama H, Kawakami H. Exome sequencing reveals a novel TTC19 mutation in an autosomal recessive spinocerebellar ataxia patient. **BMC Neurol.** 2014;14:5.
14. Akizuki M, Yamashita H, Uemura K, Maruyama H, Kawakami H, Ito H, Takahashi R. Optineurin suppression causes neuronal cell death via NF- $\kappa$ B pathway. **J Neurochem.** 2013;126(6): 699-704.
15. Izumi Y, Miyamoto R, Morino H, Yoshizawa A, Nishinaka K, Udaka F, Kameyama M, Maruyama H, Kawakami H. Cerebellar ataxia with SYNE1 mutation accompanying motor neuron disease. **Neurology.** 2013;80(6): 600-1.
16. The clinical characteristics of spinocerebellar ataxia 36: a study of 2121 Japanese ataxia patients. Sugihara K, Maruyama H, Morino H, Miyamoto R, Ueno H, Matsumoto M, Kaji R, Kitaguchi H, Yukitake M, Higashi Y, Nishinaka K, Oda M, Izumi Y, Kawakami H. **Mov Disord.** 2012;27(9): 1158-63.

#### 総説

1. 筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子 丸山博文、森野豊之、川上秀史 **脳と神経**2016 Sep;68(9): 1081-1086.
2. Gomez CM, Kawakami H. Neurogenetics: The expanding horizons of diagnosis and disease pathogenesis. **Neurology.** 2015 84(11): 1070-1.
3. Optineurin and amyotrophic lateral sclerosis. Maruyama H, Kawakami H. **Geriatr Gerontol Int.** 2013;13(3): 528-32.



# 毒性伝達機構の分子イメージングを 基軸とした神経変性疾患研究

(平成23年度～平成27年度)

**樋口 真人** 量子科学技術研究開発機構・放射線  
医学総合研究所・チームリーダー



計画

## 研究の背景と目的

神経変性疾患モデルマウスとポジトロン断層撮影 (PET) およびインビボ光イメージングの各種プローブを利用して、神経細胞内の恒常性維持とその障害の鍵となる各種プロセスを生体脳で画像化し、プロセス間の因果関係を明らかにする。また、神経外環境の維持と破綻に関与するシグナル分子やその受容体を可視化することで、環境の破綻と毒性増加が空間的に伝播する様子を経時的に捉えることを可能にする。加えて神経細胞内メカニズムと神経外環境のクロストークを可視化し、神経細胞傷害の空間的拡大に神経外環境がどのように関わるかを解明する。

## 研究成果

**(1) 神経毒性因子であるタウタンパク凝集体の生体イメージング**：アルツハイマー病をはじめとする各種神経変性疾患で脳内に蓄積するタウタンパクの凝集体を、新規イメージング薬剤を用いてPETおよび二光子レーザー蛍光顕微鏡により生体で可視化することに、世界に先駆けて成功した。様々なタイプのタウ病変に結合する一連の化合物PBB1～PBB5を新規に開発し、タウ病変モデルであるタウトランスジェニック (Tg) マウスのPETにより、PBB3が最も高いコントラストでタウ病変を画像化するプローブであることを明らかにした。また、PBB3が蛍光を発する化合物であることを利用して、タウTgマウスの二光子レーザー蛍光顕微鏡により、静注したPBB3が速やかに脳内に移行し、神経細胞内のタウ凝集体に結合することを証明した。引き続き、探索的臨床PET研究を開始し、PBB3を用いることで、アルツハイマー病患者、ならびに非アルツハイマー型認知症患者の脳内に蓄積するタウ凝集体を画像化できることを実証した (図を参照)。正常加齢からアルツハイマー病への移行において、タウははじめにアミロイドと独立して海馬体付近に蓄積するが、ひとたびアミロイドが蓄積すると、海馬体外に伝播部位が拡大し、アルツハイマー病の発症ひいては進行に至ることが示された。この変化は、タウの異常が脳内環境を伝播する過程を画像で捉えた所見といえる。タウTgマ

ウスにおいても、タウ蓄積と神経炎症 (後述)、神経細胞死が密接な関係を有することが、経時的なPET・MRI・二光子レーザー蛍光顕微鏡により明らかになった。今後このマルチモーダル・イメージング系は、病態制御・修飾因子の同定に役立つと見込まれる。一連の研究成果は、2013年に雑誌Neuronに掲載された。

**(2) 炎症性ミクログリアの生体イメージング**：炎症性ミクログリアのマーカ分子であるトランスロケータータンパク (TSPO) は、放射性プローブを用いてPETで画像化できるが、いかなるタイプのミクログリアがTSPO陽性となるのかは不明であった。我々はタウTgマウスをはじめとする、各種認知症モデルマウスの神経炎症を、TSPOのPETにより捉えることに成功し、TSPOを高発現するミクログリアが、神経傷害性の攻撃的な性質を有することを示した。この成果は、2011年に雑誌Journal of Neuroscienceに掲載された。次いでTSPOを高感度で検出し、しかもヒトでTSPOの遺伝子多型にかかわらず高精度の定量が可能になるPETプローブを開発し、2015年に雑誌Theranosticsで報告した。

**(3) Designer receptor exclusively activated by designer drug (DREADD) の発現と神経活性制御効果の画像化**：DREADDは人工リガンド薬剤に選択的に反応する人工受容体で、脳内に発現させれば神経系の遺伝子発現レポーターとして利用できるのみならず、DREADDを発現する細胞の活動を人工リガンドで制御可能になる。我々はDREADDのTgマウスを作製し、PETによるDREADDの可視化と、脳血流MRIによるDREADDの神経活性制御効果の画像化を達成した。また、同TgマウスよりiPS細胞を作製して神経前駆細胞に誘導し、正常マウス脳内に移植して神経細胞へ分化する過程を、DREADDのPETにより画像化した。これらの成果は2016年に雑誌Journal of Neuroscienceに掲載された。この技術はサルにも応用され、研究成果が2016年に雑誌Nature Communicationsに掲載された。

**新規イメージング薬剤により認知症患者のタウ病変をPETで可視化**

	MRI	タウ病変 (新規薬剤)	老人斑
アルツハイマー病患者			
正常高齢者			

従来の老人斑イメージング薬剤と異なり  
新規薬剤は海馬 (矢頭) のタウ蓄積を可視化

↓

神経変性に直結する毒性因子タウの蓄積を  
経時的に追跡可能

(Neuron 2013)

## 結語

タウタンパクに代表される毒性因子の蓄積と空間的伝播の生体画像化に成功し、毒性因子と相互作用する炎症性ミクログリアの可視化を実現させた。これらの病的プロセスの結果として生じる神経細胞の機能異常を検出し、回路の障害を修復する手段として、DREADDの発現と作用を可視化する技術を開発した。

## 主要研究成果

### 原著論文

1. Nagai Y, Kikuchi E, Lerchner W, Inoue KI, Ji B, Eldridge MA, Kaneko H, Kimura Y, Oh-Nishi A, Hori Y, Kato Y, Hirabayashi T, Fujimoto A, Kumata K, Zhang MR, Aoki I, Suhara T, Higuchi M, Takada M, Richmond BJ, Minamimoto T. PET imaging-guided chemogenetic silencing reveals a critical role of primate rostromedial caudate in reward evaluation. **Nat Commun** 7: 13605, (2016).
2. Ji B, Kaneko H, Minamimoto T, Inoue H, Takeuchi H, Kumata K, Zhang MR, Aoki I, Seki C, Ono M, Tokunaga M, Tsukamoto S, Tanabe K, Shin RM, Minamihisamatsu T, Kito S, Richmond BJ, Suhara T, Higuchi M. Multimodal imaging for DREADD-expressing neurons in living brain and their application to implantation of iPSC-derived neural progenitors. **J Neurosci** 36: 11544-11558, (2016).
3. Barron AM, Tokunaga M, Zhang MR, Ji B, Suhara T, Higuchi M. Assessment of neuroinflammation in a mouse model of obesity and  $\beta$ -amyloidosis using PET. **J Neuroinflammation** 13: 221, (2016).
4. Tiwari AK, Ji B, Yui J, Fujinaga M, Yamasaki T, Xie L, Luo R, Shimoda Y, Kumata K, Zhang Y, Hatori A, Maeda J, Higuchi M, Wang F, Zhang MR. [18F]FEBMP: Positron emission tomography imaging of TSPO in a model of neuroinflammation in rats, and in vitro autoradiograms of the human brain. **Theranostics** 5: 961-969 (2015).
5. Chen CJ, Bando K, Ashino H, Taguchi K, Shiraishi H, Shima K, Fujimoto O, Kitamura C, Matsushima S, Uchida K, Nakahara Y, Kasahara H, Minamizawa T, Jiang C, Zhang MR, Ono M, Tokunaga M, Suhara T, Higuchi M, Yamada K, Ji B. In vivo SPECT imaging of amyloid- $\beta$  deposition with radioiodinated imidazo[1,2-a]pyridine derivative DRM106 in a mouse model of Alzheimer's disease. **J Nucl Med** 56: 120-126, (2015).
6. Oi N, Tokunaga M, Suzuki M, Nagai Y, Nakatani Y, Yamamoto N, Maeda J, Minamimoto T, Zhang MR, Suhara T, Higuchi M. Development of novel PET probes for central 2-amino-3- (3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolyl) propionic acid receptors. **J Med Chem** 58: 8444-8462, (2015).
7. Kimura Y, Ichise M, Ito H, Shimada H, Ikoma Y, Seki C, Takano H, Kitamura S, Shinotoh H, Kawamura K, Zhang MR, Sahara N, Suhara T, Higuchi M. PET quantification of tau pathology in human brain with <sup>11</sup>C-PBB3. **J Nucl Med** 56: 1359-1365, (2015).
8. Maruyama M, Shimada H, Suhara T, Shinotoh H, Ji B, Maeda J, Zhang MR, Trojanowski JQ, Lee VMY, Ono M, Masamoto K, Takano H, Sahara N, Iwata N, Okamura N, Furumoto S, Kudo Y, Chang Q, Saido TC, Takashima A, Lewis J, Jang MK, Aoki I, Ito H, Higuchi M. Imaging of tau pathology in a tauopathy mouse model and in Alzheimer patients compared to normal controls.

**Neuron** 79: 1094-1108, (2013).

9. Yamada M, Uddin LQ, Takahashi H, Kousa R, Takahata K, Kimura Y, Ikoma Y, Eguchi Y, Takano H, Matsuura M, Ito H, Higuchi M, Suhara T. Superiority illusion arises from resting-state brain networks modulated by dopamine. **Proc Natl Acad Sci USA** 110: 4363-4367, (2013).
10. Maeda J, Zhang MR, Okauchi T, Ji B, Ono M, Hattori S, Kumata K, Iwata N, Saido TC, Trojanowski JQ, Lee VMY, Staufenbiel M, Tomiyama T, Mori H, Fukumura T, Suhara T, Higuchi M. In vivo positron emission tomographic imaging of glial responses to amyloid- $\beta$  and tau pathologies in mouse models of Alzheimer's disease and related disorders. **J Neurosci** 31: 4720-4730, (2011).

### 総説

1. Higuchi M, Ji B, Maeda J, Sahara N, Suhara T. In vivo imaging of neuroinflammation in Alzheimer's disease. **Clin Exp Neuroimmunol** 7: 139-144, (2016).
2. Higuchi M, Maeda J, Ji B, Tokunaga M, Zhang MR, Maruyama M, Ono M, Fukumura T, Suhara T. PET Applications in animal models of neurodegenerative and neuroinflammatory disorders. **Curr Top Behav Neurosci** 11: 45-64, (2012).



# 後シナプスでのタンパク質代謝と ミクログリアによる監視機構

(平成24年度～平成25年度)



公募

鶴田文憲

筑波大学 生命環境系 助教

## 研究の背景と目的

脳神経系におけるRNAやタンパク質の代謝は、神経細胞やグリア細胞など個々の細胞によって厳密に調節されており、この精密な制御機構が脳内恒常性の維持に対して重要である。特に、シナプス周辺部における代謝調節は、神経細胞自律的なメカニズムのみならず、グリア細胞による細胞非自律的メカニズムも関わっており、これらメカニズムが破綻すると、様々な疾患発症の原因になると考えられている。本研究課題では、神経変性疾患や発達障害への関与が報告されている脱ユビキチン化酵素USP15に着目し、このタンパク質が脳内でどのように働いているか、特にRNAやタンパク質の代謝制御機構への関連性解明を目的とする。具体的に、(1)脱ユビキチン化の標的タンパク質の同定と詳細な分子メカニズム解明、(2)USP15の異常がなぜ神経変性疾患や発達障害につながるのか、USP15異常と神経疾患をつなぐ鍵因子の同定を試みる。

## 研究成果

(1) 脱ユビキチン化標的因子の同定と分子メカニズムの解明: USP15は、様々なストレス応答や炎症性反応の調節に関与するユビキチン鎖切断酵素で、USP15変異は様々な神経疾患につながる事が示唆されている。本申請者は、USP15<sup>-/-</sup>マウスの個体解析から、USP15の異常が多動性障害や月齢依存的な神経変性につながる事を見出した。そこでUSP15の基質を同定するため、USP15の結合タンパク質をLC/MSでスクリーニングしたところ、U6-snRNPの制御因子TUT1とSART3を同定した。次に、USP15がこれらタンパク質を脱ユビキチン化しているか検討したところ、USP15はSART3を足場にしてTUT1を効率良く脱ユビキチン化することを見出した。以上の結果から、TUT1がUSP15の新規基質である事が示唆された。

(2) USP15異常と神経疾患をつなぐ鍵因子の同定: USP15がU6-snRNP制御因子の調節に関与することから、USP15<sup>-/-</sup>マウスではU6スプライソソーム機能が破綻することで、RNAスプライシング異常を引き起こし、様々な神経機能

障害に繋がるのではないかと推測した。そこでUSP15<sup>-/-</sup>マウス脳でスプライシング変化を起こすmRNAをAffymetrix exon arrayで解析したところ、Sparcl1/Hevinを始めとする、数多くのmRNAスプライシング変動が確認できた。このことから、USP15がU6スプライソソームの機能を調節することで、グローバルな標的遺伝子のスプライシングを制御している可能性が示唆された。興味深いことに、USP15やSparcl1/Hevinの変異は、自閉症発症の危険因子として報告されており、USP15変異によってスプライシング変動を受けたSparcl1/Hevinを始めとする標的遺伝子群が、運動障害、多動性障害につながるのではないかと考えている。

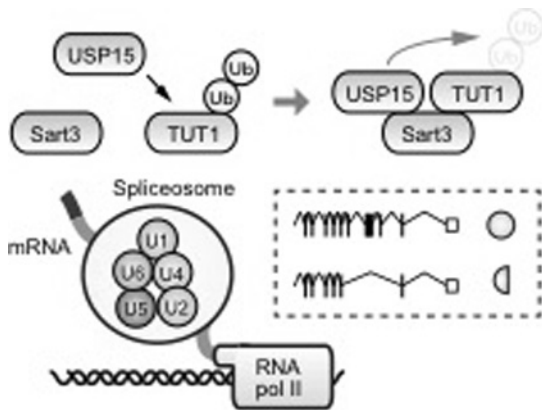
## 結語

脳神経系におけるUSP15制御の分子メカニズムとして、新たな脱ユビキチン化の標的因子TUT1、またその反応を補助する足場タンパク質SART3を同定した。またUSP15によるTUT1の脱ユビキチン化反応が、RNAスプライソソーム制御に関与し、グローバルなmRNAスプライシング制御に貢献することを見出した。さらにexon arrayを用いたスクリーニングの結果から、Sparcl1/Hevinを始めとする複数のスプライシング標的因子を同定した。本研究のスクリーニングから同定した標的の中には、ミクログリアやアストロサイトから分泌され、シナプス制御に関与する因子が複数存在することから、本研究の目的である脳神経系におけるUSP15の役割解明に迫ることができた。今後、疾患との関連などさらに検証することが期待される。

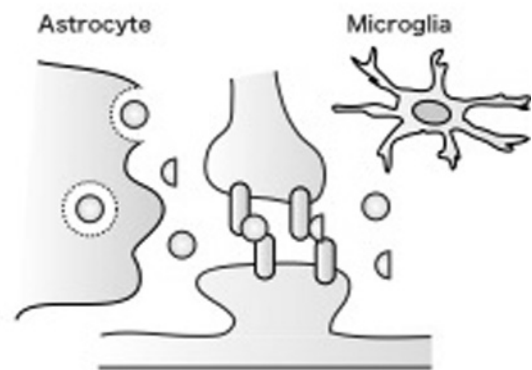
## 主要研究成果

### 原著論文

1. CACUL1/CAC1 attenuates p53 activity through PML post-translational modification. Fukuda T, Kigoshi-Tansho Y, Naganuma T, Kazaana A, Okajima T, Tsuruta F\*, Chiba T\*. **Biochem. Biophys. Res. Commun. In Press** \*co-corresponding



USP15によるTUT1の脱ユビキチン化  
RNAスプライシングの変化



スプライシング変異体による  
シナプス制御など

2. USP15 stabilizes the transcription factor Nrf1 in the nucleus, promoting the proteasome gene expression. Fukagai K, Waku T, AM Masudul Azad Chowdhury; Kubo K, MatsumotoM, Kato H, Natsume T, Tsuruta F, Chiba T, Taniguchi H, Kobayashi A **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 478:363-370 (2016)
3. SCFFbl12 increases p21Waf1/Cip1 expression level through atypical ubiquitin chains synthesis Tsuruta F\*, Takebe A, Haratake K, Kanemori Y, Kim J, Endo T, Kigoshi Y, Fukuda T, Miyahara H, Ebina M, Baba T, Chiba T\* **Mol. Cell Biol.** 36: 2182-2194 (2016) \*co-corresponding
4. KIAA0368-deficiency affects disassembly of 26S proteasome under oxidative stress condition. Haratake K, Sato A, Tsuruta F, Chiba T. **J Biochem.** pii: mvw006. (2016)
5. PIKfyve mediates the motility of late endosomes and lysosomes in neuronal dendrites Tsuruta F\*, Dolmetsch RE **Neurosci. Lett.** 605 18-23 (2015) \*corresponding
7. The intronic region of Fbxl12 functions as an alternative promoter regulated by UV irradiation Tsuruta F\*, Kim J, Fukuda T, Kigoshi Y, Chiba T# **Biochem. Biophys. Rep.** 3 100-107 (2015) \*co-corresponding
8. CACUL1/CAC1 Regulates the Antioxidant Response by Stabilizing Nrf2. Kigoshi Y, Fukuda T, Endo T, Hayasaka N, Iemura S, Natsume T, Tsuruta F, Chiba T **Sci. Rep.** 5 12857 (2015)
9. Myeloma overexpressed 2 (Myeov2) regulates L11 subnuclear localization through Nedd8 modification Ebina M\*, Tsuruta F\*, Katoh MC, Kigoshi Y, Someya A, Chiba T# **PLoS ONE** 8:e65285 (2013) \*equal contribution, #co-correspondence
10. Competition between  $\alpha$ -actinin and Ca<sup>2+</sup>-calmodulin controls surface retention of the L-type Ca<sup>2+</sup> channel CaV1.2 Hall DD, Dai S, Tseng PY, Malik Z, Nguyen M, Matt L, Schnizler K, Shephard A, Mohapatra DP, Tsuruta F, Dolmetsch RE, Christel CJ, Lee A, Burette A, Weinberg RJ and Hell JW **Neuron** 78:483-497 (2013)
11. Brap2 regulates temporal control of NF- $\kappa$ B localization mediated by inflammatory response Takashima O\*, Tsuruta F\*, Kigoshi Y, Nakamura S, Kim J, Katoh MC, Fukuda T, Irie K, Chiba T. **PLoS ONE** 8:e58911 (2013) \*equal contribution
12. Cytoplasmic location of  $\alpha$ 1A voltage-gated calcium channel C-terminal fragment (Cav2.1-CTF) aggregate as sufficient to cause cell death Takahashi M, Obayashi M, Ishiguro T, Sato N, Niimi Y, Ozaki K, Mogushi K, Mahmut Y, Tanaka H, Tsuruta F, Dolmetsch R, Yamada M, Takahashi H, Kato T, Mori O, Eishi Y, Mizusawa H, Ishikawa K. **PLoS ONE** 8:e50121 (2013)

## 総説

1. Cold shock as a possible remedy for neurodegenerative disease Aihara T, Tsuruta F\* **Int J Neurol Neurother.** 3: 053 (2016) \*corresponding
2. Microglia: The new players in regulating the brain development. Tsuruta F **Curr. Neurobiol.** 7: 54-55 (2016)
3. New insights into the functions of PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> in the pathogenesis of neurodegenerative disorders. Tsuruta F **Neural Regen. Res.** 11: 240-241 (2016)



# 脳内環境を維持するためのオートファジーの役割

(平成24年度～平成25年度)

公募

田中 敦

山形大学・医学部メディカルサイエンス推進研究所・准教授



## 研究の背景と目的

細胞内成分の分解系として知られるオートファジーは、その欠損により神経組織に封入体形成を惹起し、神経組織の脱落・運動障害などを呈することが知られている。近年、オートファジーの生理的意義として、障害を受けた細胞内小器官の駆除による細胞内環境の維持が想定され、そのシステムの破綻がパーキンソン病のような神経変性疾患における発症の原因ではないかと考えられるようになった。本研究課題では、オートファジーを神経組織特異的に欠損したマウスを用い、ミトコンドリアを含む各細胞内小器官の機能不良が認められるか、認められる場合にはどのような機能崩壊過程を経るかについて明らかにすることを目的に以下の研究を遂行した。

## 研究成果

### (1) オートファジー欠損マウスの解析

マウス出生後、神経細胞封入体形成、運動異常が示されるまでの時点において、神経組織から生化学的に得られたミトコンドリアを含む各細胞内小器官画分を分離精製し、各小器官の完全性を検討した。結果、比較的初期段階から機能異常を示すミトコンドリアについては、これまでに報告されていた機能異常ミトコンドリアが顕著に認められる時点よりもかなり初期に、ミトコンドリアを構成する因子の中で特に呼吸鎖複合体と称される機能性複合体の形成異常が認められることを明らかにした。さらにこれらの知見を培養系の神経細胞株にて再現、検証すべく、オートファジー欠損培養細胞を用いた実験を行った結果、マウス個体と同様の現象を確認した。これらの成果は複数の学会（国内外）における招待講演を含む成果発表により報告した。

### (2) DJ1 欠損モデル細胞を用いた解析

共同研究としてパーキンソン病原因因子の1つであるDJ1 を欠損したトリリンパ球系細胞DT40の解析を行った。結果、

DJ1 欠損細胞においては酸化ストレスへの脆弱性、ミトコンドリア機能障害、ミトコンドリアの形態異常などを認めた。これらの成果は海外学術誌への発表を行った。

### (3) 末梢神経疾患におけるミトコンドリア機能障害の解析

共同研究としてシャーコットマリートゥース（CMT）病患者の解析を行った。結果、ミトコンドリア呼吸鎖複合体サブユニットの1つであるCOX6A1 遺伝子変異があらたにCMT 病の因子として同定され、さらに患者由来バイオプシーおよび、血球細胞の解析により、健常者群と比較してミトコンドリア機能障害が認められること、呼吸鎖複合体の形成に障害が認められることを明らかとした。これらの成果は海外学術誌への発表を行った。

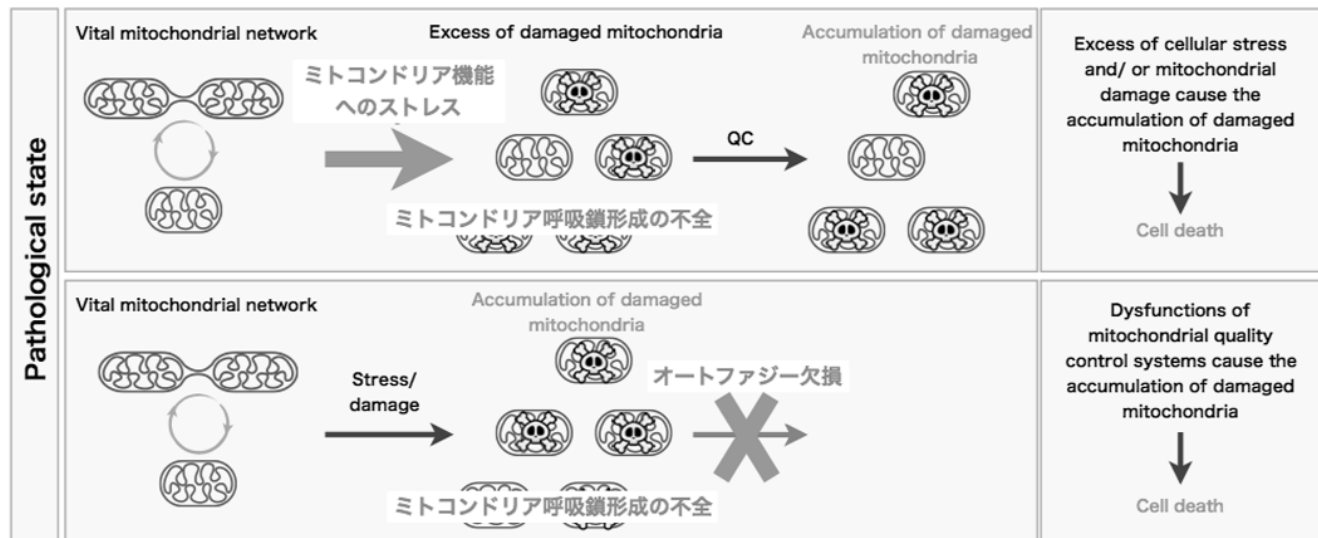
### (4) 心筋症モデルにおけるミトコンドリア機能障害と細胞死の関係性解析

共同研究として、doxorubicin 投与後の心筋症モデルにおけるミトコンドリア機能不全とその抑制におけるHMGB1 の関与を検討した。その結果としては、HMGB1 過剰発現マウスにおけるdoxorubicin 耐性が示され、そのマウスの心筋内ではミトコンドリア機能障害から発生する細胞死の抑制が認められることを明らかとした。これらの成果は海外学術誌に発表した。

## 結語

ミトコンドリア機能異常と神経組織、他の組織の機能障害、脱落、崩壊の関係性は、未だ多くの点で解明すべき点が残っている。その中で、ミトコンドリア機能異常の早期マーカーとして呼吸鎖複合体形成度に注目することは、今後神経変性疾患の進行を初期にモニターするよき指標となる可能性がある。

## ミトコンドリア機能異常と品質管理



## 主要研究成果

### 原著論文

1. Narumi T., Shishido T., Otaki Y., Kadowaki S., Honda Y., Funayama A., Honda S., Hasegawa H., Kinoshita D., Nishiyama S., Takahashi H., Arimoto T., Miyamoto T., Watanabe T., Tanaka A., Woo CH., Abe J., Takeishi Y., and Kubota I. Cardiac-specific Overexpression of High-mobility Group Box 1 Attenuates Cardiomyocyte Apoptosis and Mitochondrial Dysfunction associated with the Pathogenesis of Doxorubicin-induced Cardiomyopathy. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2015(82):1-12.
2. Tamiya G., Makino S., Hayashi M., Abe A., Numakura C., Ueki M., Tanaka A., Ito C., Toshimori K., Ogawa N., Terashima T., Maegawa H., Yanagisawa D., Tooyama I., Tada M., Onodera O., Hayasaka K. A Mutation of COX6A1 Causes a Recessive Axonal or Mixed Form of Charcot-Marie-Tooth Disease. *Am. J. Hum. Gen.*, 2014 Sep 4;95(3):294-300.
3. Minakawa EN, Yamakado H, Tanaka A, Uemura K, Takeda S, Takahashi R. Chicken DT40 cell line lacking DJ-1, the gene responsible for familial Parkinson's disease, displays mitochondrial dysfunction. *Neurosci Res.*, 2013 Dec;77(4):228-33.

### 著書

1. 田中敦, 岡本徳子, 風間智彦 「さまざまなモデル生物からミトコンドリア画分を分離する簡便な方法」 実験医学 2014年9月号 Vol.32 No.14 “クローズアップ実験法”
2. 田中敦問題は膜で包んで分解へ実験医学 2014年4月号 Vol.32 No.6 “News & Hot Paper Digest”
3. 田中敦選択的オートファジーによるミトコンドリア品質管理機構医学のあゆみ 2012 Vol.241 No.4:239-244.
4. 田中敦損傷ミトコンドリアの処理機構-PINK1/Parkin 依存性マイトファジー生体の科学 2012 Vol.63 No.5:496-497.

### 国際学会発表

1. Tanaka A, Mattie S., McBride HM., EMBO workshop Organelle contact sites: Intracellular communication and role in diseaseポスター (採択) (2016, サルディニア, イタリア)
2. Tanaka A, Oshikiri Y, Tamai Y, Youle RJ, Mizushima N Keystone Symposia Meeting on Mitochondrial Dynamics and Physiologyワークショップ口頭発表およびポスター (採択) (2014, サンタフェ, アメリカ)
3. Tanaka A, Oshikiri Y, Tamai Y, Mizushima N The 4th International Symposium on Dynamics of Mitochondria (DynaMito2013) ポスター (採択) (2013, 沖縄, 日本)

### 総説

1. Endo F, Komine O, Yamanaka K. Neuroinflammation in motor neuron disease. *Clin Exp Neuroimmunol* 7: 126-138 (2016) .
- 2.



# リン酸化プロテオミクスに基づく リン酸化神経病態学の確立

(平成24年度～平成25年度)

公募

五十嵐 道弘

新潟大学医歯学系教授



## 研究の背景と目的

タンパク質のリン酸化は、分子レベルで最も重要な脳内環境変化への調節的反応であり、病的な状態では種々のリン酸化異常によるLewy小体、原繊維変化などが特徴的である。おそらく神経系の病態におけるリン酸化異常は未知のものが多数存在し、それを見出すことで新規診断分子マーカーが、また異常リン酸化のコントロールによる新規治療戦略が開発可能である。

申請者は成長円錐をin vivoから調製し、プロテオミクスによって種々の成長円錐機能分子を明らかにした(PNAS, 2009)が、さらにリン酸化プロテオミクスによって、神経成長に関わるリン酸化部位を1,000種類のタンパク質から6,000か所見出した。そのうち極めてリン酸化頻度の高いものが、20種類の分子について60か所ほどあることを得た。本研究ではその結果から、これらの部位にリン酸化特異抗体を作成して種々の病態での分布を検索し、リン酸化部位の不活性化(ノックインマウス)を作成する。さらにその根拠となる分子間相互作用を同定する。

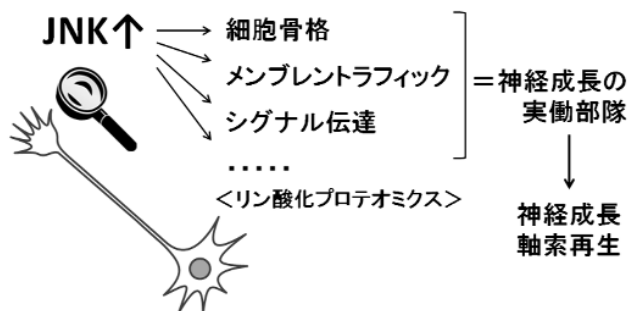
## 研究成果

### (1) GAP-43の新規リン酸化の意義

GAP-43は神経成長の分子マーカーとして知られているが、その意義は十分に理解されていない。リン酸化プロテオミクスの結果、GAP-43のS96リン酸化が成長円錐で最も顕著にリン酸化されていたため、このリン酸化の意義を解析した。

S96のリン酸化抗体は特異性が高く、末梢神経の再生軸索を特異的に認識した(原著11)。このリン酸化は、JNK依存性でJNKの阻害剤や、上流のMKK7のcKOでは顕著に抑制された。S96のリン酸化は発生期の伸長軸索は特異的に認識され、軸索成長が終了すると軸索内のS96リン酸化は急激に減少した。このリン酸化は、坐骨神経損傷時の再生や、不全脊髄損傷後の出芽現象でも検出され、末梢神経再生では質量分析で直接、生化学的にも検出された。

S96Aノックインマウス(KI)を作成したところ、このマウスは、培養系で成長円錐の面積狭小化、軸索伸長の低下を示し、その理由は異常な分岐の増加、軸索途中のフィロポディアの増加によるものであった。上記の点を総合すると、S96リン酸化は正常な神経伸長や軸索再生に必須であり、その分子マーカーになることが明確となった(投稿中;左下図は神経成長・軸索再生におけるJNK活性化の意義)。



### (2) 神経細胞の極性に関する研究

GPM6aは機能未知の膜蛋白質で、神経細胞が分化すると発現が上昇する。この蛋白質の機能を明らかにするため、種々の実験を行った結果、この分子が神経細胞の極性形成を促進し、従来神経細胞や他の細胞で極性形成に関係することが示されていたシグナル伝達分子群(Rufy3/rap2/Tiam2)がGPM6aの下流に集合することで極性形成が促進されることがわかった。GPM6aのこの効果はパルミトイル化によって脂質ラフトに集積することでこの働きを果たすことが明確になった。この機構は、細胞外基質の作用で極性形成が促進される経路に働くことが明らかとなった(原著1)。

同様に、TAG-1等の関連分子が極性形成に関係することを見出し、これらの多様性が極性形成の多重的な保証を行っていることを見出した(原著5,6)。

### (3) 神経細胞の細胞外環境としてのコンドロイチン硫酸(CS)の役割

CSは神経成長の最大・最強の阻害効果を持つ因子で、細胞外に存在する。

われわれは神経系でのCS合成の律速控訴と考えられるCSGalNAcT1(T1)に関するノックアウトマウス(T1KO)を作成した。このマウスで脊髄損傷を作成してその回復を調べたところ、顕著な回復を示した。その機構として、合成経路を共有し、CSと正反対で神経成長を促進するヘパラン硫酸(HS)の合成が高まっていることが明らかとなった。従って、CS合成の減弱とHS合成の促進が同時に起こり、最適な細胞外環境が軸索再生を最適化することが証明された(原著9)。

また、CSは細胞外でperineuronal nets(PNN)という構造をとって、特に抑制性入力parvalbumin陽性細胞(PV細胞)の調節を行うことが神経系で知られているが、これと神経可塑性との関連性を視覚系の眼優位可塑性で調べると、片眼遮蔽の系でT1KOでは臨界期が生じないことがわかった。この系を解析することで、臨界期は正常なPV細胞の発達に必須で、転写因子Otx2の取り込みでPNNが必須であることが証明された。以上のことから、PNNと可塑性の実態の関連性が明確となった(原著2;外に投稿中1件)。

## 結語

以上の結果は、脳内環境で神経細胞の内外で多様な分子機構が神経成長を保証していることが明確となった(総説1-3)。これらの相互の関係を明らかにすることが今後の神経成長・軸索再生の機構を解明する手がかりとなる。

## 主要研究成果

### 原著論文

- Honda A, Ito Y, Takahashi-Niki K, Matsushita N, Nozumi M, Tabata H, Takeuchi K, Igarashi M: Extracellular Signals induce Glycoprotein M6a Clustering of Lipid-rafts and associated Signaling Molecules. J Neurosci, in press
- Hou X, Yoshioka N, Tsukano, H, Sakai A, Miyata S, Watanabe Y, Yanagawa Y, Sakimura K, Takeuchi K, Kitagawa H, Hensch TK, Shibuki K, Igarashi M, Sugiyama S: Chondroitin Sulfate within Perineuronal Nets Is Required for Onset and Offset of Critical Period



- Plasticity in the Visual Cortex. *Sci Rep*, in press
3. Izumikawa T, Sato B, Mikami T, Tamura J, Igarashi M, Kitagawa H (2015) GlcUA  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4Xyl (2-O-phosphate) is the preferred substrate for chondroitin N-acetylgalactosaminyltransferase-1. *J Biol Chem*. 290: 5438-5448.
  4. Lemmon VP., Ferguson AR, Popovich PG, Xu XM, Snow DM, Igarashi M, Beattie CE, Bixby JL (2014) Minimum Information about a Spinal Cord Injury Experiment: A Proposed Reporting Standard for Spinal Cord Injury Experiments. *J Neurotrauma* 31: 1354-1361.
  5. Namba T, Kibe Y, Funahashi Y, Nakamuta S, Takano T, Ueno T, Shimada A, Kozawa S, Okamoto M, Shimoda Y, Oda K, Wada Y, Masuda T, Sakakibara A, Igarashi M, Miyata T, Faivre-Sarrailh C, Takeuchi K, Kaibuchi K (2014) Pioneering axons regulate neuronal polarization in the developing cerebral cortex. *Neuron* 81: 814-829.
  6. Nagaoka T, Ohashi R, Inutsuka A, Sakai S, Fujisawa N, Yokoyama M, Huang YH., Igarashi M, Kishi M. (2014) The Wnt/Planar Cell Polarity Pathway Component Vangl2 Induces Synapse Formation through Direct Control of N-Cadherin. *Cell Rep*. 6: 916-927.
  7. Uemura S, Nagaoka T, Yokoyama M, Igarashi M, Kishi M (2014) A simple and highly efficient method to identify the integration site of a transgene in the animal genome. *Neurosci Res* 80:91-94.
  8. Watanabe Y, Katayama N, Takeuchi K, Togano T, Itoh R, Sato M, Yamazaki M, Abe M, Sato T, Oda K, Yokoyama M, Takao K, Fukaya M, Miyakawa T, Watanabe M, Sakimura K, Manabe T, \*Igarashi M (2013) Point mutation in syntaxin-1A causes abnormal vesicle recycling, behaviors, and short term plasticity. *J Biol Chem* 288: 34906-34919.
  9. Takeuchi K, Yoshioka N, Higa Onaga S, Watanabe Y, Miyata S, Wada Y, Kudo C, Okada M, Ohko K, Oda K, Sato T, Yokoyama M, Matsushita N, Nakamura M, Okano H, Sakimura K, Kawano H, Kitagawa H, Igarashi M (2013) Chondroitin sulphate N-acetylgalactosaminyl-transferase-1 inhibits recovery from neural injury. *Nature Communications* 4:2740. doi: 10.1038/ncomms3740.
  10. Ando K, Kudo Y, Aoyagi K, Ishikawa R, Igarashi M, Takahashi M (2013) Calmodulin-dependent regulation of neurotransmitter release differs in subsets of neuronal cells. *Brain Res* 1535C:1-13.
  11. Oyamatsu H, Koga D, \*Igarashi M, \*Shibata M, \*Ushiki T (2012) Morphological assessment of early axonal regeneration in end-to-side nerve coaptation models. *J Plast Surg Hand Surg* 46: 299-307.

## 総説

1. Igarashi M (2014) Proteomic identification of the molecular basis of mammalian CNS growth cones. *Neurosci Res*. 88C: 1-15 (invited review) .
2. 五十嵐 道弘 (2014) ECM糖鎖の動的調節機構と臓器機能の危機管理能力. *生体の科学* 65: 606-612
3. Igarashi M: The molecular basis of the mammalian growth cone. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* (in press)



# グリア細胞内のカルシウム調節破綻を介した神経変性過程の解明

(平成24年度～平成25年度)

公募

木下 彩栄

京都大学医学研究科 教授



## 研究の背景と目的

アルツハイマー病では、神経細胞から放出されるアミロイドβ (Aβ) が蓄積することが、最初期病変の一つと考えられている。認知症発症の約20年ほど前より、Aβの蓄積による老人斑が出現し、Aβの出現により、海馬に局限していた神経原線維変化(リン酸化されたタウタンパク質より成る)が徐々に大脳皮質に広がるのが、最近のバイオマーカーの研究等で明らかになりつつある。しかしながら、Aβがどのようにして病変を進展させていくのかということについては十分に理解が進んでいない。申請者はアルツハイマー病の病態として、神経細胞のみならず、グリア細胞を含めた脳内環境の重要性に着目し、アストロサイト内におけるカルシウム調節の破綻が、アミロイド病理と神経変性、シナプス脱落の間を仲介する変化であると考えた。そこで、神経細胞から放出されたAβがどのようにグリア細胞であるアストロサイトに影響を及ぼし、神経変性につながっていくのかという点に着目して研究を立案した。

## 研究成果

### (1) Aβ刺激によるアストロサイトの反応

これまでの研究で、アミロイド処置によるアストロサイト内のカルシニューリン-NFATシグナルの活性化を検出し、アミロイドによる細胞内カルシウムレベルの上昇が証明された。その結果として、アストロサイトからの種々の炎症性サイトカイン放出の亢進を認めた。

### (2) アストロサイトからのIGF-BPの放出

アストロサイトから放出されるサイトカインの中で、炎症性サイトカインIGF-BPはmRNAレベル、蛋白レベルとも増加を

認め、アミロイドによりカルシウムレベルが上昇し、アストロサイトから放出されたものと推測された。

### (3) IGF-BPのヒト脳における発現

非常に興味深いことにIGF-BPは、対照脳と比較して顕著にアルツハイマー病の脳で発現が亢進しており、ヒトの脳においてもアミロイド負荷によるアストロサイトを介した炎症性メディエーターの放出を示唆した。

### (4) IGF-BPによるタウのリン酸化の亢進

このようにして分泌されたIGFBP-3が神経細胞のアルツハイマー変化に与える影響を調べるため、神経細胞のタウのリン酸化と細胞死に関する実験を行った。タウのリン酸化は、グリコーゲン合成酵素キナーゼ3β (GSK-3β) によっても制御されることが知られており、GSK-3βの抑制を受けると、タウのリン酸化が抑制される。AβはGSK-3βの抑制を解除することで、タウのリン酸化を促す方向にあるとされている。今回の実験では、IGFはGSK-3βを抑制し、タウのリン酸化も抑制するが、IGFBPはそのIGFの作用を阻害するということが分かった。細胞死に関しても、IGFは細胞生存性に働くのに対して、IGFBPはIGFの作用を阻害する。このように、IGFBP-3はタウのリン酸化を促し、細胞死に向かわせる作用を持っていることが分かった。

## 結語

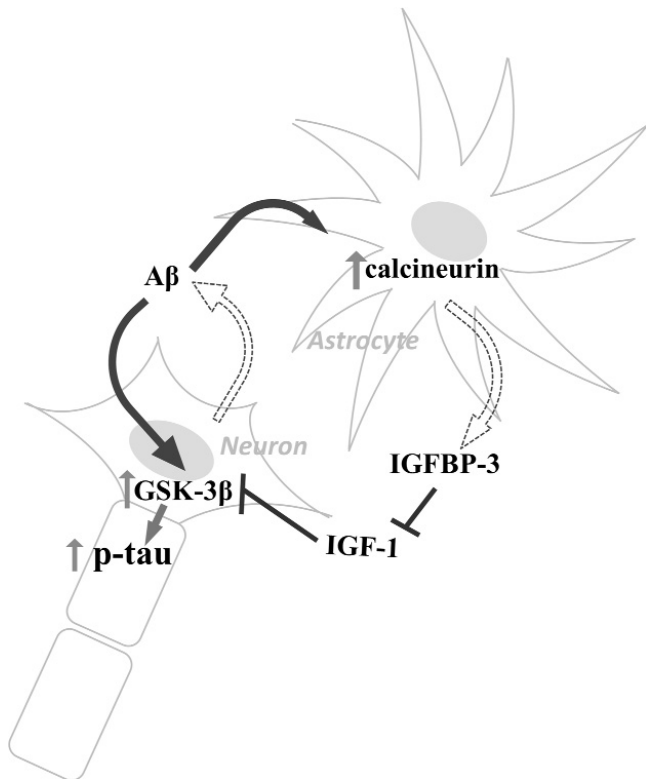
神経細胞によって生成されたAβが、アストロサイト内のカルシニューリンを活性化させ、結果としてIGFBP-3の放出を促す。そのIGFBP-3が今度は神経細胞内のタウのリン酸化を引き起こす、というものである。つまり、神経細胞内のタウのリン酸化にはアストロサイトの関与が重要であり、IGFBP-3が実際にその役割の一端を担っているという事が明らかになった。

これまで、老人斑と神経原線維変化という2つの病理所見はどのように互いに関連しているのか十分解明が進んでいなかったが、アストロサイトを介して病態が促進されている可能性が今回の研究で示唆された。その役割の一端を担っているIGFBP-3は、アルツハイマー病理の解明においても治療標的としても極めて重要な分子であると考えられる。

## 主要研究成果

### 原著論文

1. Makoto Honda, Itsunari Minami, Norie Tooi, Nobuhiro Morone, Hisae Nishioka, Kengo Uemura, Ayae Kinoshita, John E heuser, Norio Nakatsuji. The modeling of Alzheimer's disease by the overexpression of mutant presenilin 1 in human embryonic stem cells. *BBRC* 469: 587-592, (2016).
2. Aramaki E, Shikata S, Miyabe M, Kinoshita A. Vocabulary Size in Speech May Be an Early Indicator of Cognitive Impairment. *PLoS One*. 11:e0155195, (2016).
3. Watanabe K, Uemura K, Asada M, Maesako M, Akiyama H, Shimohama S, Takahashi R, Kinoshita A. The participation of insulin-like growth factor-3 released by astrocytes in the pathology of Alzheimer'



- s disease. **Mol Brain** 8 :82. doi: 10.1186/s13041-015-0174-2, (2015).
4. Maesako M, Uemura M, Tashiro Y, Sasaki K, Watanabe K, Noda Y, Ueda K, Asada M, Kubota M, Okawa K, Ihara T, Shimohama S, Uemura K, Kinoshita A. High fat diet enhances  $\beta$ -site cleavage of amyloid precursor protein (APP) via promoting  $\beta$ -site APP cleaving enzyme 1/Adaptor protein 2/clathrin complex formation. **PLoS One** 10: e0131199, (2015).
  5. Jingami N, Asada-Utsugi M, Uemura K, Noto R, Takahashi M, Ozaki A, Kihara T, Kageyama T, Takahashi R, Shimohama S, Kinoshita A.: Idiopathic Normal Pressure Hydrocephalus has a Different Cerebrospinal Fluid Biomarker Profile of Alzheimer's Disease. **J Alzheimers Dis.** 45:109-115, (2015).
  6. 野田泰葉、米山智子、木下彩栄 軽度アルツハイマー型認知症患者の記憶障害に対するリバスタチグミンの効果 **新薬と臨床**, 64-2, 44-50. (2015).
  7. Yuki D, 他8名, Kinoshita A, Setou M: DHA-PC and PSD95 decrease after loss of synaptophysin and before neuronal loss in patients with Alzheimer's disease. **Scientific Reports** 4:7130. doi: 10.1038/screp07130, (2014).
  8. Maesako M, 他8名, Takahashi R, Shimohama S, Kinoshita A: Continuation of exercise is necessary to inhibit high fat diet-induced  $A\beta$  deposition and memory deficit in amyloid precursor protein transgenic mice. **PLoS ONE** 8: e72796, (2013).
  9. Noda Y, 他6名, Shimohama S, Takahashi R, Kinoshita A, Uemura K: Copper enhances APP dimerization and promotes  $A\beta$  production. **Neurosci Lett** 547:10-15, (2013).
  10. Kubota M, 他5名, \*Kinoshita A: Videophone-based multimodal home telecare support system for patients with diabetes. **Diabetol Int**, 52-59, 2013
  11. Ly PTT, Kinoshita A, 他13名, \*Song W: Inhibition of GSK3 $\beta$ -mediated BACE1 expression reduces Alzheimer-associated phenotypes. **J Clin Invest** 123: 224-235, (2013).
  12. Maesako M, 他9名, Takahashi R, Shimohama S, Kinoshita A: Exercise is more effective than diet control in preventing high fat diet-induced  $\beta$ -amyloid deposition and memory deficit in amyloid precursor protein transgenic mice. **J Biol Chem** 287:23024-33, (2012).
  13. Maesako M, 他8名, Takahashi R, Kihara T, Shimohama S, \*Kinoshita A: Gain of function by phosphorylation in Presenilin 1-mediated regulation of insulin signaling. **J Neurochem** 121:964-73, (2012).
  14. Maesako M, 他10名, \*Kinoshita A. Environmental enrichment ameliorated high fat diet-induced  $A\beta$  deposition and memory deficit in APP transgenic mice. **Neurobiol Aging**, 33:1011.e11-23, (2012).

臨床老年看護 3/4月号 (2016).

6. 久保田正和、木下彩栄 認知症の危険因子とマネジメント **医学と薬学** 72: 1207-1218, (2015).
7. 久保田正和、\*木下彩栄 認知症の危険因子としての糖尿病 **Progress in Medicine** 35: 1403-1407, (2015).
8. 前迫真人、木下彩栄：アルツハイマー病の発症・進展と耐糖能障害 **医学のあゆみ** 249(6), 523-527, (2014).

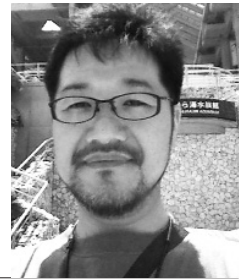
## 総説

1. Tashiro Y, Kinoshita A. Environmental risk factors. **Brain Nerve**. 68:837-47, (2016).
2. 野田泰葉、木下彩栄 運動と脳の関連性 **現代化学** 545: 30-31, (2016).
3. 木下彩栄 認知症と運動・食事 **日本認知症学会誌** 30: 348-355, 2016
4. 久保田正和、木下彩栄 Alzheimer病と食の関連性 **認知症の最新医療** 6(4) (2016).
5. 宮田千春、木下彩栄 アルツハイマー病の最新医療と予防法



# 樹状突起の異常交差に起因する“てんかん様症状”の発症機構の追究

(平成24年度～平成25年度)



公募

碓井 理夫

京都大学大学院・生命科学研究所・講師

## 研究の背景と目的

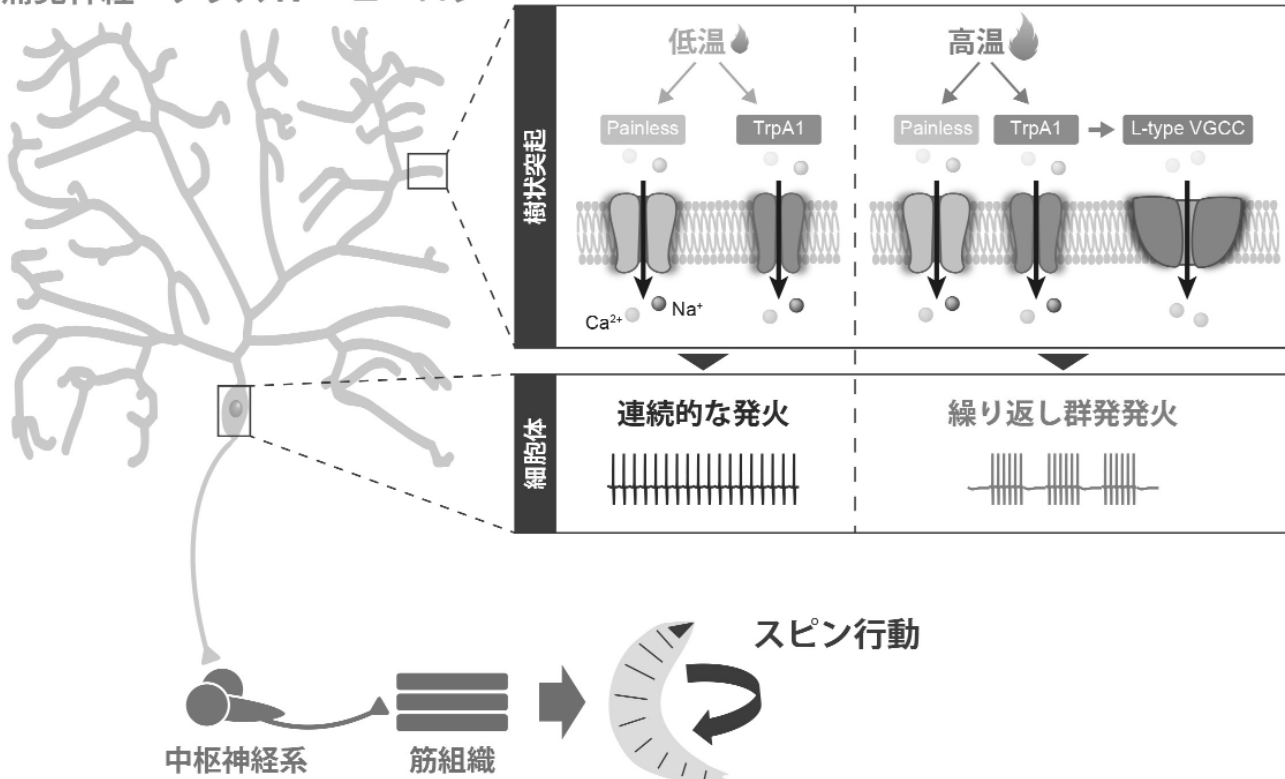
ショウジョウバエ幼虫の痛覚受容を担う一次感覚ニューロンであるclass IV dendritic arborization neuron (Class IV ニューロン) は、表皮直下に長大な樹状突起を頻りに分岐させながら2次元的に展開している。同一の細胞体に由来している樹状突起の分枝(姉妹樹状突起)は、互いに他を忌避し合うことにより殆ど交差することなく受容野を隈なく被覆する。我々の研究グループは、この姉妹樹状突起間の相互反発的な伸長過程を、7回膜貫通型タンパク質であるFlamingoとその下流調節因子Espinasが協調的に作用し続けることで制御していることを明らかにしていた(Matsubara et al., Genes & Development, 2011)。時を同じくして、Espinasの哺乳類ホモログであるヒトPrickleがヒトのミオクロヌスてんかんの責任遺伝子であるとの報告や、ノックアウトマウスがてんかん様の行動異常をしめすことが報告されていた。そこで、Class IV ニューロンの神経生理特性を徹底的に調査することで、てんかん発症の分子および細胞レベルでのメカニズムに迫る基盤を固めることを目指した。

## 研究成果

(1) ショウジョウバエの幼虫は、外敵の襲撃や紫外線などの有害刺激に対して、ダッシュ行動とスピン行動という2種類の異なる逃避行動戦略をとる。この際、痛覚を受容する感覚ニューロンであるClass IVの神経活動が、行動惹起に対して

必要かつ十分な条件であることがわかっていった。そこで、「痛覚ニューロン自身が刺激の種類や強度に応じてそれぞれに特異的な発火パターンを生成しており、それが個体の行動パターンを調節している」との仮説を立て、これを示すことにした。まず、熱刺激時のClass IV ニューロンの応答を精密に計測するために、赤外線レーザーによって樹状突起の一部を高精度に加熱しながらニューロンの発火パターンを記録し、同時に細胞内のカルシウム濃度をイメージングにより記録する新規計測系を構築した。この計測系による観察の結果、熱刺激時には刺激強度に応じて細胞内へのカルシウム流入が悉無的に発生していることが明らかになった。さらに、このカルシウム流入と同時に、高頻度発火と発火静止期とが繰り返す「繰り返し群発発火」パターンが生起することが明らかになった。この知見をもとに、カルシウム流入が「繰り返し群発発火」の生成に必須であることを示した。さらには、高速作動型のチャンネルロドプシンを利用することで、「繰り返し群発発火」が特定の逃避行動(Rolling locomotion, 転がり行動)を誘発していることを明らかにした。つまり、カルシウム流入を介して活動電位の発生パターンを積極的に変化させることで、個体レベルの適切な逃避行動を選択していることを初めて明らかにしたことになる(Terada et al., eLife, 2016)。現在、樹状突起交差異常を含む、様々な突起形態異常とClass IV ニューロンの発火パターンおよび個体の逃避行動パターンにどのような影響をおよぼすのかを系統的に検索しているところである。

## 痛覚神経“クラスIVニューロン”



(2) 様々な感覚ニューロンのうち、2つ異なる個性を支配する2つの転写因子AbruptおよびKnot (Collier) に注目して、それらの「結合DNA領域の探索」と「被発現調節遺伝子群の網羅的同定」全ゲノムスケールで解析した。その結果、一部重複する下流遺伝子群の発現量を時空間的に精妙な調節をおこなうことで細胞の個性を確立していることを明らかにした (Hattori et al., *Developmental Cell*, 2013)。

### 結語

樹状突起形態やFlamingoシグナリングとてんかん発症メカニズムとの関係は未だに謎が多い。我々の解析から、Class IVニューロンをモデル系にしててんかん発症機構の分子・細胞レベルでの解析を行える基盤が整備されたと考えている。今後、生理的なメカニズム解析を推進することが重要であると考えている。

### 主要研究成果

#### 原著論文

1. Watanabe K, Furumizo Y, Usui T, \*Hattori Y, and \*Uemura T. Nutrient-dependent dendrite arborization of somatosensory neurons. **Genes to Cells** (2016)
2. Terada S-I, Matsubara D, Onodera K, Matsuzaki M, \*Uemura T and \*Usui T. Neuronal processing of noxious thermal stimuli mediated by dendritic Ca<sup>2+</sup> influx in *Drosophila* somatosensory neurons. **eLife** 5, e12959 (2016)
3. Shimono K, Fujishima K, Nomura T, Ohashi M, Usui T, Kengaku M, Toyoda A and \*Uemura T. An evolutionarily conserved protein CHORD regulates scaling of dendritic arbors with body size. **Scientific Reports** 4 (2014)
4. Hattori Y, Usui T, Satoh D, Moriyama S, Shimono K, Itoh T, Shirahige K and \*Uemura T. Sensory-neuron subtype-specific transcriptional programs controlling dendrite morphogenesis: genome-wide analysis of Abrupt and Knot/Collier. **Developmental Cell** 27(5), 530-544 (2013)
5. Yanagihashi Y, Usui T, Izumi Y, Yonemura S, Sumida M, Tsukita S, Uemura T and \*Furuse M. Snakeskin, a membrane protein associated with smooth septate junctions, is required for intestinal barrier function in *Drosophila*. **Journal of Cell Science** 125(8), 1980-1990 (2012)

#### 総説

1. Shi D, Arata M, Usui T, Fujimori T and \*Uemura T. "Seven-pass transmembrane cadherin CELSRs, and Fat4 and Dchs1 cadherins: from planar cell polarity to three-dimensional organ architecture." In *The Cadherin Superfamily* (Suzuki S and Hirano S eds.), Springer Publishing Company, (2016)



# 時差症候群の分子機構の解明とその治療に関する研究

(平成24年度～平成25年度)



公募

岡村 均 京都大学・大学院薬学研究科・教授

## 研究の背景と目的

人間の日周リズムは、地球の自転に同期している。ヒトは夜明けと共に起床し、日没とともに帰宅し、食事ののち眠る。しかし、前世紀における人工照明の普及と、今世紀における現代の経済のグローバル化は、この生命の進化の未獲得した生体リズムシステムをも脅かしている。ジェット機の発明により、地上の様々な時間帯を一举に飛び越えることが現実のものになり、ヒトは生体リズムと環境の明暗リズムのずれ（時差）を初めて経験することになる。この時差は、近年の交替制勤務、時間外労働の普及のせいで、飛行機に乗らなくとも、日常体験することになる。やっかいなことに、この時差は慢性的であり、生体リズムの変調による高血圧、メタボリック症候群、糖尿病、発癌などの生活習慣病の重要なリスクファクターにもなる。しかも、時差の生理機構や分子機構は、全く解明されていない。そこで、今回我々は、この分子神経メカニズムを検索した。

## 研究成果

(1) 時差時の中枢時計SCNのリズム我々はマウスを用い、日本から米国西海岸への移動にあたる、飼育する明暗環境を8時間早める時差実験を行った。時差を起こす前は、1日半、時差の後は10日間にわたって、4時間毎にLMDを用いてSCNをサンプリングし、定量的に時計遺伝子の量を測定した。哺乳類時計の中枢振動体Per2を初めとする時計遺伝子は、時差を起こす前は明瞭な日周リズムを示していたが、時差を起こした直後はそのリズム性が消失した。SCN時計遺伝子は、そのきわめて安定したリズム性が特徴であるので、この時差後のリズム消失は想定外の所見である。その後、リズム性は日々少しずつ

回復し、この時計遺伝子の結果は、行動レベルに反映され、マウスは、時差の後、新しい明暗環境に順応するのに10日程度を要した。

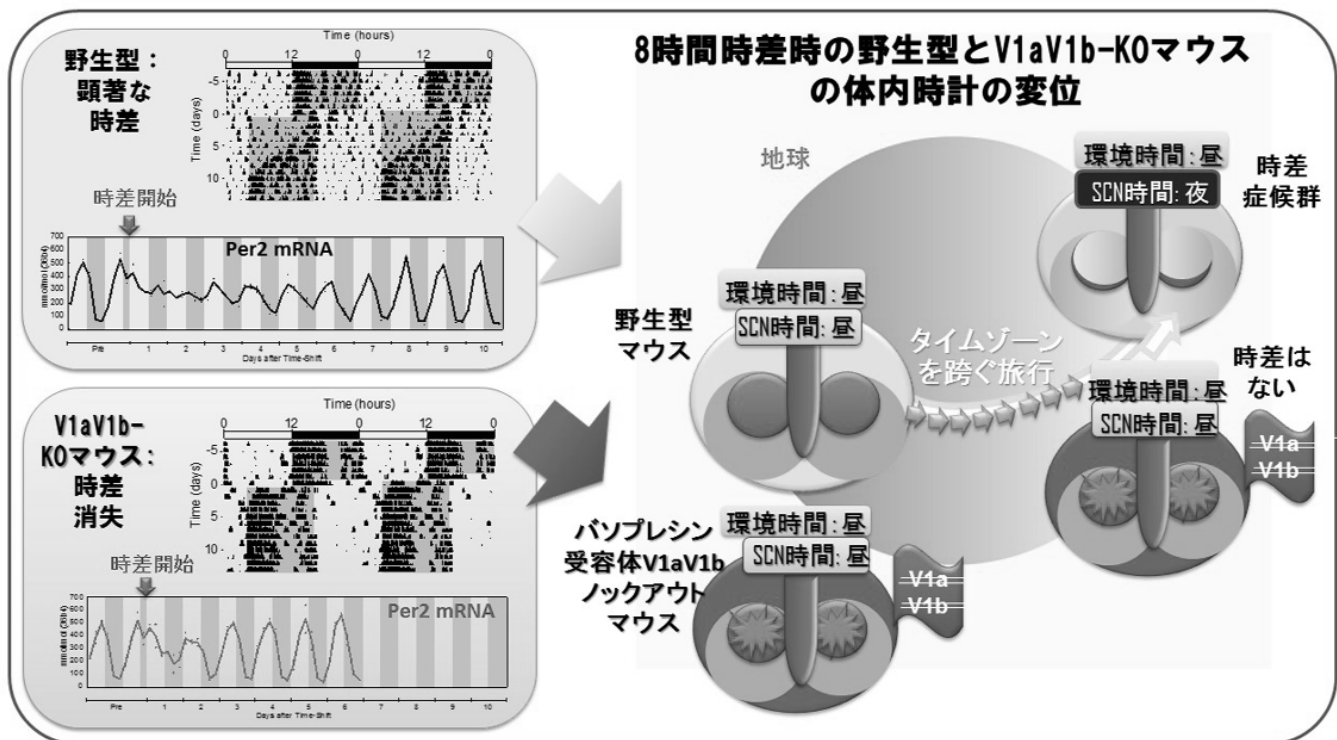
### (2) 時差時の末梢時計のリズム

全身の細胞もリズム発信能力を持つ。今回、SCNサンプリングに用いたと同じマウスの、肝臓、腎臓の末梢時計の動態を調べた。その結果、末梢臓器の時計の時計遺伝子のリズムは、SCNのようなリズム振幅の減弱は伴わず、十分保たれていた。しかし、新しい明暗周期へのリズムの位相の同調はなかなか起こらず、10日もかかった。SCNの位相変位が末梢時計よりも常に先行することから、まずSCNが同調し、この情報が全身の臓器の時計の同調を誘導していることが推測される。

### (3) SCNのAVP神経系と時差

細胞レベルの検索より、SCNにはアルギニン・バソプレッシン(AVP)作動性ニューロンが存在することが従来より報告されている。しかしこの細胞系の機能については、全く解明されていなかった。今回、SCN内のほとんどのAVPニューロンにV1a受容体が発現することを明らかにした。電子顕微鏡所見と合わせ、これは、AVP神経細胞同士がSCN内の局所神経ネットワークを形成していることを示している。V1bもSCNにあるといわれているので、我々は、V1aとV1b受容体を共に欠損したダブルノックアウトマウス(V1a<sup>-/-</sup>V1b<sup>-/-</sup>マウス)を作製した。このV1a<sup>-/-</sup>V1b<sup>-/-</sup>マウスでは、SCN内のAVPネットワークが機能消失していると考えられる。

このV1a<sup>-/-</sup>V1b<sup>-/-</sup>マウスで、8時間明暗位相を早める時差実験



を行ったところ、マウスは瞬時に新周期に同調した。野生型マウスでは、新しい明暗環境に順応するのに10日要するのに比べれば、明らかな変動である。また、明暗環境を8時間遅らせる時差環境下でも、*V1a<sup>-/-</sup>V1b<sup>-/-</sup>*マウスは同様に素早く順応した。では、*V1a*と*V1b*のどちらの遺伝子が関与しているのだろうか？単独*V1a<sup>-/-</sup>*マウスや、単独*V1b<sup>-/-</sup>*マウスでは、時差同調時間は、野生型マウスと*V1a<sup>-/-</sup>V1b<sup>-/-</sup>*マウスの中間の値を示した。すなわち、*V1a*と*V1b*の両遺伝子とも時差形成に関与しているのである。

このSCNの局所ネットワークが如何にして時差に結びつくのかを検証するため、我々は、リアルタイムでSCN各細胞の各々のリズムが測定可能なSCNスライス培養系を用いることにした。*Per1-luc*レポーターマウスから作成したSCNスライスの生物発光をモニタリングすることにより、SCNに存在する何百というニューロンの概日リズムを同時に測定することができる。SCNの各細胞は安定した概日リズムを示すが、各細胞のリズムの位相は異なる。すなわち、まず最初にSCNの背内側の細胞がピークを迎え、その後波が伝播していくように、腹外側に向かって次々と細胞がピークを迎えていく。

このSCNスライスにタンパク質合成阻害剤である cycloheximide (CHX) を投与すると、全細胞の発光リズムは完全に消失する。これは、タンパク質寿命がきわめて短いPERタンパク質が合成阻害で速やかに消失するため、時計遺伝子の転写翻訳ループが成立しないからである (PERタンパク質はリン酸化を経てユビキチン化され分解される)。続いて、CHXを除去すると、陽性因子であるCLOCK/BMAL1は影響を受けないので、この転写翻訳が再開され、その3時間後に全てのSCN細胞が全く同時に発光リズムのピークを示す。その後、野生型のSCNスライスでは、背側から腹側の順序の通りに各細胞のリズム位相は回復した。しかし、*V1a<sup>-/-</sup>V1b<sup>-/-</sup>*マウスから採取したSCNスライスでは、CHX投与前は野生型と同じく背内側から腹外側への順でリズム位相のピークを示したが、CHX投与後はその順序の通りの回復は無かった。このことは、AVP-V1aV1b受容体神経連絡が細胞のリズムの位相の順番を規定すると言える。この遺伝子改変マウスで見られたCHX投与後の細胞リズムの乱れは、野生型SCNスライスにバソプレッシン受容体アンタゴニスト投与時をしたときにも認められたので、SCNバソプレッシン局所ニューロン系が、細胞間の位相較差の制御という全く新しい機構で、時差による体内時計の位相変位を制御している可能性を強く示唆している。

## 結語

今回、時差の神経生理機構とそれを裏打ちする分子機構が明らかとなった。驚くべきことに、時差時、体内時計の中核である視交叉上核 (SCN) の時計が止まり、これが回復するとともに時差が解消された。同時に、遺伝子改変マウスを用いた研究で、時差の分子機構の中核を担っているのがバソプレッシンおよびその*V1a*受容体と*V1b*受容体であることが解明された。さらに、バソプレッシン*V1a*受容体および*V1b*受容体の拮抗薬が時差解消に有効であった。時差は、近年急増するシフトワークによる生活習慣病の病因としても注目されており、今後の展開が期待される。

## 主要研究成果

### 原著論文

1. Yamaguchi Y, Suzuki T, Mizoro Y, Kori H, Okada K, Chen Y, Fustin JM, Yamazaki F, Mizuguchi N, Zhang J, Dong X, Tsujimoto G, Okuno Y, Doi M, \*Okamura H. Mice genetically deficient in vasopressin *V1a* and *V1b* receptors are resistant to jet lag. **Science** 342, 85-90 (2013).
2. Fustin JM, Doi M, Yamaguchi Y, Hayashi H, Nishimura S, Yoshida M, Isagawa T, Suimye-Morioka M, Kakeya H, Manabe I, \*Okamura H. RNA-methylation-dependent

RNA processing controls the speed of the circadian clock. **Cell**, 155:793-806 (2013).



## ミクログリアの活性酸素産生と亜鉛シグナル 調節因子としてのプロトンチャネル

(平成24年度～平成25年度)

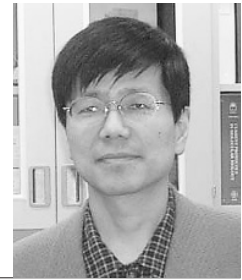
## プロトンチャネルノックアウトマウスを用いた 摂食中枢機構の維持とその破綻の理解

(平成26年度～平成27年度)

公募

岡村 康司

大阪大学大学院医学系研究科・教授



### 研究の背景と目的

電位依存性プロトンチャネルVSOP/Hv1は、膜の脱分極に伴ってH<sup>+</sup>を透過させるイオンチャネルであり、哺乳類の脳内ではミクログリア特異的に発現する。VSOP/Hv1は一般的には活性酸素産生を促進する役割を持つと信じられており、また低濃度のZn<sup>2+</sup> (1 μM以下) によって抑制されるという性質を併せ持つ。既にVSOP/Hv1欠損マウスでは脳梗塞時の活性酸素産生低下により、脳損傷が大きく緩和されることが報告されており、創薬ターゲット分子としても着目されている。しかしこれまでにミクログリアにおけるVSOP/Hv1による活性酸素産生制御機構を、細胞レベルで詳細に解析した例は存在せず、またミクログリアは様々な生理状態を取りうるため、VSOP/Hv1による制御機構もそれによって異なる可能性も存在する。さらにシナプス間隙などの細胞外に放出されるZn<sup>2+</sup>によるVSOP/Hv1抑制機構も未解明な点が多い。そこで本研究では(1) Zn<sup>2+</sup>によるVSOP/Hv1の抑制機構の解明、(2) ミクログリアにおける活性酸素産生機構の解明、(3) ノックアウトマウスを用いた脳内環境維持におけるプロトンチャネルの役割の解明、を目的とした。

### 研究成果

(1) Zn<sup>2+</sup>によるVSOP/Hv1の抑制機構の構造レベルでの解明：我々はX線構造解析によりVSOP/Hv1の構造を原子レベルで明らかにすることに成功した。その結果、VSOP/Hv1は電位センサードメインを上下に動かすことで、H<sup>+</sup>の透過路を開閉することが明らかになり、またその際Zn<sup>2+</sup>は細胞外側から留め金となって作用し、H<sup>+</sup>透過路を閉じていることが明らかとなった。

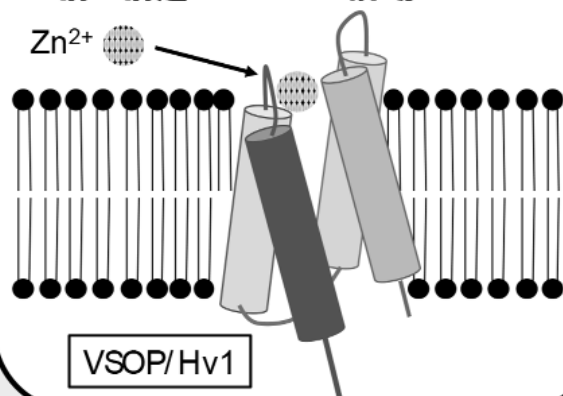
(2) 初代培養ミクログリアにおける活性酸素産生制御：我々はVSOP/Hv1欠損マウスよりミクログリアを調整し、活性酸素産生を計測した。その結果過去の報告とは反対に、VSOP/Hv1欠損ミクログリアにおいて活性酸素産生の増大が認められた。すなわちVSOP/Hv1がミクログリアの活性酸素産生を抑制していた。これまでVSOP/Hv1は全ての免疫細胞において、活性酸素産生の際に生じる余剰のH<sup>+</sup>を細胞外へと排出することで、活性酸素の産生を助けると考えられている。従って今回ミクログリアで認められた現象は、VSOP/Hv1による全く未知の活性酸素産生制御機構が存在することを示唆している。最近の詳細な解析から、この現象には、VSOP/Hv1がアクチン動態を制御することによって活性酸素産生を制御することが示唆されている。

(3) ノックアウトマウスを用いた脳内環境維持におけるプロトンチャネルの役割の解明：プロトンチャネルのノックアウトマウスは体重増加、内臓脂肪の増加を呈した。プロトンチャネルは神経系ではミクログリアに特異的に発現することから、視床下部などでの炎症が生じて摂食行動に変化が生じた可能性が考えられた。またグルコース代謝についても検討した結果、週齢とともにノックアウトマウスでは血清グルコース濃度の上昇が見られ、糖新生の亢進が生じることが示唆された。

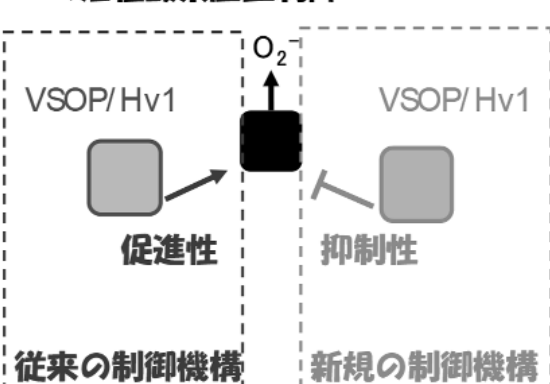
脳内炎症については、週齢とともに脳内のミクログリアの生理的性質が変化することに着目して解析を行い、大脳皮質での抗酸化酵素の発現変化を調べた。VSOP/Hv1欠損マウスにおいて幼若マウス(1日齢、5日齢、3週齢)ではその発現量が低下したのに対し、加齢マウス(6ヶ月齢)では逆に増大した。更に脳梗塞実験では、6ヶ月齢マウスでは先行研究と同様に脳損傷の軽減が見られたのに対し、若齢マウスでは差異が認めら

## ミクログリアにおける電位依存性プロトンチャネルの機能 (代表：岡村康司)

### 1. Zn<sup>2+</sup>によるVSOP/Hv1の抑制機構の構造レベルでの解明



### 1. VSOP/Hv1によるミクログリアの活性酸素産生制御





れなかった。従って加齢マウスで見られた脳損傷の軽減には、抗酸化酵素の発現上昇が寄与している可能性も考えられた。このようにVSOP/Hv1によるミクログリアの活性酸素産生制御機構や脳内環境への影響を考える上で、個体の加齢状態も重要な要素となることが明らかとなった。

## 結語

近年生体内で極めて重要なシグナル因子として着目されている $Zn^{2+}$ が、VSOP/Hv1の機能を抑制する機構を原子構造レベルで明らかにした。また、ミクログリアの活性酸素産生におけるVSOP/Hv1による制御に関し、従来とは逆の、抑制作用が存在することを見出した。更にVSOP/Hv1欠損による脳内環境への影響は、従来考えられてきた以上に複雑であり、個体の週齢によって異なるという側面を明らかにした。

## 主要研究成果

### 原著論文

1. Fujiwara Y, Kurokawa T, Takeshita K, Kobayashi M, Okochi Y, Nakagawa A, Okamura Y. The cytoplasmic coiled-coil mediates cooperative gating temperature sensitivity in the voltage-gated  $H^+$  channel Hv1. *Nature Communications*. 2012; 3:816. doi: 10.1038/ncomms1823.
2. Sasaki M, Tojo A, Okochi Y, Miyawaki N, Kamimura D, Yamaguchi A, Murakami M, Okamura Y. Autoimmune disorder phenotypes in HVCN1 gene deficient mice. *Biochem. J.* 2012; 450(2):295-301.
3. Fujiwara Y, Takeshita K, Nakagawa A, Okamura Y. Structural characteristics of the redox-sensing coiled coil in the voltage-gated  $H^+$  channel. *J. Biol. Chem.* 2013; 288(25):17968-17975.
4. Kurokawa T, Okamura Y. Mapping of sites facing aqueous environment of voltage-gated proton channel at resting state: A study with PEGylation protection. *Biochem. Biophys. Acta.* 2013; 1838(1):382-387.
5. Takeshita K, Sakata S, Yamashita E, Fujiwara Y, Kawanabe A, Kurokawa T, Okochi Y, Matsuda M, Narita H, Okamura Y, Nakagawa A. X-ray crystal structure of voltage-gated proton channel. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2014; 21:352-357.
6. Fujiwara Y, Kurokawa T, Okamura Y. Long  $\alpha$  helices projecting from the membrane as the dimer interface in the voltage-gated  $H^+$  channel. *J. Gen. Physiol.* 2014; 143:377-386.
7. Okochi Y, Aratani Y, Adissu HA, Miyawaki N, Sasaki M, Suzuki K, Okamura Y. The voltage-gated proton channel Hv1/VSOP inhibits neutrophil granule release. *J. Leukocyte Biol.* 2016; 99(1):7-19.
8. Kawanabe A, Okamura Y. Effects of unsaturated fatty acids on the kinetics of voltage-gated proton channels heterologously expressed in cultured cells. *J. Physiol.* 2016; 594(3):595-610.
9. Sakata S, Miyawaki N, McCormack TJ, Arima H, Kawanabe A, Ozkucur N, Kurokawa T, Jinno Y, Fujiwara Y, Okamura Y. Comparison between mouse and sea urchin orthologs of voltage-gated proton channel suggests role of S3 segment in activation gating. *Biochem. Biophys. Acta.* 2016; 1858(12):2972-2983.
2. Okamura Y, Fujiwara Y, Sakata S. Gating mechanisms of voltage-gated proton channels. *Annual Rev. Biochem.* 2015; 84:685-709.
3. 電位依存性プロトンチャンネルにおけるプロトン透過機構について, 岡村 康司, 生物物理, 56(3)154-158, 2016年05月

### 総説

1. Fujiwara Y, Okamura Y. Temperature-sensitive gating of voltage-gated proton channels. *Current Topics in Membranes* 2014; 74:259-292



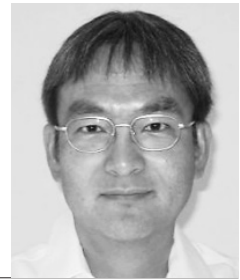
# 脳内環境の恒常性の維持機構におけるネクチンとアフアディンの機能

(平成24年度～平成25年度)

公募

萬代 研二

神戸大学・医学研究科・特命准教授



## 研究の背景と目的

脳内環境の恒常性の維持は、脳が正常に機能するための基盤であり、その破綻は神経機能の不全さらには様々な疾患の原因となる。研究代表者は細胞間の接着装置、ネクチン-アフアディン複合体を見出し、この分子複合体が上皮細胞における細胞間接着と極性の形成に不可欠な機能を果たしていることを明らかにしてきた。本研究では、脳内環境の恒常性の維持におけるアフアディンの機能の解明を目指した。

## 研究成果

ほ乳類の大脳皮質は多様な神経細胞からなる層構造を形成している。興奮性神経細胞は、主として、発生期の脳の脳室帯と呼ばれる、脳室の周囲を取り囲む細胞層に存在する神経幹細胞のラディアルグリア細胞の不等分裂によって産生される。ラディアルグリア細胞は脳室面と基底面（大脳皮質表面）に放射状突起を伸長させ、それぞれの面に結合している。産生された新生神経細胞は、ラディアルグリア細胞の放射状突起に接着し、それを足場として放射状に移動して大脳皮質の特定の層に定着する。この移動様式はロコモーションと呼ばれる。

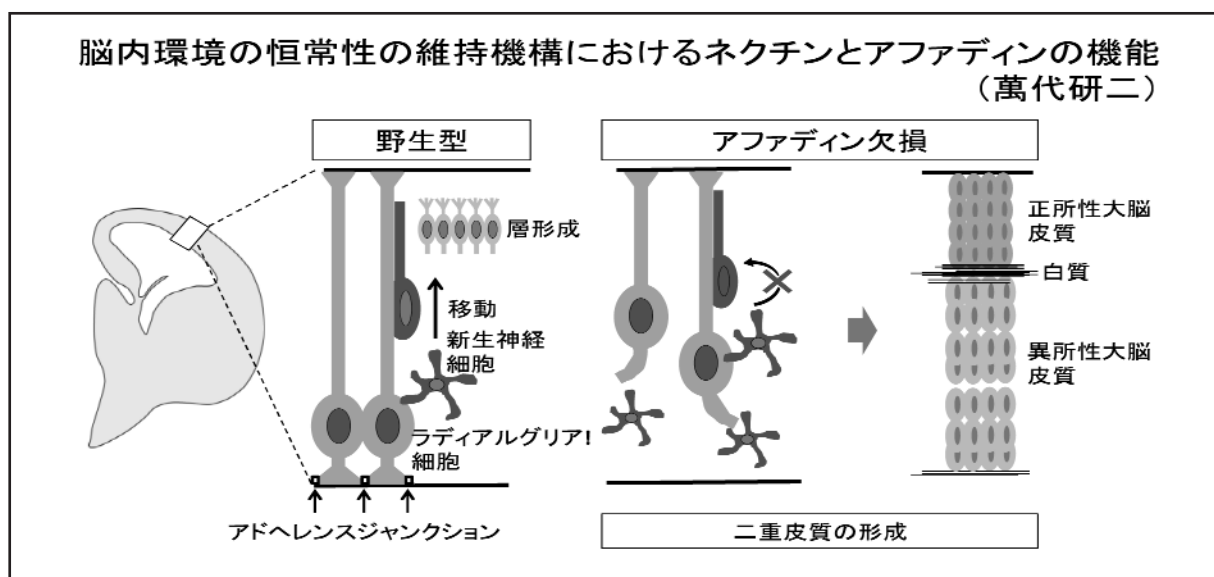
個体発生期のマウス脳では、アフアディンは、ラディアルグリア細胞に発現しており、神経幹細胞から神経細胞への分化と大脳皮質の層形成にも関与していると考えられた。そこで、アフアディン遺伝子欠損マウスを用いて、大脳皮質の発生過程におけるアフアディンの機能を解析した。従来法で作成したアフアディン欠損マウスは、外胚葉と中胚葉に由来する組織の発生の異常によって胎生10.5日以降生存しないが、アフアディンをNestin-CreやEmx1-Cre依存性に欠損させた条件付き遺伝子欠損マウスでは胎生致死が回避された。

**(1) 脳内環境の恒常性の維持におけるアフアディンの機能：**  
Nestin-Cre マウスはCreリコンビナーゼを神経細胞やグリア細胞の前駆細胞に発現する。Nestin-Cre 依存性のアフアディン

ン欠損マウスは、出生後、早期に水頭症を発症して死亡した。このアフアディン欠損マウスでは、中脳水道と第3脳室表面に存在する脳室上衣細胞の前駆細胞であるラディアルグリア細胞のアドヘレンスジャンクションが形成されず、脳室上衣細胞が脳室表面から消失していた。さらに、中脳水道や第3脳室腹側部周辺の神経組織が癒合し、中脳水道が狭窄し、第3脳室腹側部が閉塞していた。その結果、脳髄液還流が障害されて脳圧が亢進し、水頭症を発症したと考えられた。脳圧は脳内環境の恒常性の維持のために厳密に制御されており、脳圧亢進は重篤な合併症を引き起こす。このように、アフアディンは脳内環境の恒常性の維持のための物質的基盤として機能していることがわかった。

## (2) 大脳皮質の層形成におけるアフアディンの機能：

Emx1-Cre マウスはCreリコンビナーゼを大脳皮質と海馬の神経細胞やグリア細胞の前駆細胞に発現する。Emx1-Cre 依存性のアフアディン欠損マウスは、水頭症を発症しなかったが、約30%は離乳時期前後に不明の原因で死亡した。Emx1-Cre 依存性アフアディン欠損マウスの大脳皮質は、皮質下帯状異所性灰白質（別名、二重皮質）を形成していた。すなわち、正所性の大脳皮質下の白質層の下部に、もう一層の異所性の大脳皮質が形成されていた。正所性大脳皮質は正常の大脳皮質に比べて菲薄化していたが、層構造は維持されていた。一方、異所性大脳皮質は種々の神経細胞からなる無秩序な細胞の塊を形成していた。このアフアディン欠損マウスの胎仔期の大脳皮質では、ラディアルグリア細胞のアドヘレンスジャンクションが破壊されており、その脳室面側の放射状突起の方向や形態の異常と、新生神経細胞の移動の異常が認められた。したがって、新生神経細胞の移動のための、ラディアルグリア細胞の放射状突起による足場の形成が障害されたため、新生神経細胞のロコモーションによる移動が正常におこなわれず、異所性大脳皮質が形成されたと考えられた。これらの結果から、アフアディンは、



ラディアルグリア細胞の放射状突起の形態形成を介して新生神経細胞の口コモーションを制御することによって、大脳皮質の形成機構に関与していることが明らかになった。

### 結語

アフアディンは上皮細胞のアドヘレンスジャンクションの形成を制御する機能に加えて、脳の形態形成や脳内環境の恒常性の維持においても重要な機能を果たしていることを見出した。一方、アフアディンの発現が統合失調症の患者脳において低下していることや、アフアディンがPINK1/Parkinのシグナルを調節することが報告され、アフアディンがこれらの疾患の発症や病態の進展に関与している可能性がある。

### 主要研究成果

#### 原著論文

1. Yamamoto H, Mandai K, Konno D, Maruo T, Matsuzaki F, Takai Y. Impairment of radial glial scaffold-dependent neuronal migration and formation of double cortex by genetic ablation of afadin. **Brain Res** 1620:139-152 (2015).
2. Yamamoto H, Maruo T, Majima T, Ishizaki H, Tanaka-Okamoto M, Miyoshi J, Mandai K, Takai Y. Genetic deletion of afadin causes hydrocephalus by destruction of adherens junctions in radial glial and ependymal cells in the midbrain. **PLoS One** 8:e80356 (2013).

#### 総説

1. Mandai K, Rikitake Y, Mori M, Takai Y. Nectins and nectin-like molecules in development and disease. **Curr Top Dev Biol** 112:197-231 (2015).
2. Mandai K, Rikitake Y, Shimono Y, Takai Y. Afadin/AF-6 and canoe: roles in cell adhesion and beyond. **Prog Mol Biol Transl Sci** 116:433-454 (2013).



# 遅発性小脳失調モデル動物を用いた軸索変性機序の解明

(平成24年度～平成27年度)

公募

岡野 ジェイムス洋尚

東京慈恵会医科大学・再生医学研究部・教授



## 研究の背景と目的

神経特異的RNA結合タンパク質Huファミリーの一つであるHuCのノックアウト(KO)マウスは、正常に発育するが生後7ヶ月になると歩行障害などの運動失調症状を呈する。このマウスの小脳では神経回路が正常に形成されたのちに遅発性にシナプス脱落を伴ったプルキンエ細胞の軸索変性が起こる。球状に変性した軸索にはミトコンドリアやAPPが貯留していることから軸索輸送の障害が疑われている。軸索が球状に肥大する変性所見は様々な神経疾患で観察されるが、神経症状発症との関連性については不明な点が多い。軸索に球状変性が出現する分子機序も詳細はわかっていない。さらに、なぜ多くの神経変性疾患が加齢に伴って発症するのかという大きな疑問も残されている。本研究では、HuCの欠失による遅発性小脳失調モデルマウスの解析を通して、軸索変性の分子メカニズムを解明するとともに、軸索の恒常性維持機構を明らかにする。

## 研究成果

### (1) 軸索変性モデルの解析

電子顕微鏡解析により、球状に膨満した変性軸索の内部にはミトコンドリアや重積した膜オルガネラ、小胞体、時には核が充満し、細胞質に局在すべき細胞内小器官が軸索に流出している所見がみられた。これは軸索起始部(Axon Initial Segment: AIS)に存在する細胞質/軸索拡散障壁の破綻を示唆している。また軸索輸送されることが知られるAPPやNF-Lも貯留していることから軸索輸送の障害も示唆された。7ヶ月齢の個体では、プルキンエ細胞から小脳核への投射線維のほとんどが失われていたが、生後1ヶ月齢では、軸索は正常に投射しており、軸索の形態にも異常は認められなかった。このこと

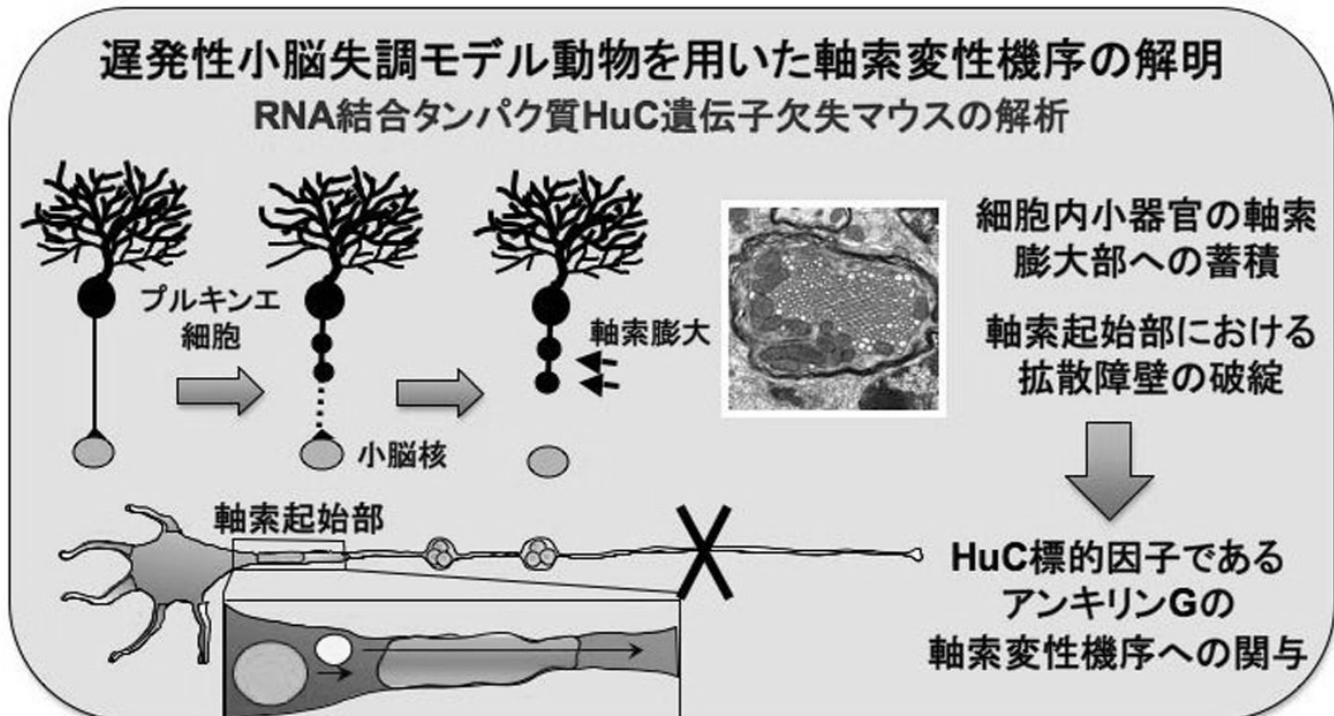
から、小脳神経回路が正常に形成されたのちに遅発性にシナプス脱落を伴った軸索変性が起こり、失調症状が出現することがわかった。

### (2) 軸索輸送の障害

生後1日齢のマウス小脳由来培養プルキンエ細胞にレンチウイルスベクターを用いてL7プロモーター/Mito-Venusを導入しタイムラプスイメージングにより観察したところ、軸索輸送速度がHuC KOにて有意に低下していることがわかった。さらに軸索膨大部においては、ミトコンドリアの移動方向が乱れ、抹消へのミトコンドリアの輸送が激減しているなど軸索輸送の障害を示す知見が得られた。

### (3) HuC標的RNAの同定

Huタンパク質は標的RNAの特定の配列を認識して結合し、その翻訳調節、安定化、選択的スプライシング制御を行うことが知られている。しかし、*in vivo*において直接Huタンパク質に結合している標的RNAの網羅的解析は行われていなかった。我々はまずHuタンパク質が特異的に認識するRNA配列を同定するため、*in vitro selection*法(SELEX法)を施行した。RNA配列ライブラリーからHuに結合する配列を精製したのち、逆転写反応・PCRを用いて指数関数的に増幅し、この過程を複数回繰り返すことによって、高親和性に結合する配列を濃縮することが可能である。52merランダム配列ライブラリーを使ったSELEX法により、Huタンパク質が高親和性に結合する基質RNA配列(GUUGUリピート)の同定に成功した。さらに、*in vivo*における標的RNAを網羅的に同定するために、HITS-CLIP法を行った。細胞からRNA結合タンパク質を免疫



沈降し、その免疫沈降産物に含まれるRNAを精製・cDNA化したのち直接シーケンスする方法である。標的配列には、GAP-43やp21/waf1 RNAの3'非翻訳領域など既知の標的のみならず、多くの遺伝子のイントロン配列が含まれていた。同定された標的の多くは軸索や樹状突起の機能制御に関わる因子であった。また、Huタンパク質はAnkyrinGのイントロン配列に結合し、近傍のエクソン34の選択的スプライシングを調節していることが示された (Ince-Dunn G, Okano HJ et al. 2012)。

#### (4) 軸索起始部の拡散障壁能の低下

ニューロンの軸索起始部 (AIS) は特有の分子群が集積した構造をもち、活動電位の発生現場であると同時に、細胞体・軸索間の拡散障壁としても機能する。マウスニューロンにおいて拡散障壁は生後9日目までに完成するが、発生段階では軸索伸長に必要な構造タンパク質を大量に輸送するため拡散障壁がないほうが有利である。一方、成熟したニューロンにおいては軸索輸送障害の原因となり得る不必要な大型タンパク質の軸索への拡散を防ぐ必要がある。そのため拡散障壁の形成時期は、厳格にニューロン分化・成熟のタイムテーブルに従って制御されている。我々は障壁完成時期に一致してAISの構造及び機能に必要な不可欠な足場タンパク質AnkyrinGのスプライシングパターンが劇的に変化することを発見した。またHuCがエクソン34の選択的スプライシングを制御することを明らかにした。AnkyrinGの選択的スプライシング制御機能およびAnkyrinGの機能転換による拡散障壁形成の時間制御機構の一端が明らかになってきた。

#### 結語

ヒトの変性疾患と同様に高年齢になってから発症するHuC KOマウスはヒトの病態を研究する上で極めてユニークかつ有用な小脳変性モデル動物であり、軸索の変性および恒常性維持のメカニズムに関する多くの分子生物学的知見を与え、加齢に伴う軸索変性プロセスの分子機構の解明にも貢献した。

#### 主要研究成果

##### 原著論文

1. Komaki Y, Hikishima K, Shibata S, Konomi T, Seki F, Yamada M, Miyasaka N, Fujiyoshi K, Okano HJ, Nakamura M, Okano H. (2016) Functional brain mapping using specific sensory-circuit stimulation and a theoretical graph network analysis in mice with neuropathic allodynia. *Sci Rep.* **6**: 37802.
2. Hasegawa M, Hara-Miyauchi C, Ohta H, Sakimura K, Okano H, Okano HJ. (2016) Analysis of RNA metabolism in peripheral WBCs of TDP-43 KI mice identifies novel biomarkers of ALS. *Neurosci Res.* **106**: 12-22.
3. Hayashi S, Yano M, Igarashi M, Okano HJ, Okano H. (2015) Alternative role of HuD splicing variants in neuronal differentiation. *J Neurosci Res.* **93**: 399-409.
4. Nakamura S, Igarashi M, Kinoshita M, Okano HJ, Okano H. (2014) Proposing a new RNA quadruplex structure: j-motif, with possible links to neural development. *J Biochem.* **155**: 385-392.
5. Ince-Dunn G, Okano HJ, Jensen KB, Park WY, Zhong R, Ule J, Mele A, Fak JJ, Yang C, Zhang C, Yoo J, Okano H, Noebels JL, Darnell RB. (2012) HITS-CLIP reveals nElav (Hu) proteins regulate RNA splicing and abundance to control brain glutamate levels and neuronal excitability. *Neuron.* **75**: 1067-1080.



# ミトコンドリア機能と破綻による神経疾患、ミトコンドリア機能異常と神経疾患

(平成24年度～平成27年度)



公募

柳 茂 東京薬科大学・生命科学部・教授

## 研究の背景と目的

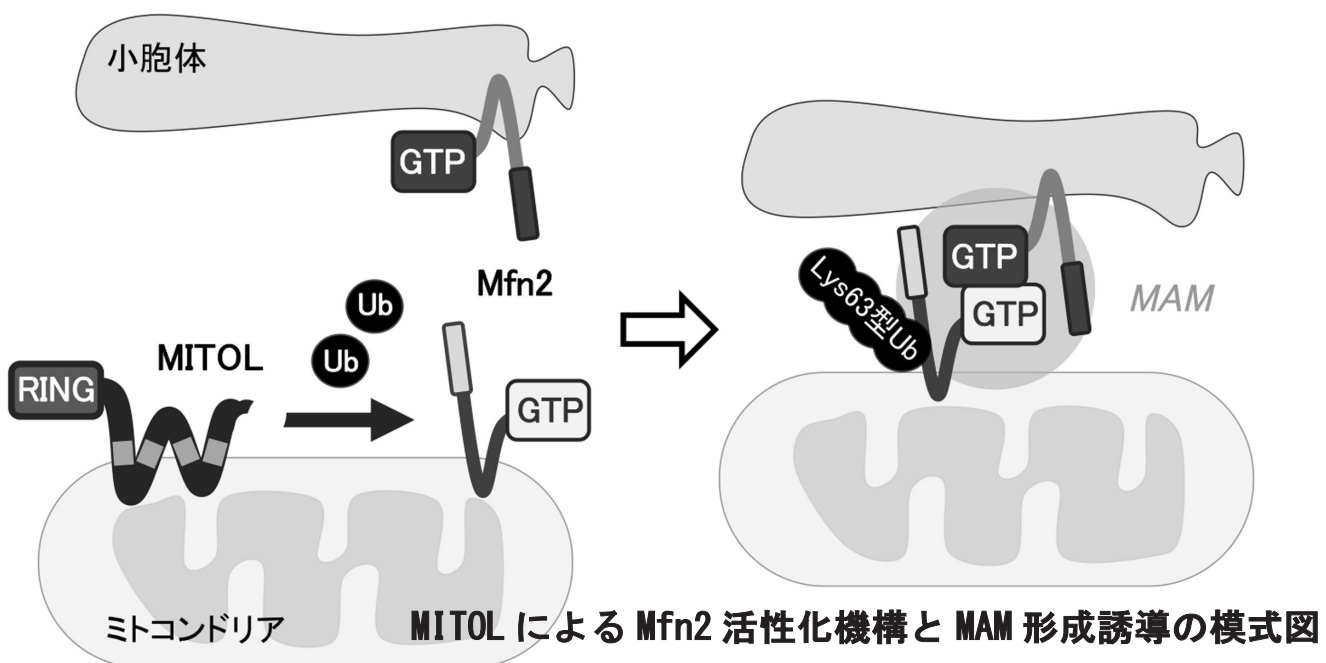
近年、膜接触はオルガネラ間ネットワークの中で最も注目される研究分野であり、とくにミトコンドリア-小胞体間の膜接触部位 Mitochondria-Associated ER membrane (MAM) に関する研究は目覚ましく進展しつつある。しかしながら、MAMの制御機構や疾患における生理機能など未だ不明な点が多い。筆者らは以前、ミトコンドリア膜型ユビキチンリガーゼ MITOLがMAMの繫留因子である Mitofusin-2 (Mfn2) を活性化して、MAMの形成を促進することを報告した。本研究は生体内のMAMの構造と役割、さらにアルツハイマー病におけるMAMの機能解明を目的とする。

## 研究成果

(1) 生体内のMAM形成とMITOLの関与：Mfn2によるMAM形成、特にMITOLによるLys63結合型ユビキチン修飾によるMAM形成誘導の本当の実態を解明するため、最新の電子顕微鏡技術を駆使し、MAMの三次元解析を行った。解析には Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy (SBF-SEM) による連続切片の電子顕微鏡撮像技術を用い、ミトコンドリアおよび小胞体を三次元的に再構築することで、両オルガネラ間の膜接触を立体的に検証することを試みた。実験材料としては、神経特異的なMITOL欠損マウスの海馬神経細胞を用いてMAMの形成の変化について解析を行った。野生型マウスの神経細胞内には枝分かれした複雑かつ巨大ミトコンドリアが多数存在しており、MAMの個数や総面積がミトコンドリアの大きさと相関性を示した。これは、巨大なミトコンドリアを形成・維持するためには大量に物質輸送を行う必要があり、そのためにMAMが発達したと考えられる。また単一箇所だけでなく複数箇所小胞体と接触することにより、小胞体から供

給される物質をミトコンドリア全体で均等に配分するというミトコンドリアの成熟や維持における戦略であると推察される。実際にMITOLを欠損した海馬神経細胞ではミトコンドリアの大きさが半減しており、枝分かれも乏しい単純な構造を示した。これはMITOLの欠損によるMAMの形成不全によって、小胞体から効率よく物質輸送を受けることができなかつたためと考えられる。さらに、MAM総面積とミトコンドリアの大きさの相関性が消失していた。この事実はMITOLによるMAMの形成制御がミトコンドリアの発達に必須であることを示唆している。われわれの三次元的解析により、生体内においてもMITOLによるMfn2のユビキチン化は、小胞体とミトコンドリアの繫留を促すことが示された。

(2) アルツハイマー病の病態におけるMAMの役割：神経特異的なMITOL欠損マウスとアルツハイマー病モデルマウスと交配することで、MAMの形成が増加しないアルツハイマー病モデルマウスを作製した。このマウスと通常のアルツハイマー病モデルマウスの病態を比較することで、アルツハイマー病におけるMAMの役割について解析した。MITOL欠損アルツハイマー病モデルマウスにおいてAβの凝集性が大きく変化していた。MITOLの欠損により、Aβの凝集塊および線維化が顕著に抑制されていたのである。Aβの産生量には有意な差が認められなかったため、報告されていたようなMAM依存的なAβの産生調節はMITOL欠損アルツハイマー病モデルマウスでは観察されなかった。重要なことは、Aβの産生量には影響を及ぼさないにもかかわらず、線維性の凝集塊は低下していたことである。予想通り、MITOL欠損アルツハイマー病モデルマウスでは可溶性Aβが増加していた。以前より、可溶性Aβは非常に高い神経毒性を発揮することが示唆されていた。また、Aβの



凝集塊を形成しないにもかかわらず重篤なアルツハイマー病を呈する患者が存在すること、あるいは逆に、 $A\beta$ の凝集塊が非常に多く観察されるにもかかわらず軽度なアルツハイマー病患者が存在することより、 $A\beta$ の凝集が神経細胞に対して保護的に働いている可能性も考えられていた。今回のわれわれの研究成果は、MITOL欠損アルツハイマー病モデルマウスにおいて神経細胞死の亢進など病態悪化の所見を得ているので、線維性 $A\beta$ の凝集塊は神経細胞の保護に働くという仮説を強く支持している。MITOL欠損による影響はMAMの形成不全だけではないので、現時点では明確な結論は得られないが、アルツハイマー病の病態におけるMAMの重要性はこれまで報告されてきた $A\beta$ の産生調節やミトコンドリアへの過剰カルシウム流入ではなく、直接的あるいは間接的な $A\beta$ の凝集性制御である可能性が考えられる。これはアルツハイマー病におけるMAMの生理機能において新しい視点を提供するものである。

## 結語

生体内においてMAMはミトコンドリアの成熟を誘導している可能性が示された。また、神経特異的MITOL欠損マウスにおいてMAMの破綻が観察されたことより、生体内においてもMITOLはMfn2をユビキチン化して小胞体とミトコンドリアの繫留を促すことが示された。また、アルツハイマー病においてMAMは $A\beta$ の凝集性を制御している可能性が示唆された。今後、生体内におけるMAMの役割が詳細に解明されれば、アルツハイマー病の新しい治療法の確立に役立つことが期待される。

## 主要研究成果

### 原著論文

1. Fukud, T, Nagashima S, Abe T, Kiyonari H, Inatome R, Yanagi S. Rescue of CAMDI deletion-induced delayed radial migration and psychiatric behaviors by HDAC6 inhibitor. **EMBO Rep** 17: 1785-1798 (2016)
2. Matsushita N, Suzuki M, Ikebe E, Nagashima S, Inatome R, Asano K, Tanaka M, Matsushita M, Kondo E, Iha H, Yanagi S. Regulation of B cell differentiation by the ubiquitin-binding protein TAX1BP1. **Sci. Rep.** 6: 31266 (2016)
3. Mizushima W, Takahashi H, Watanabe M, Kinugawa S, Matsushima S, Takada, S, Yokota T, Furihata T, Matsumoto J, Tsuda M, Chiba I, Nagashim, S, Yanagi S., Matsumoto M, Nakayama ., Tsutsui H, Hatakeyama S. The novel heart-specific RING finger protein 207 is involved in energy metabolism in cardiomyocytes. **J Mol Cell Cardiol** 100: 43-53 (2016)
4. Hoshiya Y, Toda T, Ebisu H, Wakimoto M, Yanagi S, Kawasaki H. Sox11 balances dendritic morphogenesis with neuronal migration in the developing cerebral cortex. **J Neurosci** 36: 5775-8784 (2016)
5. Saida H, Matsuzaki Y, Takayama K, Iizuka A, Konno A, Yanagi S, Hirai H. One-year follow-up of transgene expression by integrase-defective lentiviral vectors and their therapeutic potential in spinocerebellar ataxia model mice. **Gene Ther** 21: 820-827 (2014)
6. Homma M, Nagashima S, Fukuda T, Yanagi S, Miyakawa H, Suzuki E, Morimoto T. Downregulation of Centaurin gamma1A increases synaptic transmission at Drosophila larval neuromuscular junctions. **Eur J Neurosci** 40: 3158-3170 (2014)
7. Konno A, Shuvaev AN, Miyake N, Miyake K, Iizuka A, Matsuura S, Huda F, Nakamura K, Yanagi S, Shimad, T, Hira, H. Mutant Ataxin-3 with an abnormally expanded polyglutamine chain disrupts dendritic development and metabotropic glutamate receptor signaling in mouse cerebellar purkinje cells. **Cerebellum** 13: 29-41 (2014)
8. Nishiyama T, Hasegawa E, Yanagi S, Kudo Y, Hamada R, Matsumura N, Tomino M, Muromachi Y, Hatakeyama K, Uchino H. Simultaneous measurement of cytosolic and mitochondrial  $Ca^{2+}$  during ischemia in mice whole-brain slice preparation and its application to drug evaluation. **Acta Neurochir Suppl** 118: 65-70 (2013)
9. Sugiura A, Nagashima S, Tokuyama T, Amo T, Matsuki Y, Ishido S, Kudo Y, McBride HM, Fukuda T, Matsushita T, Inatome R, Yanagi S. MITOL regulates endoplasmic reticulum-mitochondria contacts via Mitofusin2. **Mol Cell** 51: 20-34 (2013)

## 総説

1. Tokuyama T, Yanagi S. Mitochondrial ubiquitin ligase MITOL/MARCH5. **Encyclopedia of Signaling Molecules, 2nd Edition** (2016)
2. Nagashima S, Tokuyama T, Yonashiro R, Inatome R, Yanagi S. Roles of mitochondrial ubiquitin ligase MITOL/MARCH5 in mitochondrial dynamics and diseases. **J Biochem** 155: 273-279 (2014)



# 海馬歯状回の恒常性維持機能の理解とその神経細胞内メカニズムの解明

(平成24年度～平成25年度)



公募

宮川 剛

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・教授

## 研究の背景と目的

脳にはシステムの恒常性を維持するための機能が備わっている。しかしながら、強い刺激が加わると、システムが破綻をきたし、病的な脳内環境が形成されてしまう。うつ病や双極性障害などの精神疾患は、システムの恒常性維持機能が遺伝的脆弱性と環境的ストレスの相互作用によって破綻した状態であると捉えることができる。海馬は、そのようなシステムの恒常性維持に重要な役割を果たしていると考えられる。我々はこれまでに、精神疾患様の行動異常を示す複数の遺伝子改変マウスにおいて、海馬歯状回の神経細胞が成体であるにもかかわらず未成熟な状態にあるという現象「未成熟歯状回」を見出した。また、抗うつ薬の慢性投与によって、海馬歯状回の成熟神経細胞が未成熟な状態に舞い戻る「脱成熟」という現象も見出し、海馬歯状回神経細胞の成熟度が様々な遺伝・環境要因によって双方向性に変化することを世界に先駆けて発見した。このような双方向性の成熟度変化は神経細胞レベルでのホメオスタティック可塑性の一例であり、システムレベルでの恒常性の維持・破綻に重要な役割を果たしていると考えられるが、その詳細については未だ不明な点が多い。本研究では、この海馬歯状回における神経細胞レベルでの双方向性の成熟度変化が脳のシステムレベルでの恒常性の維持・破綻とどのような関係にあるのかを明らかにし、それらのシステムに関与する神経細胞内分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 研究成果

**(1) 歯状回神経細胞の成熟度変化とシステム恒常性維持機能の関連**：歯状回神経細胞の成熟度変化とシステムの恒常性維持機能の関連を調べるために、未成熟歯状回を持つ  $\alpha$  CaMKIIヘテロ欠損マウスや Schnurri-2 欠損マウス、SNAP-25 ノックインマウスに対して各種の心理的・身体的ストレスを負荷し、ストレス反応の程度を調べた。未成熟歯状回を持つマウスでは、拘束ストレスや不安様行動の測定装置として知られる高架式十字迷路へ暴露すると、血中コルチコステロン濃度が野生型マウス

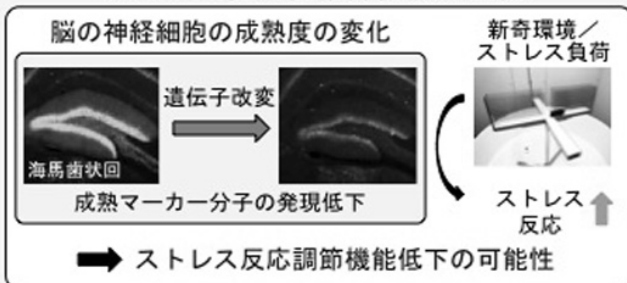
スに比べて高くなり、ストレス反応が亢進していることが示唆された。さらに、これらの遺伝子改変マウスを対象にデキサメタゾン (DEX) 抑制テストを行い、ストレス反応の調節に重要な視床下部?下垂体?副腎 (HPA) 系反応に対する海馬の抑制的調節機能を評価した。その結果、未成熟歯状回を持つマウスでは、DEXを投与しても血中コルチコステロン濃度が高いままで低下しないことが明らかとなった。これはHPA系反応の抑制機能に障害があることを示唆している。これらの結果から、未成熟歯状回という細胞レベルでの変化がストレスに対するシステムレベルでの恒常性維持機能の破綻と関連していることが示唆された。しかし、歯状回の神経細胞を未成熟な状態へと戻す作用がある抗うつ薬を慢性的に投与すると、前頭皮質の特定の抑制性神経細胞においても「脱成熟」が誘導されることを見出した。歯状回以外の脳細胞の成熟度変化がHPA系反応の異常を引き起こしている可能性については今後検討する予定である。

**(2) 歯状回神経細胞の成熟度操作法の確立**：海馬歯状回神経細胞の成熟度変化とシステムレベルでの恒常性維持機能の関係を明らかにするためには、神経細胞の成熟度を変化させる要因の特定や成熟度を操作する手法の確立が必要不可欠である。そこで、歯状回で成熟度変化を引き起こす操作法の一つとしてストレス刺激に着目した。野生型マウスに社会的敗北ストレスや拘束ストレスなどの各種ストレスを慢性的に負荷すると、海馬において神経細胞が未成熟な状態であることを示唆する遺伝子発現変化パターンを示すようになることを見出した。さらに、歯状回の神経細胞を特異的に刺激することで成熟度変化を引き起こす方法として光遺伝学的操作法の確立を図った。この操作法には、歯状回の神経細胞特異的に光受容チャネルであるチャネルロドプシン2 (ChR2) を発現するマウスを作製する必要があったため、ChR2 flox マウスと歯状回特異的Cre発現マウスを入手し交配を行った。作製した歯状回神経細胞特異的ChR2発現マウスの歯状回に複数回の光刺激を与えたところ、

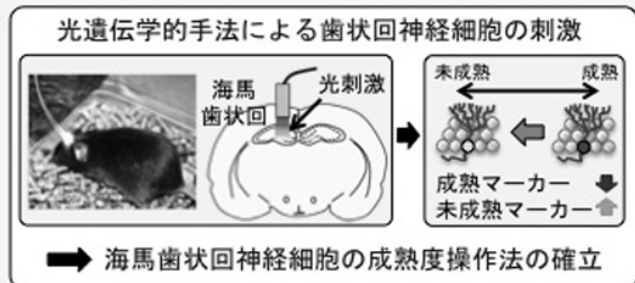
## 海馬歯状回の恒常性維持機能の理解とその神経細胞内メカニズムの解明

(代表：宮川 剛)

### 1. 脳の神経細胞の成熟度変化によるシステム恒常性維持機能の破綻



### 2. 歯状回の細胞成熟度操作法の開発



歯状回の神経細胞の成熟度変化から脳内環境の維持・破綻メカニズムの解明へ



歯状回神経細胞に「脱成熟」が誘導されることが遺伝子発現解析やタンパク発現解析から明らかとなり、神経細胞成熟度の操作法の確立に成功した。今後、この解析手法を用いることで歯状回神経細胞の成熟度変化とシステムの恒常性維持機能の直接的な関係を明らかにできると考えられる。

**(3) 精神神経疾患モデルマウスにおける歯状回神経細胞の成熟度変化**：本領域の班員との共同研究により、複数の精神神経疾患モデルマウスにおいても、歯状回の成熟度が変化していることを確認した。このことから、歯状回の成熟度異常をともなう脳内環境の恒常性維持機能の破綻が、様々な精神・神経疾患に関与している可能性があることが示された。

### 結語

海馬歯状回の神経細胞が未成熟な状態にある複数系統の遺伝子改変マウスでは、ストレス負荷によるHPA系の反応が亢進していることが示唆され、歯状回の成熟度とシステムの恒常性維持機能との間に関連があることを示す結果が得られた。歯状回の成熟度を変化させる要因の一つに神経細胞の過活動があり、光遺伝学的手法を利用して歯状回の神経細胞を選択的に刺激し神経活動を誘導すると、細胞成熟度を操作できることが分かった。また、本領域内での共同研究により、脳内環境が破綻した各種モデルマウスの歯状回でも成熟度が変化していることを確認した。本研究により、海馬歯状回の神経細胞の成熟度変化という細胞レベルでの変化がシステムの恒常性維持機構の一端を担っていることが明らかとなった。確立した成熟度操作法を活用することにより、今後、恒常性維持機構の解明がさらに進むと期待される。

### 主要研究成果

#### 原著論文

1. Ohira K, Takeuchi R, Shoji H, Miyakawa T. Fluoxetine-induced cortical adult neurogenesis. **Neuropsychopharmacology** 38: 909-920 (2013).
2. Takao K, Kobayashi K, Hagihara H, Ohira K, Shoji H, Hattori S, Koshimizu H, Umemori J, Toyama K, Nakamura HK, Kuroiwa M, Maeda J, Atsuzawa K, Esaki K, Yamaguchi S, Furuya S, Takagi T, Walton NM, Hayashi N, Suzuki H, Higuchi M, Usuda N, Suhara T, Nishi A, Matsumoto M, Ishii S, Miyakawa T. Deficiency of schnurri-2, an MHC enhancer binding protein, induces mild chronic inflammation in the brain and confers molecular, neuronal, and behavioral phenotypes related to schizophrenia. **Neuropsychopharmacology** 38: 1409-1425 (2013).
3. Ohira K, Takeuchi R, Iwanaga T, Miyakawa T. Chronic fluoxetine treatment reduces parvalbumin expression and perineuronal nets in gamma-aminobutyric acidergic interneurons of the frontal cortex in adult mice. **Mol Brain** 6: 43 (2013).
4. Hattori S, Hagihara H, Ohira K, Aoki I, Saga T, Suhara T, Higuchi M, Miyakawa T. In vivo evaluation of cellular activity in  $\alpha$ CaMKII heterozygous knockout mice using manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI). **Front Integr Neurosci** 7: 76 (2013).

### 総説

1. Hagihara H, Takao K, Walton NM, Matsumoto M, Miyakawa T. Immature dentate gyrus: an endophenotype of neuropsychiatric disorders. **Neural Plast** 2013: 318596 (2013).



# 転写因子NF-Yを介した新たな神経維持・変性機構の解明

(平成24年度～平成25年度)



公募

山中 智行

同志社大学・脳科学研究科・特任准教授

## 研究の背景と目的

転写因子NF-Yは、NF-YA, NF-YB, NF-YCという3つのサブユニットから構成され、CCAATモチーフに結合し、タンパク質シャペロン等を含め様々な遺伝子の発現を調節する。近年、我々は、神経変性疾患の1つであるハンチントン病のモデルマウス脳において、その病因タンパク質の凝集によりNF-Yの活性が低下し、結果、シャペロン遺伝子の発現が減少することを見出した (Yamanaka T et al. EMBO J. 2008)。この発見を機に、NF-Yが神経細胞の維持・変性に何らかの形で関わっていることが期待されていた。

## 研究成果

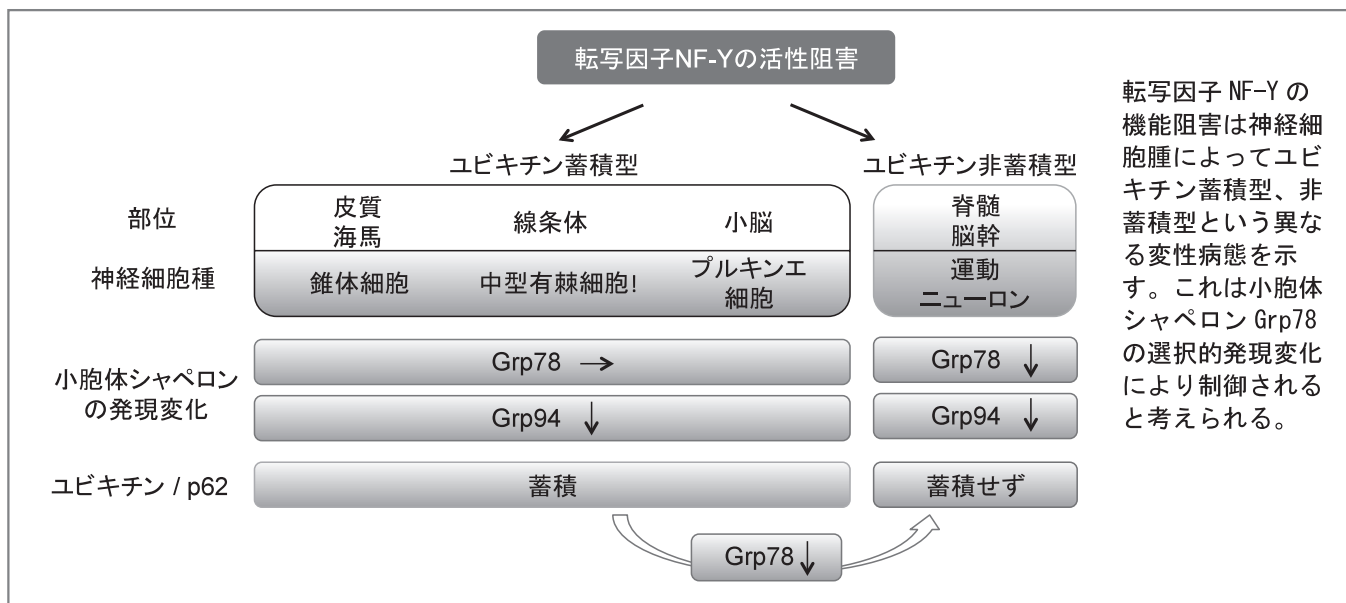
(1) NF-Y の構成因子であるNF-YAを大脳神経細胞で欠損させたマウスを作製し、NF-Yの機能解析を試みた。その結果、このマウスでは、体重の減少や寿命の短縮と共に、神経の脱落及び顕著な脳萎縮を示すことが観察され、NF-Yが大脳神経細胞の維持・生存に必須であることが初めて明らかとなった。興味深いことに、変性神経細胞では、タンパク質分解に関わるユビキチンやp62が不溶化していること、これらが膜タンパク質と共に小胞体に集積していることを発見した。また小胞体自体も、滑面小胞体というリボソームの付着していないものが異常に増加し、細胞核周囲に集積していることも明らかにした。さらに、変性神経細胞では、小胞体シャペロン等の発現が低下していることも見出した。以上のことから、NF-Yは、神経細胞の小胞体の構造と恒常性維持に関わっており、その機能破綻は、膜タンパク質の不溶化・蓄積と共に小胞体の顕著な集積という、これまでにない新規の神経変性病態を示すことを明らかにした (Yamanaka T et al. Nat Commun. 2014)。

これまでに、多くの神経変性疾患で、異常タンパク質が不溶性の線維性凝集体を形成し、ユビキチンやp62と共に封入体と呼ばれる構造体を形成することが知られていたが、本研究によ

り、不溶化膜タンパク質が、封入体を形成することなく小胞体に蓄積することを示し、小胞体が異常膜タンパク質の蓄積する「場」となり得ることを初めて見出した。これは、小胞体の劇的な質的・量的変化と関連していると考えられる。今後の解析により、新たな膜タンパク質蓄積病態の詳細とその細胞応答機構や小胞体膜の代謝機構が明らかとなると期待される。

(2) NF-Yが球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) でも活性阻害されるという報告をふまえ、マウス脊髄の運動神経細胞でNF-Yの活性を阻害しその影響を観察した。その結果、運動機能異常が観察されるとともに、運動神経細胞が脱落することを見出した。興味深いことに、運動神経細胞ではユビキチンの蓄積は観察されなかった。詳細な解析の結果、小胞体の恒常性に必須の遺伝子 Grp78 の発現が抑制されていることがわかった。NF-Y 活性阻害による Grp78 の発現抑制は、大脳や小脳の神経細胞では観察されず、またこれらの神経細胞で Grp78 の発現を人為的に抑制すると運動神経細胞様の病態を示した。よって、Grp78 の発現抑制は運動神経細胞に特異的な変性メカニズムに関与していると考えられる (Yamanaka T et al. Sci Rep. 2016)。

本研究から、Grp78 遺伝子の発現抑制が運動神経細胞の変性に関わっていることが明らかになってきた。今後は、まず Grp78 が球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) 等の運動神経疾患で発現抑制されているか確認し、Grp78 遺伝子の治療標的因子としての可能性について調べていく必要がある。ただ、小胞体の機能異常は、上記の球脊髄性筋萎縮症を含め、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、脊髄性筋萎縮症 (SMA) などの主要な運動神経疾患でも報告されている。小胞体の機能を回復し恒常性を保持することが、運動神経疾患の治療に有用になると期待される。



(3) E-boxモチーフに結合する転写因子USF (upstream stimulating factor) について、NF-Yとの相互作用が報告されていたこともあり、その神経細胞系での網羅的解析を行った。その結果、USFがリソソーム遺伝子のプロモーター領域に結合し、その発現を制御することを明らかとし、リソソーム制御に関わる新しい分子機構の存在が示唆された (Yamanaka T et al. FEBS J. 2016)。リソソームの異常はアルツハイマー病・パーキンソン病やリソソーム蓄積病などの神経疾患で報告されており、本研究成果が、これら疾患の原因究明や治療法探索につながる事が期待される。

## 結語

多くの神経変性疾患では中枢神経系の異なる領域が選択的に障害される。それぞれの障害部位に着目した変性メカニズムの解析は進んでいるものの、これらが異なる神経細胞種でも共通の病態に関わるのか等、その包括的理解は得られていない。

本研究での中枢神経系に着目した包括的解析から、NF-Yの機能障害は細胞種特異的な小胞体シャペロンの発現制御を介して、ユビキチン蓄積型・非蓄積型という異なる変性病態を引き起こすことが明らかとなった。細胞種依存的な遺伝子発現制御は、他の神経変性シグナルについても異なる応答を引き起こすと期待され、神経変性疾患での領域選択的な病態の理解につながると期待される。

## 主要研究成果

### 原著論文

1. Yamanaka T (co-corresponding author), Tosaki A, Miyazaki H, Kurosawa M, Koike M, Uchiyama Y, Maity SN, Misawa H, Takahashi R, Shimogori T, Hattori N, Nukina N. Differential roles of NF-Y transcription factor in ER chaperone expression and neuronal maintenance in the CNS. *Sci Rep.* 2016 Sep 30;6:34575.
2. Misawa H, Inomata D, Kikuchi M, Maruyama S, Moriawaki Y, Okuda T, Nukina N, Yamanaka T. Reappraisal of VAcHT-Cre: Preference in slow motor neurons innervating type I or IIa muscle fibers. *Genesis.* 2016 Sep 6.
3. Yamanaka T (co-corresponding author), Tosaki A, Kurosawa M, Shimogori T, Hattori N, Nukina N. Genome-wide analyses in neuronal cells reveal that upstream transcription factors regulate lysosomal gene expression. *FEBS J.* 2016 Mar;283(6):1077-87.
4. Yamanaka T, Wong HK, Tosaki A, Bauer PO, Wada K, Kurosawa M, Shimogori T, Hattori N, Nukina N. Large-scale RNA interference screening in mammalian cells identifies novel regulators of mutant huntingtin aggregation. *PLoS One.* 2014 Apr 4;9(4):e93891
5. Yamanaka T, Tosaki A, Kurosawa M, Matsumoto G, Koike M, Uchiyama Y, Maity SN, Shimogori T, Hattori N, Nukina N. NF-Y inactivation causes atypical neurodegeneration characterized by ubiquitin and p62 accumulation and endoplasmic reticulum disorganization. *Nat Commun.* 2014 Feb 25;10.1038/ncomms4354.
6. Yamanaka T (co-corresponding author), Tosaki A, Kurosawa M, Akimoto K, Hirose T, Ohno S, Hattori N, Nukina N. Loss of aPKC  $\lambda$  in differentiated neurons disrupts the polarity complex but does not induce obvious neuronal loss or disorientation in mouse brains. *PLoS One.* 2013 Dec 31;8(12):e84036.

## 総説

1. 山中智行「脳神経細胞の生存に関わる新規遺伝子の発見」理大科学フォーラム、2015年8月、374号 30-34

2. 山中智行、貫名信行「転写因子NF-Y欠損による新たな神経変性病態」医学のあゆみ、2014年10月、251巻4号317-8



# ストレス条件下における選択的オートファジーの制御機構

(平成24年度～平成25年度)



公募

松本 弦

長崎大院・医歯薬学総合研究科・講師

## 研究の背景と目的

神経細胞におけるマクロオートファジーの欠損は、ユビキチン化タンパク質の細胞内蓄積を伴う神経変性を引き起こす。神経細胞はグリア細胞により栄養されているため飢餓状態になることはないが、恒常的オートファジーによりユビキチン化タンパク質が分解されていることが知られている。凝集してしまったタンパク質は、プロテアソームでは分解することができないため、選択的オートファジーによって分解されると考えられるが、神経変性疾患患者の病変神経細胞において凝集性タンパク質が蓄積するということは、選択的オートファジーによる分解からも回避しているということの意味する。我々は、神経細胞における凝集性タンパク質の蓄積の原因として、選択的オートファジーの制御機構の異常が関係している可能性を想定し、その制御分子機構の解明を目指して研究を行った。

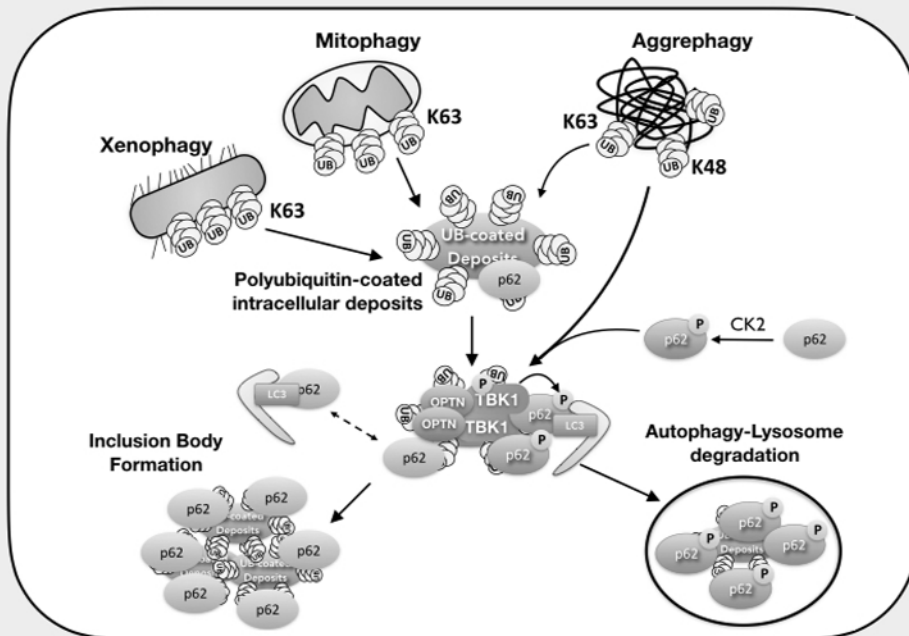
## 研究成果

(1) マイトファジーにおけるp62/SQSTM1の役割：選択的オートファジーを駆動するユビキチン結合型オートファジーアダプターであるp62/SQSTM1は、オートファジーにより恒常的に分解されている。定常状態において、p62はK63分枝型ポリユビキチン鎖と弱い親和性を持つが、プロテアソーム

の基質となるK48分枝型ポリユビキチン鎖とは結合しない。我々は、これまでにp62タンパク質のユビキチン結合ドメインに存在するセリン403 (S403) がリン酸化されることにより、p62がK48分枝型とK63分枝型の両方のポリユビキチン鎖と高い親和性で結合できることを見出してきた。つまり、このS403リン酸化により、p62は選択的オートファジーのアダプターとして機能するようになると考えられる。オートファジーアダプターは、基質分解の際、基質とともに分解され、再利用はされない。我々は、ストレス条件下で選択的オートファジーによる分解基質が一時的に増えたとき、p62がどのようにリン酸化されて基質をオートファゴソームへ取り込ませるのかという問題に取り組んだ。細胞をCCCPなどの脱分極剤で処理するとPINK1-Parkin依存性的にミトコンドリアの選択的オートファジーによる分解(マイトファジー)が起こる。この系を利用して、分解基質としてのミトコンドリアがどのようにしてオートファゴソームで取り囲まれるかについて、ライブセルイメージングによる解析を行い、ミトコンドリアにParkinが結合するとすぐにp62が結合し、その後オートファゴソームへ取り込まれることを確認した。ユビキチン化されたミトコンドリアと共局在したp62のリン酸化状態を調べてみると、S403リン酸化p62を含むものと含まないものに分かれ、オートファゴ

## ストレス条件下における選択的オートファジーの制御機構

(代表：松本 弦)



ポリユビキチン化された細胞内不要物の選択的オートファジーによる分解は、OPTN-TBK1-p62のリン酸化カスケードにより制御されている。

ソームへ取り込まれたミトコンドリアのほとんどはS403リン酸化型p62であった。これらの結果は、基質となるミトコンドリア上でp62がS403リン酸化を受けた後、優先的にオートファゴソームへと取り込まれることを示している。

(2) p62依存性選択的オートファジーの制御機構：マイトファジーを駆動するp62はどのようにしてリン酸化されるのか。TBK1 (TANK-Binding Kinase 1) の特異的阻害により、マイトファジーにおけるp62のリン酸化が阻害されることなどから、我々は、TBK1がマイトファジーにおけるリン酸化を制御していることを見出した。TBK1はS172のリン酸化により活性化することが知られているが、このS172リン酸化TBK1はユビキチン化されたミトコンドリア上でのみ観察され、S403リン酸化p62の局在と一致した。これらの結果は、TBK1が分解基質となるミトコンドリア上で活性化し、p62をS403リン酸化していることを示唆している。更に、ミトコンドリア上で活性化するTBK1は、Optineurin (OPTN) がTBK1をミトコンドリア上に運び活性化させることも見出した。OPTN-TBK1はこれまで感染バクテリアの選択的オートファジーによる排除機構(ゼノファジー; Xenophagy)でも利用されていることなどから、p62のS403リン酸化が選択的オートファジーの普遍的な制御の鍵となっているのではないかと考えている。

## 結語

本研究において見出したOPTN-TBK1-p62のリン酸化カスケードによる選択的オートファジー制御は、細胞内の不要なオルガネラや構造物の排除機構として、普遍的な役割を果たしていると考えられる。p62のS403リン酸化をコントロールすることで、細胞内の不要タンパク質や傷害オルガネラの分解を促進することで、今後、神経変性疾患の治療戦略につなげていきたい。

## 主要研究成果

### 原著論文

1. \*Imai, Y., Kobayashi, Y., Inoshita, T., Meng, H., Arano, T., Uemura, K., Asano, T., Yoshimi, K., Zhang, C-L., Matsumoto, G., Ohtsuka, T., Kageyama, R., Kiyonari, H., Shioi, G., Nukina, N., \*Hattori, N. and \*Takahashi, R. The Parkinson's disease-associated protein kinase LRRK2 modulates Notch signaling through the endosomal pathway, **PLoS Genet**, 11, e1005503. doi: 10.1371/journal.pgen.1005503, (2015).
2. Kurosawa, M., Matsumoto, G., Sumikura, H., Hatsuta, H., Murayama, S., Sakurai, T., Shimogori, T., Hattori, N. and \*Nukina, N. Serine 403-phosphorylated p62/SQSTM1 immunoreactivity in inclusions of neurodegenerative diseases. **Neurosci. Res.**, 10.1016/j.neures.2015.08.002. (2015).
3. \*Matsumoto, G., Shimogori, T., Hattori, N., and \*Nukina, N. TBK1 controls autophagic engulfment of Parkin-recruited depolarized mitochondria through p62 phosphorylation. **Hum Mol Genet**, 24, 4429-4442, (2015).
4. Kurosawa, M., Matsumoto, G., Kino, Y., Okuno, M., Kurosawa-Yamada, M., Washizu, C., Taniguchi, H., Nakaso, K., Yanagawa, T., Warabi, E., Shimogori, T., Sakurai, T., Hattori, N. and \*Nukina, N. Depletion of p62 reduces nuclear inclusions and paradoxically ameliorates disease phenotypes in Huntington's model mice. **Hum Mol Genet**, 24, 1092-1105 (2015).
5. Shiba-Fukushima, K., Arano, T., Matsumoto, G., Inoshita, T., Yoshida, S., Ishihama, Y., Ryu, K.-Y., Nukina, N., \*Hattori, N., and \*Imai, Y. Phosphorylation of

Mitochondrial Polyubiquitin by PINK1 Promotes Parkin Mitochondrial Tethering. **PLoS Genet** 10, e1004861 (2014).

6. Yamanaka, T., Tosaki, A., Kurosawa, M., Matsumoto, G., Koike, M., Uchiyama, Y., Maity, S.N., Shimogori, T., Hattori, N., and \*Nukina, N. NF-Y inactivation causes atypical neurodegeneration characterized by ubiquitin and p62 accumulation and endoplasmic reticulum disorganization, **Nature Commun.** 5, 3354, (2014).
7. Kitamura, A., Inada, N., Kubota, H., Matsumoto, G., Kinjo, M., Morimoto, R.I., \*Nagata, K. Dysregulation of the Proteasome Enhances the Toxicity of ALS-linked Mutant SOD1. **Genes Cells** 19, 209-24 (2014).
8. 3. Bauar, P.O., Hudec, R., Goswami, A., Kurosawa, M., Matsumoto, G., Mikoshiba, K. and \*Nukina, N. ROCK-phosphorylated vimentin modifies mutant huntingtin aggregation via sequestration of IRBIT, **Mol. Neurodeg.** 7, 43-, (2012).

## 総説

1. \*松本 弦, マイトファジーの認識機構—選択的オートファジーの一形態として, **医学のあゆみ** 250巻6・7合併号 (2014)
2. \*松本 弦, 貫名信行 著, p62のリン酸化とオートファジー, **Annual Review 2013 神経**, 29-36 中外医学社 (2013)
3. \*松本 弦, 貫名信行 選択的オートファジーによるユビキチン化タンパク質の処理機構, 生体の科学 細胞の分子構造と機能—核以外の細胞小器官, 63巻5号, p490-491, (2012)
4. \*松本 弦, 貫名信行 p62のリン酸化と選択的オートファジー, **BIO Clinica 「神経筋疾患の分子標的治療開発」**の各論, 27巻10号, p18-22, (2012)



# 神経変性疾患におけるアディポネクチンの役割と治療への応用

(平成24年度～平成25年度)

公募

橋本 款

東京都医学総合研究所・パーキンソン病研究室・副参事研究員



## 研究の背景と目的

近年、アルツハイマー病 (AD) やパーキンソン病 (PD) などの神経変性疾患の病態にインスリン抵抗性が関与することが明らかになってきた。我々は、抗炎症効果を呈し、インスリン受容体シグナルの感受性を高める善玉アディポカインのアディポネクチン (APN) が、神経変性の抑制に重要であると考え、この仮説を?シヌクレイントランスジェニックマウスに対する投与実験で証明した (Annual. Transl. Clin. Neurol., 2014)。しかしながら、実際の患者脳におけるAPNの役割は、必ずしも明らかではない。引き続き、AD患者の血清・脳脊髄液の解析を通して検討した (東松戸市民病院部長・東京都医学研究員研究員・藁谷正明博士との共同研究)

## 研究成果

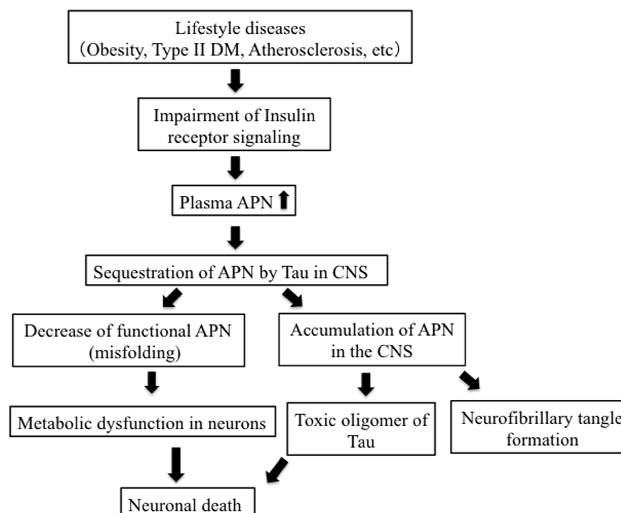
### (1) ADの血清・脳脊髄液 (CSF) におけるAPNの変動

その結果、血清においては、APNは正常コントロール (NC) 較べて、AD、及び、軽度認知障害 (MCI) において有意に増加しており、他方、CSFにおいては、APNはMCI、及び、NCに較べて、ADにおいて有意に低下することを観察した。また、AD脳の組織学的解析においては、免疫蛍光二重染色により、APNはTauと共局在するような結果を得た (J Alzheimers Dis, 2016)。

糖尿病や肥満やII型糖尿病などのメタボリック症候群においては、血清のAPNが減少することが明らかにされており、マウスにおいて、外からAPNを補うと症状が改善することから、APNのloss of functionが病態に関与していると想定される。これらのメタボリック症候群とADの病態は、インスリン受容体シグナル伝達の低下、ミトコンドリア機能低下、酸化ストレス、慢性炎症、終末糖化産物 (AGEs) の関与など多くの重複が見られることから、ADにおいても血清APNの減少が予想される。しかしながら、これとは逆に、我々を含むいくつかのグループはADにおいて、血清のAPNが増加することを観察している (Une 2011, Waragai 2016, van Himbergen 2012)。特に、Mayo Clinicの報告 (Wennberg et al, J Alzheimers Dis, 2016) より、AD患者の血清APN濃度とアミロイド病変・認知機能低下が相関性することから、ADの病態においては、APNのgain of functionが関与している可能性、すなわち、APNがADの危険因子であることが示唆されたのである。

このように、APNが神経変性抑制作用・促進作用という二重性をもってADの病態に関与している。その機序は明らかではないが、インスリンシグナルは神経細胞の分化・生存に必須であることから、重要であるから、生活習慣病などによってインスリンシグナルが低下するとそれを代償するためにAPNの発現が上昇するが、APNはTauにsequesterされ、蛋白凝集が促進する結果、神経変性が進行するようなメカニズムを想定している (図1)。また、ADにおける血清APNの増加は早期診断やdisease modifying therapyのバイオマーカーに役立つ可能性もありのは大変興味深い。このようなAPNの性質は、糖尿病やその他のメタボリック症候群に対する従来の治療戦略を少し変える必要があるかもしれない。我々は、抗インスリン耐性治療・tau免疫療法の併用療法が有効ではないかと想定している (投稿中)。

図1



(2) APNの研究に関連して、アミロイドの免疫療法と抗インスリン抵抗性の併用療法が治療効率を上げる可能性を言及した (npj Parkinson's disease in press)。

(3) その他、微小重力による影響が寝たきり老人や宇宙飛行士の海馬の神経変性を促進する可能性に関して提案した (npj Microgravity 2016)。

## 結語

神経変性疾患の予防にAPNなどによる抗インスリン療法が有効であると思われるが、他方で、神経変性が反って促進される可能性もあり、注意が必要である。また、微小重力により神経変性が促進される可能性があることから、逆に、過重力による予防効果が期待されるが (投稿中)、今後の研究が必要である

## 主要研究成果

### 原著論文

1. Suzuki K, Yamaguchi A, Yamanaka S, Kanzaki S, Kawashima M, Togo T, Katsuse O, Koumitsu N, Aoki N, Iseki E, Kosaka K, Yamaguchi K, Hashimoto M et al. (15名中13番目) Accumulated alpha-synuclein affects the progression of GM2 gangliosidosis. *Exp Neurol*. 2016; 284(Pt A):38-49.
2. Waragai M, Adame A, Trinh I, Sekiyama K, Takamatsu Y, Une K, Masliah E, Hashimoto M. Possible Involvement of Adiponectin, the Anti-Diabetes Molecule, in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2016; 52(4):1453-9.

## 総説

1. Takamatsu Y, Koike W, Takenouchi T, Sugama S, Wei J, Waragai M, Sekiyama K, Hashimoto M Protection against neurodegenerative disease on Earth and in space. *npj Parkinson's disease* 2017; 3: 4.

2. Takamatsu Y, Koike W, Takenouchi T, Sugama S, Wei J, Waragai M, Sekiyama K, Hashimoto M. Protection against neurodegenerative disease on Earth and in space. **npj Microgravity** 2016; 2: 16013.
3. Sekiyama K, Takamatsu Y, Koike W, Waragai M, Takenouchi T, Sugama S, Hashimoto M. Insight into the dissociation of behavior from histology in Synucleinopathies and in related neurodegenerative diseases. **J Alzheimers Dis.** 2016; 52(3):831-41.



公募

# 神経変性における細胞内 TDP-43 凝集体の意義の解明

(平成 24 年度～平成 25 年度)

## 細胞内異常タンパク質凝集体形成のメカニズムの解明

(平成 26 年度～平成 27 年度)

野中 隆

東京都医学総合研究所・認知症プロジェクト・副参事研究員



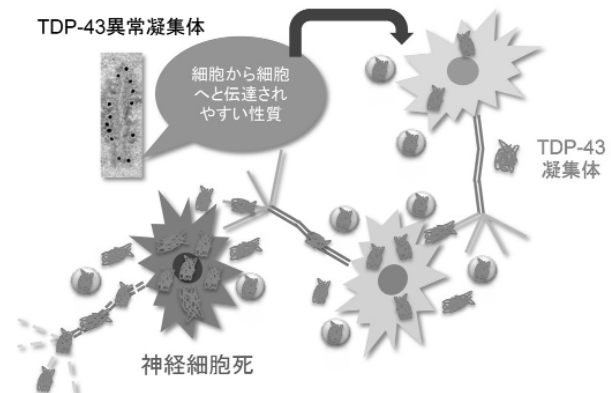
### 研究の背景と目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) や前頭側頭葉変性症 (FTLD-TDP) の患者脳に出現するユビキチン陽性の細胞内凝集体の主要な構成タンパク質として TDP-43 が同定された。本研究では、患者脳由来の不溶化 TDP-43 を凝集体核 (シード) として細胞内に導入する培養細胞モデルを利用して、患者脳由来の不溶化 TDP-43 の性質について検討した。さらに、患者脳において、最初の凝集体形成に関わる因子の探索を行った。

### 研究成果

(1) 患者脳に蓄積する TDP-43 のプリオン様性質：患者脳に蓄積する TDP-43 は、リン酸化 TDP-43 抗体を用いたイムノプロット解析において、その C 末端断片のパターンの違いによりいくつかのタイプ (A、B および C) に分類できることが知られている。そこで、タイプの異なる不溶化 TDP-43 をシードとして細胞内に導入したところ、導入したシードの C 末端断片のパターンとほぼ同じパターンを有する TDP-43 の蓄積が培養細胞内において認められた。すなわち、導入したシードを鋳型として、それと同様な構造を有する TDP-43 凝集体が培養細胞内において再現されることが判明した。したがって、患者脳に蓄積する不溶化 TDP-43 には、プリオン病における異常プリオンのような自らを鋳型として同じ構造の異常凝集体のコピーを作り出す能力が備わっていることが示唆された。また、この不溶化 TDP-43 のプリオン様の性質について詳細に検討した。その結果、いずれのタイプの患者脳由来の不溶化 TDP-43 は、トリプシン、キモトリプシンあるいはプロテイナーゼ K 処理を行った後でもシードとして作用することが判明した。またこの不溶化 TDP-43 画分を熱処理すると、タイプごとに熱安定性が異なる可能性が示された。さらに、患者脳由来の不溶性 TDP-43 をシードとして細胞内で蓄積したプラスミド由来の TDP-43 凝集体を培養細胞より調製し、再度それをシードとして培養細胞に処理すると、患者脳由来の不溶性 TDP-43 と同様にシードとして機能することが判明した。また、TDP-43 の凝集体を含む細胞と含まない細胞の共培養実験により、TDP-43 凝集体がエキソソームを介して細胞間を伝播する可能性が示唆された。以上の結果をまとめ、Cell Report 誌に投稿し掲載された。

(2) 活性型 Casein kinase 1δ による TDP-43 の局在変化および細胞内蓄積：SH-SY5Y 細胞を用いて、これまでに TDP-43 の異常リン酸化に関与することが報告されている種々のキナーゼと TDP-43 を共発現させて、TDP-43 リン酸化抗体を用いた生化学および免疫組織化学的解析を行った。その結果、Casein kinase 1δ (CK1δ) の C 末端部分を欠いた活性型 CK1δ の共発現により、TDP-43 の核から細胞への局在変化および細胞質蓄積が顕著に認められた。またプラスミド由来の TDP-43 だけでなく、内在性 TDP-43 も細胞質で蓄積した。さらに TDP-43 と活性型 CK1δ の共発現を経時的に観察したところ、リン酸化 TDP-43 が蓄積した後で断片化が生じることが判明した。またこれらの変化は活性型 CK1δ に依存的であり、キナーゼ活性を欠く変異型 CK1δ ではこのような変化は見られなかった。以上の結果は、活性型 CK1δ のキナーゼ活性に依存して細胞内で TDP-43 が局在変化および蓄積することを示しており、TDP-43 の細胞内蓄積の新たなメカニズムを示して



いる。以上の結果をまとめ、J. Biol. Chem. 誌に投稿し掲載された。

ある種のキナーゼの異常活性化などにより、細胞内で最初の凝集体形成が誘導される。その凝集体はプリオン様性質を有しており、自分のコピーを次々と作り、細胞内で凝集体が増殖する。凝集体を有する細胞はやがて死滅するが、細胞外に放出された凝集体は新たな細胞に取り込まれる。その凝集体は、それでも自分自身を鋳型としてコピーを作り、最終的にその細胞を死滅させる。

### 結語

以上の結果より、患者脳に蓄積する不溶化 TDP-43 には、プリオン病における異常プリオンに極めて類似した性質が存在することが明らかとなった。したがって、TDP-43 が蓄積する TDP-43 プロテノパチーと称される疾患において、中枢神経における TDP-43 凝集体の拡がり的一部は、プリオン様の伝播メカニズムを介することが示唆される。その詳細な機構は不明ではあるが、異常タンパク質の凝集体が伝播する可能性は、神経変性疾患全般の新たな治療戦略を考える上で、今後重要なファクターになると考えられる。

### 主要研究成果 原著論文

1. Nonaka T, Suzuki G, Tanaka Y, Kametani F, Hirai S, Okado H, Miyashita T, Saitoe M, Akiyama H, Masai H and Hasegawa M. Phosphorylation of TAR DNA-binding Protein of 43 kDa (TDP-43) by Truncated Casein Kinase 1δ Triggers Mislocalization and Accumulation of TDP-43. *J. Biol. Chem.* 291: 5473-5483, 2016.
2. Tanaka Y, Nonaka T, Suzuki G, Kametani F and Hasegawa M. Gain-of-function profilin 1 mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis cause seed-dependent intracellular TDP-43 aggregation. *Hum. Mol. Genet.* 25: 1420-1433, 2016.
3. Davidson Y, Robinson AC, Troakes C, Smith B, Al-Saraj S, Shaw C, Rollinson S, Masuda-Suzukake M, Suzuki G, Nonaka T, Pickering-Brown S, Snowden JS, Hasegawa



- M, and Mann DMA. Neurodegeneration in Frontotemporal Lobar Degeneration and Motor Neurone Disease associated with expansions in C9orf72 is not associated with aggregated forms of dipeptide repeat proteins. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 42: 242-254, 2016.
4. Taniguchi-Watanabe S, Arai T, Kametani F, Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Tarutani A, Murayama S, Saito Y, Arima K, Yoshida M, Akiyama H, Robinson A, Mann DMA, Iwatsubo T, Hasegawa M. Biochemical classification of tauopathies by immunoblot, protein sequence and mass spectrometric analyses of sarkosyl-insoluble and trypsin-resistant tau. *Acta Neuropathol.* 131: 267-280, 2016.
  5. Takahashi M, Miyata H, Kametani F, Nonaka T, Akiyama H, Hisanaga SI, Hasegawa M. Extracellular association of APP and tau fibrils induces intracellular aggregate formation of tau. *Acta Neuropathol.* 129: 895-907, 2015.
  6. Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Kubo M, Shimozawa A, Akiyama H, Hasegawa M. Pathological alpha-synuclein propagates through neural networks. *Acta Neuropathol. Commun.* 2: 88, 2014.
  7. Yamashita M, Nonaka T, Hirai S, Miwa A, Okado H, Arai T, Hosokawa M, Akiyama H, Hasegawa M. Distinct pathways leading to TDP-43-induced cellular dysfunctions. *Hum. Mol. Genet.* 23: 4345-4356, 2014.



## パーキンソン病発症を予防するミトコンドリアストレス 応答機構の解析(前期)：PINK1の作動機構解明からミト コンドリアホメオスタシスと神経変性の核心に迫る(後期) (平成24年度～平成27年度)



公募

松田 憲之

東京都医学総合研究所・ユビキチンプロジェクト・プロジェクトリーダー

### 研究の背景と目的

＜背景＞ドパミン神経の変性・脱落を特徴とする神経変性疾患であるパーキンソン病（PD）の発症機構は未だ完全に解明されている訳ではない。一方で、1990年代からPDの発症とミトコンドリアの機能異常が密接に関係することが報告されていた。

＜目的＞遺伝性劣性PDの原因遺伝子産物 PINK1 と Parkin に着目しながら、前期にパーキンソン病発症を予防するミトコンドリアストレス応答機構を解明することを、後期にミトコンドリアホメオスタシス維持機構の分子メカニズムをPINK1の作動機構から解明することを目的とした。最終的に公募期間を通じて、PD発症に繋がるミトコンドリア品質管理の鍵分子やシグナル経路を明らかにすることを通じて、脳内環境という視点からPDの病態解明を目指した。

### 研究成果

#### (1) PINK1の自己リン酸化を介した分子制御機構の解明

研究計画を申請した当時の主流仮説はPINK1の膜電位依存的な分解という「量的な制御」に注目したものであったが、申請者は本研究を通じてPINK1は「質的にも制御」されていることを示して、当該分野に大きなインパクトを与えた。詳細は以下の通りである。1) PINK1がミトコンドリアの膜電位の低下に伴って自己リン酸化される、2) この自己リン酸化は種々の患者由来の変異PINK1では阻害されている、3) MS解析とセリン/スレオニンに対する変異導入を組み合わせた実験から、PINK1の自己リン酸化部位はSer228とSer402である、4) この部位をアラニンに置換した変異体PINK1 (S228A/S402A) はParkinをミトコンドリアに移行させることができないが、この部位をアスパラギン酸（リン酸基模倣アミノ酸）に置換した変異PINK1 (S228D/S402D) は自己リン酸化非依存的にParkinをミトコンドリアに移行させる。これらの成果は「PINK1のSer228/Ser402自己リン酸化を介した質的制御が異常なミトコンドリアの認識に決定的に重要である」ことを示しており、原著論文として報告した(Okatsu, Nat Commun, 2012)。

さらにはNAMOS (Native Antibody-based MObility-Shift) アッセイを駆使してPINK1の質的制御に関する研究を

発展させて、PINK1が膜電位の低下時にTOM複合体を含む巨大分子量複合体を形成するとともに、その中で2量体を形成しており、その2量体形成が上記PINK1自己リン酸化に必須の役割を果たしていることを報告した (Iguchi, JBC, 2013)。

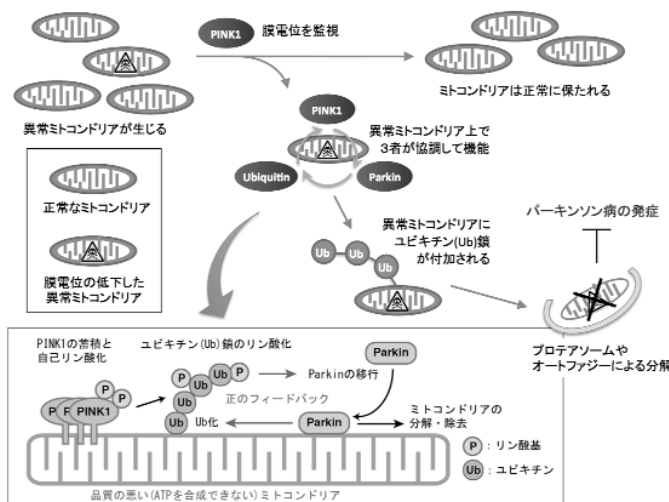
#### (2) PINK1のMTS阻害時の外膜局在化機構を介した分子制御機構の解明

上述の「PINK1とParkinが異常ミトコンドリアをユビキチン化して細胞内から除去する」プロセスにおける最上流イベントは「PINK1が異常ミトコンドリアの外膜に局在化すること」である。正常なミトコンドリアではPINK1は膜電位に依存して分解されており、膜電位が低下すると分解を免れたPINK1が機能する。しかしながら、分解が停止するだけではPINK1はマトリクスや細胞質に局在化するはずであり、異常ミトコンドリア外膜に局在化するための特別な仕組みが必要である。そこで、PINK1が異常ミトコンドリア外膜に局在化する仕組みの詳細な解析を行い、既知の仮説とは異なる新しい仕組みを明らかにした。

PINK1のN-末端のMTSの前にマイナスチャージのアミノ酸を付加してMTS機能を阻害すると、PINK1が自己リン酸化され、Parkinの移行と活性化も誘導可能であった。つまり、ミトコンドリアの膜電位と無関係に、N-末端MTS機能の阻害だけでPINK1を活性化できること（MTS機能阻害が必要十分条件であること）を見出した。さらにPINK1のミトコンドリア外膜局在化に必要な領域を同定する実験から、従来提唱されていた領域（94 - 110 a.a.）は不要であり、この領域を欠いたPINK1でも異常ミトコンドリア外膜への局在化・自己リン酸化・Parkinの移行誘導が可能であることを示した。最終的にMTS機能が阻害されると、新奇な外膜局在化領域（30 - 94 a.a.）が機能することで、PINK1が異常ミトコンドリアの外膜に局在・機能すると結論した。

#### (3) 異常ミトコンドリア外膜に局在したPINK1がParkinを正に制御する機構の解明

最終的にはParkinが異常ミトコンドリアをユビキチン化して細胞内から除去するので、PINK1がどのようにしてParkinを活性化するのか、そのメカニズムの解明を行なった。研究対



象にしたのが、損傷ミトコンドリア上でParkinを活性化する“活性化因子”と、損傷ミトコンドリアにParkinを移行させる“受容体”の実体解明である。

まずPINK1の基質の探索を行ない、PINK1がユビキチンのSer65をリン酸化することを見出した。細胞内共発現実験を行なったところ、ユビキチンのSer65をアラニンに置換した変異体Ub (S65A)をParkinと共発現してもParkinの酵素活性は変化しないけれども、ユビキチンのSer65をグルタミン酸（リン酸基模倣アミノ酸）に置換した変異ユビキチン(S65E)はParkinのE3機能を活性化させることを見出した。さらに、試験管内の再構成実験からもリン酸化ユビキチンがParkin活性化因子であることが示された (Koyano, *Nature*, 2014)。

細胞内でユビキチンは単体（モノユビキチン）だけでなく、複数の分子が連なったユビキチン鎖としても存在する。リン酸化ユビキチンがリン酸化Parkinを活性化するという事実から両者の相互作用が示唆されるが、単体のリン酸化ユビキチンとParkinの結合は非常に弱かった。そこで、リン酸化ユビキチン鎖がParkinと結合する可能性を検証した。まず、細胞内や試験管内でユビキチン鎖もPINK1によってリン酸化されることを示した。次に、このリン酸化ユビキチン鎖がParkinの局在変化に関与するかどうかを検証するために、ミトコンドリア局在シグナルとタンデムユビキチンを融合 (Mt-4Ub) し、PINK1欠損細胞内でParkinと共発現を行なった。Mt-4UbとParkinの両者がリン酸化模倣変異を有する時に限り、PINK1やミトコンドリア膜電位の低下と無関係に、Parkinはミトコンドリアに局在化した。さらに試験管内でリン酸化ユビキチン鎖とリン酸化Parkinの直接的な結合を示した。より生理的なリン酸化ユビキチン鎖 (K63 linkage リン酸化ユビキチン鎖) をリソソーム上に形成させた場合にも、Parkinをリソソームに局在化できることが明らかとなった。一連の結果から、リン酸化ユビキチン鎖が“Parkin受容体”であると結論した (Okatsu, *JCB*, 2015)。

## 結語

ParkinとPINK1とユビキチンの3者がどのように協調してミトコンドリア品質を管理・維持しているのかについて研究を行った。その分子機構が「PINK1の蓄積→自己リン酸化と活性化→ユビキチンのリン酸化→Parkinの活性化→基質のユビキチン化」という cascading reaction であることを解明した。

## 主要研究成果

### 原著論文

- Akabane, S., Matsuzaki, K., Yamashita, S-I, Arai, K., Okatsu, K., Kanki, T., Matsuda, N., and Oka, T. (2016) Constitutive activation of PINK1 leads to proteasome-mediated and non-apoptotic cell death independently of mitochondrial autophagy. *J. Biol. Chem.*, 291(31), pp16162-74.
- Kojima, W., Kujuro, Y., Okatsu, K., Bruno, Q., Koyano, F., Kimura, M., Yamano, K., Tanaka, K., and Matsuda, N. (2016) Unexpected mitochondrial matrix localization of Parkinson's disease-related DJ-1 mutants but not wild type DJ-1. *Genes to Cells*, 21(7), pages 772-788.
- Yamano, K., Queliconi, B.B., Koyano, F., Saeki, Y., Hirokawa, T., Tanaka, K., and Matsuda, N. (2015) Site-specific interaction mapping of phosphorylated ubiquitin to uncover Parkin activation. *J. Biol. Chem.*, 290, 25199-25211.
- Okatsu, K., Koyano, F., Kimura, M., Kosako, H., Saeki, Y., Tanaka, K., and Matsuda, N. (2015) Phosphorylated ubiquitin chain is the genuine Parkin receptor. *Journal of Cell Biology*, 209, 111-128.
- Okatsu, K., Kimura, M., Oka, T., Tanaka, K., and Matsuda, N. (2015) Unconventional PINK1 localization to the outer membrane of depolarized mitochondria drives Parkin recruitment. *Journal of Cell Science*, 128, 964-978.
- Koyano, F., Okatsu, K., Kosako, H., Tamura, Y., Go, E., Kimura, M., Kimura, Y., Tsuchiya, H., Yoshihara, H., Hirokawa, T., Endo, T., Fon, E-A., Trempe, J-F., Saeki, Y., Tanaka, K., and Matsuda, N. (2014) Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate Parkin. *Nature*, 510, 162-166.
- Okatsu, K., Uno, M., Koyano, F., Go, E., Kimura, M., Oka, T., Tanaka, K., and Matsuda, N. (2013) A dimeric PINK1-containing complex on depolarized mitochondria stimulates Parkin recruitment. *J. Biol. Chem.*, 288: 36372-36384.
- Kimura, Y., Fukushi, J., Hori, S., Matsuda, N., Okatsu, K., Kakiyama, Y., Kawawaki, J., Kakizuka, A., and Tanaka, K. (2013) Different dynamic movements of wild-type and pathogenic VCPs and their cofactors to damaged mitochondria in a Parkin-mediated mitochondrial quality control system. *Genes to Cells*, 18(12), 1131-43.
- Iguchi, M., Kujuro, Y., Okatsu, K., Koyano, F., Kimura, M., Suzuki, N., Uchiyama, S., Tanaka, K., and Matsuda, N. (2013) Parkin catalyzed ubiquitin-ester transfer is triggered by PINK1-dependent phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 288, 22019-22032.
- Koyano, F., Okatsu, K., Ishigaki, S., Fujioka, Y., Kimura, M., Sobue, G., Tanaka, K., and Matsuda, N. (2013) The principal PINK1 and Parkin cellular events triggered in response to dissipation of mitochondrial membrane potential occur in primary neurons. *Genes to Cells*, 18, 672-681.
- Okatsu, K., Iemura, S-I., Koyano, F., Go, E., Kimura, M., Natsume, T., Tanaka, K., and Matsuda, N. (2012) Mitochondrial hexokinase HK1 is a novel substrate of the Parkin ubiquitin ligase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 428(1), 197-202.
- Okatsu, K., Oka, T., Iguchi, M., Imamura, K., Kosako, H., Tani, N., Kimura, M., Go, E., Koyano, F., Funayama, M., Shiba-Fukushima, K., Sato, S., Shimizu, H., Fukunaga, Y., Taniguchi, H., Komatsu, M., Hattori, N., Mihara, K., Tanaka, K., and Matsuda, N. (2012) PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria. *Nature Commun.* 3:1016 (10 page)

### 総説

- Yamano, K., Matsuda, N., and Tanaka, K. (2016) The ubiquitin signal and autophagy: an orchestrated dance leading to mitochondrial degradation *EMBO Reports*, 17, 300-316.
- Matsuda, N. (2016) Phospho-ubiquitin: Upending the PINK-Parkin-ubiquitin cascade. *J. Biochemistry*, 159(4): 379-385.
- Matsuda, N. and Tanaka, K. (2015) Tagged tags engage disposal. *Nature*, 524, 294-295.
- Matsuda, N. and Tanaka, K. (2015) The PARK2/Parkin receptor on damaged mitochondria revisited: uncovering the role of phosphorylated ubiquitin chains. *Autophagy*, 11(9), 1700-1701.
- Koyano, F. and Matsuda, N. (2015) Molecular mechanisms underlying PINK1 and Parkin catalyzed ubiquitylation of substrates on damaged mitochondria. *Biochim Biophys Acta-Molecular Cell Research*, Volume 1853, Issue 10, Part B, Pages 2791-2796.
- Tanaka, K. and Matsuda, N. (2014) Proteostasis and neurodegeneration: the roles of proteasomal degradation and autophagy. *Biochim Biophys Acta. - Molecular Cell Research*, 1843(1), 197-204.



# 軸索変性の分子細胞生物学的解析とその治療応用に関する研究 (平成24年度～平成25年度)

# 軸索変性の分子細胞生物学的解析とその治療応用に関する研究 (平成26年度～平成27年度)



公募

若月 修二

国立精神・神経医療研究センター神経研究所・疾病研究第五部・室長

### 研究の背景と目的

軸索変性（軸索の構造が壊れること）はアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経難病の発症や症状形成の重要な要因のひとつである。これらの神経難病の治療方法として、軸索変性を阻止することが有効である可能性が示唆されているが、そもそも軸索変性がどのような分子機構で制御されているのかは永らく不明であった。2011年、我々はセリン・スレオニンキナーゼ AKT が E3 ユビキチンリガーゼ ZNRF1 (zinc and ring finger 1) を介してユビキチン・プロテアソーム系 (UPS) 依存的に分解され、AKT ならびにその下流のリン酸化シグナルが軸索から失われることが、変性の進行を促進することを明らかにした。この成果は、リン酸化シグナルの活性により変性から軸索を保護できることを示すとともに、軸索変性と UPS とを直接関連付ける分子メカニズムを初めて明確にした。本研究では、この分子メカニズムを研究対象として、培養細胞レベル、動物個体レベルなど、さまざまアプローチを駆使して、軸索変性を分子細胞生物学的に理解することにより、軸索変性を抑制する方法論を確立し、その成果を治療薬の開発など前臨床段階の研究へ発展させることを目的とした。

### 研究成果

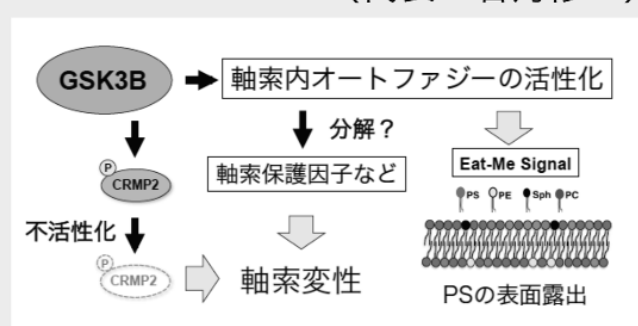
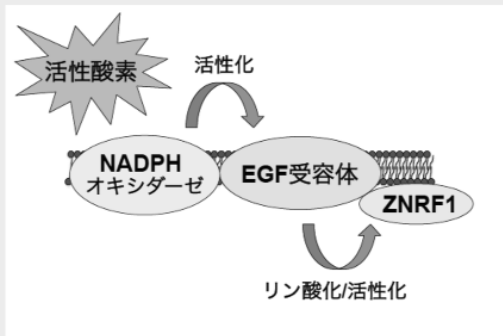
**(1) ZNRF1 は酸化ストレスにより活性化し神経変性を促進する:** ZNRF1 はほとんどのニューロンに存在するが普段は不活性である。脳梗塞周辺部のニューロンでは、酸化ストレスの影響によりアポトーシスが誘導され、細胞内にリン酸化 CRMP2 蛋白 が認められる。このことは、酸化ストレスを受けたニューロンでは ZNRF1 を介する一連の細胞内反応が活性化することを示唆した。ZNRF1 の活性がリン酸化を含む ZNRF1 自身の翻訳後修飾により制御される可能性を検討したところ、酸化ストレスにより ZNRF1 が EGF 受容体依存的にリン酸化/活性化し、アポトーシスを誘導することが判明した。し

たがって、酸化ストレスによるニューロンの変性の制御において ZNRF1 のリン酸化/活性化が重要な役割を果たすことが示された。

ZNRF1 はミスチル酸を介して細胞膜に結合することから、EGF 受容体によるリン酸化/活性化は細胞膜近傍で生じるイベントと考えられた。細胞膜近傍で酸化ストレスを生み出す NADPH オキシダーゼが ZNRF1 のリン酸化/活性化に関連する可能性を考え、NOX 遺伝子を発現抑制したところ、ZNRF1 のリン酸化が低下し、同時に軸索変性が大幅に遅延した。したがって、変性によって軸索に酸化ストレスが生じ、EGF 受容体依存的に ZNRF1 のリン酸化/活性化を誘導し、変性を促進することが示唆された。酸化ストレス応答性の蛍光プローブにより酸化ストレス産生をモニターする実験から、変性する軸索における酸化ストレス産生は NADPH オキシダーゼ阻害剤により阻止されるが、EGF 受容体阻害剤では阻止されなかった。これらことから、NADPH オキシダーゼが産生する活性酸素種が EGF 受容体を介して ZNRF1 をリン酸化/活性化させ、軸索変性を誘導/促進することが証明された (図)。

**(2) ZNRF1-GSK3B シグナルを介する軸索内オートファジー誘導機構の解明:** 一般に、死にゆく細胞は細胞膜内側に限局するリン脂質ホスファチジルセリン (PS) を細胞表面に露出し、マクロファージなどの貪食細胞はこれを "eat-me-signal" として認識し、死細胞として除去する。この PS の細胞表面への露出が変性軸索にも認められる。PS の露出には ATP を必要とする。RNA 干渉法によりオートファジー必須遺伝子 ATG5、ATG7 を発現抑制し、オートファジー誘導を妨害した軸索では PS 表面露出が抑制されることから、変性軸索ではオートファジーの活性化を介して ATP を供給し、"eat-me-signal" の提示を後押しすることが示された。同様に、ZNRF1 や GSK3B のドミナントネガティブ型変異体を強制発現させた軸索では、

## 軸索変性の分子細胞生物学的解析とその治療応用に関する研究 (代表 若月修二)



1. 酸化ストレスを介する神経変性機構の解明

2. 新しい神経破綻機構の解明

軸索変性を介する脳内環境の破綻機構の解明と制御へ

ATP供給やPSの表面提示が阻害されることから、ZNR1-GSK3Bシグナルが変性軸索でのオートファジー誘導に関与することが示された(図)。加えて、ZNR1-GSK3Bシグナルとオートファジー誘導を結びつける分子としてMCL1を同定した。MCL1は普段はミトコンドリアにおいてBECLIN1/ATG6と複合体を形成しているが、軸索変性が開始すると140番目のセリン残基がGSK3Bにリン酸化されてフリーとなり、オートファジーを誘導した。この成果により、「軸索内オートファジー」の分子メカニズムが初めて解明された。

## 結語

酸化ストレスは神経難病の発症や進行に重要な役割を果たす主因のひとつである。我々の研究結果は、ZNR1の機能阻害が、酸化ストレスが誘起する神経変性からニューロンを保護する有望な創薬標的となる可能性を示唆した。また、本研究により、軸索への傷害により活性化するGSK3Bを介して軸索内オートファジーが誘導され、変性を促進することを明らかとなった。これらの結果から、ZNR1はUPSとオートファジー・リソソーム系という主要な蛋白分解系を調節し、神経変性を制御する鍵分子であると考えられた。

## 主要研究成果

### 原著論文

1. Wakatsuki S, Tokunaga S, Shibata M, and Araki T. GSK3B-mediated phosphorylation of MCL1 regulates axonal autophagy to promote Wallerian degeneration. **J Cell Biol** in press.
2. Saito F., Wakatsuki S., Tokunaga S., Hujieda, H. and Araki T. Glutamate signals through mGluR2 to control Schwann cell differentiation and proliferation. **Sci Rep** 6: 29856. (2016)
3. Wakatsuki S. and Araki T. NADPH oxidases promote apoptosis by activating ZNR1 ubiquitin ligase in neurons treated with exogenously applied oxidant. **Commun Integr Biol** 9: e1143575 (2016)
4. Wakatsuki, S., Furuno, A., Oshima, M., and Araki T. Oxidative stress-dependent phosphorylation activates ZNR1 to induce neuronal/axonal degeneration. **J Cell Biol** 211, 881-896 (2015)
5. Wakatsuki, S., Araki, T., and Sehara-Fujisawa A. Neureglin-1/Glial Growth Factor stimulates Schwann Cell Migration by inducing the  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrin-ErbB2-Focal Adhesion Kinase Complex Formation. **Genes Cells** 19: 66-77 (2014)
6. #Togashi, K., #Wakatsuki, S., Furuno, A., Tokunaga, S., Nagai, Y., and Araki, T. (#co-firstauthor) Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchangers induce autophagy in neurons and inhibit polyglutamine-induced aggregate formation. **PLoS One** 8: e81313 (2013)

## 総説

1. 若月修二, 荒木敏之 酸化ストレスを神経変性に変換する仕組み: 鍵分子ZNR1の活性化メカニズムと変性する軸索におけるオートファジー誘導 **臨床免疫・アレルギー科** 66: 337-344 (2016)
2. Wakatsuki S. and Araki T. ZNR1: a key molecule activated by reactive oxygen species to cause neuronal degeneration. **Atlas of Science** <http://atlasofscience.org/znr1-a-key-molecule-activated-by-reactive-oxygen-species-to-cause-neuronal-degeneration/> (2015)
3. 若月修二, 荒木敏之 ユビキチン・プロテアソーム系によって制御される軸索変性の分子メカニズム第35回生化学特集「酵母から動植物まで包括するユビキチン・プロテアソーム系の新展開」**生化学** 84: 463-471 (2012)

4. 若月修二, 荒木敏之 ユビキチンリガーゼZNR1はAKTをプロテアソーム依存的に分解しGSK3BによるCRMP2のリン酸化を誘導することにより神経軸索の変性を促進する **ライフサイエンス新着論文レビュー** <http://first.lifesciencedb.jp/archives/3957> (2012)



# 加齢脳におけるタウの生理機能維持とその破綻機構

(平成24年度～平成25年度)



公募

高島 明彦

学習院大学理学部・生命科学科・教授

## 研究の背景と目的

アルツハイマー病は老齢期認知症の多くの原因であり、病理学的にはβアミロイドとタウの蓄積が観察されている。弧発性アルツハイマー病の場合、病因は単一因子ではなく加齢に伴う多因子が病因となり、βアミロイドとタウの蓄積を伴う神経機能低下を引き起こすと考えられる。Braakらの研究から嗅内野/海馬の神経原線維変化はその部位の機能低下を起こし学習記憶障害の要因となるがβアミロイド蓄積に依存せず75歳で90%以上のヒトで観察される。このことは、嗅内野/海馬の神経原線維変化は老化因子によって形成されることを示唆している。しかし、脳老化又は老化因子の実態はいまだ明らかになっていない。この課題では神経原線維変化を脳老化のマーカーとし、その誘因となるシナプス長期抑圧、特にNMDA-dependent LTDの発現部位、行動刺激を見いだすことを目的とする

## 研究成果

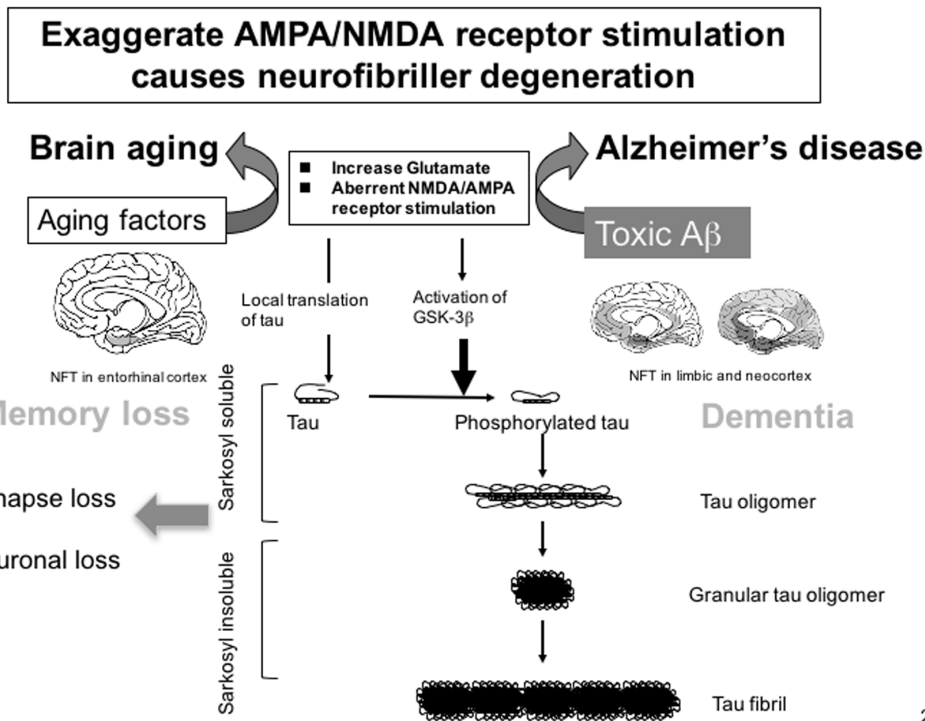
### (1) タウはシナプス長期抑圧誘導機構に関与している。

これまで微小管結合蛋白として認識されていたタウがシナプス後膜に存在することを生化学的分画法、および電顕で確認した。タウ欠失による老齢期の空間記憶学習障害の原因を調べるためその分子的基盤となる海馬のシナプス可塑性について検討した。シナプス長期増強 (LTP)、シナプス長期抑圧 (LTD) について野生マウス、タウ遺伝子欠失マウスを用いてIn vivo recording法でHigh frequent stimulation に対するLTPレベルに違いは見いだせないこと、Low frequent stimulationで惹起されるLTDはタウ遺伝子ヘテロ、ホモ欠失マウスで抑制

されることを見いだした。更にLTD誘導にタウが必要であることをタウ shRNAによるタウのノックダウンによって海馬スライスで確認した。LTDにはNMDA依存性、非依存性の誘導がある。Chemical LTD誘導法を用いてタウ欠失マウス由来の海馬スライスにLTDを誘導するとNMDAでは誘導されないがDHPGで誘導することが出来た。このことからタウはNMDA依存性のLTD誘導に必要な因子であることが明らかになった。NMDA依存性のLTDを誘導するとGSK-3を介したタウのリン酸化が生じる。リン酸化タウを発現させるとAMPA受容体とPICK1の結合が増大した。また、PHF1サイトをAlaに置換したタウを発現するとLTDが起こらなくなることから、リン酸化タウがNMDA依存性LTD誘導に必要であることが推定された。

### (2) NMDA受容体刺激はタウのリン酸化と凝集を促進する

NMDA依存性のLTDを誘導するとGSK-3を介したタウのリン酸化が生じる。野生型マウス海馬に静置電極を置きLTDを誘導するLFSを頻回行った後、海馬標本を用いて生化学的検討を行うと、LFS刺激を行ったマウス海馬ではサルコシル不溶性タウが形成されていることが示された。さらにタウのE3ligaseであるCHIPノックアウトマウスを用いるとLFS刺激を行ったマウス海馬でサルコシル不溶性タウ量の増大が観察された。これらのことからNMDA受容体刺激によってタウは過剰リン酸化と凝集を引き起こす。この凝集タウはコピキチン化が起こることによって分解されることが示された。すなわち、過剰なNMDA受容体刺激が脳老化因子の一つであることが示唆された。



### (3) $\beta$ アミロイドはタウを介して脳老化を促進する。

23か月齢および8か月齢の野生型マウスを用いて Mn-enhanced MRIによって場所学習中の脳活動を測定した。その結果、23か月齢マウスでは8か月マウスと比べて海馬の過活動が起きていた。モリス水迷路では若齢、老齢ともに学習記憶は成立していたがプローブテストにおけるエラースコア(記憶の正確さ)では老齢期マウスが有意な低下を示した。一方、8か月齢のAPPマウスを用いた Mn-enhanced MRIの結果は老齢期マウスと同様海馬過活動が観察された。このマウスとタウノックアウトマウスを掛け合わせると海馬過活動は8か月野生型マウスと同レベルまで低下した。しかしモリス水迷路では既報とは異なりAPPマウスで示される記憶障害はタウノックアウトとの掛け合わせによって改善はされなかった。海馬活動と関連した行動は locomotor activity であった。脳活動測定から $\beta$ アミロイドはタウを介して脳老化を促進することが示唆された。

### 結語

これまで微小管結合蛋白として認識されていたタウはシナプスにおいてシナプス可塑性に関与し、老化、 $\beta$ アミロイドによる過剰な興奮性刺激によってタウの過剰リン酸化、凝集を引き起こし神経変性へと進行することが示唆された。

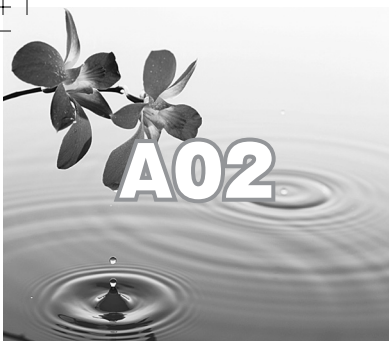
### 主要研究成果

#### 原著論文

1. Yoshitake J, Takashima A. and et al (8名中8番目) Modification of Tau by 8-nitro-cGMPJ **Biol Chem.** (2016) in press 査読有
2. Huuskonen MT, Takashima A. and et al (1名中11番目) Bexarotene targets autophagy and is protective against thromboembolic stroke in aged mice with tauopathy. **Sci Rep.** (2016) Sep 14;6:33176. 査読有
3. Tanaka T., Ohashi S., Kobayashi S. Four nucleocytoplasmic-shuttling proteins and p53 interact specifically with the YB-NLS and are involved in anticancer reagent-induced nuclear localization of YB-1. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, (2016), 478: 1363-1369. 査読有
4. Takashima A. Mechanism of neurodegeneration through tau and therapy for Alzheimer disease. **Journal of Sport and Health Science** (2016), in press 査読有
5. Soeda Y, and Takashima A. and et al. (16名中16番目) Toxic tau oligomer formation blocked by capping of cysteine residues with 1,2-dihydroxybenzene groups. **Nat Commun.** (2015) Dec 16;6:10216.
6. Yagishita S, Takashima A. and et al. (5名中5番目) Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$ -mediated Phosphorylation in the Most C-terminal Region of Protein Interacting with C Kinase 1 (PICK1) Regulates the Binding of PICK1 to Glutamate Receptor Subunit GluA2. **J Biol Chem.** (2015) Oct 15. 査読有
7. Ohta E, Takashima A, and et al. (19名中14番目) I2020T mutant LRRK2 iPSC-derived neurons in the Sagami-hara family exhibit increased Tau phosphorylation through the AKT/GSK-3 $\beta$  signaling pathway. **Hum Mol Genet.** (2015) Sep 1;24(17):4879-900. 査読有
8. Sotiropoulos I, Takashima A. and et al (8名中8番目) Female Hippocampus Vulnerability to Environmental Stress as Precipitating Factor in Tau Aggregation Pathology. **J Alzheimers Dis.** (2015) Jan 1;43(3):763-74. 査読有
9. Kobayashi S, Tanaka T. and et al. (他3名) YB-1 gene expression is kept constant during myocyte differenti-

ation through replacement of different transcription factors and then falls gradually under the control of neural activity. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, (2015), 68: 1-8. 査読有

10. Umeda T, Takashima A, and et al. (6名中4番目) Neurofibrillary tangle formation by introducing wild-type human tau into APP transgenic mice. **Acta Neuropathol.** (2014) May; 127(5):685-98. 査読有
11. Sahara N, Takashima A, and et al. (5名中5番目) Biochemical Distribution of Tau Protein in Synaptosomal Fraction of Transgenic Mice Expressing Human P301L Tau. **Front Neurol.** (2014) Mar 11;5:26. 査読有
12. Tanaka T, Kobayashi S, and et al. (9名中9番目) Indirubin derivatives alter DNA binding activity of the transcription factor NF-Y and inhibit MDR1 gene promoter. **Eur. J. Pharmacol.**, (2014), 741: 83-89. 査読有



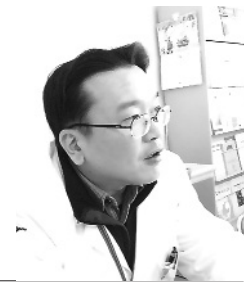
# シナプス可塑性の恒常的維持機構の 解明と神経機能再建への応用

(平成24年度～平成25年度)

公募

宮井 和政

大阪府立大学・大学院総合リハビリテーション学研究所・教授



## 研究の背景と目的

シナプス可塑性誘導刺激は既存のシナプスの伝達効率の変化（長期増強現象：LTPなど）を引き起こすとともに、新たな樹状突起スパインの生成も惹起する。可塑性誘導刺激によって新生したスパインはシナプスへと成熟するまでに15～20時間が必要であること、また新生スパインは既存のシナプスに向かって伸びる傾向があることから、スパインの新生は可塑性の変化の余地の少なくなった古いシナプスを余地の大きい新しいシナプスへと入れ替えることで脳全体の可塑性の余地を恒常的に維持する機構に関わる可能性がある。

我々は、既存のシナプスの伝達効率の変化には関与せず、スパインの新生のみを誘導するシグナル経路としてニューロトリプシン-アグリン経路を同定した（Matsumoto-Miyai et al., Cell, 2009）。可塑性誘導刺激によりシナプスに分泌されたニューロトリプシンはアグリンを切断し、遊離したアグリンC末端断片がスパインの新生を惹起する。本研究では、刺激依存的なスパイン新生に障害のあるニューロトリプシン遺伝子欠損マウスを用いた再学習実験により、スパイン新生が可塑性の恒常的な維持機構に関与するかどうかを検討するとともに、アグリン受容体であるNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseの働きを調節できる強心配糖体を用いて樹状突起スパイン新生促進システムが構築できるかどうかを検討した。

## 研究成果

(1) シナプス可塑性維持におけるスパイン新生の役割：シナプス可塑性維持の指標として、ある刺激に対して特定の反応を学習させたのち、同じ刺激に対して異なる反応を再学習させる行動実験系を用い、ニューロトリプシン遺伝子欠損マウスと野生型マウスの再学習成績を比較した。

(1)-①モリス水迷路における再学習：モリスの水迷路においてゴールのプラットフォームの位置を覚えた直後に変更し、新たなゴールの位置の再学習の成績を比較したところ、ニューロトリプシン遺伝子欠損マウスと野生型マウスでは有意な差は認められなかった。また、ゴールの位置を2回変更した場合も同様

に有意差は認められなかった。

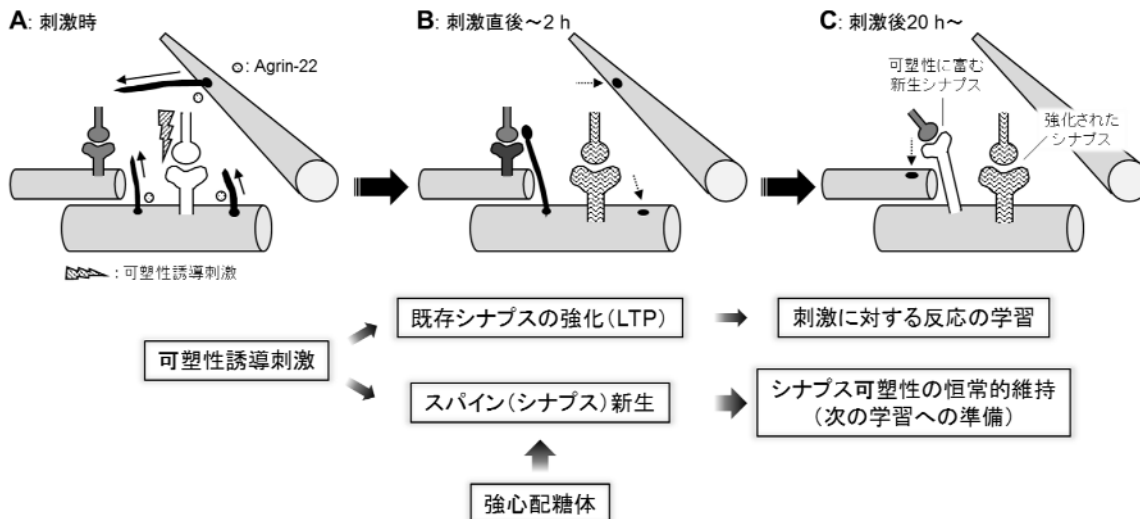
(1)-②恐怖条件づけにおける消去学習：恐怖反応を引き起こす無条件刺激（電気刺激）と条件刺激を同時に与えると、条件刺激のみで恐怖反応を呈するようになる（恐怖記憶の獲得）が、同じ条件刺激のみを与え続けると、やがてその恐怖反応は消去する（消去学習）。消去学習は同じ条件刺激に対してもはや恐怖を感じる必要がないことを再学習するシステムである。ニューロトリプシン遺伝子欠損マウスにおける消去学習を検討したところ、条件刺激が音刺激の場合（キュー依存性）でも、ケージなどの環境や実験手順の場合（文脈依存性）でも、野生型マウスと比較して消去学習の成立が有意に遅れることが明らかとなった。この結果は、消去学習の際には大脳皮質前頭前野でスパイン新生が認められるとの報告とも合致していた。

## (2) 強心配糖体投与によるスパイン新生促進システムの構築

ニューロトリプシン-アグリン経路は可塑性誘導刺激によるスパイン新生のみを担当することから、この経路のみを活性化できれば、神経細胞を興奮させずにシナプス新生を促進するシステムが構築できる。そこで、中枢神経系におけるアグリンC末端断片の受容体であるNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseの働きを調節できる強心配糖体Digoxinの腹腔内投与が、スパインの新生を促進できるか否かを検討した。DigoxinをNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseのポンプ活性を促進する濃度および抑制する濃度で投与したところ、海馬CA1ニューロンの樹状突起からのフィロポディア（スパイン前駆体）の数は、ポンプ活性を促進した場合にのみ増加する傾向が認められた。すなわち、Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseの活性化がスパイン新生を促進する可能性が示唆された。

## 結語

ニューロトリプシン-アグリン経路によるスパイン新生は、ある種のシナプス可塑性の恒常的維持機構に寄与していると考えられた。また、強心配糖体によるアグリン受容体Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseの活性化は、スパイン新生を促進する可能性が示唆された。強心配糖体によるスパイン新生はニューロンの興奮性に





影響を与えずに神経機能障害からの回復を促進できる手法となりうる可能性がある。

## 主要研究成果

### 原著論文

1. Matsumoto-Miyai K, Yamada E, Shinzawa E, Koyama Y, Shimada S, Yoshizumi M, Kawatani M. Serotonergic regulation of distention-induced ATP release from the urothelium. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, 310: F646-F655 (2016).
2. Takezawa K, Kondo M, Kiuchi H, Ueda N, Soda T, Fukuhara S, Takao T, Miyagawa Y, Tsujimura A, Matsumoto-Miyai K, Ishida Y, Negoro H, Ogawa O, Nonomura N, Shimada S. Authentic role of ATP signaling in micturition reflex. **Sci. Rep.**, 6: 19585 (2016).
3. Kudo D, Miyakoshi N, Hongo M, Matsumoto-Miyai K, Kasukawa Y, Misawa A, Ishikawa Y, Shimada Y. Nerve growth factor and estrogen receptor mRNA expression in paravertebral muscles of patients with adolescent idiopathic scoliosis: a preliminary study. **Spine Deform.**, 3: 122-127 (2015).
4. Fukiya Y, Yoshizumi M, Saito M, Matsumoto-Miyai K, Nimura T, Kawatani M. Synergistic effects of loxoprofen and glycine on the micturition reflex in conscious rats. **Biomed. Res.**, 35: 17-23 (2014).
5. Kudo D, Miyakoshi N, Hongo M, Matsumoto-Miyai K, Kasukawa Y, Misawa A, Ishikawa Y, Shimada Y. LBX1 mRNA expression in paravertebral muscles of patients with adolescent idiopathic scoliosis: a preliminary study. **Akita J. Med.**, 40: 151-156 (2013).
6. Matsumoto-Miyai K, Yamada E, Yoshizumi M, Kawatani M. The regulation of distention-induced ATP release from urothelium by the adenylyl cyclase-cyclic AMP pathway. **Biomed. Res.**, 33: 153-157 (2012).

### 総説

1. Sonderegger P, Matsumoto-Miyai K. Activity-controlled proteolytic cleavage at the synapse. **Trends Neurosci.**, 37: 413-423 (2014).
2. Matsumoto-Miyai K, Yoshizumi M, Kawatani M. Regulatory effects of 5-hydroxytryptamine receptors on voiding function. **Adv. Ther.**, 32: S3-S15 (2015).



# 胎児期における脳内環境の破綻と 育児放棄の発症機序の解明

(平成24年度～平成25年度)

公募

下川 哲昭

高崎健康福祉大学・健康栄養学部・教授



## 研究の背景と目的

CIN85 (Cbl-interacting protein of 85 kD) は膜受容体エンドサイトーシスの制御分子である。このCIN85を欠損したマウスを作製・解析したところ「多動」と「育児放棄 (ネグレクト)」の表現型を示した。多動については脳線条体のドパミン受容体におけるエンドサイトーシスの異常によることを明らかにした。本研究の目的は、胎児期における神経系の形成と将来の育児行動との関連、正常育児行動への回復を育児放棄のモデルマウスを用いて明らかにすることである。さらに、先天性甲状腺機能低下症における行動異常の解析を脳内環境の破綻に焦点をあてて解析した。

## 研究成果

### (1) 胎児期における母体からの適正なプロラクチンシグナルは次世代における正常な育児行動の発現に必要である<sup>(1)</sup>

育児放棄の母親 (CIN85 KO) によって死亡したすべての仔の胃にはミルクが確認できなかったことから、母親の乳腺の構造とミルクの産生能を調べたがWTと違いはなかった。ホモ接合体 (homozygote) の母親から生まれたCIN85 KOは育児放棄をするが、ヘテロ接合体 (heterozygote) の母親から生まれたCIN85 KOは育児行動をする。そこで胎仔期環境の違いによる育児行動の獲得を解析するため胚の交換移植を行った。CIN85 KOの卵管にWTの胚を移植、反対にWTの卵管にCIN85 KOの胚を移植し、誕生した仔は成熟後、交配・分娩させ育児行動を観察した。KOの卵管に移植したWTの胚由来の仔は成熟後、WTであるにもかかわらず強い育児放棄様行動を示した。一方、WTの卵管に移植したKOの胚由来の仔は成熟後、正常な育児行動を示した。これらの結果より胎仔期環境が将来の育児行動の発現を決定している可能性が示された。この決定にはいかなる分子や機構が関わっているのか？ CIN85 KOは脳内ドパミンシグナルの過剰により多動性を示す。ドパミンは育児行動の発現に必要な下垂体ホルモンであるプロラクチン (PRL) の阻害因子である。CIN85 KOでは視床下部ドパミン量は上昇しており、一方、血中PRL濃度は低下している。

た。妊娠後期から出産までPRLを投与すると次世代の仔の育児行動は回復した。さらに成熟後の育児行動に必要な神経回路である視床下部内側視索前野 (MPOA) から後腹側核 (VP) までの神経活動はCIN85 KOでは低下しているがPRLの投与により、その神経活動は上昇した。これらの結果は、胎児期における母体からの適正なPRL曝露は次世代の正常な育児行動の発現に必要であることを示している。

### (2) 先天性甲状腺機能低下症における脳内環境の破綻による行動異常の解析<sup>(2-5)</sup>

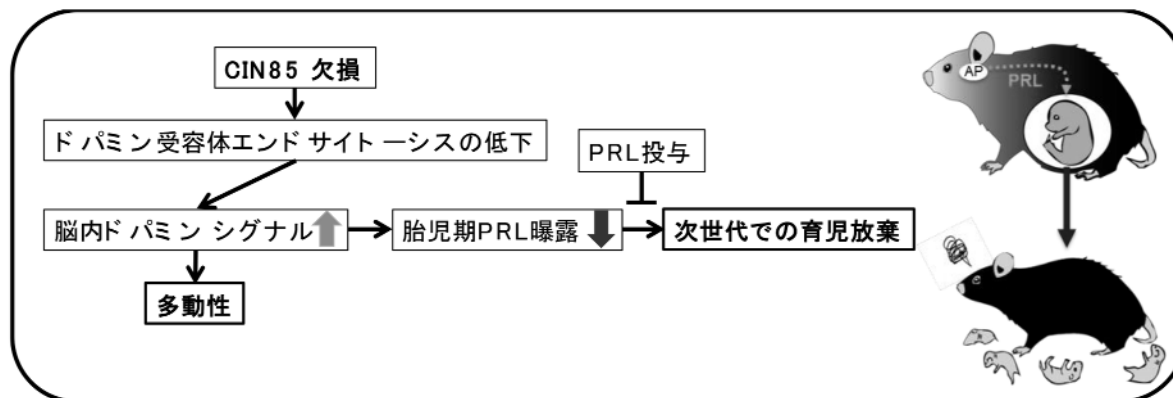
甲状腺ホルモン (TH) は、中枢神経系の発達および機能維持において重要な役割を果たす。ここでは先天性甲状腺機能低下症モデル動物であるrdwラットの行動解析と脳内環境の破綻との相関について示す。rdwラットは、Wistarラットから先天性侏儒症を示す突然変異体として確立され甲状腺機能低下症を示す。

#### a. rdwラットにおける小脳発達遅延は運動協調障害を引き起こす

甲状腺機能低下の小脳機能に及ぼす影響をロータロッド試験により評価した。rdwラットの雌雄におけるロータロッド上での時間は、それぞれ雄野生型ラットの約15%、雌野生型ラットの5%未満であった。この運動協調障害の重大な障害の原因を明らかにするために、小脳プルキンエ細胞内に特異的に発現するcalbindin-D28kの抗体を使って小脳の形態学的相違を免疫組織化学的に調べた。rdwラットのプルキンエ細胞では、野生型と比較してその細胞体は有意に小さく、樹状突起形成も乏しかった。また、小脳の細胞層の形成では外顆粒細胞層が厚く分子層が薄いことが分かった。

#### b. rdwラットは寡動 (活動性低下) である

rdwラットの概日リズムは野生型同様、明/暗サイクルに従って変化し暗時の運動量は明時に比べ有意に高かった。しかしながら、運動量自体は野生型ラットに比べ顕著に低く同時期の野生型ラットと比較して明/暗期共に25%程度に減少した。



c. 離乳後のT4投与はrdwラットの脳機能異常を改善させない

離乳後のrdwラットに対するT4の経口投与は、甲状腺機能低下症による体重減少を改善し同年齢の正常ラットと同等のサイズに成長させた。また、T4投与はrdwラットの血清TSHレベルを減少、血清T3レベルを上昇させ正常ラットと同等のホルモン濃度にした。一方、rdwラットの脳機能障害に対するT4投与の効果をロータロッド試験等で評価したが、運動協調における重度の障害を改善しなかった。さらにrdwラットは依然として寡動であった。

d. rdwラットは黒質線条系においてドパミンの異常な軸索輸送を示す

rdwラットの甲状腺機能低下症に対する黒質線条系のドパミン作動性シグナルの関与を解析した。rdwラットの黒質におけるドパミン含有量は野生型と比較して有意な増加を示した。反対にrdwラットの線条体におけるドパミン含有量は野生型に比べ有意な低下を示した。一方、脳におけるTHの欠乏は、チューブリンアイソフォームの発現量の低下による軸索輸送の障害を引き起こす。rdwラットでは、黒質と線条体におけるtubulin IIIの発現量が、野生型ラットのそれよりも有意に低かった。これらの知見は、rdwラットの寡動性の要因である線条体ドパミンレベルの低下は、tubulin IIIの発現量の低下により黒質から線条体へドパミンの軸索輸送が障害されることによることを示している。

## 結語

(1) 育児行動の発現は、妊娠中の母体の変化や出産後の新生児との触れ合いによって引き起こされるとされてきた。また、幼少期に親からネグレクトされた子供は自分が親になった際、我が子をネグレクトしてしまう傾向があることがわかっている。これに対して我々の研究結果は、将来、仔育てするか？しないか？は従来から考えられてきた母親の妊娠や出生後ではなく、母親自身がその母親の子宮内にいた胎児期の内分泌環境、特に母体からの適正なPRLシグナルと脳内育児神経回路によってその方向性が決定する。

(2) 甲状腺ホルモンは小脳形成およびドパミンの軸索輸送の制御を介して脳内環境の形成・維持に極めて重要な機能を有している。

## 主要研究成果

### 原著論文

1. 投稿中
2. Shimokawa N, Yousefi B, Morioka S, Yamaguchi S, Ohsawa A, Hayashi H, Azuma A, Mizuno H, Furudate S, Haijima A, Takatsuru Y, Iwasaki T, Umezu M, Koibuchi N. Altered cerebellum development and dopamine distribution in a rat genetic model with congenital hypothyroidism. *J Neuroendocrinol* 26: 164-175, 2014.
3. Yu L, Iwasaki T, Xu M, Lesmana R, Xiong Y, Shimokawa N, Chin WW, Koibuchi N. Abberant cerebellar development of transgenic mice expressing dominant-negative thyroid hormone receptor in cerebellar Purkinje cells. *Endocrinology* 156, 1565-1576, 2015.
4. Toya S, Takatsuru Y, Amano I, Shimokawa N, Koibuchi N. Early-life-stress affects the homeostasis of glutamatergic synapses. *E. J. Neurosci.* 40, 3627-3634, 2014.
5. Xu M, Sulkowski ZL, Parekh P, Khan A, Chen T, Midha S, Iwasaki T, Shimokawa N, Koibuchi N, Zavacki AM, Sajdel-Sulkowska EM. Effects of Perinatal Lipopolysaccharide (LPS) Exposure on the Developing Rat Brain; Modeling the Effect of Maternal Infection on the Devel-

oping Human CNS. *Cerebellum* 12, 572-586, 2013.

## 総説

1. Shimokawa N, Masuda S, Masuda H, Koibuchi N. CIN85 defect in brain and neurobehavioral disorder: involvement in excess dopamine signaling. *Hormonal Studies*, doi: 10.7243/2052-8000-1-2, 2013.
2. Shimokawa N, Koibuchi N. Animal models to study thyroid hormone action in neurodevelopment. In: **Thyroid hormone disruption and neurodevelopment** (Eds, Koibuchi N, Yen PM), 2017, Springer, New York, NY.
3. 下川 哲昭 脳内環境の破綻と神経・精神異常の発生メカニズムの解析-「多動症」や「育児放棄」への一考察。「こころの発達と病気」脳の世紀推進会議編 pp.63-89, 2016.



てんかん発症に伴う脳内温度環境変化と病態悪化のクロスリンク  
てんかんの病態悪化に関与するアストロサイト亜種の性質  
(平成24年度～平成27年度)



公募

柴崎 貢志

群馬大学大学院・医学系研究科・准教授

研究の背景と目的

我々はこれまでの研究で、37℃で一定と考えられてきた脳内温度が動物の行動や状態に応じてダイナミックに変動していることを見いだしている。さらに、この温度変化を脳内の温度センサー・TRPV4 (34℃以上で活性化) が感知し、温度エネルギーを電気信号に変換することで神経活動に役立てる分子機構を見いだしてきた。本研究では、てんかん発症に着目し、その病態における、局所脳内温度が正常時と比較し、どの程度変化しているのかを調べ、TRPV4が脳内温度情報を電気信号に変換するシステムの破綻が神経興奮性の異常にどのようにつながるのかを分子レベルで調べた。また、TRPV4陽性アストロサイトという新たなグリアネットワークの制御に着目しててんかんの病態分子基盤解明と治療法開発研究にも取り組んだ。

研究成果

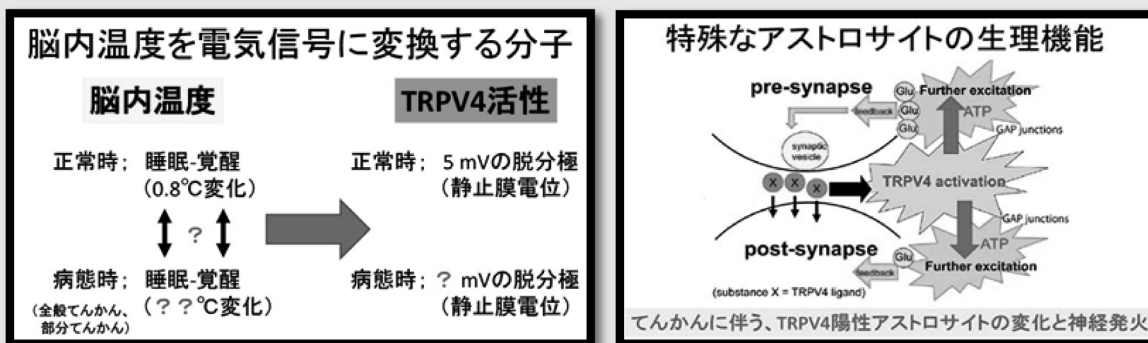
(1) 脳内温度環境を電気信号に変換し、脳機能を制御する TRPV4 : 神経細胞の成熟過程におけるTRPV4のシナプス局在化はシナプス構造の成熟化とは独立した事象として生じており、マウスにおいては幼児期に母親が餌の探索に出かけた際に体温・脳内温度低下が起る。このため、その温度的不均一性を克服し、自分自身で熱産生し、脳内温度を保つ環境を獲得した後ではじめてTRPV4が後シナプスへと局在化することを見いだした (BBRC 2015)。これまでに多くの古典的な研究により、25℃の室温条件下よりも生理的温度環境である37℃の方が神経細胞の興奮性が高くなることが報告されていたが、なぜ37℃の生理条件の方が興奮性をもたらすのかに関する分子メカニズムは全く未解明であった。我々は、温度センサー・TRPV4の生理的温度環境 (37℃) による活性化を介して、脳内温度情報が神経興奮のためのシグナルに変換される過程を明らかにし、何故恒温動物の脳内温度が、変動しないように精密に制御されているのかを知る重要な手がかりを得た。そして、TRPV4が神経活動維持に必須であり、TRPV4KOマウスは統合失調症に類似した行動異常を示すことを見いだした (Pflugers Archiv, 2015)。

(2) てんかん病態時の脳内温度とTRPV4 : てんかん病態では脳内において温度センサー・TRPV4が過剰に活性化し、神経興奮が異常になることが痙攣を引き起こす一因であると考えられた。てんかんモデルマウスのてんかん原性域に独自開発した局所温度可変システムを埋め込み、てんかん原性域をTRPV4の活性化温度閾値である34度を下回る30度程度まで冷却すると、てんかん放電をほぼ消失させることが出来た。この実験の際、野生型とTRPV4欠損マウスで、てんかん原性域の冷却効果を比較したところ、脳冷却による治療効果は野生型マウスで有意に大きかった。つまり、脳冷却効果が脳内温度で恒常的に活性化しているTRPV4阻害を介するものであることを見いだした (投稿中)。

(4) アストロサイトTRPV4と神経活動 : ごく一部 (20%以下) の限られたアストロサイトだけにTRPV4発現が限局していることを見いだした (BBRC 2013)。そして、アストロサイトTRPV4は脳内に存在するアラキドン酸により活性化し、ギャップ結合とATP放出を介して近傍他のアストロサイトを興奮させ、それらがグルタミン酸放出を行うことで、シナプス活性を増強していることを明らかにした (JBC 2014、著者のデータが表紙を飾った)。

(5) アストロサイトTRPV4とてんかん病態 : 部分てんかんモデルマウスのてんかん原性域においては、全てのアストロサイトがTRPV4陽性へと変化し、過興奮を引き起こすことで病態悪化が進行する可能性を見いだした (投稿準備中)。この他に、ニューロンとは異なり、アストロサイト内ではTRPV4が一部のミトコンドリアに高集積し、それらのミトコンドリアが脱分極し、細胞代謝レベルを負に制御していることも新たに見いだした (投稿準備中)。そして、TRPV4阻害薬が部分てんかんの有用な治療薬候補となり得ることも見いだした (投稿準備中)。

てんかん発症に伴う脳内温度環境変化と病態悪化のクロスリンク  
てんかんの病態悪化に関与するアストロサイト亜種の性質 (代表: 柴崎貢志)



## 結語

脳内環境の中でも特に脳内温度に着目し、正常脳と病態脳における局所温度変化や温度センサーTRPV4異常活性化に着目した解析を進め、脳内温度とTRPV4が恒温動物の高度な脳機能を担う主要な因子であることを明らかにした。てんかん病態の制御には、てんかん原性域の冷却やTRPV4阻害が有用な治療となり得ることを見いだした。特に、てんかん脳では正常脳で20%以下しか存在しないTRPV4陽性アストロサイト数が急増し、全てのアストロサイトがTRPV4陽性化し、細胞代謝レベルを異常化することが病態悪化の一因であるという新たなメカニズムを見いだした。これらに着目し、グリア創薬が今後の病態制御の主役となり得ると結論づけた。

## 主要研究成果

### 原著論文

1. Sugio S, Nagasawa M, Kojima I, Ishizaki Y, Shibasaki K. TRPV2 activation by focal mechanical stimulation requires interaction with the actin cytoskeleton and enhances growth cone motility. **FASEB J.** in press
2. Shibasaki K, Hosoi N, Kaneko R, Ishizaki Y, Yamada K. Glycine release from astrocytes via functional reversal of GlyT1. **J. Neurochem.** (2016) July 15 (Epub ahead of print)
3. Shibasaki K, Sugio S, Takao K, Yamanaka A, Miyakawa T, Tominaga M, Ishizaki Y. TRPV4 activation at the physiological temperature is a critical determinant of neuronal excitability and behavior. **Pflugers Archiv.** 467(12):2495-2507 (2015)
4. Iijima K, Kurachi M, Shibasaki K, Naruse M, Puentes S, Imai H, Yoshimoto Y, Mikuni M, Ishizaki Y. Transplanted microvascular endothelial cells promote OPC survival in ischemic demyelinating lesions. **J. Neurochem.** 135(3):539-550 (2015)
5. Naruse M, Shibasaki K, Ishizaki Y. FGF-2 signal promotes proliferation of cerebellar progenitor cells and their oligodendrocytic differentiation at early postnatal stage. **Biochem Biophys Res. Commun.** 463(4):1091-96 (2015)
6. Kusakari S, Saitow F, Ago Y, Shibasaki K, Sato-Hashimoto M, Matozaki Y, Hirai H, Matsuda T, Matozaki T, Ohnishi H. Shp2 in forebrain neurons regulates synaptic plasticity and memory formation in mice. **Mol. Cell. Biol.** 35(9):1557-72 (2015)
7. Shibasaki K, Tominaga M, Ishizaki Y. Hippocampal neuronal maturation triggers post-synaptic clustering of brain temperature-sensor TRPV4. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 458: 168-173 (2015)
8. Shibasaki K, Ikenaka K, Tamalu F, Tominaga M, Ishizaki Y. A novel subtype of astrocytes expressing TRPV4 (transient receptor potential vanilloid 4) regulates neuronal excitability via release of gliotransmitters. **J. Biol. Chem.** 289(21):14470-80 (2014) <cover of the paper >
9. Takayama Y, Shibasaki K, Suzuki Y, Yamanaka A, Tominaga M. Modulation of water efflux through functional interaction between TRPV4 and anoctamin1. **FASEB J.** 28(5):2238-48 (2014)
10. Kayakabe M, Kakizaki T, Kaneko R, Sasaki A, Nakazato Y, Shibasaki K, Ishizaki Y, Saito H, Suzuki N, Furuya N, Yanagawa Y. Motor dysfunction in cerebellar Purkinje cell-specific vesicular GABA transporter knockout mice. **Front Cell Neurosci.** 7:286 (2014)
11. Shibasaki K, Ishizaki Y, Mandadi S. Astrocytes express functional TRPV2 ion channels. **Biochem. Biophys.**

**Res. Commun.** 441: 327-332 (2013)

12. Naruse M, Shibasaki K, Yokoyama S, Kurachi M, Ishizaki Y. Dynamic Changes of CD44 Expression from Progenitors to Subpopulations of Astrocytes and Neurons in Developing Cerebellum. **PLoS ONE** 8: e53109 (2013)
13. Okano-Uchida T, Naruse M, Ikezawa T, Shibasaki K, Ishizaki Y. Cerebellar neural stem cells differentiate into two distinct subtypes of astrocytes in response to CNTF and BMP2. **Neuroscience Letter** 552:15-20 (2013)

## 総説

1. Shibasaki K, TRPV4 ion channel as important cell sensor. **J. Anesthesia** 30(6):1014-1019 (2016)
2. Shibasaki K, Physiological significance of TRPV2 as a mechanosensor, thermosensor and lipidsensor. **J. Physiol. Sci.** 66(5): 359-65 (2016)



## 神経-ミクログリア接触シグナルによる脳内環境制御メカニズムの解明 (平成24年度～平成25年度)

## 白質ミクログリアを制御する細胞間接触シグナルの解析 (平成26年度～平成27年度)



公募

大西 浩史

群馬大学大学院・保健学研究科・教授

### 研究の背景と目的

ミクログリアは貪食作用による損傷組織の除去を介して、障害を受けた脳組織の修復に中心的な役割を果たす。一方、過剰な活性化は炎症性サイトカインや神経傷害因子の作用により、多様な神経疾患、炎症性疾患で病態の増悪をもたらす。ミクログリアは神経細胞など周囲の細胞と直接接触することで脳内環境をサーベイしており、その際には様々な細胞間接触シグナルがミクログリアの機能を正・負に制御すると考えられる。多様な細胞間接触シグナルの中で、膜型分子SIRP $\alpha$ とCD47によるシグナルは、マクロファージ貪食作用や樹状細胞恒常性などに関与することが知られている。SIRP $\alpha$ はミクログリアにも発現するが、その機能はまだ明らかでない。本研究では、CD47-SIRP $\alpha$ シグナルを中心に、ミクログリアの活性化制御システムの解析を進め、神経疾患・神経障害の分子病態の理解、新たな臨床応用標的の創出を目指す。

### 研究成果

(1) CD47-SIRP $\alpha$ シグナルのミクログリア活性化制御への関与：SIRP $\alpha$ 遺伝子破壊マウスの脳内で、樹状細胞マーカーであるCD11cのmRNAが増加することを見出し、さらに、組織化学的解析により、野生型マウス脳ではほとんど存在しないCD11c陽性のミクログリアが、SIRP $\alpha$  KOマウスの脳内で著しく増加することを明らかにした。一方、SIRP $\alpha$ のリガンドCD47のKOマウスもSIRP $\alpha$  KOマウスと同様の表現型を示すことから、CD47とSIRP $\alpha$ の相互作用の欠損がCD11c陽性ミクログリア増加の原因であることがわかった。また、CD47-SIRP $\alpha$ シグナル欠損の影響は白質領域に特異的であり、脳梁、白板、海馬采など白質領域に限定してCD11c陽性ミクログリアの増加がみられた。KOマウスの白質ではミクログリアの細胞数が増加しており、ミクログリアの増殖も起こっていると考えられた。

脊髄ミクログリアをフローサイトメトリーで解析した結果、

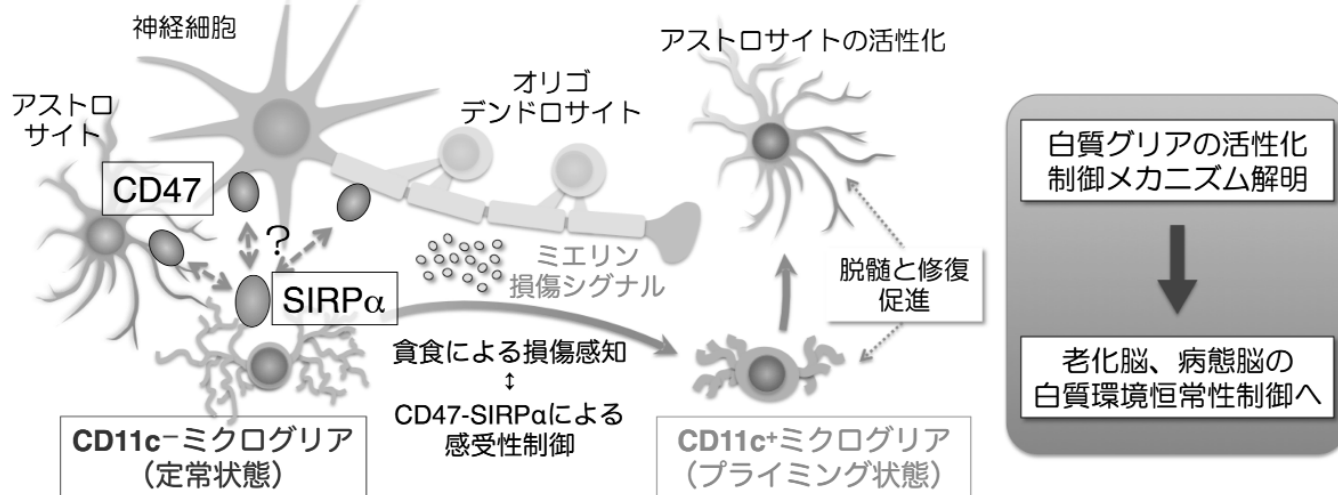
CD11c陽性ミクログリアでは、CD14, Clec7a, CD68など自然免疫系に特徴的な分子が増加していることがわかった。さらに、SIRP $\alpha$  KOマウスでは、CD11c陰性ミクログリアにおいても、これら分子のマイルドな増加傾向が見られた。これらのことから、CD47-SIRP $\alpha$ シグナルは白質、灰白質のミクログリア活性化を抑制的に制御するが、その欠損による影響は、白質でより顕著に現れると考えられた。

CD47-SIRP $\alpha$ シグナル欠損の影響が特に顕著な白質領域の構造を電子顕微鏡により解析したところ、SIRP $\alpha$  KOマウスの海馬采では、特に直径の太い軸索でミエリン化の割合が低下する傾向が認められ、KOマウスでは白質ミエリンの破壊と修復による恒常性維持がミクログリア活性化により影響を受けている可能性が考えられた。ただし、後述のように、この表現型については矛盾する結果も得られており、今後さらに詳細な解析を重ねる必要がある。

### (2) マイクロアレイ解析による遺伝子発現変化の検討：

CD47-SIRP $\alpha$ シグナルの欠損が白質環境に与える影響をさらに検討するために、CD47 KOマウスの白質組織についてマイクロアレイによる発現遺伝子の解析を行った。白質として視神経/視索を解析したところ、野生型マウスに比べてCD47 KOマウスの白質で増加する遺伝子の中には、自然免疫、炎症、貪食促進制御等のGO termを含む遺伝子群が有意に多く含まれていた。また、Lgals3, Clec7a, Lpl, Apoc1, Ch25h, Igf1, Mmp12など、ミエリンの脱髄と再生に関連する複数の遺伝子が増加していることが明らかとなった。さらに脳から単離したミクログリアを使って同様の解析を行ったところ、細胞増殖因子Igf1、脂質代謝関連遺伝子Lpl, Apoc1, Ch25h, カテプシン阻害因子Cst7、細胞外基質分解酵素Mmp12などが、白質サンプルと共通に増加する遺伝子群として同定された。これらのことからKOマウスの白質ミクログリアは細胞増殖刺激、脂質代謝、基質分解などの機能更新を特徴とする可能性が考え

## CD47-SIRP $\alpha$ シグナルによる白質グリア活性化制御



られた。また、白質サンプルの解析結果から、KO マウスでは反応性アストロサイトのマーカー分子GFAPの発現増加が確認され、アストロサイトも活性化状態にあると考えられた。

**(3) ミクログリアに発現するSIRP  $\alpha$ の関与** : CD47-SIRP  $\alpha$ シグナルがどのような細胞間で機能するのかを検討するために、Cx3cr1-CreER マウスとSIRP  $\alpha$ -flox マウスの交配により、ミクログリア特異的コンディショナルKO (cKO) マウスを作製し、全身性KO マウスと表現型を比較した。解析の結果、ミクログリア特異的SIRP  $\alpha$  cKOは全身性KO マウスと同様の表現型を示すことから、ミクログリアに発現するSIRP  $\alpha$ が周囲の細胞に発現するCD47と相互作用してミクログリアの活性化を制御することが明らかとなった。また、cKOの白質領域では、GFAPの免疫染色性が増強しており、ミクログリアの変化がアストロサイトの活性化を誘導することがわかった。一方、電子顕微鏡解析では、全身性KO マウスで見られたミエリン軸索の割合低下はcKO マウスでは認められず、定常状態でのミエリン恒常性への関与については今後の課題として残されている。

cKOおよび野生型マウスでCuprizone誘導性脱髄モデルを検討したところ、Cuprizone投与により、野生型マウスでもミクログリア活性化 (CD11c陽性ミクログリアの出現等) が認められる一方、cKOマウスのミクログリアでは、より早期からより激しくミクログリアとアストロサイトが活性化し、脱髄の重症化も認められた。一方、重症化した脱髄は回復期では速やかに修復され、同じ期間内に野生型と同レベルにまで回復した。SIRP  $\alpha$ の欠損によりミクログリアはCuprizoneの傷害性に高感受性となっており、損傷ミエリンの除去が亢進することがわかった。

## 結語

ミクログリアのSIRP  $\alpha$ はミエリン損傷への応答性の閾値を制御する可能性がある。その場合、負荷をかけていない状態では、SIRP  $\alpha$ 欠損ミクログリアは、白質での生理的なミエリンの破壊と修復 (ターンオーバー) に過剰に反応していることが考えられる。SIRP  $\alpha$ は、ミクログリアを起点とするアストロサイト活性化にも関与しており、白質グリア活性化制御の主要な因子であることがわかった。また詳細は述べないが、本研究に関連して作製したShp2 (SIRP  $\alpha$ 下流シグナル分子) KOマウス、CD47 KOマウスで見出した神経機能の異常については、領域内研究者との共同研究により論文にまとめた (Kusakari et al. *Mol Cell Biol*, 2016; Koshimizu et al., *PLoS ONE*, 2014)。

## 主要研究成果

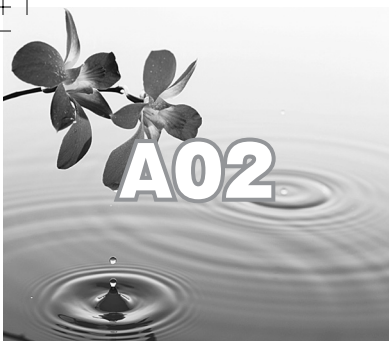
### 原著論文

1. Kusakari S, Saitow F, Ago Y, Shibasaki K, Sato-Hashimoto M, Matsuzaki Y, Kotani T, Murata Y, Hirai H, Matsuda T, Suzuki H, Matozaki T, Ohnishi H. Shp2 in forebrain neurons regulates synaptic plasticity, locomotion, and memory formation in mice. *Mol Cell Biol* 35: 1557-1572 (2015).
2. Koshimizu H, Takao K, Matozaki T, Ohnishi H, Miyakawa T. Comprehensive behavioral analysis of Cluster of Differentiation 47 knockout mice. *PLoS ONE* 9: e89584, (2014).
3. Zen K, Guo Y, Bian Z, Lv Z, Zhu D, Ohnishi H, Matozaki T, Liu Y. Inflammation-induced proteolytic processing of the SIRP  $\alpha$  cytoplasmic ITIM in neutrophils propagates a proinflammatory state. *Nat Commun* 4: (2013).

## 総説

1. Murata Y, Kotani T, Ohnishi H, Matozaki T. The CD47-SIRP  $\alpha$  signalling system: its physiological roles and

therapeutic application. *J Biochem* 155: 335-344 (2014).



# 小脳バーグマングリア微小突起によるシナプス修飾の維持・破綻に関する研究

(平成24年度～平成25年度)



公募

大倉 正道

埼玉大学・理工学研究科・准教授

## 研究の背景と目的

小脳は姿勢制御・運動学習等の中枢であるが、小脳皮質において唯一の出力神経細胞であるプルキンエ細胞(PC)の発火活動は、PCとアストロサイトの一種であるバーグマングリア(BG)とのグリアー神経連関により修飾され、その異常によって脊髄小脳失調症(SCA7)等の疾患が引き起こされる。近年シナプス近傍の環境に重大な影響を与えるアストロサイト微小突起が海馬等でシナプス活動に伴って短時間のうちにダイナミックに伸縮することが分かってきた。本研究では、微小突起の伸縮が突起内Ca<sup>2+</sup>濃度、シナプス活動、およびシナプス近傍の神経外環境の変化とどのように関係するのかを明らかにし、シナプスの機能維持・障害のメカニズムを解明することを目的としている。

## 研究成果

三者間シナプスの修飾を理解するためにアストロサイトと神経細胞の局所形態および局所Ca<sup>2+</sup>活動を可視化できる蛍光プローブの開発を進めた。その結果、神経細胞における単一発火活動、発火閾値下のシナプス入力活動やアストロサイトにおける突起内Ca<sup>2+</sup>活動を可視化できる高感度・高性能な緑色蛍光Ca<sup>2+</sup>プローブG-CaMP6～8の開発に成功した。開発したG-CaMP6にアクチンを融合させたG-CaMP6-actinを作製し、マウスの海馬CA3神経細胞に発現させたところ、歯状回から

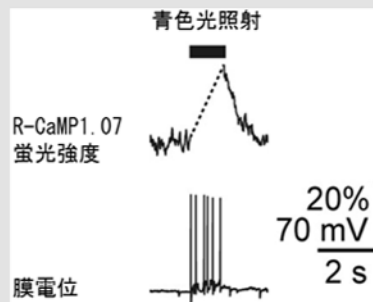
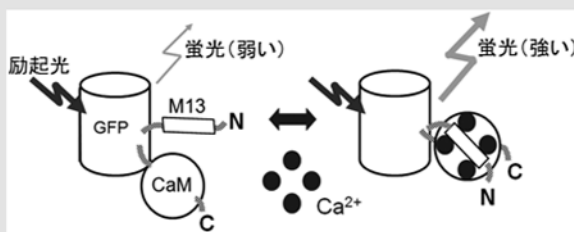
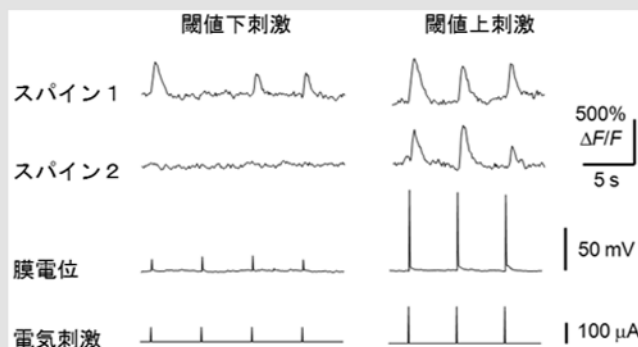
の投射線維の閾値上および閾値下の刺激に対応したシナプスのCa<sup>2+</sup>活動を可視化することに成功した。また、G-CaMP7をゼブラフィッシュの視覚の中枢である視蓋に発現させたところ、餌であるゾウリムシの網膜上の像に対応した視蓋の部位の活動をリアルタイムに可視化することに成功した。さらに、赤色蛍光Ca<sup>2+</sup>プローブR-CaMP1.07を開発し、海馬神経細胞において光刺激プローブであるチャンネルロドプシンと併用してCa<sup>2+</sup>可視化を容易に行えることを示した。

次に三者間シナプスを構築する軸索終末、樹状突起スパイン、アストロサイト微小突起の形態とCa<sup>2+</sup>活動を可視化できる蛍光プローブを作製した。開発したプローブを神経細胞とアストロサイトに発現させ、グリアー神経連関を修飾することが知られている各種伝達物質やその阻害薬の投与、あるいは光感受性非選択性カチオンチャンネルであるchannelrhodopsin-2を用いて細胞種特異的な光刺激等を行い、三者間シナプスの局所形態とCa<sup>2+</sup>活動への影響について可視化解析を進めた。

## 結語

本研究でアストロサイトと神経細胞の局所形態および局所Ca<sup>2+</sup>活動を可視化できる蛍光プローブが開発された。高感度・高性能な緑色蛍光Ca<sup>2+</sup>プローブは、閾値上および閾値下の神経活動を検出できる性能を備えており、三者間シナプス活動の解析への応用を可能にした。また赤色蛍光Ca<sup>2+</sup>プローブR-

## 小脳バーグマングリア微小突起によるシナプス修飾の維持・破綻に関する研究 (代表：大倉正道)





CaMP1.07は、光刺激プローブであるチャンネルロドプシンとの併用により、神経活動の操作と検出を同時実施する解析への応用を可能にした。これによりグリア-神経連関を含めたシナプス修飾の維持・破綻のメカニズムの解析を進めることが出来た。

また、領域内共同研究（五十嵐道弘先生、船曳和雄先生、柴崎貢志先生、檜山武史先生との共同研究）を通じて、異なる脳部位や細胞内局所の機能解析を進めることが出来た。

## 主要研究成果

### 原著論文

1. Monai H, Ohkura M, Tanaka M, Oe Y, Konno A, Hirai H, Mikoshiya K, Itohara S, Nakai J, Iwai Y, Hirase H. Calcium imaging reveals glial involvement in transcranial direct current stimulation-induced plasticity in mouse brain. **Nature Communications** 7:11100, 1-10, (2016).
2. Kobayashi C, Ohkura M, Nakai J, Matsuki N, Ikegaya Y, Sasaki T. Large-scale imaging of subcellular calcium dynamics of cortical neurons with G-CaMP6-actin. **NeuroReport** 25, 501-506, (2014).
3. Hiroi M, Ohkura M, Nakai J, Matsuda N, Hashimoto K, Inoue K, Fiala A, Tabata T. Principal component analysis of odor coding at the level of third-order olfactory neurons in *Drosophila*. **Genes to Cells** 18, 1070-1081, (2013).
4. Mera T, Itoh T, Kita S, Kodama S, Kojima D, Nishinakamura H, Okamoto K, Ohkura M, Nakai J, Iyoda T, Iwamoto T, Matsuda T, Baba A, Omori K, Ono J, Watarai H, Taniguchi M, Yasunami Y. Pretreatment of donor islets with the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger inhibitor improves the efficiency of islet transplantation. **American Journal of Transplantation** 13, 2154-2160, (2013).
5. #Muto A, #Ohkura M, Abe G, Nakai J, Kawakami K. Real-time visualization of neuronal activity during perception. **Current Biology** 23, 1-5, (2013). #Co-first Authors.
6. #Ohkura M, #Sasaki T, Sadakari J, Gengyo-Ando K, Kagawa-Nagamura Y, Kobayashi C, Ikegaya Y, Nakai J. Genetically encoded green fluorescent Ca<sup>2+</sup> indicators with improved detectability for neuronal Ca<sup>2+</sup> signals. **PLoS One** 7: e51286, 1-10, (2012). #Co-first Authors.
7. #Ohkura M, #Sasaki T, Kobayashi C, Ikegaya Y, Nakai J. An improved genetically encoded red fluorescent Ca<sup>2+</sup> indicator for detecting optically evoked action potentials. **PLoS One** 7: e39933, 1-7, (2012). #Co-first Authors.

プローブ R-CaMP1.07. **日本薬理学雑誌** 141, 175-175, (2013).

6. 大倉正道, 貞刈純子, 中井淳一. タンパク質でできた高性能な蛍光カルシウムセンサー. **ケミカルエンジニアリング** 57, 926-931, (2012).

### 総説

1. Takata N, Shinohara Y, Ohkura M, Mishima T, Nakai J, Hirase H. Imaging of astrocytic activity in living rodents. "Optical imaging of neocortical dynamics" Springer, **NeuroMethods** 85, 191-207, (2014).
2. 大倉正道, 中井淳一. 蛍光Ca<sup>2+</sup>プローブタンパク質を用いた神経細胞とアストロサイトのCa<sup>2+</sup>イメージング. **日本薬理学雑誌** 142, 226-230, (2013).
3. 大倉正道, 中井淳一. 蛍光バイオセンサーの開発. 「進化分子工学～高速分子進化によるタンパク質・核酸の開発～」第3編第1章第6節, 267-273, (2013).
4. 大倉正道, 中井淳一. 光遺伝学ツールを用いた光制御および蛍光測定手法の開発. 「オプトジェネティクス (光遺伝学)」第2編第2章第1節, 107-117, (2013).
5. 大倉正道, 中井淳一. (2013) 遺伝子コード型赤色蛍光Ca<sup>2+</sup>



## 神経炎症反応によって制御される脳内アミロイド代謝システムの分子機構

### 炎症反応に呼応する細胞外環境因子によるアミロイドβタンパク代謝制御機構の解明

(平成24年度～平成27年度)

公募

富田 泰輔

東京大学大学院・薬学系研究科・教授



#### 研究の背景と目的

高齢化社会を迎え、アルツハイマー病（AD）は大きな社会問題となっている。これまでに申請者は、AD発症に関わるAβの産生機構について研究を進め、その過程で主にin vitro系において炎症性メディエーターであるS1P、TNFαなどのシグナル刺激によりAβ産生が変化することや、グリア細胞がAβ分解活性を示すプロテアーゼを分泌していることを見出していた。しかしその分子機構や病態への意義については不明であった。そこで本研究では、これらのAβ代謝を制御する炎症性液性因子について注目し、その発現・活性制御メカニズムについて解析を進めると同時に、ADにおける病態に対してこれらの経路がどのように変化するか、モデル生物を用いて検討を行うことを目的として研究を遂行した。

#### 研究成果

##### (1) 炎症性メディエーターによるAβ産生を制御するセクレターゼ活性制御機構

申請者らは、S1PがAβ産生機構を制御する重要な鍵分子である可能性を示唆していた（Takasugi et al., *J Neurosci* 2011）。そこでS1P受容体アンタゴニストであるFTY720を用いて解析した結果、γセクレターゼの活性を抑制することで神経細胞からのAβ産生を低下させることを見出した（Takasugi et al., *PLoS ONE* 2013）。また合成セラミドアナログであるPDMPやDMAPPもγセクレターゼ活性を制御しうることも見出し、炎症性脂質メディエーターであるリゾリン脂質経路がAβ産生系を制御していることを明らかにした（Takasugi et al., *BBRC* 2014）。しかし興味深いことに、FTY720のADモデル動物に対する投与実験においてはAβ42量が増加するという、in vitroとは異なる影響を示した。

これはグリア細胞の存在する脳内環境においてはS1Pシグナルが異なった作用を発揮する可能性を示している。

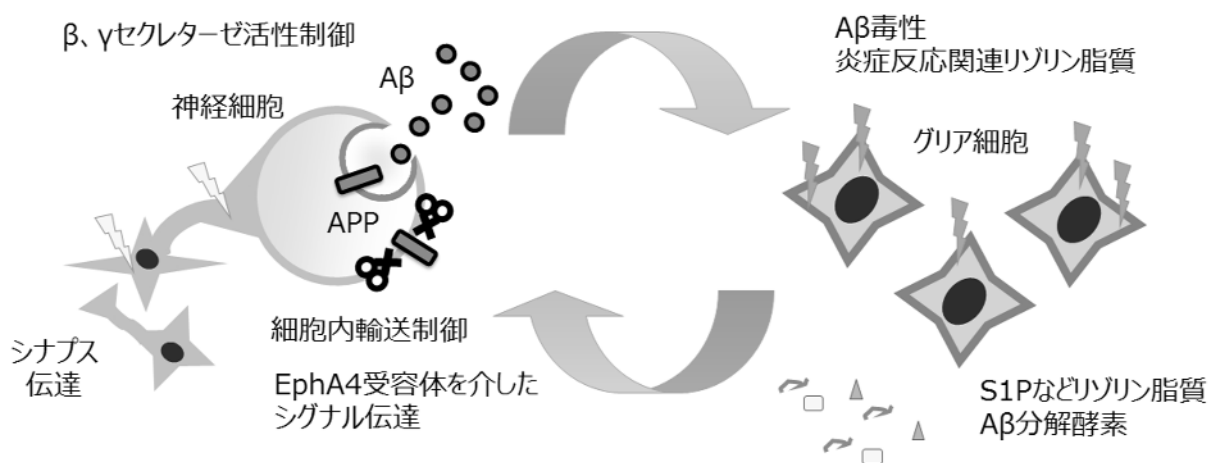
##### (2) グリア細胞が関与する脳内Aβ量を制御する機構の解明

上記結果を踏まえ、Aβ量に対するグリア細胞の寄与を検討したところ、神経・グリア細胞共培養系においては、神経細胞単独培養時には観察されない、Aβ分解活性が培養上清に存在していることも明らかとなった。そこでその責任酵素の同定を目指し、アストロサイトームを用いて生化学的・分子生物学的解析を行った。そしてその培養上清中に、既知のAβ分解酵素プラスミンとは異なる、セリンプロテアーゼに属するAβ分解活性が存在することを見出し、組織型カリクレインファミリーの一つであるKLK7を候補分子として同定した（論文投稿準備中）。KLK7の発現量はAβ濃度によって制御されており、Aβにより惹起される炎症性プロテアーゼであると考えられた。

##### (3) 脂質結合ドメインを有するアルツハイマー症遺伝学的リスク因子が脳内Aβ量を制御する機構の解明

ADの遺伝学的リスク因子のうち、BIN1はリサイクリングエンドソームにおいて脂質と結合し、βセクレターゼのリソソームへの輸送を促進するAβ産生抑制因子であることを明らかにした（Miyagawa et al., *Hum Mol Genet* 2016）。一方、PICALMはγセクレターゼの細胞表面膜からの内在化速度を決定し、Aβ42産生活性を規定している分子であることが明らかとなった（Kanatsu *Nat Commun* 2014; Kanatsu et al., *Hum Mol Genet* 2014）。またEph4が神経-グリア細胞間コミュニケーションを介し神経細胞におけるβセクレターゼの細胞内輸送および代謝が制御されること、その結果Aβ産生が変化されていることを明らかにし、細胞外環境・細胞間相互

### 神経炎症反応によって制御される脳内アミロイド代謝システムの分子機構 炎症反応に呼応する細胞外環境因子によるアミロイドβタンパク代謝制御機構の解明 (公募研究 代表：富田 泰輔)



作用の変化を感受する分子であることを明らかにした（論文投稿準備中）。

## 結語

A $\beta$ 代謝経路における細胞外環境や炎症性因子の重要性が明確となった。またこれまで主に神経細胞におけるメカニズムが注目されてきたA $\beta$ 産生・代謝機構について、グリア細胞、特にアストロサイトの寄与が明らかとなった。今後これらの炎症性メディエーターの変化が孤発性AD脳で生じているか、バイオマーカーとしての可能性を含めて検証し、同時にこれらの経路がAD治療・予防薬開発における介入点となりうるかについて検討を進めていきたい。

## 主要研究成果

### 原著論文

1. Kanatsu K, Hori Y, Takatori S, Watanabe T, Iwatsubo T, Tomita T\*: Partial loss of CALM function reduces A $\beta$  42 production and amyloid deposition in vivo. **Hum Mol Genet** in press (2016)
2. Miyagawa T, Ebinuma I, Morohashi Y, Hori Y, Chang MY, Hattori H, Maehara T, Yokoshima S, Fukuyama T, Tsuji S, Iwatsubo T, Prendergast GC, Tomita T\*: BIN1 regulates BACE1 intracellular trafficking and amyloid- $\beta$  production. **Hum Mol Genet** 25(14):2948-2958 (2016).
3. Tominaga A, Cai T, Takagi-Niidome S, Iwatsubo T, Tomita T\*: Conformational changes in transmembrane domain 4 of presenilin 1 are associated with altered A $\beta$  42 production. **J Neurosci** 36(4):1362-1372 (2016).
4. Takagi-Niidome S, Sasaki T, Osawa S, Sato T, Morishima K, Cai T, Iwatsubo T, Tomita T\*: Cooperative substrate gating mechanism by hydrophilic loop 1 and C terminus of presenilin 1 in the amyloid- $\beta$  production. **J Neurosci** 35(6):2646-2656 (2015).
5. Takasugi N, Sasaki T, Shinohara M, Iwatsubo T, Tomita T\*: Synthetic ceramide analogues increase Amyloid- $\beta$  42 production by modulating  $\gamma$ -secretase activity. **Biochem Biophys Res Comm** 457(2):194-199 (2015).
6. Takeo K, Tanimura S, Shinoda T, Osawa S, Zahariev IK, Takegami N, Ishizuka-Katsura Y, Shinya N, Takagi-Niidome S, Tominaga A, Ohsawa N, Kimura-Someya T, Shirouzu M, Yokoshima S, Yokoyama S, Fukuyama T, Tomita T\*, Iwatsubo T: Allosteric regulation of  $\gamma$ -secretase activity by a phenylimidazole-type  $\gamma$ -secretase modulator. **Proc Natl Acad Sci USA** 111(29):10544-10549 (2014).
7. Kanatsu K, Morohashi Y, Suzuki M, Kuroda H, Watanabe T, Tomita T\*, Iwatsubo T: Decreased CALM expression reduces A $\beta$  42 to total A $\beta$  through clathrin-mediated endocytosis of  $\gamma$ -secretase. **Nat Commun** 5, Article number: 3386 (2014).
8. Taniguchi A, Sasaki D, Shiohara A, Iwatsubo T, Tomita T, Sohma Y, Kanai M: Attenuated aggregation and neurotoxicity of amyloid- $\beta$  peptide by catalytic photo-oxidation. **Angew Chem Int Ed Engl** 53(5):1382-1385 (2014).
9. Takasugi N, Sasaki T, Ebinuma I, Osawa S, Isshiki H, Takeo K, Tomita T\*, Iwatsubo T: FTY720/Fingolimod, a sphingosine analogue, reduces amyloid- $\beta$  production in neurons. **PLoS ONE** 8(5):e64050 (2013).
10. Imamura Y, Umezawa N, Osawa S, Shimada N, Higo T, Yokoshima S, Fukuyama T, Iwatsubo T, Kato N, Tomita

T\*, Higuchi T: Effect of helical conformation and side-chain structure on  $\gamma$ -secretase inhibition by  $\beta$ -peptide foldamers: Insight into substrate recognition. **J Med Chem** 56(4):1443-1454 (2013).

11. Takagi-Niidome S, Osawa S, Tomita T\*, Iwatsubo T: Inhibition of  $\gamma$ -secretase activity by a monoclonal antibody against the extracellular hydrophilic loop of presenilin 1. **Biochemistry** 52(1):61-69 (2013).
12. Suzuki K, Hayashi Y, Nakahara S, Kumazaki H, Prox J, Horiuchi K, Zeng M, Tanimura S, Nishiyama Y, Osawa S, Sehara-Fujisawa A, Saftig P, Yokoshima S, Fukuyama T, Matsuki N, Koyama R, Tomita T\*, Iwatsubo T: Activity-dependent Cleavage of Neuroligin 1. **Neuron** 76(2):410-422 (2012).
13. Takeo K, Watanabe N, Tomita T\*, Iwatsubo T: Contribution of  $\gamma$ -secretase cofactors to the formation of catalytic pore of presenilin 1. **J Biol Chem** 287(31):25834-25843 (2012)

### 総説

1. Kanatsu K and Tomita T\*: Membrane trafficking and proteolytic activity of  $\gamma$ -secretase in Alzheimer disease. **Biol Chem** 397(9):827-835 (2016).
2. Tomita T\*: Molecular mechanism of intramembrane proteolysis by  $\gamma$ -secretase. **J Biochem** 156(4):195-201 (2014).
3. Tomita T, Iwatsubo T: Structural biology of presenilins and signal peptide peptidases (Minireview). **J Biol Chem** 288(21):14673-14680 (2013).
4. Morohashi Y, Tomita T: Protein trafficking and maturation regulates intramembrane proteolysis. **BBA-Biomembranes** 1828(12):2855-2861 (2013).



# アストログリア細胞のエンドサイトーシスの障害による神経発達障害

(平成24年度～平成25年度)



公募

山田 清文

名古屋大学・医学部附属病院・教授

## 研究の背景と目的

統合失調症の約30%は妊娠中の母親のウイルス感染に関連があると報告されているが、周産期ウイルス感染による脳神経発達障害の分子機構は不明である。我々は、polyI:Cを用いた周産期擬似ウイルス感染モデルマウスの脳機能障害の分子機構をin vivoおよびin vitroで解析し、polyI:Cはアストログリアに作用してアストログリア-神経細胞間の相互作用を障害すること、さらにアストログリアで誘導されるインターフェロン誘導性膜タンパク (IFITM3) が神経発達障害に関与する重要な分子であることを見出した (Ibi et al., *Glia* 2013)。本研究では、1) polyI:C処置アストログリアの培養上清 (polyI:C-ACM) に含まれる神経発達障害誘因物質の同定、2) IFITM3結合タンパクの同定、3) polyI:C-ACMにより神経細胞で生じる神経突起伸展障害およびスパイン形成障害のシグナル経路の解明、4) マウス前頭葉皮質グリア細胞にIFITM3を過剰発現した動物モデルの作製とその脳機能解析を目的とする。

## 研究成果

### (1) PolyI:C-ACMに含まれる神経発達障害誘因物質の同定

PolyI:C-ACMを初代培養神経細胞に添加すると、神経突起の伸長とスパイン形成が抑制されるが (神経発達障害活性)、IFITM3-KOマウス由来アストロサイトから調製した polyI:C-ACMには神経発達障害活性は認められない。PolyI:C-ACMの神経発達障害活性の本体を同定するために2D-DIGEによるプ

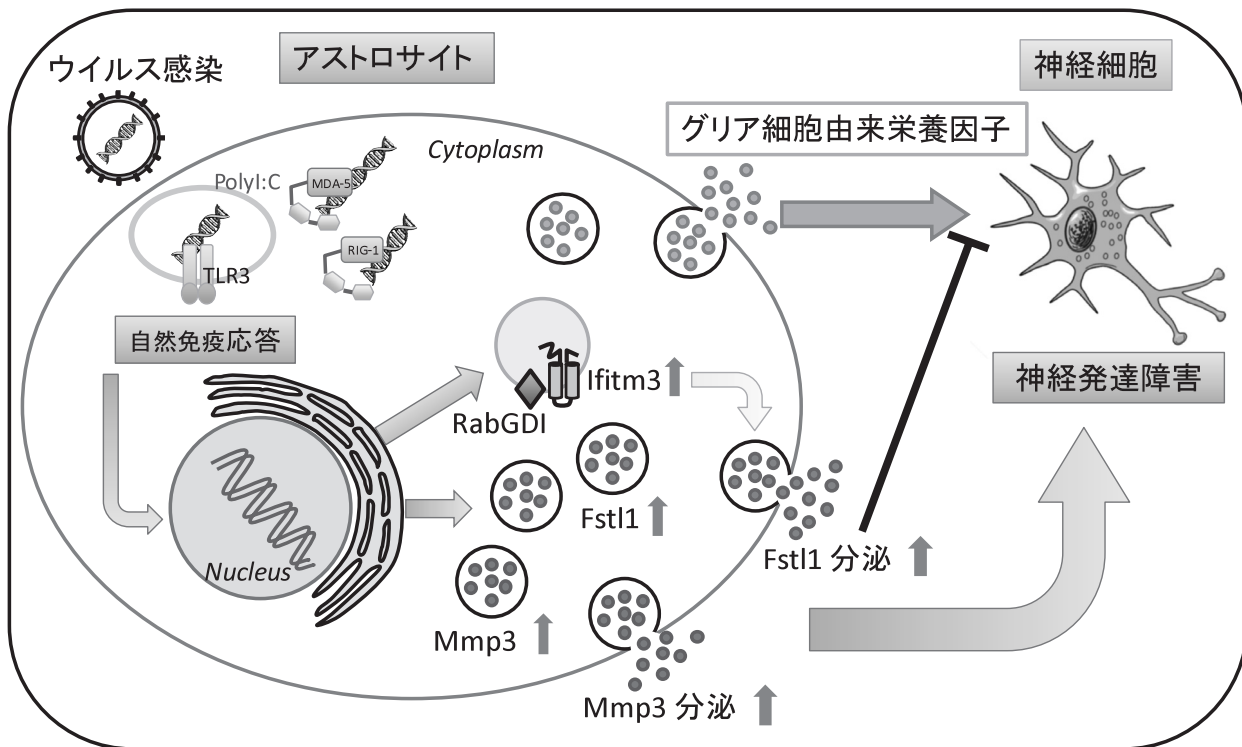
ロテオーム解析を実施し、候補分子として13個のタンパク質を同定した。その中の一つ matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) に着目して検討した結果、polyI:C-ACMではMMP-3タンパク質とその酵素活性が増加していることを確認した。さらに、polyI:C-ACMの神経発達障害活性はアストロサイトのMMP-3をノックダウンすることにより有意に減弱した。逆にリコンビナントMMP-3を培養神経細胞に添加すると神経突起の伸長が抑制された。したがって、polyI:C刺激によりアストロサイトから分泌される神経発達障害因子にMMP-3が含まれると考えられる (Yamada et al., *Brain Behav Immun*, 2014)。

MMP-3以外の候補分子としてFollostatin like-1 (Fstl1)の機能についても解析した。Fstl1は野生型アストロサイトのpolyI:C-ACMで増加し、IFITM3-KOマウス由来polyI:C-ACMでは増加しなかった。PolyI:C-ACMの神経発達障害活性はアストログリア細胞を Fstl1 siRNA で処理することにより減弱した。さらに、polyI:C処置モデルマウスのアストロサイトにFstl1が発現することを免疫染色により確認した (投稿準備中)。

### (2) IFITM3結合タンパクの同定

培養アストロサイトにおいて、IFITM3はpolyI:Cの他、LPSなどの多くの toll-like receptor (TLR) リガンドにより誘導された (Nakajima et al., *Eur J Pharmacol* 2014)。LC-

## アストログリア細胞のエンドサイトーシスの障害による神経発達障害 (代表: 山田清文)



MS/MS解析によりIFITM3の新規結合タンパク質候補としてRabGDIを同定し、IFITM3とRabGDIの結合をGST pull down assayにより確認した。IFITM3とRabGDIの相互作用の役割を解明するための実験を行い、以下の結果を得た。(i) IFITM3とRab5が細胞内で部分的に共局在している。(ii) IFITM3を過剰発現させると、GTP結合型Rab5が増加し、IFITM3はRab5の活性を亢進する。(iii) IFITM3を過剰発現させると細胞内小胞サイズが大きくなり、IFITM3はRab5を活性化して小胞の融合とMulti-vesicular body (MVB) の形成を促進することが示唆された(投稿準備中)。

### (3) PolyI:C-ACMにより神経細胞で生じる神経突起伸展障害およびスパイン形成障害のシグナル経路の解明

PolyI:C-ACMによる神経発達障害活性のメカニズムについて、Na,K-ATPase (Neuron 2011) あるいはBMP4 (PNAS 2011) の関与を想定して実験を行った。

### (4) 前頭葉皮質グリア細胞にIFITM3を過剰発現した動物モデルの作製とその脳機能解析

AAVベクターを用いてGFAPプロモーター制御下に野生型IFITM3 (WT) あるいはリン酸化ミュータントIFITM3 (Y20F) を7週令の雄性マウス前頭葉皮質に過剰発現させ、系統的な行動解析を実施した。オープン・フィールド試験、自発運動量試験、Y字型迷路試験、新規物体認知試験、プレパルス抑制試験、社会性行動試験、高架式十字迷路試験、MK-801およびメタンフェタミン誘発性多動試験の何れの行動試験においても、EGFPのみを発現したコントロール群とIFITM3 (WT) 発現マウスあるいはIFITM3 (Y20F) 発現マウスの3群間において有意な変化は認められなかった。なお、IFITM3がアストロサイトに発現していることは免疫染色により確認した(投稿準備中)。

## 結語

統合失調症の環境要因として知られている周産期ウイルス感染による神経発達障害の分子機構を解明することを目的として、polyI:Cモデルにおいてアストロサイト特異的に誘導されるIFITM3の機能を中心に研究を実施し、新規結合分子としてRabGDIを同定し、その機能の一端を明らかにした。さらに、活性化アストロサイトから分泌される神経発達障害活性を有する分子としてMMP3とFstl1を同定した。したがって、本研究の目的である周産期ウイルス感染による神経発達障害の分子メカニズムの解明に迫ることができた。さらに、本研究で同定したこれらの新規分子は、神経発達障害の治療薬開発において新しい創薬標的になりうると思われる。

## 主要研究成果

### 原著論文

1. Ibi D, Nagai T, Nakajima A, Mizoguchi H, Kawase T, Tsuboi D, Kano S, Sato Y, Hayakawa M, Lange UC, Adams DJ, Surani MA, Satoh T, Sawa A, Kaibuchi K, Nabeshima T, Yamada K. Astroglial IFITM3 mediates neuronal impairments following neonatal immune challenge in mice. *Glia* 61:679-693, (2013).
2. Nakajima A, Ibi D, Nagai T, Yamada S, Nabeshima T, Yamada K. Induction of interferone-induced transmembrane protein 3 gene expression by lipopolysaccharide in astrocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 745:166-175, (2014).
3. Yamada S, Nagai T, Nakai T, Ibi D, Nakajima A, Yamada K. Matrix metalloproteinase-3 is a possible mediator of neurodevelopmental impairment due to polyI:C-induced innate immune activation of astrocytes. *Brain Behav Immun.* 38:272-282, (2014).

## 総説

1. Ibi D, Yamada K: Therapeutic targets for neurodevelopmental disorders emerging from animal models with perinatal immune activation. *Int. J. Mol. Sci.* 16:1-12, (2015).



# 脳内環境におけるガングリオシド糖鎖の分別的役割の解明

(平成24年度～平成25年度)



公募

大海 雄介

中部大学・生命健康科学部・助手

## 研究の背景と目的

シアル酸含有スフィンゴ糖脂質、ガングリオシドは脊椎動物の神経系組織に多く発現していることから神経組織の発生と機能に深く関与していると考えられている。しかし、ガングリオシド欠損による神経変性の機序は全く不明であった。これまで当研究室では様々なガングリオシド欠損マウスを作成し、ガングリオシドの欠損が神経変性を引き起こすことを報告してきた。このような神経変性は、ガングリオシドの欠損による脂質ラフトの構築異常により補体が活性化し、過剰な炎症が惹起されたことが一つの要因と考えられた。

さらにその中で我々は、ガングリオシド欠損マウス脳ではグリア細胞が異常に活性化していることを発見した。しかし、種々のグリアがいかなる機序で活性化し、さらには脳内環境の破綻を惹起しているかは不明のままである。本研究では、ガングリオシド欠損に伴うアストロサイト、ミクログリアの異常活性化に焦点を置き、神経変性におけるアストロサイト、ミクログリアの分別的役割と分子機構を解明すると共に、脳内環境の健全性の維持におけるガングリオシドの普遍的意義を解明する。

## 研究成果

ガングリオシド欠損に伴うグリア細胞の異常活性化とグリア細胞の分別的役割を検討するために以下の検討を行った。

(1) 野生型 (WT) 及びガングリオシド欠損マウスの脳組織切片を用いて、ミクログリアの異常活性の検討を行った結果、ガングリオシド欠損マウスにおいてミクログリアの集積が認められ、さらにM1型マーカーのiNOS抗体で多くのミクログリアが染色された。これによりガングリオシド欠損マウスで集積する活性化ミクログリアは、炎症を誘発するM1型ということが示唆された。

(2) WT初代培養アストロサイトに発現するガングリオシドのprofileをflow cytometryにて検討した結果、初代培養ア

ストロサイトではガングリオシド GM1, GD1a, GD1b, GT1bが高発現することが明らかになった。ガングリオシド欠損アストロサイトの炎症性サイトカインへの反応性を検討したところ、IL-6による刺激によって、TNF- $\alpha$ の発現が亢進し、さらに抗炎症因子であるSOCS3の発現低下が認められた。以上により、アストロサイトにおいてガングリオシドが炎症性サイトカインに対する反応およびそれらの発現を制御していることが示唆された。また、ガングリオシド欠損アストロサイトにおける細胞膜機能の異常を明らかにするため、[3H] グルタミン酸をWTまたはガングリオシド欠損アストロサイトの培地に添加し、グルタミン酸の取り込み能を検討した結果、ガングリオシド欠損アストロサイトではグルタミン酸の取り込み能の低下が見られた。これはガングリオシドの欠損によるミクロドメイン上の構造変化がグルタミン酸トランスポーターであるEAAT1/2の局在変化を惹起し、グルタミン酸の取り込みを低下させたためと考えられた。さらに、ガングリオシドの欠損は、現在迄に判明していた小脳だけでなく、脊髄などの他の部位でもグリア細胞の活性化と神経変性を惹起することが明らかになった。

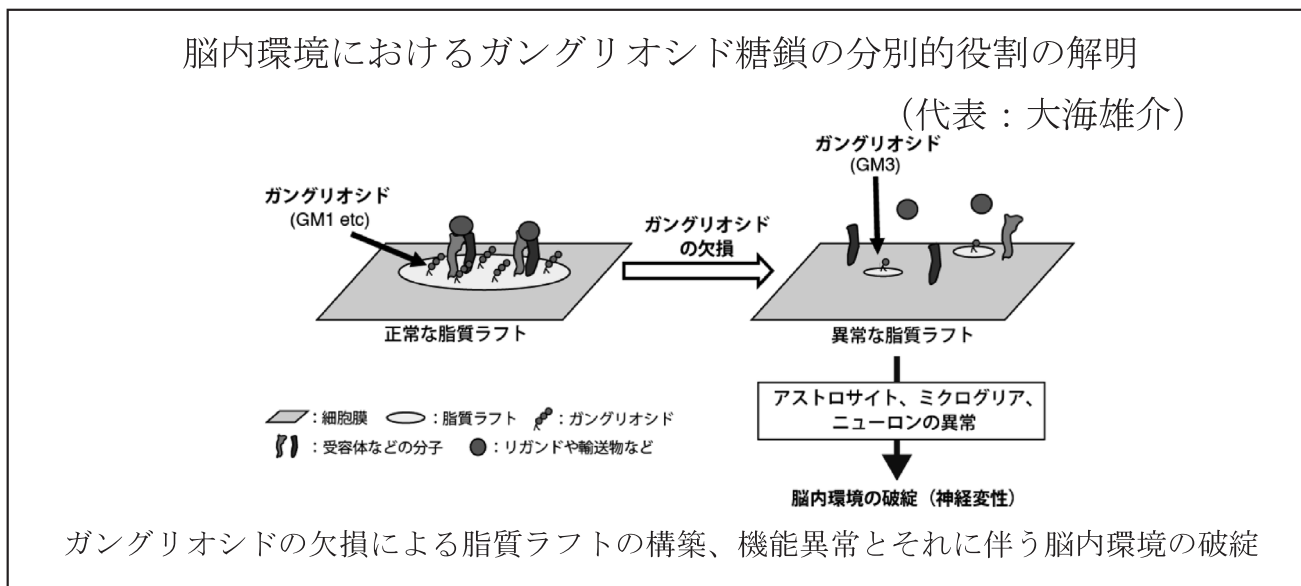
## 結語

ガングリオシド欠損マウスを解析することにより、ガングリオシドがニューロンとグリアにおいて、脳内環境を正常に調節していることが分かってきた。特に、ガングリオシドが脂質ラフトの構築と機能に大きく関与することが明らかになってきた(図)。今後はガングリオシド欠損グリア細胞上の脂質ラフトの異常に焦点化して、脂質ラフトに局在するどのような分子が神経やグリアの機能に関わるのかを明らかにしていく予定である。

## 主要研究成果

### 原著論文

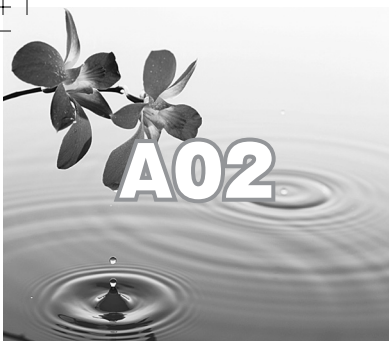
- Ohmi, Y, Ohkawa Y, Tajima O, Sugiura Y, Furukawa K, Furukawa K. Ganglioside deficiency causes inflamma-



tion and neurodegeneration via the activation of complement system in the spinal cord. *J Neuroinflammation*. 11, 61, 2014

#### 総説

1. Ohmi, Y., Ohkawa, Y., Yamauchi, Y., Tajima, O., Furukawa, K., Furukawa, K. Essential roles of gangliosides in the formation and maintenance of membrane microdomains in brain tissues. *Neurochem Res*. 37: 1185-1191, 2012
2. Furukawa, K., Hamamura, K., Ohkawa, Y., Ohmi, Y., Furukawa, K. Disialyl gangliosides enhance tumor phenotypes with differential modalities. *Glycoconj J*. 29: 579-584, 2012
3. Furukawa, K., Ohkawa, Y., Yamauchi, Y., Hamamura, K., Ohmi, Y., Furukawa, K. Fine tuning of cell signals by glycosylation. *J Biochem*. 151, 573-578, 2012
4. 古川鋼一、大海雄介、大川祐樹、古川圭子、田島織絵：神経疾患と糖鎖の関わり、Annual Review神経2013 (株)中外医学、pp37-45, 2013
5. 古川鋼一、大海雄介、大川祐樹、徳田典代、古川圭子：GM3合成酵素欠損症、日本臨床 別冊 新領域別症候群シリーズ20「先天代謝異常症候群」617-620, 2012



# ミクログリアの毒性転換の制御による神経変性疾患の新規治療法開発

(平成24年度～平成25年度)



公募

竹内 英之 横浜市立大学・医学部・准教授

## 研究の背景と目的

近年、神経変性疾患において、ニューロン以外の機序による自滅的な細胞死（自律性ニューロン死）の他に、ニューロンの周囲環境であるグリア細胞、とくにミクログリアが異常に活性化することでニューロン死をきたす（非自律性ニューロン死）機序が病態進展に大きく関与していることが明らかとなった。本来は神経保護的な役割を果たしている生理的なミクログリアが、変性ニューロンなどからの放出因子に対する応答反応として、神経保護的な役割から神経傷害的な役割へと「毒性転換」を来すことが、神経変性疾患の病態の進展因子である証拠が蓄積している。

そこで、本研究では、ミクログリアの毒性転換の詳細なメカニズムを明らかにし、神経変性疾患の病態機序の解明や新たな診断・治療戦略の展開への基盤を確立することを目的として、検討を行った。

## 研究成果

### (1) ミクログリアの毒性転換制御因子の探索

マウス初代培養ニューロンおよびミクログリアを用いた、cDNAおよびmiRNAマイクロアレイ法およびサイトカイン/ケモカイン蛍光ビーズアレイ法による網羅的解析とニューロン・ミクログリア共培養系での確認実験を通じて、変性ニューロン由来のミクログリア毒性転換制御因子の候補因子としてIL-34, CX3CL1, FGF-2, CCL2, CCL11を、また、ミクログリア自体のミクログリア毒性転換制御の候補因子として、IL-19およびSiglec-9を見出した。

### (2) ミクログリアの毒性転換制御による治療法開発

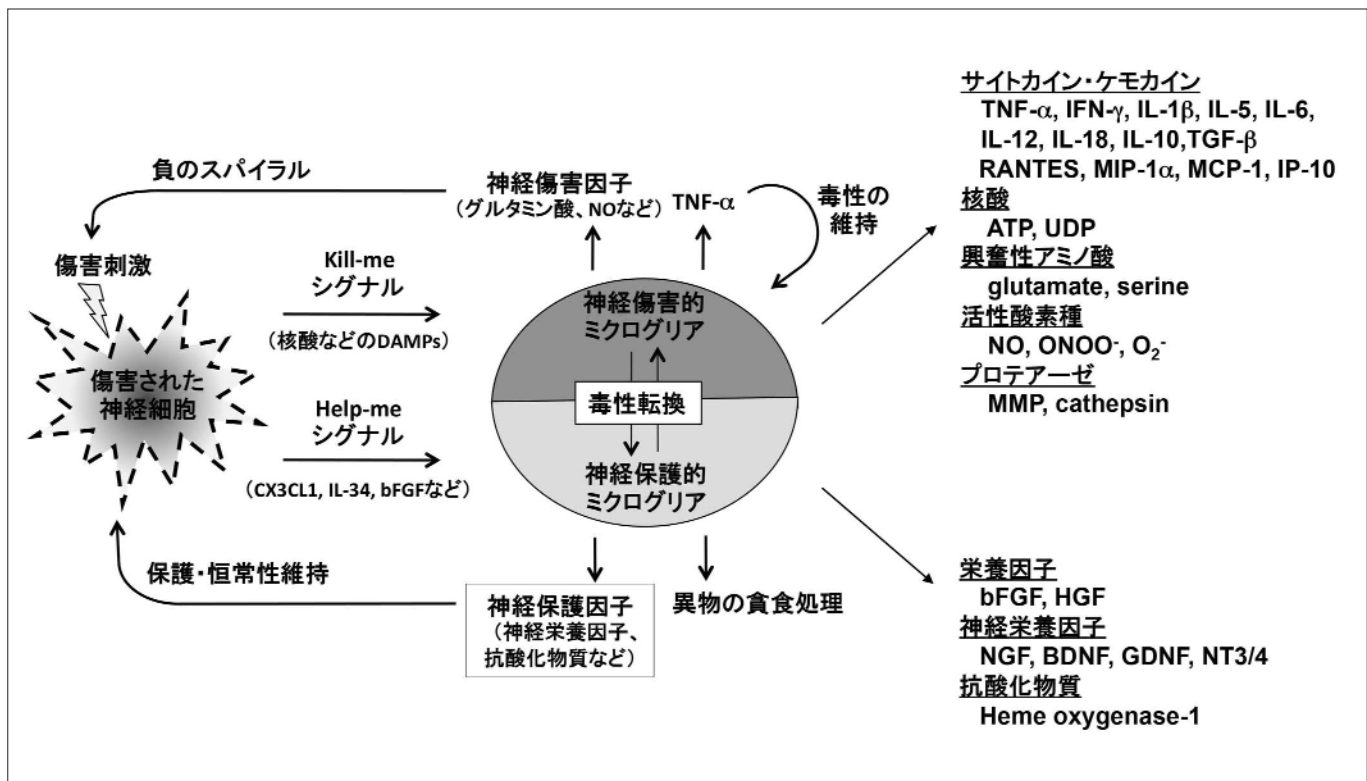
IL-19およびsiglec-9の治療効果を検討するために、国際的に汎用されている多発性硬化症の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）マウスを用いて検討を行った。

まず、野生型マウスおよびIL-19欠損マウスに対してEAEを作製したところ、IL-19欠損マウスでの有意なEAE症状の増悪を認めた。EAEマウス由来の中枢神経浸潤CD11b陽性細胞（= ミクログリア/マクローファージ）では抗原提示能が増強し、細胞障害性Th1/Th17細胞の分化誘導亢進を示したことから、IL-19がミクログリア/マクローファージの毒性転換抑制因子であることがin vivoでも検証できた。

次いで、野生型マウスで作成したEAEに対して、EAE症状極期（免疫後14日目）にsiglec-9を経静脈単回投与した結果、症状が有意に改善した。組織学的解析において、脊髄における脱髄範囲、炎症性細胞浸潤が明らかに減少し、軸索障害も有意に改善していた。また、病巣のCD11b陽性細胞も細胞傷害型から細胞保護型に変化していた。

## 結語

本研究を通じて、ミクログリアの毒性転換制御因子を見出すことができた。さらに、当該因子を用いて、神経疾患モデルにおける脳内環境の恒常性破綻を正常化させ、疾患治療の検証を行うことができた。今後、創薬展開を見据えた前臨床試験を予定している。





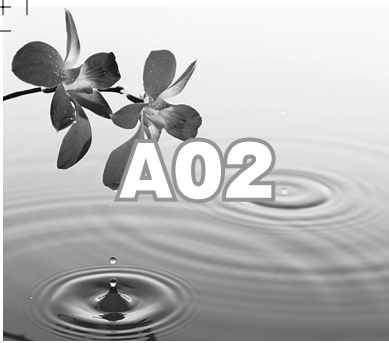
## 主要研究成果

## 原著論文

1. Watanabe M, Masaki K, Yamasaki R, Kawanokuchi J, **Takeuchi H**, Matsushita T, Suzumura A, Kira JI: Th1 cells downregulate connexin 43 gap junctions in astrocytes via microglial activation. *Scientific Reports*. 6:38387, 2016.
2. Shimojima C, **Takeuchi H (corresponding author)**, Jin S, Parajuli B, Hattori H, Suzumura A, Hibi H, Ueda M, Yamamoto A: Conditioned Medium from the Stem Cells of Human Exfoliated Deciduous Teeth Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Journal of Immunology*. 96(10):4164-71, 2016.
3. Ohgomori T, Yamada J, **Takeuchi H**, Kadomatsu K, Jinno S: Comparative morphometric analysis of microglia in the spinal cord of SOD1 (G93A) transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *European Journal of Neuroscience*. 43(10):1340-51, 2016.
4. Imai K, Kotani T, Tsuda H, Mano Y, Nakano T, Ushida T, Li H, Miki R, Sumigama S, Iwase A, Hirakawa A, Ohno K, Toyokuni S, **Takeuchi H**, Mizuno T, Suzumura A, Kikkawa F: Neuroprotective potential of molecular hydrogen against perinatal brain injury via suppression of activated microglia. *Free Radical Biology & Medicine* 91:154-163, 2015.
5. Fujisawa H, Sugimura Y, Takagi H, Mizoguchi H, **Takeuchi H**, Izumida H, Nakashima K, Ochiai H, Takeuchi S, Kiyota A, Fukumoto K, Iwama S, Takagishi Y, Hayashi Y, Arima H, Komatsu Y, Murata Y, Oiso Y: Chronic Hyponatremia Causes Neurologic and Psychologic Impairments. *Journal of the American Society of Nephrology*. 27(3):766-80, 2016.
6. Parajuli B, Horiuchi H, Mizuno T, **Takeuchi H (corresponding author)**, Suzumura A: CCL11 enhances excitotoxic neuronal death by producing reactive oxygen species in microglia. *GLIA* 63(12):2274-2284, 2015.
7. Horiuchi H, Parajuli B, Wang Y, Azuma Y, Mizuno T, **Takeuchi H (corresponding author)**, Suzumura A: Interleukin-19 acts as a negative autocrine regulator of activated microglia. *PLoS ONE* 10(3):e0118640, 2015.
8. Fukumoto K, Mizoguchi H, **Takeuchi H**, Horiuchi H, Kawanokuchi J, Jin S, Mizuno T, Suzumura A: Fingolimod increases brain-derived neurotrophic factor levels and ameliorates amyloid  $\beta$ -induced memory impairment. *Behavioural Brain Research* 268:88-93, 2014.
9. Noda M, Takii K, Parajuli B, Kawanokuchi J, Sonobe Y, **Takeuchi H**, Mizuno T, Suzumura A: FGF-2 released from degenerating neurons exerts microglial-induced neuroprotection via FGFR3-ERK signaling pathway. *Journal of Neuroinflammation* 11(1):76, 2014.
10. Wang Y, Jin S, Sonobe Y, Cheng Y, Horiuchi H, Parajuli B, Kawanokuchi J, Mizuno T, **Takeuchi H (corresponding author)**, Suzumura A: Interleukin-1  $\beta$  induces blood-brain barrier disruption by downregulating Sonic hedgehog in astrocytes. *PLoS ONE* 9(10):e110024, 2014.
11. Umebayashi D, Natsume A, **Takeuchi H (corresponding author)**, Hara M, Nishimura Y, Fukuyama R, Sumiyoshi N, Wakabayashi T: Blockade of gap junction hemichannel protects secondary spinal cord injury from activated microglia-mediated glutamate excitotoxicity. *Journal of Neurotrauma* 31(24):1967-1974, 2014.
12. Jin S, Sonobe Y, Kawanokuchi J, Horiuchi H, Cheng Y, Wang Y, Mizuno T, **Takeuchi H (corresponding author)**, Suzumura A: Interleukin-34 restores blood-brain barrier integrity by upregulating tight junction proteins in endothelial cells. *PLoS ONE* 9(12):e115981, 2014.
13. Doi Y, **Takeuchi H (co-first author)**, Mizoguchi H, Fukumoto K, Horiuchi H, Jin S, Kawanokuchi J, Parajuli B, Sonobe Y, Mizuno T, Suzumura A: Granulocyte-Colony Stimulating Factor Attenuates Oligomeric Amyloid  $\beta$  Neurotoxicity by Activation of Neprilysin. *PLOS ONE* 9(7):e103458, 2014.
14. Doi Y, **Takeuchi H (corresponding author)**, Horiuchi H, Hanyu T, Kawanokuchi J, Jin S, Parajuli B, Sonobe Y, Mizuno T, Suzumura A: Fingolimod phosphate attenuates oligomeric amyloid  $\beta$ -induced neurotoxicity via increased brain-derived neurotrophic factor expression in neurons. *PLoS One*. 8(4):e61988, 2013.
15. Parajuli B, Sonobe Y, **Horiuchi H**, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A: Oligomeric amyloid  $\beta$  induces IL-1  $\beta$  processing via production of ROS: implication in Alzheimer's disease. *Cell Death and Disease* 4:e975, 2013.
16. Noda H, **Takeuchi H (corresponding author)**, Mizuno T, Suzumura A: Fingolimod phosphate promotes the neuroprotective effects of microglia. *Journal of Neuroimmunology* 256(1-2):13-18, 2013.

## 総説

1. **Takeuchi H (corresponding author)**, Suzumura A: Gap junctions and hemichannels composed of connexins: potential therapeutic targets for neurodegenerative diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8:189, 2014.
2. **Takeuchi H (corresponding author)**: Midkine and multiple sclerosis. *British Journal of Pharmacology* 171(4):931-935, 2014.
3. **Takeuchi H (corresponding author)**: Roles of glial cells in neuroinflammation and neurodegeneration. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 4(s1):2-16, 2013.



# 末梢神経損傷により中枢移行する免疫系細胞とグリア細胞連関による中枢神経機能変化

(平成24年度～平成25年度)



公募

中川 貴之

京都大学医学部附属病院・准教授

## 研究の背景と目的

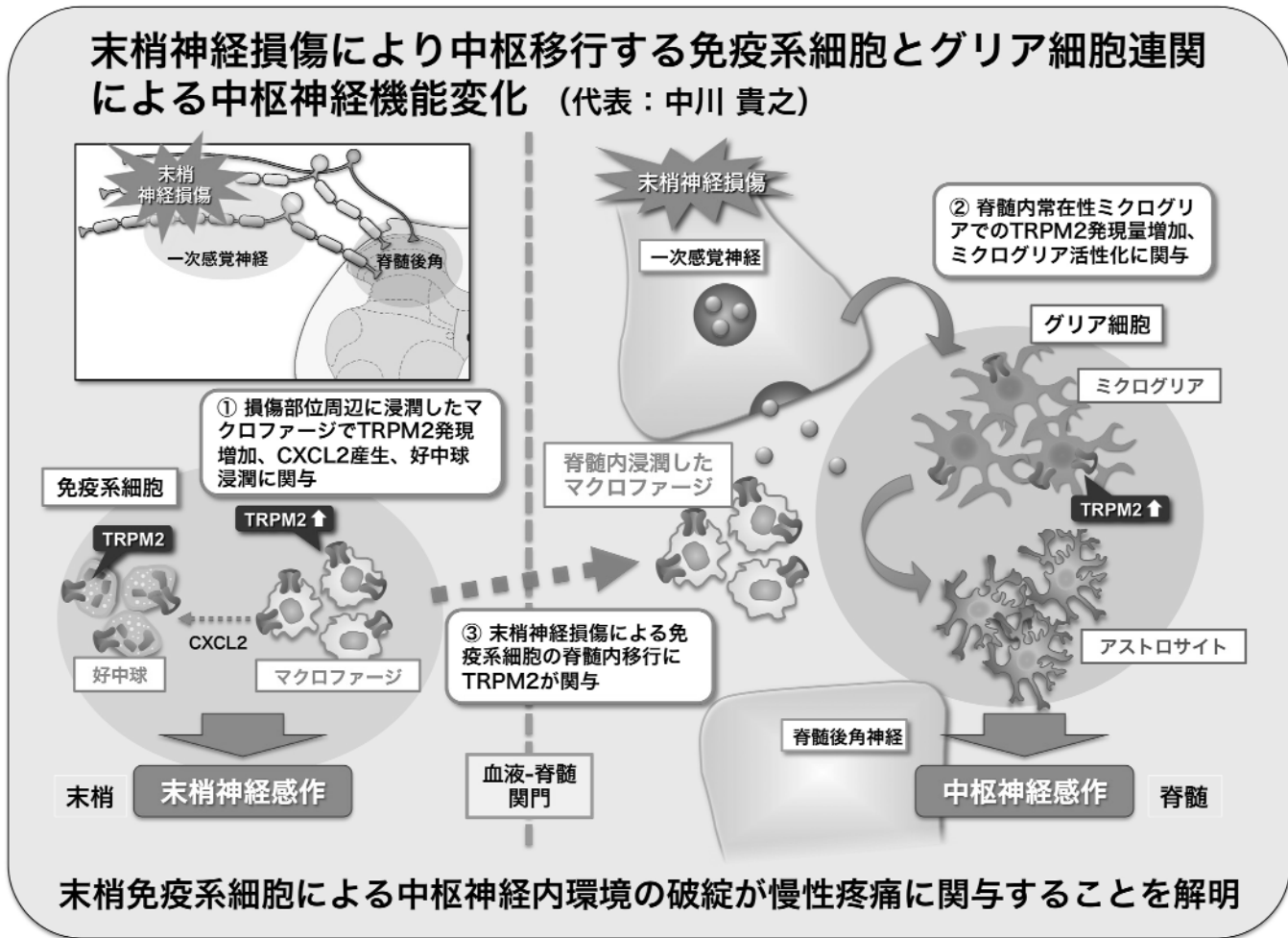
脳や脊髄といった中枢神経系内の環境は、通常、血液-脳関門あるいは血液-脊髄関門により保護され、さらに、ミクログリアやアストロサイトにより中枢神経内の環境を維持する機構が張り巡らされている。ところが、神経変性疾患などにおいては、血液-脳/脊髄関門の破綻により、マクロファージやTリンパ球等の末梢免疫系細胞が脳/脊髄実質内に移行し、常在性グリア細胞と協調しつつ脳/脊髄内環境の破綻に関与し、各疾患の発症、進行や重症化に寄与していると考えられている。

一方、神経障害性疼痛の原因として、神経損傷部位周辺に浸潤した免疫系細胞による末梢神経の過敏化(末梢神経感作)に加え、その入力先である脊髄後角でのグリア細胞による中枢神経系の過敏化(中枢神経感作)が関与すると考えられているが、近年、末梢神経損傷時にも、Tリンパ球やマクロファージなどの末梢由来の免疫系細胞が脊髄内に移行することが報告されているが、未だ不明な点が多く残されている。本研究では、末梢神経損傷時の免疫系細胞の中枢移行のメカニズムとその意義について検討した。

## 研究成果

### (1) 骨髄キメラマウスを用いた末梢神経損傷後の免疫系細胞の中枢移行の解析

GFPトランスジェニックマウスと野生型マウスによる骨髄キメラマウスを作製し、L4脊髄神経切断後のGFP陽性骨髄由来細胞の体内動態を観察したところ、損傷部位周辺の脊髄神経、坐骨神経、後根神経節に多数のGFP陽性細胞、特に抗Iba1抗体で染色されるマクロファージが多く浸潤していた。また、L4脊髄神経が投射する領域の脊髄内において、Iba1陽性/GFP陰性の常在性ミクログリアおよびIba1陽性/GFP陽性細胞の浸潤マクロファージの様子を観察すると、脊髄神経切断3日後をピークに常在性ミクログリアが活性化し、やや遅れて7、14日後に免疫系細胞の脊髄内への移行が認められた。また、免疫系細胞が脊髄内に移行した領域は、常在性ミクログリアの活性化領域とほぼ一致しており、末梢免疫系細胞の脊髄内移行には、先行して活性化した常在性ミクログリアが関与していると考えられた。



末梢免疫系細胞による中枢神経内環境の破綻が慢性疼痛に関与することを解明

## (2) マクロファージ/ミクログリアに発現するTRPM2の神経障害性疼痛における役割

単球/マクロファージ、好中球、Tリンパ球などの免疫系細胞やミクログリアに多く発現する活性酸素種（ROS）感受性のtransient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) チャネルの遺伝子欠損（KO）マウスを用いて、各種疼痛モデルへの影響を評価した。その結果、生理的な痛みを表す侵害受容性疼痛モデルにおいて影響は認められなかったが、カラゲニン誘発炎症、変形性関節症、実験的アレルギー性脳脊髄炎などの炎症性疼痛モデルや、末梢神経損傷、ストレプトゾトシン誘発糖尿病、抗がん剤により誘発される神経障害性疼痛モデルにおいて有意な減弱が認められた。次に、末梢神経障害性疼痛モデルを用いて、マクロファージあるいはミクログリアに発現するTRPM2の役割を検討したところ、損傷部位周辺に浸潤するマクロファージでのTRPM2発現量が増加すること、TRPM2-KOマウスでも浸潤したマクロファージの細胞数に差はないが、好中球の数が部分的に減少すること、また、主にマクロファージから産生され、強力な好中球走化作用を示すCXCL2の産生が有意に減少していることなどを明らかにした。

## (3) 末梢神経損傷時の免疫系細胞の脊髄内移行におけるTRPM2の役割

マクロファージおよびミクログリアそれぞれのTRPM2の寄与を検討するため、WTマウスおよびTRPM2-KOマウス間で4種類のGFP陽性骨髄キメラマウスを作製し、坐骨神経部分結紮を施したところ、いずれのキメラマウスにおいても、機械的アロディニアの減弱が認められ、マクロファージおよびミクログリアいずれのTRPM2も神経障害性疼痛に寄与すると考えられた。坐骨神経部分結紮14日後の脊髄後角において、Iba1陽性細胞およびGFP陽性細胞の様子を観察したところ、脊髄内移行したマクロファージが3種類のキメラマウスいずれにおいても減少していたが、常在性ミクログリアに差は認められなかった。

## 結語

今回の研究結果から、末梢神経損傷後、中枢神経系では常在性ミクログリアの初期の応答が神経障害性疼痛の誘導に関わるとともに免疫系細胞の脊髄内移行を惹起し、さらに、脊髄内移行したマクロファージなどの免疫系細胞が脊髄後角神経の機能的変化を維持し、神経障害性疼痛の慢性化に寄与していると考えられた。また、常在性ミクログリアの活性化だけでなく、免疫系細胞の脊髄内浸潤にもROS感受性TRPM2が関与することが明らかとなった（図）。

## 主要研究成果

### 原著論文

- Miyanojara, J., Shirakawa, H., Sanpei, K., Nakagawa, T., Kaneko, S. (2015) A pathophysiological role of TRPV1 in ischemic injury after transient focal cerebral ischemia in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 467: 478-83.
- Miyake, T., Shirakawa, H., Nakagawa, T., Kaneko, S. (2015) Activation of mitochondrial transient receptor potential vanilloid 1 channel contributes to microglial migration. *Glia*, 63: 1870-82.
- So, K., Haraguchi, K., Asakura, K., Isami, K., Sakimoto, S., Shirakawa, H., Mori, Y., Nakagawa, T., Kaneko, S. (2015) Involvement of TRPM2 in a wide range of inflammatory and neuropathic pain mouse models. *J. Pharmacol. Sci.*, 127: 237-43.
- Zhao, M., Nakamura, S., Miyake, T., So, K., Shirakawa, H., Tokuyama, S., Narita, M., Nakagawa, T., Kaneko, S. (2014) Pharmacological characterization of standard analgesics on oxaliplatin-induced acute cold hypersensitivity in mice. *J. Pharmacol. Sci.*, 124: 514-7.
- Miyake, T., Shirakawa, H., Kusano, A., Sakimoto, S., Konno, M., Nakagawa, T., Mori, Y., Kaneko, S. (2014) TRPM2 contributes to LPS/IFN  $\gamma$ -induced production of nitric oxide via the p38/JNK pathway in microglia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 444: 212-7.
- Isami, K., Haraguchi, K., So, K., Maeda, S., Asakura, K., Shirakawa, H., Mori, Y., Nakagawa, T., Kaneko, S. (2013) Involvement of TRPM2 in peripheral nerve injury-induced infiltration of peripheral immune cells into the spinal cord in mouse neuropathic pain model. *PLOS ONE*, 8: e66410.
- Munakata, M., Shirakawa, H., Nagayasu, K., Miyanojara, J., Miyake, T., Nakagawa, T., Katsuki, H., Kaneko, S. (2013) The TRPC3 inhibitor Pyr3 improves outcomes and attenuates astrogliosis after intracerebral hemorrhage in mice. *Stroke*, 44: 1981-1987.
- Zhao, M., Isami, K., Nakamura, S., Shirakawa, H., Nakagawa, T., Kaneko, S. (2012) Acute cold hypersensitivity characteristically induced by oxaliplatin is caused by the enhanced responsiveness of TRPA1 in mice. *Mol. Pain*, 8: 55.
- Haraguchi, K., Kawamoto, A., Isami, K., Maeda, S., Kusano, A., Asakura, K., Shirakawa, H., Mori, Y., Nakagawa, T., Kaneko, S. (2012) TRPM2 contributes to inflammatory and neuropathic pain through the aggravation of pronociceptive inflammatory responses in mice. *J. Neurosci.*, 32: 3931-3941.

## 総説

- 三宅崇仁、白川久志、中川貴之、金子周司：ミクログリア細胞機能における活性酸素シグナリング～TRPチャネルを介した新しい細胞制御機構。日本薬理学雑誌, 147: 6-11 (2016)
- 勇 昂一、中川貴之、金子周司：神経障害性疼痛とミクログリアのTRPM2受容体。Clinical Neuroscience 33: 1387-1391 (2015)
- 中川貴之：グリア細胞の機能とその異常。脳神経外科診療プラクティス6（橋本伸夫監修、三國信敬/深谷親 編集）文光堂, 16-18 (2015)
- 中川貴之、白川久志、金子周司：末梢神経損傷により中枢移行する免疫系細胞と神経障害性疼痛の関連。遺伝子医学MOOK（メディカルドゥ）26: 142-147 (2014)
- 白川久志、崎元伸哉、中川貴之、金子周司：免疫系細胞の異常活性化による脳虚血傷害の病態進展 ミクログリア/マクロファージのiNOS発現におけるTRPM2の役割。日本薬理学雑誌, 144: 104-109 (2014)
- 中川貴之、勇 昂一、原口佳代、宗可奈子、朝倉佳代子、白川久志、金子周司：神経障害性疼痛における免疫系細胞に発現するTRPM2チャネルの役割。薬学雑誌, 134: 379-386 (2014)
- 中川貴之：痛みの発生と慢性化におけるTRPチャネルの役割～新規鎮痛薬標的としての可能性～。実験医学, 32: 519-526 (2014)



# グリア細胞の貪食作用による脳内環境の維持機構とその破綻 (平成24年度～平成25年度)

## パーキンソン病における神経系エクソソームの役割 (平成26年度～平成27年度)

公募

華山 力成 金沢大学・医学系・教授



### 研究の背景と目的

エクソソームは分泌細胞由来の蛋白質や脂質、RNAなどを内包する直径30～100nmの細胞外小胞で、これらの分子を介して標的細胞の様々な機能を制御すると考えられている。特に中枢神経系においてエクソソームは、神経細胞とグリア細胞、いずれの細胞からも放出されることが確認されており、互いの細胞にエクソソームが受け渡されることによって様々な神経機能の制御に関与すると考えられている。更に、神経細胞由来エクソソームには、アミロイドβやα-シヌクレインなど凝集体を形成する蛋白質とそのmRNAが含まれており、神経変性疾患や脳内炎症発症への関与が注目されている。そこで、本研究では、神経細胞由来エクソソームに焦点を当て、このエクソソームによるグリア細胞の機能制御機構を明らかにするとともに、神経変性疾患の病態発症におけるエクソソームの役割を明らかにすることを目的とする。

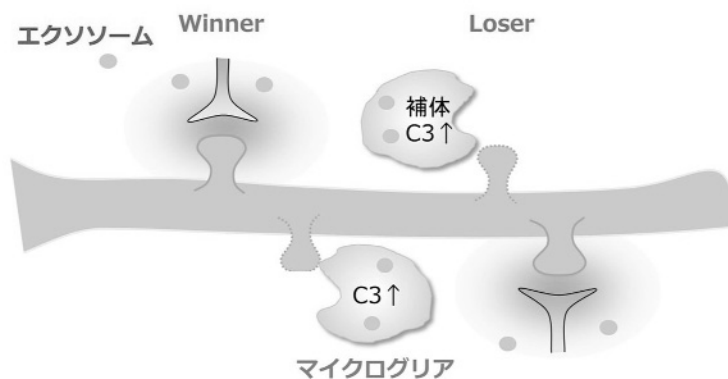
### 研究成果

**(1) 神経細胞由来エクソソームによるシナプス剪定の制御機構**：ミクログリアによる軸索やシナプスの刈り込み（剪定）は、発生過程における神経回路網の再構築のみならず、学習や記憶などに関わる脳の可塑性と密接に関係していると考えられている。近年、軸索やシナプスの剪定に障害をもつノックアウトマウスがいくつか報告されているが、ミクログリアの刈り込み能を制御する機構は未だに不明のままである。そこで私達は、まず培養細胞系でこの過程の再構築を試みた。未分化のPC12細胞をNGF存在下の無血清培地で培養すると、軸索が伸長しシナプス様の構造を形成する。その後、培地からNGFを抜くと軸索変性が引き起こされる。NGFを抜いた無血清培地では軸索変性だけでなく細胞も死滅するが、血清入りの培地に置換したところ、軸索変性のみが生じ、細胞は生存して再び増殖を始めることが明らかとなった。そこでこの系を用いて、PC12細胞とミクログリア細胞株（MG6）を共培養しタイムラプスで観察してみたところ、MG6細胞は変性が始まったばかりの軸索を積極的に貪食し除去することで、軸索剪定を促進することが明らかとなった。

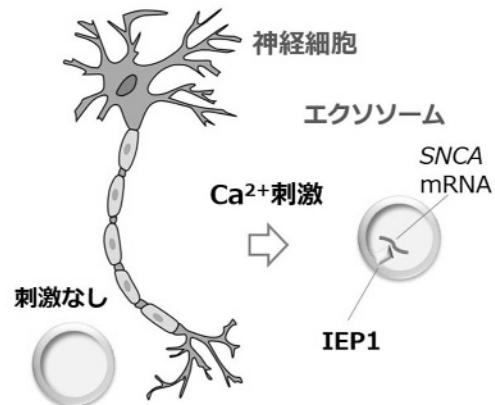
かとなった。次に、生体内で軸索やシナプスの剪定は神経活動依存的に生じることが知られている為、KCl刺激でPC12細胞から放出されるエクソソームの効果を検討したところ、このエクソソームをあらかじめ取り込んだMG6細胞は、軸索剪定能が亢進することが明らかとなった。そこで、DNAマイクロアレイを用いて、エクソソームによってMG6細胞に発現誘導された遺伝子を探索したところ、補体成分であるC3が顕著に誘導されていた。実際、抗C3阻害抗体をMG6細胞に作用させると、エクソソームによる軸索剪定能の亢進を阻害することが判明した。以上の結果から、神経細胞から放出されたエクソソームが、ミクログリアに補体成分C3を発現させることによって、軸索・シナプス剪定を促進することが明らかになった。

**(2) 神経細胞由来エクソソームによるα-シヌクレインmRNAの排出機構**：α-シヌクレインはパーキンソン病において神経細胞内に形成される封入体（レビー小体）の主要成分であり、その点変異体（A53Tなど）が家族性パーキンソン病の原因として報告されている。私達は、マウス神経細胞の初代培養においてIP3などのCa<sup>2+</sup>刺激で内在性のα-シヌクレインのmRNA（SNCA mRNA）がエクソソームに内包化されることを見出した。このことから、神経細胞におけるα-シヌクレインの蓄積を予防する機構としてエクソソームによるSNCA mRNAの排出機構に着目した。私達は、Ca<sup>2+</sup>刺激依存的にSNCA mRNAをエクソソームにリクルートする分子があるのではないかと考え、Ca<sup>2+</sup>刺激でSNCA mRNAとともにエクソソームに内包化される分子をショットガン質量分析の結果から25種に絞り込んだ。次に、各候補分子をSNCA mRNAとともに過剰発現させてみたところ、Ca<sup>2+</sup>刺激依存的にSNCA mRNAをエクソソームにリクルートする分子を見出し、IEP1（IP3-induced exosomal protein 1）と名付けた。IEP1は、in vitroの実験でSNCA mRNAと特異的に結合することが確認された為、IEP1がCa<sup>2+</sup>刺激でSNCA mRNAをエクソソーム内へとリクルートし、細胞外への排出を促進する分子であると考えている。

### 1. 神経細胞由来エクソソームによるシナプス剪定の制御機構



### 2. 神経細胞由来エクソソームによるα-シヌクレインmRNAの排出機構



## 結語

本研究により、脳内環境における神経細胞由来エクソソームの生理機能の一端を明らかにすることができた。以前より、発生過程のシナプス競合において、勝者が敗者を淘汰する為に、punishment signalを放出すると考えられているが、その実態は、神経活動依存的に放出されたエクソソームなのではないかと考えられる。また、神経細胞由来エクソソームによるSNCA mRNAの排出機構は、神経細胞の保護に働くが、この機構が過剰になると、エクソソームの標的であるグリア細胞にSNCA mRNAを伝播することにより、炎症応答を惹起し、脳ホメオスタシスの破綻につながると予想される。

## 主要研究成果

### 原著論文

1. Nakai Y, Yoshida T, Diez D, Miyatake Y, Nishibu T, Imawaka N, Naruse K, Sadamura Y, Hanayama R. A novel affinity-based method for the isolation of highly purified extracellular vesicles. **Sci Rep** 6: 33935 (2016)
2. Bahrini I, Song J, Diez D, Hanayama R. Neuronal exosomes facilitate synaptic pruning by up-regulating complement factors in microglia. **Sci Rep** 5: 7989 (2015)
3. Toda S, Hanayama R, Nagata S. Two-step engulfment of apoptotic cells. **Mol Cell Biol** 32(1):118-25 (2012)

### 総説

1. Song J, Hanayama R. Mechanisms of lysosomal exocytosis by immune cells. **Chronic Inflammation** Miyasaka M. and Takatsu K. ed. (Springer) 369-375 (2016)
2. Hanayama R. Autoimmune Diseases and the Role of MFG-E8. **MFG-E8 and Inflammation** Wang P. ed. (Springer) 97-117 (2014)



# 変性疾患における神経細胞、ミクログリアの相互作用、インフラマゾームを中心に

(平成24年度～平成25年度)

公募

望月 秀樹

大阪大学大学院医学系研究科 神経内科学 教授



## 研究の背景と目的

我々はこれまでミクログリアを介した炎症機転がパーキンソン病に重要な役割を果たすことをMPTP動物モデルで明らかにしてきた。ミクログリアに発現するcaspase-11がインフラマゾーム活性化とIL-1 $\beta$ 産生を促すこと、caspase-11欠損マウスにおいてMPTPによるドパミン神経障害が軽減することを見出し、ドパミン神経細胞死にミクログリアとインフラマゾームが重要な役割を果たすことを報告した (Mochizuki et al. Journal of Neuroscience, 2004)。

ミクログリアは周囲に存在するサイトカイン等の刺激を受け、M1タイプかM2タイプのいずれかの活性化型に分化することが知られている。インターフェロン $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、リポポリサッカライド (LPS) と顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) により分化するM1タイプと、IL-4, IL-13によるM2タイプである。M1は炎症性サイトカイン、活性酸素、一酸化窒素 (NO) を産生し、炎症促進作用と組織障害性を持つ一方、M2は炎症沈静と組織修復に働く。実際に我々の先行研究でも、MGをIFN- $\gamma$ とCD40刺激抗体あるいはSema4Dで刺激するとiNOSを高発現するM1タイプに、分化し、ニューロン障害性を持つようになることが判明している (Okuno et al. Journal of Neurochemistry, 2004, 91, 404-412. Journal of Neuroscience Research, 2005, 81:874-882. The Journal of Immunology, 2010, 184: 1499-1506.)。その一方で、最近ALSモデルマウス (G93A変異SODTgマウス) の成熟リンパ球を欠損させることにより、病初期にM2ミクログリアが増加し麻痺症状の発症が遅延することを見出し、M1/M2バランスの制御によりALSの改善がもた

らされる可能性が明らかになった。さらに興味深いことに、これらの研究の過程でALSモデルマウスの麻痺症状進行に伴い、GM-CSFの脊髄内での発現が著増しているという知見を得ており、発症早期のM2ミクログリアが、進行期にM1に変換することが、病態の進展に重要な役割を果たしている可能性を見出した。

本研究ではこれらの知見に基づき、神経変性疾患における①インフラマゾームを介したミクログリアの活性化の役割 ②ミクログリアのM1/M2制御による治療の可能性について検討した。

## 研究成果

### (1) インフラマゾームについて

ASCはNalp1, Nalp3, NaRC4, AIM2インフラマゾームに結合し、インフラマゾーム活性化に必須の分子である。ASC欠損マウスに対してLPS及びロテノン黒質に投与した。ASC欠損マウスは野生型マウスに比べて有意にミクログリアの活性化とドパミン神経細胞障害が軽減しており、インフラマゾームがパーキンソン病に重要な役割を果たしていることが示唆された。現在はミクログリアの活性化因子について検討中である。

### (2) M1/M2について

GM-CSFは受容体に結合した後、JAK2を活性化し、さらにSTAT5を活性化することによって生理的活性を誘導する。G93Aマウスの脊髄においてリン酸化JAK2の発現を検討したところ、GM-CSFの増加と一致してミクログリアのリン酸化JAK2は増加していた。GM-CSFの効果を阻害するためにRigel社で開発され、

骨髄線維症動物モデルで有効性が証明されているJAK2阻害剤R723を用いた。R723は予測通り炎症性モノサイトや脊髄のインターフェロンガンマ及びiNOSの発現を減少させたが、マウスの症状改善には至らなかった。原因としてJAK2阻害剤がM1だけでなくM2も抑制したこと、ALSマウスの炎症機転を増悪させるTNF、NOX2、IL-1が抑制できていないことなどが考えられた。ALSの炎症機転を制御し神経変性を改善するにはM1を抑制するとともにM2の活性を促すことが重要と推定された。自然免疫系の過剰な活性化を抑制することや制御性T細胞の誘導が今後重要になってくると思われる。

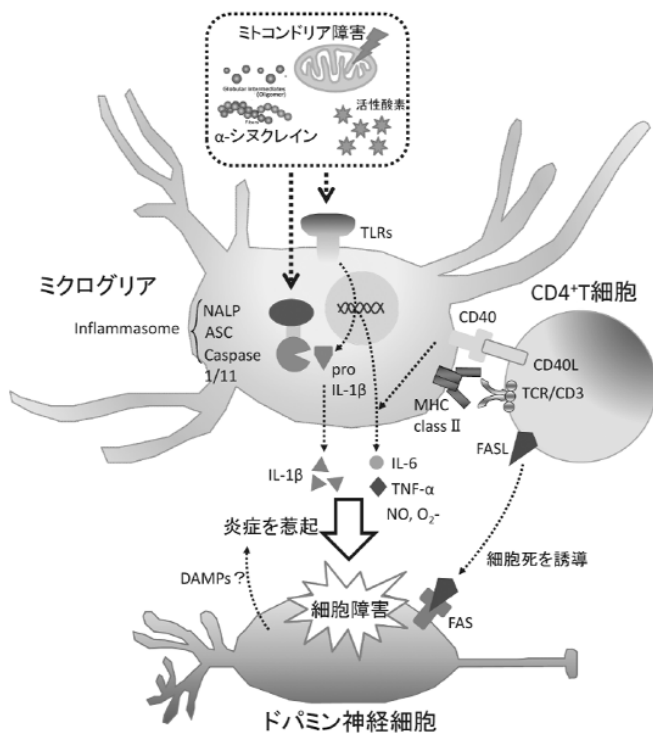
## 結語

神経変性疾患において、インフラマゾームを介した炎症機転や、M1/M2ミクログリア制御が重要な役割を果たすことが明らかになった。今後は神経変性疾患におけるインフラマゾームの活性化誘導因子やM2ミクログリアからM1ミクログリアへの転換機構の解明が課題である。

## 主要研究成果

### 原著論文

1. Tada S, Yasui T, Nakatsuji Y, Okuno T, Koda T, Mochizuki H, Sakoda S, Kikutani H. BAFF controls neural cell survival through BAFF receptor. PLoS One 8 (7):e70924, 2013
2. Tada S, Okuno T, Hitoshi Y, Yasui T, Honorat JA, Takata K, Koda T, Shimagami H, Chi-Jing C, Namba A,



- Sugimoto T, Sakoda S, Mochizuki H, Kikutani H, Nakatsuji Y. Partial suppression of M1 microglia by Janus kinase 2 inhibitor does not protect against neurodegeneration in animal models of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroinflammation*. 2014 Oct 19;11:179. doi: 10.1186/s12974-014-0179-2.
3. Tada S, Yasui T, Nakatsuji Y, Okuno T, Koda T, Mochizuki H, Sakoda S, Kikutani H. BAFF controls neural cell survival through BAFF receptor. *PLoS One*. 2013 Jul 29;8(7):e70924.
  4. Yasuda T, Nakata Y, Choong CJ, Mochizuki. Neurodegenerative changes initiated by presynaptic dysfunction. *Transl Neurodegener*. 2013 Aug 7;2(1):16.
  5. Fujimoto H, Mihara M, Hattori N, Hatakenaka M, Kawano T, Yagura H, Miyai I, Mochizuki H. Cortical mechanisms underlying balance recovery in patients with hemiplegic stroke. *Neuroimage*. 2014 Jan 15;85 Pt 1:547-54.
  6. Mochizuki H, Choong CJ, Yasuda T. The promises of stem cells: stem cell therapy for movement disorders. *Parkinsonism Relat Disord*. 2014 Jan;20 Suppl 1:S128-31.
  7. Khoo HM, Kishima H, Hosomi K, Maruo T, Tani N, Oshino S, Shimokawa T, Yokoe M, Mochizuki H, Saitoh Y, Yoshimine T. Low-frequency subthalamic nucleus stimulation in Parkinson's disease: a randomized clinical trial. *Mov Disord*. 2014 Feb;29(2):270-4.
  8. Koda T, Okuno T, Takata K, Honorat JA, Kinoshita M, Tada S, Moriya M, Sakoda S, Mochizuki H, Kumanogoh A, Nakatsuji Y. Sema4A inhibits the therapeutic effect of IFN- $\beta$  in EAE. *J Neuroimmunol*. 2014 Mar 15;268(1-2):43-9.
  9. Kimura Y, Mihara M, Kawarai T, Kishima H, Sakai N, Takahashi MP, Mochizuki H. Efficacy of deep brain stimulation in an adolescent patient with DYT11 myoclonus-dystonia. *Neurology and clinical Neuroscience*. 2014 Mar; 2(2):57-9.
  10. Sugiyama Y, Yagita Y, Yukami T, Watanabe A, Oyama N, Terasaki Y, Omura-Matsuoka E, Sasaki T, Mochizuki H, Kitagawa K. Granulocyte colony-stimulating factor fails to enhance leptomeningeal collateral growth in spontaneously hypertensive rats. *Neurosci Lett*. 2014 Apr 3;564:16-20.
  11. Takata K, Kato H, Shimosegawa E, Okuno T, Koda T, Sugimoto T, Mochizuki H, Hatazawa J, Nakatsuji Y. <sup>11</sup>C-acetate PET imaging in patients with multiple sclerosis. *PLoS One*. 2014 Nov 4;9(11):e111598.
  12. Takata K, Tomita T, Okuno T, Kinoshita M, Koda T, Honorat JA, Takei M, Hagihara K, Sugimoto T, Mochizuki H, Sakoda S, Nakatsuji Y. Dietary Yeasts Reduce Inflammation in Central Nerve System via Microflora. *Ann Clin Transl Neurol*. 2015 Jan;2(1):56-66.
  13. Kitagawa K, Miwa K, Yagita Y, Okazaki S, Sakaguchi M, Mochizuki H. Association between carotid stenosis or lacunar infarction and incident dementia in patients with vascular risk factors. *Eur J Neurol*. 2015 Jan;22(1):187-92.
  14. Kimura Y, Mihara M, Takahashi M, Kishima H, Sakai N, Kawarai T, Shimozono T, Mizuguchi M, Ozono K, Yoshimine T, Kaji R, Mochizuki M. A case of early onset myoclonus-dystonia due to a novel mutation of the  $\epsilon$ -Sarcoglycan Gene in a Japanese family.
  15. Kimura Y, Oda M, Nakatani T, Sekita Y, Monfort A, Wutz A, Mochizuki H, Nakano T. CRISPR/Cas9-mediated reporter knock-in in mouse haploid embryonic stem cells. *Sci Rep*. 2015 Jun 3;5:10710.
  16. Nakatani R, Nakamori M, Fujimura H, Mochizuki H, Takahashi MP. Large expansion of CTG/CAG repeats is exacerbated by MutS  $\beta$  in human cells. *Sci Rep*. 2015 Jun 5;5:11020.
  17. Beck G, Shinzawa K, Hayakawa H, Baba K, Yasuda T, Sumi-Akamaru H, Tsujimoto Y, Mochizuki H. Deficiency of Calcium-Independent Phospholipase A2 Beta Induces Brain Iron Accumulation through Upregulation of Divalent Metal Transporter 1. *PLoS One*. 2015 Oct 27;10(10):e0141629.
  18. Araki K, Yagi N, Ikemoto Y, Yagi H, Choong CJ, Hayakawa H, Beck G, Sumi H, Fujimura H, Moriwaki T, Nagai Y, Goto Y, Mochizuki H. Synchrotron FTIR microspectroscopy for structural analysis of Lewy bodies in the brain of Parkinson's disease patients. *Sci Rep*. 2015 Dec 1;5:17625.
  19. Choong CJ, Sasaki T, Hayakawa H, Yasuda T, Baba K, Hirata Y, Uesato S, Mochizuki H. A novel histone deacetylase 1 and 2 isoform-specific inhibitor alleviates experimental Parkinson's disease. *Neurology of Aging* 2016 Jan;37:103-16.
  20. Fujiwara S, Araki K, Matsuo T, Yagi H, Yamada T, Shibata K, Mochizuki H. Dynamical Behavior of Human  $\alpha$ -Synuclein Studied by Quasielastic Neutron Scattering. *PLoS One*. 2016 Apr 20;11(4):e0151447.
  21. Beck G, Shinzawa K, Hayakawa H, Baba K, Sumi-Akamaru H, Tsujimoto Y, Mochizuki H. Progressive Axonal Degeneration of Nigrostriatal Dopaminergic Neurons in Calcium-Independent Phospholipase A2  $\beta$  Knockout Mice. *PLoS One*. 2016 Apr 14;11(4):e0153789. doi: 10.1371/journal.pone.0153789. eCollection 2016.
  22. Sumi-Akamaru H, Beck G, Shinzawa K, Kato S, Riku Y, Yoshida M, Fujimura H, Tsujimoto Y, Sakoda S, Mochizuki H. High expression of  $\alpha$ -synuclein in damaged mitochondria with PLA2G6 dysfunction *Acta Neuropathol Commun*. 2016;4:27.



# アストロサイトの部位特異的プロファイルがもたらす脳内環境と神経保護

(平成24年度～平成25年度)



公募

浅沼 幹人 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

## 研究の背景と目的

アストロサイトの内在性抗酸化防御機能の障害が、パーキンソン病 (PD)、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、脳虚血などの神経疾患の病態形成に関与することが報告されている。また、脳内における強力な内在性抗酸化防御因子グルタチオン (GSH) の神経細胞における合成は、アストロサイトでのシスチントランスポーターxCTを介したシスチン取り込みとそれに続くGSH生成に依存している。我々はこれまでに、神経-アストロサイト共培養系での酸化ストレスによるドパミン (DA) 神経障害やPDモデルマウス脳において、抗酸化防御因子GSHおよび金属結合蛋白メタロチオネイン (MT) の誘導・合成が線条体アストロサイトにおいてのみ亢進し、DA神経保護に働くことを見出した。本研究では、刺激に対するアストロサイトおよびその抗酸化防御機構などの反応性の脳部位特異的プロファイルがもたらす脳内環境と神経細胞の脆弱性・抵抗性との関係を、培養系あるいは各種神経疾患モデル動物において解明することを目的とした。

## 研究成果

### (1) 各種刺激による初代培養アストロサイトの部位特異的プロファイリング：

神経毒6-OHDAあるいはDA神経変性を惹起する環境毒農薬ロテノン処置により中脳および線条体アストロサイトで部位特異的に発現の増減する因子をDNAマイクロアレイを用いて網羅的に検索したところ、刺激により中脳と線条体アストロサイトで同様に増減する因子は全体の10%に過ぎず、ほとんどの因子の発現に部位特異性があることが判った。6-OHDAにより中脳アストロサイトで変化がなく、線条体アストロサイトで発現が増加したのものには、Nrf2で転写調節されるphase II解毒

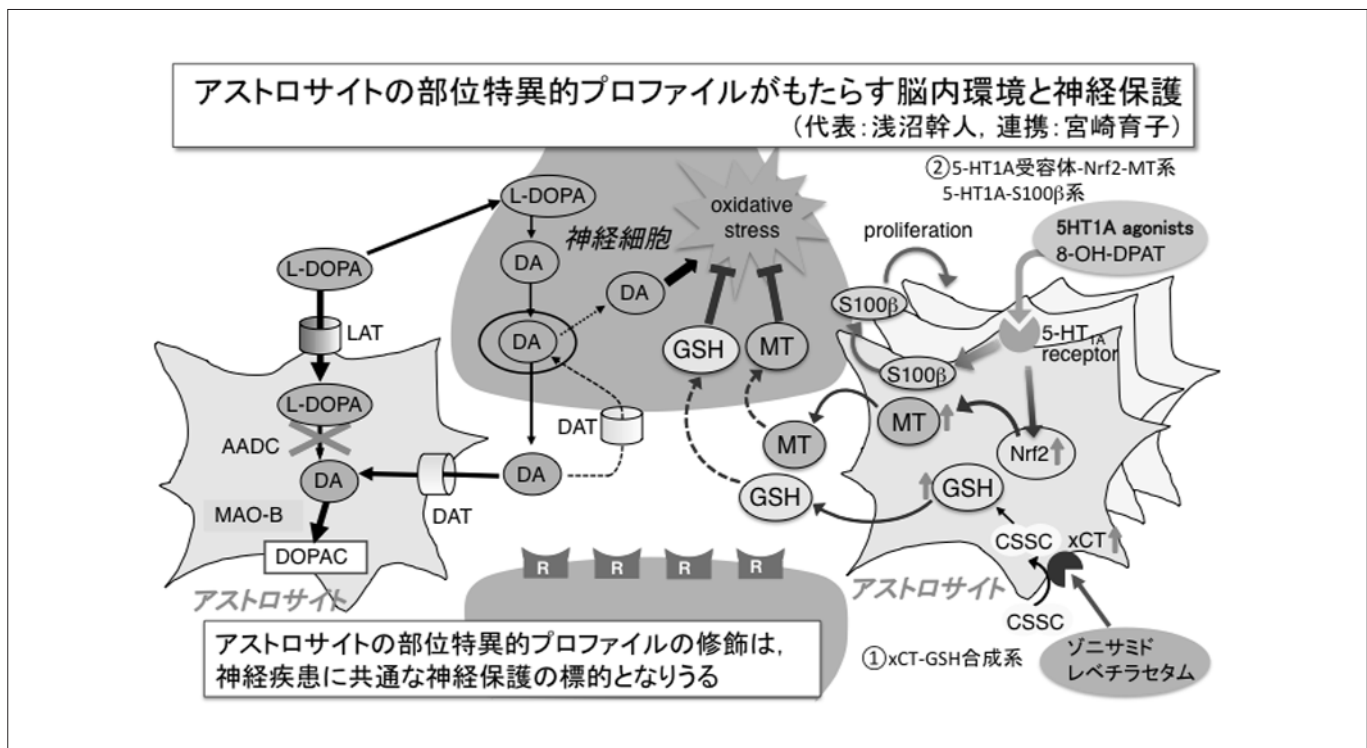
酵素類 (NQO-1, GSH関連酵素等) の遺伝子があり、蛋白レベルでもその増加を確認した。また、ロテノンにより線条体アストロサイトで発現増加している因子の中にParkin遺伝子がみられた。線条体アストロサイトはこれらの抗酸化因子を発現させることにより強い抗酸化能を発揮していると考えられた。

### (2) 初代培養神経・アストロサイト共培養系を用いた部位特異的プロファイルと神経保護：

初代培養中脳DA神経と各脳部位アストロサイトとの共培養に酸化ストレスとして6-OHDAを添加したところ、線条体アストロサイトとの共培養の方が前頭皮質、中脳アストロサイトとの共培養に比べDA神経生存率は有意に高く、さらに6-OHDA処置した線条体アストロサイトの培養液を添加した中脳DA神経の生存率は、6-OHDA処置した中脳アストロサイトの培養液を添加した場合に比べ有意に高く、6-OHDAのDA神経毒性に対して線条体アストロサイトから神経保護因子が放出されていると考えられた。

また、L-DOPAによる初代培養中脳DA神経細胞への生存維持効果がアストロサイトを介するものであり、L-DOPA代謝産物3-OMDはL-DOPAのアストロサイトへの取り込みを阻害することで、L-DOPAの保護効果を抑制することを明らかにした (Asanuma and Miyazaki, BMC Neurosci, 2016)。

一方、アストロサイト自己増殖に働くS100β分泌を促す神経保護薬候補として既に我々が選定したセロトニン5-HT<sub>1A</sub>レセプターアゴニスト8-OH-DPATが、アストロサイト上の5-HT<sub>1A</sub>レセプターに作用し、S100β分泌を介してアストロサイト増殖に働き、さらにアストロサイトでのNrf2活性化およびMTの発現・放出を介して、6-OHDAによる培養DA神経変性に対して保護効果を発揮するという神経保護のメカニズムを明らかにした (Miyazaki et al., Neurobiol Dis, 2013)。





### (3) 疾患動物モデルでのアストロサイトの部位特異的プロファイルと神経保護 :

6-OHDAによるPDモデルに8-OH-DPATを連日投与することにより、黒質DA神経変性が有意に抑制できた (Miyazaki et al., *Neurobiol Dis*, 2013)。また、抗てんかん薬レベチラセタムがアストロサイトのxCT-GSH合成系賦活によりPDモデルでDA神経保護に働くことを明らかにした (Miyazaki et al., *J Neurochem*, 2016)。

線条体アストロサイトがL-DOPAを取り込むがDAに変換されていないこと、L-DOPA濃度勾配に従いL-DOPAを取り込み、排出をしており、アストロサイトがL-DOPAのリザーバーとして働いていることも明らかにした (Asanuma et al., *PLoS ONE*, 2014)。

さらに、変異SOD1過剰発現ALSモデルマウスに8-OH-DPATを投与すると、脊髄前角のアストロサイトを増殖させることなくMT発現が増加し、運動障害ならびに運動神経の脱落が抑制されることを見出した (Miyazaki et al., *Ann Pharmacol Pharmaceut*, 2016)。

### 結語

酸化ストレスに対するアストロサイトの反応性と抗酸化因子の発現が脳部位により異なり、その部位特異的プロファイルが神経細胞の脆弱・抵抗性に関係することを明らかにした。部位特異的プロファイルの修飾、特にアストロサイトのxCT-GSH合成系、5-HT1A受容体-Nrf2-MT系、5-HT1A-S100 $\beta$ 系を賦活する薬剤が酸化ストレスによる神経保護効果を発揮することを発見した。アストロサイトの部位特異的プロファイルの修飾は神経疾患治療法開発の標的となりうると期待できる。

### 主要研究成果

#### 原著論文

- Miyazaki I, Murakami S, Nakano T, Torigoe N, Kikuoka R, Kitamura Y, Sendo T, Asanuma M. Serotonin-1A agonist 8-OH-DPAT alleviates motor dysfunction and motor neuron degeneration in a model of amyotrophic lateral sclerosis. **Ann Pharmacol Pharmaceut** 1: 1003 (2016).
- Asanuma M, Miyazaki I. 3-O-methyldopa inhibits astrocyte-mediated dopaminergic neuroprotective effects of L-DOPA. **BMC Neurosci**, 17: 52 (2016).
- Takehima M, Miyazaki I, Murakami S, Kita T, Asanuma M. L-Theanine protects against excess dopamine-induced neurotoxicity in the presence of astrocytes. **J Clin Biochem Nutr** 59: 93-99 (2016).
- Sasaki T, Liu K, Agari T, Yasuhara T, Morimoto J, Okazaki M, Takeuchi H, Toyoshima A, Sasada S, Shinko A, Kondo A, Kameda M, Miyazaki I, Asanuma M, Borlongan CV, Nishibori M, Date I. Anti-high mobility group box 1 antibody exerts neuroprotection in a rat model of Parkinson's disease. **Exp Neurol** 275: 220-231 (2016).
- Miyazaki I, Murakami S, Torigoe N, Kitamura Y, Asanuma M. Neuroprotective effects of levetiracetam target xCT in astrocytes in parkinsonian mice. **J Neurochem** 136: 194-204 (2016).
- Murakami S, Miyazaki I, Miyoshi K, Asanuma M. Long-term systemic exposure to rotenone induces central and peripheral pathology of Parkinson's disease in mice. **Neurochem Res** 40: 1165-1178 (2015).
- Asano T, Koike M, Sakata S, Takeda Y, Nakagawa T, Hatano T, Ohashi S, Funayama M, Yoshimi K, Asanuma M, Toyokuni S, Mochizuki H, Uchiyama Y, Hattori N, Iwai K. Possible involvement of iron-induced oxidative insults in neurodegeneration. **Neurosci Lett** 588: 29-35 (2015).
- Asanuma M, Miyazaki I, Murakami S, Diaz-Corrales FJ, Ogawa N. Striatal astrocytes act as a reservoir for L-DOPA. **PLoS ONE** 9: e106362 (2014).
- Murakami S, Miyazaki I, Sogawa N, Miyoshi K, Asanuma M. Neuroprotective effects of metallothionein against rotenone-induced myenteric neurodegeneration in parkinsonian mice. **Neurotox Res** 26: 285-98 (2014).
- Miyoshi K, Kasahara K, Murakami S, Takeshima M, Kumamoto N, Sato A, Miyazaki I, Matsuzaki S, Sasaoka T, Katayama T, Asanuma M. Lack of dopaminergic inputs elongates the primary cilia of striatal neurons. **PLoS ONE** 9: e97918 (2014).
- Miyake A, Kitamura Y, Miyazaki I, Asanuma M, Sendo T. Effects of (+)-8-OH-DPAT on the duration of immobility during the forced swim test and hippocampal cell proliferation in ACTH-treated rats. **Pharmacol Biochem Behav** 122: 240-245 (2014).
- Miyazaki I, Asanuma M, Murakami S, Takeshima M, Torigoe N, Kitamura Y, Miyoshi K. Targeting 5-HT1A receptors in astrocytes to protect dopaminergic neurons in parkinsonian models. **Neurobiol Dis** 59: 244-256 (2013).
- Asanuma M, Miyazaki I, Diaz-Corrales FJ, Higashi Y, Namba M, Ogawa N. Transplantation of melanocytes obtained from the skin ameliorates apomorphine-induced abnormal behavior in rodent hemi-parkinsonian models. **PLoS ONE** 8: e65983 (2013).
- Diaz-Corrales FJ, Miyazaki I, Asanuma M, Ruano D, Rios RM. Centrosomal aggregates and Golgi fragmentation disrupt vesicular trafficking of DAT. **Neurobiol Aging** 33: 2462-2477 (2012).

### 総説

- Miyazaki I, Asanuma M. Serotonin 1A receptors on astrocytes as a potential target for treatment of Parkinson's disease. **Curr Med Chem** 23: 686-700 (2016).
- Kita T, Asanuma M, Miyazaki I, Takeshima M. Protective effects of phytochemical antioxidants on neurotoxin-induced degeneration of dopaminergic neurons. **J Pharmacol Sci** 124: 313-319 (2014).



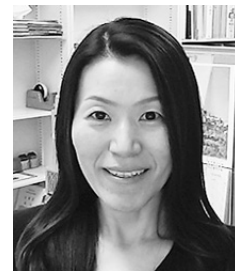
# 脳老化と神経変性疾患発症の分子機構の解明

(平成24年度～平成25年度)

公募

田口 明子

国立長寿医療研究センター・部長



## 研究の背景と目的

老化は認知機能の低下を導く生物体必須の内在性要因であるが、近年の研究から、糖尿病が老化様の効果を有し、認知機能障害を促進する重要な危険因子であることが明らかとなっている。糖代謝調節経路であるインスリン様シグナルの主要調節因子であるInsulin Receptor Substrates2 (IRS2) の脳における欠損は、寿命を延長し老化を遅延するだけでなく、従来のアルツハイマー病 (AD) モデル動物の病態を改善することが判明したことから、脳IRS2シグナルは、認知機能の恒常性に重要な役割を果たしていることが示唆される。一方、最近の知見から、認知機能は脳内だけで管理される訳ではなく、加齢に伴い増加する血中因子による影響を強く受け、体系的に調節されることが明らかにされた。これらの結果から、糖尿病による認知機能障害の誘導機構にも類似の体系的調節機構が働いている可能性が考えられる。本研究では、神経変性疾患と脳IRS2シグナルの相関を明らかにすることを通じて、神経変性を導く根本的な分子機序を理解することを目的とする。

## 研究成果

### 1. 脳IRS2の欠損が中脳ドーパミン神経細胞に与える影響

#### (1) 脳IRS2の低下・欠損がドーパミン

神経細胞変性に与える影響：IRS2は中脳ドーパミン (DA) 神経細胞に発現していることを確認後、中脳黒質線条体DA神

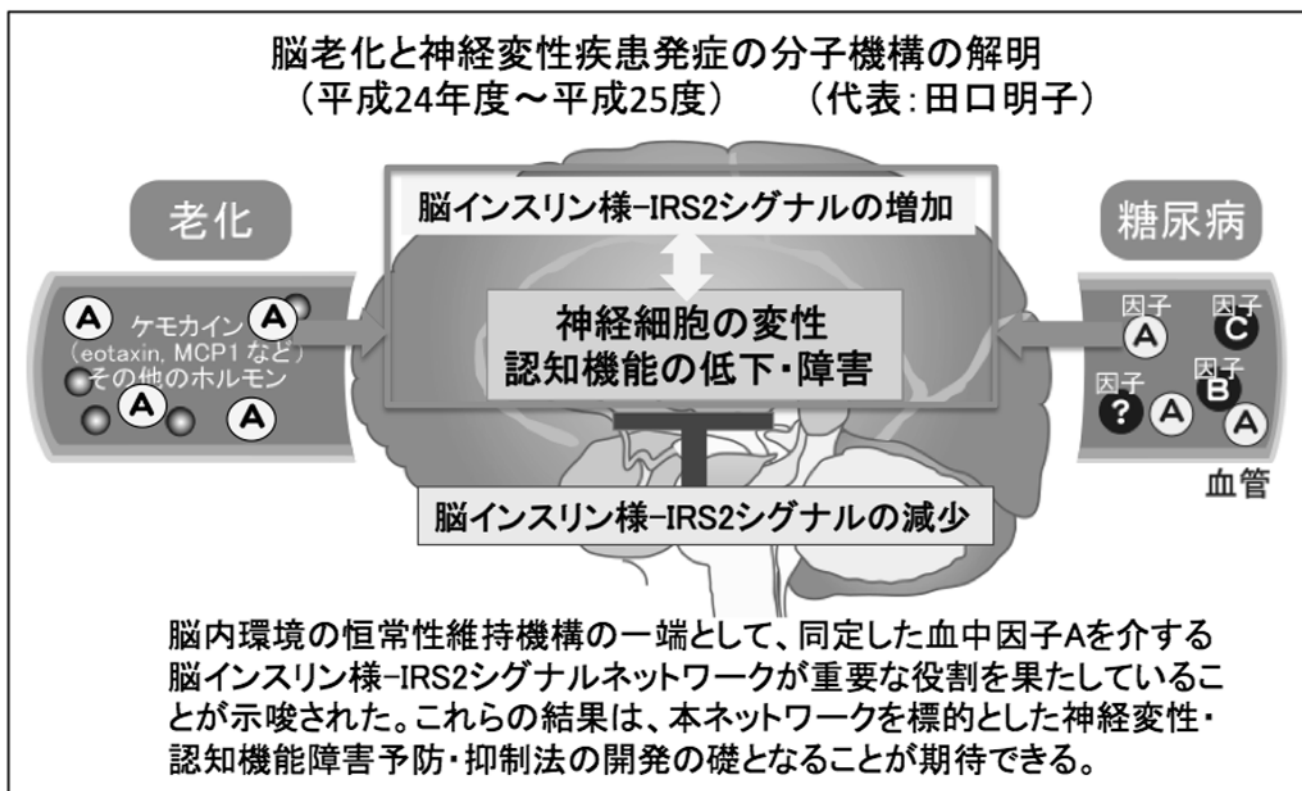
経細胞変成誘導薬MPTP投与の老齢脳特異的IRS2欠損 (Blrs2ko<sup>+/-and-/-</sup>) マウスのDA神経細胞の変化について精査した結果、老齢Blrs2ko<sup>+/-and-/-</sup>(KO)マウスの中脳黒質線条体では、DA神経細胞死が有意に抑制されていた (投稿準備中)。

(2) ドーパミン代謝経路の変化についての解析：MPTP投与後の老齢KOマウス脳のDOPAC, HVA, DAのそれぞれの濃度を測定し、DAの代謝率について検討を行った結果、老齢コントロールマウスに比べDAの代謝率が有意に高いことが判った。

(3) 酸化ストレスについての解析：蛍光プローブ法、ELISA法により、老齢KOマウスの脳内活性酸素種 (ROS) および尿中酸化ストレスマーカー (8-OHdG) を測定した結果、対照群との間でROSの値に差は見られなかったが、老齢KOマウス尿中の8-OHdGは低下しており、この体系的酸化ストレスレベルの低下が脳IRS2の欠損に伴う神経保護作用に関与する可能性が示された。

### 2. 脳IRS2シグナルの変化を指標とした糖尿病付随体系的認知機能障害誘導機構

(1) 糖尿病に伴う海馬依存的認知機能障害における脳IRS2シグナルの変化：遺伝子が無損傷で糖代謝異常を伴い認知障害が進行する2型糖尿病の生理的モデル (Diet Induced



Obesity:DIO) マウスを用いて、脳IRS2シグナルと海馬依存的認知機能の変化について解析を行った結果、DIOマウス海馬では、IRS2シグナルが有意に亢進していることが判明した。

機能調節における脳インスリン様シグナルの役割? 医学のあゆみ249(6): 535-538, 2014

**(2) 糖尿病に伴う体系的認知機能障害誘導機構の可能性についての検討**：脳IRS2シグナルの亢進と認知機能の低下が連動することを指標として、DIOマウスと野生型マウスの交換輸血およびパラバイオーシスを行った結果、DIOマウス血中には、認知機能の低下を促し、海馬IRS2シグナルを亢進させる液性因子が存在することが示唆され、血中因子のスクリーニングから、候補因子を同定した。

### 結語

脳IRS2シグナルの欠損は、中脳DA神経細胞変性に対して神経保護作用を発揮することが示唆された。さらに、脳IRS2シグナルの亢進と認知機能の低下は連動し、その連動には同定した血中因子を介した体系的調節機構が関与することが示唆された。同定した因子は老齢マウス血中でも同様に変化していることを突き止めている。これらの研究結果は、本研究の推進とその発展から導かれたもので、脳内環境の恒常性破綻メカニズム解明のための次への一歩となった。

### 主要研究成果

#### 論文

1. Takayanagi Y, Laursen TM, Yukitake H, Ueda S, Sumitomo A, Tanaka T, Horiuchi Y, Cascella NG, Ishizuka K, Taguchi A, Eaton WW, Sakurai T, Mortensen PB, Sawa A.: Molecular epidemiology in psychiatry: common metabolic problems in schizophrenia and bipolar disorder (Under review)
2. Tada H, Miyazaki T, Takemoto K, Jitsuki S, Nakajima W, Koide M, Yamamoto N, Taguchi A, Kawai H, Komiya K, Suyama K, Abe H, Sano A, Takahashi T.: Social isolation suppresses actin dynamics and synaptic plasticity through ADF/cofilin inactivation in the developing rat barrel cortex (Under review)
3. Tada H, Miyazaki T, Takemoto K, Takase K, Jitsuki S, Nakajima W, Koide M, Yamamoto N, Komiya K, Suyama K, Sano A, Taguchi A, Takahashi T.: Neonatal isolation augments social dominance by altering actin dynamics in the medial prefrontal cortex. PNAS, 2016, in press
4. Tada H, Tokunaga A, Tanokashira D, Kurata E, Taguchi A.: Role of metabolic signaling in the regulation of Cognitive functions. Biomedical Gerontology, 40(2): 9-14, 2016
5. Miyoshi K, Yanagi S, Kawahara K, Nishio M, Tsubouchi H, Imazu Y, Koshida R, Matsumoto N, Taguchi A, Nakazato M.: Epithelial Pten controls acute lung injury and fibrosis by regulating alveolar epithelial cell integrity. *Am J Respir Crit Care Med*, 187: 262-275, 2013

#### 総説

1. 田口明子.: インスリン様シグナルと寿命・老化の制御. 糖尿病学イラストレイティッド, 291-296. 2012
2. 田口明子, 倉田栄子, 福岡屋航.: 代謝調節分子の中脳神経系における役割—脳内インスリン様受容体シグナル分子IRS2を介した神経機能調節機構—. 心と体のクロストークから解く 精神・神経疾患, 実験医学増刊号, 30: 2057-2061. 2012
3. 福岡屋航, 田口明子.: 糖尿病関連神経変性疾患—アルツハイマー病発 機構についての新たな視点. Diabetes Frontier, 24(3):253-261, 2013
4. 田口明子.: 脳の老化とインスリン様シグナル 脳21, Vol.17 No.2 110-115. 2014
5. 田口明子.: インスリン様シグナルとアルツハイマー病 ?認知



公募

## 内在性Nogo受容体アンタゴニストLOTUSによる 脳内環境制御 (平成24年度～平成25年度)

### 内在性Nogo受容体アンタゴニストLOTUSによる 多発性硬化症治療法の開発 (平成26年度～平成27年度)

竹居光太郎

横浜市立大学・大学院生命医科学研究科・教授



#### 研究の背景と目的

本研究は、報告者らが発見した新規の神経回路形成因子LOTUSとその結合分子Nogo receptor-1 (NgR1)の分子間相互作用が織りなす生理機能を利用した新しい神経再生医療技術の基盤構築を目的とする。NgR1は、中枢神経系のミエリン膜に存在する3種の神経再生阻害因子(Nogo, MAG, OMgp)およびBリンパ球刺激因子(BLyS)とコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)に共通する受容体で、神経細胞がこれらの因子を受容すると軸索伸長が著しく阻害されることが知られることから、NgR1は障害を受けた中枢神経系の再生を困難にする主要因と考えられている。また近年では、多発性硬化症での脱髄による神経変性の進行にNogoとNgR1の相互作用が関わることが報告されている。報告者らは、LOTUSはNgR1と相互作用して内在性のNgR1アンタゴニストとして機能し、胎生期脳における嗅索形成に寄与することを明らかにした(Sato et al., *Science*, 2011)。このことから、LOTUSの細胞機能を利用した新しい神経再生治療戦略を考案するに至った。

#### 研究成果

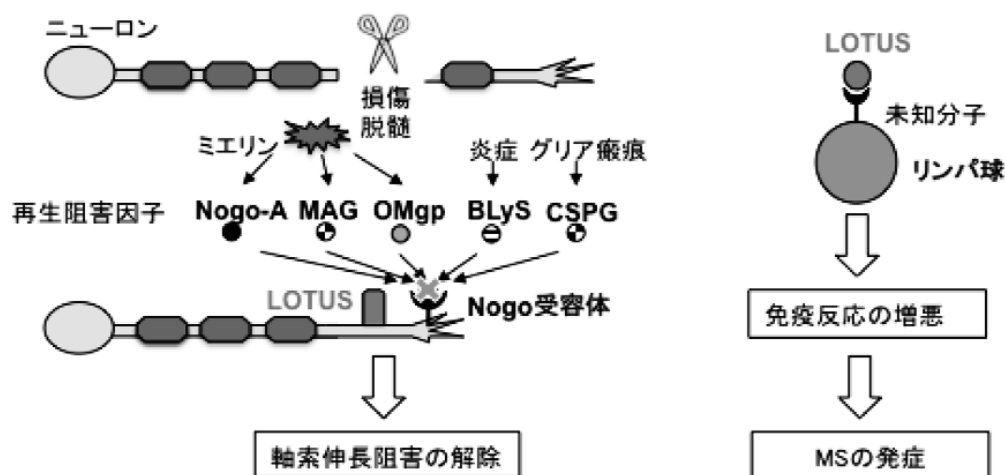
(1) **内在性Nogo受容体およびPirBのアンタゴニスト**：LOTUSは、Nogo以外のOMgp, MAG, BLyS, CSPGのNgR1に対する結合、および脊髄後根神経節細胞における成長円錐崩壊と神経突起伸長作用について検討したところ、Nogo受容体の5種のリガンド分子(神経再生阻害因子)全てに対してLOTUSは強力な拮抗作用を示すことが判明した(Kurihara et al., 2014)。一方、Nogo, MAG, OMgpの3種の神経再生阻害因子をリガンドとする新たな受容体PirBが発見され、LOTUSとPirBの相互作用について解析したところ、LOTUSとPirBは相互作用を示し、NogoとPirBの結合を阻害した(未発表)。以上より、LOTUSは神経再生を阻む2種の受容体、NgR1とPirBの双方に対する内在性アンタゴニストであることが判明した。

(2) **脊髄損傷モデルにおける神経再生**：背側半切断による脊髄損傷モデル動物を作製し、経時的に運動機能回復を行動学的・組織学的に解析したところ、LOTUS-KOマウスにおいては齧歯類が有する自然神経再生能が野生型に比して著しく減弱し、齧歯類が示す自然神経再生能に内在性LOTUSが深く関わることを示唆された。次に、LOTUS過剰発現マウス(LOTUS-TGマウス)を用いて同様の解析を行ったところ、野生型が示す自然回復能を越える有意な機能回復亢進が認められた。以上から、LOTUS発現の遺伝的背景の違いによって明確な差異が示され、LOTUSは神経再生に奏功することの確証を得た(Hirokawa et al., 論文投稿中)。

(3) **病勢を反映するLOTUS発現変動**：LOTUSが、国の指定難病の一つである多発性硬化症(MS)の軸索変性にNogoやNgR1が関与することから、MS患者の脳脊髄液中のLOTUS濃度を解析したところ、MSの病勢に従い脳脊髄液中で顕著に変動することが判明した。MSは再発と寛解を繰り返すが、再発患者ではLOTUSが激減するのに対し、寛解した患者では健常人レベルに回復した(Takahashi et al., 2015)。MSには、病勢を判断する有効なバイオマーカーがなく、この成果で脳脊髄液中のLOTUSの変動が、多発性硬化症の病勢を示す新たなバイオマーカー(診断薬)として臨床応用されることが期待される。

(4) **多発性硬化症モデル動物(EAEマウス)におけるLOTUSの関与**：LOTUS-KOマウスを用いてEAEマウスを作製したところ、MS様神経症状が改善したのに対し、LOTUS-TGマウスでは症状悪化を来した。このことは、LOTUSはMS急性期において病態悪化因子であることを示唆する。そこでLOTUSのリンパ球における影響を検討したところ、LOTUSはEAEマウスから得た末梢リンパ球およびTリンパ球に未知の結合分子と結合し、IL-17産生を増加させてリンパ球の増殖をもたらして免疫反応を増加させることが判明した。以上から、急性期MSの免疫応答にLOTUSが関与することが見いだされ、

#### 内在性Nogo受容体アンタゴニストLOTUSによる 脳内環境制御 & MS治療法の開発



リンパ球上のLOTUS結合分子を同定してLOTUSとの相互作用を遮断することがMS病態改善に寄与する可能性があることが分かった。

## 結語

神経回路形成因子LOTUSの有するNgR1に対する拮抗作用のほぼ全容が明らかになった。また、その拮抗作用によって脊髄損傷モデルにおいて神経再生能を惹起することが可能であることが判明した。一方、MSの病勢に従ってLOTUSの髄液内濃度変動し、病勢バイオマーカーに転用することが期待された。更に、急性期MSにおいてLOTUSは末梢リンパ球と反応して免疫反応を増悪することで病態発症に関与することが示唆された。これらの成果より、神経再生を阻む脳内環境をLOTUSが負に制御できること、LOTUSとTリンパ球との相互作用がMSの新たな治療標的となることが明らかになり、本研究の目的である、環境制御因子としての役割とMS発症機序の解明に迫ることができた。

## 主要研究成果

### 原著論文

1. Iketani, M., Yokoyama, T., Kurihara, Y., Strittmatter, S.M., Goshima, Y., Kawahara, N., Takei, K. Axonal branching in lateral olfactory tract is promoted by Nogo signaling. **Scientific Reports, in press.** (2016).
2. Ge, X., Ritter, S.Y., Tsang, K., Shi, R., Takei, K., Aliprantis, A.O. Sex-specific protection of osteoarthritis by deleting cartilage acid protein 1. **PlosOne** DOI:10.1371/journal.pone.0159157 (2016)
3. Takahashi, K., Kurihara, Y., Suzuki, Y., Goshima, Y., Tanaka, F., Takei, K. Association of cerebrospinal fluid levels of lateral olfactory usher substance protein with disease activity in multiple sclerosis. **JAMA Neurology** 72(2): 176-179 (2015).
4. Nagai, J., Kitamura, Y., Owada, K., Yamashita, N., Takei, K., Goshima, Y., Ohshima, T. Crmp4 deletion promotes recovery from spinal cord injury by neuroprotection and limited scar formation. **Scientific Reports** 5: 8269 (DOI: 10.1038/srep08269) (2015).
5. Kurihara, Y., Iketani, M., Ito, H., Nishiyama, K., Sakakibara, Y., Goshima, and Y. Takei, K. LOTUS suppresses axon growth inhibition by blocking interaction between Nogo receptor-1 and all four types of its ligand. **Molecular Cellular Neuroscience** 61 : 211-218 (2014).
6. Yamashita, N., Usui, H., Nakamura, F., Chen, S., Sasaki, Y., Hida, T., Suto, F., Taniguchi, M., Takei, K., Goshima, Y. PlexinA4-dependent retrograde Semaphorin3A signaling regulates the dendritic localization of GluA2-containing AMPA receptors. **Nature Communications** 5: 3424 (DOI: 10.1038/ncomms4424) (2014).

### 総説

1. Takahashi, K., Takei, K., Tanaka, F. Association of multiple sclerosis with lateral olfactory tract usher substance (LOTUS), a possible endogenous inhibitor of axonal degeneration. **Clinical and Experimental Neuroimmunology** 6 : 64-69 (2015).
2. Takahashi, K., Tanaka, F., Takei, K. LOTUS, a possible endogenous inhibitor of axonal degeneration, as a biomarker for multiple sclerosis. **Neural Degenerative Disease Management** 5(6): 469-472 (doi:10.2217/nmt.15.47) (2015).
3. Kurihara, Y., Takei, K. LOTUS, a potent blocker of Nogo receptor causing inhibition of axonal growth. **Neural**

**Regeneration Research** 10(1): 46-18 (2015).

4. 高橋慶太, 田中章景, 竹居光太郎 多発性硬化症の新規病勢診断マーカー. **臨床神経科学** (Clinical Neuroscience) 34(4): 484-485 (2016)
5. 高橋慶太, 田中章景, 竹居光太郎. 軸索再生関連分子の多発性硬化症診断マーカーへの応用. **Brain and Nerve** 68(1): 82-89 (2016).
6. 竹居光太郎 神経回路形成因子LOTUSの機能に基づく神経系の再生医学的研究. **横浜医学** 66:547-552 (2015).
7. 竹居光太郎 軸索再生阻害因子の制御による神経回路形成と神経再生. **脳神経系の再生医学** p85-90, 診断と治療社 (2015).



# シーディングによる脳内環境の破綻伝播メカニズムの解明

(平成24年度～平成25年度)

公募

古川 良明

慶應義塾大学・理工学部・准教授



## 研究の背景と目的

SOD1は家族性ALSで最初に同定された責任遺伝子で、その遺伝子産物であるSOD1タンパク質は活性酸素の除去に関わる金属酵素である。現在までに150種類以上のALS変異が報告されており、マウスに変異SOD1タンパク質を発現させるとALS様の症状を再現することができる。一方で、SOD1遺伝子をノックアウトしたマウスはALS様の症状を呈さないことから、変異に伴うSOD1の生理機能（活性酸素の除去）の低下がALSを発症させる要因ではなく、神経毒性につながる新たな物性をSOD1が変異によって獲得することが示唆されている。特に、脊髄運動ニューロンなどの病変部位には、変異SOD1が異常に蓄積していることから、SOD1の構造形成（フォールディング）における何らかの異常が毒性の発揮に関与しているのではないかと考えられている。

野生型SOD1は銅・亜鉛イオンを結合し、分子内ジスルフィド（S-S）結合を形成することで、構造的に非常に安定化するタンパク質である。しかし、病理性変異によって、金属イオンとの親和性や分子内S-S結合の安定性が低下することが知られている。つまり、SOD1の構造が変異に伴って異常となる（ミスフォールディング）メカニズムを明らかにすることで、ALSの発症や病態進行を抑制する手法の開発につなげることができる。しかし、病理性変異によってSOD1がどのようにミスフォールディングするのか、その詳細なメカニズムは明らかとなっていない。これまでに私は、変異SOD1を発現するALSモデルマウスにおいて、分子「間」S-S結合でクロスリンクされた異常なSOD1オリゴマーを同定することに成功してきた。そこで、物理化学的・免疫化学的な手法を駆使することで、SOD1がオリゴマーへとミスフォールディングするメカニズムの解明を試みている。

## 研究成果

まず、金属イオンを結合していないアポ型SOD1の熱安定性がALS変異によって低下することを示差走査熱量測定により確認することができた。しかし、アポ型SOD1の熱変性は、天然

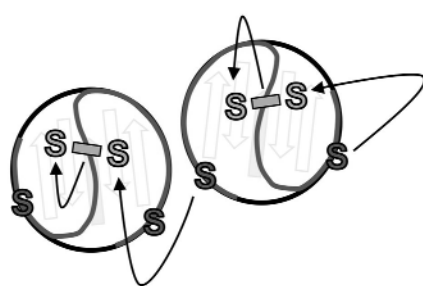
状態（F状態）と変性状態（U状態）の単純な二状態転移（ $F \rightleftharpoons U$ ）で進行するのではなく、中間的な状態（I状態）が存在することが分かった（ $F \rightleftharpoons I \rightleftharpoons U$ ）。特に、生理的温度である37°C付近では、野生型SOD1がF状態として存在していたのに対して、変異型（G37R）SOD1はI状態として存在していた。また、アポ型SOD1のI状態のコンフォメーションについて、円二色性分光法、及び、X線小角散乱法により解析したところ、F状態とほぼ変わらないコンパクトな全体構造を有していたものの、二次構造含量が大きく低下していることが分かった。その結果、アポ型SOD1のF状態は比較的安定に存在できるものの、I状態は容易にオリゴマーを形成し、それらはS-S結合によってクロスリンクされていた（S-Sオリゴマー）。SOD1は4つのシステイン残基を有しており、そのうちの2つが分子内S-S結合の形成に関与している。I状態では、SOD1の分子内S-S結合が他のシステイン残基との間でシャッフルし、分子間S-S結合へと異性化することでS-Sオリゴマーを形成することが分かった。

そこで、S-Sオリゴマーの病理学的意義について検討するために、S-Sオリゴマーを特異的に認識する抗体（S-Sオリゴマー抗体）を作製し、ALSモデルマウスやSOD1-ALS患者におけるS-Sオリゴマーの免疫化学的検出を試みた。その結果、SOD1-ALSの主要な病変部位である脊髄運動ニューロンにS-Sオリゴマーの形成を認めることができた。一方で、病変が限定的である小脳や脊髄後角領域にはS-Sオリゴマー抗体による免疫化学的シグナルが検出されず、また、SOD1遺伝子に変異が見られないALS患者においても、S-Sオリゴマーは見いだされなかった。

## 結語

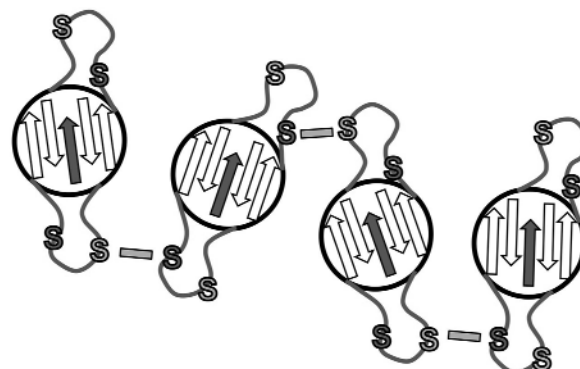
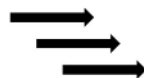
以上より、SOD1はALS変異の導入に伴ってその高い構造安定性を失い、生理的温度においては、二次構造含量の低下したI状態として存在することを明らかにできた。さらに、I状態にあるSOD1では、システイン残基間でS-S結合のシャッフルが進行し、S-Sオリゴマーの形成を *in vitro/in vivo* のいず

## ALS変異による構造安定性の低下



SOD1

S-S結合  
シャッフルリング



S-Sオリゴマー

れの条件においても確認することができた。現在は、これらの知見をもとにして、変異SOD1におけるFからIへの状態転移、ならびに、S-Sオリゴマーの形成過程をターゲットとすることで、変異SOD1のミスフォールディングを抑制できる薬剤の開発を進めている。

## 主要研究成果

### 原著論文

1. Tokuda E, Anzai I, Nomura T, Toichi K, Watanabe M, Ohara S, Watanabe S, Yamanaka K, Morisaki Y, Misawa H, and Furukawa Y. Immunochemical characterization on pathological oligomers of mutant Cu/Zn-superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. **Mol Neurodegener**, (2016), *in press*.
2. Anzai I, Tokuda E, Mukaiyama A, Akiyama S, Endo F, Yamanaka K, Misawa H, and Furukawa Y. A misfolded dimer of Cu/Zn-superoxide dismutase leading to pathological oligomerization in amyotrophic lateral sclerosis. **Protein Sci**, (2016) Dec. 15 (*Epub ahead of print*).
3. Anzai I, Toichi K, Tokuda E, Mukaiyama A, Akiyama S, and Furukawa Y. Screening of drugs inhibiting in vitro oligomerization of Cu/Zn-superoxide dismutase with a mutation causing amyotrophic lateral sclerosis. **Front Mol Biosci**, 3: 40 (2016).
4. Furukawa Y, Suzuki Y, Fukuoka M, Nagasawa K, Nakagome K, Shimizu H, Mukaiyama A, and Akiyama S. A molecular mechanism realizing sequence-specific recognition of nucleic acids by TDP-43 **Sci Rep**, 6: 20576 (2016).
5. Furukawa Y, Anzai I, Akiyama S, Imai M, Cruz FJC, Saio T, Nagasawa K, Nomura T, and Ishimori K. Conformational disorder of the most immature Cu,Zn-superoxide dismutase leading to amyotrophic lateral sclerosis. **J Biol Chem**, 291: 4144-55 (2016).
6. Ogawa M, Shidara H, Oka K, Kurosawa M, Nukina N, and Furukawa Y. Cysteine residues in Cu,Zn-superoxide dismutase are essential to toxicity in *Caenorhabditis elegans* model of amyotrophic lateral sclerosis. **Biochem Biophys Res Commun**, 463: 1196-202 (2015).
7. Sakurai Y, Anzai I, and Furukawa Y. A primary role for disulfide formation in the productive folding of prokaryotic Cu,Zn-superoxide dismutase. **J Biol Chem**, 289: 20139-49 (2014).
8. Nomura T, Watanabe S, Kaneko K, Yamanaka K, Nukina N, Furukawa Y. Intranuclear aggregation of mutant FUS/TLS as a molecular pathomechanism of amyotrophic lateral sclerosis. **J Biol Chem**, 289: 1192-202 (2014).
9. Furukawa Y. Redox environment is an intracellular factor to operate distinct pathways for aggregation of Cu,Zn-superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. **Front Cell Neurosci**, 7: Article 240 (2013).
10. Furukawa Y, Kaneko K, Watanabe S, Yamanaka K, Nukina N. Intracellular seeded aggregation of mutant Cu,Zn-superoxide dismutase associated with amyotrophic lateral sclerosis. **FEBS Lett**, 587: 2500-5 (2013).
11. Toichi K, Yamanaka K, Furukawa Y. Disulfide scrambling describes the oligomer formation of superoxide dismutase (SOD1) proteins in the familial form of amyotrophic lateral sclerosis. **J Biol Chem**, 288: 4970-80 (2013).
12. Mitomi Y, Nomura T, Kurosawa M, Nukina N, Furukawa Y. Post-aggregation oxidation of mutant huntingtin controls the interactions between aggregates. **J Biol Chem**, 287: 34764-75, (2012).

### 総説

1. Tokuda E and Furukawa Y. Copper homeostasis as a therapeutic target in amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. **Int J Mol Sci**, 17:636 (2016).
2. Furukawa Y and Tokuda E. Aggregation of FET proteins as a pathological change in amyotrophic lateral sclerosis. **Adv Exp Med Biol**, (2016) Jun. 17 (*Epub ahead of print*).
3. Ogawa M and Furukawa Y. A seeded propagation of Cu,Zn-superoxide dismutase aggregates in amyotrophic lateral sclerosis. **Front Cell Neurosci**, 8: Article 83 (2014).
4. Furukawa Y and Nukina N. Functional diversity of protein fibrillar aggregates from physiology to RNA granules to neurodegenerative diseases. **Biochim Biophys Acta**, 1832: 1271-8 (2013).



# シナプス伝達維持におけるアストロサイト・ニューロン間エネルギー共生機構の解明

(平成24年度～平成25年度)



公募

加藤 総夫

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

## 研究の背景と目的

健全な脳機能を維持するには膨大なエネルギーが必要であり、その供給破綻が、機能障害や神経細胞死をもたらすことは広く認識されている。血流障害や低酸素症などの細胞外環境は当然として、ミトコンドリアの品質、細胞内分布、あるいは代謝障害などの細胞内環境の異常も、健全なニューロンの機能維持を阻害し、重篤な帰結を招きうる。このように、脳が臓器の中で最も高いエネルギー要求性を持つ事実がよく知られているにもかかわらず、どのような過程で産生されたATPがニューロンのどのような活動に使われているのか、そしてそのATP産生に用いられる栄養源（グルコース）はどのような経路を介して血流からニューロンまで運搬されるのか、その詳細は十分に理解されていない。

エネルギー要求性の最も高いニューロンの活動は興奮性シナプス伝達であり、シナプス前後にはそれを支えるべくミトコンドリアが豊富に存在する。一方、全脳ATP消費の5%以下しか消費しないアストロサイトのシナプス周囲微細突起のミトコンドリアはわずかである。ところが、アストロサイトがグリコーゲンを豊富に持つ一方、ニューロンはグリコーゲン合成酵素を欠く。

このパラドクスに我々は注目し、シナプス伝達の維持におけるアストロサイトからニューロンへの lactate 輸送機構の意義の解明を目指した。アストロサイトからの lactate 輸送の責任分子であるモノカルボン酸トランスポーター（MCT1/2/4; SLC16A1/7/3）の薬理的阻害によって、興奮性シナプス伝達がMCTによって供給されるエネルギーに依存する事実を見出した。さらに、その普遍的役割を検証するため、強いMCT発現を示す小脳、孤束核、海馬および扁桃体でその影響を評価した。

## 研究成果

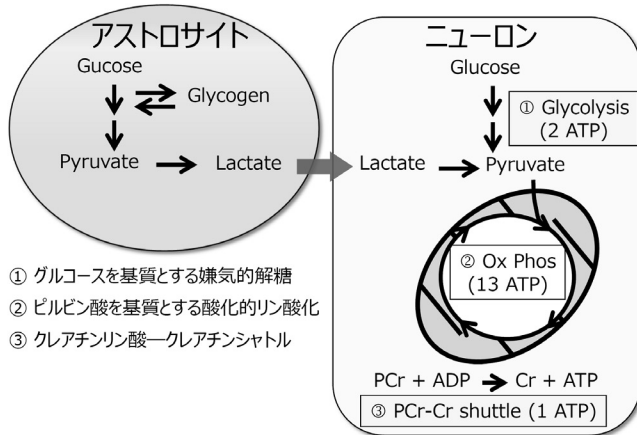
### (1) 孤束核興奮性シナプス伝達維持におけるMCTの役割

虚血・低酸素抵抗性が高く、MCTの存在が示されている延髄の孤束核に着目し、急性脳スライス標本を用いて、どのような状態のどのような神経活動の維持にMCTを介したエネルギー供給が必要とされるか検討した。孤束核はさまざまな自律機能制御において内臓情報の統合に与る神経核であり、血圧や血中酸素濃度、グルコース濃度、内臓活動状態などの情報を常にモニターしている。摂食抑制によるMCT2発現誘導、第4脳室へのMCT阻害薬微量投与による高血糖、および、ラクテート微量投与による低血糖、孤束核 glucose-sensing ニューロンのラクテート応答 など、MCTによるラクテート輸送系が重要な役割を担っていることが示されている神経核である。

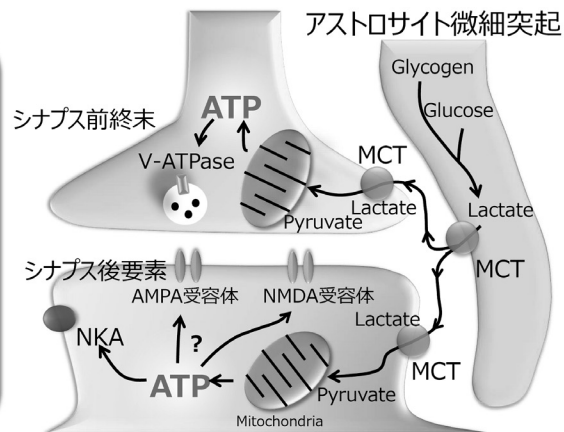
孤束核を含むラット脳幹急性スライス標本を作製し、孤束一次求心線維刺激によって誘発される興奮性シナプス後電流 (EPSC) を記録し、その振幅に及ぼす細胞外グルコース除去の影響を評価した。細胞外グルコースを除去すると、はじめの5分間はほとんど変化が見られず、その後急激に振幅が小さくなり15分後にはほとんど完全に抑制された。この時、グルコース除去と同時に細胞外にラクテートを投与すると、振幅減少は緩徐になり、15分後も振幅が半分程度維持された。また、 $\gamma$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (4-CIN; MCT阻害薬) 存在下にグルコースを除去すると、最初の5分間のグルコース除去応答の潜伏期間が消失するとともに、速やかにシナプス伝達が消失した。この実験成績は、グルコース非存在下にも細胞外にラクテートが存在すればある程度シナプス伝達が維持されること、この効果がMCTによるラクテート輸送に依存していること、そしてさらに、グルコース除去後の最初の5分間は、MCTを介したおそらくはアストロサイトのグリコーゲンに由来したラクテート供給によってシナプス伝達が維持されていることを示している。

## シナプス伝達維持におけるアストロサイト・ニューロン間エネルギー共生機構の解明 (代表：加藤総夫)

アストロサイト・ニューロン共生によるエネルギー産生の概略



MCTによるラクテート輸送を介した興奮性シナプス伝達の維持





## (2) シナプス伝達と細胞興奮性維持におけるMCTの役割の同定

MCTを介したラクテート輸送の普遍的役割を検証するため、孤束核同様に高いMCT発現を示す小脳、海馬および扁桃体でその阻害の影響を検討した。これらいずれの部位においても4-CINもしくはD-lactateはEPSC振幅を50%以上抑制した。特に、小脳（平行線維-プルキンエ細胞シナプス）および海馬（Schaffer側枝-錐体細胞シナプス）においてその効果は顕著であった。また、細胞内液にQX-314を含めない条件下で記録した扁桃体外側核ニューロンおよび小脳プルキンエ細胞では、4-CINは著明な外向き電流もしくは過分極を生じさせ、これは、ATP依存性K（KATP）チャネルの阻害薬によって消失した。脳部位によっては、MCTが興奮性シナプス近傍でのATP産生のみならず、細胞のATP濃度の下流としてKATPチャネルを介した興奮性そのものの制御にも関与している可能性が示された。この機構はアストロサイトからのエネルギー供給減少を細胞興奮性の低下に変換する分子機構と想定される。

### 結語

本研究成果は、神経間のシナプス伝達や細胞興奮性の維持においてニューロン・グリア共生 symbiosis が重要な役割を担うことを示している。生物学的にも重要な発見である。共生 symbiosis とは「複数種の生物が相互関係を持ちつつ同所的に生活している状態」である。この概念を発展させた真核生物とミトコンドリアや葉緑体の関係も共生と呼ばれる。このような意味において、上述したアストロサイトとニューロン間の関係は、異種細胞間共生のひとつの例ととらえることができる。大部分がシナプス伝達維持に消費されるニューロンの多量のATPを、異種細胞であるアストロサイトのグリコーゲン解糖とラクテート輸送で補う、という関係を、脳の高次機能を遂行していくために進化的に獲得された細胞間共生としてとらえることによって、その脳内環境維持における意義の理解が進むとともに、その破綻・障害によって発症・増悪する病態の理解とそれに対する新規の対処法の開発にもつながるだろう。

### 主要研究成果

#### 原著論文

1. Nagase M, Takahashi Y, Watabe AM, Kubo Y, Kato F. On-site energy supply at synapses through monocarboxylate transporters maintains excitatory synaptic transmission. *J Neurosci*. 34:2605-17 (2014).

### 総説

1. 永瀬将志, \*加藤総夫 (2014). シナプス伝達維持におけるアストロサイト・ニューロン間エネルギー共生. *遺伝子医学 MOOK*26号: 163-8.
2. 永瀬将志, \*加藤総夫 (2014). 興奮性シナプス伝達のエネルギーはどのように供給されているか? *Clinical Neuroscience* 32巻: 1310-1.



# 脳内環境破綻時の $\text{Na}_x$ チャンネルの生理機能の解明

(平成24年度～平成27年度)

公募

檜山 武史

基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部門・助教



## 研究の背景と目的

ナトリウム ( $\text{Na}$ ) チャンネル  $\text{Na}_x$  は、血液脳関門の無い脳部位である脳室周囲器官のグリア細胞 (アストロサイト及び上衣細胞) に発現しており、脳内  $\text{Na}$  レベルセンサーとして血液や脳脊髄液の水/ $\text{Na}$  バランスの破綻を感知して、塩分摂取行動の調節に関与する。しかし、その他の部位に発現する  $\text{Na}_x$  の生理的役割については、明らかになっていなかった。さらに近年、 $\text{Na}_x$  の発現が神経損傷部位において大きく変動することも報告され、 $\text{Na}_x$  の未知の生理機能の解明がまたれていた。本研究は、脳内環境破綻時の  $\text{Na}_x$  の生理的役割に着目し、その解明を目的として実施した。

## 研究成果

(1)  $\text{Na}_x$  の新たな調節機構の解明:  $\text{Na}_x$  は  $\text{Na}$  濃度依存的に開口するが、その閾値を *in vitro* で測定する限り、平常時の血液や脳脊髄液の  $\text{Na}$  濃度では閉じており、極度の脱水などで  $\text{Na}$  濃度が高まった時にのみ活性化すると推測されていた。しかし、本研究において、その閾値がエンドセリンによって調節され、生体では  $\text{Na}$  濃度の生理的な変動域を感知していることを見出した (Hiyama et al., Cell Metab, 2013)。さらに、一定濃度以上のエンドセリン (1 nM) が存在する状態になれば、エンドセリン単独でも  $\text{Na}_x$  を開口させることが明らかになった。

(2) 末梢神経切断後の再伸長における  $\text{Na}_x$  の役割の解明: 末梢神経では非ミエリン化シュワン細胞に  $\text{Na}_x$  が発現しており、軸索切断後の再伸長に  $\text{Na}_x$  が寄与していることが明らかになった (Unezaki et al., Eur J Neurosci, 2014)。薬理的な解析から、切断部位でエンドセリン濃度が高まり、 $\text{Na}_x$  が活性化することでシュワン細胞から放出された乳酸が、軸索伸長を促進していることがわかった。

(3) ニューロンにおける  $\text{Na}_x$  と細胞膜における安定化機構:  $\text{Na}_x$  が大脳皮質及び扁桃体基底外側部の一部のニューロンに発現していることが明らかになった (Matsumoto et al., PLoS

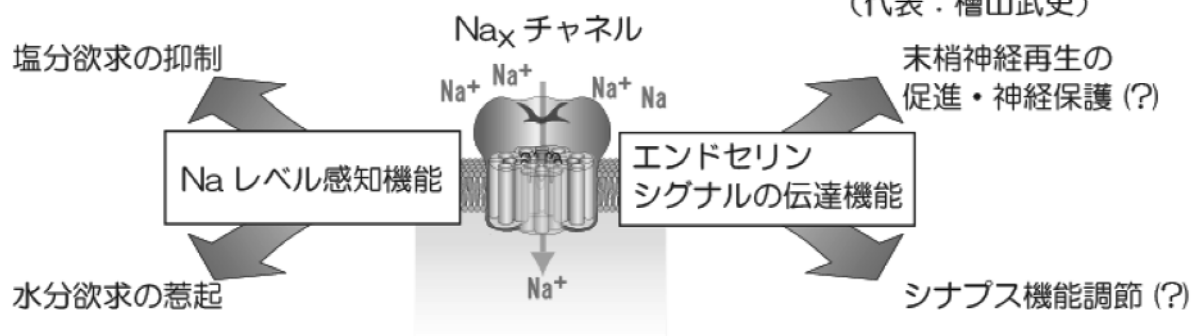
One, 2015)。 $\text{Na}_x$  の C 末領域には PDZ 結合モチーフがあり、アストロサイトでは、SAP97 と PDZ 配列を介して結合していたが (Matsumoto et al., FEBS Lett, 2012)、ニューロンでは PSD95 と結合し、シナプス後部に存在していた。さらに、ニューロンに発現している  $\text{Na}_x$  も、グリア細胞と同様の  $\text{Na}$  感受性を示すこと、 $\text{Na}_x$  のイオン選択性は  $\text{Na}^+ \sim \text{Li}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+$  であることも明らかになった。

(4) 本態性高  $\text{Na}$  血症をもたらす自己免疫疾患群の解明: 我々は、これまでに、 $\text{Na}_x$  に対する自己抗体が産生され、高  $\text{Na}$  血症を発症したとみられる症例を報告していた。その後、同様の症状を示す他の症例を解析したところ、その多くにおいて  $\text{Na}_x$  に対する自己抗体は産生されていないものの、 $\text{Na}_x$  の発現部位の一つである脳弓下器官を特異的に認識する自己抗体が産生されていることを見出した (Hiyama et al., Brain Pathol, 2016)。これらの症例では、浸透圧上昇に対するバソプレッシン分泌応答が失われていたが、MRI 検査では、視床下部や下垂体に組織異常がみられなかった。脳弓下器官は、口渇感や塩分欲求調節の中核である (後述) と同時に、視床下部のバソプレッシン産生部位に神経連絡を有する。このことから、自己抗体の結合による脳弓下器官の炎症が、口渇感や塩分欲求の調節とバソプレッシン分泌制御の異常をもたらす、本態性高  $\text{Na}$  血症を発症したと考えられる新たな疾患群として報告した。

(5) 血液・脳脊髄液の水/ $\text{Na}$  バランスの破綻を感知する機構と口渇感や塩分欲求制御メカニズムの解明: 脱水状態では、血液・脳脊髄液の  $\text{Na}$  レベルの上昇によって脳弓下器官の  $\text{Na}_x$  が活性化し、抑制性神経の活動が高まる。最近、そのシグナルが塩分欲求を抑える脳内機構の解明に成功した (Matsuda et al., Nat Neurosci, 2016)。脳弓下器官には水欲求 (口渇感) と塩分欲求を担うニューロンが存在していた (以下、水ニューロン、塩ニューロンと呼ぶ)。水ニューロンも塩ニューロンもアンジオテンシン II によって活性化する性質があり、水ニューロンは終板脈管器官に、塩ニューロンは腹側分界条床核に神経突

## 脳内環境破綻時の $\text{Na}_x$ チャンネルの生理機能の解明

(代表: 檜山武史)



起を伸ばし、神経結合を作っていた。ただし、このままでは、アンジオテンシンIIが上昇する状態では、常に水と塩を並行して摂取することになる。しかし、それぞれのニューロンは、体液状態に応じた制御を受けていることも明らかになった。塩欠乏状態では、体液のアンジオテンシンII濃度が高まるが、同時にペプチドの一種、コレシストキニンの分泌が高まり、水ニューロンの活動が抑えられていた。その結果、口渇感は抑えられ、主に塩欲求が生じることがわかった。一方、脱水状態でも体液のアンジオテンシンII濃度が高まるが、水分が不足し体液塩濃度が高まることにより、Na<sub>x</sub>が活性化し、塩ニューロンの活動が抑制されていた。その結果、塩分欲求は抑えられ、主に口渇感が生じることがわかった。

口渇感の制御については、複数の調節機構が存在するものと推定される。他のグループからは、TRPV1とTRPV4が口渇感の誘発に関わる脳内浸透圧センサー分子として提唱されていた。ところが、その後の別のグループの実験では、結果が再現されず、長らく議論が続いてきた。最近になって、我々は、マウス脳室内に微量の高張液を直接投与し、その際に誘発される飲水行動を観察する手法を確立し、Na<sub>x</sub>とTRPV4が協働する新たな口渇感制御機構を明らかにした (Sakuta et al., *Am J Physiol*, 2016)。

## 結語

本研究では、NaチャンネルNa<sub>x</sub>による脳内環境破綻の感知と、その回復過程における生理的役割を中心に解析を行い、神経損傷における回復、水/Naバランス破綻時における行動制御について解明した。また、自己抗体産生による脳内局所領域の炎症が、体液バランスの破綻をもたらすことも明らかにした。

## 主要研究成果

### 原著論文

1. Matsuda T, Hiyama TY, Niimura F, Matsusaka T, Fukamizu A, Kobayashi K, Kobayashi K, Noda M. Distinct neural mechanisms for the control of thirst and salt appetite in the subfornical organ. **Nat Neurosci**. (2016) Dec. 19 (*Epub ahead of print*).
2. Hiyama TY, Utsunomiya AN, Matsumoto M, Fujikawa A, Lin CH, Hara K, Kagawa R, Okada S, Kobayashi M, Ishikawa M, Anzo M, Cho H, Takayasu S, Nigawara T, Daimon M, Sato T, Terui K, Ito E, Noda M. Adipsic Hypernatremia without Hypothalamic Lesions Accompanied by Autoantibodies to Subfornical Organ. **Brain Pathol**. (2016) Jun. 24 (*Epub ahead of print*).
3. Sakuta H, Nishihara E, Hiyama TY, Lin CH, Noda M. Na<sub>x</sub> signaling evoked by an increase in [Na<sup>+</sup>] in CSF induces water intake via EET-mediated TRPV4 activation. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 311: R299-R306, (2016).
4. Doura T, Kamiya M, Obata F, Yamaguchi Y, Hiyama TY, Matsuda T, Fukamizu A, Noda M, Miura M, Urano Y. Detection of LacZ-Positive Cells in Living Tissue with Single-Cell Resolution. **Angew Chem Int Ed Engl** 55:9620-9624, (2016).
5. Matsumoto M, Hiyama TY, Kuboyama K, Suzuki R, Fujikawa A, Noda M. Channel properties of Na<sub>x</sub> expressed in neurons. **PLoS One** 10: e0126109, (2015).
6. Unezaki S, Katano T, Hiyama TY, Tu NH, Yoshii S, Noda M, Ito S. Involvement of Na<sub>x</sub> sodium channel in peripheral nerve regeneration via lactate signaling. **Eur J Neurosci** 39: 720-729, (2014).
7. Hiyama TY, Yoshida M, Matsumoto M, Suzuki R, Matsuda T, Watanabe E, Noda M. Endothelin-3 expression in the subfornical organ enhances the sensitivity

of Na<sub>x</sub>, the brain sodium-level sensor, to suppress salt intake. **Cell Metab** 17: 507-519, (2013).

8. Matsumoto M, Fujikawa A, Suzuki R, Shimizu H, Kuboyama K, Hiyama TY, Hall RA, Noda M. SAP97 promotes the stability of Na<sub>x</sub> channels at the plasma membrane. **FEBS Lett** 586: 3805-3812, 2012.

## 総説

1. Hiyama TY, Noda M. Sodium sensing in the subfornical organ and body-fluid homeostasis. **Neurosci Res** 113: 1-11, (2016).
2. Noda M, Hiyama TY. Sodium sensing in the brain. **Pflugers Arch** 467: 465-474, (2015).
3. Noda M, Hiyama TY. The Na<sub>x</sub> Channel: What it is and what it does. **Neuroscientist** 21: 399-412, (2015).



# グリア細胞操作を起点とする 神経活動変化と伝播様式解析

(平成24年度～平成25年度)

公募

田中 謙二

慶應義塾大学・医学部・准教授



## 研究の背景と目的

グリア神経相互作用はグリアから神経へと神経からグリアへの2つの作用が複雑に絡み合うため、いずれかを抽出して解析することが困難であった。さらに事態を複雑にするのは、グリア細胞の操作および観察のために何らかの処置を施す際に脳実質に外傷を与えてしまうと、グリア細胞が瞬時に活性化してしまうことにある。グリアの活性化がグリア神経相互作用に交絡し、正常脳で行われているであろう相互作用を見誤らせる。

この困難を克服するために、脳実質に外傷を与えることなくアストロサイトの活動を变化させる実験系を構築すること、脳実質の外傷を与えることなく、脳の活動を抽出する実験系を構築することを技術開発の目的とした。次に、これらの非侵襲的なアストロサイトの操作と脳活動の観察から、アストロサイトの活動変化が、脳の広い領域に対してどのように伝播するのか、その伝播様式を明らかにすることを研究の目的とした。

## 研究成果

### (1) 脳実質に外傷を与えることなくアストロサイトに摂動を加える実験系の構築

グリア細胞（アストロサイト）選択的な摂動は、光遺伝学的手法を用いた。まず、アストロサイト特異的にチャンネルロドプシン（ChR2）を発現させるマウスを作成した。アストロサイ

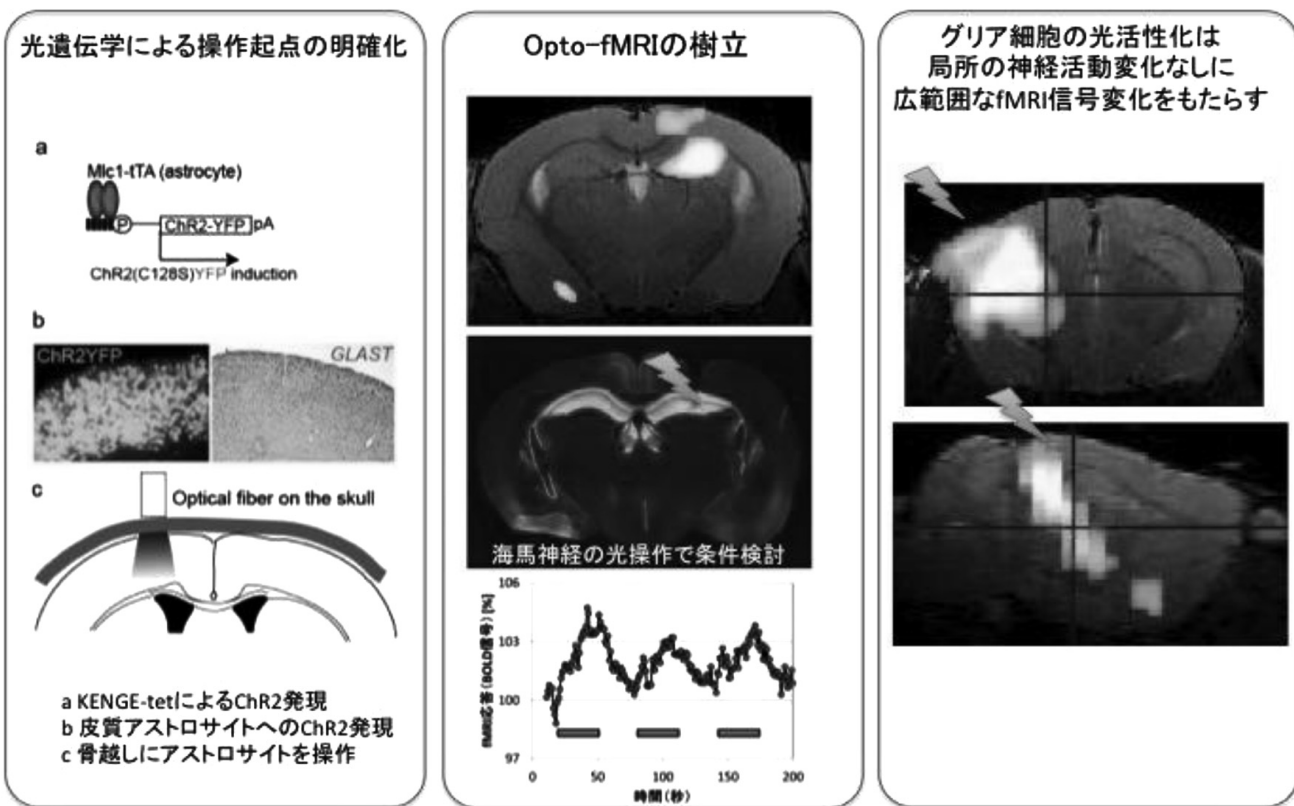
ト特異的遺伝子Mlc1のプロモーターを利用し、テトラサイクリントランスアクチベーター（tTA）を発現するMlc1-tTAマウスと、b-actin遺伝子座にtetO-ChR2(C128S変異体)をノックインしたKENGE-tetO-ChR2マウスを交配し、ダブルトランスジェニックマウスを作成した（文献1）。このマウスでは、アストロサイト特異的に光感受性の高いチャンネルロドプシンC128S変異体を十分量発現させることが出来た。光感受性が高いため、頭蓋骨越しに光で皮質アストロサイトを活性化できることが確認された。つまり脳実質に外傷を加えることなくアストロサイトに摂動を加えることが可能になった。

最近の松井らの研究によって（文献2,3）、チャンネルロドプシンの開口時間に比例してグルタミン酸の放出とK<sup>+</sup>イオンの放出がおこることが分かったので、光照射時間を調節して皮質アストロサイトに摂動を加えた。5秒間の青色光照射によって、マウスが身をよじることが再現良く観察された。0.5秒間の照射では外見上変化は見られなかった。前者の場合、一過性の過興奮と引き続き spreading depression が再現良く観察された。後者の場合、特段の神経活動変化は観察されなかった。

### (2) 脳実質に外傷を与えることなく脳活動の変化を抽出する実験系の構築

皮質アストロサイトの摂動が、脳の活動をどのように変化さ

## グリア細胞操作を起点とする神経活動変化と伝播様式解析



せるか知ることを目的として、opto-fMRIを構築した(文献4, 5)。7テスラ高磁場のMRスキャナーにクライオプローブを搭載した、信号ノイズの低い機器を使用した。覚醒下でMRI撮像するための脳固定方法の開発、拘束ストレスを軽減させて撮影中に体動を抑制させるための馴化方法の開発、光ファイバーの設置方法の開発を行い、opto-fMRIを樹立した。Opto-fMRIの最適化では、海馬CA1錐体細胞にChR2を発現させるマウスを用いて行った。

### (3) アストロサイトを起点とする活動の伝播様式の解析

アストロサイトにChR2(C128S)を発現するマウスを用いて、大脳皮質を頭蓋骨越しに光照射し、その前後の全脳活動をMRIスキャナーで計測した。5秒間の照射では、マウスの体動が大きくスキャナーを破損する可能性が高いため行わなかった。0.5秒間の頭蓋骨越しの光照射によって、照射直下の大脳皮質にfMRI信号の大きな変化を引き起こすことがわかった。更に、照射直下にfMRI信号がとどまらず、信号が広く接続方向、垂直方向に広がるのが可視化出来た。この信号の広がり、既存の神経軸索走行では説明のつかないパターンであった。

### 結語

グリア神経相互作用を解析するために、グリア細胞から一方向性の作用を光遺伝学によって模倣した。その作用応答をfMRIによって全脳レベルで解析した。いずれも外傷を与えることなく、外傷による効果の混入なしに遂行できた。

アストロサイト光刺激によって神経活動の変化を伴わずにfMRI信号を生じることが出来ること、おそらくアストロサイトの活動変化が血流動態を変化させてfMRI信号を広範囲に変化させていることの2点が明らかになった。アストロサイトへの照射強度を変化させることで、神経活動の変化を随伴させることも可能なので、アストロサイト、血管、神経の3者の相互作用の時空間ダイナミクスを検証することが可能になった。

## 主要研究成果

### 原著論文

1. Tanaka KF, Matsui K, Sasaki T, Sano H, Sugio S, Fan K, Hen R, Nakai J, Yanagawa Y, Hasuwa H, Okabe M, Deisseroth K, Ikenaka K, Yamanaka A. Expanding the repertoire of optogenetically targeted cells with an enhanced gene expression system. *Cell Rep* 2 (2):397-406, 2012
2. Sasaki T, Beppu K, Tanaka KF, Fukazawa Y, Shigemoto R, Matsui K. Application of an optogenetic byway for perturbing neuronal activity via glial photostimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109(50):20720-20725, 2012
3. Beppu K, Sasaki T, Tanaka KF, Yamanaka A, Fukazawa Y, Shigemoto R, Matsui K. Optogenetic countering of glial acidosis suppresses glial glutamate release and ischemic brain damage. *Neuron*. 81(2):314-320, 2014
4. Takata N, Yoshida K, Komaki Y, Xu M, Sakai Y, Hikishima K, Mimura M, Okano H, Tanaka KF. Optogenetic activation of CA1 pyramidal neurons at the dorsal and ventral hippocampus evokes distinct brain-wide responses revealed by mouse fMRI. *PLoS One*. 10:e0121417, 2015
5. Yoshida K, Mimura Y, Ishihara R, Nishida H, Komaki Y, Minakuchi T, Tsurugizawa T, Mimura M, Okano H, Tanaka KF, Takata N. Physiological effects of a habituation procedure for functional MRI in awake mice using a cryogenic radiofrequency probe. *J Neurosci Methods*. 274:38-48, 2016

## 総説

1. Natsubori A, Takata N, Tanaka KF (3/3). Observation and manipulation of glial cell function by virtue of sufficient probe expression. *Front Cell Neurosci*. 9:176, 2015



公募

# 海馬グリア細胞の環境応答機構の 解明

(平成24年度～平成25年度)

桑原 知子

国立研究開発法人産業技術総合研究所 (AIST) 創薬基盤研究部門  
主任研究員(兼)国立研究開発法人 筑波大学グローバル教育院 (協  
同大学院) 准教授



## 研究の背景と目的

申請者らの研究で明らかにしてきた海馬グリア細胞の応答機構で、Wnt3タンパク質を1起点として起きる事神経新生現象は、幹細胞での標的遺伝子の転写活性化、阻害因子の役割、標的遺伝子の海馬の神経新生での役割や神経細胞の多様性獲得機構にまで繋がるものである。海馬の神経機能の恒常性維持機構とその破綻を考える上で、焦点とする因子群や基礎となる分子機構に新たな視点を提供できるのではないかと考え、糖尿病など疾患下での神経細胞の機能低下の原因を、Wnt3を中心とする海馬グリア細胞の応答機構から明らかにすることができれば、創薬や医療への貢献も期待できるのではないかと考え、本研究を行った。

## 4) 研究成果

海馬のグリア細胞は、神経細胞の機能維持や神経活動のサポートだけでなく、未分化の成体神経幹細胞からの神経新生を支える重要な機能を持っている。成体脳内の海馬や嗅球では、生涯にわたり新しい神経細胞が神経幹細胞から日々産み出されているが、その頻度は年齢とともに減少し、ス

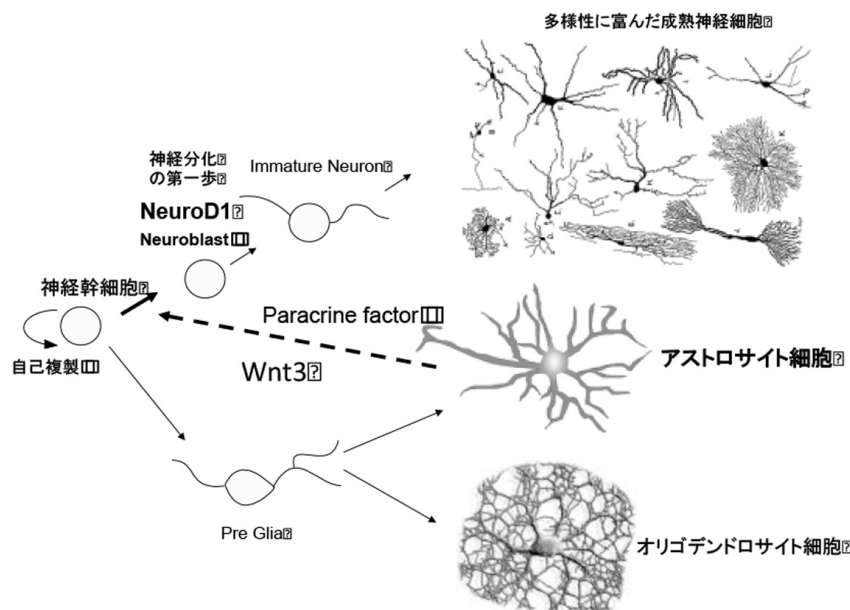
トレスや疾患など個人が置かれた環境によって変化する。これは、脳内の神経新生現象が、外的刺激によって容易に変化し得る分子メカニズムで調節されていることを示唆している。この成体脳内の神経新生を制御する中心となる分子メカニズムの一つがWntシグナル伝達系である。

このWntシグナルの標的となる遺伝子群の一つがNeuroD1と呼ばれる遺伝子である。NeuroD1を欠損すると成体脳内では神経新生が生じないことが実験的に確認されており、NeuroD1遺伝子は神経新生にとって必須な遺伝子であることを示している。成体神経幹細胞から神経細胞への分化を開始・促進するWnt3の制御機能は、主としてNeuroD1等の神経分

化を牽引する遺伝子の転写活性化を導くことによる。未分化の成体神経幹細胞では、外部からのWntタンパク質のシグナル伝達の入力のOn/Offにより、神経分化を開始する遺伝子群の転写のOn/Offが調節されていることになる。このWnt3/Wnt3a自体の発現を左右するのは何があるかについてさらに調べると、興味深いことが明らかになった。海馬の幹細胞ニッチとして機能するグリア細胞による制御機構の外的刺激への応答メカニズムが加齢や飼育環境、疾患などによって多様に変化したのである。うつ病や糖尿病などの疾患下でのグリア細胞機能との関わりについてさらに詳細に解析した。Wnt3因子に焦点を当て、その産生能、さらに産生されたWnt3因子への神経幹細胞の応答分子機構の変容を解析し、糖尿病など早期診断に有用なマーカー遺伝子などや糖尿病の疾患過程での挙動変化、機能的役割、疾患予防への取り組みに役立つ因子の探索、運動効果の影響などを発見した。これらの成果をまとめて多くの論文発表を行った他、特許出願も行った。

## 5) 結語

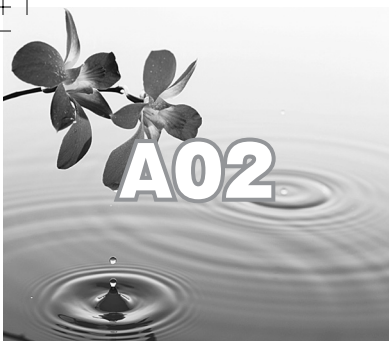
脳内で神経新生が起きる際、海馬の神経回路の形成と機能を調節する遺伝子の活性化が、細胞外シグナルを受け取る神経細胞によって、また、疾病状態と正常な状態によって、一様ではないことを初めて明らかにした。さらに、疾病状態と正常な状態における神経細胞の機能を調節する遺伝子の活性化の相異が、海馬ニューロンにおいても、嗅球においても、同様に観察することができることを見出した。特に、糖尿病疾患に伴うインスリンの動態変化に関する新規機序の研究成果などについて、学術論文や特許にまとめ、発表した。Wnt3の効力を左右する個体への「外部刺激」に、新しい神経細胞のネットワーク形成を上昇するもの(ex. 運動、豊かな環境など)もあれば、減少させるもの(ex. ストレス、疾患、老化など)もあることは、あ



る意味において神経新生が可逆的な応答機能を潜在的に含有していることの証明であり、数多くの遺伝子群の発現様式がWnt3を軸として多様に变化する機構で支えられていることが判ってきたことは、将来的な創薬や再生医療の有力な切り口となると考えられる。

## 主要研究成果 論文、総説リスト

1. Fujimaki S, Wakabayashi T, Asashima M, Takemasa T and Kuwabara T\*. Treadmill running induces satellite cell activation in diabetic mice. (2016) *BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS REPORTS*, 8, 6-13. (査読あり、\*責任著者)
2. Wakabayashi T, Hidaka R, Fujimaki S, Asashima M, Kuwabara T\*. Diabetes Impairs Wnt3-Induced Neurogenesis in Olfactory Bulbs via glutamate transporter 1 inhibition. *J Biol Chem*, 2016, 289 (11):7399-7412. (査読あり)
3. Fujimaki S, Masanao M, Wakabayashi T, Asashima M, Takemasa T and Kuwabara T\*. Functional Overload Enhances Satellite Cell Properties in Skeletal Muscle. *Stem Cells Int.*, 2015, 1-11 (査読あり)
4. Fujimaki S, Wakabayashi T, Takemasa T, Asashima M, Kuwabara T\*. The regulation of stem cell aging by Wnt signaling. *Histol Histopathol.* 2015 (査読あり)
5. Fujimaki S, Wakabayashi T, Takemasa T, Asashima M, Kuwabara T\*. Diabetes and Stem Cell Function. (2015) *Biomed Res Int.* 2015: 1-16. (査読あり)
6. Fujimaki S, Hidaka R, Asashima M, Takemasa T and Kuwabara T\* Wnt protein-mediated satellite cell conversion in adult and aged mice following voluntary wheel running. (2014) *J Biol Chem*, 289(11):7399-7412. (査読あり)
7. Wakabayashi T, Hidaka R, Fujimaki S, Asashima M and Kuwabara T\* (2014) MicroRNAs and the epigenetics in adult neurogenesis. *Adv Genet.*, 86, 27-44 (査読あり)
8. Fujimaki S, Takemasa T, Kuwabara T\*. Transdisciplinary Approach for Sarcopenia. The effects of exercise on skeletal muscle hypertrophy and satellite cells. *Clin Calcium.* 2014 Oct;24(10):1463-1470. (査読あり)
9. Hidaka R, Machida M, Terashima K, Fujimaki S, Asashima M. Kuwabara T\* (2013) Monitoring neurodegeneration in diabetes using adult neural stem cells derived from the olfactory bulb. *Stem Cell Res Ther.*, 4, 51 (査読あり)
10. Fujimaki S, Masanao M, Hidaka R, Takemasa T, Asashima M and Kuwabara T\* Intrinsic ability of adult stem cell in skeletal muscle: an effective and replenishable resource to establishment of pluripotent stem cells. *Stem Cells Int.*, 2013, 1-18 (査読あり)
11. Kuwabara T and Asashima M (2012) Regenerative medicine using adult neural stem cells: Potentials for diabetes therapy and other pharmaceutical applications. *J. Mol. Cell Biol.*, 4, 133-139. (査読あり)
12. Kuwabara T\* and Asashima M (2012) Olfactory bulb-derived neural stem cells of diabetes therapy. *Aroma Research*, 13, 31-35. (invited issues、査読あり)
13. Machida M, Asashima M. Kuwabara T\* (2012) The Insulin Regulatory Network in Adult Hippocampus and Pancreatic endocrine system. *Stem Cells Int.* vol. 2012, 1-8. (査読あり)
14. Kuwabara T and Asashima M (2012) Prospects for regeneration therapy with stem cells. *Inflammation and Regeneration*, 32, 438-445.
15. Kuwabara T\* (2012) Environmental activation of retroelements during adult neurogenesis. *Environment and Epigenetics*.
16. Antoszcyk S, Terashima K, Warashina M, Asashima M, Kuwabara T\* (2012) Active expression of retroelements in neurons differentiated from adult hippocampal neural stem cells. *Neural Stem Cells and Therapy*, 11, 223-238. 査読あり
17. 町田 正直, 浅島 誠, 桑原 知子 (2012) 嗅球由来の神経幹細胞の脾臓への移植による糖尿病改善治療. *内分泌・糖尿病・代謝内科*, 35(2)107-112.
18. 特願2013-060512「海馬または嗅球由来の成体神経幹細胞を用いた神経・精神疾患および糖尿病のモニタリング方法」桑原 知子, 浅島 誠



## 脳内温度・浸透圧の感知メカニズムと その破綻 (TRPV4, TRPM2チャンネルを 介した脳内環境センシング) (平成24年度～平成27年度)

公募

富永 真琴 岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授



### 研究の背景と目的

脳内の細胞(神経細胞・上皮細胞・グリア細胞)は、それを取り巻く環境の変化の中で、その環境情報を他のシグナルに変換して環境変化にダイナミックに対応している。TRPチャンネルの多くはカルシウム透過性の高い非選択性陽イオンチャンネルを形成している。TRPイオンチャンネルスーパーファミリーは7つのサブファミリー: TRPC, TRPM, TRPV, TRPML, TRPP, TRPA, TRPNに分けられるが、哺乳類では27のチャンネルが6つのサブファミリーを構成している。カルシウム透過性が高いためにチャンネル開口によるカルシウム流入が細胞内の様々なカルシウム依存性経路を活性化し、神経細胞においては脱分極から細胞興奮をもたらす。感覚神経では侵害刺激を電気信号に変換するための脱分極に必要な陽イオンの流入を司る陽イオン透過性のイオンチャンネルの中心的分子群の1つがTRPイオンチャンネルである。そして、11のTRPチャンネル(TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM2, TRPM3, TRPM4, TRPM5, TRPM8, TRPA1, TRPC5)に温度感受性があることが報告されている。神経細胞・上皮細胞・グリア細胞に発現する温度感受性TRPチャンネルが脳内環境情報を感知して脳内の恒常性維持に関与し、その異常が脳機能異常を招来する、という仮説を検証することを目的とする。

### 研究成果

(1) **TRPM2によるレドックセンシング**: マクロファージにTRPM2が強く発現し、温度依存的に活性化して細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇を介して、サイトカイン産生・放出、食欲の増強をもたらすことも明らかにした。また、このTRPM2機能の過酸化水素による感作がメチオニンの酸化を介して起こることも判明した。TRPM2の活性化温度閾値は感作によって体温レベルに低下することから、TRPM2の活性化は末梢の炎症部位だけでなく、脳内温度環境下でも起こりうる(PNAS, 2012)。

(2) **脈絡膜上皮細胞TRPV4による脳内温度・浸透圧感知**: 体温下においてマウス脳脈絡膜上皮細胞のアピカル膜で恐らく血管側からの水流入による細胞膨張を感知して活性化した

TRPV4を介して流入したカルシウムがTRPV4に結合したカルシウム活性化クロライドチャンネルのanoctamin1(ANO1)を活性化させることが明らかとなった。脳脈絡膜上皮細胞は細胞内クロライド濃度が高いので、ANO1の活性化はクロライドを流出させ、それが駆動力となって水が流出すると考えられる(FASEB J, 2014)。

(3) **TRPV1とCa<sup>2+</sup>活性化Cl<sup>-</sup>チャンネルanoctamin1の機能連関**: マウス感覚神経細胞でTRPV1とanoctamin 1(ANO1)が共発現し、TRPV1を介して流入したカルシウムによってanoctamin 1が活性化することが明らかになった。カプサイシンによって惹起される内向き電流のうちおよそ半分はクロライドの流出によってもたらされることがわかった。この機能連関は物理的結合によって起こることも明らかになった。また、マウス感覚神経においてカプサイシンによって起こる活動電位の発生およびカプサイシンによる痛み関連行動がANO1阻害薬で有意に抑制された。TRPV1, ANO1機能連関が疼痛薬開発の新たなターゲットになる可能性が示唆された(PNAS, 2015)。

(4) **ミクログリアの温度依存性運動**: マウス脳から単離したミクログリアの運動解析システムを確立し、33度、37度、40度での移動距離を比較したところ、高温になるほど大きくなることが分かった。電気生理学的解析、薬理的解析によって、複数の温度感受性TRPチャンネルが関与することが明らかになった(論文準備中)。

### 結語

脳は産熱臓器ではないが、深部体温の変化によって1日に約2度の温度変化をする。また、発熱等に伴って40度近くまで脳温が上昇することがある。さらに、脳は浸透圧をはじめとする様々な細胞外環境変化に曝露される。こうした脳内の環境変化を感知するシステムの一つとして温度感受性TRPチャンネルが機能することが明らかになった。

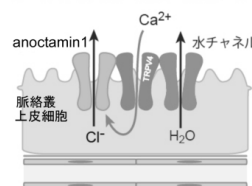
### 脳内温度・浸透圧の感知メカニズムとその破綻

(TRPV4, TRPM2チャンネルを介した脳内環境センシング)(代表: 富永真琴)

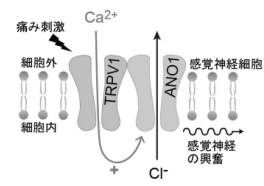
#### 1. TRPM2によるレドックセンシング



#### 2. 脈絡膜上皮細胞TRPV4による脳内温度・浸透圧感知



#### 3. TRPV1とanoctamin1の機能連関



温度感受性TRPチャンネルによる脳内環境感知機構の解明と制御へ



## 主要研究成果

## 原著論文

1. Gupta R, Saito S, Mori Y, Itoh S, Okumura H, Tominaga M. Structural basis of TRPA1 inhibition by HC-030031 utilizing species-specific differences. **Sci Rep** 6: 37460 (2016).
2. Sun W, Uchida K, Takahashi N, Iwata Y, Wakabayashi S, Goto T, Kawada T, Tominaga M. Activation of TRPV2 negatively regulates the differentiation of mouse brown adipocytes. **Pfluger Archiv Eur J Physiol** 468: 1527-1540 (2016).
3. Saito S, Ohkita M, Saito C, Takahashi K, Tominaga M, Ohta T. Evolution of Heat Sensors Drove Shifts in Thermosensation between Xenopus Species Adapted to Different Thermal Niches. **J Biol Chem** 291: 11446-11459 (2016).
4. Sun W, Uchida K, Suzuki Y, Zhou Y, Kim M, Takayama Y, Takahashi N, Goto T, Wakabayashi S, Kawada T, Iwata Y, Tominaga M. Lack of TRPV2 impairs thermogenesis in mouse brown adipose tissue. **EMBO reports** 17: 383-399 (2016).
5. Takaishi M, Uchida K, Suzuki Y, Matsui H, Shimada T, Fujita F, Tominaga M. Reciprocal effects of capsaicin and menthol on thermo-sensation through regulated activities of TRPV1 and TRPM8. **J Physiol Sci** 66: 143-155 (2016).
6. Nishimoto R, Kashio M, Tominaga M. Propofol-induced pain sensation involves multiple mechanisms in sensory neurons. **Pfluger Archiv Eur J Physiol** 467: 20101-2020 (2015).
7. Kashio M, Tominaga M. Redox signal-mediated enhancement of the temperature sensitivity of Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) elevated glucose-induced insulin secretion from pancreatic islets. **J Biol Chem** 290: 12435-12442 (2015).
8. Takayama Y, Uta D, Furue H, Tominaga M. Pain-enhancing mechanism through interaction between TRPV1 and anoctamin 1 in sensory neurons. **Proc Natl Acad Sci USA** 112: 5213-5218 (2015).
9. Kurganov E, Zhou Y, Saito S, Tominaga M. Heat and AITC activate green anole TRPA1 in a membrane-delimited manner. **Pfluger Archiv Eur J Physiol** 466: 1873-1884 (2014).
10. Takayama Y, Shibasaki K, Suzuki Y, Yamanaka A, Tominaga M. Modulation of water efflux through functional interaction between TRPV4 and TMEM16A/noctamin 1. **FASEB J** 28: 2238-2248 (2014).
11. Saito S, Banzawa N, Fukuta N, Saito T.C., Takahashi K, Imagawa T, Ohta T, Tominaga M. Heat and noxious chemical sensor, chicken TRPA1, as a target of bird repellents and identification of its structural determinants by multispecies functional comparison. **Molec Biol Evol** 31: 708-722 (2014).
12. Takaishi M, Uchida K, Fujita F, Tominaga M. Inhibitory effects of monoterpenes on human TRPA1 and the structural basis of their activity. **J Physiol Sci** 64 : 47-57 (2014).
13. Zhou Y, Suzuki Y, Uchida K, Tominaga M. Identification of a splice variant of mouse TRPA1 that regulates TRPA1 activity. **Nat Commun** 4: 2408 (2013).
14. Fujita F, Uchida K, Takaishi M, Sokabe T, Tominaga M.

Ambient temperature affects the temperature threshold for TRPM8 activation through interaction of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. **J Neurosci** 33: 6154-6159 (2013).

15. Saito S, Nakatsuka K, Takahashi K, Fukuta N, Imagawa T, Ohta T, Tominaga M. Analysis of Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) in frogs and lizards illuminates both nociceptive heat and chemical sensitivities and coexpression with TRP Vanilloid 1 (TRPV1) in ancestral vertebrates. **J Biol Chem** 287: 30743-30754 (2012).
16. Kashio M, Sokabe T, Shintaku K, Uematsu T, Fukuta N, Kobayashi N, Mori Y, Tominaga M. Redox signal-mediated sensitization of Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) to temperature affects macrophage functions. **Proc Natl Acad Sci USA** 109: 6745-6750 (2012).

## 総説

1. Saito S, Tominaga M. Functional diversity and evolutionary dynamics of thermoTRP channels. **Cell Calcium** 57: 214-221 (2015).
2. Tominaga M, Tayamaya Y. Interaction between TRP and Ca<sup>2+</sup>-activated chloride channels. **Channels** 56: 332-339 (2014).
3. Uchida K, Tominaga M. The role of TRPM2 in pancreatic  $\beta$ -cells and the development of diabetes. **Cell Calcium** 56: 332-339 (2014).



# シヌクレイノパチーの分子イメージング

(平成24年度～平成25年度)



公募

武田 篤

国立病院機構仙台西多賀病院・院長

## 研究の背景と目的

異常凝集タンパクがプリオンの様に細胞間を伝播し、周辺細胞に病変を拡大させる現象が注目を集めている。 $\alpha$ シヌクレイノパチー患者脳内に蓄積する凝集 $\alpha$ シヌクレイン ( $\alpha$ SYN)の吸収・分泌・分解に関する細胞内小胞輸送経路について、PARK17家族性PD原因遺伝子として同定されたVPS35などに着目し、異常タンパク伝播のメカニズムを分子生物学的に解析することを目的とする。

また $\alpha$ シヌクレイノパチーの代表疾患であるパーキンソン病において、 $[^{11}\text{C}]$  BF-227 PETによる $\alpha$ SYN凝集体の可視化・画像化が可能であるかどうかを検討するとともに、多系統萎縮症患者の $[^{11}\text{C}]$  BF-227集積の経時的変化について検討することによって、 $\alpha$ SYN凝集体のin vivoイメージング技術の確立を目指すことを目的とする。

## 研究成果

**(1) VPS35の $\alpha$ SYN蓄積に関する役割：**家族性パーキンソン病PARK17原因遺伝子として報告されたVPS35はエンドソームからゴルジへの積荷タンパク輸送(レトロマー)の構成因子であるが、同遺伝子のノックダウンによるレトロマー機能破綻がリソソーム中の活性型カテプシンDを減少させ $\alpha$ SYN蓄積を誘導すること、またVPS35サイレンシングが $\alpha$ SYNトランスジェニックフライの複眼変成と運動機能障害を悪化させることを証明した (Miura E, et al., Neurobiol Dis, 2014)。

**(2)  $\alpha$ SYNの吸収・分泌・分解に関する細胞内小胞輸送経路の役割：** $\alpha$ SYN分泌がプリオンの様にエキソソームを介してはならず、Rab11を介するリサイクリング経路が主に関与することを証明した。さらに神経・オリゴデンドログリア細胞への $\alpha$ SYN細胞内取り込みにはダイナミン依存性エンドサイトーシスに関与しており、同過程がセルトランにより抑制可能であることを報告した。また小胞輸送系への $\alpha$ SYNターゲティングにE3リガーゼNedd4-1を介したK63ユビキチ

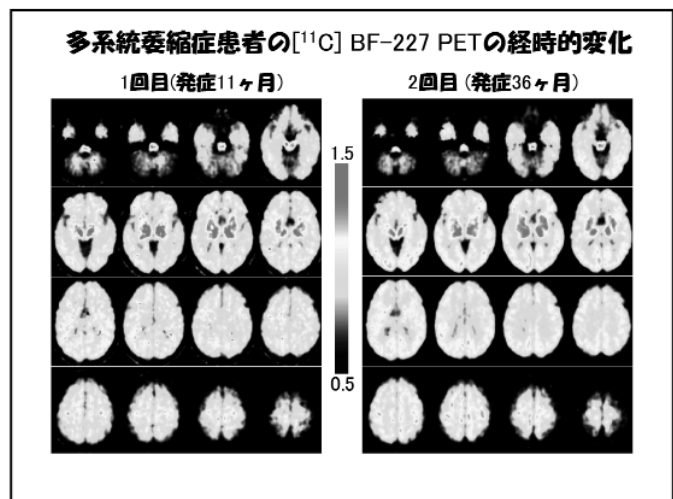
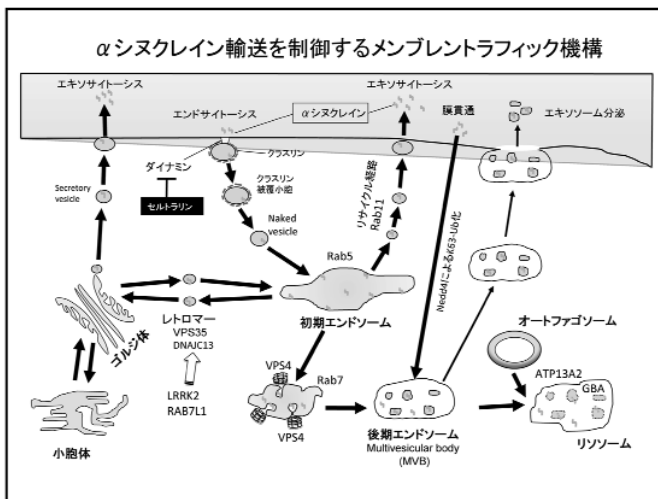
ン化が重要な役割を果たすことを明らかにした (Sugeno N, J Biol Chem, 2014)。

**(3) パーキンソン病における $\alpha$ SYN凝集体の画像化：**パーキンソン病患者17名に $[^{11}\text{C}]$  BF-227 PETを施行し、健常者群と比較したところ、中心前回、補足運動野、帯状回において有意差をもって $[^{11}\text{C}]$  BF-227の集積亢進を認めた。17名のうち8名で平均約2.3年の間隔で2回目のPETを施行したところ、補足運動野で有意差をもって経時的に集積の増加を認めた。1回目で扁桃体などの辺縁系に集積がみられる群において経時的に大脳全体に拡大していくことを確認した。このようにパーキンソン病の $\alpha$ SYN凝集体の画像化が可能であることが示唆された (投稿準備中)。

**(4) 多系統萎縮症における $\alpha$ SYN凝集体の経時的変化：** $\alpha$ SYNは多系統萎縮症にみられるグリア細胞質内封入体の構成成分のひとつでもあるが、以前に多系統萎縮症患者8名に $[^{11}\text{C}]$  BF-227 PETを施行し、健常者群と比較して有意差をもって、大脳白質、被殻、後部帯状回、淡蒼球、一次運動野、前帯状回、黒質で $[^{11}\text{C}]$  BF-227集積亢進を確認し報告した。さらに8名のうち4名に経時的に $[^{11}\text{C}]$  BF-227 PETを評価したところ、被殻や前頭葉白質などで劇的に $\alpha$ SYN凝集体量が変化していることが示唆された (投稿準備中)。 $[^{11}\text{C}]$  BF-227 PETは $\alpha$ SYN凝集体のin vivoの画像化を可能とし、パーキンソン病ならびに多系統萎縮症の病期や治療効果判定に応用できる可能性が示唆された。

## 結語

$\alpha$ SYNのプリオン様伝播についてのメカニズムの解明に迫ることができた。またPETを用いた研究では $\alpha$ シヌクレイノパチーのin vivoの画像化に貢献することができた。今後は $\alpha$ SYNの伝播阻止薬についてin vitroでスクリーニングし、PETを用いて実際に伝播阻止可能であるかを実証していく予定である。



## 主要研究成果

### 原著論文

1. Baba T, Hosokai Y, Nishio Y, Kikuchi A, Hirayama K, Suzuki K, Hasegawa T, Aoki M, Takeda A, Mori E. Longitudinal study of cognitive and cerebral metabolic changes in Parkinson's disease. **J Neurol Sci**, (2016).
2. Kikuchi A, Okamura N, Hasegawa T, Harada R, Watanuki S, Funaki Y, Hiraoka K, Baba T, Sugeno N, Oshima R, Yoshida S, Kobayashi J, Ezura M, Kobayashi M, Tano O, Mugikura S, Iwata R, Ishiki A, Furukawa K, Arai H, Furumoto S, Tashiro M, Yanai K, Kudo Y, Takeda A, Aoki M. *In vivo* visualization of tau deposits in corticobasal syndrome by <sup>18</sup>F-THK5351 PET. **Neurology** 87: 2309-2316, (2016).
3. Oshima R, Hasegawa T, Tamai K, Sugeno N, Yoshida S, Kobayashi J, Kikuchi A, Baba T, Futatsugi A, Sato I, Satoh K, Takeda A, Aoki M, Tanaka N. ESCRT-0 dysfunction compromises autophagic degradation of protein aggregates and facilitates ER stress-mediated neurodegeneration via apoptotic and necroptotic pathways. **Sci Rep** 6: 24997, (2016).
4. Odagiri H, Baba T, Nishio Y, Iizuka O, Matsuda M, Inoue K, Kikuchi A, Hasegawa T, Aoki M, Takeda A, Taki Y, Mori E. On the utility of MIBG SPECT/CT in evaluating cardiac sympathetic dysfunction in Lewy body diseases. **PLoS One** 11: e0152746, (2016).
5. Kawasaki I, Baba T, Takeda A, Mori E. Loss of awareness of hyposmia is associated with mild cognitive impairment in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord** 22:74-79, (2016).
6. Yoshihara A, Fukatsu M, Hoshi K, Ito H, Yamaguchi Y, Ishii R, Tokuda T, Miyajima M, Arai H, Kato T, Furukawa K, Arai H, Kikuchi A, Takeda A, Ugawa Y, Hashimoto Y. Subgroup differences in "brain-type" transferrin and  $\alpha$ -synuclein in Parkinson's disease and multiple system atrophy. **J Biochem** 160: 87-91, (2016).
7. Kikuchi A, Takeda A, Sugeno N, Miura E, Kato K, Hasegawa T, Baba T, Konno M, Oshima R, Watanuki S, Hiraoka K, Tashiro M, Aoki M. Brain metabolic changes of cervical dystonia with spinocerebellar ataxia type 1 after botulinum toxin therapy. **Intern Med** 55: 1919-1922, (2016).
8. Uchiyama M, Nishio Y, Yokoi K, Hosokai Y, Takeda A, Mori E. Pareidolia in Parkinson's disease without dementia: A positron emission tomography study. **Parkinsonism Relat Disord** 21:603-609, (2015).
9. Miura E, Hasegawa T, Konno M, Suzuki M, Sugeno N, Fujikake N, Geisler S, Tabuchi M, Oshima R, Kikuchi A, Baba T, Wada K, Nagai Y, Takeda A, Aoki M. VPS35 dysfunction impairs lysosomal degradation of  $\alpha$ -synuclein and exacerbates neurotoxicity in a Drosophila model of Parkinson's disease. **Neurobiol Dis** 71: 1-13, (2014).
10. Sugeno N, Hasegawa T, Tanaka N, Fukuda M, Wakabayashi K, Oshima R, Konno M, Miura E, Kikuchi A, Baba T, Anan T, Nakao M, Geisler S, Aoki M, Takeda A. K63-linked ubiquitination by E3 Ubiquitin Ligase Nedd4-1 facilitates endosomal sequestration of internalized alpha-synuclein. **J Biol Chem** 289: 18137-18151, (2014).
11. Takeda A, Baba T, Kikuchi A, Hasegawa T, Sugeno N, Konno M, Miura E, Mori E. Olfactory dysfunction and dementia in Parkinson's disease. **J Parkinsons Dis** 4: 181-187, (2014).
12. Shoji Y, Nishio Y, Baba T, Uchiyama M, Yokoi K, Ishioka T, Hosokai Y, Hirayama K, Fukuda H, Aoki M, Hasegawa T, Takeda A, Mori E. Neural substrates of cognitive subtypes in Parkinson's disease: a 3-year longitudinal study. **PLoS One** 9:e110547, (2014).
13. Kashihara K, Kondo T, Mizuno Y, Kikuchi S, Kuno S, Hasegawa K, Hattori N, Mochizuki H, Mori H, Murata M, Nomoto M, Takahashi R, Takeda A, Tsuboi Y, Ugawa Y, Yamanmoto M, Yokochi F, Yoshii F, Stebbins GT, Tilley BC, Luo S, Wang L, LaPelle NR, Goetz CG; MDS-UPDRS Japanese Validation Study Group. Official Japanese Version of the Movement Disorder Society-Unified Parkinson's Disease Rating Scale: validation against the original English version. **Mov Disord Clin Pract** 1:200-212, (2014).
14. Stankovic I, Krismer F, Jesic A, Antonini A, Benke T, Brown RG, Burn DJ, Holton JL, Kaufmann H, Kostic VS, Ling H, Meissner WG, Poewe W, Semnic M, Seppi K, Takeda A, Weintraub D, Wenning GK; ; Movement Disorders Society MSA (MODIMSA) Study Group. Cognitive impairment in multiple system atrophy: a position statement by the Neuropsychology Task Force of the MDS Multiple System Atrophy (MODIMSA) study group. **Mov Disord** 29:857-867, (2014).
15. Kikuchi A, Baba T, Hasegawa T, Kobayashi M, Sugeno N, Konno M, Miura E, Hosokai Y, Ishioka T, Nishio Y, Hirayama K, Suzuki K, Aoki M, Takahashi S, Fukuda H, Itoyama Y, Mori E, Takeda A. Hypometabolism in the supplementary and anterior cingulate cortices is related to dysphagia in Parkinson's disease: a cross-sectional and 3-year longitudinal cohort study. **BMJ Open** 3: e002249, (2013).

### 総説

1. Hasegawa T, Kikuchi A, Takeda A. Pathogenesis of multiple system atrophy. **Neurology and Clinical Neuroscience** 1: 189-194, (2013).



# 脳内環境変化による興奮性シナプス制御の分子イメージング解析

(平成24年度～平成25年度)

公募

林 崇

国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・室長



## 研究の背景と目的

ヒトを含む哺乳類の中枢神経系における主要な興奮性神経伝達物質はグルタミン酸である。興奮性シナプスにおけるイオンチャンネル型グルタミン酸受容体の中で、AMPA型グルタミン酸受容体（AMPA受容体）のシナプス発現数と受容体局在の制御は、シナプス伝達や可塑性等のシナプス機能調節の分子実体である。また、NMDA型グルタミン酸受容体（NMDA受容体）は電位依存的にカルシウムを通す特性を持ち、可塑性の誘導に重要である。本研究では、実験系としてマウス脳と初代培養神経細胞を主に使用し、正常および精神疾患様の変調状態におけるシナプス機能の分子制御機構を解析した。同時に、グルタミン酸受容体の各サブユニットの分子挙動を指標として、全反射蛍光顕微鏡を用いた1分子イメージング法による興奮性シナプスの可視化解析を行ない、各種の精神疾患原因遺伝子のシナプス機能への影響を可視化解析した。これにより、脳内環境の変化に伴う興奮性シナプス制御機構の解明を目指した。

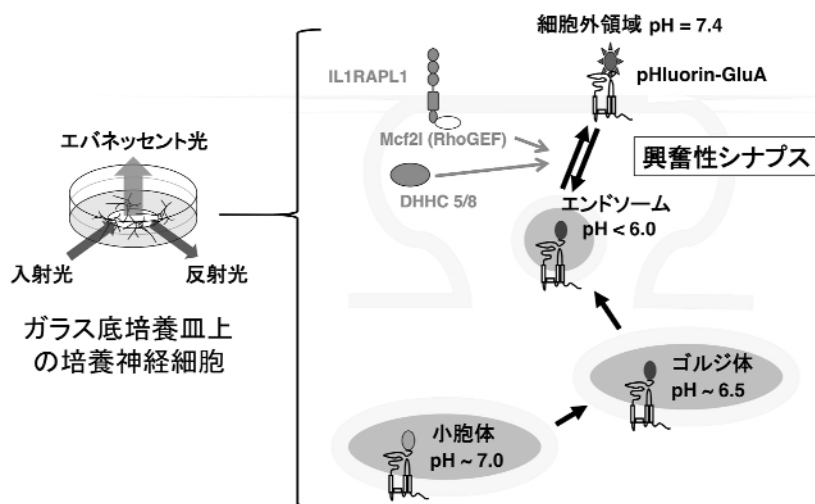
## 研究成果

(1) Interleukin-1 receptor accessory protein-like 1 (IL1RAPL1) は、脳特異的に発現するIL1受容体ファミリーに属する分子であるが、IL1の受容体としては機能しない。IL1RAPL1は、特に興奮性シナプス後膜に局在して、シナプス前膜側との相互作用により、興奮性シナプスの形成・維持に関与することが知られていた。また、精神疾患患者の研究から、IL1RAPL1遺伝子上に生じる突然変異が、X連鎖知的障害と自閉症を発症させることが報告されている。知的障害と自閉症は、臨床的には別の疾患として診断されるが、併発する例も多く、ある程度共通の発症分子機構があると考えられる。本研究では、IL1RAPL1およびその下流で機能する情報伝達分子群が大脳皮質神経細胞の興奮性シナプスを制御する機構を解析した。まず、IL1RAPL1の結合分子としてRhoGEFの一種であるMcf2-likeを同定し、下流のRhoAを介して、スパイン形態を持つ興奮性シナプスの形成を促進することを見出した。RhoAの活性化はアクチン繊維の構造変化を起し、アクチンに支えられた

スパインを誘導すると考えられる。更に、IL1RAPL1とRhoAを介したシグナル系により、哺乳類の中枢神経系において主要な興奮性神経伝達を担う、グルタミン酸受容体のシナプス発現が制御されていることを、全反射蛍光顕微鏡を用いた1分子イメージング法を用いて明らかにした（PLoS One 8: e66254 (2013)）。

この観察系の確立により、IL1RAPL1等の精神疾患原因遺伝子によるシナプス制御の可視化に加え、他の多くの脳内環境の維持・調節因子による神経細胞中での分子挙動変化を、ライブ・イメージング解析することが可能となった。

(2) シナプス分子の制御機構には様々な様式があり、タンパク質翻訳後修飾の一種であるS-パルミトイル化は、飽和脂肪酸の可逆的な付加反応である。パルミトイル化を触媒する酵素は、ヒトでは20種類以上が同定されている。近年のゲノム解析と大規模な家系調査から、その内の幾つかが精神疾患あるいは神経変性疾患の原因遺伝子の一つであることが報告された。中でも、それぞれ双極性障害と統合失調症の関連遺伝子であるDHHC5とDHHC8は、特に神経系で高発現を示し、そのC末端にはタンパク質相互作用に関与するII型PDZリガンド配列が存在する。この結合配列を介して、DHHC5/8がAMPA受容体結合タンパク質のGRIP1bと相互作用し、かつGRIP1bのパルミトイル化に伴う膜局在を調節することで、AMPA受容体の神経細胞内輸送を制御していることを、我々は既に発表した（Neuron 73, 482-496 (2012)）。本研究では、新たに、DHHC8が他のAMPA受容体結合タンパク質であるPICK1にも会合して、PICK1のパルミトイル化を亢進することを見出した。更に、小脳の平行線維-プルキンエ細胞間のシナプスにおいて、DHHC8によるPICK1のパルミトイル化がAMPA受容体の細胞内取り込みを促進し、これに伴ってシナプスに発現するAMPA受容体を減少させ、長期抑圧を誘導していることを明らかにした（Journal of Neuroscience 33, 15401-15407 (2013)）。この研究成果は、パルミトイル化依存的なシナプス可塑性の最初の報告であると共に、長期抑圧に重要なパルミ



大脳皮質および海馬の初代培養神経細胞系で、全反射蛍光顕微鏡を用い、細胞外でのみ発光するpHluorinタグを付けたグルタミン酸受容体の興奮性シナプスにおける1分子挙動を観察した。

これにより、脳内環境の変化および各種の精神疾患原因遺伝子による興奮性シナプスの制御の可視化解析が可能となった。

トイル化タンパク質を同定した初めての研究である。また、本研究の結果から、脳内の興奮性シナプスにおけるグルタミン酸受容体結合タンパク質による受容体の局在と輸送制御の変調が、正常なシナプス機能の維持を困難にし、精神疾患を誘発する可能性が考えられた。

(3) 海馬CA1錐体細胞の興奮性シナプスにおける、NMDA受容体の翻訳後修飾に伴うシナプス発現制御機構を明らかにした (PLoS One 7: e49089 (2012))。更に、大脳皮質培養神経細胞において、この系を介して興奮性シナプスでのAMPA受容体のシナプス組み込みを制御していることを可視化解析した (未発表)。

## 結語

今回の興奮性シナプス形成の制御に関わる知的障害・自閉症原因遺伝子IL1RAPL1下流の情報伝達系の研究から、知的障害と自閉症の原因遺伝子を介したシグナル系に生じた異常が、大脳皮質の興奮性シナプス機能の変調を起こし、精神疾患を誘発する可能性が考えられた。また、本研究で用いた1分子挙動の可視化イメージング方法により、各種精神疾患原因・関連遺伝子によるシナプス制御の可視化に加え、他の多くの脳内環境の維持・調節因子による神経細胞中での分子挙動変化を、ライブ・イメージングすることが可能となった。この観察系は、脳内環境の維持や調節に関わる多様な因子の分子動態解析にも、今後様々に応用できるものと期待される。

更に、双極性障害と統合失調症にそれぞれ関与するパルミトイル化修飾酵素DHHHC-5/8の解析を進めた結果、興奮性シナプスでのAMPA受容体制御を担うことが明らかになった。グルタミン酸受容体以外にも、可逆的なパルミトイル化/脱パルミトイル化修飾によって制御される神経伝達物質受容体やイオンチャンネルは脳内に数多く存在し、また、DHHHC-5/8以外のパルミトイル化修飾酵素にも精神疾患と神経変性疾患の原因遺伝子が存在する。このイメージング技法を用いた今後の研究によって、それらの分子機能と分子動態が明らかにされ、脳内環境変化に伴うシナプス機能の調節機構の理解が進み、将来的な診断法および治療法につながる基礎的知見が確立されるものと考えられる。

## 主要研究成果

### 原著論文

1. Mattison HA, Hayashi T, Barria A. Palmitoylation at two cysteine clusters on the C-terminus of GluN2A and GluN2B differentially control synaptic targeting of NMDARs. **PLoS One** 7: e49089 (2012).
2. Hayashi T, Yoshida T, Ra M, Taguchi R, Mishina M. IL1RAPL1 associated with mental retardation and autism regulates the formation and stabilization of glutamatergic synapses of cortical neurons through RhoA signaling pathway. **PLoS One** 8: e66254 (2013).
3. Thomas GM, Hayashi T, Haganir RL, Linden DJ. DHHHC8-dependent PICK1 palmitoylation is required for induction of cerebellar long-term synaptic depression. **Journal of Neuroscience** 33: 15401-15407 (2013).
4. Hori K, Nagai T, Shan W, Sakamoto A, Taya S, Hashimoto R, Hayashi T, Abe M, Yamazaki M, Nakao K, Nishioka T, Sakimura K, Yamada K, Kaibuchi K, Hoshino M. Cytoskeletal regulation by AUTS2 in neuronal migration and neuriteogenesis. **Cell Reports** 9: 2166-2179 (2014).

## 総説

1. Thomas GM, Hayashi T. Smarter neuronal signaling complexes from existing components: How regulatory modifications were acquired during animal evolution. **Bioessays** 35: 929-939 (2013).



# パーキンソン病および関連神経変性疾患のPET酸化ストレスイメージング

(平成24年度～平成25年度)



公募

米田 誠

福井県立大学・看護福祉学部・教授

## 研究の背景と目的

遺伝性あるいは後天的にミトコンドリアに障害が生じた場合には、エネルギー産生の低下と共に活性酸素種（ROS）の漏出が増大し、細胞や組織に酸化的傷害（酸化ストレス）が加わる。この酸化ストレスは、パーキンソン病（PD）、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、ミトコンドリア脳筋症などの多くの神経変性疾患（神経難病）や認知症に関与する。パーキンソン病（PD）の病態において、ミトコンドリアの品質管理（ミトファジー）の傷害が病態として想定され、劣化したミトコンドリア（ROS産生）が増加していると考えられている。特に、家族性PDの原因であるParkinやPINK1とミトファジーの関わりが注目されている。我々は、放射線プローブ<sup>62</sup>Cu-ATSMがミトコンドリア異常を伴った部分で停滞し、陽電子を放出することを原理として、*in vitro*の基礎研究（Yoshii, Yoneda et al. Nucl Med Biol. 2012）を経て、脳内酸化ストレスをPETで画像化する方法を開発した。本研究は、神経変性疾患の脳内環境における酸化ストレスの増大・関与をPETを用いて生体脳で評価し、病態の解明や各種の薬剤開発・評価につづることを目的とする。

## 研究成果

### (1) PD及び関連疾患の脳内酸化ストレス：

<sup>62</sup>Cu-ATSM PETによって、生体脳の線条体における集積が、PD患者では健常対照者に比べて有意に高いことが明らかとなり、臨床徴候の重症度とも正の相関をすることをすでに、報告している（Ikawa, Yoneda et al. Nucl. Med. Biol. 2011）。

そこで、さらに線条体におけるドパミン（DA）ニューロン

の残存の指標であるDaTscanとCu-ATSM PETを9名のPD患者で施行し、残存DAニューロンあたりの酸化ストレスを検討した。その結果、残存DAニューロンあたりの酸化ストレスは、PD患者では正常対象に比較して有意に増大していた。これらの結果から、PD患者の線条体においては、DAニューロン選択的に酸化ストレスが増大し、神経変性を促進していることが考えられた（投稿中）。

また、ミトファジーにおいて必要な働きをなすParkin遺伝子に遺伝的に変異を有する4家系の家族性PD患者において、脳内における酸化ストレスを<sup>62</sup>Cu-ATSM PETを用いて検討した。その結果、家族性PD患者では、孤発性PD患者と比べて、より広範に脳内の酸化ストレスが増大している結果が得られた。

### (2) ALSにおける脳内酸化ストレス：

ALS患者の生体脳での酸化ストレスをPETイメージングで検討した。その結果、患者群では健常対照者に比べて運動野における<sup>62</sup>Cu-ATSMの集積が有意に亢進していた。また、<sup>62</sup>Cu-ATSMの集積は、臨床的な重症度とも有意な正の相関を有していた（Ikawa, Yoneda et al. Neurology 2015）。

## 結語

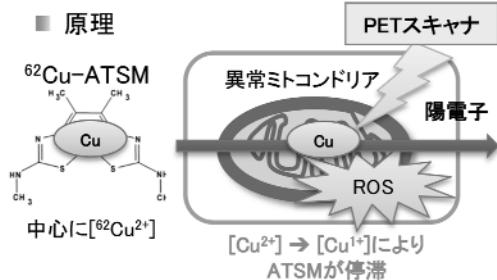
我々が新たに開発したCu-ATSM PETによって、各種の神経変性疾患（神経難病）患者の生体脳における酸化ストレスを検討できるようになった。これを用いることで、神経変性の機序を解明できるばかりでなく、抗酸化療法や神経保護療法による薬理学的効果を非進取的・継時的に観察できることが期待される。また、酸化ストレスは、アルツハイマー病（AD）にお

## パーキンソン病および関連神経変性疾患のPET酸化ストレスイメージング

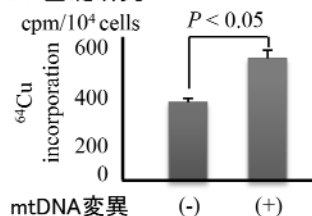
（代表：米田 誠，連携研究者：岡沢秀彦，服部信孝，井川正道）

### 1. 酸化ストレスPETの開発

#### ■ 原理

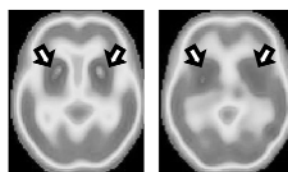


#### ■ In vitro 基礎研究



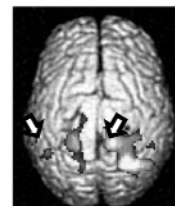
### 2. 神経変性疾患・認知症への応用

#### ■ PD

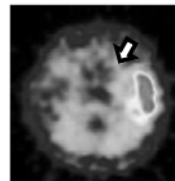


患者群 健常者群

#### ■ ALS



#### ■ ミトコンドリア病 (MELAS)



- PD関連疾患
  - ・家族性PD
  - ・多系統萎縮症
- 認知症
  - ・アルツハイマー病
  - ・レビー小体病

ける老人斑形成過程でのアミロイドβ蛋白の凝集にも関与することが知られており、アミロイドイメージング (PiB PET) との併用などにより、詳細な病態機序の解明ができる可能性がある。

以上、Cu-ATSM PETは、神経変性疾患や認知症患者における脳内酸化ストレスを評価できる新しいツールとして期待される。

## 主要研究成果

### 原著論文

1. Masamichi Ikawa, Hidehiko Okazawa, Tetsuya Tsujikawa, Akiko Matsunaga, Osamu Yamamura, Tetsuya Mori, Tadanori Hamano, Yasushi Kiyono, Yasunari Nakamoto, Makoto Yoneda. Increased oxidative stress is related to disease severity in the ALS motor cortex: A PET study. **Neurology**; 84:2033-2039, (2015).
2. Takuya Konno, Masayoshi Tada, Mari Tada, Akihide Koyama, Hiroaki Nozaki, Yasuo Harigaya, Jin Nishimiya, Akiko Matsunaga, Nobuaki Yoshikura, Kenji Ishihara, Musashi Arakawa, Aiko Isami, Kenichi Okazaki, Hideaki Yokoo, Kyoko Itoh, Makoto Yoneda, Mitsuru Kawamura, Takashi Inuzuka, Hitoshi Takahashi, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera, Akiyoshi Kakita, and Takeshi Ikeuchi. Haploinsufficiency of CSF-1R and Clinicopathological Characterization in patients with HDLS. **Neurology** 82:139-148, (2014).
3. Masamichi Ikawa, Makoto Yoneda, Tomoko Muramatsu, Akiko Matsunaga, Tetsuya Tsujikawa, Tatsuya Yamamoto, Nobuyuki Kosaka, Kazuyuki Kinoshita, Osamu Yamamura, Tadanori Hamano, Yasunari Nakamoto, Hirohiko Kimura. Detection of pre-clinically latent hyperperfusion due to stroke-like episodes by arterial spin-labeling perfusion MRI in MELAS patients. **Mitochondrion** 13:676-80, (2013).
4. Yoneda M, Ikawa M, Arakawa K, Kudo T, Kimura H, Fujibayashi Y, Okazawa H. In vivo functional brain imaging and a therapeutic trial of L-arginine in MELAS patients. **Biochim Biophys Acta**. 1820:615-618, (2012).
5. Yoshii Y, Yoneda M, Ikawa M, Furukawa T, Kiyono Y, Mori T, Yoshii H, Oyama N, Okazawa H, Saga T, Fujibayashi Y. Radiolabeled Cu-ATSM as a novel indicator of overreduced intracellular state due to mitochondrial dysfunction: studies with mitochondrial DNA-less  $\rho^0$  cells and cybrids carrying MELAS mitochondrial DNA mutation. **Nucl Med Biol**. 39:177-85, (2012).
6. Tsujikawa T, Yamamoto T, Ikawa M, Yoneda M, Kimura H. Crossed cerebellar hyperperfusion after MELAS attack followed up by whole brain continuous arterial spin labeling perfusion imaging. **Acta Radiol**. 53:220-202, (2012).
7. Ikawa M, Arakawa K., Hamano T., Nagata M., Nakamoto Y., Kuriyama M., Koga, Y. Yoneda, M. Evaluation of systemic redox states in patients carrying MELAS A3243G mutation in mitochondrial DNA. **Eur Neurol** 67:232-237, (2012).

ング. **脳内環境辞典**. メディカルビュー社 (2017) (印刷中).

3. Kenichiro Arakawa, Masamichi Ikawa, Hiroshi Tada, Hidehiko Okazawa, Makoto Yoneda. Mitochondrial cardiomyopathy and usage of L-arginine. **Arginine in Clinical Nutrition**. Ed. Victor R. Preedy. Springer, NY, USA, (2016).
4. H. Okazawa, M. Ikawa, T. Tsujikawa, Y. Kiyono, M. Yoneda. Brain imaging for oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. **Q J Nucl Med Mol Imaging** 58:387-397 (2014) (Review).

### 総説

1. 井川正道, 岡沢秀彦, 米田誠. 酸化ストレスイメージング. **Annual Review 神経**, (2017) (印刷中).
2. 米田誠, 井川正道, 岡沢秀彦. 脳酸化ストレスPETイメージ



**フッ素MR画像法と光画像法によるアミロイドオリゴマーのin vivo病態解析** (平成24年度～平成25年度)  
**ケミカルシフトの違いを利用したフッ素MR画像による複数の脳内異常蛋白の同時解析** (平成26年度～平成27年度)



公募

**遠山 育夫** 滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・教授

**研究の背景と目的**

アルツハイマー病などの神経変性疾患に共通する脳内環境変化として、異常蛋白の蓄積があり、異常蛋白の形成や放出、その伝播が、病態解明と診断治療法の開発にとって重要な鍵となる。アルツハイマー病の病態の中で、最も早期に形成され、最も神経毒性が強いのはアミロイドオリゴマーと考えられている。そこで、最初の2年間は、アミロイドオリゴマーを標的として、アミロイドオリゴマーに強く結合する化合物を開発し、動物モデルを用いた画像化に挑戦した。

アルツハイマー病では、アミロイドオリゴマーの形成に続き、βシート構造を持つアミロイドフィブリルを主成分とする老人斑の形成、異常にリン酸化されたタウ蛋白を主成分とする神経原線維変化の形成、そして神経細胞死と進んでいくと考えられている。しかしながら、それぞれの異常蛋白相互の関連については良く解っていない。それらの異常蛋白相互の関連を明らかにするためには、複数の異常蛋白をin vivoで同時に画像化する技術が不可欠である。そこで、後半2年間は、我々の開発した画像化試薬の混合液を投与して、多重フッ素MR画像法で同時画像化を行い、複数の異常蛋白の同時画像化を試みた。

**研究成果**

**(1) アミロイドオリゴマーを画像化するためのプローブの開発**

アミロイドオリゴマーに特異的に結合する化合物の開発は困難であったので、アミロイドオリゴマーとアミロイドフィブリルに結合する化合物Shiga-Y5とアミロイドフィブリルだけに結合するShiga-X22を同時投与し、その差をとる(Subtraction画像)ことで、アミロイドオリゴマーの画像を得ることに挑戦した。

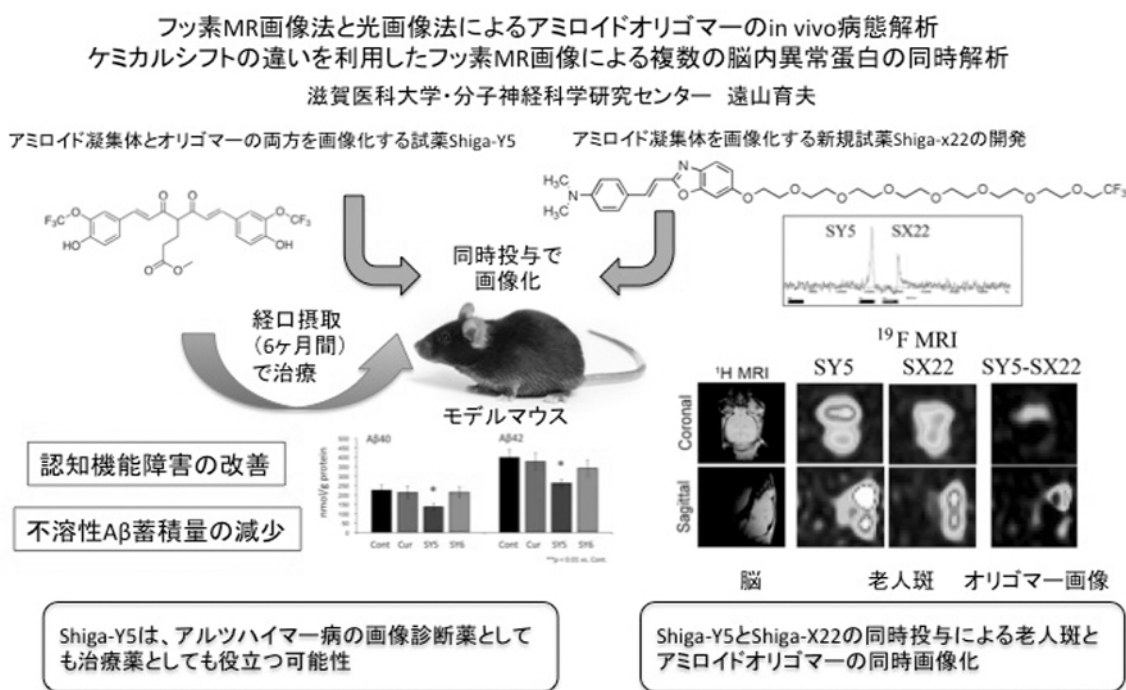
まず最初に、βシート構造をとるAβフィブリルにのみ結合し、強いフッ素NMR信号を出すShiga-X (benzoxazoleを基本骨格に持つ)化合物を開発し、特許を出願(特願2013-202531)するとともに国際学術誌に発表した(Yanagisawa et al., J Alzheimer Dis, 2014)。これにより、すでに所有しているアミロイドオリゴマーにも結合するShiga-Y (McClure et al., J Alzheimer Dis, 2015, Yanagisawa et al., Biochem Biophys Report, 2015; Taguchi et al., Aust J Chem, 2015)化合物と組み合わせることで、アミロイドオリゴマーのin vivo解析を行うための試薬がそろったことになった。

**(2) フッ素MR画像法によるアミロイドオリゴマーと老人斑の同時画像化**

上記のShiga-Y5とShiga-X22をアルツハイマー病の遺伝子改変モデルマウス(AβPP/PS1)の尾静脈に同時投与し、Shiga-Y5とShiga-X22の画像を同時に取得することに成功した。Shiga-X22は老人斑にのみ結合することから、Shiga-X22の画像は老人斑の分布を示していると考えられた。一方、Shiga-Y5は老人斑に加えアミロイドオリゴマーにも結合する。そこで、Shiga-Y5の画像からShiga-X22の画像を差し引くことで得られた画像を、これまで画像化ができなかったアミロイドオリゴマーの候補画像として報告した(Tooyama et al., Ageing Res Rev, 2016)。

**(3) Shiga-Y5によるアルツハイマー病治療効果の検証**

比較的高い脳移行率を示すShiga-Y5と脳に入らない誘導体Shiga-Y6、あるいはクルクミンを飼料に混ぜて、アルツハイマー病の遺伝子改変モデルマウス(AβPP/PS1)に6ヶ月間





投与し、それらの認知症治療効果と脳の病理変化を比較検討した。その結果、脳に入る Shiga-Y5 は認知機能の低下を防止した ( $p < 0.05$ )。しかし、クルクミンや脳に入らない Shiga-Y6 では効果が認められなかった。さらに Shiga-Y5 投与マウスでは、脳内の不溶性 A $\beta$  42 量と A $\beta$  40 量が有意に低下するとともに、脳内のグリアの反応を抑制した。神経芽細胞腫を用いた培養実験では、Shiga-Y5 は A $\beta$  の凝集を抑制して、細胞の生存率を高めた。

以上の結果は、Shiga-Y5 がアルツハイマー病の画像診断薬としてのみならず、新しい治療薬の候補となることを示している (Yanagisawa et al., *Neurobiol Aging*, 2015)。

## 結語

フッ素 MR 画像法は、<sup>19</sup>F 原子がもつ NMR 信号を利用して画像化する MR 画像法である。フッ素 MR 画像法でケミカルイメージング技術を用いると、試薬の出す <sup>19</sup>F-NMR 信号のケミカルシフトの違いを利用して、複数の脳内異常蛋白を同時画像化することが可能である。今回、領域内共同研究を通じて、フッ素 MR 画像法による複数蛋白の同時画像化手法を開発し、これまで画像化ができなかったアミロイドオリゴマーの候補画像を得ることができると、脳内環境の病態解明につながる成果を得ることができた。

## 主要研究成果

### 原著論文

1. Wang X, Yang H, Yanagisawa D, Bellier JP, Morino K, Zhao S, Liu P, Vigers P, Tooyama I.: Mitochondrial ferritin affects mitochondria by stabilizing HIF-1  $\alpha$  in retinal pigment epithelium: implications for the pathophysiology of age-related macular degeneration. **Neurobiol Aging** 47: 168-179, 2016
2. Yanagisawa D, Taguchi H, Morikawa S, Kato T, Hirao K, Shirai N, Tooyama I: Novel curcumin derivatives as potent inhibitors of amyloid  $\beta$  aggregation. **Biochem Biophys Report** 4: 357-368, 2015
3. Taguchi H, Yanagisawa D, Morikawa S, Hirao K, Shirai N, Tooyama I: Synthesis and Tautomerism of Curcumin Derivatives and Related Compounds. **Aust J Chem** 68: 224-229
4. Yanagisawa D, Ibrahim NF, Taguchi H, Morikawa S, Hirao K, Shirai N, Sogabe T, Tooyama I: Curcumin derivative with the substitution at C-4 position, but not curcumin, is effective against amyloid pathology in APP/PS1 mice. **Neurobiol Aging** 36: 201-210, 2015.
5. McClure R, Yanagisawa D, Stec D, Koktysh D, Xhillari D, Jaeger R, Chekmenev E, Tooyama I, Gorel JC, Pham W: Inhalable Curcumin: Offering the Potential for Translation to Imaging and Treatment of Alzheimer's Disease. **J Alzheimer Dis** 144: 283-295.
6. Yanagisawa, D., Taguchi, H., Ibrahim, N.F., Morikawa, S., Shiino, A., Inubushi, T., Hirao, K., Shirai, N., Sogabe, T., Tooyama, I: Preferred features of a fluorine-19 MRI probe for amyloid detection in the brain. **J Alzheimer's Dis** 39: 617-631, 2014.

## 総説

1. Tooyama I, Yanagisawa D, Taguchi H, Kato T, Hirao K, Shirai N, Sogabe T, Ibrahim NF, Inubushi T, Morikawa S: Amyloid imaging using fluorine-19 magnetic resonance imaging (<sup>19</sup>F-MRI). **Ageing Res Rev**, 30: 85-94, 2016.
2. Tooyama I, Ibrahim NF, Durani LW, Hamezah HS, Damanhuri MHA, Wan Ngah WZ, Taguchi H, Yanagisawa D: Curcumin against amyloid pathology in

mental health and brain composition. In: Ronald Ross Watson and Victor R. Preedy, editors, *Fruits, Vegetables, and Herbs*. Oxford: Academic Press, p. 487-506 (2016).

## 特許

1. 特願 2013-202531 発明の名称「神経難病の MR 画像診断薬」出願日：2013 年 9 月 27 日, 発明者 遠山育夫、田口弘康、柳沢大治郎, 出願人：滋賀医大



# 内因性チャネルを用いた脳内レドックス環境イメージングと老化・病態脳研究への応用

(平成24年度～平成25年度)



公募 柿澤 昌 京都大学・薬学研究所・准教授

## 研究の背景と目的

機能分子への酸化修飾の蓄積は、老化や疾患発症の主要因の一つであると考えられている。したがって脳内環境に関する研究を進めるうえで、酸化環境に着目することは有意義であると考えられるが、十分な定量性と空間分解能を有する測定法はこれまで確立されていなかった。研究代表者は予備的な研究により、細胞内カルシウムストアである小胞体膜に発現するカルシウム放出チャネルの一種、リアノジン受容体 (RyR) のカフェインに対する応答性 (CICR) は酸化シグナルによる影響を受けないが、一酸化窒素 (NO) に対する応答性 (NICR) は酸化シグナルにより阻害されることを見出し、カルシウムイメージング法を用いたNICR/CICR比の測定による酸化状態モニター法を考案した。

本研究ではまず、過酸化水素の濃度依存的に神経細胞におけるNICR/CICR比が低下することを示し、NICR/CICR比の測定による細胞内酸化状態モニターが可能であることを示す。さらに、加齢に伴いNICR/CICR比が低下することを示し、本測定法が老化・神経変性疾患等の予防や早期発見へと繋がる可能性を提示することを目指した。

## 研究成果

### (1) カルシウムイメージングの応用による細胞内レドックス環境のモニタリング:

機能分子への酸化修飾の蓄積は、老化や疾患発症の主要因の一つと考えられている。したがって、脳内環境に関する研究を進める上で、酸化環境に着目することは有意義であると考えられるが、十分な定量性と空間分解能を有する測定法はこれまで確立されていなかった。研究代表者はまず、1型リアノジン受容体 (RyR1) が一酸化窒素 (NO) によりS-ニトロシル化修飾を受け活性化することで起こる、新規細胞内カルシウム放出機構、一酸化窒素依存的カルシウム放出 (NICR) をマウス小脳のプルキンエ細胞で同定した (Kakizawa et al. EMBO J, 2012)。そして、予備的な実験により、RyR1のカフェインに対する応答性 (CICR) は酸化シグナルによる影響を受けないが、NICRは阻害されることを見出し、NICR/CICR比の測定による酸化状態モニター法を考案した。

いが、NICRは阻害されることを見出し、NICR/CICR比の測定による酸化状態モニター法を考案した。本研究では、NICR/CICR比の測定による細胞内酸化状態モニター系を確立した上で、脳神経細胞内酸化環境をモニターし、老化・神経変性疾患等の予防・早期発見への応用の可能性を示すことを目指したが、研究期間内に以下の様な成果が得られている。

- ・若齢マウス個体由来の小脳スライス標本を、様々な濃度の過酸化水素で前処理し、カルシウムイメージング法によりプルキンエ細胞のNICR、CICRを測定し、NICR/CICR比を求めたところ、濃度依存的な低下が確認された。また、NICR/CICR比の低下に対応して、小脳で発現するRyR1のS-ニトロシル化修飾が阻害されること、及びジスルフィド化修飾が増加することを、それぞれの化学修飾を選択的に検出する生化学的手法により明らかにした。
- ・加齢に伴い、プルキンエ細胞のNICR/CICRの低下及びRyR1のS-ニトロシル化の阻害が見られることを、生後1～20ヶ月齢のマウスを用いて明らかにした。

以上により、NICR/CICR比の測定により、細胞内酸化状態のモニタリングが可能になり、さらに個体の加齢に伴う細胞内酸化修飾の蓄積を検出することが可能となることが示唆された (投稿準備中)。

### (2) ホスホチロシンアダプター分子ShcBの小胞体内カルシウム環境維持への関与:

ホスホチロシンアダプター分子の一種、ShcBの遺伝子欠損マウスにおいて、小脳依存的な運動学習が阻害されることを明らかにし、さらに、その原因として小脳平行線維シナプスの可塑性、小脳プルキンエ細胞における小胞体カルシウムストアの機能維持に阻害が見られることを示した。

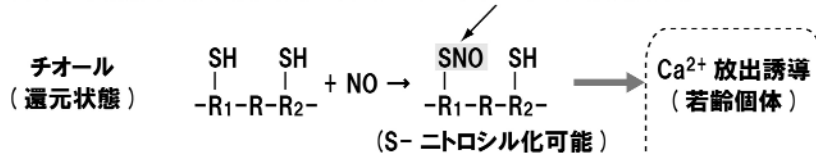
さらに、ShcBによる細胞内カルシウムストア機能維持の分子機構についても解析を進め、カルシウムATPaseの活性に影響を及ぼすことを示唆する結果が得られている (投稿中)。

## 結語

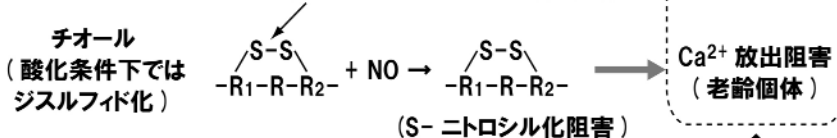
# 内因性チャネルを用いた脳内レドックス環境イメージングと老化・病態脳研究への応用

(代表: 柿澤 昌)

このタンパク質分子の活性化にはR1のチオール基のS-ニトロシル化が必要



R1, R2とのシステインが酸化条件下ではジスルフィド結合を形成



イメージング法を用いた細胞内レドックス環境のモニタリング

脳の神経細胞内のレドックス環境に着目して、小脳プルキンエ細胞のNICR/CICR比が、過酸化水素の濃度依存的に低下することを明らかにし、カルシウムイメージングの応用により細胞内レドックス環境のモニタリングが可能となることを示した。さらに、プルキンエ細胞では加齢に伴いNICR/CICR比が低下することを示し、本手法が老化や神経変性疾患の予防や早期発見へと繋がる可能性を示した。

## 主要研究成果

### 原著論文

1. Mikami Y, Kanemaru K, Okubo Y, Nakaune T, Suzuki J, Shibata K, Sugiyama H, Koyama R, Murayama T, Ito A, Yamazawa T, Ikegaya Y, Sakurai T, Saito N, Kakizawa S, Iino M. Nitric Oxide-induced Activation of the Type 1 Ryanodine Receptor Is Critical for Epileptic Seizure-induced Neuronal Cell Death. **EBioMedicine** 11, 253-261, (2016).
2. Baba S, Onga K, Kakizawa S, Ohyama K, Yasuda K, Otsubo H, Scott B W, Burnham W M, Matsuo T, Nagata I, Mori N. Involvement of the neuronal phosphotyrosine signal adaptor N-Shc in kainic acid-induced epileptiform activity. **Sci Rep** 6: 27511, (2016).
3. Zhao C, Ichimura A, Qian N, Iida T, Yamazaki D, Noma N, Asagiri M, Yamamoto S, Komazaki S, Sato C, Aoyama F, Sawaguchi A, Kakizawa S, Nishi M, Takeshima H. Mice lacking the intracellular cation channel TRIC-B have compromised collagen production and impaired bone mineralization. **Sci Signal** 9: ra49, (2016).
4. Van B, Nishi M, Komazaki S, Ichimura A, Kakizawa S, Nakanaga K, Aoki J, Park K H, Ma J, Ueyama T, Ogata T, Maruyama N, Takeshima H. Mitsugumin 56 (hedgehog acyltransferase-like) is a sarcoplasmic reticulum-resident protein essential for postnatal muscle maturation. **FEBS Letters** 589: 1095-1104, (2015).
5. Yamamoto S, Yamazaki T, Komazaki S, Yamashita T, Osaki M, Matsubayashi M, Kidoya H, Takakura N, Yamazaki D, Kakizawa S. Contribution of calumen to embryogenesis through participation in the endoplasmic reticulum-associated degradation activity. **Dev Biol** 393: 33-43, (2014).
6. Tao S, Yamazaki D, Komazaki S, Zhao C, Iida T, Kakizawa S, Imaizumi Y, Takeshima H. Facilitated hyperpolarization signaling in vascular smooth muscle-overexpressing TRIC-A channels. **J Biol Chem** 288: 15581-15589, (2013).
7. Kakizawa S, Yamazawa T, Iino M. Nitric oxide-induced calcium release: activation of type 1 ryanodine receptor by endogenous nitric oxide. **Channels (Austin)** 7: 1-5, (2013).
8. Kakizawa S, Yamazawa T, Chen Y, Ito A, Murayama T, Oyamada H, Kurebayashi N, Sato O, Watanabe M, Mori N, Oguchi K, Sakurai T, Takeshima H, Saito N, Iino M. Nitric oxide-induced calcium release via ryanodine receptors regulates neuronal function. **EMBO J** 31: 417-428, (2012).
9. Kakizawa S, Shibasaki M, Mori N. Protein oxidation inhibits NO-mediated signaling pathway for synaptic plasticity. **Neurobiol Aging** 33: 535-545, (2012).
10. Nishi M, Aoyama F, Kisa F, Zhu H, Sun M, Lin P, Ohta H, Van B, Yamamoto S, Kakizawa S, Sakai H, Ma J, Sawaguchi A, Takeshima H. TRIM50 protein regulates vesicular trafficking for acid secretion in gastric parietal cells. **J Biol Chem** 287: 33523-33532, (2012).

## 総説

1. Mikami Y, Kakizawa S, Yamazawa T. Essential Roles of Natural Products and Gaseous Mediators on Neuronal Cell Death or Survival. **Int J Mol Sci** 17: (2016).
2. Kakizawa S, Yamazawa T. Nitric-oxide induced calcium release: Regulatory mechanism and physiological function. **Folia Pharmacologica Japonica** 147: 194-199, (2016).
3. Yamazawa T, Kakizawa S. Nitric oxide-induced calcium release: Neuronal cell death. **Folia Pharmacologica Japonica** 147: 200-205, (2016).
4. Kakizawa S, Kaiya H, Takahashi A. Posttranslational modification of intercellular messenger systems. **Front Endocrinol (Lausanne)** 5: 27, (2014).
5. Kakizawa S. Nitric Oxide-Induced Calcium Release: Activation of Type 1 Ryanodine Receptor, a Calcium Release Channel, through Non-Enzymatic Post-Translational Modification by Nitric Oxide. **Front Endocrinol (Lausanne)** 4: 142, (2013).
6. Kakizawa S, Takeshima H, Iino M. Nitric Oxide-Induced Calcium Release: A Novel Calcium-Mobilizing Mechanism Mediated by S-nitrosylation-Dependent Modulation of Ryanodine Receptor. **Messenger** 1: 133-140, (2012).



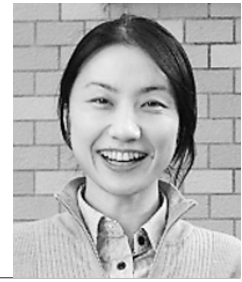
# 質量分析イメージングによる 脳内環境の可視化

(平成24年度～平成25年度)

公募

矢尾 育子

浜松医科大学・光先端医学教育研究センター  
フォトンクス医学研究部光イメージング研究室・准教授



## 研究の背景と目的

本研究では、質量顕微鏡法、すなわち質量分析イメージングにより、脳内環境のバランスが破綻した時に起こる分子の変動を可視化し、新たな鍵分子を見出すことを目標とする。

神経科学研究での応用例がまだ少ない質量顕微鏡法を利用することで、既存的手法では成分を検出することができなかった変動分子を同定・網羅的に記述し、脳内環境のバランス変化を可視化する。具体的には、モデルとしてSCR-KOマウスを用い、SCRAPPERとそれが関与するタンパク質分解系の役割を明らかにする。また、神経変性疾患のモデルについても質量顕微鏡法で観察し、ヒトの神経変性疾患脳サンプルから得られる情報との比較検討を行い、全く新しい情報を得る。得られた情報から、凝集体の蓄積や神経伝達物質の放出異常が原因となっている神経変性疾患の病態解明を目指す。

## 研究成果

### (1) アセチルコリン局在の可視化：

アセチルコリンの局在を明らかにすることは、アセチルコリンによる神経伝達機構を理解し、脳の活動状態を知る手掛かりとなる。そこで、質量分析イメージングにより、組織から直接アセチルコリンを検出し局在を可視化することを試みた。マウス脳切片上では、海馬台、上丘、内側膝状複合体、視床の横方向の背核、視床網様核、嗅結、黒質、中小脳脚、網状核、顔面運動核、内側前庭核、傍小脳脚核、橋網様核等に局在が認められた。得られた画像から、マウス脳内でアセチルコリンはコリン作動性ニューロンの神経核および投射先で高濃度に存在することが明らかとなった。マウス脊髄においては、アセチルコリンは前角に存在する大型のコリン作動性運動神経の細胞体に豊富に存在し、全体的に灰白質に多く分布することが明らかとなった (Sugiura et al., Anal Bioanal Chem, 2012)。

### (2) SCR-KO マウス脳における変化の検出：

SCRAPPERは神経シナプスに局在するユビキチンE3リ

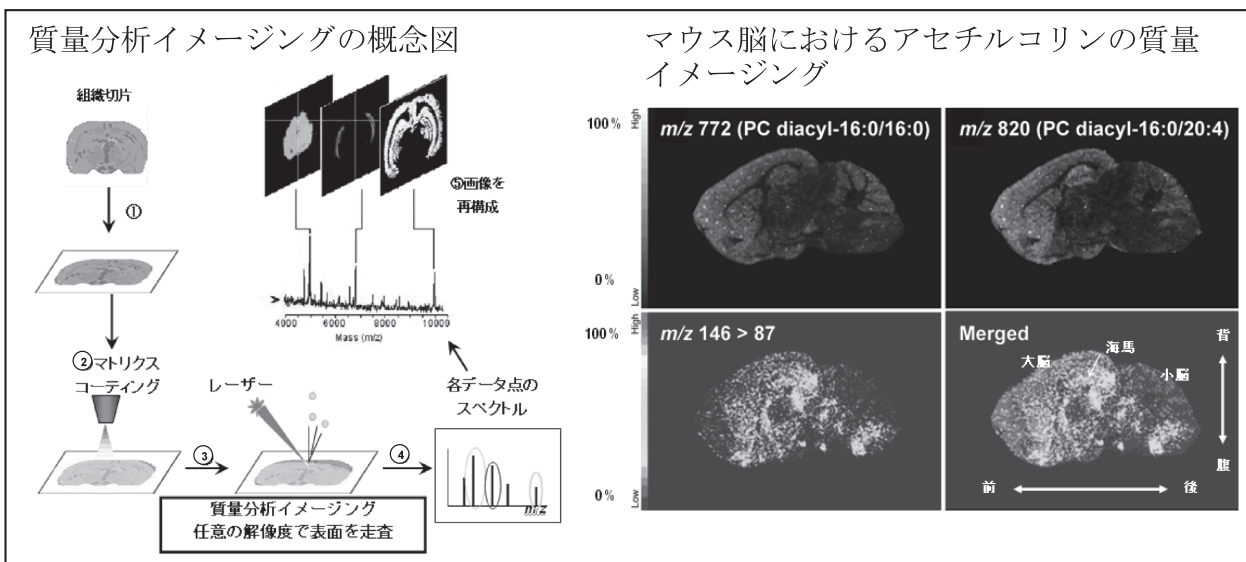
ガーゼであり、前シナプスのアクティブゾーンタンパク質RIM1を分解に導くことで神経伝達を調節している。ノックアウトマウスではシナプス小胞からの伝達物質放出確率が増大しており、シナプス可塑性の変化に加え、脳での神経変性の表現型が見られる。質量分析イメージングを用いた野性型マウス脳と比較することによりSCRAPPER分子の欠損により起こる変化を解析した。PCA解析を組み合わせた解析によりSCR-KOマウス脳で変動する分子が検出された。SCR-KOマウスの脳で複数のペプチドの増減に加え特定の脂質分子の減少があることが明らかとなった。

### (3) アルツハイマー病脳の脂質変化の解析：

アルツハイマー病患者の脳ではDHA-PC (ドコサヘキサエン酸含有ホスファチジルコリン) が低下していることが報告されていたが、この減少がアルツハイマー病の機構にどのように関わっているかは不明であった。質量分析イメージングによりアルツハイマー病患者の脳のDHA-PCの分布を解析し、その変動を検討した。その結果、DHA-PCはアミロイドの蓄積が認められる大脳皮質領域で減少していることが明らかとなった。大脳皮質におけるDHA-PCの減少は、発症からの期間と症状の重度に相関し、期間が長期で症状が重いほど顕著に低下していることが明らかとなった。さらに、このDHA-PCの減少は神経細胞の機能に重要なシナプスタンパク質であるPSD-95の低下とも相関していることを発見した。PSD-95を初めとするシナプスタンパク質の低下はアルツハイマー病患者の認知機能の低下の原因のひとつと考えられており、脳内のDHA-PCはアルツハイマー病の認知機能の低下と関係する可能性が示された (Yuki et al., Sci Rep 2014)。

## 結語

質量分析イメージング手法の改善によりこれまで検出できなかった分子の局在を明らかにすることができた。また、脳切片上の分子局在解析に応用することにより、脳内で重要な働きを



担う分子や、脳内環境の変化により変動する分子を検出することができた。

## 主要研究成果

### 原著論文

- Hirahara Y, Wakabayashi T, Mori T, Koike T, Yao I, Tsuda M, Honke K, Gotoh H, Ono K, Yamada H. Sulfatide species with various fatty acid chains in oligodendrocytes at different developmental stages determined by imaging mass spectrometry. **J Neurochem**, (2016) *Nov. 12 (Epub ahead of print)*
- Katano T, Fukuda M, Furue H, Yamazaki M, Abe M, Watanabe M, Nishida K, Yao I, Yamada A, Hata Y, Okumura N, Nakazawa T, Yamamoto T, Sakimura K, Takao T, Ito S. Involvement of Brain-Enriched Guanylate Kinase-Associated Protein (BEGAIN) in Chronic Pain after Peripheral Nerve Injury. **eNeuro**, (2016) *Oct. 17*
- Shimma S, Kumada HO, Taniguchi H, Konno A, Yao I, Furuta K, Matsuda T, Ito S. Microscopic visualization of testosterone in mouse testis by use of imaging mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem**, (2016) *May. 26; 408(27):7607-7615*. doi: 10.1007/s00216-016-9594-9.
- Konno A, Ikegami K, Konishi Y, Yang HJ, Abe M, Yamazaki M, Sakimura K, Yao I, Shiba K, Inaba K, Setou M. Ttl19<sup>-/-</sup> mice sperm flagella show shortening of doublet 7, reduction of doublet 5 polyglutamylation and a stall in beating. **J Cell Sci**, (2016) *Jul. 15; 129(14):2757-66*. doi: 10.1242/jcs.185983.
- Taniguchi H, Katano T, Nishida K, Yao I, Morimoto Y, Matsuda T, Ito S. Expression of hOvol2 in the XY body of human spermatocytes. **Andrologia**, (2016) *May. 2* doi: 10.1111/and.12599. [Epub ahead of print]
- Hossen MA, Nagata Y, Waki M, Ide Y, Takei S, Fukano H, Romero-Perez GA, Tajima S, Yao I, Ohnishi K, Setou M. Decreased level of phosphatidylcholine (16:0/20:4) in multiple myeloma cells compared to plasma cells: a single-cell MALDI-IMS approach. **Anal Bioanal Chem**, (2015) *May. 11; 407(18):5273-80*.
- Yuki D, Sugiura Y, Zaima N, Akatsu H, Takei S, Yao I, Maesako M, Kinoshita A, Yamamoto T, Kon R, Sugiyama K, Setou M. DHA-PC and PSD-95 decrease after loss of synaptophysin and before neuronal loss in patients with Alzheimer's disease. **Sci Rep**, (2014) *Nov. 20; 4:7130*.
- Lu J, Yao I, Shimojo M, Katano T, Uchida H, Setou M, Ito S. Identification of nitrated tyrosine residues of protein kinase G-I $\alpha$  by mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem**, (2014) *Jan. 23; 406(5):1387-96*.
- Takagi H, Setou M, Ito S, Yao I. SCRAPER regulates the thresholds of long-term potentiation/depression, the bidirectional synaptic plasticity in hippocampal CA3-CA1 synapses. **Neural Plast**, (2012) *Dec. 22; 2012:352829*.
- Sugiura Y, Zaima N, Setou M, Ito S, Yao I. Visualization of acetylcholine distribution in central nervous system tissue sections by tandem imaging mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem**, (2012) *Jun. 1; 403(7):1851-61*.
- Yamada M, Yao I, Hayasaka T, Ushijima M, Matsuura M, Takada H, Shikata N, Setou M, Kwon AH, Ito S. Identification of oligosaccharides from histopathological sections by MALDI imaging mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem**, (2012) *Feb. 1; 402(5):1921-30*.
- Chizaki R, Yao I, Katano T, Matsuda T, Ito S. Restricted expression of Ovol2/MOVO in XY body of mouse spermatocytes at the pachytene stage. **J Androl**, (2012) *Mar.-Apr.; 33(2):277-86*.

### 総説

- Setou M, Yao I, Alisa G, Woods and Costel C, Darie (Eds.) : Advancements of mass spectrometry in biomedical research. **Anal Bioanal Chem** 407(5):1283-84 (2015).
- Romero GA, Takei S, Yao I. Imaging Mass Spectrometric Analysis of Neurotransmitters: A Review. **Mass Spectrometry** (Tokyo) 3(3):S0049 (2015).
- 武井史郎, 矢尾育子. 質量分析イメージングの最新動向 -質量顕微鏡法について-. **インナービジョン** 29(7) 53-57, (2014).
- Eriksson C, Masaki N, Yao I, Hayasaka T, Setou M. MALDI Imaging Mass Spectrometry-A Mini Review of Methods and Recent Developments. **Advances in Mass Spectrometry** 19:231-240 (2013).
- 矢尾育子. 脳内物質のイメージング質量分析. **JSBMS Letters** 38(3)41-46 (2013).
- 矢尾育子, 伊藤誠二. 神経科学領域における質量分析イメージング. **臨床化学** 42:332-337 (2013).



## 脳内環境のミクロ解析を可能にする 顕微内視鏡の開発

(平成24年度～平成25年度)

公募

船曳 和雄

先端医療振興財団 先端医療センター研究所 上席研究員



### 研究の背景と目的

パーキンソン病をはじめとして様々な神経疾患での脳内変化においてPKA (Protein Kinase A) やMAP キナーゼ (Mitogen-activated Protein Kinase) などの各種キナーゼの活性化が重要な役割を担っていることが知られ、それらの生体内での動態の解明は、各種疾患の病態生理解明や新たな治療ターゲットの探索などで重要と考えられる。従来、これら生体内でのキナーゼ活性は、固定サンプルでの免疫組織学的解析や摘出サンプルの生化学的解析でなされてきた。前者は優れた空間解像度を持ち、後者は分子特異的に定量的なデータを得ることができるが、両者とも経時的にその変化をモニターすることはできないという限界があった。本研究では、脳内環境のミクロ解析を実現するために顕微内視鏡システムを開発し、これを用いて自由行動中のマウスから脳深部神経回路の細胞レベルのin vivo imaging 観察法を確立すること。さらに、薬物依存やパーキンソン病など各種精神、神経疾患に深く関与する線条体における2種類の投射系それぞれのPKA,ERK 活性をモニターし、行動選択の背景に存在するこれらキナーゼ変化のダイナミクスを明らかにすることを目的とする。

### 研究成果

Cre-lox system を用いて、線条体の直接路及び間接路投射ニューロン (dMSN, iMSN) それぞれにプロテインキナーゼ A (PKA) あるいは細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) の活性をモニターできるFRET バイオセンサー (Kamioka et al, 2012) を発現させたマウスを作製した。そして、これらマウスの背側線条体 (行動開始や行動選択に重要と考えられている) に顕微内視鏡を留置して様々な行動パラダイム (コカイン投与、電気ショック、オスマウスのmating 行動) でのdMSN, iMSN のPKA,ERK 応答を観察した。結果、コカイン投与などの報酬

入力、あるいは逆に電気ショックなどの忌避入力に対して、dMSNやiMSNは逆方向のPKA,ERK 応答を示すことが明らかとなった。さらにそれらPKA,ERK 応答と同時に行動変化 (具体的にはコカイン投与は歩行運動、電気ショックはself-grooming) も記録することで、両者の時間関係も明らかにすることができた。次に、より自然な行動選択の状況と考えられるオスマウスのmating 行動におけるdMSN,iMSNのPKA,ERK 応答を計測した。結果、予想通りメスマウスに対して積極的なmating 行動をとっている場合には、dMSNのPKA,ERKは有意な活性化を示し、iMSNは有意な変化を示さなかった。一方、忌避入力としては非常にマイルドと思われる、メスマウスに対してのmating 行動に非積極的な状況では、逆にiMSNのPKAと特にERKが有意な活性化を示した。これは、オスのmating 行動といったより自然な行動選択の場面において、背側線条体での直接路、間接路の神経回路の活性変化が日常的にダイナミックに起こっていることを示すと同時に、より低濃度のドーパミン変化に対して応答することが知られるD2受容体をもつ間接路が日常的な僅かな状況変化に応じて行動選択する場面などではより重要な役割を担うことを示唆する所見と考えられた (Goto et al, PNAS, 2015)。次に我々は、DREADD法を用いて強制的にdMSN、あるいはiMSN特異的にcAMPを変化させ、それによるPKA変化とオスマウスの生殖行動変化を観察した。結果、DREADD法によるcAMP変化に応じて、自由行動中の顕微内視鏡からの記録でもcAMPを上昇させるとPKAは活性化し、逆に減少させると不活性化を示すことが我々の計測法で検出できることを確かめた。さらに、これらPKA変化と呼応するようにオスマウスはmating 行動の積極性を変化させた。以上より、行動選択と背側線条体直接路・間接路投射ニューロンのPKA 応答とのcausal linkageを確認した (Goto et al, PNAS, 2015)。

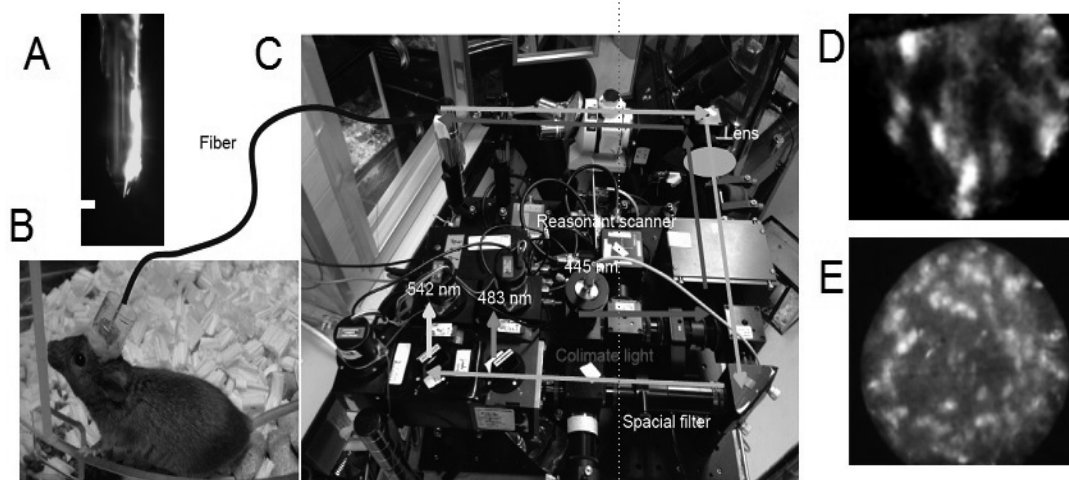


図1 我々が開発した顕微内視鏡システム A.鉛筆状に研磨した内視鏡先端。低浸襲で脳深部が観察可能。B.内視鏡留置により長期間、自由行動での観察が可能。C.自作した共焦点レーザー走査光学系安価で自由な拡張が可能。D.大脳皮質錐体細胞の内視鏡像例(D,Eとも視野300ミクロン)。E.線条体の内視鏡像例。脳深部神経回路での細胞レベルの組織観察が長期間、自由行動中マウスから可能。

さらに、上記と同様の手法を側坐核にも適応し、側坐核での回避記憶形成におけるdMSN,iMSNのPKA応答の役割を調べた。結果、回避記憶形成に必須と思われたiMSNのPKA応答は、回避刺激（電気ショック）を受けた直後ではなく、10分程度経ってから徐々に現れることを明らかにした（Yamaguchi et al, PNAS, 2015）。

### 結語

本研究により開発された顕微内視鏡による自由行動下のin vivoキナーゼイメージングは、今まで、免疫組織学的な手法で行われていた各種行動や精神・神経疾患におけるキナーゼ等の細胞内情報伝達系の詳細な時間経過の把握を可能とするだけでなく、同時に行動レベルでの影響を同一個体で繰り返し調べることのできる大きなメリットがあり、同手法の多方面での応用が期待される。

### 主要研究成果

#### 原著論文

1. Htr2a-Expressing Cells in the Central Amygdala Control the Hierarchy between Innate and Learned Fear. Isosaka T, Matsuo T, Yamaguchi T, Funabiki K, Nakanishi S, Kobayakawa R, Kobayakawa K. Cell. 2015 Nov 19;163(5):1153-64.
2. Role of PKA signaling in D2 receptor-expressing neurons in the core of the nucleus accumbens in aversive learning. Yamaguchi T, Goto A, Nakahara I, Yawata S, Hikida T, Matsuda M, Funabiki K, Nakanishi S. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Sep 8;112(36):11383-8.
3. Circuit-dependent striatal PKA and ERK signaling underlies rapid behavioral shift in mating reaction of male mice. Goto A, Nakahara I, Yamaguchi T, Kamioka Y, Sumiyama K, Matsuda M, Nakanishi S, Funabiki K. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 May 26;112(21):6718-23.

### 総説

1. ファイバー型顕微内視鏡とそれを用いた自由行動下の記録法について 日本レーザー医学会誌 藤飯慎也 船曳和雄 in press
2. In vivo PKA/ERK イメージングと薬物依存 脳21 船曳和雄 2016, 19(1): 23-26.
3. 細胞レベルでの組織観察を可能にする顕微内視鏡の開発とその臨床応用の可能性 船曳和雄 Equilibrium Research, 2015, 74(4): 318-323.



# ミスフォールドタンパク質の核外排出分子機構の解析

(平成26年度～平成27年度)

公募

村田 茂穂

東京大学・薬学系研究科・教授



## 研究の背景と目的

神経変性疾患に共通する病理所見として、細胞内にユビキチン陽性のミスフォールドタンパク質が封入体を形成することが知られる。封入体系性の場として aggresome、JUNQ などが知られているが、いずれも核内ではなく細胞質内の特定の部位に生じる構造体であり、タンパク質封入体形成は緻密に制御された細胞内プロセスであると考えられる。しかし、そのメカニズムと病態生理的意義の多くは不明である。本研究では、細胞内のミスフォールドタンパク質およびユビキチン化タンパク質が細胞内で処理される機構（ユビキチン化・分解・細胞内輸送・変性抑制）・タンパク質恒常性維持機構を解析し、異常タンパク質の細胞内蓄積にいたる分子機構およびその病態生理的意義を明らかにすることを目的とする。

## 研究成果

### (1) プロテアソームのユビキチン鎖受容体のマウス個体における役割の解析：

神経細胞内で生じる異常タンパク質はユビキチン化された後にプロテアソームにより分解される。プロテアソームには Rpn10 と Rpn13 の2つの主要なユビキチン化タンパク質受容体が存在するが、複数のユビキチン鎖受容体が存在する意義は不明であった。Rpn10、Rpn13 各単独遺伝子欠損マウスおよび同時遺伝子欠損マウスの解析により、Rpn10、Rpn13 ともにマウス個体の生存に必須であること、両者は主に縮重的に働いているが各受容体にのみ捕捉される基質ユビキチン化タンパク質が存在することを明らかにした (Hamazaki et al. Plos Genet, 2015)。

### (2) タンパク質品質管理における Sirt1 の関与の解析：

Sirt1 は長寿遺伝子として知られる。老化の主要因の1つとしてタンパク質恒常性の破綻が挙げられており、Sirt1 のタンパク質品質管理における役割を検討した。その結果、Sirt1 欠損マウスおよび欠損細胞においてユビキチン化タンパク質が蓄積していることが判明した。その効果は Sirt1 欠損による

Hsp70 の発現量の低下に一部起因することがわかった。Sirt1 は転写因子 HSF を活性化することにより熱ショック応答を正に制御することが過去に報告されていたが、我々の解析では Sirt1 欠損による Hsp70 発現低下は HSF を介していないことが示唆され、Sirt1 がこれまで知られていない新しい機構で細胞内タンパク質の品質管理を担っている可能性を示した (Tomita et al. Sci Rep, 2015)

### (3) プロテアソーム遺伝子群転写活性化因子 Nrf1 を活性化させるプロテアーゼ DDI2 の同定：

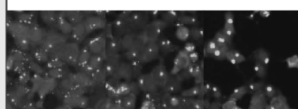
プロテアソーム機能の低下は神経変性を引き起こすことが知られており、プロテアソームの量と活性を制御する機構の解明は重要な課題である。Nrf1 (NF-E2-related factor 1) はプロテアソーム機能低下時に活性化され、プロテアソーム遺伝子群の転写を促進することによりプロテアソーム機能を回復させる転写因子である。しかし、その活性化機構は不明であった。我々はゲノムワイド siRNA スクリーニングにより、アスパラギン酸プロテアーゼ DDI2 が小胞体で産生された Nrf1 を小胞体膜から切り離すことにより活性化させる分子であることを明らかにした。脳特異的 Nrf1 欠損マウスは神経変性を生じることから、Nrf1 活性化メカニズムの解明はプロテアソーム誘導を可能にする神経変性疾患治療薬への道筋を示すものと期待される。

### (4) ミスフォールドタンパク質の細胞内局在を制御する機構の探索：

我々は筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因となる変異 SOD1 タンパク質が核から細胞質へ積極的に運び出されている現象を発見し、その分子機構と病態生理的意義の解明を目指した。ミスフォールドタンパク質のモデルとして、ALS 型変異 SOD1G85R、アルツハイマー病型変異 tau (P301L) の細胞内局在および凝集形成を指標としてゲノムワイド siRNA スクリーニングを実施した。その結果、ミスフォールドタンパク質の凝集形成および細胞内局在に影響を与える分子群を複数同定することに成功した。現在、それらの分子機構について詳細な

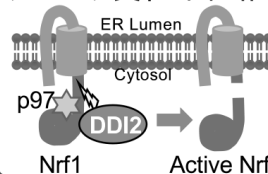
## ミスフォールドタンパク質の核外排出分子機構の解析 (代表: 村田茂穂)

### ミスフォールドタンパク質の細胞内動態制御機構と病態生理的意義の解明



Tau(P301L), SODG85R の凝集性・局在制御因子の siRNA スクリーニングによる探索

### ユビキチン・プロテアソーム系によるタンパク質恒常性維持機構の解明



プロテアソーム増産によるタンパク質恒常性維持

ミスフォールドタンパク質の品質管理機構の解明に基づいた神経変性疾患発症機構の理解と創薬標的の探索



解析を行っている。

#### (5) 過剰発現により神経変性を抑制する新規因子の同定：

ショウジョウバエを用いた網羅的遺伝学的解析により、プロテアソーム機能低下に起因する神経変性を、過剰発現により抑制する因子Xを同定した。さらに、因子XがTDP-43発現による神経変性を抑制すること、ユビキチン化TDP-43の凝集性を抑制することを見いだした（投稿中）。

#### 結語

細胞内異常タンパク質蓄積に起因する神経変性疾患の理解および治療標的の解明を目指して研究を実施した。その結果、プロテアソームのユビキチン化タンパク質認識サブユニットの哺乳類個体での意義、Sirt1のタンパク質品質管理における役割、タンパク質恒常性維持に重要な転写因子Nrf1の活性化機構の解明を行うことが出来た。また、領域内共同研究によるミスフォールドタンパク質の細胞内動態に関する研究も大きく進展し、脳内環境のタンパク質恒常性破綻のメカニズムの解明に迫ることが出来た。

#### 主要研究成果

##### 原著論文

1. Koizumi S, Irie T, Hirayama S, Sakurai Y, Yashiroda H, Naguro I, Ichijo H, Hamazaki J, Murata S. The aspartyl protease DDI2 activates Nrf1 to compensate for proteasome dysfunction. **eLife** 5: e18357 (2016)
2. Shirozu R, Yashiroda H, Murata S. Proteasome Impairment Induces Recovery of Mitochondrial Membrane Potential and an Alternative Pathway of Mitochondrial Fusion. **Mol Cell Biol.** 36(2):347-62 (2015)
3. Hamazaki J, Hirayama S, Murata S. Redundant Roles of Rpn10 and Rpn13 in Recognition of Ubiquitinated Proteins and Cellular Homeostasis. **PLoS Genet.** 11(7):e1005401. (2015)
4. Tomita T, Hamazaki J, Hirayama S, McBurney MW, Yashiroda H, Murata S. Sirt1-deficiency causes defective protein quality control. **Sci Rep.** 5:12613. (2015)
5. Shirozu R, Yashiroda H, Murata S. Identification of minimum Rpn4-responsive elements in genes related to proteasome functions. **FEBS Lett.** 589(8):933-40. (2015)
6. Yashiroda H, Toda Y, Otsu S, Takagi K, Mizushima T, Murata S. N-terminal  $\alpha 7$  deletion of the proteasome 20S core particle substitutes for yeast PI31 function. **Mol Cell Biol.** 35(1):141-52. (2015)
7. Bai M, Zhao X, Sahara K, Ohte Y, Hirano Y, Kaneko T, Yashiroda H, Murata S. Assembly mechanisms of specialized core particles of the proteasome. **Biomolecules.** 4(3):662-77. (2014)
8. Pack CG, Yukii H, Toh-e A, Kudo T, Tsuchiya H, Kaiho A, Sakata E, Murata S, Yokosawa H, Sako Y, Baumeister W, Tanaka K, Saeki Y. Quantitative live-cell imaging reveals spatio-temporal dynamics and cytoplasmic assembly of the 26S proteasome. **Nat Commun.** 5:3396. (2014)



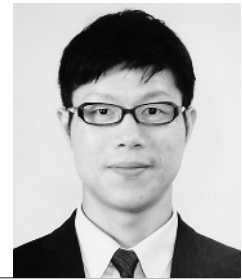
# 時差時における脳内時間環境の恒常性を担う神経分子メカニズムの解明

(平成26年度～平成27年度)

公募

山口 賀章

京都大学・薬学研究科・助教



## 研究の背景と目的

睡眠障害や生活習慣病といったシフトワーカー（交替制勤務者）の健康問題が叫ばれて久しい。この病態は、慢性時差勤務による概日リズム異常に基づくと考えられ、ジェット機による海外旅行時に陥る時差症候群と同じく、体内時計と外界時間（実生活の時間）のズレによって起こる。このような、明暗環境の急激な変動により、脳内時間環境の恒常性が損なわれるメカニズムは不明であったが、我々は、概日リズムの中核である視交叉上核（SCN）の分子時間生物学研究を通して、神経ペプチド・バソプレッシンの受容体であるV1aとV1bを介したSCN内の局所神経回路が欠損したマウスでは、明暗環境を変化させたときに生じる時差症状が完全に消失することを報告した。しかしながら、SCNの神経細胞において、バソプレッシンのシグナルが、どのような分子メカニズムで時差に関与するのかは依然として不明である。そこで、我々は、レポーターマウスから採取したSCN切片培養を用いて、SCN細胞振動におけるV1aとV1bの役割を解析する研究を開始させた。

## 研究成果

### (1) SCNのV1aとV1bは細胞振動の位相差を形成する：

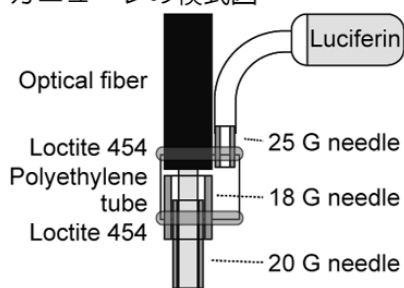
我々は、お茶の水女子大学の郡宏先生とのコラボレーションにより、SCNのAVP神経結合に基づいた数理モデルを構築したところ、AVP結合がないV1aV1bダブルノックアウト（DKO）マウスのSCNをシミュレーションした場合には、時差

環境下で瞬時に再同調することを再現できた。さらに、この数理モデルから、V1aV1bDKOマウスの場合では、AVP細胞間の位相差が小さくなると予想された。そこで、実際にSCNの切片培養を用いて検討したところ、野生型（WT）マウスのSCN神経細胞はV1aV1bDKOのよりも倍ほどの位相差を持って振動していること、WTのSCNにV1aとV1bのアンタゴニストを投与するとSCN神経細胞間の振動位相差が有意に小さくなることがわかった。上記の結果はAVP神経結合がSCN神経細胞間の位相差を形成することを示すものであるが、「細胞間コミュニケーションが振動を同期させる」という既存の定説と全く逆であり、極めて興味深い。

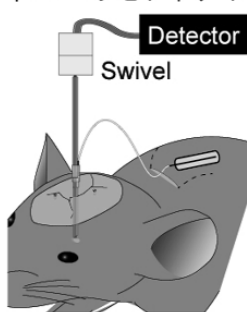
### (2) V1a/V1bコンディショナルKOマウス：

我々はこれまでに全身でV1aとV1bを欠損したマウスを使用していたため、どの臓器・組織でのV1aとV1bが時差を制御するかは不明であった。そこで、各々のコンディショナルノックアウトマウスを作製することで、V1aおよびV1b受容体のそれぞれが、体のどの部位で、どのようなシグナル伝達を介して時差を制御するかを同定し、システム的な時差のメカニズムを解明することを試みている。これまでに、標的エクソンをloxP配列で挟んだV1aとV1bそれぞれのコンディショナルノックアウトマウス（floxマウス）を作製し、floxマウスと組織・臓器特異的Creマウスとを交配させ、V1aおよびV1bの組織・臓器特異的KOマウスを作製した。野生型マウスと比

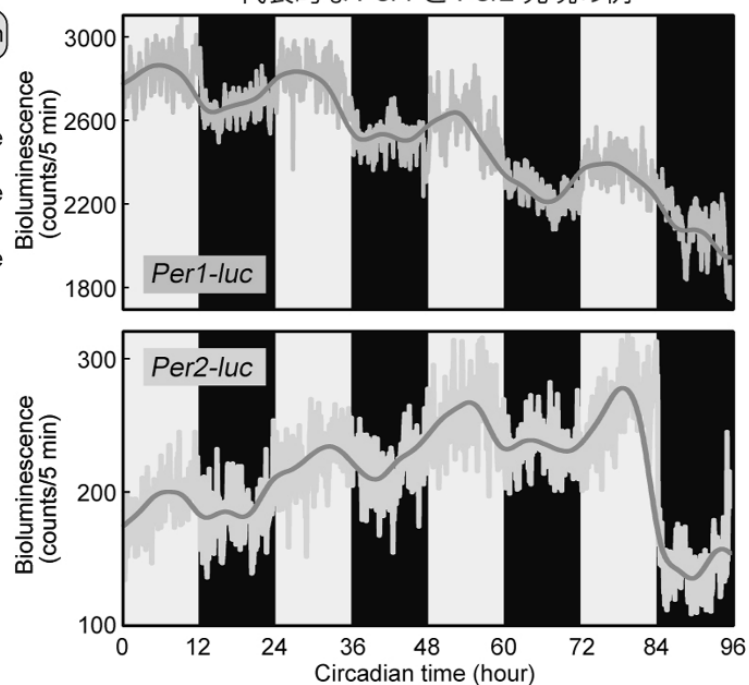
カニューレの模式図



光ファイバーのセットアップ図



代表的な Per1 と Per2 発現の例



自由行動下ラットの視交叉上核における時計遺伝子 Per1 と Per2 発現のリアルタイム計測

較して、V1aあるいはV1bそれぞれの全身ノックアウトマウスは、有意に早く時差に再同調する。従って、V1aあるいはV1bの組織・臓器特異的KOマウスを、野生型およびそれぞれの全身KOマウスと比較する。

### (3) 自由行動下ラットSCNにおける時計遺伝子振動のリアルタイムモニタリング：

概日振動の分子基盤は、時計遺伝子による転写・翻訳を介したネガティブフィードバック機構である。主要な時計遺伝子であるPer1とPer2は、SCNにて極めて安定に発現振動することが知られている。我々はこれまでに、4時間毎にサンプリングしたSCNを用いて、時差環境下ではこれらの発現振動が著しく減弱することを報告したが、例えば時差への再同調における行動変化と時計遺伝子の発現変動の関係や、SCN個々の細胞における概日振動が時差環境下でどのように変動するのかは依然として不明である。そこで我々は、Per1あるいはPer2のプロモーターでルシフェラーゼ (luc) を発現する2種類のトランスジェニックラット (Per1-lucラットおよびPer2-lucラット) を用いて、時計遺伝子の発現振動を自由行動下のラットSCNより計測する研究を行った。ラットSCNに光ファイバーを挿入し、ルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを浸透圧ポンプによりSCNに持続投与したところ、Per1-lucラットおよびPer2-lucラットのどちらを用いた場合でも、長期間にわたって明瞭な概日リズムを示す生体発光を計測した (図)。これらの発光リズムを解析したところ、振動の大きさは共におよそ2倍であり、周期長はどちらも24時間であった。しかし、振動のピーク時刻は異なっており、Per1-lucの発光ピークは主観的明期中頃に、Per2-lucの発光ピークはそれより3時間程度遅れていた。これらのピーク時間の違いは、レーザーマイクロダイセクション法を用いて単離したSCNのサンプルを用いたリアルタイムPCR法による定量によっても示された。

### 結語

今後は、新たに構築したV1aとV1bの時差環境下における行動の再同調を測定して、時差を制御するV1aとV1bのシステム的な解明を行う。また、時差のようなSCNの時間恒常性が破綻するような環境下で、Per1やPer2がどのように変動するかをモニターし、これらの再同調過程や行動リズムとの関連を解明したい。

### 主要研究成果

#### 原著論文

1. Yamaguchi Y, Okada K, Mizuno T, Ota T, Yamada H, Doi M, Kobayashi M, Tei H, Shigeyoshi Y, Okamura H. Real-Time Recording of Circadian Per1 and Per2 Expression in the Suprachiasmatic Nucleus of Freely Moving Rats. **J Biol Rhythms** 31: 108-111, (2016).
2. Suehiro K, Nakamura Y, Xu S, Uda Y, Matsumura T, Yamaguchi Y, Okamura H, Yamashita T, Takei Y. Ectodomain phosphorylation promotes functional recovery from spinal cord injury. **Sci Rep** 4: 4972, (2014).

### 総説

1. Yamaguchi Y. Molecular and Neural Mechanisms for the Robustness of the Circadian Clock. **Yakugaku Zasshi** 135: 1265-1272, (2015).
2. 山口 賀章, 岡村 均. 時差をつかさどる視交叉上核のバソプレッシン神経回路. **生化学** 86: 687-692, (2014).



# 脳内環境を制御する神経幹細胞の恒常性変化

(平成26年度～平成27年度)

公募

菅田 浩司

慶應義塾大学・医学部・専任講師



## 研究の背景と目的

スペインの脳解剖学者であるカハール (Santiago Ramon y Cajal) は、成体の脳においてニューロンは新生も再生もしないとする趣旨の説を1928年に提唱し、この概念は神経幹細胞の特徴を示すドグマとして長らく信じられて来た。しかし、1962年にAltmanがラットの成体脳においてニューロン新生が行われている事を報告して以降、様々な動物種や実験手法によって同様の結果が報告されてきた。1998年にはErikssonらによって、成人脳においても終生にわたってニューロン新生が行われている事が報告された。現在では、側脳室下帯や海馬歯状回では成体においてもニューロン新生が行われている事が知られている。しかしながら、成体においてはほとんどの神経幹細胞はグリア細胞に分化するか、分裂を休止するか、細胞死によって除去されるため、発達期と比較すると神経幹細胞の可塑性と増殖能力は著しく低下している。

一方で近年の研究から、成体における神経幹細胞は様々な生理的・病的刺激によって増殖が再活性化する事が明らかになっている。さらに、成人におけるニューロン新生の低下が気分障害や鬱など、様々な疾患と関連する可能性が指摘されていることから、成体における神経幹細胞の可塑性の変化は中枢神経系の機能維持に極めて重要な役割を果たしていると考えられる。

増殖を休止した神経幹細胞の再活性化を研究する上で最も大きな課題は、ヒトを含めた哺乳類動物では、再活性化するポテンシャルを有する休止期神経幹細胞が脳のどこに、どれだけ、どういった状態で維持されているかが今だに明確でない点である。そのため、解析そのものを非常に困難にしている。一方で、私たちが研究モデルとして用いているショウジョウバエにおいては、逆にほぼ全ての神経幹細胞が特定の発生時期に一旦休止期に入り、その後分裂を再活性化する事が知られている。従って、ショウジョウバエは休止期神経幹細胞の再活性化機構を解析する上で優れたモデル系である。

我々はショウジョウバエの強力な遺伝学を応用する事で、中枢神経系の発生・分化を制御する遺伝子についての研究を行ってきた。一連の解析の過程で、脂質代謝酵素の機能欠失型変異体において、神経幹細胞に特異的に細胞死が誘導される表現型を見出した。本公募研究ではこの遺伝子の機能欠失型変異体の解析を通じて、休止期神経幹細胞が再活性化を受ける際の分子レベルでの制御機構の解明を試みた。

## 研究成果

### (1) 再活性化時の神経幹細胞特異的な細胞死：

特異的な抗体を作成してその発現パターンを解析したところ、発生初期から成虫に至るまで、中枢神経系を含むほぼ全身で発現が認められた。また、変異体における細胞死に関して時系列を追って解析したところ、この細胞死は発生初期の神経幹細胞では観察されないにもかかわらず、休止期を経て再活性化する時期に顕著に増加する事を見出した。さらに、細胞死が観察され始めた直後から個体の成長と生存率がともに著しく低下することから、神経幹細胞への毒性と個体レベルの毒性との相関が予想された。

### (2) 細胞死を誘導する責任臓器の同定：

この特徴的な細胞死の原因となる臓器を特定するために、細胞死に対する in vivo でのレスキュー実験を行なった。10種類

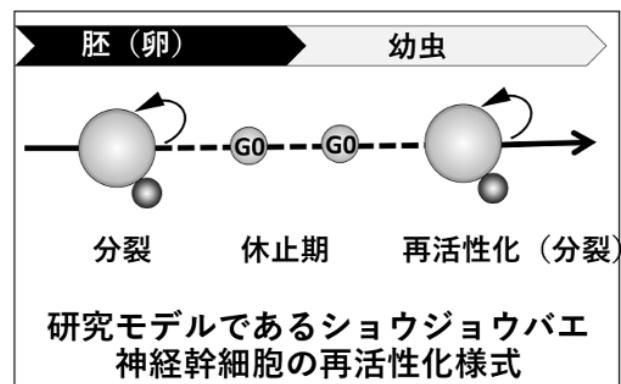
の組織特異的発現系統を用いて解析を行なったところ、興味深いことに、レスキューコンストラクトを神経幹細胞に強制的に発現させても細胞死は抑制できないのに対して、ニューロンに発現させると極めて顕著に抑制できる事を見出した。また、他の臓器への発現では抑制できなかった。これらの結果は、ニューロンが神経幹細胞の再活性化を制御している事、及び変異体内ではその分子機構が破綻している可能性を示唆している。

### (3) 細胞死を実行する分子機構の解析：

遺伝学的な解析並びに生化学的な手法を用いてニューロンのサブタイプの同定を試みた。その結果、現在までの解析ではコリン作動性神経の関与を示唆する結果を得ている。本神経サブタイプは再活性化時の脳内での存在比率が高く、少なくともその一部は神経幹細胞と接していることを見出した。後者では、質量分析の一種である imaging Mass Spectrometry (IMS) を用いて、変異体脳内において変化する神経伝達物質の検出を試みた。その結果、変異体ではアセチルコリン量が増加していることを見出した。従って、変異体ではコリン作動性神経が野生型と比較して異常に活性化していると考えられる。現在、脂質代謝酵素が制御する一連の分子機構について詳細な解析を進めている。

## 結語

増殖を休止した神経幹細胞が再活性化するためには、適切な量の活性化誘導シグナルが適切なタイミングで入力される必要があると考えられる。また、このシステムは周囲の神経によって制御されている可能性が高いと考えられる。



## 主要研究成果

### 原著論文

1. Bertolin AP, Katz MJ, Yano M, Acevedo J, Pozzi B, Blanco-Obregon D, Gandara L, **Kanda H**, Okano H, Srebrow A and Wappner P. 'Musashi mediates translational repression of the Hypoxia Inducible Factor.' **Nucl. Acid Res.** 44(16), 7555-67, 2016.

### 総説

1. 菅田浩司、岡野栄之「4D 蛍光イメージングのためのライトシート顕微鏡」 **Medical Science Digest** 41(9), 278-279, 2015.



# 間葉系幹細胞による脳内環境の維持および破綻からの回復メカニズムの解明

(平成26年度～平成27年度)



公募

平井 宏和

群馬大学・医学系研究科・教授

## 研究の背景と目的

生体には恒常性を維持する仕組みがあり、遺伝、環境、加齢の3者が複雑に影響し合って恒常性に障害を与える。恒常性が破綻すると神経細胞は変性へと進み、やがて脱落する。遺伝性脊髄小脳失調症1型（Spinocerebellar ataxia type 1: SCA1）は、原因遺伝子ATXN1をコードするゲノム領域に存在するCAG繰返し配列の異常伸長が原因の遺伝性神経変性疾患である。患者は小脳、脳幹を中心に広く中枢神経系が障害される。根本的な治療法は見つかっていない。これまでの多くの研究により変異遺伝子から作られるATXN1タンパク質に起因する細胞内恒常性の破綻が原因であることが明らかになってきた。重要なことは、変異遺伝子をもつ患者も中壮年期の発症までは全く異常が見られないということで、強力な恒常性維持機構が存在し、発症まで遺伝子変異による悪化（変性促進）要因に打ち勝っていたと考えられる。

恒常性維持に関わる防御因子には、ユビキチン-プロテアソーム経路やオートファジーによる変異分子の分解、シャペロン分子による凝集阻止に加えて、脳へ遊走する間葉系幹細胞（Mesenchymal stem cell: MSC）と神経細胞との融合、およびMSCからの栄養因子の放出が考えられる。これまでにSCA1モデルマウスの小脳に4種類の幹細胞や単球を投与した

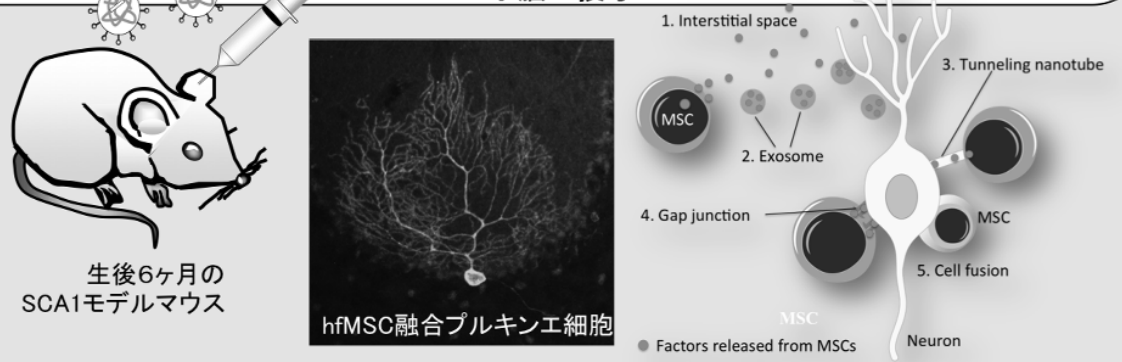
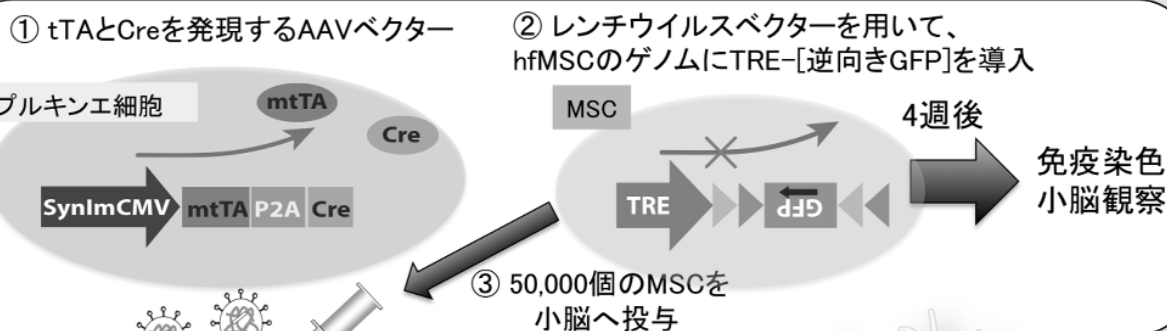
ところ、MSCを投与したときのみに有意に運動失調の進行が抑えられ、小脳病態の進行も抑えられることを明らかにした（Matsuura et al. Cerebellum 2014）。このことからMSCはSCA1や他の神経変性疾患に対する細胞治療として使用できる可能性があると考えられた。髄腔内に投与したMSCがSCA1病態を緩和するメカニズムとして、1) MSCからの栄養因子の放出、2) MSCがニューロンに分化して変性ニューロンと置き換わる、3) MSCが変性ニューロンと融合して変性から回復させる、などが考えられた。MSCからの栄養因子放出やMSCがニューロンへと分化することはこれまでに報告されている。しかし、MSCが変性ニューロンに融合することは明確には示されていない。そこで本研究では、SCA1モデルマウスの小脳に投与したヒト胎児由来（human fetal; hf）MSCが変性ニューロンに融合することを明確に示すことを目的とした。

## 研究成果

### (1) hfMSCと小脳プルキンエ細胞との融合：

hfMSCとマウス小脳のニューロンが本当に融合するのかを調べるために、我々はFlip excisionを用いた（図）。まずレンチウイルスベクターをhfMSCに感染させてhfMSCのゲノムに

## 間葉系幹細胞による脳内環境の維持および破綻からの回復メカニズムの解明（代表：平井宏和）



間葉系幹細胞は、変性しているプルキンエ細胞とのみ融合する。

生後6ヶ月のSCA1モデルマウス

hfMSC融合プルキンエ細胞

TRE- (逆向きGFP) を挿入した。次に6ヶ月齢の変性が進んだSCA1モデルマウスの小脳に、ニューロン特異的プロモーター制御下でテトラサイクリントランスアクトベーター (tTA) とCreリコンビナーゼを発現するアデノ随伴ウイルスベクターを投与した。投与2週間後のマウスの小脳に、TRE- (逆向きGFP) をもつhfMSC50,000個を注入した。hfMSCがニューロンに融合すると、hfMSCゲノムの“逆向きGFP”がCreの働きで正しい向きに組み替えられ、さらにtTAがTREプロモーターに結合してGFPが産生されると考えられる (hfMSCのニューロンへの分化では、GFPを発現しない)。hfMSCを投与してから2ヶ月後にSCA1モデルマウスの小脳を観察したところ、GFPでラベルされたプルキンエ細胞と抑制性介在ニューロン (星状細胞とバスケット細胞) が確認され、hfMSCがこれらのニューロンと融合したと考えられた (図) (Huda et al. PLoS One 2016)。

## (2) MSCの培養上清による脊髄運動ニューロンの編成抑制:

MSCの培養上清をSCA1ノックインマウスに髄注、あるいは静脈投与したところ、有意にロータロッドの成績が向上した。脊髄運動ニューロンを観察したところ、髄注、静脈投与のいずれにおいても運動ニューロン変性が有意に抑制されていた (Suto et al. CNS Neurosci Ther 2016)。

## 結語

脊髄小脳失調症において、MSCが変性ニューロン選択的に融合すること、MSCから分泌される成分がニューロンの変性を抑制し、運動失調の進行を抑えることを明らかにした。本成果は根本的な治療法のない神経変性疾患の治療法につながるものであり、今後の臨床応用も視野に入れて研究を継続していきたい。

## 主要研究成果

### 原著論文

1. Huda F, Fan Y, Suzuki M, Konno A, Matsuzaki Y, Takahashi N, Chan JK, Hirai H. Fusion of Human Fetal Mesenchymal Stem Cells with "Degenerating" Cerebellar Neurons in Spinocerebellar Ataxia Type 1 Model Mice. **PLoS One**, (2016) Nov 1;11(11):e0164202. doi: 10.1371/journal.pone.0164202.
2. Matsuzaki Y, Konno A, Mukai R, Honda F, Hirato M, Yoshimoto Y, Hirai H. (2016) Transduction Profile of the Marmoset Central Nervous System Using Adeno-Associated Virus Serotype 9 Vectors. **Mol Neurobiol**, (2016) Feb. 16 (Epub ahead of print). DOI: 10.1007/s12035-016-9777-6
3. Arsenault J, Gholizadeh S, Niibori Y, Pacey LK, Halder SK, Koxhioni E, Konno A, Hirai H, Hampson DR. FMRP Expression Levels in Mouse CNS Neurons Determine Behavioral Phenotype. **Hum Gene Ther** (2016) Sep 7 (Epub ahead of print)
4. Suto N, Mieda T, Iizuka A, Nakamura K, Hirai H. Morphological and Functional Attenuation of Degeneration of Peripheral Neurons by Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium in Spinocerebellar Ataxia Type 1-Knock-in Mice. **CNS Neurosci Ther** 22 (8):670-6, (2016)
5. Conceicao M, Mendonca L, Nobrega C, Gomes C, Costa P, Hirai H, Moreira JN, Lima MC, Manjunath N, Pereira de Almeida L. Intravenous administration of brain-targeted stable nucleic acid lipid particles alleviates Machado-Joseph disease neurological phenotype. **Biomaterials** 82:124-37, (2016)
6. Mieda T, Suto N, Iizuka A, Matsuura S, Iizuka H,

Takagishi K, Nakamura K, Hirai H. Mesenchymal stem cells attenuate peripheral neuronal degeneration in spinocerebellar ataxia type 1 knockin mice. **J Neurosci Res** 94(3):246-52, (2016)

7. Iizuka A, Matsuzaki Y, Konno A, Hirai H. (2016) Plasticity of the developmentally arrested staggerer cerebellum in response to exogenous ROR $\alpha$ . **Brain Struct Funct** 221(6):2879-89, (2016)
8. Nobrega C, Carmo-Silva S, Albuquerque D, Vasconcelos-Ferreira A, Vijayakumar UG, Mendonca L, Hirai H, Pereira de Almeida L. Re-establishing ataxin-2 downregulates translation of mutant ataxin-3 and alleviates Machado-Joseph disease. **Brain** 138(Pt 12):3537-54, (2015)
9. Duarte-Neves J, Goncalves N, Cunha-Santos J, Simoes AT, den Dunnen WF, Hirai H, Kugler S, Cavadas C, Pereira de Almeida L. Neuropeptide Y mitigates neuropathology and motor deficits in mouse models of Machado-Joseph disease. **Hum Mol Genet** 24(19): 5451-63, (2015)
10. Kusakari S, Saitow F, Ago Y, Shibasaki K, Sato-Hashimoto M, Matsuzaki Y, Kotani T, Murata Y, Hirai H, Matsuda T, Suzuki H, Matozaki T, Ohnishi H. Shp2 in forebrain neurons regulates synaptic plasticity, locomotion, and memory formation in mice. **Mol Cell Biol** 35 (9):1557-72, (2015)
11. Matsuura S, Shuvaev AN, Iizuka A, Nakamura K, Hirai H. Mesenchymal stem cells ameliorate cerebellar pathology in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 1. **Cerebellum** 13(3):323-30, (2015)

## 総説

1. Nakamura K, Mieda T, Suto N, Matsuura S, Hirai H. (2015) Mesenchymal stem cells as a potential therapeutic tool for spinocerebellar ataxia. **Cerebellum** 14 (2):165-70, (2015)



# 脳神経系の形成と発達を制御する 脳内環境の解明

(平成26年度～平成27年度)

公募

河崎 洋志

金沢大学・脳・肝インターフェイスメディスン研究センター・教授



## 研究の背景と目的

発生および発達過程において脳神経系が誤りなく正しく形成されることは、適切な脳機能の獲得に必須である。従って、脳神経系の形成と発達を制御するメカニズムの解明およびその異常が引き起こす疾患病態の解明は社会的にも重要である。そこで我々はマウスとフェレットを用いて、環境要因と遺伝要因の二つを切り口として脳神経系の形成と発達の制御メカニズムの解析を行った。

## 研究成果

### (1) マウス大脳皮質の発達における環境要因の重要性：

哺乳類の生涯で最も劇的な環境の変化は「出生」(=母親から生まれ出ること)と言える。この急激な環境の変化に対して新生子の脳神経系は対応を迫られることは想像に難くないが、出生が脳神経系の発達に及ぼす影響はあまりわかっていなかった。

我々は、マウス大脳皮質の体性感覚野での神経回路の発達に、出生が重要な役割を担っていることを見出した。体性感覚野には体性感覚地図が存在しており、とくにマウスのヒゲに対応する組織構築はバレルと呼ばれる。

バレルは新生子マウスが生まれて数日のうちに形成されることから、出生がバレル形成のトリガーになっていると仮説を立てた。この仮説を検証するために人為的に早産をおこし、早産で生まれたマウス(早産マウス)と通常の時期に生まれたマウス(正常産マウス)とでバレル形成時期を比較した。その結果、早産マウスでは正常産マウスに比べてバレルが早期に形成していることを見いだした。この結果は、出生がバレル形成のトリガーとして働いていることを示唆している。

出生の下流に位置する分子機構を探索したところ、脳内環境の一つとも言える細胞外セロトニン濃度が重要な役割を果たしていることを見いだした。まず、脳脊髄液中のセロトニン濃度が出生後に著しく減少すること、このセロトニン減少の時期が早産により早まることを見いだした。さらにセロトニン減少を阻害するとバレル形成が阻害され、促進するとバレル形成も促進されたことから、出生→細胞外セロトニン減少→バレル形成

という制御機構があることが明らかとなった。

続いて、我々は出生後に始まる行動として哺乳行動に注目した。新生子が母親の乳首を探索し吸い付くまでの潜時は、出生後に急速に短くなるが、早産マウスでは潜時の短縮が早期に起こることを見いだした。この結果は、出生は解剖学的な発達のみならず、行動の発達も制御していることを意味している。

### (2) フェレット大脳皮質の発達を制御する脳内環境と遺伝要因：

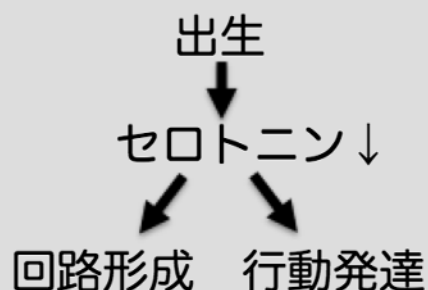
ヒトに比べてマウスでは大脳皮質が未発達であることから、高等哺乳動物に特徴的な脳構造の解析はマウスでは困難である。そこで、よりヒトに近い大脳皮質を持つ高等哺乳動物を用いた分子遺伝学的研究が重要になってきている。我々はとくに高等哺乳動物の大脳皮質の表面にあるシワ(脳回)に着目して研究を進めている。脳回は大脳皮質の高機能化の基盤となる重要な構造と考えられており、滑脳症や多小脳回症など脳回異常疾患の病態解明も重要である。

我々は、脳回を持つ高等哺乳動物フェレットに着目し研究を進めてきた。我々はフェレット用cDNAマイクロアレイを独自に作成し、高等哺乳動物で特徴的な発現分布を示す遺伝子を同定してきた。さらに子宮内エレクトロポレーション法を応用し、フェレットの大脳皮質での遺伝子操作法の確立に成功した。

これらの技術を用いて、発生期フェレット大脳皮質において将来に脳回になる部分にTbr2が多く発現していることを見いだした。さらにTbr2機能阻害により、脳回の形成が障害された。従ってTbr2は脳回の形成に重要である。さらにTbr2機能阻害により大脳皮質の表面側の神経細胞が減少していたことから、Tbr2が大脳皮質の表面側の神経細胞を増やすことで脳回が生じると考えている。

また、脳回の形成異常疾患である多小脳回症(polymicrogyria)の疾患モデルフェレットを作成した。多小脳回症は文字通りに「小さい脳回が多くできる疾患」である。過去にヒト多小脳回症の遺伝子解析がなされFGF受容体3の活性化型変異が報告されていた。そこで、FGF受容体3を活性化させるFGF8

## 脳神経系の発生と発達を制御する脳内環境





をフェレット大脳皮質に導入したところ多小脳回症を再現することに成功した。この多小脳回症フェレットでは大脳皮質の表面側の神経細胞が増加していた。従って、FGF受容体活性化により大脳皮質表面側の神経細胞が増加し、小さい脳回が多くできると考えている

### 結語

我々はマウスとフェレットを用いて、セロトニンやFGFなどの脳内環境に重要な分子を明らかにした。この研究を遂行する機会を頂いた新学術領域「脳内環境」に感謝致します。

### 主要研究成果

#### 原著論文

1. Sato C., Iwai-Takekoshi L., Ichikawa Y. and Kawasaki H., Cell type-specific expression of FoxP2 in the ferret and mouse retina, **Neuroscience Research**, in press.
2. Ebisu H., Iwai-Takekoshi L., Fujita-Jimbo E., Momoi T. and Kawasaki H., Foxp2 regulates identities and projection patterns of thalamic nuclei during development, **Cerebral Cortex**, in press
3. Inoue N., Ikawa Y., Sato A., Yokoi A., Kuroda M., Nomura K., Sakai S., Tajima H., Ikeda H., Ebisu H., Kawasaki H., Ohta T. and Yachie A., Immunostaining of sulfatide-storing macrophages in gallbladder of a patient with metachromatic leukodystrophy, **Pediatric Neurology**, 64, e3-4, 2016
4. Ghosh H., Auguadri L., Battaglia S., Simone Thirouin Z., Zemoura K., Messner S., Acuna M. A., Wildner H., Yevenes G. E., Dieter A., Kawasaki H., Hottiger M. O., Zeilhofer H. U., Fritschy J.-M. and Tyagarajan S. K., Several posttranslational modifications act in concert to regulate gephyrin scaffolding and GABAergic transmission, **Nature Communications**, 7, 13365, 2016
5. Toda T., Shinmyo Y., Dinh D. T. A., Masuda K. and Kawasaki H., An essential role of SVZ progenitors in cortical folding in gyrencephalic mammals, **Scientific Reports**, 6, 29578, 2016
6. Hoshiya Y., Toda T., Ebisu H., Wakimoto M., Yanagi S. and Kawasaki H., Sox11 balances dendritic morphogenesis with neuronal migration in the developing cerebral cortex, **Journal of Neuroscience**, 36, 5775-5784, 2016
7. Shinmyo Y., Tanaka S., Tsunoda S., Hosomichi K., Tajima A. and Kawasaki H., CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in the mouse brain using in utero electroporation, **Scientific Reports**, 6, 20611, 2016
8. Shinmyo Y., Riyadh M. A., Ahmed G., Naser I. B., Hossain M., Takebayashi H., Kawasaki H., Ohta K. and Tanaka H., Draxin from neocortical neurons controls the guidance of thalamocortical projections into the neocortex, **Nature Communications**, 6, 10232, 2015
9. Sadakane O., Masamizu Y., Watakabe A., Terada S., Ohtsuka M., Takaji M., Mizukami H., Ozawa K., Kawasaki H., Matsuzaki M. and Yamamori T., Long-term two-photon calcium imaging of neuronal populations with subcellular resolution in adult non-human primates, **Cell Reports**, 13, 1989-1999, 2015
10. Masuda K., Toda T., Shinmyo Y., Ebisu H., Hoshiya Y., Wakimoto M., Ichikawa Y. and Kawasaki H., Pathophysiological analyses of cortical malformation using gyrencephalic mammals, **Scientific Reports**, 5, 15370, 2015
11. Sadakane O., Watakabe A., Ohtsuka M., Takaji M., Sasaki T., Kasai M., Isa T., Kato G., Nabekura J., Mizukami H., Ozawa K., Kawasaki H. and Yamamori T., In vivo two-photon imaging of dendritic spines in marmoset neocortex, **eNeuro**, 2, e0019-15, 2015
12. Wakimoto M., Sehara K., Ebisu H., Hoshiya Y., Tsunoda S., Ichikawa Y. and Kawasaki H., Classic cadherins mediate selective intracortical circuit formation in the mouse neocortex, **Cerebral Cortex**, 25, 3535-3546, 2015
13. Fujishiro T., Kawasaki H., Aihara M., Saeki T., Yamagishi R., Atarashi T., Mayama C. and Araie M., Establishment of an experimental ferret ocular hypertension model for the analysis of central visual pathway damage, **Scientific Reports**, 4, 6501, 2014
14. Toda T. and Kawasaki H., The development of suckling behavior of neonatal mice is regulated by birth, **Molecular Brain**, 7, 8, 2014

### 総説

1. Shinmyo Y. and Kawasaki H., CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in the mouse brain using in utero electroporation, **Current Protocols in Neuroscience**, in press.
2. Shinmyo Y., Masuda K., Hoshiya Y., Ebisu H. and Kawasaki H., Molecular investigations of the structure and development of the brain of carnivores, in **Brain Evolution by Design**, Shigeno S., Murakami Y. and Nomura T. eds., Springer Publishers, New York, in press
3. Kawasaki H., Spatio-temporal regulation of the formation of the somatosensory system, **Development, Growth & Differentiation**, 57, 193-199, 2015
4. Kawasaki H., Genetic manipulation of gyrencephalic carnivores using in utero electroporation, in **Electroporation Methods and Neuroscience**, Saito T. ed., Springer Publishers, New York, 2015, pp105-113
5. Kawasaki H., Molecular investigations of the brain of higher mammals using gyrencephalic carnivore ferrets, **Neuroscience Research**, 86, 59-65, 2014



## 中枢神経傷害後の脳内環境変化による髄鞘修復の促進

(平成26年度～平成27年度)

公募

村松 里衣子

大阪大学大学院・医学系研究科所・准教授



### 研究の背景と目的

炎症や外傷により脳脊髄組織が傷つくと、様々な神経症状が現れる。時間がたつにつれて、程度の差はあるものの、症状は自然回復する。症状の回復は、傷ついた神経組織が修復したためと考えられている。本研究では、髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトの傷害時の応答について、末梢のホルモンとの関連に着目した。

正常時、脳内環境は、血液脳関門や血液脳脊髄関門が形成する強固なバリア機能により、末梢環境と隔離されている。しかし、病態ではしばしばバリア機能が障害されるため、末梢環境に備わる分子が、脳脊髄に漏出する。研究代表者らは、末梢の備わる分子の中から、発生期のオリゴデンドロサイトの発達に影響を与えるレプチンに注目し、レプチンが中枢神経傷害後のオリゴデンドロサイトに与える作用を探索した。

### 研究成果

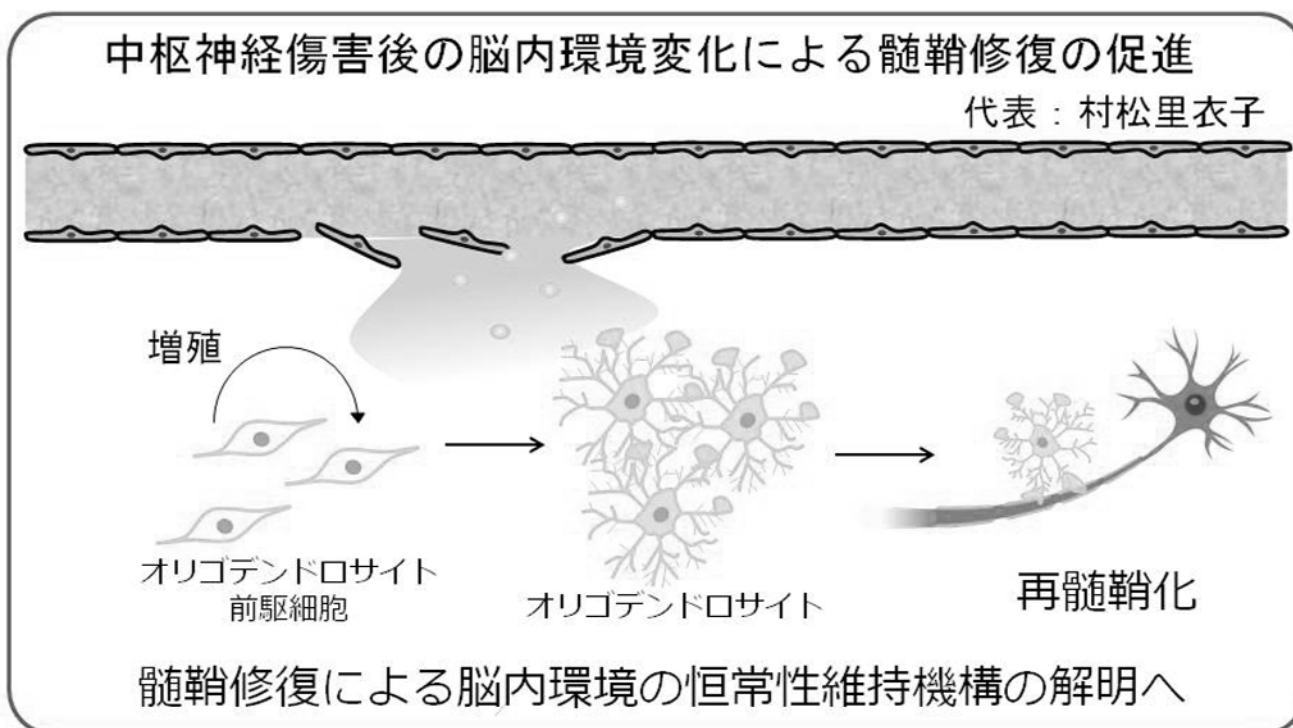
#### (1) レプチンによるオリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖効果：

髄鞘の形成は、オリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖、遊走、そして成熟オリゴデンドロサイトへの分化の3つのステップから成る。最初のステップであるオリゴデンドロサイト前駆細胞 (oligodendrocyte precursor cell, OPC) の増殖に対してレプチンが作用するか検討するため、脳と脊髄からそれぞれ PDGFR $\alpha$ 陽性オリゴデンドロサイト前駆細胞を採取し、同細胞におけるレプチン受容体の発現を免疫染色法により確認した。同細胞をレプチン存在下で培養し、BrdU取り込み能を測定したところ、レプチン処置群ではBrdUの取り込みが高まってお

り、このことからレプチンがOPCの増殖を促進させることがわかった。レプチン受容体は、細胞内でERKのリン酸化を亢進する作用を持つことが知られており、またERKのリン酸化は髄鞘の形成に必要と指摘されている。レプチンによるOPCの増殖効果にもERKが関わるか薬理的な検討を行った。その結果、U0126を予め処置した上でレプチンを添加したOPCでは、U0126非処置群と比較しBrdUの取り込みが抑制された。このことから、レプチンによるOPCの増殖にはERKのリン酸化が必要であることが示唆された。

#### (2) 内在性のレプチンが髄鞘の自然修復に寄与：

脱髄後の髄鞘の自然修復にはOPCの増殖が必要である。脱髄後のOPCの増殖に、内在するレプチンが寄与するか検討するため、マウスの脊髄背側にLysophosphatidylcholine (LPC) を局所的に注入して脱髄巣を作成するモデルを使用した。LPC注入後に、患部にレプチン中和抗体を処置し、OPCの増殖および髄鞘の修復を評価した。コントロール群と比較しレプチン中和抗体処置群では、BrdU陽性OPCが少なく、またLPC注入領域周囲のMBP陽性エリアも狭かった。このことから、内在性のレプチンが、脱髄後のOPCの増殖と髄鞘修復を促進させることが示唆された。続いて、内在性のレプチンが末梢臓器由来か、あるいはLPC注入により中枢神経系で産生量が増えるか検討するため、LPC注入後の脊髄組織でのレプチンタンパク質量およびmRNA量を測定した。LPC注入領域周囲のレプチンタンパク質量はコントロール群より多く、一方で同領域でのレプチンmRNAレベルは群間に差がなかった。また、intact マウス、LPC注入マウスからそれぞれ脳を含む全身の臓



器を採取し、レプチンタンパク質量を測定したところ、脂肪におけるレプチンタンパク質量が他臓器と比較して多く、またLPC注入の有無により各臓器におけるレプチンタンパク質量に有意な差は認められなかった。さらに、レプチンの受容体発現を中枢神経系で観察したところ、OPC以外にもGFAP陽性アストロサイト、NeuN陽性神経細胞がレプチン受容体を発現していたが、その発現量はLPC注入の有無により差はなかった。このことから、脂肪細胞が恒常的に産生しているレプチンが、LPC注入に伴い脳内に漏出し、OPCの作用していることが示唆された。

### (3) OPCのレプチン受容体が髄鞘修復に必要：

レプチンがOPCに直接働きかけ、髄鞘修復を促すかを検討するため、OPC特異的にレプチン受容体を欠失するコンディショナルノックアウトマウスを作成した。コントロール群と比較し、本コンディショナルノックアウトマウスでは、LPC注入後に見られるOPCの増殖数が少なく髄鞘の修復も阻害された。このことから、OPCに発現するレプチン受容体が、髄鞘の修復を支持していることが示唆された。

### 結語

中枢神経傷害後の髄鞘修復に関して、特に末梢のレプチンの寄与を見出した。本研究は、病態における脳内環境の変化として、末梢環境の重要性を解明したものであり、脳内環境の恒常性の回復に関するメカニズムの一端を示唆するものである。

### 主要研究成果

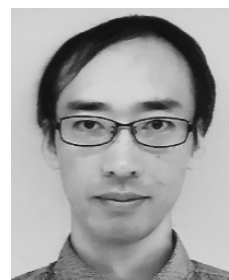
#### 原著論文

1. Matoba K, Muramatsu R, Yamashita T. Leptin sustains spontaneous remyelination in the adult central nervous system. **Scientific Reports**, (2017) 7: 40397



# 脳内環境がスパイン形態可塑性に与える影響の解析

(平成26年度～平成27年度)



公募

野口 潤

国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 微細構造研究部 室長

## 研究の背景と目的

樹状突起スパインは海馬や大脳皮質などの神経細胞樹状突起に見られる長さ1 μm程度のトゲ状の構造である。樹状突起スパインはシナプス後部構造であり、多くの精神・神経疾患において、大脳皮質等のスパイン形態の異常やスパイン密度の対照群との差異が見出される。スパイン形態はシナプス機能を反映しており、シナプス可塑性にともないスパイン形態の変化も生じる。このことから、スパイン形態は生理機能や病態の指標となりうる。

生理的な神経細胞の情報処理機構を理解する上でも、疾患の進展の機序を理解する上でも、シナプス可塑性情報の神経細胞内あるいは神経細胞外（あるいは他の細胞）への伝播制御機構を解明することは重要である。我々は、スパイン形態可塑性（スパイン収縮）が近隣のスパインに伝播する場合があるという結果を得ていたため、今回さらにシナプス長期増強あるいは長期抑制刺激時にスパイン形態可塑性情報がどのように拡散あるいは保持されるかを詳細に解析した。

## 研究成果

### (1) シナプス可塑性におけるアクチン結合タンパク質動態制御の解析

ラット幼若海馬培養スライス標本においてシナプス長期抑制 (Long-term depression; LTD) 刺激をケイジドグルタミン酸の2光子アンケイジングを用いて単一スパインに与えると、刺激されたスパインの収縮が生じ、このスパイン収縮は樹状突起に沿って近隣のスパインにも広がった。

スパイン形態可塑性はシナプス後部である樹状突起スパインにおいてアクチン重合の制御によって実行されるので、我々はアクチン線維切断タンパク質 cofilin に着目して解析した。まず cofilin 活性化酵素の阻害ペプチドによってスパイン収縮は抑制された。次に cofilin を海馬神経細胞内に還流したところ、スパイン収縮が見られたことから、cofilin タンパク質の神経細胞樹状突起内での拡散がスパイン収縮を制御していることが示唆された。

一方、長期増強 (Long-term potentiation; LTP) 刺激条件において、刺激を受けたスパインの体積増大の後、リン酸化 cofilin はスパイン内に～1時間滞留することがわかった。このことから、リン酸化 cofilin が可塑性情報の短時間の保持に関与している可能性が示唆された。

### (2) シナプス前部機能プローブの開発

我々はシナプス後部（スパイン）からシナプス前部に伝達される可塑性情報を検討するために、シナプス前部機能を定量的に明らかにする光学プローブの開発をまず実施した。

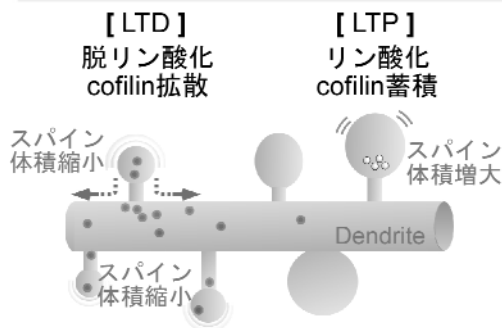
我々はラット海馬培養スライス標本を用いて、シナプス前終末の機能を、SNAREタンパク質 (Syntaxin1A ? VAMP2) の複合体形成、すなわちシナプス小胞の docking の程度により定量化することを試みた。SNAREタンパク質間の FRET (Forster resonance energy transfer) を2光子励起蛍光寿命法で測定することによって、SNAREタンパク質の複合体形成を定量化したところ、以下のことが明らかになった：①シナプス前終末のスパインと相対する位置にSNARE複合体形成が高い領域が見出された。これは active zone (AZ) と呼ばれるシナプス小胞が細胞膜に docking する部位に相当すると考えられた。②シナプス前終末のSNARE複合体形成と樹状突起スパイン体積は正に相関することが分かった。このことから、シナプス前終末とシナプス後部の生理的機能は何らかの機構で関連づけられていることがリアルタイムに確認できた。

### (3) シナプス前部機能プローブを用いたシナプス結合の判定

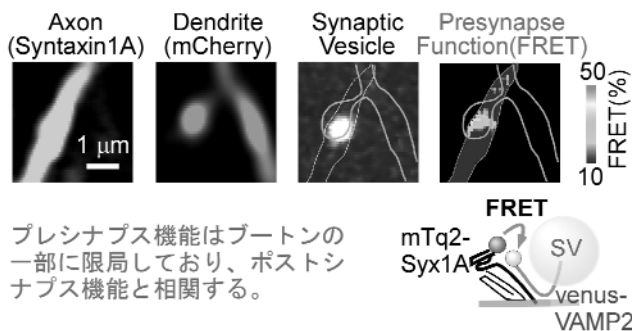
上記で開発したプローブを利用してシナプス結合の有無を評価する試みを実施した。ラット海馬培養スライス標本のCA1錐体細胞シナプス後部のみを標識するために PSD95-mCherry 融合タンパク質をシナプス後部（スパイン）に発現させ、SNARE複合体を検出するシナプス前部機能プローブをCA3錐体細胞に発現させることによって Schaffer 側枝軸索に発現させた。予備的な実験では、シナプス後部局在タンパク質

## 脳内環境がスパイン形態可塑性に与える影響の解析 (代表: 野口 潤)

### 1. シナプス可塑性におけるアクチン結合タンパク質動態制御の解析



### 2. シナプス後部（スパイン）機能とシナプス前部機能の相互作用の解析



プレシナプス機能はブートンの一部に限局しており、ポストシナプス機能と相関する。

可塑性情報の細胞内あるいは細胞外への伝播の生理的意義と病態における役割の解明。

PSD95と、シナプス前部機能 (putative AZ) は近接して局在する場合が観察された。

## 結語

神経細胞シナプス可塑性刺激条件と可塑性情報の拡散との関係について今回ラット海馬培養スライス標本を用いて検討した。試験した条件において、LTP刺激条件ではスパイン形態可塑性が刺激スパイン内に留まり、LTD刺激条件ではスパイン形態可塑性が刺激スパインから拡散した。そのメカニズムについて検討した結果、cofilinタンパク質のリン酸化によってcofilinタンパク質の滞留と拡散が制御されることが示唆された。

一方、スパインからシナプス前部に拡散する可塑性情報の有無を調べるために、シナプス前部の機能プローブを作製し、実際にシナプス前部機能のリアルタイム測定を行った。

その結果、シナプス前部機能と、そのシナプス前部とシナプス結合していると推定される樹状突起スパインの機能は相関することが明らかとなった。また、シナプス前部機能プローブを用いることで、シナプス結合の判定ができる可能性が示唆された。このことは光学顕微鏡によるコネクトミクス解析に適用可能と考えられる。今後、シナプス後部 (スパイン) に生じたシナプス可塑性がシナプス前部に伝達されるメカニズムを解析する。

## 主要研究成果

### 原著論文

1. Noguchi J, Hayama T, Watanabe S, Ucar H, Yagishita S, Takahashi N, Kasai H. State-dependent diffusion of actin-depolymerizing factor/cofilin underlies the enlargement and shrinkage of dendritic spines. **Sci Rep** 6: 32897, (2016).
2. Takehara H, Nagaoka A, Noguchi J, Akagi T, Kasai H, Ichiki T. Implantable Microfluidic Device with Hydrogel Permeable Membrane for Delivering Chemical Compounds and Imaging Neural Cells in Living Mice. **J Photopolym Sci Technol** 29: 513-518, (2016).
3. Nagaoka A, Takehara H, Hayashi-Takagi A, Noguchi J, Ishii K, Shirai F, Yagishita S, Akagi T, Ichiki T, Kasai H. Abnormal intrinsic dynamics of dendritic spines in a fragile X syndrome mouse model in vivo. **Sci Rep** 6: 26651, (2016).
4. Takahashi N<sup>#</sup>, Sawada W<sup>#</sup>, Noguchi J<sup>#</sup>, Watanabe S<sup>#</sup>, Ucar H, Hayashi-Takagi A, Yagishita S, Ohno M, Tokumaru H, Kasai H. (#Equally contributed). Two-photon fluorescence lifetime imaging of primed SNARE complexes in presynaptic terminals and  $\beta$  cells. **Nat Commun** 6: 8531, (2015).
5. Takehara H, Nagaoka A, Noguchi J, Akagi T, Kasai H, Ichiki T. Lab-on-a-brain: Implantable micro-optical fluidic devices for neural cell analysis in vivo. **Sci Rep** 4: 6721, (2014).
6. Boinapally S, Huang B, Abe M, Katan C, Noguchi J, Watanabe S, Kasai H, Xue B, Kobayashi T. Caged Glutamates with  $\pi$ -Extended 1,2-Dihydronaphthalene Chromophore: Design, Synthesis, Two-Photon Absorption Property, and Photochemical Reactivity. **J Org Chem** 79: 7822-7830, (2014).



## 新規イメージング技術による 疾患モデルマウスの解析

(平成26年度～平成27年度)

公募

高橋 琢哉

横浜市立大学医学部生理学・教授



### 研究の背景と目的

精神神経疾患の多くは脳内環境の破綻により生ずると考えられている。脳における興奮性シナプスの大半を占めるグルタミン酸シナプスを中核的に担っているのがグルタミン酸受容体であるAMPA受容体である。AMPA受容体はげっ歯類を中心とした研究により神経系脳発現を中心的に仲介していることが明らかになっており、脳内環境を制御する重要な分子である。また、様々な病態とも密接な関係があることが示唆されている。一方で、人疾患における直接的な関与についての研究は難航している。

### 研究成果

#### (1) 統合失調モデルマウスの解析

統合失調症の家系でNogo受容体のloss of functionが近年報告されたが、統合失調症モデルマウスとしてNogo受容体欠損マウスの解析を行った。Nogo受容体欠損マウスのバレル皮質においてAMPA受容体のシナプス移行が亢進していることが示された。さらに、スパイン表面のGluA1を二光子顕微鏡でin vivoイメージングする新規イメージング技術を開発した。本技術を用いてNogo受容体欠損マウスのバレル皮質を観察したところ、欠損マウスにおいてはスパイン表面のGluA1が増加していることが明らかになった。

#### (2) 社会的隔離ラットの解析

社会的隔離ラットの内側前頭前野においてAMPA受容体のシ

ナプス移行が低下していることを見出した。この現象がADF/cofilinの不活性化によって仲介されていること、アクチンの流動性の低下によって仲介されていることも見出した。さらにこの細胞生物学的な現象を介して、ラットの攻撃性が上がることも示した。

#### (3) AMPA受容体ラベル化法の開発

AMPA受容体を生体動物において非侵襲的にイメージングする方法の開発を行っており、イメージング候補化合物の絞り込みに成功した。

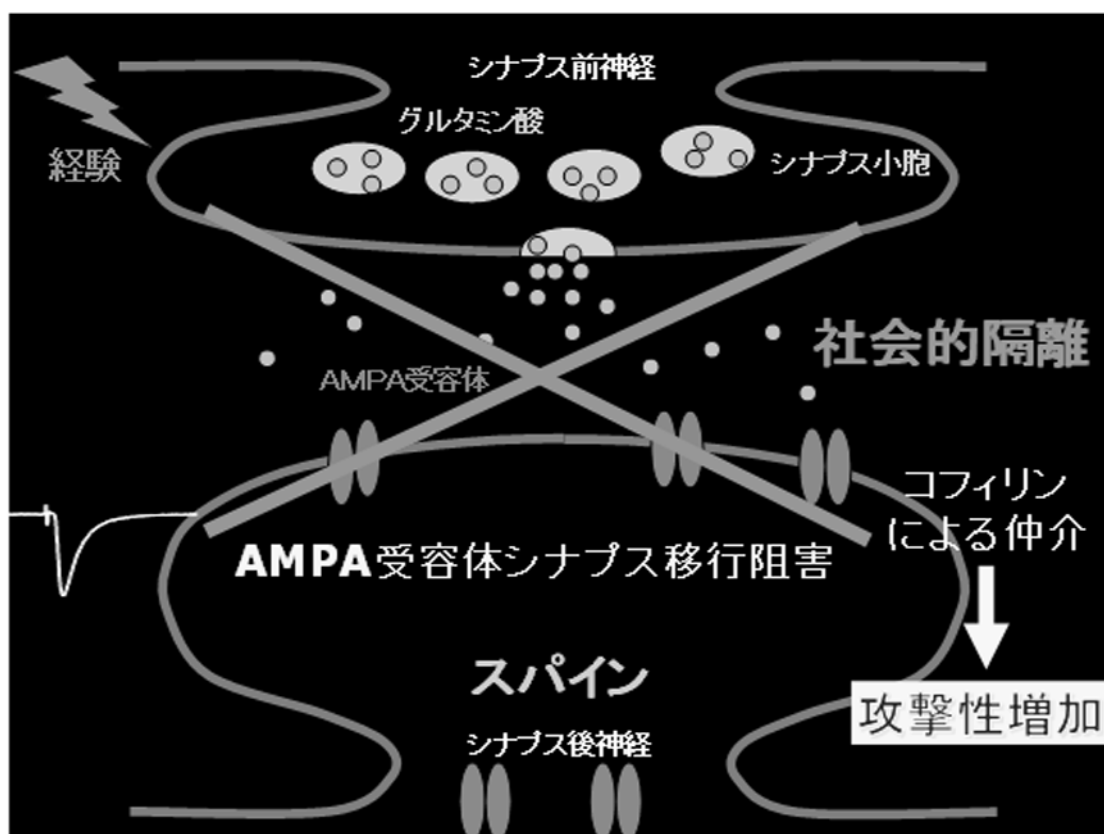
### 結語

AMPA受容体のシナプス移行を中心に疾患モデル動物の解析を行っている。その過程で、スパイン表面のAMPA受容体をin vivoで観察する新規イメージング技術を開発した。さらに非侵襲的に解析する方法を開発中である。

### 主要研究成果

#### 原著論文

1. Tada H, Koide M, Ara W, Shibata Y, Funabashi T, Suyama K, Goto T, Takahashi T. Estrous Cycle-Dependent Phasic Changes in the Stoichiometry of Hippocampal Synaptic AMPA Receptors in Rats. Plos One, (2015) ;10(6):e0131359.
2. Jitsuki S, Nakajima W, Takemoto K, Sano A, Tada H,



Takahashi-Jitsuki A, Takahashi T. Nogo Receptor Signaling Restricts Adult Neural Plasticity by Limiting Synaptic AMPA Receptor Delivery. *Cerebral Cortex*, (2016) 26(1); 427+439

Nakajima W, Jitsuki S, Sano A, Takahashi T. Sustained Enhancement of Lateral Inhibitory Circuit Maintains Cross Modal Cortical Reorganization. *PLoS One*, (2016) 11(2): e0149068.

4. Tada H, Miyazaki T, Takemoto K, Takase K, Jitsuki S, Nakajima W, Koide M, Yamamoto N, Komiya K, Suyama K, Sano A, Taguchi A, and Takahashi T. Neonatal isolation augments social dominance by altering actin dynamics in the medial prefrontal cortex. *PNAS*, (2016) 1606351113.
5. Takemoto K, Iwanari H, Tada H, Suyama K, Sano A, Nagai T, Hamakubo T, and Takahashi T. Optical inactivation of synaptic AMPA receptors erases fear memory. *Nature Biotechnology*, (2016)  
doi: 10.1038/nbt.3710.





# 班会議・領域シンポジウム



## 平成23年度冬の班会議

2012年1月28日(土) - 29日(日) KKRホテル熱海

## 1月28日(土)

14:00 領域代表者 挨拶

A01	座長	高橋 良輔	
14:05~14:25	A01	高橋 良輔	タンパク分解系障害による脳内環境変調と神経変性メカニズム
14:25~14:45	A01	漆谷 真	TDP-43のフォールディングにおけるRRM2ドメイン内構造の役割
14:45~15:05	A01	佐藤 栄人	ドーパミン神経特異的オートファジー欠損マウスが呈する凝集体の特徴と細胞死への関与
15:05~15:25	A01	内山 安男	神経軸索におけるタンパク質分解機構とその破綻
A01	座長	内山 安男	
15:40~16:00	A01	内匠 透	神経細胞におけるRNA障害と脳内環境の関連研究
16:00~16:20	A02	山中 宏二	脊髄環境の恒常性維持とその破綻：グリアー神経連関からみた神経変性機序の解明
16:20~16:40	A02	三澤日出巳	ALSモデルマウスの病状進行に伴う免疫調節タンパク質オステオポンチンの運動神経から神経外環境への放出と凝集
特別講演	座長	木山 博資	
16:40~17:10	特別講演	岡澤 均	凝集前タンパク質をターゲットとするハンチントン病の治療戦略
17:10~17:50	特別講演	田中 啓二	不良ミトコンドリアをモニターするPINK1/Parkinシステムの作動機構

## 1月29日(日)

特別講演	座長	山中 宏二	
9:00~9:40	特別講演	岡野 栄之	iPS細胞を用いた神経再生・疾患・創薬研究
A02	座長	樋口 真人	
9:40~10:00	A02	木山 博資	脳内環境の破綻を制御する新たなグリア・神経間応答機構の探索とその機能解析
10:00~10:20	A02	吉澤 明生	Optineurin-ALS優性変異E478Gは直鎖状ユビキチン結合能が低下する
10:35~10:55	A02	加藤 英政	脳内環境構成細胞の導出を妨げるヒトiPS細胞にまつわる『初期値』の是正
10:55~11:15	A03	樋口 真人	毒性伝達機構の分子イメージングを基軸とした神経変性疾患研究

## 平成24年度夏の班会議

2012年7月23日(月) - 24日(火) TKPガーデンシティ仙台

### 7月23日(月)

13:30~13:35 領域代表 挨拶

A01	座長	内匠	透、内山 安男
14:00~14:25	A01	田中 敦	脳内環境を維持するためのオートファジーの役割
14:25~14:50	A01	柳 茂	ミトコンドリア機能と破綻による神経疾患
14:50~15:15	A01	松田 憲之	パーキンソン病発症を予防するミトコンドリアストレス応答機構
15:15~15:40	A01	岡野 洋尚	遅発性小脳失調モデル動物を用いた軸索変性機序の解明
16:00~16:25	A01	木下 彩栄	インスリンシグナル調節破綻を介したアルツハイマー病の病態の解明
16:25~16:50	A01	服部 信孝	脳内環境における封入体形成のメカニズム：封入体と神経細胞死の関連性について

### 7月24日(火)

A02, A03	Chairpersons: Dr. Koji Yamanaka, Dr. Makoto Higuchi, Dr. Hiroshi Kiyama		
9:00~9:25	A02	Dr. Hideyuki Takeuchi	Neurotoxic microglia-targeted therapy for neurodegeneration
9:25~9:50	A02	Dr. Takayuki Nakagawa	Involvement of interaction between CNS-infiltrating peripheral immune cells and spinal glia in peripheral nerve injury-induced neuropathic pain
9:50~10:15	A02	Dr. Hiroshi Ohnishi	Signaling through direct cell-cell contact: functional roles of SIRP family membrane proteins in the brain
10:35~11:00	A02	Dr. Asanuma Masato	Development of astrocyte-targeted neuroprotective drugs based on region-specific features of astrocytes
11:00~11:25	A02	Dr. Kazuo Funabiki	Development of micro-endoscope for micro-scopic analysis of brain environment in vivo.
11:25~12:05	A02	Dr. Tony Wyss-Coray	Adult neural progenitor cells as regulators of microglial function.

## 平成24年度冬の班会議

2013年1月16日(水) - 17日(木) 京都大学医学部芝蘭会館

## 1月16日(水)

13:00~13:05 代表挨拶

A01	座長	内山 安男	
13:05~13:15	A01	高橋 良輔	運動ニューロン特異的26Sプロテアソーム欠損は筋萎縮性側索硬化症の臨床経過・病理所見を再現する
13:15~13:25	A01	漆谷 真	RNA認識モチーフ1 (RRM1) のコンフォメーション異常によるTDP-43蛋白質の病原性獲得について
13:25~13:35	A01	五十嵐道弘	リン酸化プロテオミクスに基づくリン酸化神経病態学の確立
13:35~13:45	A01	碓井 理夫	樹状突起の異常交差に起因する“てんかん様症状”の発症機構の追究
13:45~13:55	A01	岡野ジェイムス洋尚	遅発性小脳失調モデル動物を用いた軸索変性機序の解明
13:55~14:05	A01	山口 賀章	時差症候群の分子機構の解明とその治療に関する研究
A01	座長	高橋 良輔	
14:05~14:15	A01	小池 正人	神経軸索におけるタンパク分解機構とその破綻
14:15~14:25	A01	岡村 康司	ミクログリアの活性酸素産生と亜鉛シグナル調節因子としてのプロトンチャネル
14:25~14:35	A01	渡邊 究	アストロサイトから放出されるIGFBP-3がニューロンに及ぼす影響とアルツハイマー病との関連
14:35~14:45	A01	高島 明彦	加齢脳におけるタウの生理機能維持とその破綻機構
14:45~14:55	A01	田中 敦	脳内環境を維持するためのオートファジーの役割
14:55~15:05	A01	鶴田 文憲	後シナプスでのタンパク質代謝とミクログリアによる監視機構
A01	座長	服部 信孝	
15:30~15:40	A01	黒坂 哲	変異TLS/FUS発現ALSモデルマウスを用いた神経変性機構の解析
A01	座長	服部 信孝	
15:40~15:50	A01	野中 隆	神経変性における細胞内TDP-43凝集体の意義の解明
15:50~16:00	A01	橋本 款	新規レビー小体型認知症モデルマウスを用いたワクチン療法の開発
16:00~16:10	A01	広常 真治	神経疾患における細胞内輸送の障害:細胞質ダイニンの制御と破綻
16:10~16:20	A01	松田 憲之	パーキンソン病発症を予防するミトコンドリアストレス応答機構の解析
16:20~16:30	A01	松本 弦	ストレス条件下における選択的オートファジーの制御機構
A01	座長	内匠 透	
16:30~16:40	A01	服部 信孝	遺伝性パーキンソン病におけるParkinの多様な分子病態機序
16:40~16:50	A01	萬代 研二	脳内環境の恒常性の維持機構におけるネクチンとアフアディンの機能
16:50~17:00	A01	宮川 剛	海馬歯状回の恒常性維持機能の理解とその神経細胞内メカニズムの解明
17:00~17:10	A01	柳 茂	ミトコンドリア機能と破綻による神経疾患
17:10~17:20	A01	山中 智行	転写因子NF-Yを介した新たな神経維持・変性機構の解明
17:20~17:30	A01	若月 修二	軸索変性の分子細胞生物学的解析とその治療応用に関する研究
A02	座長	川上 秀史	
17:30~17:40	A02	檜山 武史	脳内環境破綻時のアストロサイトNaxチャンネルの役割
17:40~17:50	A02	宮井 和政	シナプス可塑性の恒常的維持機構の解明と神経機能再建への応用
17:50~18:00	A02	下川 哲昭	胎児期における脳内環境の破綻と育児放棄の発症機序の解明

## 1月17日(木)

A02	座長	加藤 英政	
9:30~9:40	A02	森野 豊之	Optineurin変異導入マウスの作製
9:40~9:50	A02	柴崎 貢志	てんかん発症に伴う脳内温度環境変化と病態悪化のクロスリンク
9:50~10:00	A02	浅沼 幹人	アストロサイトの部位特異的プロファイルがもたらす脳内環境と神経保護
10:00~10:10	A02	大海 雄介	脳内環境におけるガングリオシド糖鎖の分別的役割の解明
10:10~10:20	A02	大倉 正道	小脳バーグマングリア微小突起によるシナプス修飾の維持・破綻に関する研究
10:20~10:30	A02	大西 浩史	SIRP $\alpha$ を介した細胞間接触シグナルによる脳内免疫系制御機構
A02	座長	三澤日出巳	
10:30~10:40	A02	木山 博資	脳内環境の破綻を制御する新たなグリア・神経間応答機構の探索とその機能解析
10:40~10:50	A02	加藤 総夫	シナプス伝達維持におけるアストロサイト・ニューロン間エネルギー共生機構の解明

10:50～11:00	A02	田口 明子	脳老化と神経変性疾患発症の分子機構の解明
11:00～11:10	A02	竹居光太郎	内在性Nogo受容体アンタゴニストLOTUSによる脳内環境制御
11:10～11:20	A02	竹内 英之	ミクログリアの毒性転換の制御による神経変性疾患の新規治療法開発
11:20～11:30	A02	田中 謙二	グリア細胞操作を起点とする神経活動変化と伝播様式解析
<b>A02 座長 木山 博資</b>			
13:00～13:10	A02	山中 宏二	脊髄環境の恒常性維持とその破綻：グリアー神経連関からみた神経変性機序の解明
13:10～13:20	A02	三澤日出巳	ALSモデルマウス脊髄におけるアルファー運動ニューロン由来の微小環境修飾因子の解析
13:20～13:30	A02	俵山 寛司	海馬形成における、神経栄養因子としてのDraxin機能の解析
<b>A02 座長 木山 博資</b>			
13:30～13:40	A02	富田 泰輔	神経炎症反応によって制御される脳内アミロイド代謝システムの分子機構
13:40～13:50	A02	富永 真琴	脳内温度・浸透圧の感知メカニズムとその破綻？脳神経細胞やミクログリア細胞に発現するTRPV4, TRPM2の脳内環境センシングメカニズムと生理的意義？
<b>A02 座長 山中 宏二</b>			
13:50～14:00	A02	加藤 英政	確実にiPS細胞から脳内細胞の誘導を可能にする新規ヒトiPS細胞作製法の開発
14:00～14:10	A02	中川 貴之	末梢神経損傷により中枢移行する免疫系細胞とグリア細胞連関による中枢神経機能変化
14:10～14:20	A02	華山 力成	グリア細胞の貪食作用による脳内環境の維持機構とその破綻
14:20～14:30	A02	古川 良明	シーディングによる脳内環境の破綻伝播メカニズムの解明
14:30～14:40	A02	奥野 龍禎	新規神経栄養因子としてのB細胞刺激因子（BAFF）とそのALSモデルマウスにおける役割
14:40～14:50	A02	山田 清文	アストログリア細胞のエンドサイトーシスの障害による神経発達障害
<b>A03 座長 漆谷 真</b>			
15:20～15:30	A03	樋口 真人	毒性伝達機構の分子イメージングを基軸とした神経変性疾患研究
<b>A03 座長 樋口 真人</b>			
15:30～15:40	A03	柿澤 昌	内因性チャンネルを用いた脳内レドックス環境イメージングと老化・病態脳研究への応用
15:40～15:50	A03	菊池 昭夫	多系統萎縮症およびパーキンソン病における脳内 $\alpha$ -シヌクレイン蛋白凝集体のPETによる画像化
15:50～16:00	A03	遠山 育夫	フッ素MR画像法と光画像法によるアミロイドオリゴマーのin vivo病態解析
16:00～16:10	A03	林 崇	脳内環境変化による興奮性シナプス制御の分子イメージング解析
16:10～16:20	A03	船曳 和雄	脳内環境のミクロ解析を可能にする顕微内視鏡システムの開発
16:20～16:30	A03	矢尾 育子	質量分析イメージングによる脳内環境の可視化
16:30～16:40	A03	米田 誠	パーキンソン病および関連神経変性疾患のPET酸化ストレスイメージング

## 平成25年度夏の班会議

2013年8月29日(木) - 30日(金) 京都大学医学部芝蘭会館

## 8月29日(木)

13:15～ 領域代表

## シンポジウムⅠ 座長 木山 博資、山中 宏二

A02	田中 謙二	グリア細胞操作を起点とする神経活動変化と伝播様式解析
A02	大倉 正道	小脳バグマングリア微小突起によるシナプス修飾の維持・破綻に関する研究
A02	檜山 武史	Na <sup>+</sup> レベルセンサーNa <sub>x</sub> の感度はエンドセリン-3によって増強されている
A02	富永 真琴	一脳神経細胞やミクログリア細胞に発現するTRPV4, TRPM2の脳内環境センシングメカニズムと生理的意義
A02	富田 泰輔	神経炎症反応によって制御される脳内アミロイド代謝システムの分子機構

## 特別講演1 座長 内山 安男

特別講演 山下 俊英 中枢神経回路の障害と修復を制御する生体システム

## 8月30日(金)

## シンポジウムⅡ 座長 樋口 真人、川上 秀史

A03	柿澤 昌	内因性チャンネルを用いた脳内レドックス環境イメージングと老化・病態脳研究への応用
A03	林 崇	脳内環境変化による興奮性シナプス制御の分子イメージング解析
A03	米田 誠	パーキンソン病および関連神経変性疾患のPET酸化ストレスイメージング
A03	樋口 真人	毒性伝達機構の分子イメージングを基軸とした神経変性疾患研究

## シンポジウムⅢ 座長 服部 信孝、内匠 透

A01	岡村 康司	ミクログリアの活性酸素産生と亜鉛シグナル調節因子としてのプロトンチャンネル
A01	野中 隆	患者脳に蓄積したTDP-43のプリオン様性質
A01	内山 安男	神経軸索におけるタンパク分解機構とその破綻
A01	高橋 良輔	タンパク分解系障害による脳内環境変調と神経変性メカニズムに関する研究

## 特別講演2 座長 高橋 良輔

特別講演 水島 昇 オートファジーの生理的意義と分子機構：特に神経系との関わり

## 平成25年度冬の班会議

2014年1月8日(水) - 9日(木) 東京ガーデンパレス

## 1月8日(水)

13:00~13:05 代表挨拶

A01	座長	服部 信孝	
13:05~13:15	A01	山下 博史	オプチニューリン機能喪失はNF- $\kappa$ B経路を介して細胞死を引き起こす
13:15~13:25	A01	漆谷 真	ミスフォールド型TDP-43のユビキチン・プロテアソーム分解系における2 cullin-2型 E3複合体の関与についての研究
13:25~13:35	A01	五十嵐道弘	リン酸化プロテオミクスに基づくリン酸化神経病態学の確立
13:35~13:45	A01	碓井 理夫	樹状突起の異常交差に起因する“てんかん様症状”の発症機構の追及
13:45~13:55	A01	岡野ジェイムス洋尚	遅発性小脳失調モデル動物を用いた軸索変性機序の解明
13:55~14:05	A01	山口 賀章、岡村 均	時差症候群の分子機構の解明とその治療に関する研究
A01	座長	内匠 透	
14:05~14:15	A01	佐藤 栄人、服部 信孝	遺伝性パーキンソン病PARK9 (ATP13A2) の分子病態とリソソームの障害
14:15~14:25	A01	岡村 康司、河合 喬文	ミクログリアの活性酸素産生と亜鉛シグナル調節因子としてのプロトンチャンネル
14:25~14:35	A01	渡邊 究	アストロサイトから放出されるIGFBP-3がニューロンに及ぼす影響とアルツハイマー病との関連
14:35~14:45	A01	高島 明彦	加齢脳におけるタウの生理機能維持とその破綻機構
14:45~14:55	A01	田中 敦	脳内環境を維持するためのオートファジーの役割-ミトコンドリア崩壊像から見えてきた新たなオートファジーの生理的役割-
14:55~15:05	A01	鶴田 文憲	RNAスプライシング異常による神経疾患発症の分子メカニズム
A01	座長	内山 安男	
15:30~15:40	A01	内匠 透	神経細胞におけるRNA障害と脳内環境の関連研究
15:40~15:50	A01	山下万貴子 野中 隆	全長TDP-43あるいはC末断片凝集体により誘導される異なる神経細胞毒性メカニズムの解明
15:50~16:00	A01	橋本 款	新規シヌクレイントランスジェニックマウスモデルを用いた病態解明及び治療法の開発(シヌクレイノパチー病態におけるアディポネクチンの治療効果について)
16:00~16:10	A01	松田 憲之	パーキンソン病発症を予防するミトコンドリアストレス応答機構の解析
16:10~16:20	A01	松本 弦	ストレス条件下における選択的オートファジーの制御機構
A01	座長	高橋 良輔	
16:20~16:30	A01	内山 安男	神経軸索におけるタンパク分解機構とその破綻
16:30~16:40	A01	萬代 研二	脳内環境の恒常性の維持機構におけるネクチンとアフアディンの機能
16:40~16:50	A01	宮川 剛	海馬歯状回の恒常性維持機能の理解とその神経細胞内メカニズムの解明
16:50~17:00	A01	柳 茂	ミトコンドリア機能と破綻による神経疾患
17:00~17:10	A01	山中 智行	転写因子NF-Yを介した新たな神経維持・変性機構の解明
17:10~17:20	A01	若月 修二	軸索変性の分子細胞生物学的解析とその治療応用に関する研究
A02	座長	山中 宏二	
17:20~17:30	A02	桐生寿美子、木山 博資	神経損傷とミトコンドリアダイナミクス
17:30~17:40	A02	柴崎 貢志	てんかん発症に伴う脳内温度環境変化と病態悪化のクロスリンク
17:40~17:50	A02	富田 泰輔	神経炎症反応によって制御される脳内アミロイド代謝システムの分子機構
17:50~18:00	A02	奥野 龍禎、望月 秀樹	ALSモデルマウスに対するプロスタグランジンI2アゴニストの効果について

## 1月9日(木)

A02	座長	加藤 英政	
9:30~9:40	A02	遠藤 史人、山中 宏二	ALSの疾患進行におけるアストロサイト由来TGF- $\beta$ 1の役割
9:40~9:50	A02	中川 貴之	末梢神経損傷により中枢移行する免疫系細胞とグリア細胞連関による中枢神経機能変化
9:50~10:00	A02	富永 真琴	脳内温度・浸透圧の感知メカニズムとその破綻?脈絡層上皮細胞に発現するTRPV4の脳内環境センシングメカニズムと生理的意義?(自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター)
10:00~10:10	A02	浅沼 幹人	アストロサイトの部位特異的プロファイルがもたらす脳内環境と神経保護 Brain environment and neuroprotection based on region-specific features of astrocytes
10:10~10:20	A02	大海 雄介	脳内環境におけるガングリオシド糖鎖の分別的役割の解明
10:20~10:30	A02	大倉 正道	小脳パーグマングリア微小突起によるシナプス修飾の維持・破綻に関する研究

A02	座長	川上 秀史	
10:30~10:40	A02	加藤 英政	TET1はヒトiPS細胞の脳神経への分化能を向上させる
10:40~10:50	A02	大西 浩史	神経-ミクログリア接触シグナルによる脳内環境制御メカニズムの解明
10:50~11:00	A02	加藤 総夫	シナプス伝達維持におけるアストロサイト・ニューロン間エネルギー共生機構の解明
11:00~11:10	A02	桑原 知子	The regulation of neural stem cell in the hippocampus and the olfactory bulb under the diabetes
11:10~11:20	A02	下川 哲昭	胎児期における脳内環境の破綻と育児放棄の発症機序の解明
11:20~11:30	A02	田口 明子	脳老化と神経変性疾患発症の分子機構の解明
A02	座長	三澤日出巳	
13:00~13:10	A02	森野 豊之、川上 秀史	Perrault 症候群の新規原因遺伝子の同定
13:10~13:20	A02	竹居光太郎	内在性Nogo受容体アンタゴニストLOTUSによる脳内環境制御
13:20~13:30	A02	堀内 浩、竹内 英之	IL-19によるミクログリア炎症抑制機構の解明
13:30~13:40	A02	田中 謙二	グリア細胞操作を起点とする神経活動変化と伝播様式解析
13:40~13:50	A02	華山 力成	グリア細胞の貪食作用による脳内環境の維持機構とその破綻
13:50~14:00	A02	檜山 武史	末梢神経軸索切断後の再生におけるNaxチャンネルの役割
A02	座長	漆谷 真	
14:00~14:10	A02	三澤日出巳	ALSモデルマウスにおけるグリア-神経連関と脳内炎症：発症初期の運動ニューロンから放出され細胞外マトリクスに蓄積するグリア活性化因子
14:10~14:20	A02	古川 良明	筋萎縮性側索硬化症に見られる変異型FUS/TLSタンパク質の凝集メカニズム
14:20~14:30	A02	宮井 和政	シナプス可塑性の恒常的維持機構の解明と神経機能再建への応用
14:30~14:40	A02	山田 清文	アストログリア細胞のエンドサイトーシスの障害による神経発達障害
A03	座長	漆谷 真	
14:40~14:50	A03	樋口 真人	毒性伝達機構の分子イメージングを基軸とした神経変性疾患研究
A03	座長	樋口 真人	
15:20~15:30	A03	柿澤 昌	内因性チャンネルを用いた脳内レドックス環境イメージングと老化病態脳研究への応用
15:30~15:40	A03	菊池 昭夫、武田 篤	多系統萎縮症およびパーキンソン病における脳内 $\alpha$ -シヌクレイン蛋白凝集体のPETによる画像化
15:40~15:50	A03	遠山 育夫	フッ素MR画像法と光画像法によるアミロイドオリゴマーのin vivo病態解析
15:50~16:00	A03	林 崇	脳内環境変化による興奮性シナプス制御の分子イメージング解析
16:00~16:10	A03	船曳 和雄	脳内環境のin vivoでのミクロ解析を可能にする顕微内視鏡システムの開発と、その背側線条体投射ニューロンの報酬・忌避刺激に対するPKA, ERK応答解析への応用
16:10~16:20	A03	矢尾 育子	質量分析イメージングによる脳内環境の可視化
16:20~16:30	A03	米田 誠	パーキンソン病および関連神経変性疾患のPET酸化ストレスイメージング



## 平成26年度夏の班会議

2014年7月24日(木) - 25日(金) ウィンク愛知

## 7月24日(木)

13:30~13:45 開会の辞およびアナウンス

## シンポジウムⅠ 座長 木山 博資、山中 宏二

- |     |       |                                    |
|-----|-------|------------------------------------|
| A02 | 河崎 洋志 | 脳神経系の形成と発達を制御する脳内環境の解明             |
| A02 | 平井 宏和 | 間葉系幹細胞による脳内環境の維持および破綻からの回復メカニズムの解明 |
| A02 | 村松里衣子 | 中枢神経障害後の脳内環境変化による髄鞘修復の促進           |

## 特別講演1 座長 内山 安男

- |      |       |                 |
|------|-------|-----------------|
| 特別講演 | 池中 一裕 | グリアアセンブリーのめざすもの |
|------|-------|-----------------|

## 7月25日(金)

## シンポジウムⅡ 座長 樋口 真人、川上 秀史

- |     |             |   |
|-----|-------------|---|
| A03 | 高橋 琢哉、宮崎 智之 | 新規イメージング技術による疾患モデルマウスの解析                |
| A03 | 野口 潤        | 脳内環境がスパイン形態可塑性に与える影響の解析                 |
| A03 | 遠山 育夫       | ケミカルシフトの違いを利用したフッ素MR画像による複数の脳内異常蛋白の同時解析 |

## シンポジウムⅢ 座長 服部 信孝、内匠 透

- |     |       |                                  |
|-----|-------|----------------------------------|
| A01 | 菅田 浩司 | 脳内環境を制御する神経幹細胞の恒常性変化             |
| A01 | 村田 茂穂 | ミスフォールドタンパク質の核外排出分子機構の解析         |
| A01 | 山口 賀章 | 時差時における脳内時間環境の恒常性を担う神経分子メカニズムの解明 |

## 特別講演2 座長 高橋 良輔

- |      |       |                          |
|------|-------|--------------------------|
| 特別講演 | 清水 重臣 | 新しく発見したオートファジーの機構と神経変性疾患 |
|------|-------|--------------------------|

## 平成26年度冬の班会議

2015年1月8日(木) - 9日(金) 広島大学広仁会館

## 1月8日(木)

15:30~15:50 代表挨拶各委員長連絡

A02	座長	木山 博資	
15:50~16:00	A02	加藤 英政	TET1はヒトiPS細胞の中内胚葉への偏りを是正し神経誘導を促進する
16:00~16:10	A02	大西 浩史	白質ミクログリアを制御する細胞間接触シグナルの解析
16:10~16:20	A02	河崎 洋志	脳神経系の形成と発達を制御する脳内環境の解明
A02	座長	山中 宏二	
16:20~16:30	A02	森野 豊之	FTDP-17の原因遺伝子 <i>MAPT</i> の新規挿入変異の同定
16:30~16:40	A02	柴崎 貢司	てんかんの病態悪化に関与するアストロサイト亜種の性質
16:40~16:50	A02	竹居光太郎	内在性Nogo受容体アンタゴニストLOTUSによる多発性硬化症治療法の開発
A02	座長	三澤日出巳	
16:50~17:00	A02	小峯 起	ALS病態における自然免疫TRIF経路活性化による神経保護メカニズムの解明
17:00~17:10	A02	村松里衣子	中枢神経傷害後の脳内環境変化による髄鞘修復の促進
A03	座長	三澤日出巳	
17:10~17:20	A03	樋口 真人	毒性伝達機構の分子イメージングを基軸とした神経変性疾患研究
A03	座長	樋口 真人	
17:20~17:30	A03	高橋 琢哉	新規イメージング技術による疾患モデルマウスの解析
17:30~17:40	A03	遠山 育夫	ケミカルシフトの違いを利用したフッ素MR画像による複数の脳内異常蛋白の同時解析
17:40~17:50	A03	野口 潤	脳内環境がスパイン形態可塑性に与える影響の解析

## 1月9日(金)

A02	座長	川上 秀史	
9:45~9:55	A02	木山 博資	脳内環境の破綻を制御する新たなグリア・神経間応答機構の探索とその機能解析
9:55~10:05	A02	富田 泰輔	炎症反応に呼応する神経外環境因子によるアミロイドβタンパク代謝制御機構の解明
10:05~10:15	A02	富永 真琴	脳内温度・浸透圧の感知メカニズムとその破綻
A02	座長	加藤 英政	
10:15~10:25	A02	三澤日出巳	ALSにおける第2波の運動ニューロン変性に関するメカニズムと細胞外因子の解析
10:25~10:35	A02	華山 力成	パーキンソン病における神経系エクソソームの役割
10:35~10:45	A02	檜山 武史	脳内ナトリウム環境の恒常性を担う食塩摂取行動の制御に関わる神経回路
A02	座長	漆谷 真	
11:00~11:10	A02	平井 宏和	間葉系幹細胞による脳内環境の維持および破綻からの回復メカニズムの解明
A01	座長	漆谷 真	
11:10~11:20	A01	星野 友則	運動ニューロン特異的26Sプロテアソームノックアウトマウス網羅的遺伝子発現解析
11:20~11:30	A01	岡野ジェイムス洋尚	遅発性小脳失調モデル動物を用いた軸索変性機序の解明
A01	座長	内匠 透	
11:30~11:40	A01	漆谷 真	ミスフォールド型TDP-43のユビキチン-プロテソーム分解処理におけるVHLの相対的機能と細胞質封入体形成の関連について
11:40~11:50	A01	岡村 康司	プロトンチャンネルノックアウトマウスを用いた摂食中枢機構の維持とその破綻の理解
11:50~12:00	A01	菅田 浩司	脳内環境を制御する神経幹細胞の恒常性変化
A01	座長	内山 安男	
13:00~13:10	A01	佐藤 栄人	オートファジー欠損マウスはパーキンソン病のモデルとなりうるか
13:10~13:20	A01	野中 隆	αシヌクレイン凝集体のプリオン様性質
13:20~13:30	A01	松田 憲之	PINK1の作動機構解明からミトコンドリアホメオスタシスと神経変性の核心に迫る
A01	座長	服部 信孝	
13:30~13:40	A01	内山 安男	神経軸索におけるタンパク分解機構とその破綻

13:40～13:50 A01 村田 茂穂 ミスフォールドタンパク質の核外排出分子機構の解析  
13:50～14:00 A01 柳 茂 ミトコンドリア機能異常と神経疾患

A01	座長	高橋	良輔	
14:00～14:10	A01	杉浦	智仁	神経細胞におけるRNA障害と脳内環境の関連研究
14:10～14:20	A01	山口	賀章	時差時における脳内時間環境の恒常性を担う神経分子メカニズムの解明
14:20～14:30	A01	若月	修二	軸索変性の分子細胞生物学的解析とその治療応用に関する研究

# 平成27年度夏の班会議

2015年9月24日(木) – 25日(金) 軽井沢プリンスウェスト

## 9月24日(木)

13:30～13:50 開会の辞およびアナウンス

シンポジウム I	座長	内匠 透、漆谷 真	
	高橋 良輔	服部 信孝	タンパク分解系障害による脳内環境変調と神経変性メカニズム
		内山 安男	脳内環境における封入体形成のメカニズム：封入体と神経細胞死の関連性について (演題名：新規遺伝性パーキンソン病からの解析から)
		山中 宏二	神経軸索におけるタンパク分解機構とその破綻 (演題名：p62/NBR1のニューロンにおける局在と分子特性について)
			脊髄環境の恒常性維持とその破綻：グリアー神経連関からみた神経変性機序の解明 (演題名：アストロサイト病態からみたALS)
特別講演 1	座長	高橋 良輔	
	特別講演	森 和俊	小胞体ストレス応答によるタンパク質品質管理

## 9月25日(金)

シンポジウム II	座長	川上 秀史、三澤日出巳	
	松田 憲之	富田 泰輔	PINK1の作動機構解明からミトコンドリアホメオスタシスと神経変性の核心に迫る
		富永 真琴	炎症反応に呼応する神経外環境因子によるアミロイドβタンパク代謝制御機構の解明 (演題名：TRPV4, TRPM2チャンネルを介した脳内環境センシング)
シンポジウム III	座長	木山 博資、樋口 真人	
	村松里衣子、山下 俊英	樋口 真人	中枢神経傷害後の脳内環境変化による髄鞘修復の促進
		高橋 琢哉	毒性伝達機構の分子イメージングを基軸とした神経変性疾患研究 新規イメージング技術による疾患モデルマウスの解析
特別講演 2	座長	内匠 透	
		岡部 繁男	新しいイメージング技術による脳機能と病態の解明

## 平成27年度冬の班会議

2016年1月7日(木) - 8日(金) 京都大学医学部芝蘭会館

## 1月7日(木)

16:30~17:00 Opening Remarks

**A01 Chair: Yasuo Uchiyama**

- |             |     |                   |  |
|-------------|-----|-------------------|--|
| 17:00~17:10 | A01 | Ryosuke Takahashi | The role of impairment of proteolytic system in the brain environmental disruption         |
| 17:10~17:20 | A01 | Makoto Urushitani | Impaired VHL/CUL2-mediated clearance of misfolded TDP-43 underlies glial inclusions in ALS |
| 17:20~17:30 | A01 | Shigeo Murata     | Analysis of the mechanism of nuclear export of ubiquitinated misfolded proteins            |

**A02 Chair: Hidemi Misawa**

- |             |     |                 |   |
|-------------|-----|-----------------|---|
| 17:30~17:40 | A02 | Hidemi Misawa   | Osteopontin involvement in the second wave of motor neuron degeneration in ALS mediated by matrix metalloproteinase-9 |
| 17:40~17:50 | A02 | Hirokazu Hirai  | Mechanisms underlying the maintenance of brain environment and rescue from the insult by mesenchymal stem cells       |
| 17:50~18:00 | A02 | Hiroshi Ohnishi | Analysis of a direct cell-cell communication signal that regulates microglial activation in the brain white matter    |

**A03 Chair: Makoto Higuchi**

- |             |     |                  |  |
|-------------|-----|------------------|--|
| 18:00~18:10 | A03 | Makoto Higuchi   | Molecular imaging of neurotoxic signaling in neurodegenerative disorders                     |
| 18:10~18:20 | A03 | Jun Noguchi      | Analysis of the Influences by Brain Environment on Dendritic Spine Structural Plasticity     |
| 18:20~18:30 | A03 | Ikuo Tooyama     | Application of double MR imaging for analysis of multiple pathological proteins in the brain |
| 18:30~18:40 | A03 | Takuya Takahashi | The development of novel technique to visualize synaptic proteins in living human            |

## 1月8日(金)

**A01 Chair: Makoto Urushitani**

- |             |     |                       |  |
|-------------|-----|-----------------------|--|
| 9:30~9:40   | A01 | Toru Takumi           | Increased ratio of cortical excitation/inhibition and modulation by serotonin in a model mouse for human 15q11-13 duplication seen in autism |
| 9:40~9:50   | A01 | Hiroshi Kanda         | A genetic approach for the understanding of brain environment that regulates the plasticity of neural stem cells                             |
| 9:50~10:00  | A01 | Hiroataka James Okano | Molecular analysis of axonal degeneration in HuC knock out mice  |
| 10:00~10:10 | A01 | Yoshinori Tanaka      | Gain-of-function Profilin 1 mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis cause intracellular TDP-43 aggregation                |

**A01 Chair: Nobutaka Hattori**

- |             |     |                    |   |
|-------------|-----|--------------------|---|
| 10:10~10:20 | A01 | Yasuo Uchiyama     | Proteolysis and its impairment in axons of CNS neurons  |
| 10:20~10:30 | A01 | Shuji Wakatsuki    | Oxidative stress-dependent phosphorylation activates the E3 ubiquitin ligase ZNRF1 to induce neuronal apoptosis and axon degeneration |
| 10:30~10:40 | A01 | Yoshiaki Yamaguchi | Molecular and neural mechanisms of the circadian clock robustness under jet lag condition   |
| 10:40~10:50 | A01 | Yasushi Okamura    | Age dependent regulation of microglial ROS production by voltage-gated proton channels  |

**A02 Chair: Koji Yamanaka**

- |             |     |                  |  |
|-------------|-----|------------------|--|
| 11:00~11:10 | A02 | Hiroshi Kiyama   | The molecular basis of glia-neuron interaction in regeneration and degeneration of injured neurons |
| 11:10~11:20 | A02 | Taisuke Tomita   | Understanding the catabolic mechanism of amyloid- $\beta$ protein induced by inflammatory response |
| 11:20~11:30 | A02 | Hiroshi Kawasaki | The roles of birth of mouse pups in neural circuit formation in the brain                          |

<b>A02</b>		<b>Chair: Hiroshi Kiyama</b>	
11:30~11:40	A02	Hidemasa Kato	Deriving human iPS cell lines which default to neural differentiation
11:40~11:50	A02	Shouta Sugio	Novel subtypes of astrocytes regulate cell metabolism, and affect disease progression of epilepsy
11:50~12:00	A02	Keita Takahashi	LOTUS protein, an endogenous Nogo receptor antagonist is involved in induction of experimental autoimmune encephalomyelitis

<b>A02</b>		<b>Chair: Hidemasa Kato</b>	
13:00~13:10	A02	Takeshi Hiyama	Neuronal protection mediated by Nax sodium channel in glial cells
13:10~13:20	A02	Makoto Tominaga	Mechanisms of temperature and osmolality detections in the brain and their failure (molecular mechanisms of temperature-dependent movement of microglia)
13:20~13:30	A02	Hiroyuki Morino	A mutation in the low voltage-gated calcium channel CACNA1G alters the physiological properties of the channel, causing spinocerebellar ataxia

<b>A02</b>		<b>Chair: Hideshi Kawakami</b>	
13:30~13:40	A02	Koji Yamanaka	Spinal cord environment: elucidating pathomechanisms of motor neuron degeneration through dysregulated glia-neuron network
13:40~13:50	A02	Rikinari Hanayama	Neuronal exosomes facilitate synaptic pruning by up-regulating complement factors in microglia
13:50~14:00	A02	Rieko Muramatsu	DNA released from damaged cell promotes remyelination in the adult central nervous system

<b>A01</b>		<b>Chair: Ryosuke Takahashi</b>	
14:00~14:10	A01	Nobutaka Hattori	Mechanisms of Lewy body formation: a hint from the pathogenesis of familial Parkinson's disease
14:10~14:20	A01	Noriyuki Matsuda	Relationship between PINK1-catalyzed mitochondrial quality control and Parkinson's disease
14:20~14:30	A01	Shigeru Yanagi	Role of mitochondrial ubiquitin ligase MITOL in mitochondrial dynamics and neurodegenerative disease

## 第1回若手シンポジウム

2012年11月17日(土) 京都平安ホテル

### 11月17日(土)

13:30~13:40 Opening Speech

#### Symposium I Chairperson: Dr. Hideshi Kawakami

13:40~14:10	Dr. Norio Takata	Astrocytes transform cholinergic modulation to cortical plasticity in vivo
14:10~14:40	Dr. Yuichi Morohashi	PICALM impacts the production and secretion of A $\beta$ 42 in cultured cells
14:40~15:10	Dr. Masato Maesako	Exercise is more effective than diet control in preventing high fat diet-induced $\beta$ -amyloid deposition and memory deficit in amyloid precursor protein transgenic mice

#### Symposium II Chairperson: Dr. Hideshi Kawakami

15:30~16:00	Dr. Tatsusada Okuno	Regulation of microglial axis by T lymphocytes in neurodegenerative disorders
16:00~16:30	Dr. Hitomi Tsuiji	Integrity of Spliceosome is a Common Target for Motor Neuron Disease

#### Special Lecture Chairperson: Dr. Ryosuke Takahashi

16:30~17:30	Dr. Jean-Pierre Julien	TDP-43 drives NF- $\kappa$ B activation in ALS.
-------------	------------------------	---

## 第2回若手シンポジウム

2015年1月8日(木) 広島大学広仁会館

### 1月8日(木)

13:00~13:05 Opening Speech

#### Symposium I Chairperson: Hideshi Kawakami

13:05~13:35	Masafumi Shimojo	Neuronal secretory pathway essential for development and maintenance of brain circuit and synaptic function
13:35~14:05	Koji Yamano	Novel insights into PINK1 regulation and function of Parkin-mediated mitophagy

#### Symposium I Chairperson: Toru Takumi

4:05~14:35	Takuya Tatebe	Identification of kallikrein-related peptidase 7 as a novel amyloid- $\beta$ peptide-degrading protease secreted from astrocytic cells
14:35~15:05	Daijiro Yanagisawa	Shiga-Y5 is a potential diagnostic and therapeutic agent for Alzheimer's disease

## 第3回若手シンポジウム

2016年1月7日(木) 京都大学医学部創立百周年記念施設「芝蘭会館」

### 1月7日(木)

13:00~13:05 Opening Remarks

#### Symposium I Chairpersons: Hideshi Kawakami and Toru Takumi

13:05~13:35	Hironori Kawahara	Neuron-Glia Communication by Neuronal Exosomes
13:35~14:05	Norihito Uemura	Viable Neuronopathic Gaucher Disease Model in Medaka ( <i>Oryzias latipes</i> ) Displays Axonal Accumulation of Alpha-Synuclein
14:05~14:35	Ruiqing Ni	Identification of kallikrein-related peptidase 7 as a novel amyloid- $\beta$ peptide-degrading protease secreted from astrocytic cells
14:35~15:05	Seiji Watanabe	Disruption of mitochondria-associated membrane in amyotrophic lateral sclerosis

#### Keynote Lecture Chairperson: Ryosuke Takahashi

15:15~16:15	Jean-Pierre Julien	Department of Psychiatry and Neuroscience, Laval University, Quebec, Canada Single chain antibodies to target aberrant protein misfolding and interactions in amyotrophic lateral sclerosis
-------------	--------------------	--

「シナプス病態」「脳内環境」「自己制御精神」  
脳疾患関連3領域合同シンポジウム  
2012年7月25日（水）仙台国際センター

<午前の部> 9:00 ~ 12:00

**Session 1 Neural mechanism of cognitive and reward systems and its dysfunction in psychiatric disorders**

- 9:00-9:40 Basal ganglia circuit regulation in reward and aversive behavior and drug addiction  
Takatoshi Hikita (Associate Professor, Medical Innovation Center, Kyoto University Graduate School of Medicine)
- 9:50-10:30 Disentangling Early Sensory Information Processing Deficits in Schizophrenia: From Neural Sources to Behavioral and Functional Outcomes  
Gregory A. Light (Associate Professor, UCSD)

**Session 2 iPS cell technology and neurodegeneration researches**

- 10:40-11:20 Cellular and molecular analysis of ALS motor neurons using patient-specific iPS cells  
Haruhisa Inoue (Associate Professor, Kyoto University)
- 11:20-12:00 Challenges towards stem cell therapy for Parkinson's disease  
Jun Takahashi (Associate Professor, Kyoto University)

<午後の部> 13:00 ~ 14:30

**Session 3 Immune system and inflammation in aging and neurodegeneration**

- 13:00-13:50 Circulatory factors as modulators of brain aging and neuroinflammation.  
Tony Wyss-Coray (Professor, Stanford University School of Medicine)
- 13:50-14:30 The role of microglia-innate immunity communication in motor neuron disease.  
Koji Yamanaka (Laboratory Head, RIKEN Brain Science Institute)



## 新学術領域研究

## 「精神神経疾患研究の現状と展望：新学術5領域の相互理解・連携を目指して」

2014年12月11日（木）鈴木章夫記念講堂

- 10:00～11:00 シナプス病態から脳疾患治療へ  
「網羅的質量分析の示唆するアルツハイマー病のシナプス超早期病態の分子機構」  
岡澤 均(東京医科歯科大学 難治疾患研究所)
- 11:00～12:00 精神疾患と脳内炎症のかかわり  
「マイクロエンドフェノタイプの解明」  
富田 博秋(東北大学 災害科学国際研究所)  
「サイトカインによる脳神経マイクロエンドフェノタイプ変換：統合失調症とそのモデル研究より」  
那波 宏之(新潟大学 脳研究所)
- 13:00～14:00 グリアアセンブリの破綻による脳機能異常。グリア病の実態とは？  
「グリアアセンブリの破綻からみた神経疾患」  
吉良 潤一(九州大学大学院医学研究院)  
「グリアアセンブリの破綻としての精神疾患を特定する」  
尾崎 紀夫(名古屋大学 医学研究科)
- 14:00～15:00 糖鎖による精神神経疾患の制御  
「神経糖鎖生物学」の取り組み  
門松 健治(名古屋大学 医学研究科)  
「糖転移合成酵素の発現制御による脊髄損傷治療」  
武内 恒成(愛知医科大学医学部)  
「福山型筋ジストロフィーにおける神経筋病態と治療戦略」  
金川 基、戸田 達史(神戸大学 医学研究科)
- 15:00～16:00 「脳内環境の解明と神経疾患克服への道」  
高橋 良輔(京都大学 医学研究科)、山中 宏二(名古屋大学 環境医学研究所)、樋口 真人(放射線医学総合研究所)

## 「脳内環境」の活動

### ■ キックオフシンポジウム

開催日：平成23年10月5日

会 場：京都大学医学部芝蘭会館

「脳内環境」が目指すものをお伝えし、計画班員とA01～A03の概要が紹介されました。多くの方にお集まり頂き、「脳内環境」についてご理解いただくと共に、公募研究への応募の参考にして頂きました。



### ■ 平成23年度冬の班会議

開催日：平成24年1月28－29日

会 場：KKRホテル熱海

特別講演として領域アドバイザーの田中先生、岡野先生、新学術領域「シナプス病態」代表の岡澤先生にお話頂き、計画班員全員がスライドとポスターで発表する、盛り沢山の班会議となりました。



### ■ 平成24年度夏のワークショップ

開催日：平成24年7月23－24日

会 場：TKPガーデンシティ仙台

公募班員11名の口演をと全班員のポスター発表で、活発な意見交換がなされました。スタンフォード大学 Tony Wyss-Coray 先生より神経前駆細胞によるミクログリア制御の特別講演を賜りました。



### ■ 平成24年度冬の班会議

開催日：平成25年1月16－17日

会 場：京都大学医学部芝蘭会館

班員全員がスライドにより発表を行いました。討論を含めて1人10分という短い持ち時間でしたが、興味深い研究成果や領域内連携の進捗が数多く伝えられ、大変に密度の濃い内容でした。



## 「脳内環境」の活動

### ■ 第1回若手国際シンポジウム

開催日：平成24年11月17日

会 場：京都平安ホテル

領域研究を担う5人の若手研究者が自身の研究を紹介し、活発な討議が繰り広げられました。特別講演として、カナダ・ラヴァル大学のJean-Pierre Julien先生に、“TDP-43 drives NF-kB activation in ALS”というタイトルでお話頂きました。



### ■ 平成25年度夏のワークショップ

開催日：平成25年8月29－30日

会 場：京都大学医学部芝蘭会館

120名に及ぶ参加者から選抜した口演と、55題に及ぶポスター発表、山下俊英先生と水島昇先生による特別講演など、盛り沢山の内容でした。領域アドバイザーの岡野栄之先生からもご講評を頂きました。



### ■ 平成25年度冬の班会議

開催日：平成26年1月8－9日

会 場：東京ガーデンパレス

計画研究ならびに公募研究の代表者・分担者合わせて57名全員が口演を行い、活発な意見交換がなされました。特に公募班員はこの会が平成24－25年度の研究期間を総括する場となりました。



## 「脳内環境」の活動

### ■ 平成26年度夏のワークショップ

開催日：平成26年7月24－25日

会 場：ウインク愛知

公募研究班員が入れ替わり初めての会議となりました。約80名に及ぶ参加者より公募班員9名を選抜した口演と、池中一裕先生と清水重臣先生の特別講演が催され、領域内外の連携への意欲を反映する内容でした。



### ■ 平成26年度冬の班会議

開催日：平成27年1月8－9日

会 場：広島大学広仁会館

計画班員・公募班員・主軸となる研究参加者33名が口演し、最終年度に向けた研究の方向性について熱心な討議が展開されました。脳科学関連の領域間でのリソースや人材のやり取りの重要性も示されました。



### ■ 平成26年度包括脳冬のシンポジウム

開催日：平成26年12月11－13日

会 場：東京医科歯科大学・東京ガーデンパレス

3日間に及んだシンポジウムの初日に、「精神神経疾患研究の現状と展望：新学術5領域の相互理解・連携を目指して」という標題で、脳神経系の疾患を取り扱っている5つの新学術領域（岡澤・門松・喜田・高橋・池中領域）の合同シンポジウムが開催され、「脳内環境」からはA01高橋、A02山中、A03樋口の3名の計画研究班員が、領域のこれまでの活動について部門ごとに解説を行いました。その後各領域で活用できるリソースの紹介と、リソース共有の可能性について話し合われました。

## 「脳内環境」の活動

### ■ 第2回若手シンポジウム

開催日：平成27年1月8日

会 場：広島大学広仁会館

計画班・公募班に属する4名の若手研究者が自身の研究を英語で発表しました。細胞内小器官の分子機構、毒性因子の分解酵素同定・生体イメージング・抗凝集治療など、「脳内環境」らしい多彩なトピックでした。

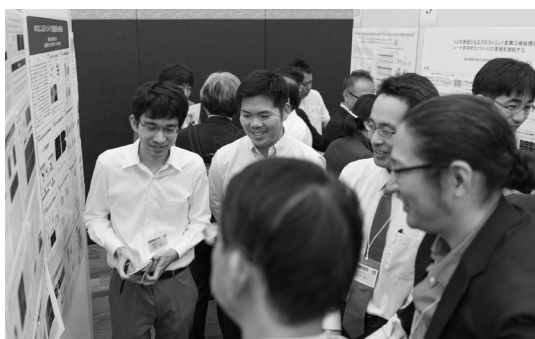


### ■ 平成27年度夏のワークショップ

開催日：平成27年9月24－25日

会 場：軽井沢プリンスウェスト

計画班員5名、公募班員3名、班友1名の計9名による口演、班員全員によるポスター発表、森和俊先生、岡部繁男先生による特別講演などが行われ、学術調査官の竹宮孝子先生からもご講評を頂きました。



### ■ 平成27年度冬の班会議

開催日：平成28年1月7－8日

会 場：京都大学医学部芝蘭会館

計画、公募33名の班員による口演が行われ、カナダ・ラバル大学Julien教授に研究発表総評と脳内環境に対する高い評価を頂きました。



# 「脳内環境」の活動

## ■ 第3回若手シンポジウム

開催日：平成28年1月7日

会場：京都大学医学部芝蘭会館

計画・公募班に所属する4名の若手研究者が、最新の研究成果を英語で発表し、出席者による活発な討論を行いました。さらに、領域アドバイザーのJean-Pierre Julien教授（カナダ・ラバル大学）に講評と特別講演をして頂きました。



## ■ 「脳内環境」領域ホームページ

(<http://www.neurol.med.kyoto-u.ac.jp/brainenvironment/>)

「脳内環境」の最新情報を配信するホームページです。各班員の研究成果がプレスリリースとして発信され、班会議など活動の詳細を記事としてご覧頂けます。ニュースレターのPDF版もダウンロード可能です。



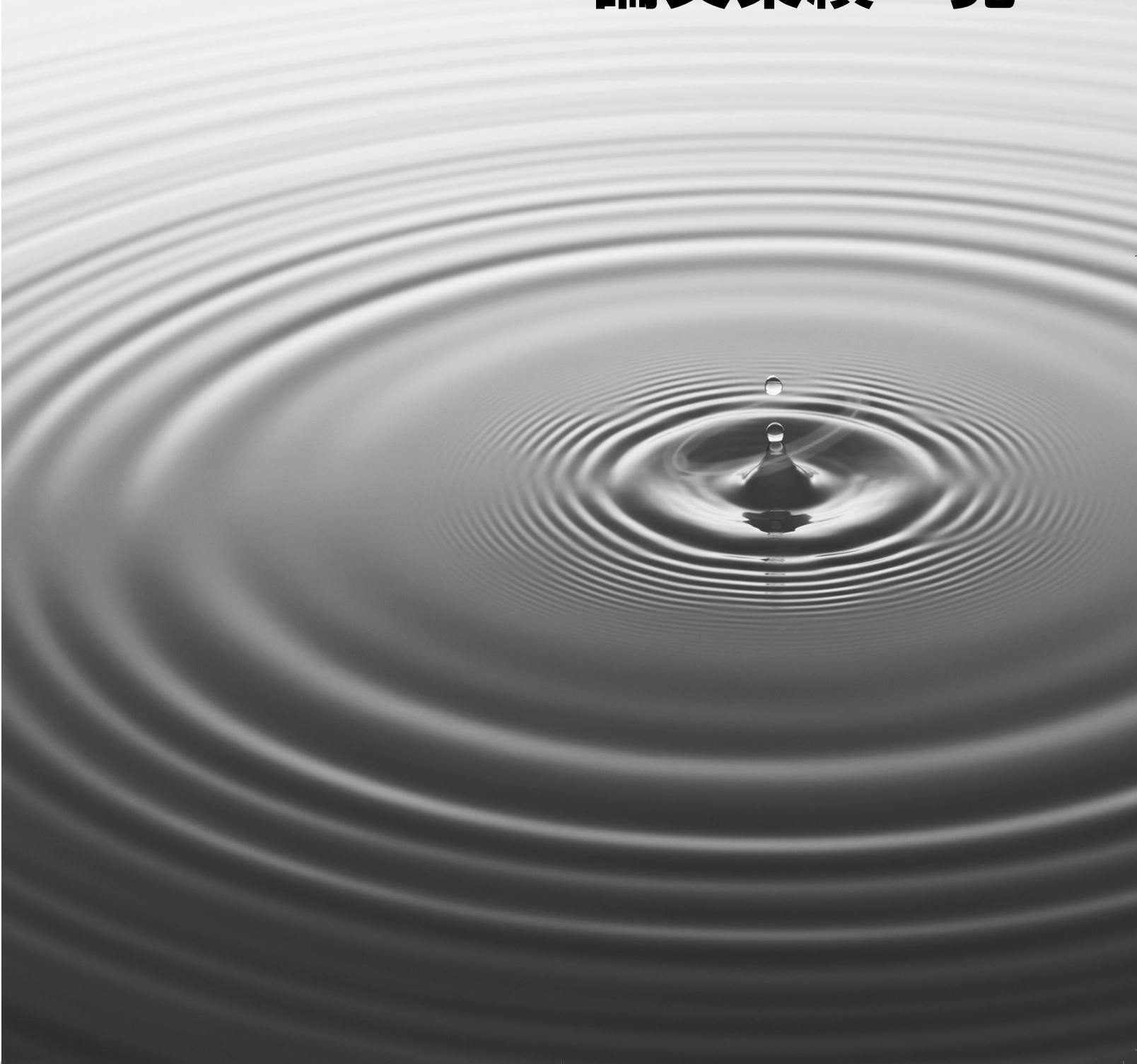
## ■ 脳内環境フォーラム

(<http://www.neurol.med.kyoto-u.ac.jp/beForum/>)

「脳内環境」に関連する領域内外の論文を紹介し、自由な討論を展開するフォーラムで、研究者はどなたでも参加可能です。投稿の際は「About」のページに記載されているルールを予めお読み下さい。



# 論文業績一覧



## 研究班

## 【高橋良輔 (研究代表者) &amp; 漆谷 真 (研究分担者)】

1. Xiao B, Ng HH, [Takahashi R](#), Tan EK. (2016) Induced pluripotent stem cells in Parkinson's disease: scientific and clinical challenges. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. pii: jnnp-2015-312036. doi: 10.1136/jnnp-2015-312036.
2. Uchida T, Tamaki Y, Ayaki T, Shodai A, Kaji S, Morimura T, Banno Y, Nishitsuji K, Sakashita N, Maki T, Yamashita H, Ito H, [Takahashi R](#), [Urushitani M](#). (2016) CUL2-mediated clearance of misfolded TDP-43 is paradoxically affected by VHL in oligodendrocytes in ALS. *Sci Rep*. 6: 19118. doi: 10.1038/srep19118.
3. Kitamura A, Saito S, Maki T, Oishi N, Ayaki T, Hattori Y, Yamamoto Y, [Urushitani M](#), Kalaria RN, Fukuyama H, Horsburgh K, [Takahashi R](#), Ihara M. (2015) Gradual cerebral hypoperfusion in spontaneously hypertensive rats induces slowly evolving white matter abnormalities and impairs working memory. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2015 Oct 13. pii: 0271678X15606717.
4. Nakamae S, Kobatake Y, Suzuki R., Tsukui T, Kato S, Yamato O, Sakai H, [Urushitani M](#), Maeda S, and Kamishina H. (2015) Iation and aggregate formation of mutant superoxide dismutase 1 in canine degenerative myelopathy. *Neuroscience* 2015 Sep 10;303: 229-40. doi: 10.1016/j.neuroscience. 2015. 06. 066.
5. Watanabe K, Uemura K, Asada M, Maesako M, Akiyama H, Shimohama S, [Takahashi R](#), Kinoshita A. (2015) The participation of insulin-like growth factor-binding protein 3 released by astrocytes in the pathology of Alzheimer's disease. *Mol Brain*. 8(1): 82. doi: 10.1186/s13041-015-0174-2.
6. Imai Y, Kobayashi Y, Inoshita T, Meng H, Arano T, Uemura K, Asano T, Yoshimi K, Zhang CL, Matsumoto G, Ohtsuka T, Kageyama R, Kiyonari H, Shioi G, Nukina N, Hattori N, [Takahashi R](#). (2015) The Parkinson's Disease-Associated Protein Kinase LRRK2 Modulates Notch Signaling through the Endosomal Pathway. *PLoS Genet*. 11(9): e1005503. doi: 10.1371/journal.pgen. 1005503.
7. Kitao Y, Ageta-Ishihara N, [Takahashi R](#), Kinoshita M, Hori O. (2015) Transgenic supplementation of SIRT1 fails to alleviate acute loss of nigrostriatal dopamine neurons and gliosis in a mouse model of MPTP-induced parkinsonism. *F1000Research*. 4: 130, 2015. DOI: 10.12688/f1000research. 6386. 1
8. Honjo Y, Ayaki T, Tomiyama T, Horibe T, Ito H, Mori H, [Takahashi R](#), Kawakami K. (2015) Increased GADD34 in oligodendrocytes in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 602: 50-5. doi: 10.1016/j.neulet. 2015. 06. 052.
9. Maki T, Maeda M, Uemura M, Lo EK, Terasaki Y, Liang AC, Shindo A, Choi YK, Taguchi A, Matsuyama T, [Takahashi R](#), Ihara M, Arai K. (2015) Potential interactions between pericytes and oligodendrocyte precursor cells in perivascular regions of cerebral white matter. *Neurosci Lett*. 597: 164-9. doi: 10.1016/j.neulet. 2015. 04. 047.
10. Hattori Y, Okamoto Y, Nagatsuka K, [Takahashi R](#), Kalaria RN, Kinoshita M, Ihara M. (2015) SIRT1 attenuates severe ischemic damage by preserving cerebral blood flow. *Neuroreport*. 26(3): 113-7. doi: 10.1097/WNR. 000000000000308.
11. Uemura N, Koike M, Ansai S, Kinoshita M, Ishikawa-Fujiwara T, Matsui H, Naruse K, Sakamoto N, Uchiyama Y, Todo T, Takeda S, Yamakado H, [Takahashi R](#) (2015) Viable neuronopathic Gaucher disease model in Medaka (*Oryzias latipes*) displays axonal accumulation of alpha-synuclein. *PLoS Genet*. 2015 Apr 2;11(4): e1005065. doi: 10.1371/journal.pgen. 1005065.
12. Jingami N, Asada-Utsugi M, Uemura K, Noto R, Takahashi M, Ozaki A, Kihara T, Kageyama T, [Takahashi R](#), Shimohama S, Kinoshita A. (2015) Idiopathic normal pressure hydrocephalus has a different cerebrospinal fluid biomarker profile from Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 45(1): 109-15. doi: 10.3233/JAD-142622.
13. Nagano S, Takahashi Y, Yamamoto K, Masutani H, Fujiwara N, [Urushitani M](#), Araki T. (2015) eine residue affects the conformational state and neuronal toxicity of mutant SOD1 in mice - Relevance to the pathogenesis of ALS. *Hum Mol Genet*. 2015. 15: 3427-3439. 2015 Jun 15;24(12): 3427-39. doi: 10.1093/hmg/ddv093.
14. Kawamoto Y, Ito H, Ayaki T, [Takahashi R](#). (2014) Immunohistochemical localization of apoptosome-related proteins in Lewy bodies in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Brain Res*. 1571: 39-48. DOI: 10.1016/j.brainres. 2014. 05. 007.
15. Yoshimura M, Ono M, Matsumura K, Watanabe H, Kimura H, Cui M, Nakamoto Y, Togashi K, Okamoto Y, Ihara M, [Takahashi R](#), Saji H. (2014) Structure-Activity Relationships and in Vivo Evaluation of Quinoxaline Derivatives for PET Imaging of  $\beta$ -Amyloid Plaques. *ACS Med Chem Lett*. 4(7): 596-600. DOI: 10.1021/ml4000707. eCollection 2013.
16. Watanabe S, Ageta-Ishihara N, Nagatsu S, Takao K, Komine O, Endo F, Miyakawa T, Misawa H, [Takahashi R](#), Kinoshita M1, Yamanaka K. (2014) SIRT1 overexpression ameliorates a mouse model of SOD1-linked amyotrophic lateral sclerosis via HSF1/HSP70i chaperone system. *Mol Brain*. 7: 62. DOI: 10.1186/s13041-014-0062-1.
17. Hattori Y, Okamoto Y, Maki T, Yamamoto Y, Oishi N, Yamahara K, Nagatsuka K, [Takahashi R](#), Kalaria RN, Fukuyama H, Kinoshita M, Ihara M. (2014) Silent Information Regulator 2 Homolog 1 Counters Cerebral Hypoperfusion Injury by Deacetylating Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Stroke*. 2014 Sep 11. pii: STROKEAHA. 114. 006265. [Epub ahead of print]
18. Kondo T, Funayama M, Tsukita K, Hotta A, Yasuda A, Nori S, Kaneko S, Nakamura M, [Takahashi R](#), Okano H, Yamanaka S, Inoue H. (2014) Focal Transplantation of Human iPSC-Derived Glial-Rich Neural Progenitors Improves Lifespan of ALS Mice. *Stem Cell Reports*. 2014 Aug 12;3(2): 242-9. DOI: 10.1016/j.stemcr. 2014. 05. 017.
19. Hashi S, Yano I, Shibata M, Masuda S, Kinoshita M, Matsumoto R, Ikeda A, [Takahashi R](#), Matsubara K. (2014) Effect of CYP2C19 polymorphisms on the clinical outcome of low-dose clobazam therapy in Japanese patients with epilepsy. *Eur J Clin Pharmacol*. 2015 Jan;71(1): 51-8. doi: 10.1007/s00228-014-1773-z
20. Kitajima Y, Tashiro Y, Suzuki N, Warita H, Kato M, Tateyama M, Ando R, Izumi R, Yamazaki M, Abe M, Sakimura K, Ito H, [Urushitani M](#), Nagatomi R, [Takahashi R](#), Aoki M. (2014) Proteasome dysfunction induces muscle growth defects and protein aggregation. *J Cell Sci*. 127(Pt 24): 5204-17. doi: 10.1242/jcs. 150961. Epub 2014 Nov 6.
21. Ayaki T, Ito H, Fukushima H, Inoue T, Kondo T, Ikemoto A, Asano T, Shodai A, Fujita T, Fukui S, Morino H, Nakano S, Kusaka H, Yamashita H, Ihara M, Matsumoto R, Kawamata J, [Urushitani M](#), Kawakami H, [Takahashi R](#). (2014) Immunoreactivity of valosin-containing protein in sporadic



amyotrophic lateral sclerosis and in a case of its novel mutant. *Acta Neuropathol Commun*. 2014 Dec 10;2: 172. doi: 10.1186/s40478-014-0172-0.

### 【服部信孝 (AO1 計画班)】

1. **Hattori N**. Movement disorders: advances in 2015. *Lancet Neurol*. 2016 Jan;15(1): 8-9. doi: 10.1016/S1474-4422(15) 00362-2. Epub 2015 Dec 8. PubMed PMID: 26700896.
2. Ogaki K, Koga S, Heckman MG, Fiesel FC, Ando M, Labbe C, Lorenzo-Betancor O, Moussaud-Lamodiere EL, Soto-Ortolaza AI, Walton RL, Strongosky AJ, Uitti RJ, McCarthy A, Lynch T, Siuda J, Opala G, Rudzinska M, Krygowska-Wajs A, Barcikowska M, Czyzewski K, Puschmann A, Nishioka K, Funayama M, **Hattori N**, Parisi JE, Petersen RC, Graff-Radford NR, Boeve BF, Springer W, Wszolek ZK, Dickson DW, Ross OA. Mitochondrial targeting sequence variants of the CHCHD2 gene are a risk for Lewy body disorders. *Neurology*. 2015 Dec 8;85(23): 2016-25. doi: 10.1212/WNL.0000000000002170.
3. Funayama M, **Hattori N**. CHCHD2 and Parkinson's disease--authors' reply. *Lancet Neurol*. 2015 Jul;14(7): 682-3. doi: 10.1016/S1474-4422(15) 00097-6.
4. Fuse A, Furuya N, Kakuta S, Inose A, Sato M, Koike M, Saiki S, **Hattori N**. VPS29-VPS35 intermediate of retromer is stable and may be involved in the retromer complex assembly process. *FEBS Lett*. 2015 Jun 4;589(13): 1430-6. doi: 10.1016/j.febslet.2015.04.040.
5. Kawajiri S, Noda K, Ikeda A, Koinuma T, Tomizawa Y, **Hattori N**, Okuma Y. Low dose of clonazepam is effective in the treatment of painless legs and moving toes syndrome: a case report. *Case Rep Neurol*. 2015 Mar 21;7(1): 59-62. doi: 10.1159/000380942.
6. Hatano T, Saiki S, Okuzumi A, Mohny RP, **Hattori N**. Identification of novel biomarkers for Parkinson's disease by metabolomic technologies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016 Mar;87(3): 295-301. doi: 10.1136/jnnp-2014-309676. Epub 2015 Mar 20. PubMed PMID: 25795009.
7. Funayama M, Ohe K, Amo T, Furuya N, Yamaguchi J, Saiki S, Li Y, Ogaki K, Ando M, Yoshino H, Tomiyama H, Nishioka K, Hasegawa K, Saiki H, Satake W, Mogushi K, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Toda T, Mizuno Y, Uchiyama Y, Ohno K, **Hattori N**. CHCHD2 mutations in autosomal dominant late-onset Parkinson's disease: a genome-wide linkage and sequencing study. *Lancet Neurol*. 2015 Mar;14(3): 274-82. doi: 10.1016/S1474-4422(14) 70266-2.
8. Matsuo H, Tomiyama H, Satake W, Chiba T, Onoue H, Kawamura Y, Nakayama A, Shimizu S, Sakiyama M, Funayama M, Nishioka K, Shimizu T, Kaida K, Kamakura K, Toda T, **Hattori N**, Shinomiya N. ABCG2 variant has opposing effects on onset ages of Parkinson's disease and gout. *Ann Clin Transl Neurol*. 2015 Mar;2(3): 302-6. doi: 10.1002/acn3.167.
9. Asano T, Koike M, Sakata S, Takeda Y, Nakagawa T, Hatano T, Ohashi S, Funayama M, Yoshimi K, Asanuma M, Toyokuni S, Mochizuki H, Uchiyama Y, **Hattori N**, Iwai K. Possible involvement of iron-induced oxidative insults in neurodegeneration. *Neurosci Lett*. 2015 Feb 19;588: 29-35. doi: 10.1016/j.neulet.2014.12.052.
10. Kubo S, Hatano T, **Hattori N**. Lipid rafts involvement in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2015 Jan 1;20: 263-79. Review. PubMed PMID: 25553450.
11. Shiba-Fukushima K, Arano T, Matsumoto G, Inoshita T, Yoshida S, Ishihama Y, Ryu KY, Nukina N, **Hattori N**, Imai Y. Phosphorylation of mitochondrial polyubiquitin by PINK1 promotes Parkin mitochondrial tethering. *PLoS Genet*. 2014 Dec 4;10(12): e1004861. doi: 10.1371/journal.pgen.1004861.
12. Shiba-Fukushima K, Inoshita T, **Hattori N**, Imai Y. Lysine 63-linked polyubiquitination is dispensable for Parkin-mediated mitophagy. *J Biol Chem*. 2014 Nov 28;289(48): 33131-6. doi: 10.1074/jbc.C114.580944.
13. Hatano T, Funayama M, Kubo S, Mata IF, Oji Y, Mori A, Zabetian CP, Waldherr SM, Yoshino H, Oyama G, Shimo Y, Fujimoto K, Oshima H, Kunii Y, Yabe H, Mizuno Y, **Hattori N**. Identification of a Japanese family with LRRK2 p. R1441G-related Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2014 Nov;35(11): 2656. e17-23. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.05.025.
14. Maraschi A, Ciammola A, Folci A, Sassone F, Ronzitti G, Cappelletti G, Silani V, Sato S, **Hattori N**, Mazzanti M, Chieregatti E, Mulle C, Passafaro M, Sassone J. Parkin regulates kainate receptors by interacting with the GluK2 subunit. *Nat Commun*. 2014 Oct 15;5: 5182. doi: 10.1038/ncomms6182. PubMed PMID: 25316086; PubMed Central PMCID: PMC4218952.
15. Amo T, Saiki S, Sawayama T, Sato S, **Hattori N**. Detailed analysis of mitochondrial respiratory chain defects caused by loss of PINK1. *Neurosci Lett*. 2014 Sep 19;580: 37-40. doi: 10.1016/j.neulet.2014.07.045. Epub 2014 Aug 1. PubMed PMID: 25092611.
16. **Hattori N**, Saiki S, Imai Y. Regulation by mitophagy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014 Aug;53: 147-50. doi: 10.1016/j.biocel.2014.05.012. Epub 2014 May 16. Review. PubMed PMID: 24842103.
17. **Hattori N**, Saiki S, Imai Y. Regulation by mitophagy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014 Aug;53: 147-50. doi: 10.1016/j.biocel.2014.05.012.
18. Yamashita C, Tomiyama H, Funayama M, Inamizu S, Ando M, Li Y, Yoshino H, Araki T, Ichikawa T, Ehara Y, Ishikawa K, Mizusawa H, **Hattori N**. Evaluation of polyglutamine repeats in autosomal dominant Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2014 Jul;35(7): 1779. e17-21. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.022.
19. Shiba-Fukushima K, Inoshita T, **Hattori N**, Imai Y. PINK1-mediated phosphorylation of Parkin boosts Parkin activity in *Drosophila*. *PLoS Genet*. 2014 Jun 5;10(6): e1004391. doi: 10.1371/journal.pgen.1004391.
20. Ishikawa K, Saiki S, Furuya N, Yamada D, Imamichi Y, Li Y, Kawajiri S, Sasaki H, Koike M, Tsuboi Y, **Hattori N**. P150glued-associated disorders are caused by activation of intrinsic apoptotic pathway. *PLoS One*. 2014 Apr 10;9(4): e94645. doi: 10.1371/journal.pone.0094645. eCollection 2014. PubMed PMID: 24722468; PubMed Central PMCID: PMC3983229.
21. Ishikawa K, Saiki S, Furuya N, Yamada D, Imamichi Y, Li Y, Kawajiri S, Sasaki H, Koike M, Tsuboi Y, **Hattori N**. P150glued-associated disorders are caused by activation of intrinsic apoptotic pathway. *PLoS One*. 2014 Apr 10;9(4): e94645. doi: 10.1371/journal.pone.0094645.
22. Fukae J, Ishikawa K, Hatano T, Yoritaka A, Takashi M, Shimo Y, Tsugawa J, Tsuboi Y, **Hattori N**. Serum uric acid concentration is linked to wearing-off fluctuation in Japanese Parkinson's disease patients. *J Parkinsons Dis*. 2014;4(3): 499-505. doi: 10.3233/JPD-140353.

### 【内山安男 (AO1 計画班)】

1. Sunabori T, Koike M, Asari A, Oonuki Y, **Uchiyama Y**: (in press) Suppression of ischemia-induced hippocampal pyramidal neuron death by hyaluronan tetrasaccharide through inhibition of toll-like receptor 2 signaling pathway. *Am J Pathol*
2. Shibata M\*, Koike M, Kusumi K, Sato N, **Uchiyama U**

- (2016) A specific tripeptidyl substrate for tripeptidyl peptidase activity is effectively hydrolyzed by alanyl aminopeptidase/aminopeptidase N/CD13 in the rat kidney. *Arch Histol Cytol* 76: 1-8, doi: org/10.1679/aohc.76.1
3. Yamamoto-Nonaka K, Koike M, Asanuma K, Takagi M, Oliva Trejo JA, Seki T, Hidaka T, Ichimura K, Sakai T, Tada N6 Ueno T, **Uchiyama Y**, Tomino Y (2016) Cathepsin D in podocytes is important in the pathogenesis of proteinuria and CKD. *J Am Soc Nephrol*, doi: 10.1681/ASN.2015040366
  4. Xie C, Ginet V, Sun Y, Koike M, Zhou K, Li T, Li H, Li Q, Wang X, **Uchiyama Y**, Truttmann AC, Kroemer G, Puyal J, Blomgren K, Zhu C (2016) Neuroprotection by selective neuronal deletion of autophagy-related gene 7 in neonatal brain injury. *Autophagy* 12: 410-423, doi: 10.1080/15548627.2015.1132134.
  5. Rinchai D, Riyapa D, Buddhisa S, Utispan K, Titball RW, Stevens MP, Stevens JM, Ogawa M, Tanida I, Koike M, **Uchiyama Y**, Ato M, Lertmemongkolchai G (2015) Macroautophagy is essential for killing of intracellular *Burkholderia pseudomallei* in human neutrophils. *Autophagy* 11: 748-755. doi: 10.1080/15548627.2015.1040969
  6. Funayama M, Ohe K, Amo T, Furuya N, Yamaguchi J, Saiki S, Li Y, Ogaki K, Ando M, Yoshino H, Tomiyama H, Nishioka K, Hasegawa K, Saiki H, Satake W, Mogushi K, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Toda T, Mizuno Y, **Uchiyama Y**, Ohno K, Hattori N. (2015) CHCHD2 mutations in autosomal dominant late-onset Parkinson's disease: a genome-wide linkage and sequencing study. *Lancet Neurol*, 14: 274-282. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70266-2. Epub 2015 Feb 4. PubMed PMID: 25662902
  7. Furuta A\*, Kikuchi H, Fujita H, Yamada D, Fujiwara Y, Kabuta T, Nishino I, Wada K, **Uchiyama Y** (2015) Property of Lysosomal Storage Disease associated with Midbrain Pathology in the CNS of LAMP-2-deficient Mice. *Am J Pathol* 185: 1713-1723, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.02.015>
  8. Nori S, Okada Y, Nishimura S, Ssaki T, Itakura G, Kobayashi Y, Renault-Mihara F, Shimizu A, Koya I, Yoshida R, Kudoh J, Koike M, **Uchiyama Y**, Ikeda E, Toyama Y, Nakamura M, Okano H (2015) Long-Term Safety Issues of iPSC-Based Cell Therapy in a Spinal Cord Injury Model: Oncogenic Transformation with Epithelial-Mesenchymal Transition. *Stem Cell Rep* 4: 1-14
  9. Uemura N, Koike M, Ansai K, Kinoshita M, Fujiwara-Ishikawa T, Matsui H, Naruse K, Sakamoto N, **Uchiyama Y**, Todo T, Takeda S, Yamakado H, Takahashi R (2015) Axonal accumulation of alpha-synuclein in Gaucher disease model of medaka (*Oryzias latipes*) does not contribute to neurodegeneration. *Pros Genetics* doi: 10.1371
  10. Nanao T, Koike M, Yamaguchi J, Sasaki M, **Uchiyama Y\*** (2015) Cellular localization and tissue distribution of endogenous DFCP1 protein. *Biomed Res* 36: 121-133
  11. Tanida I, Ueno T, **Uchiyama Y\*** (2015) A Super-Ecliptic, pHluorin-mKate2, Tandem Fluorescent Protein-Tagged Human LC3 for the Monitoring of Mammalian Autophagy. *PLoS ONE* 9: e110600. doi: 10.1371/journal.pone.0110600
  12. Suyama M, Koike M, Asaoka D, Mori H, Oguro M, Ueno T, Nagahara A, Watanabe S, **Uchiyama U\*** (2014) Increased immunoreactivity of cathepsins in the rat esophagus under chronic acid reflux esophagitis. *J Histochem Cytochem* 62: 645-660
  13. Sakuraba M, Murata J, Teruyama R, Kamiya K, Yamaguchi J, Okano Y, **Uchiyama Y**, Ikeda K (2014) Spatiotemporal expression of TRPM4 in the mouse cochlea. *J Neurosci Res* 92: 1409-1418
  14. Ueshima S, Nishida T, Koike M, Matsuda H, Sawa Y, **Uchiyama Y\*** (2014) Nitric oxide-mediated injury of interstitial cells of Cajal and intestinal dysmotility under endotoxemia. *Biomed Res* 35: 251-262
  15. Bartolome A, Kimura-Koyanagi M, Asahara S, Guillen C, Teruyama K, Inoue H, Shimizu S, Kanno A, Garcia-Aguilar A, Koike M, **Uchiyama Y**, Benito M, Noda T, Kido Y (2014) Pancreatic  $\beta$  cell failure mediated by mTORC1 hyperactivity and autophagic Pancreatic  $\beta$  cell failure mediated by mTORC1 hyperactivity and autophagic impairment. *Diabetes*
  16. Nakafuku-Fukuda M, Hirata T, Keto Y, Yamano M, Yokoyama T, **Uchiyama Y** (2014) Inhibitory effect of the selective secretion 5-HT receptor antagonist ramosetron on duodenal acidification-induced gastric hypersensitivity in rats. *Eur J Pharmacol* 731: 88-92 doi: 10.1016/j.ejphar.2014.02.040.
  17. Yamanaka T, Tosaki A, Kurosawa M, Matsumoto G, Koike M, **Uchiyama Y**, Maity SN, Shimogori T, Hattori N, Nukina N (2014) NF-Y inactivation causes atypical neurodegeneration characterized by ubiquitin and p62 accumulation and endoplasmic reticulum disorganization. *Nat Commun* doi: 10.1038/ncomms4354
  18. Yokono M, Takasu T, Hayashizaki Y, Mitsuoka K, Kihara R, Muramatsu Y, Miyoshi S, Tahara A, Kurosaki E, Li Q, Tomiyama H, Sasamata M, Shibasaki M, **Uchiyama Y** (2014) SGLT2 selective inhibitor ipragliflozin reduces body fat mass by increasing fatty acid oxidation in high-fat diet-induced obese rats. *Eur J Pharmacol* 727-66-74 doi: 10.1016/j.ejphar.2014.01.004
  19. Awazawa M, Futami T, Sakada M, Kaneko K, Ohsugi M, Nakaya K, Terai A, Suzuki R, Koike M, **Uchiyama Y**, Kadowaki T, Ueki K (2014) Deregulation of Pancreas-Specific Oxidoreductin ERO1  $\beta$  in the Pathogenesis of Diabetes Mellitus. *Mol Cell Biol* 34: 1290-1299 doi: 10.1128/MCB.01647-13
  20. Kashima J, Shintani-Ishida K, Nakajima M, Maeda H, Unuma K, **Uchiyama Y**, Yoshida K (2014) Immunocytochemical study of the autophagy marker microtubule-associated protein 1 light chain 3 in normal and steatotic human livers. *Hepatol Res*, 44: 779-787, DOI: 10.1111/hepr.12183

#### 【内匠透 (AO1計画班)】

1. Sugiura, T., Matsuda, S., Kurosaka, S., Nakai, N., Fukumoto, K., Takahashi, T., Maruyama, H., Imaizumi, K., Matsumoto, M., **\*Takumi, T.** (2016) Translocated in liposarcome regulates the distribution and function of mammalian enabled, a modulator of actin dynamics. *FEBS J* in press.
2. Liu, X., Homma, A., Sayadi, J., Yang, S., Ohashi, J., **\*Takumi, T.** (2016) Sequence features associated with the cleavage efficiency of CRISPR/Cas9 system. *Sci. Rep.* 6: 19675.
3. Nomura, J., Jaaro-Peled, H., Lewis, E., Nunez-Abades, P., Huppe-Gourgues, F., Cash-Padgett, T., Emiliani, F., Kondo, M. A., Furuya, A., Landek-Salgado, M. A., Ayhan, Y., Kamiya, A., **Takumi, T.**, Haganir, R., Pletnikov, M., O'Donnell, P., **\*Sawa, A.** (2016) Role for neonatal D-serine signaling: prevention of physiological and behavioral deficits in adult Pick1 knockout mice. *Mol. Psychiatry* 21: 386-393.
4. Myung, J., Hong, S., DeWoskin, D., De Schutter, E., Forger, D. B., **\*Takumi, T.** (2015) GABA-mediated repulsive coupling between circadian clock neurons in the SCN encodes seasonal time. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112: E3920-3929.
5. Kishimoto, R., Tamada, K., Liu, X., Okubo, H., Ise, S., Ohta, H., Ruf, S., Nakatani, J., Kohno, N., Spitz, F., **\*Takumi, T.** (2015) Model mice for 15q11-13 duplication syndrome exhibit late onset obesity and altered lipid metabolism. *Hum. Mol. Genet.* 24: 4559-4572.
6. Tanoue, S., Fujimoto, K., Myung, J., Hatanaka, F., Kato, Y.,

- \***Takumi, T.** (2015) DEC2-E4BP4 heterodimer represses the Per2 EE-element-driven promoter activities to modulate phase of circadian oscillation. *Front Neurol.* 6: 166.
7. Liu, X., Tamada, K., Kishimoto, R., Okubo, H., Ise, S., Ohta, H., Ruf, S., Nakatani, J., Kohno, N., Spitz, F., \***Takumi, T.** (2015) Transcriptome profiling of white adipose tissue in a mouse model for 15q duplication syndrome. *Genomics Data*, 5: 394-396.
  8. DeWoskin, D., Myung, J., Belle, M. D. C., Piggins, H. D., **Takumi, T.**, \*Forger, D. B. (2015) Distinct roles for GABA across multiple timescales in mammalian circadian time-keeping. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112: E3911-3919.
  9. Kloth, A. D., Badura, A., Li, A., Cherskov, A., Connolly, S. G., Bangash, M. A., Garasselli, G., Penagarikano, O., Pichon, C., Tsai, P. T., Geschwind, D. H., Hansel, C., Sahin, M., **Takumi, T.**, Worley, P. F., \*Wang, S. S-H. (2015) Cerebellar multisensory learning defects in five mouse autism models. *eLife* 4: e06085.
  10. \*Ellegood, J., Anagnostou, E., Babineau, B. A., Crawley, J. N., Lin, L., Genestine, M., DiCicco-Bloom, E., Lai, J. K. Y., Foster, J. A., Penagarikano, O., Geschwind, D. H., Pacey, L. K., Hampson, D. R., Laliberte, C. L., Millis, A. A., Tam, E., Osborne, L. R., Kouser, M., Espinosa-Becerra, F., Xuan, Z., Powell, C. M., Raznahan, A., Robins, D. M., Nakai, N., Nakatani, J., **Takumi, T.**, van Eede, M. C., Kerr, T. M., Muller, C., Blakely, R. D., Veenstra-VanderWeele, J., Henkelman, R. M., Lerch, J. P. (2015) Clustering autism-using neuroanatomical differences in 30 mouse models related to autism and gain insight into the heterogeneity of the disorder. *Mol. Psychiatry* 20: 118-125.
  11. \*Ellegood, J., Anagnostou, E., Babineau, B. A., Crawley, J. N., Lin, L., Genestine, M., DiCicco-Bloom, E., Lai, J. K. Y., Foster, J. A., Penagarikano, O., Geschwind, D. H., Pacey, L. K., Hampson, D. R., Laliberte, C. L., Millis, A. A., Tam, E., Osborne, L. R., Kouser, M., Espinosa-Becerra, F., Xuan, Z., Powell, C. M., Raznahan, A., Robins, D. M., Nakai, N., Nakatani, J., **Takumi, T.**, van Eede, M. C., Kerr, T. M., Muller, C., Blakely, R. D., Veenstra-VanderWeele, J., Henkelman, R. M., Lerch, J. P. (2015) 3D visualization of the regional differences. *Mol. Psychiatry* 20: 1.
  12. Hughes, A. T. L., Croft, C. L., Samuels, R. E., Myung, J., **Takumi, T.**, \*Piggins, H. D. (2015) Constant light enhances synchrony among circadian clock cells and promotes behavioral rhythms in VPAC2-signaling deficient mice. *Sci. Rep.* 5: 14044.
  13. Kino, Y., Washizu, C., Kurosawa, M., Yamada, M., Miyazaki, H., Akagi, T., Hashikawa, T., Doi, H., **Takumi, T.**, Hicks, G. G., Hattori, N., Shimogori, T., \*Nukina, N. (2015) FUS/TLS deficiency causes behavioral and pathological abnormalities distinct from amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol. Commun.* 25: 24.
  14. \*Ellegood, J., Nakai, N., Nakatani, J., Henkelman, R. M., **Takumi, T.**, Lerch, J. P. (2015) Consistency between the neuroanatomical and behavioural phenotype in the 15q11-13 duplication mouse model. *Autism Res.* 8: 545-555.
  15. Shigemori, T., Sakai, A., **Takumi, T.**, Itoh, Y., \*Suzuki H. (2015) Altered microglia in the amygdala are involved in anxiety-related behaviors of a copy number variation mouse model of autism. *J. Nippon Med. Sch.* 82: 929-99.
  16. Nakai, N., Otsuka, S., Myung, J., \***Takumi, T.** (2015) Autism spectrum disorder model mice: focus on copy number variation and epigenetics. *Sci. China Life Sci.* 58: 1-9.
  17. Nakai, N., Yizhar, O., \***Takumi, T.** (2015) Towards understanding the neural mechanism of behavioral phenotypes seen in psychiatric disorders. Yawo, H., Kandori, H. and Koizumi, A. eds. Optogenetics, Springer, New York, pp331-339.
  18. Tamada, K., \***Takumi, T.** (2015) Serotonin disturbance in mouse models of autism spectrum disorders. Roubertoux, P. L. ed: Organism Models of Autism Spectrum Disorders. Humana Press, New York, pp239-262.
  19. Goriki, A., Hatanaka, F., Myung, J., Kim, J., Yoritaka, T., Tanoue, S., Abe, T., Kiyonari, H., Fujimoto, K., Kato, Y., Todo, T., Matsubara, A., Forger, D., \***Takumi, T.** (2014) A novel protein, CHRONO, functions as a core component of the mammalian circadian clock. *PLoS Biol.* 12: e1001839.
  20. Isshiki, M., Tanaka, S., Kuriu, T., Tabuchi, K., **Takumi, T.**, \*Okabe, S. (2014) Enhanced synapse remodeling as a common phenotype in mouse models of autism. *Nat. Commun.* 5: 4742.
  21. Pichon, C., Kloth, A. D., Grasselli, G., Titley, H. K., Nakayama, H., Hashimoto, K., Wan, V., Simmons, D. H., Eissa, T., Nakatani, J., Cherskov, A., Miyazaki, T., Watanabe, M., **Takumi, T.**, Kano, M., Wang, S. S-H., \*Hansel, C. (2014) Deficits in cerebellar plasticity and motor learning in a copy number variation mouse model of autism spectrum disorder. *Nat. Commun.* 5: 5586.
  22. Liu, X., \***Takumi, T.** (2014) Genomic and Genetic Aspects of Autism Spectrum Disorder. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 452: 244-253.

#### 【山中宏二 (研究代表者) & 三澤日出巳 (研究分担者)】

1. Lasiene, J., Komine, O., Fujimori-Tonou, N., Powers, B., Endo, F., Watanabe, S., Jin, S., Horner, P., Ravits, J., **Misawa, H.**, and \***Yamanaka, K.** (2016) Neuregulin 1 exerts neuroprotection in SOD1-linked amyotrophic lateral sclerosis mice via restoration of C-boutons on spinal motor neurons. *Acta Neuropathol. Commun.* 4: 15.
2. Chhangani, D., Endo, F., Amanullah, A., Upadhyay, A., Watanabe, S., Mishra, R., \***Yamanaka, K.** and \*Mishra, A. (2015) Mahogunin ring finger 1 confers cytoprotection against mutant SOD1 aggregates and is defective in an ALS mouse model. *Neurobiol. Dis.* 86: 16-28.
3. Komine, O. and \***Yamanaka, K.** (2015) Neuroinflammation in motor neuron disease. *Nagoya J. Med. Sci.* 77: 537-549.
4. Endo, F. and \***Yamanaka, K.** (2015) Astrocytic TGF- $\beta$  1: detrimental factor in ALS. *Oncotarget* 6: 15728-15729.
5. Endo, F., Komine, O., Fujimori-Tonou, N., Katsuno, M., Jin, S., Watanabe, S., Sobue, G., Dezawa, M., Wyss-Coray, T. and \***Yamanaka, K.** (2015) Astrocyte-derived TGF- $\beta$  1 accelerates disease progression in ALS mice by interfering with the neuroprotective functions of microglia and T cells. *Cell Reports* 11: 592-604.
6. \*Moriwaki, Y., Takada, K., Nagasaki, T., Kubo, N., Ishii, T., Kose, K., Kageyama, T., Tsuji, S., Kawashima, K. and \***Misawa, H.** (2015) IL-22/STAT3-induced increases in SLURP1 expression within psoriatic lesions exerts antimicrobial effects against Staphylococcus aureus. *PLoS ONE* 10: e0140750.
7. \*Moriwaki, Y., Takada, K., Tsuji, S., Kawashima, K. and \***Misawa, H.** (2015) Transcriptional regulation of SLURP2, a psoriasis-associated gene, is under control of IL-22 in the skin: A special reference to the nested gene LYNX1. *Int. Immunopharmacol.* 29: 71-75.
8. \*Kawashima, K., Fujii, T., Moriwaki, Y., **Misawa, H.** and Horiguchi, K. (2015) Non-neuronal cholinergic system in regulation of immune function with a focus on ?7 nAChR. *Int. Immunopharmacol.* 29, 127-134.
9. \*Heneka, M. T., Carson, M. J., Khoury, J. E., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhratsky, A., **Yamanaka, K.**, Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., Petzold, G. C., Town, T., Morgan, D., Shinohara, M. L., Perry, V. H., Holmes, C., Bazan, N. G., Brooks, D. J., Hunot, S., Joseph, B., Deigendesch, N.,

- Garaschuk, O., Boddeke, E., Dinarello, C. A., Breitner, J. C., Cole, G. M., Golenbock, D. T. and Kummer, M. P. (2015) Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurology* 14: 388-405.
10. Watanabe, S., Hayakawa, T., Wakasugi, K. and \*Yamanaka, K. (2014) Cystatin C protects neuronal cells against mutant copper-zinc superoxide dismutase-mediated toxicity. *Cell Death Dis.* 5: e1497.
11. Watanabe, S., Ageta-Ishihara, N., Nagatsu, S., Takao, K., Komine, O., Endo, F., Miyakawa, T., Misawa, H., Takahashi, R., \*Kinoshita, M. and \*Yamanaka, K. (2014) SIRT1 overexpression ameliorates a mouse model of SOD1-linked amyotrophic lateral sclerosis via HSF1/HSP70i chaperone system. *Mol. Brain* 7: 62.
12. Fujii, T., Horiguchi, K., Sunaga, H., Moriwaki, Y., Misawa, H., Kasahara, T., Tsuji, S. and \*Kawashima, K. (2014) SLURP-1, an endogenous alpha7 nicotinic acetylcholine receptor allosteric ligand, is expressed in CD205 (+) dendritic cells in human tonsils and potentiates lymphocytic cholinergic activity. *J. Neuroimmunol.* 267, 43-49.
13. Narumoto, O., Niihara, Y., Ishii, S., Morihara, H., Okashiro, S., Nakahari, T., Nakano, T., Matsumura, H., Shimamoto, C., Moriwaki, Y., Misawa, H., Yamashita, N., Nagase, T., Kawashima, K. and \*Yamashita, N. (2013) Effect of secreted lymphocyte antigen-6/urokinase-type plasminogen activator receptor-related peptide-1 (SLURP-1) on airway epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 438, 175-179.
- spasticity, *PLoS One* 9(12): e114328.
10. Akagi T, Matsumura Y, Yasui M, Minami E, Inoue H, Masuda T, Tozaki-Saitoh H, Tamura T, Mizumura K, Tsuda M, Kiyama H. \*Inoue K, (2014) Interferon regulatory factor 8 expressed in microglia contributes to tactile allodynia induced by repeated cold stress in rodents, *J Pharmacol Sci* 126(2): 172-176.
11. Yasui M, Yoshimura T, Takeuchi S, Tokizane K, Tsuda M, Inoue K, \*Kiyama H. (2014) A chronic fatigue syndrome model demonstrates mechanical allodynia and muscular hyperalgesia via spinal microglial activation, *Glia* 62(9): 1407-1417

## 和文 (総説)

1. 木山博資, 損傷神経の生存から軸索再生への分子基盤-自律性と非自律性-, (2014) *Peripheral Nerve* 25(2): 196-199.
2. 木山博資 (2014) 損傷運動神経再生におけるグリア・神経細胞間応答の形態と分子基盤, 脳内環境維持機構と破綻がもたらす疾患研究, 遺伝子医学MOOK26, メディカルドゥ社, (ISSN 1349-2527) pp90-96

## 【川上秀史 (研究代表者) &amp; 加藤英政 (研究分担者)】

1. Kohda M, Tokuzawa Y, Kishita Y, Nyuzuki H, Moriyama Y, Mizuno Y, Hirata T, Yatsuka Y, Yamashita-Sugahara Y, Nakachi Y, Kato H. Okuda A, Tamaru S, Bornha NN, Banshoya K, Aigaki T, Sato-Miyata Y, Ohnuma K, Suzuki T, Nagao A, Maehata H, Matsuda F, Higasa K, Nagasaki M, Yasuda J, Yamamoto M, Fushimi T, Shimura M, Kaiho-Ichimoto K, Harashima H, Yamazaki T, Mori M, Murayama K, \*Ohtake A, \*Okazaki Y. A Comprehensive Genomic Analysis Reveals the Genetic Landscape of Mitochondrial Respiratory Chain Complex Deficiencies. *PLoS Genet.* 2016 Jan 7;12(1): e1005679.
2. \*Morino H, Matsuda Y, Muguruma K, Miyamoto R, Ohsawa R, Ohtake T, Otobe R, Watanabe M, Maruyama H, Hashimoto K, \*Kawakami H. A mutation in the low voltage-gated calcium channel CACNA1G alters the physiological properties of the channel, causing spinocerebellar ataxia. *Mol Brain.* 2015 Dec 29;8: 89.
3. \*Gomez CM, \*Kawakami H. Neurogenetics: The expanding horizons of diagnosis and disease pathogenesis. *Neurology.* 2015 Mar 17;84(11): 1070-1.
4. \*Muguruma K, Nishiyama A, Kawakami H. Hashimoto K, Sasai Y. Self-organization of polarized cerebellar tissue in 3D culture of human pluripotent stem cells. *Cell Rep.* 2015 Feb 3;10(4): 537-50.
5. Ayaki T, \*Ito H, Fukushima H, Inoue T, Kondo T, Ikemoto A, Asano T, Shodai A, Fujita T, Fukui S, Morino H, Nakano S, Kusaka H, Yamashita H, Ihara M, Matsumoto R, Kawamata J, Urushitani M, Kawakami H. Takahashi R. Immunoreactivity of valosin-containing protein in sporadic amyotrophic lateral sclerosis and in a case of its novel mutant. *Acta Neuropathol Commun.* 2014 Dec 10;2: 172.
6. Morino H, \*Pierce SB, Matsuda Y, Walsh T, Ohsawa R, Newby M, Hiraki-Kamon K, Kuramochi M, Lee MK, Kleivit RE, Martin A, Maruyama H, King MC, \*Kawakami H. Mutations in Twinkle primase-helicase cause Perrault syndrome with neurologic features. *Neurology.* 2014 Nov 25;83(22): 2054-61.
7. Mochizuki Y, Kawata A, Maruyama H, Homma T, Watabe K, Kawakami H. Komori T, Mizutani T, Matsubara S. A Japanese patient with familial ALS and a p. K510M mutation in the gene for FUS (FUS) resulting in the totally locked-in state. *Neuropathology.* 2014 Oct;34(5): 504-9. doi: 10.1111/neup.12130.

## 【木山博資 (A02計画班)】

1. Nagata K, Kiryu-Seo S, Tamada H, Okuyama-Uchimura F, \*Kiyama H. \*Saido TC, (\*co-corresponding author) (2016) ECEL1 mutation implicates impaired axonal arborization of motor nerves in the pathogenesis of distal arthrogyrosis. *Acta Neuropathol*, in press
2. Jung J, Uesugi N, Jeong NJ, Park BS, Konishi H, \*Kiyama H. (2016) Increase of transcription factor EB (TFEB) and lysosomes in rat DRG neurons and their transportation to the central nerve terminal in dorsal horn after nerve injury. *Neuroscience* 313: 10-22
3. Rashwan A, Konishi H, El-Sharaby A, \*Kiyama H. (2016) Ontogeny and innervation of taste buds in mouse palatal gustatory epithelium, *J Chemical Neuroanat* 71: 26-40
4. Kobayashi M, Konishi H, Takai T, \*Kiyama H. (2015) A DAP12-Dependent Signal Promotes Pro-Inflammatory Polarization in Microglia Following Nerve Injury and Exacerbates Degeneration of Injured Neurons. *Glia* 63(6): 1073-1082.
5. Yin X, Kiryu-Seo S, (他4名), (2015) Proteolipid protein cannot replace PO protein as the major structural protein of peripheral nervous system myelin, *Glia*, 63(1): 66-77.
6. Tamada H, \*Kiyama H. (2015) Existence of c-Kit negative cells with ultrastructural features of interstitial cells of Cajal in the subserosal layer of the W/Wv mutant mouse colon, *J Smooth Muscle Res.* 51: 1-9.
7. Ji S, Ohkawa Y, Tokizane K, Ohmi Y, Banno R, Furukawa K, Kiyama H. \*Furukawa K, (2015) Beta-series gangliosides crucially regulate leptin secretion in adipose tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 459(2): 189-95.
8. \*Taguchi T, Katanosaka T, Yasui M, Hayashi K, Yamashita M, Wakatsuki K, Kiyama H. Yamanaka A, Mizumura K (2015) Peripheral and spinal mechanisms of nociception in a rat reserpine-induced pain model, *Pain* 156(3): 415-27.
9. Toda T, Ishida K, Kiyama H. Yamashita T, \*Lee S (2014) Down-regulation of KCC2 expression and phosphorylation in motoneurons, and increases the number of in primary afferent projections to motoneurons in mice with post-stroke

## 【樋口真人 (A03計画班)】

1. Koga, K., 他8名, **Higuchi, M.**, Ohtake, N., Suhara, T., \*Chaki, S. (2016) TASP0434299: A novel pyridopyrimidin-4-one derivative as a radioligand for vasopressin V1B receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* Published online, DOI: 10.1124/jpet.116.232942.
  2. Kimura, Y., 他7名, **Higuchi, M.**, Zhang, M. R., \*Suhara, T. (2016) A new method to quantify tau pathologies with <sup>11</sup>C-PBB3 PET using reference tissue voxels extracted from brain cortical gray matter. *EJNMMI Res.* 6: 24.
  3. \*Kimura, Y., 他12名, **Higuchi, M.**, Zhang, M. R., Suhara, T. (2016) [<sup>11</sup>C]TASP457, a novel PET ligand for histamine H3 receptors in human brain. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* Published online, DOI: 10.1007/s00259-016-3332-6
  4. Koga, K., Maeda, J., 他11名, Suhara, T., \***Higuchi, M.** (2016) Development of TASP0410457 (TASP457), a novel dihydroquinolinone derivative as a PET radioligand for central histamine H3 receptors. *EJNMMI Res.* 6: 11.
  5. Moraga, A., 他6名, **Higuchi, M.**, Llop, J., Moro, M. A., \*Martin, A., Lizasoain, I. (2016) *J. Cereb. Blood Flow Metab.* Published online, DOI: 10.1177/0271678X15627657.
  6. Eldrige, M. A. G., 他6名, **Higuchi, M.**, Minamimoto, T., \*Rishmond, B. J. (2016) Chemogenetic disconnection of monkey orbitofrontal and rhinal cortex reversibly disrupts reward value. *Nat. Neurosci.* 19: 37-39.
  7. \*Takuwa, H., Maeda, J., 他7名, **Higuchi, M.** (2015) [<sup>11</sup>C]Raclopride binding in the striatum of minimally restrained and free-walking awake mice in a positron emission tomography study. *Synapse* 69: 600-606.
  8. Shimojo, M., **Higuchi, M.**, Suhara, T., \*Sahara, T. (2015) Imaging multimodalities for dissecting Alzheimer's disease: Advanced technologies of positron emission tomography and fluorescence imaging. *Front. Neurosci.* 9: 482.
  9. Xie, L., Maeda, J., 他9名, **Higuchi, M.**, Suhara, T., Wang, F., \*Zhang, M. R. (2015) Development of 1-N-<sup>11</sup>C-methyl- and -d-tryptophan for pharmacokinetic imaging of the immune checkpoint inhibitor 1-methyl-5-tryptophan. *Sci. Rep.* 5: 16417.
  10. Oi, N., 他5名, Maeda, J., Minamimoto, T., Zhang, M. R., Suhara, T., \***Higuchi, M.** (2015) Development of novel PET probes for central 2-amino-3- (3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolyl) propionic acid (AMPA) receptors. *J. Med. Chem.* 58: 8444-8462.
  11. Hashimoto, H., 他13名, **Higuchi, M.**, \*Zhang, M. R. (2015) Identification of a major radiometabolite of [<sup>11</sup>C]PBB3. *Nucl. Med. Biol.* 42: 905-910.
  12. \*Ji, B., 他12名, Suhara, T., **Higuchi, M.** (2015) Distinct binding of amyloid imaging ligands to unique amyloid- $\beta$  deposited in the presubiculum of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 135: 859-866.
  13. \*Kimura, Y., 他11名, Suhara, T., **Higuchi, M.** (2015) PET quantification of tau pathology in human brain with <sup>11</sup>C-PBB3. *J. Nucl. Med.* 56: 1359-1365.
  14. \*Shimada, H., 他7名, **Higuchi, M.**, Kuwabara, S., Suhara, T. (2015) Dementia with Lewy bodies can be well-differentiated from Alzheimer's disease by measurement of brain acetylcholinesterase activity - A [<sup>11</sup>C]MP4A PET study -. (2015) *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 30: 1105-1113.
  15. Tiwari, A., 他10名, Maeda, J., **Higuchi, M.**, Wang, F., \*Zhang, M. R. (2015) [<sup>18</sup>F]FEBMP: Positron emission tomography imaging of TSPO in a model of neuroinflammation in rats, and in vitro autoradiograms of the human brain. *Theranostics* 5: 961-969.
  16. \*Marin, A., 他6名, **Higuchi, M.**, Matute, C., Llop, J. (2015) In vivo PET imaging of the  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic acetylcholine receptor as a marker for brain inflammation after cerebral ischemia. *J. Neurosci.* 35: 5998-6009.
  17. Tateno, A., Sakayori, T., **Higuchi, M.**, Suhara, T., 他4名. (2015) Amyloid imaging with [<sup>18</sup>F]florbetapir in geriatric depression: early-onset versus late-onset. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 30: 720-728.
  18. Tateno, A., Sakayori, T., Kawashima, Y., **Higuchi, M.**, Suhara, T., 他8名. (2015) Comparison of imaging biomarkers for Alzheimer's disease: amyloid imaging with [<sup>18</sup>F]florbetapir positron emission tomography and magnetic resonance imaging voxel-based analysis for entorhinal cortex atrophy. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 30: 505-513.
  19. Endo, T., 他8名, Suhara, T., \***Higuchi, M.** (2015) Quantification of central substance P receptor occupancy by aprepitant using small animal positron emission tomography. 18: 1-10.
  20. Chen, C. J. 他16名, Suhara, T., **Higuchi, M.**, Yamada, K., \*Ji, B. (2015) In vivo SPECT imaging of amyloid- $\beta$  deposition with radioiodinated imidazo[1, 2-a]pyridine derivative DRM106 in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Nucl. Med.* 56: 120-126.
  21. Toth, M., 他5名, **Higuchi, M.**, Gulyas, B., \*Halldin, C. (2014) ABC transporter dependent brain uptake of the 5-HT1B receptor radioligand [<sup>11</sup>C]AZ10419369. *EJNMMI Res.* 4: 64.
  22. Chen, C. J., 他12名, Suhara, T., **Higuchi, M.**, Yamada, K., \*Ji, B. (2014) Biological evaluation of the radioiodinated imidazo[1, 2-a]pyridine derivative DRK092 for amyloid- $\beta$  imaging in mouse model of Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 581: 103-108.
  23. Chen, C. J., 他13名, **Higuchi, M.**, Suhara, T., Yamada, K., \*Ji, B. (2014) Synthesis and biological evaluation of novel radioiodinated imidazopyridine derivatives for amyloid- $\beta$  imaging in Alzheimer's disease. *Bioorg. Med. Chem.* 22: 4189-4197.
  24. Seki, C., 他4名, **Higuchi, M.**, 他9名, \*Suhara, T. (2014) Evaluation of [<sup>11</sup>C]oseltamivir uptake into the brain during immune activation by systemic polyinosine-polycytidylic acid injection: a quantitative PET study using juvenile monkey models of viral infection. *EJNMMI Res.* 4: 24.
  25. Hashimoto, H., 他15名, Suhara, T., **Higuchi, M.**, \*Zhang, M. R. (2014) Radiosynthesis, photoisomerization, biodistribution, and metabolite analysis of <sup>11</sup>C-PBB3 as a clinically useful PET probe for imaging of tau pathology. *J. Nucl. Med.* 55: 1532-1538.
  26. \*Ito, H. 他15名, **Higuchi, M.**, Kawamura, K., Fukumura, T., Boo, E. L., Farde, L., Suhara, T. (2014) Quantitative analysis of amyloid deposition in Alzheimer disease using PET and the radiotracer <sup>11</sup>C-AZD2184. *J. Nucl. Med.* 55: 932-938.
- 【総説】
27. 樋口真人 (2016) 脳の可視化からみた認知症治療戦略, *BIO Clinica* 31(4): 38-42
  28. 樋口真人 (2015) 神経科領域におけるPET/CTの有用性—認知症に対するアミロイドイメージング・タウイメージングによる早期診断を中心に, *Innervision*30(12): 14-18
  29. 前田純, 樋口真人, 須原哲也 (2015) 抗精神病薬の臨床開発における分子神経イメージングの役割, *分子精神医学* 15(4): 22-28
  30. 島田齊, 丸山将浩, 樋口真人, 須原哲也 (2015) 認知症診断におけるtau, amyloid imagingの役割, *臨床画像* 30(2): 177-186
  31. 島田齊, 石川愛, 北村聡一郎, 樋口真人 (2015) タウPETイメージング, *Annual Review 2015 神経* 50-56
  32. 須原哲也, 樋口真人, 他23名 (2015) 脳とこころの分子イメージング, *放射線科学* 58(1): 4-29
  33. 樋口真人 (2015) 分子神経イメージングとカルシウム, *CLINICAL CALCIUM* 25(2): 71-78
  34. 樋口真人 (2015) 総論: 正常および異常機能の分子基盤を明らかにする生体イメージングと診断への応用, *Medical Science Digest* 41(2): 10-11
  35. 樋口真人 (2014) タウPETイメージングのアップデート, *Psychiatry Today* 35

36. 遠藤浩信, 島田斉, **樋口真人**, 篠遠仁, 須原哲也 (2014) 精神・神経疾患における分子イメージングの現状と展望, *Innervision* 29(7): 58-62
37. **樋口真人**, 季斌, 前田純, Anna Barron, 須原哲也 (2014) アルツハイマー病における神経炎症の生体イメージング, *Dementia Japan* 28(2): 211-219

[書籍]

38. 佐原成彦, **樋口真人** (2015) タウPETイメージングによる認知症研究の新展開, 認知症の脳画像診断—早期検出と鑑別をめざして, 西村恒彦・他編, メジカルビュー社 pp162-167
39. **樋口真人** (2014) 毒性因子の伝達機構を標的とした脳内環境の分子イメージング, 高橋良輔・他編, メディカルドゥ社 pp170-177
40. 丹羽文俊, 島田斉, **樋口真人**, 須原哲也 (2014) 新しい画像診断—アミロイド・タウイメージング—, 最新医学別冊 新しい診断と治療のABC 82/神経3 アルツハイマー型認知症 改訂第2版, 田平武編, 最新医学社 pp109-118

## A01 公募班

## 【鶴田文憲 (A01 公募班)】

1. #**Tsuruta F.** New insights into the functions of PtdIns (3, 5) P2 in the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Neural Regen. Res.* 11: 240-241 (2016) #corresponding (review)
2. Haratake K, Sato A, **Tsuruta, F.** Chiba T. KIAA0368-deficiency affects disassembly of 26S proteasome under oxidative stress condition. *J Biochem.* pii: mvw006. (2016)
3. #**Tsuruta F.**, Dolmetsch RE PIKfyve mediates the motility of late endosomes and lysosomes in neuronal dendrites *Neurosci. Lett.* 605: 18-23 (2015) #corresponding
4. #**Tsuruta F.**, Kim J, Fukuda T, Kigoshi Y, #Chiba T The intronic region of Fbxl12 functions as an alternative promoter regulated by UV irradiation *Biochem. Biophys. Rep.* 3: 100-107 (2015) #co-corresponding
5. Kigoshi Y, Fukuda T, Endo T, Hayasaka N, Iemura S, Natsume T, **Tsuruta, F.** Chiba T CACUL1/CAC1 Regulates the Antioxidant Response by Stabilizing Nrf2. *Sci. Rep.* 5: 12857 (2015)

## 【田中 敦 (A01 公募班)】

1. Narumi T., Shishido T., Otaki Y., Kadowaki S., Honda Y., Funayama A., Honda S., Hasegawa H., Kinoshita D., Nishiyama S., Takahashi H., Arimoto T., Miyamoto T., Watanabe T., **Tanaka A.** Woo CH., Abe J., Takeishi Y., and Kubota I. Cardiac-specific Overexpression of High-mobility Group Box 1 Attenuates Cardiomyocyte Apoptosis and Mitochondrial Dysfunction associated with the Pathogenesis of Doxorubicin-induced Cardiomyopathy J. *Mol. Cell. Cardiol.*, 2015(82): 1-12.
2. Tamiya G., Makino S., Hayashi M., Abe A., Numakura C., Ueki M., **Tanaka A.** Ito C., Toshimori K., Ogawa N., Terashima T., Maegawa H., Yanagisawa D., Tooyama I., Tada M., Onodera O., Hayasaka K. A Mutation of COX6A1 Causes a Recessive Axonal or Mixed Form of Charcot-Marie-Tooth Disease *Am. J. Hum. Gen.*, 2014 Sep 4;95(3): 294-300.
3. Minakawa EN, Yamakado H, **Tanaka A.** Uemura K, Takeda S, \*Takahashi R. Chicken DT40 cell line lacking DJ-1, the gene responsible for familial Parkinson's disease, displays mitochondrial dysfunction. *Neurosci Res.* 2013 Dec(77) 4: 228-33.
4. \***田中敦** (監修・責任著者), 岡本徳子, 風間智彦 さまざまなモデル生物からミトコンドリア画分を分離する簡便な方法」秀潤社 実験医学 2014年9月号 Vol. 32 No. 14” クローズアップ実験法”
5. \***田中敦** 「問題」は膜で包んで分解へ 羊土社 実験医学 2014年4月号 Vol32 No. 6 890-891
6. \***田中敦** 「損傷ミトコンドリアの処理機構-PINK1/Parkin 依存性マイトファジー」医学書院 生体の科学 Vol63, No. 5: 496-497
7. \***田中敦** 「選択的オートファジーによるミトコンドリア品質管理機構」医歯薬出版株式会社 医学のあゆみ Vol241, No. 4: 239-244

## 【五十嵐道弘 (A01 公募班)】

1. Izumikawa T, Sato B, Mikami T, Tamura J, **Igarashi M.** Kitagawa H (2015) GlcUA  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4Xyl (2-O-phosphate) is the preferred substrate for chondroitin N-acetylgalactosaminyltransferase-1. *J Biol Chem.* 290: 5438-5448.
2. \***Igarashi M** (2014) Proteomic identification of the molecular basis of mammalian CNS growth cones. *Neurosci Res.* 88C: 1-15 (invited review).
3. Lemmon VP., Ferguson AR, Popovich PG, Xu XM, Snow DM, **Igarashi M.** Beattie CE, Bixby JL (2014) Minimum

- Information about a Spinal Cord Injury Experiment: A Proposed Reporting Standard for Spinal Cord Injury Experiments. *J Neurotrauma* 31: 1354-1361.
- Namba T, Kibe Y, Funahashi Y, Nakamuta S, Takano T, Ueno T, Shimada A, Kozawa S, Okamoto M, Shimoda Y, Oda K, Wada Y, Masuda T, Sakakibara A, **Igarashi M**, Miyata T, Faivre-Sarrailh C, Takeuchi K, Kaibuchi K (2014) Pioneering axons regulate neuronal polarization in the developing cerebral cortex. *Neuron* 81: 814-829.
  - Nagaoka T, Ohashi R, Inutsuka A, Sakai S, Fujisawa N, Yokoyama M, Huang YH., **Igarashi M**, Kishi M. (2014) The Wnt/Planar Cell Polarity Pathway Component Vangl2 Induces Synapse Formation through Direct Control of N-Cadherin. *Cell Rep.* 6: 916-927.
  - Uemura S, Nagaoka T, Yokoyama M, **Igarashi M**, Kishi M (2014) A simple and highly efficient method to identify the integration site of a transgene in the animal genome. *Neurosci Res* 80: 91-94.
  - Watanabe Y, Katayama N, Takeuchi K, Togano T, Itoh R, Sato M, Yamazaki M, Abe M, Sato T, Oda K, Yokoyama M, Takao K, Fukaya M, Miyakawa T, Watanabe M, Sakimura K, Manabe T, **Igarashi M** (2013) Point mutation in syntaxin-1A causes abnormal vesicle recycling, behaviors, and short term plasticity. *J Biol Chem* 288: 34906-34919.
  - Takeuchi K, Yoshioka N, Higa Onaga S, Watanabe Y, Miyata S, Wada Y, Kudo C, Okada M, Ohko K, Oda K, Sato T, Yokoyama M, Matsushita N, Nakamura M, Okano H, Sakimura K, Kawano H, Kitagawa H, **Igarashi M** (2013) Chondroitin sulphate N-acetylgalactosaminyl-transferase-1 inhibits recovery from neural injury. *Nature Communications* 4: 2740. doi: 10.1038/ncomms3740.
  - Ando K, Kudo Y, Aoyagi K, Ishikawa R, **Igarashi M**, Takahashi M (2013) Calmodulin-dependent regulation of neurotransmitter release differs in subsets of neuronal cells. *Brain Res* 1535C: 1-13.
  - Oyamatsu H, Koga D, **Igarashi M**, \*Shibata M, \*Ushiki T (2012) Morphological assessment of early axonal regeneration in end-to-side nerve coaptation models. *J Plast Surg Hand Surg* 46: 299-307.

#### 【木下彩栄 (AO1 公募班)】

- Watanabe K, Uemura K, Asada M, Maesako M, Akiyama H, Shimohama S, Takahashi R, **Kinoshita A**. The participation of insulin-like growth factor-3 released by astrocytes in the pathology of Alzheimer's disease. *Mol Brain* (in press)
- Maesako M, Uemura M, Tashiro Y, Sasaki K, Watanabe K, Noda Y, Ueda K, Asada M, Kubota M, Okawa K, Ihara T, Shimohama S, Uemura K, **Kinoshita A**. High fat diet enhances  $\beta$ -site cleavage of amyloid precursor protein (APP) via promoting  $\beta$ -site APP cleaving enzyme 1/Adaptor protein 2/clathrin complex formation. *PLoS One*; 10(9) e0131199 2015
- Jingami N, Asada-Utsugi M, Uemura K, Noto R, Takahashi M, Ozaki A, Kihara T, Kageyama T, Takahashi R, Shimohama S, **Kinoshita A**.: Idiopathic Normal Pressure Hydrocephalus has a Different Cerebrospinal Fluid Biomarker Profile of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 45: 109-115, 2015
- Yuki D, Sugiura Y, Zaima N, Akatsu H, Takei S, Yao I, Maesako M, **Kinoshita A**, Yamamoto T, Kon R, Sugiyama K, Setou M.: DHC-PC and PSD-95 decrease after loss of synaptophysin and before neuronal loss in patients with Alzheimer's disease. *Scientific reports*; 4: 7130. doi: 10.1038/srep07130. 2014
- Maesako M, Uemura K, Iwata A, Kubota M, Watanabe K, Uemura M, Noda Y, Asada-Utsugi M, Kihara T, Takahashi R, Shimohama S, **Kinoshita A**. Continuation of exercise is necessary to inhibit high fat diet-induced  $\beta$ -amyloid deposition

and memory deficit in amyloid precursor protein transgenic mice. *PLoS One*. 2013 8(9): e72796.

#### 【碓井理夫 (AO1 公募班)】

- Terada, S. -I., Matsubara, D., Onodera, K., Matsuzaki, M., \*Uemura, T., **Usui, T.** (2016) Neuronal processing of noxious thermal stimuli mediated by dendritic Ca<sup>2+</sup> influx in *Drosophila* somatosensory neurons. *eLife* 5, e12959.
- Shimono, K., Fujishima, K., Nomura, T., Ohashi, M., **Usui, T.**, Kengaku, M., Toyoda, A., \*Uemura, T. (2014) An evolutionarily conserved protein CHORD regulates scaling of dendritic arbors with body size. *Scientific Reports* 4: 5.
- Hattori, Y., **Usui, T.**, Satoh, D., Moriyama, S., Shimono, K., Itoh, T., Shirahige, K., \*Uemura, T. (2013) Sensory-neuron subtype-specific transcriptional programs controlling dendrite morphogenesis: genome-wide analysis of Abrupt and Knot/Collier. *Developmental Cell* 27(5), 530-544.
- \*Uemura, T., Shimono, K., Nomura, T., **Usui, T.**, Komai, H., Toyoda, A. (2013) Linking body size to morphology of neuronal dendritic arbors in adults. *Molecular Biology of the Cell* 24
- Yanagihashi, Y., **Usui, T.**, Izumi, Y., Yonemura, S., Sumida, M., Tsukita, S., Uemura, T., \*Furuse, M. (2012) Snakeskin, a membrane protein associated with smooth septate junctions, is required for intestinal barrier function in *Drosophila*. *Journal of Cell Science* 125(8), 1980-1990.

#### 【岡村均 (AO1 公募班)】

- \*Yamaguchi Y, Okada K, Mizuno T, Ota T, Yamada H, Doi M, Kobayashi M, Tei H, Shigeyoshi Y, **Okamura H**. Real-time recording of circadian Per1 and Per2 expression in the suprachiasmatic nucleus of freely moving rats. *J Biol Rhythms*, 査読有, 31, 108-111, 2016.
- Ota T, Doi M, Yamazaki F, Yarimizu D, Okada K, Murai I, Hayashi H, Kunisue S, Nakagawa Y, **Okamura H**. Angiotensin II triggers expression of the adrenal gland zona glomerulosa-specific  $3\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase isoenzyme through de novo protein synthesis of the orphan nuclear receptors NGFIB and NURR1. *Mol Cell Biol*, 査読有, 34, 3880-3894, 2014.
- \*Doi M, Satoh F, Maekawa T, Nakamura Y, Fustin JM, Tainaka M, Hotta Y, Takahashi Y, Morimoto R, Takase K, Ito S, Sasano H, **Okamura H**. Isoform-specific monoclonal antibodies against 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/ isomerase family provide markers for subclassification of human primary aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab*, 査読有, 99, E257-262, 2014.
- Yamamura K, \*Doi M, Hayashi H, Ota T, Murai I, Hotta Y, Komatsu R, **Okamura H**. Immunolocalization of murine type IV  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in the adrenal gland, testis, skin, and placenta. *Mol Cell Endocrinol*, 査読有, 382, 131-138, 2014.

#### 【岡村康司 (AO1 公募班)】

- Okuda H, Yonezawa Y, Takano Y, **Okamura Y**, Fujiwara Y\*. (2016) Direct Interaction between the Voltage-sensors Produces Cooperative Sustained Deactivation in Voltage-gated H<sup>+</sup> Channel Dimers. *J. Biol. Chem.* in press.
- Okochi Y, Aratani Y, Adissu HA, Miyawaki N, Sasaki M, Suzuki K, **Okamura Y**\*. (2016) The voltage-gated proton channel Hv1/VSOP inhibits neutrophil granule release. *J. Leukoc. Biol.* 99(1): 7-19.
- Kawanabe A, **Okamura Y**\*. (2015) Effects of unsaturated fatty acids on the kinetics of voltage-gated proton channels heterologously expressed in cultured cells. *J. Physiol.* in

- press.
4. **Okamura Y**, Fujiwara Y, Sakata S. (2015) Gating mechanisms of voltage-gated proton channels. *Annual Rev. Biochem.* 84: 685-709.
  5. Berthier C, Kutchukian C, Bouvard C, **Okamura Y**, Jacquemond V\*. (2015) Depression of voltage-activated Ca<sup>2+</sup> release in skeletal muscle by activation of a voltage-sensing phosphatase. *J. Gen. Physiol.* 145(4): 315-30. doi: 10.1085/jgp.201411309.
  6. Yamaguchi S, Aoki N, Kitajima T, **Okamura Y\***, Homma KJ\*. (2014) Expression of the voltage-sensing phosphatase gene in the chick embryonic tissues and in the adult cerebellum. *Com. Integ. Biol.* 7(5): 1-4.
  7. Fujiwara Y, **Okamura Y\***. (2014) Temperature-sensitive gating of voltage-gated proton channels. *Current Topics in Membranes* 74: 259-292
  8. Fujiwara Y\*, Kurokawa T, **Okamura Y\***. (2014) Long  $\alpha$  helices projecting from the membrane as the dimer interface in the voltage-gated H<sup>+</sup> channel. *J. Gen. Physiol.* 143: 377-386
  9. Mutua J, Jinno Y, Sakata S, Okochi Y, Ueno S, Tsutsui H, Kawai T, Iwao Y, **Okamura Y\***. (2014) Functional diversity of voltage-sensing phosphatases (VSPs) in two urodele amphibians. *Physiological Reports* 2: no. e12061, DOI: 10.14814/phy2.12061
  10. Tsutsui H\*, Jinno Y, Tomita A, **Okamura Y**. (2014) Rapid evaluation of a protein-based voltage probe using a field-induced membrane potential change. *Biochem Biophys Acta.* 1838(7): 1730-7. doi: 10.1016/j.bbamem.2014.03.002.
  11. Takeshita K, Sakata S, Yamashita E, Fujiwara Y, Kawanabe A, Kurokawa T, Okochi Y, Matsuda M, Narita H, **Okamura Y\***, Nakagawa A\* (2014) X-ray crystal structure of voltage-gated proton channel. *Nature Structural & Molecular Biology* Published online: 02 March 2014 ; doi: 10.1038/nsmb.2783,
  12. Itsuki K, Imai Y, Hase H, **Okamura Y**, Inoue R, Mori M\*. (2014) PLC-mediated PI (4, 5) P<sub>2</sub> hydrolysis regulates activation and inactivation of TRPC6/7 channels. *J. Gen. Physiol.* 143(2): 183-201.
  13. Kokunai Y, Nakara T, Furuta M, Sakata S, Kimura H, Aiba T, Yoshinaga M, Osaki Y, Nakamori M, Itoh H, Sato T, Kubota T, Kadota K, Shindo K, Mochizuki H, Shimizu W, Horie M, **Okamura Y**, Ohno K, Takahashi MP\*. (2014) A Kir3.4 mutation causes Andersen-Tawil syndrome by an inhibitory effect on Kir2.1. *Neurology*82(12): 1058-64.
  14. Sakata S\*, **Okamura Y**. (2014) Phosphatase activity of the voltage-sensing phosphatase, VSP, shows graded dependence on the extent of activation of the voltage sensor. *J. Physiol.* 592(5): 899-914
  15. Kurokawa T, **Okamura Y\***. (2013) Mapping of sites facing aqueous environment of voltage-gated proton channel at resting state: A study with PEGylation protection. *Biochem. Biophys. Acta.* 1838(1): 382-7.
  16. Yamaguchi S, Kurokawa T, Taira I, Aoki N, Sakata S, **Okamura Y\***, Homma KJ. (2013) Potential role of voltage-sensing phosphatases in regulation of cell structure through the production of PI (3, 4) P<sub>2</sub>. *J. Cell. Physiol.* 229(4): 422-33.
  17. Tsutsui H\*, Jinno Y, Tomita A, Niino Y, Yamada Y, Mikoshiba K, Miyawaki A, **Okamura Y**. (2013) Improved detection of electrical activity with a voltage probe based on a voltage-sensing phosphatase. *J. Physiol.* 591(18): 4427-37.
  18. Tsutsui H\*, Jinno Y, Tomita A, **Okamura Y**. (2013) Optically detected structural change in the N-terminal region of the voltage-sensor domain. *Biophys. J.* 105(1): 108-15.
  19. Fujiwara Y\*, Takeshita K, Nakagawa A, **Okamura Y**. (2013) Structural characteristics of the redox-sensing coiled coil in the voltage-gated H<sup>+</sup> channel. *J. Biol. Chem.* 288(25): 17968-75.
  20. Sasaki M, Tojo A, Okochi Y, Miyawaki N, Kamimura D, Yamaguchi A, Murakami M, **Okamura Y\***. (2012) Autoimmune disorder phenotypes in HVCN1 gene deficient mice. *Biochem. J.*, 450(2): 295-301.
  21. Fujiwara Y\*, Kurokawa T, Takeshita K, Nakagawa A, Larsson HP, **Okamura Y**. (2012) Gating of the Designed Trimeric/Tetrameric Voltage-Gated H<sup>+</sup> Channel. *J. Physiol.*, 591(Pt 3): 627-40.
  22. Itsuki K, Imai Y, **Okamura Y**, Abe K, Inoue R, Mori MX\*. (2012) Voltage-sensing phosphatase reveals temporal regulation of TRPC3/C6/C7 channels by membrane phosphoinositides. *Channels (Austin)*, 1;6(3)
  23. Kurokawa T, Takasuga S, Sakata S, Yamaguchi S, Horie S, Homma KJ, Sasaki T & **Okamura Y\***. (2012). 3' phosphatase activity toward PI (3, 4) P<sub>2</sub> by voltage-sensing phosphatase, VSP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 109(25): 10089-94.
  24. Fujiwara Y\*, Kurokawa T, Takeshita K, Kobayashi M, Okochi Y, Nakagawa A & **Okamura Y\***. (2012). The cytoplasmic coiled-coil mediates cooperative gating temperature sensitivity in the voltage-gated H<sup>+</sup> channel Hv1.. *Nature Communications*, 3: 816. doi: 10.1038/ncomms1823.
  25. **Okamura Y**. (2012) Voltage-gated proton channels., In: Edward H. Egelman, editor: *Comprehensive Biophysics*, Vol 6, Channels Proteins, Montal, M. Oxford: Academic Press, pp. 199-222.
  26. Imai Y, Itsuki K, **Okamura Y**, Inoue R, Mori MX\* (2012) A self-limiting regulation of TRPC3/C6/C7 channels coupled with PI (4, 5) P<sub>2</sub>-diacylglycerol signalling. *The Journal of Physiology*, 590(Pt 5): 1101-19.
- 【萬代研二 (A01 公募班)】**
1. Fujiwara T, Inoue T, Maruo T, Rikitake Y, Ieki N, **Mandai K**, Kimura K, Kayahara T, Wang S, Itoh Y, Sai K, Mori M, Mori K, \*Takai Y, \*Mizoguchi A. (2015). Nectin-1 spots regulate the branching of olfactory mitral cell dendrites. *Mol Cell Neurosci*, 68, 143-150. doi: 10.1016/j.mcn.2015.07.003
  2. Yamamoto H, \***Mandai K**, Konno D, Maruo T, Matsuzaki F, \*Takai Y. (2015). Impairment of radial glial scaffold-dependent neuronal migration and formation of double cortex by genetic ablation of afadin. *Brain Res*, 1620, 139-152. doi: 10.1016/j.brainres.2015.05.012
- 総説
3. **Mandai K**, Rikitake Y, Mori M, \*Takai Y. (2015). Nectins and nectin-like molecules in development and disease. *Curr Top Dev Biol.*, 112, 197-231.
- 【広常真治 (A01 公募班)】**
1. Inaba H, Goto H, Kasahara K, Kumamoto K, Yonemura S, Inoko A, Yamano S, Wanibuchi H, He D, Goshima N, Kiyono T, **Hirotsune S**, Inagaki M Ndel1 suppresses cilia regeneration in proliferating cells by regulating the trichoplein-Aurora-A pathway. *J Cell Biol* (in press) (査読有)
  2. Toba S, Koyasako K, Yasunaga T, **Hirotsune S** (2015) Lis1 restricts the conformational changes in cytoplasmic dynein on microtubules. *Microscopy (Oxf)*. (査読有)
  3. Okamoto M, Iguchi T, Hattori T, Matsuzaki S, Koyama Y, Taniguchi M, Komada M, Xie MJ, Yagi H, Shimizu S, Konishi Y, Omi M, Yoshimi T, Tachibana T, Fujieda S, Katayama T, Ito A, **Hirotsune S**, Tohyama M, Sato M (2015) DBZ regulates cortical cell positioning and neurite development by sustaining the anterograde transport of Lis1 and DISC1



through control of Ndel1 dual-phosphorylation. *J Neurosci* 35: 2942-2958. (査読有)

4. Jin M, Yamada M, Arai Y, Nagai T, **Hirotsune S** (2014) Arl3 and LC8 regulate dissociation of dynactin from dynein. *Nat Commun* 5: 5295. (査読有)
5. Yan J, Chao DL, Toba S, Koyasako K, Yasunaga T, **Hirotsune S**, Shen K (2013) Kinesin-1 regulates dendrite microtubule polarity in *Caenorhabditis elegans*. *Elife* 2: e00133. (査読有)
6. Yamada M, Kumamoto K, Mikuni S, Arai Y, Kinjo M, Nagai T, Tsukasaki Y, Watanabe TM, Fukui M, Jin M, Toba S, **Hirotsune S** (2013) Rab6a releases LIS1 from a dynein idling complex and activates dynein for retrograde movement. *Nat Commun* 4: 2033. (査読有)
7. Xie Y, Juschke C, Esk C, **Hirotsune S**, Knoblich JA (2013) The phosphatase PP4c controls spindle orientation to maintain proliferative symmetric divisions in the developing neocortex. *Neuron* 79: 254-265. (査読有)
8. Toba S, Tamura Y, Kumamoto K, Yamada M, Takao K, Hattori S, Miyakawa T, Kataoka Y, Azuma M, Hayasaka K, Amamoto M, Tominaga K, Wynshaw-Boris A, Wanibuchi H, Oka Y, Sato M, Kato M, **Hirotsune S** (2013) Post-natal treatment by a blood-brain-barrier permeable calpain inhibitor, SNJ1945 rescued defective function in lissencephaly. *Sci Rep* 3: 1224. (査読有)
9. Sebe JY, Bershteyn M, **Hirotsune S**, Wynshaw-Boris A, Baraban SC (2013) ALLN rescues an in vitro excitatory synaptic transmission deficit in Lis1 mutant mice. *J Neurophysiol* 109: 429-436. (査読有)
10. Wachi T, Yoshida N, Funae Y, Ueno M, Germino GG, **Hirotsune S**, Deguchi N (2012) Progesterone induced mesenchymal differentiation and rescued cystic dilation of renal tubules of Pkd1 (-/-) mice. *Biochem Biophys Res Commun* 425: 212-218. (査読有)
11. Toba S, **Hirotsune S** (2012) A unique role of dynein and nud family proteins in corticogenesis. *Neuropathology* 32: 432-439. (査読有)
12. Takitoh T, Kumamoto K, Wang CC, Sato M, Toba S, Wynshaw-Boris A, **Hirotsune S** (2012) Activation of Aurora-A is essential for neuronal migration via modulation of microtubule organization. *J Neurosci* 32: 11050-11066. (査読有)

#### 【岡野ジェームス洋尚 (AO1 公募班)】

1. Hasegawa M, Hara-Miyauchi C, Ohta H, Sakimura K, Okano H, **\*Okano HJ**. Analysis of RNA metabolism in peripheral WBCs of TDP-43 KI mice identifies novel biomarkers of ALS. *Neurosci Res*. In press.

#### 【柳 茂 (AO1 公募班)】

1. Saida, H., Matsuzaki, Y., Takayama, K., Iizuka, A., Konno, A., **Yanagi, S.**, and **\*Hirai, H.** (2014) One-year follow-up of transgene expression by integrase-defective lentiviral vectors and their therapeutic potential in spinocerebellar ataxia model mice. *Gene Ther.* 21: 820-827
2. Homma, M., Nagashima, S., Fukuda, T., **Yanagi, S.**, Miyakawa, H., Suzuki, E., and **\*Morimoto, T.** (2014) Downregulation of Centaurin gamma 1A increases synaptic transmission at *Drosophila* larval neuromuscular junctions. *Eur. J. Neurosci.* 40: 3158-3170
3. Nagashima, S., Tokuyama, T., Yonashiro, R., Inatome, R., and **\*Yanagi, S.** (2014) Roles of mitochondrial ubiquitin ligase MITOL/MARCH5 in mitochondrial dynamics and diseases. *J. Biochem.* 155: 273-279 Review

#### 【宮川 剛 (AO1 公募班)】

1. Akers, KG., 他 8名, Shoji, H., Ohira, K., Richards, BA., **Miyakawa, T.**, Josselyn SA., **\*Frankland PW.** (2014) Hippocampal neurogenesis regulates forgetting during adulthood and infancy. *Science* 344(6184): 598-602.
2. Onouchi, T., Takao, K., **Miyakawa, T.**, 他 12名, **\*Senda, T.** (2014) Targeted deletion of the C-terminus of the mouse adenomatous polyposis coli tumor suppressor results in neurologic phenotypes related to schizophrenia. *Mol Brain* 7: 21.
3. Shoji, H., Takao, K., Hattori, S., **\*Miyakawa, T.** (2014) Contextual and cued fear conditioning test using a video analyzing system in mice. *J Vis Exp* 85: e50871.
4. Koshimizu, H., Takao, K., Matozaki, T., Ohnishi, H., **\*Miyakawa, T.** (2014) Comprehensive behavioral analysis of cluster of differentiation 47 knockout mice. *PLoS One* 9(2): e89584.
5. Hazama, K., **Miyakawa, T.**, 他 10名, **\*Hashimoto, H.** (2014) Increased behavioral and neuronal responses to a hallucinogenic drug in PACAP heterozygous mutant mice. *PLoS One* 9(2): e89153.
6. Kobayashi, M., 他 5名, Takao, K., **Miyakawa, T.**, **\*Matsuoka, I.** (2014) Absence of BRINP1 in mice causes increase of hippocampal neurogenesis and behavioral alterations relevant to human psychiatric disorders. *Mol Brain* 7: 12.
7. Yamashita, N., Takahashi, A., Takao, K., Yamamoto, T., Kolattukudy, P., **Miyakawa, T.**, **\*Goshima, Y.** (2013) Mice lacking collapsin response mediator protein 1 manifest hyperactivity, impaired learning and memory, and impaired prepulse inhibition. *Front Behav Neurosci* 7: 216.
8. Paemka, L., Takao, K., **Miyakawa, T.**, 21名, **\*Bassuk, AG.** (2013) PRICKLE1 interaction with SYNAPSIN I reveals a role in autism spectrum disorders. *PLoS One* 8(12): e80737.
9. Hattori, S., Hagihara, H., Ohira, K., 他 4名, **\*Miyakawa, T.** (2013) In vivo evaluation of cellular activity in  $\alpha$  CaMKII heterozygous knockout mice using manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI). *Front Integr Neurosci* 7: 76.
10. Ohira, K., Takeuchi, R., Iwanaga, T., **\*Miyakawa, T.** (2013) Chronic fluoxetine treatment reduces parvalbumin expression and perineuronal nets in gamma-aminobutyric acidergic interneurons of the frontal cortex in adult mice. *Mol Brain* 6: 43.
11. Watanabe, Y., Takao, K., **Miyakawa, T.**, 他 14名, **\*Igarashi, M.** (2013) Point mutation in syntaxin-1A causes abnormal vesicle recycling, behaviors, and short term plasticity. *J Biol Chem* 288(48): 34906-19.
12. Soya, S., Shoji, H., **Miyakawa, T.**, 他 4名, **\*Sakurai, T.** (2013) Orexin receptor-1 in the locus coeruleus plays an important role in cue-dependent fear memory consolidation. *J Neurosci* 33(36): 14549-57.
13. Ageta-Ishihara, N., Yamakado, H., Morita, T., Hattori, S., Takao, K., **Miyakawa, T.**, Takahashi, R., **\*Kinoshita, M.** (2013) Chronic overload of SEPT4, a parkin substrate that aggregates in Parkinson's disease, causes behavioral alterations but not neurodegeneration in mice. *Mol Brain* 6: 35.
14. Hagihara, H., Takao, K., Walton, NM., Matsumoto, M., **\*Miyakawa, T.** (2013) Immature dentate gyrus: an endophenotype of neuropsychiatric disorders. *Neural Plast* 2013: 318596.
15. Umemori, J., Takao, K., Koshimizu, H., Hattori, S., Furuse, T., Wakana, S., **\*Miyakawa, T.** (2013) ENU-mutagenesis mice with a non-synonymous mutation in *Grin1* exhibit abnormal anxiety-like behaviors, impaired fear memory, and decreased acoustic startle response. *BMC Res Notes* 6: 203.

16. Shin, R., Kobayashi, K., Hagihara, H., 他8名, **Miyakawa, T.**, \*Matsumoto, M. (2013) The immature dentate gyrus represents a shared phenotype of mouse models of epilepsy and psychiatric disease. *Bipolar Disord* 15(4): 405-21.
  17. Ohira, K., Kobayashi, K., Toyama, K., Nakamura, HK., Shoji, H., Takao, K., 他5名, \***Miyakawa, T.** (2013) Synaptosomal-associated protein 25 mutation induces immaturity of the dentate granule cells of adult mice. *Mol Brain* 6: 12.
  18. Toba, S., Tamura, Y., Kumamoto, K., Yamada, M., Takao, K., Hattori, S., **Miyakawa, T.**, 他10名, \*Hirotsune S. (2013) Post-natal treatment by a blood-brain-barrier permeable calpain inhibitor, SNJ1945 rescued defective function in lissencephaly. *Sci Rep* 3: 1224.
  19. Takao, K., Kobayashi, K., Hagihara, H., Ohira, K., Shoji, H., Hattori, S., Koshimizu, H., Umemori, J., 他18名, \***Miyakawa, T.** (2013) Deficiency of schnurri-2, an MHC enhancer binding protein, induces mild chronic inflammation in the brain and confers molecular, neuronal, and behavioral phenotypes related to schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 38(8): 1409-25.
  20. Ohira, K., Takeuchi, R., Shoji, H., \***Miyakawa, T.** (2013) Fluoxetine-induced cortical adult neurogenesis. *Neuropsychopharmacology* 38(6): 909-20.
  21. Komine, Y., Takao, K., **Miyakawa, T.**, \*Yamamori, T. (2012) Behavioral abnormalities observed in Zfx2-deficient mice. *PLoS One* 7(12): e53114.
  22. Nagura, H., Takao, K., **Miyakawa, T.**, 他8名 \*Doi, T. (2012) Impaired synaptic clustering of postsynaptic density proteins and altered signal transmission in hippocampal neurons and disrupted learning behavior in PDZ1 and PDZ2 ligand-binding-deficient PSD-95 knockin mice. *Mol Brain* 5: 43.
  23. Hattori, S., Takao, K., Tanda, K., Toyama, K., Shintani, N., Baba, A., Hashimoto, H., \***Miyakawa, T.** (2012) Comprehensive behavioral analysis of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) knockout mice. *Front Behav Neurosci* 6: 58.
  24. Lee, HU., Yamazaki, Y., Tanaka, KF., Furuya, K., Sokabe, M., Hida, H., Takao, K., **Miyakawa, T.**, Fujii, S., \*Ikenaka, K. (2013) Increased astrocytic ATP release results in enhanced excitability of the hippocampus. *Glia* 61(2): 210-24.
  25. Yamakado, H., **Miyakawa, T.**, 他6名, \*Takahashi, R. (2012)  $\alpha$ -Synuclein BAC transgenic mice as a model for Parkinson's disease manifested decreased anxiety-like behavior and hyperlocomotion. *Neurosci Res* 73(2): 173-7.
  26. Koshimizu, H., Leiter, LM., \***Miyakawa, T.** (2012) M4 muscarinic receptor knockout mice display abnormal social behavior and decreased prepulse inhibition. *Mol Brain* 5: 10.
- p62/SQSTM1 immunoreactivity in inclusions of neurodegenerative diseases. *Neurosci. Res.*, 10. 1016/j. neuros. 2015. 08. 002.
3. \***Matsumoto, G.**, Shimogori, T., Hattori, N., and \*Nukina, N. (2015) TBK1 controls autophagic engulfment of Parkin-recruited depolarized mitochondria through p62 phosphorylation. *Hum Mol Genet*, 24, 4429-4442
  4. Shiba-Fukushima, K., Arano, T., **Matsumoto, G.**, Inoshita, T., Yoshida, S., Ishihama, Y., Ryu, K. -Y., Nukina, N., \*Hattori, N., and \*Imai, Y. (2014). Phosphorylation of Mitochondrial Polyubiquitin by PINK1 Promotes Parkin Mitochondrial Tethering. *PLoS Genet* 10, e1004861.
  5. Kurosawa, M., **Matsumoto, G.**, Kino, Y., Okuno, M., Kurosawa-Yamada, M., Washizu, C., Taniguchi, H., Nakaso, K., Yanagawa, T., Warabi, E., Shimogori, T., Sakurai, T., Hattori, N. and \*Nukina, N. (2015). Depletion of p62 reduces nuclear inclusions and paradoxically ameliorates disease phenotypes in Huntington's model mice. *Hum Mol Genet*, 24, 1092-1105

#### 【橋本 款 (AO1 公募班)】

1. Sekigawa A, Takamatsu Y, Sekiyama K, **Hashimoto M.** Role of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Synucleins in the Axonal Pathology of Parkinson's Disease and Related Synucleinopathies. *Biomolecules*. 2015 May 19;5(2): 1000-111.
2. Sekiyama K, Waragai M, Akatsu H, Sugama S, Takenouchi T, Takamatsu Y, Fujita M, Sekigawa A, Rockenstein E, Inoue S, La Spada AR, Masliah E, **Hashimoto M.** Disease-Modifying Effect of Adiponectin in Model of  $\alpha$ -Synucleinopathies. *Ann Clin Transl Neurol*. 2014 Jul 3;1(7): 479-489.
3. Sekiyama K, Takamatsu Y, Waragai M, **Hashimoto M.** Role of genomics in translational research for Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Sep 19;452(2): 226-35.
4. Sekigawa A, Sekiyama K, Fujita M, Takamatsu Y, La Spada AR, Masliah E, **Hashimoto M.** Dual effects of  $\beta$ -synuclein on the pathogenesis of Parkinson disease. *Ann Neurol*. 2013 Aug;74(2): 306.
5. Sekigawa A, Takamatsu Y, Sekiyama K, Takenouchi T, Sugama S, Waragai M, Fujita M, **Hashimoto M.** Diversity of mitochondrial pathology in a mouse model of axonal degeneration in synucleinopathies. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013: 817807.

#### 【野中 隆 (AO1 公募班)】

1. \***Nonaka T.** Suzuki G, Tanaka Y, Kametani F, Hirai S, Okado H, Miyashita T, Saitoe M, Akiyama H, Masai H and Hasegawa M. Phosphorylation of TAR DNA-binding Protein of 43 kDa (TDP-43) by Truncated Casein Kinase 1  $\delta$  Triggers Mislocalization and Accumulation of TDP-43. *J. Biol. Chem.* in press
2. Tanaka Y, **Nonaka T.** Suzuki G, Kametani F and Hasegawa M. Gain-of-function profilin 1 mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis cause seed-dependent intracellular TDP-43 aggregation. *Hum. Mol. Genet.* in press.
3. Cacabelosa D, Ayala V, Belen Granado-Serrano A, Jove M, Torres P, Boada J, Cabre R, Ramirez-Nuneza O, Gonzalo H, Soler-Canterob A, Carlos Enrique Serrano J, Josep Bellmunt M, Paz Romerob M, Jose Motilvab M, **Nonaka T.** Hasegawa M, Ferrer I, Pamplona R, and Portero-Otin M. Interplay between TDP-43 and docosahexaenoic acid-treated processes in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* in press.
4. Davidson Y, Robinson AC, Troakes C, Smith B, Al-Saraj S, Shaw C, Rollinson S, Masuda-Suzukake M, Suzuki G,

#### 【山中智行 (AO1 公募班)】

1. **Yamanaka T\***, Tosaki A, Kurosawa M, Shimogori T, Hattori N, Nukina N\*. Genome-wide analyses in neuronal cells reveal that USF transcription factors regulate lysosomal gene expression. *FEBS J.* 2016 Jan 12. doi: 10.1111/febs. 13650.

#### 【松本 弦 (AO1 公募班)】

1. \*Imai, Y., Kobayashi, Y., Inoshita, T., Meng, H., Arano, T., Uemura, K., Asano, T., Yoshimi, K., Zhang, C-L., **Matsumoto, G.**, Ohtsuka, T., Kageyama, R., Kiyonari, H., Shioi, G., Nukina, N., \*Hattori, N. and \*Takahashi, R. The Parkinson's disease-associated protein kinase LRRK2 modulates Notch signaling through the endosomal pathway. *PLoS Genet*, 11, e1005503. doi: 10.1371/journal.pgen. 1005503
2. Kurosawa, M., **Matsumoto, G.**, Sumikura, H., Hatsuta, H., Murayama, S., Sakurai, T., Shimogori, T., Hattori, N. and \*Nukina, N. (2015) Serine 403-phosphorylated

**Nonaka T.** Pickering-Brown S, Snowden JS, Hasegawa M, and Mann DMA. Neurodegeneration in Frontotemporal Lobar Degeneration and Motor Neurone Disease associated with expansions in C9orf72 is not associated with aggregated forms of dipeptide repeat proteins. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* in press.

5. Taniguchi-Watanabe S, Arai T, Kametani F, **Nonaka T.**, Masuda-Suzukake M, Tarutani A, Murayama S, Saito Y, Arima K, Yoshida M, Akiyama H, Robinson A, Mann DMA, Iwatsubo T, Hasegawa M. Biochemical classification of tauopathies by immunoblot, protein sequence and mass spectrometric analyses of sarkosyl-insoluble and trypsin-resistant tau. *Acta Neuropathol.* in press.
6. Nagata E, **Nonaka T.**, Moriya Y, Fujii N, Okada Y, Tsukamoto H, Itoh J, Okada C, Satoh T, Arai T, Hasegawa M, Takizawa S. Inositol Hexakisphosphate Kinase 2 Promotes Cell Death in Cells with Cytoplasmic TDP-43 Aggregation. *Mol. Neurobiol.* in press.
7. Takahashi M, Miyata H, Kametani F, **Nonaka T.**, Akiyama H, Hisanaga SI, Hasegawa M (2015) Extracellular association of APP and tau fibrils induces intracellular aggregate formation of tau. *Acta Neuropathol.* 129: 895-907.
8. Masuda-Suzukake M, **Nonaka T.**, Hosokawa M, Kubo M, Shimozawa A, Akiyama H, Hasegawa M (2014) Pathological alpha-synuclein propagates through neural networks. *Acta Neuropathol. Commun.* 2: 88.
9. Yamashita M, **\*Nonaka T.**, Hirai S, Miwa A, Okado H, Arai T, Hosokawa M, Akiyama H, Hasegawa M (2014) Distinct pathways leading to TDP-43-induced cellular dysfunctions. *Hum. Mol. Genet.* 23: 4345-4356.

#### 【松田憲之 (A01 公募班)】

1. Yamano, K., Queliconi, B. B., Koyano, F., Saeki, Y., Hirokawa, T., Tanaka, K., and **Matsuda, N.** (2015) Site-specific Interaction Mapping of Phosphorylated Ubiquitin to Uncover Parkin Activation. *J. Biol. Chem.*, 290: 25199-25211.
2. Okatsu, K., Koyano, F., Kimura, M., Kosako, H., Saeki, Y., Tanaka, K., and **Matsuda, N.** (2015) Phosphorylated ubiquitin chain is the genuine Parkin receptor. *Journal of Cell Biology*, 209: 111-128.
3. Okatsu, K., Kimura, M., Oka, T., Tanaka, K., and **Matsuda, N.** (2015) Unconventional PINK1 localization to the outer membrane of depolarized mitochondria drives Parkin recruitment. *Journal of Cell Science*, 128: 964-978.

#### 【若月修二 (A01 公募班)】

1. **Wakatsuki, S.** and Araki, T. Significance of mechanism-oriented research for Wallerian degeneration and neuronal apoptosis. Neurodegenerative disorders as systemic diseases. Edited by Wada, K. pp159-182. Springer 2015.
2. Araki, T. and **Wakatsuki, S.** ZNRF1: a key molecule activated by reactive oxygen species to cause neuronal degeneration Atlas of Science <http://atlasofscience.org/znrf1-a-key-molecule-activated-by-reactive-oxygen-species-to-cause-neuronal-degeneration/>
3. **Wakatsuki, S.** and Araki, T. NADPH oxidases promote apoptosis by activating ZNRF1 ubiquitin ligase in neurons treated with exogenously applied oxidant. *Commun Integr Biol.* (2015) in press (invited).
4. **Wakatsuki, S.**, Furuno, A., Oshima, M., Araki, T. Oxidative stress-dependent phosphorylation activates ZNRF1 to induce neuronal/axonal degeneration. *J Cell Biol.* (2015) 211, 881-896.
5. Saitoh, F., **Wakatsuki, S.**, Tokunaga, S., Araki T. Glutamate

signals through mGluR2 to control Schwann cell differentiation and proliferation. *Sci Rep.* in revision.

#### 【碓井理夫 (A01 公募班)】

1. Terada, S. -I., Matsubara, D., Onodera, K., Matsuzaki, M., **\*Uemura, T.**, \*Usui, T. (2016) Neuronal processing of noxious thermal stimuli mediated by dendritic Ca<sup>2+</sup> influx in Drosophila somatosensory neurons. *eLife* 5, e12959.
2. Shimono, K., Fujishima, K., Nomura, T., Ohashi, M., **Usui, T.**, Kengaku, M., Toyoda, A., \*Uemura, T. (2014) An evolutionarily conserved protein CHORD regulates scaling of dendritic arbors with body size. *Scientific Reports* 4: 5.
3. Hattori, Y., Usui, T., Satoh, D., Moriyama, S., Shimono, K., Itoh, T., Shirahige, K., **\*Uemura, T.** (2013) Sensory-neuron subtype-specific transcriptional programs controlling dendrite morphogenesis: genome-wide analysis of Abrupt and Knot/Collier. *Developmental Cell* 27(5), 530-544.
4. \*Uemura, T., Shimono, K., Nomura, T., **Usui, T.**, Komai, H., Toyoda, A. (2013) Linking body size to morphology of neuronal dendritic arbors in adults. *Molecular Biology of the Cell* 24
5. Yanagihashi, Y., **Usui, T.**, Izumi, Y., Yonemura, S., Sumida, M., Tsukita, S., Uemura, T., \*Furuse, M. (2012) Snakeskin, a membrane protein associated with smooth septate junctions, is required for intestinal barrier function in Drosophila. *Journal of Cell Science* 125(8), 1980-1990.

#### 【山口賀章 (A01 公募班)】

1. **\*Yamaguchi Y#**, Okada K#, Mizuno T, Ota T, Yamada H, Doi M, Kobayashi M, Tei H, Shigeyoshi Y, and \*Okamura H: "Real-time recording of circadian Per1 and Per2 expression in the suprachiasmatic nucleus of freely moving rats." *Journal of Biological Rhythms* 31, 108-111, 2016. (#: co-first, \*: corresponding author)
2. **\*Yamaguchi Y:** "Molecular and neural mechanisms for the robustness of the circadian clock." *Yakugaku Zasshi* 135, 1265-1272, 2015. (\*: corresponding author)
3. Suehiro K, Nakamura Y, Xu S, Uda Y, Matsumura T, **Yamaguchi Y**, Okamura H, Yamashita T, Takei Y: "Ecto-domain phosphorylation promotes functional recovery from spinal cord injury." *Scientific reports* 4, 4972, 2014.
4. 岡村均, **山口賀章:** "内分泌 基礎分野での進歩 脳内バゾプレッシンと時差." *Annual review. 糖尿病・代謝・内分泌* 143-151, 2015.
5. **山口賀章,** 岡村均: "時差をつかさどる視交叉上核のバゾプレッシン神経回路." *生化学* 86, 687-692, 2014.
6. **山口賀章,** 岡村均: "脳内バゾプレッシンは時差ボケの原因か." *医学のあゆみ* 250, 1195-1196, 2014.

#### 【菅田浩司 (A01 公募班)】

1. **菅田浩司,** 岡野栄之 (2015) 「4D 蛍光イメージングのためのライトシート顕微鏡」 *Medical Science Digest* 41: 278-279, 総説

#### 【村田茂穂 (A01 公募班)】

1. Shirozu R, Yashiroda H, **Murata S.** (2015) Proteasome Impairment Induces Recovery of Mitochondrial Membrane Potential and an Alternative Pathway of Mitochondrial Fusion. *Mol Cell Biol.* 36(2): 347-62. doi: 10.1128/MCB.00920-15.
2. Hamazaki J, Hirayama S, **Murata S.** (2015) Redundant Roles of Rpn10 and Rpn13 in Recognition of Ubiquitinated Proteins and Cellular Homeostasis. *PLoS Genet.* 11(7): e1005401. doi: 10.1371/journal.pgen.1005401.
3. Tomita T, Hamazaki J, Hirayama S, McBurney MW, Yashiroda H, **Murata S.** (2015) Sirt1-deficiency causes

defective protein quality control. *Sci Rep.* 5: 12613. doi: 10.1038/srep12613.

4. Shirozu R, Yashiroda H, **Murata S.** (2015) Identification of minimum Rpn4-responsive elements in genes related to proteasome functions. *FEBS Lett.* 589(8): 933-40. doi: 10.1016/j.febslet.2015.02.025.
5. Yashiroda H, Toda Y, Otsu S, Takagi K, Mizushima T, **Murata S.** (2015) N-terminal  $\alpha 7$  deletion of the proteasome 20S core particle substitutes for yeast PI31 function. *Mol Cell Biol.* 35(1): 141-52. doi: 10.1128/MCB.00582-14.
6. Bai M, Zhao X, Sahara K, Ohte Y, Hirano Y, Kaneko T, Yashiroda H, **Murata S.** (2014) Assembly mechanisms of specialized core particles of the proteasome. *Biomolecules.* 4(3): 662-77. doi: 10.3390/biom4030662.
7. Pack CG, Yukii H, Toh-e A, Kudo T, Tsuchiya H, Kaiho A, Sakata E, **Murata S.** Yokosawa H, Sako Y, Baumeister W, Tanaka K, Saeki Y. (2014) Quantitative live-cell imaging reveals spatio-temporal dynamics and cytoplasmic assembly of the 26S proteasome. *Nat Commun.* 5: 3396. doi: 10.1038/ncomms4396.

## A02公募班

### 【宮井和政 (A02公募班)】

1. \*Sonderegger P and **Matsumoto-Miyai K.** Activity-controlled proteolytic cleavage at the synapse. *Trends Neurosci.* 37, 413-423. (2014).
2. \***Matsumoto-Miyai K.** Yamada E, Shinzawa E, Koyama Y, Shimada S, Yoshizumi M, and Kawatani M. Serotonergic regulation of distention-induced ATP release from the urothelium. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 310, F646-F655. (2016).
3. Takezawa K, \*Kondo M, Kiuchi H, Ueda N, Soda T, Fukuhara S, Takao T, Miyagawa Y, Tsujimura A, **Matsumoto-Miyai K.** Ishida Y, Negoro H, Ogawa O, Nonomura N, and Shimada S. Authentic role of ATP signaling in micturition reflex. *Sci. Rep.* 6, 19585. (2016).
4. \***Matsumoto-Miyai K.** Yoshizumi M, and Kawatani M. Regulatory effects of 5-hydroxytryptamine receptors on voiding function. *Adv. Ther.* 32, S3-S15. (2015).
5. \*Kudo D, Miyakoshi N, Hongo M, **Matsumoto-Miyai K.** Kasukawa Y, Misawa A, Ishikawa Y, and Shimada Y. Nerve growth factor and estrogen receptor mRNA expression in paravertebral muscles of patients with adolescent idiopathic scoliosis: a preliminary study. *Spine Deform.* 3, 122-127. (2015).
6. Fukiya Y, Yoshizumi M, Saito M, **Matsumoto-Miyai K.** Nimura T, and \*Kawatani M. Synergistic effects of loxoprofen and glycine on the micturition reflex in conscious rats. *Biomed. Res.* 35, 17-23. (2014).
7. \*Kudo D, Miyakoshi N, Hongo M, **Matsumoto-Miyai K.** Kasukawa Y, Misawa A, Ishikawa Y, and Shimada Y. Lbx1 mRNA expression in paravertebral muscles of patients with adolescent idiopathic scoliosis: a preliminary study. *Akita J. Med.* 40, 151-156. (2013).
8. \***Matsumoto-Miyai K.** Yamada E, Yoshizumi M, and Kawatani M. The regulation of distention-induced ATP release from urothelium by the adenylyl cyclase-cyclic AMP pathway. *Biomed. Res.* 33, 153-157. (2012).

### 【下川哲昭 (A02公募班)】

1. Vargas D, **Shimokawa N.** Kaneko R, Rosales W, Parra A, Castellanos A, Koibuchi N \*Lizcano F. (2016) Regulation of human subcutaneous adipocyte differentiation by EID1. *J. Mol. Endocrinol.* 56, 113-122.
2. Tsunoda D, Iizuka H, Ichinose T, Iizuka Y, Mieda T, \***Shimokawa N.** Takagishi K, Koibuchi N. (2016) The Trk family of neurotrophin receptors is downregulated in the lumbar spines of rats with congenital kyphoscoliosis. *Mol. Cell. Biochem.* 412, 11-18.
3. **下川哲昭** (2016) 「こころの発達と病氣」: 脳内環境の破綻と神経・精神異常の発生メカニズムの解析-「多動症」や「育児放棄」への一考察, pp. 63-89, 脳の世紀推進会議編, 東京.
4. Yu L, Iwasaki T, Xu M, Lesmana R, Xiong Y, **Shimokawa N.** Chin WW, Koibuchi N. (2015) Abberant cerebellar development of transgenic mice expressing dominant-negative thyroid hormone receptor in cerebellar Purkinje cells. *Endocrinology* 156, 1565-1576.
5. \***Shimokawa N.** (2015) Significance of CIN85 analysis in nutritional study. *J. Nutr. Biol.* 1, 1-6.
6. 角田大介, **下川哲昭**, 飯塚伯, 鯉淵典之, 高岸憲二 (2015) 先天性脊柱側弯症モデルラットにおける遺伝子発現の網羅的解析. *J. Spine Res.* 6, 157-160.
7. Toya S, Takatsuru Y, Amano I, **Shimokawa N.** Koibuchi N. (2014) Early-life-stress affects the homeostasis of glutamatergic synapses. *E. J. Neurosci.* 40, 3627-3634.

8. Ichinose T, Lesmana R, Yamamoto A, Kobayashi T, Shitara F, Shimoyama D, Yusuke Takatsuru Y, Iwasaki T, **Shimokawa N**, Takagishi K, Koibuchi N. (2014) Possible involvement of IGF-1 signaling on compensatory growth of the infraspinatus muscle induced by the supraspinatus tendon detachment of rat shoulder. *Physiological Report 2*, e00197, doi: 10.1002/phy2. 197.

#### 【柴崎貢志 (A02公募班)】

1. \***Shibasaki K** Physiological significance of TRPV2 as a mechanosensor, thermosensor and lipid sensor. *J. Physiol. Sci.*, 2016 in press \*責任著者
2. #Deftu A-F, #**Shibasaki K**, 他4名, TRPV1 activation by CXCL1 via Gi/o protein is associated with itch. *Pflugers Archiv*. 2016 in press #Co-1st著者
3. \***Shibasaki K**, Sugio S, Takao K, Yamanaka A, Miyakawa T, Tominaga M, Ishizaki Y, TRPV4 activation at the physiological temperature is a critical determinant of neuronal excitability and behavior. *Pflugers Archiv*. 467: 2495-507 doi: 10.1007/s00424-015-1726-0 \*責任著者
4. Iijima K, Kurachi M, **Shibasaki K**, 他6名, Transplanted microvascular endothelial cells promote oligodendrocyte precursor cell survival in ischemic demyelinating lesions. *Journal of Neurochemistry* 135: 539-50 doi: 10.1111/jnc.13262.
5. Naruse M, **Shibasaki K**, Ishizaki Y, FGF-2 signal promotes proliferation of cerebellar progenitor cells and their oligodendrocytic differentiation at early postnatal stage. *Biochem Biophys Res. Commun.* 463(4): 1091-96 (2015)
6. Kusakari S, Saitow F, Ago Y, **Shibasaki K**, 他6名, Shp2 in forebrain neurons regulates synaptic plasticity, locomotion, and memory formation in mice. *Mol. Cell. Biol.* 35(9): 1557-72 (2015)
7. \***Shibasaki K**, Tominaga M, Ishizaki Y, Hippocampal neuronal maturation triggers post-synaptic clustering of brain temperature-sensor TRPV4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 458: 168-173 (2015) \*責任著者

#### 【大西浩史 (A02公募班)】

1. Kusakari, S., Saitow, F., Ago, Y., Shibasaki, K., Sato-Hashimoto, M., Matsuzaki, Y., Kotani, T., Murata, Y., Hirai, H., Matsuda, T., Suzuki, H., Matozaki, T., \***Ohnishi, H.** (2015) Shp2 in forebrain neurons regulates synaptic plasticity, locomotion, and memory formation in mice. *Mol. Cell. Biol.* 35(9): 1557-1572.
2. Moriya, M., Inoue, S., Miyagawa-Tomita, S., Nakashima, Y., Oba, D., Niihori, T., Hashi, M., **Ohnishi, H.**, Kure, S., Matsubara, Y., \*Aoki Y. (2015) Adult mice expressing a Braf Q241R mutation on an ICR/CD-1 background exhibit a cardio-facio-cutaneous syndrome phenotype. *Hum. Mol. Genet.* 24(25): 7349-7360.
3. \*Motegi, S., Yokoyama, Y., Ogino, S., Yamada, K., Uchiyama, A., Takeuchi, Y., **Ohnishi, H.**, Ishikawa, O. (2015) Pathogenesis of multiple lentigines in LEOPARD syndrome with PTPN11 gene mutation. *Acta. Derm. Venereol.* 95(8): 978-984.
4. Li, X. J., Goodwin, C. B., Nabinger, S. C., Richine, B. M., Yang, Z., Hanenberg, H., **Ohnishi, H.**, Matozaki, T., Feng, G. S., \*Chan, R. J. (2015) Protein tyrosine phosphatase, Shp2, positively regulates macrophage oxidative burst. *J. Biol. Chem.* 290(7): 3894-3909.
5. Murata, Y., Kotani, T., **Ohnishi, H.**, Matozaki, T. The CD47-SIRP  $\alpha$  signaling system: its physiological roles and therapeutic application. *J. Biochem.* 155(6), 335-344.

#### 【大倉正道 (A02公募班)】

1. Monai H, **Ohkura M**, Tanaka M, Oe Y, Konno A, Hirai H, Mikoshiba K, Itohara S, Nakai J, Iwai Y, Hirase H. (2016) Calcium imaging reveals glial involvement in transcranial direct current stimulation-induced plasticity in mouse brain. *Nat Commun.* 22;7: 11100.

#### 【富田泰輔 (A02公募班)】

1. Ueda, N., Yanagisawa, K., **Tomita, T.**, \*Kimura, N. (2016) Retromer and Rab2-dependent trafficking mediate PS1 degradation by proteasomes in endocytic disturbance. *J Neurochem* in press
2. Tominaga, A., Cai, T., Takagi-Niidome, S., Iwatsubo, T., \***Tomita, T.** (2016) Conformational changes in transmembrane domain 4 of presenilin 1 are associated with altered A  $\beta$  42 production. *J Neurosci* 36(4): 1362-1372.
3. \*Futai, E., Osawa, S., Cai, T., Fujisawa, T., Ishiura, S., **Tomita, T.** (2016) Suppressor mutations for presenilin 1 familial Alzheimer disease mutants modulate  $\gamma$ -secretase activities. *J Biol Chem* 291(1): 435-446.
4. Takagi-Niidome, S., Sasaki, T., Osawa, S., Sato, T., Morishima, K., Cai, T., Iwatsubo, T., \***Tomita, T.** (2015) Cooperative substrate gating mechanism by hydrophilic loop 1 and C terminus of presenilin 1 in the amyloid- $\beta$  production. *J Neurosci* 35(6): 2646-2656, 2015.
5. Takasugi, N., Sasaki, T., Shinohara, M., Iwatsubo, T., \***Tomita, T.** (2015) Synthetic ceramide analogues increase Amyloid- $\beta$  42 production by modulating  $\gamma$ -secretase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 457(2): 194-199.
6. Takeo, K., Tanimura, S., Shinoda, T., Osawa, S., Zahariev, I. K., Takegami, N., Ishizuka-Katsura, Y., Shinya, N., Takagi-Niidome, S., Tominaga, A., Ohsawa, N., Kimura-Someya, T., Shirouzu, M., Yokoshima, S., Yokoyama, S., Fukuyama, T., \***Tomita, T.**, Iwatsubo, T. (2014) Allosteric regulation of  $\gamma$ -secretase activity by a phenylimidazole-type  $\gamma$ -secretase modulator. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(29): 10544-10549.
7. Yonezawa, H., Nishiyama, Y., Takeo, K., **Tomita, T.**, Iwatsubo, T., Yokoshima, S., \*Fukuyama, T. (2014) Novel Photocleavable Linker:  $\alpha$ -Thioacetophenone-type Linker. *Bioorg Med Chem Lett* 24(13): 2831-2833.

#### 【山田清文 (A02公募班)】

1. Nakajima, A., Nagai, T., 他9名, \***Yamada, K.** (2013) Nobiletin, a citrus flavonoid, ameliorates cognitive impairment, oxidative burden, and hyperphosphorylation of tau in senescence-accelerated mouse. *Behav. Brain Res.*, 250: 351-360.
2. Nakai, T., Nagai, T., 他4名, \***Yamada K** (2014) Alterations of GABAergic and dopaminergic system in mutant mice with disruption of exons 2 and 3 of the Disc1 gene. *Neurochem. Int.*, 74: 74-83.
3. Nakajima, A., Ibi, D., Nagai, T., Yamada, S., Nabeshima, T., \***Yamada, K.** (2014) Induction of interferone-induced transmembrane protein 3 gene expression by lipopolysaccharide in astrocytes. *Eur. J. Pharmacol.*, 745: 166-175.
4. Nakai T, Nagai T, 他9名, \***Yamada K** (2014) Girdin phosphorylation is crucial for synaptic plasticity and memory: a potential role in the interaction of BDNF/TrkB/Akt signaling with NMDA receptor. *J. Neurosci.*, 34: 14995-15008.
5. Nakajima, A., Nagai, T., 他8名, \***Yamada, K.** (2015) Nobiletin, a citrus flavonoid, improves cognitive impairment and reduces soluble Ab levels in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease (3XTg-AD). *Behav. Brain Res.*, 289: 69-77. (IF=3. 028)

- Mizoguchi H, Nagai, T., 他8名, \*Yamada, K. (2015) The insular GABAergic system controls decision-making in healthy and drug-dependent rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 112: E3930-3939.
- Furukawa-Hibi, Y., Yun, J., Nagai, T., \*Yamada, K. (2015) Stress increases DNA methylation of the neuronal PAS domain 4 (Npas4) gene. *Neuroreport*, 26: 827-832.

### 【大海雄介 (A02 公募班)】

- Ohmi, Y., Ohkawa Y, Tajima O, Sugiura Y, Furukawa K, \*Furukawa K. (2014) Ganglioside deficiency causes inflammation and neurodegeneration via the activation of complement system in the spinal cord. *J Neuroinflammation*. 11: 61.

### 【竹内英之 (A02 公募班)】

- Imai K, Kotani T, Tsuda H, Mano Y, Nakano T, Ushida T, Li H, Miki R, Sumigama S, Iwase A, Hirakawa A, Ohno K, Toyokuni S, Takeuchi H. Mizuno T, Suzumura A, Kikkawa F: Neuroprotective potential of molecular hydrogen against perinatal brain injury via suppression of activated microglia. *Free Radical Biology & Medicine* 2015 in press.
- Fujisawa H, Sugimura Y, Takagi H, Mizoguchi H, Takeuchi H. Izumida H, Nakashima K, Ochiai H, Takeuchi S, Kiyota A, Fukumoto K, Iwama S, Takagishi Y, Hayashi Y, Arima H, Komatsu Y, Murata Y, Oiso Y: Chronic Hyponatremia Causes Neurologic and Psychologic Impairments. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2015 in press.
- Parajuli B, Horiuchi H, Mizuno T, \*Takeuchi H. Suzumura A: CCL11 enhances excitotoxic neuronal death by producing reactive oxygen species in microglia. *GLIA* 63(12): 2274-2284, 2015.
- Mita T, Furukawa-Hibi Y, Takeuchi H. Hattori H, Yamada K, Hibi H, Ueda M, Yamamoto A: Conditioned medium from the stem cells of human dental pulp improves cognitive function in a mouse model of Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research* 293: 189-197, 2015.
- Arima H, Omura T, Hayasaka T, Masaki N, Hanada N, Xu D, Banno T, Kobayashi K, Takeuchi H. Kadomatsu K, Matsuyama Y, Setou M: Reductions of docosahexaenoic acid-containing phosphatidylcholine levels in the anterior horn of an ALS mouse model. *Neuroscience* 297: 127-136, 2015.
- Horiuchi H, Parajuli B, Wang Y, Azuma Y, Mizuno T, \*Takeuchi H. Suzumura A: Interleukin-19 acts as a negative autocrine regulator of activated microglia. *PLoS ONE* 10(3): e0118640, 2015.
- Jin S, Sonobe Y, Kawanokuchi J, Horiuchi H, Cheng Y, Wang Y, Mizuno T, \*Takeuchi H. Suzumura A: Interleukin-34 restores blood-brain barrier integrity by upregulating tight junction proteins in endothelial cells. *PLoS ONE* 9(12): e115981, 2014.
- Umebayashi D, Natsume A, \*Takeuchi H. Hara M, Nishimura Y, Fukuyama R, Sumiyoshi N, Wakabayashi T: Blockade of gap junction hemichannel protects secondary spinal cord injury from activated microglia-mediated glutamate excitotoxicity. *Journal of Neurotrauma* 31(24): 1967-1974, 2014.
- Wang Y, Jin S, Sonobe Y, Cheng Y, Horiuchi H, Parajuli B, Kawanokuchi J, Mizuno T, \*Takeuchi H. Suzumura A: Interleukin-1 $\beta$  induces blood-brain barrier disruption by downregulating Sonic hedgehog in astrocytes. *PLoS ONE* 9(10): e110024, 2014.
- \*Takeuchi H. Suzumura A: Gap junctions and hemichannels composed of connexins: potential therapeutic targets for neurodegenerative diseases. *Frontiers in Cellular*

Neuroscience 8: 189, 2014.

- Noda M, Takii K, Parajuli B, Kawanokuchi J, Sonobe Y, Takeuchi H. Mizuno T, Suzumura A: FGF-2 released from degenerating neurons exerts microglial-induced neuroprotection via FGFR3-ERK signaling pathway. *Journal of Neuroinflammation* 11(1): 76, 2014.
- Fukumoto K, Mizoguchi H, Takeuchi H. Horiuchi H, Kawanokuchi J, Jin S, Mizuno T, Suzumura A: Fingolimod increases brain-derived neurotrophic factor levels and ameliorates amyloid  $\beta$  -induced memory impairment. *Behavioural Brain Research* 268: 88-93, 2014.
- Doi Y, Takeuchi H. Mizoguchi H, Fukumoto K, Horiuchi H, Jin S, Kawanokuchi J, Parajuli B, Sonobe Y, Mizuno T, Suzumura A: Granulocyte-Colony Stimulating Factor Attenuates Oligomeric Amyloid  $\beta$  Neurotoxicity by Activation of Neprilysin. *PLOS ONE* 9(7): e103458, 2014.
- Cheng Y, \*Takeuchi H. Sonobe Y, Jin S, Wang Y, Horiuchi H, Parajuli B, Kawanokuchi J, Mizuno T, Suzumura A: Sirtuin 1 attenuates oxidative stress via upregulation of superoxide dismutase 2 and catalase in astrocytes. *Journal of Neuroimmunology* 269(1-2): 38-43, 2014.
- Burkovetskaya M, Karpuk N, Xiong J, Bosch M, Boska MD, Takeuchi H. Suzumura A, Tammy Kielian T: Evidence for Aberrant Astrocyte Hemichannel Activity in Juvenile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis (JNCL). *PLoS One*. 9(4): e95023, 2014.

### 【中川貴之 (A02 公募班)】

- Dogishi, K., Kodera, M., Oyama, S., Shirakawa, H., \*Nakagawa, T., Kaneko, S. (2015) Long-lasting pain-related behaviors in mouse chronic cystitis model induced by a single intravesical injection of hydrogen peroxide. *J. Pharmacol. Sci.*, 129: 244-6.
- Miyanojara, J., \*Shirakawa, H., Sanpei, K., Nakagawa, T., Kaneko, S. (2015) A pathophysiological role of TRPV1 in ischemic injury after transient focal cerebral ischemia in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 467: 478-83.
- Miyake, T., \*Shirakawa, H., Nakagawa, T., Kaneko, S. (2015) Activation of mitochondrial transient receptor potential vanilloid 1 channel contributes to microglial migration. *Glia*, 63: 1870-82.
- So, K., Haraguchi, K., Asakura, K., Isami, K., Sakimoto, S., Shirakawa, H., Mori, Y., \*Nakagawa, T., Kaneko, S. (2015) Involvement of TRPM2 in a wide range of inflammatory and neuropathic pain mouse models. *J. Pharmacol. Sci.*, 127: 237-43.
- \*中川貴之 (2016) 末梢神経障害および末梢血流障害によるしびれと TRPA1. 生化学, in press.
- 三宅崇仁, 白川久志, \*中川貴之, 金子周司 (2016) ミクログリア細胞機能における活性酸素シグナリング ~TRPチャネルを介した新しい細胞制御機構. *日本薬理学雑誌*, 147: 6-11.
- 勇昂一, \*中川貴之, 金子周司 (2015) 神経障害性疼痛とミクログリアの TRPM2 受容体. *Clinical Neuroscience* 33: 1387-91.
- \*中川貴之 (2015) グリア細胞の機能とその異常. *脳神経外科診療ブライティス6* (橋本伸夫監修, 三國信敬/深谷親 編集) 文光堂, 16-18.
- \*中川貴之 (2015) 抗がん剤による末梢神経障害と transient receptor potential (TRP) チャネル. *産婦人科漢方研究のあゆみ*, 32: 6-11.
- \*中川貴之, 永安一樹, 金子周司 (2015) 縫線核脳切片培養系の特徴と向精神薬によるセロトニン神経機能変化の作用解析. *日本神経精神薬理学雑誌*, 35: 39-44.
- \*中川貴之 (2015) 鎮痛補助薬の作用機序を再考する. *臨床麻酔*, 39: 19-26.
- \*白川久志, 崎元伸哉, 中川貴之, 金子周司 (2014) 免疫系細胞の異常活性化による脳虚血傷害の病態進展 ミクログリア/マクロファージの iNOS 発現における TRPM2 の役割. *日本薬理学雑誌*, 144: 104-9.

## 【華山力成 (A02 公募班)】

1. Bahrini I, Song J, Diez D, **Hanayama R**. Neuronal exosomes facilitate synaptic pruning by up-regulating complement factors in microglia. *Sci Rep*. 5, 7989 (2015)
2. **Hanayama R**. Autoimmune Diseases and the Role of MFG-E8. MFG-E8 and Inflammation. Wang P. ed. (Springer) 97-117 (2014)
3. 石止貴将, **華山力成**. マクロファージによる慢性炎症応答: 血球貪食症候群の発症機序 *BIO Clinica 慢性炎症と疾患 (北隆館)* 4(2) (2015)

## 【望月秀樹 (A02 公募班)】

1. Hayakawa H, Nagai M, Kawanami A, Nakata Y, Nihira T, Ogino M, Takada M, Saido T, Takano J, Saegusa M, Mikami T, Hamada J, Nishiyama K, **Mochizuki H**, Mizuno Y. Loss of DARPP-32 and calbindin in multiple system atrophy. *J Neural Transm*. 2013 May 29.

## 【浅沼幹人 (A02 公募班)】

1. \*Miyazaki, I. and **Asanuma, M.**: Serotonin 1A receptors on astrocytes as a potential target for treatment of Parkinson's disease. *Curr. Med. Chem.*, in press.
2. Sogawa, C., Ikegame, M., Miyazaki, I., Ara, T., Imamura, Y., Okusha, Y., Ohyama, K., **Asanuma, M.**, Sogawa, N., Yamamoto, T. and Kozaki, K.: Changes in metallothionein isoform expression in the bones of ovariectomized rats. *J. Hard Tissue Biol.*, in press.
3. Miyazaki, I., Murakami, S., Torigoe, N., Kitamura, Y. and \***Asanuma, M.** (2016) Neuroprotective effects of levetiracetam target xCT in astrocytes in parkinsonian mice. *J. Neurochem.*, 136(1): 194-204.
4. Sasaki, T., Liu, K., Agari, T., \*Yasuhara, T., Morimoto, J., Okazaki, M., Takeuchi, H., Toyoshima, A., Sasada, S., Shinko, A., Kondo, A., Kameda, M., Miyazaki, I., **Asanuma, M.**, Borlongan, C. V., Nishibori, M. and Date, I. (2016) Anti-high mobility group box 1 antibody exerts neuroprotection in a rat model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.*, 275(1): 220-231.
5. Murakami, S., Miyazaki, I., Miyoshi, K. and \***Asanuma, M.** (2015) Long-term systemic exposure to rotenone induces central and peripheral pathology of Parkinson's disease in mice. *Neurochem. Res.*, 40: 1165-1178.
6. \*Kitamura, Y., Hattori, S., Yoneda, S., Watanabe, S., Kanemoto, E., Sugimoto, M., Kawai, T., Machida, A., Kanzaki, H., Miyazaki, I., **Asanuma, M.** and Sendo, T. (2015) Doxorubicin and cyclophosphamide treatment produces anxiety-like behavior and spatial cognition impairment in rats: Possible involvement of hippocampal neurogenesis via brain-derived neurotrophic factor and cyclin D1 regulation. *Behav. Brain Res.*, 292: 184-193.
7. Asano, T., Koike, M., Sakata, S., Takeda, Y., Nakagawa, T., Hatano, T., Ohashi, S., Funayama, M., Yoshimi, K., **Asanuma, M.**, Toyokuni, S., Mochizuki, H., Uchiyama, Y., \*Hattori, N. and \*Iwai, K. (2015) Possible involvement of iron-induced oxidative insults in neurodegeneration. *Neurosci. Lett.*, 588: 29-35.
8. \***Asanuma, M.**, Miyazaki, I., Murakami, S., Diaz-Corrales, F. J. and Ogawa, N. (2014) Striatal astrocytes act as a reservoir for L-DOPA. *PLoS ONE*, 9: e106362.
9. Murakami, S., Miyazaki, I., Sogawa, N., Miyoshi, K. and \***Asanuma, M.** (2014) Neuroprotective effects of metallothionein against rotenone-induced myenteric neurodegeneration in parkinsonian mice. *Neurotox. Res.*, 26: 285-298.
10. Kasahara, K., Miyoshi, K., Murakami, S., Miyazaki, I. and

- \***Asanuma, M.** (2014) Visualization of astrocytic primary cilia in the mouse brain by immunofluorescent analysis using the cilia marker Arl13b. *Acta Med. Okayama*, 68: 317-322.
11. \*Ohmori, I., Kawakami, N., Liu, S., Wang, H., Miyazaki, I., **Asanuma, M.**, Michiue, H., Matsui, H., Mashimo, T. and Ouchida, M. (2014) Methylphenidate improves learning impairments and hyperthermia-induced seizures caused by a Scn1a mutation. *Epilepsia*, 55(10): 1558-1567. doi: 10.1111/epi.12750
12. \*Miyoshi, K., Kasahara, K., Murakami, S., Takeshima, M., Kumamoto, N., Sato, A., Miyazaki, I., Matsuzaki, S., Sasaoka, T., Katayama, T. and **Asanuma, M.** (2014) Lack of dopaminergic inputs elongates the primary cilia of striatal neurons. *PLoS ONE*, 9(5): e97918.
13. Miyake, A., \*Kitamura, Y., Miyazaki, I., **Asanuma, M.** and Sendo, T. (2014) Effects of (+) -8-OH-DPAT on the duration of immobility during the forced swim test and hippocampal cell proliferation in ACTH-treated rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 122: 240-245.
14. \***浅沼幹人**, 宮崎育子 (2014) アストロサイトの部位特異的プロファイルがもたらす脳内環境と神経保護. 高橋良輔, 漆谷真, 山中宏二, 樋口真人編, 脳内環境-維持機構と破綻がもたらす疾患研究, メディカルドゥ, 大阪, pp102-107.
15. Sogawa, N., Hirai, K., Sogawa, C., Ohyama, K., Miyazaki, I., Tsukamoto, G., **Asanuma, M.**, Sasaki, A. and \*Kitayama, S. (2013) Protective effect of cepharanthin on cisplatin-induced renal toxicity through metallothionein expression. *Life Sci.*, 92: 727-732.
16. Morinaga, H., Sugiyama, H., Inoue, T., Takiue, K., Kikumoto, Y., Kitagawa, M., Akagi, S., Nakao, K., Maeshima, Y., Miyazaki, I., **Asanuma, M.**, Hiramatsu, M. and Makino, H. (2012) Effluent free radicals are associated with residual renal function and predict technique failure in peritoneal dialysis patients. *Perit. Dial. Int.*, 32: 453-461.
17. 林宏美, 土居真穂, 尾上由華, 鍛塚圭子, 三宅彩香, 小山敏広, 四宮一昭, 宮崎育子, **浅沼幹人**, \*北村佳久 (2012) ACTH反復投与ラットにおける海馬細胞新生の減少及びそのメカニズムに関する検討. *薬学雑誌*, 132: 173-178.

## 【田口明子 (A02 公募班)】

1. \***田口明子** (2014) インスリン様シグナルとアルツハイマー病—認知機能調節における脳インスリン様シグナルの役割— *医学のあゆみ* 249(6): 535-538, 2014

## 【竹居光太郎 (A02 公募班)】

1. Takahashi, K., Kurihara, Y., Suzuki, Y., Goshima, Y., Tanaka, F., and **Takei, K.** (2015) Association of cerebrospinal fluid levels of lateral olfactory usher substance protein with disease activity in multiple sclerosis. *JAMA Neurology*, 72(2): 176-179 (DOI: 10.1001/jamaneurol).
2. Nagai, J., Kitamura, Y., Owada, K., Yamashita, N., **Takei, K.**, Goshima, Y., Ohshima, T. (2015) Crmp4 deletion promotes recovery from spinal cord injury by neuroprotection and limited scar formation. *Scientific Reports*, 5: 8269 (DOI: 10.1038/srep08269).
3. Takahashi, K., **Takei, K.**, and Tanaka, F. (2015) Association of multiple sclerosis with lateral olfactory tract usher substance (LOTUS), a possible endogenous inhibitor of axonal degeneration. *Clinical and Experimental Neuroimmunology*, 6: 64-69.
4. Takahashi, K., Tanaka, F., and **Takei, K.** (2015) LOTUS, a possible endogenous inhibitor of axonal degeneration, as a biomarker for multiple sclerosis. *Neural Degenerative Disease Management*, 5(6): 469-472 (doi: 10.2217/nmt.15.47).
5. Kurihara, Y. and **Takei, K.** (2015) LOTUS, a potent blocker

- of Nogo receptor causing inhibition of axonal growth. *Neural Regeneration Research*, 10(1): 46-18
- Kurihara, Y., Iketani, M., Ito, H., Nishiyama, K., Sakakibara, Y., Goshima, and Y. **Takei, K.** (2014) LOTUS suppresses axon growth inhibition by blocking interaction between Nogo receptor-1 and all four types of its ligand. *Molecular Cellular Neuroscience*, 61: 211-218.
  - 高橋慶太, 田中章景, **竹居光太郎** (2016) 多発性硬化症の新規病勢診断マーカー. 臨床神経科学 (Clinical Neuroscience), 中外医学社. (印刷中)
  - 竹居光太郎** (2015) 神経回路形成因子 LOTUS の機能に基づく神経系の再生医学的研究. 横浜医学, 横浜医学会. (印刷中)
  - 高橋慶太, 田中章景, **竹居光太郎** (2015) 軸索再生関連分子の多発性硬化症診断マーカーへの応用. *Brain and Nerve*. (印刷中)
  - 竹居光太郎** (2015) 軸索再生阻害因子の制御による神経回路形成と神経再生. 脳神経系の再生医学. p85-90, 診断と治療社.

### 【古川良明 (A02 公募班)】

- \***Furukawa, Y.**, Suzuki, Y., Fukuoka, M., Nagasawa, K., Nakagome, K., Shimizu, H., Mukaiyama, A., Akiyama, S. (2016) A molecular mechanism realizing sequence-specific recognition of nucleic acids by TDP-43. *Sci. Rep.* 6: 20576.
- \***Furukawa, Y.**, Anzai, I., Akiyama, S., Imai, M., Cruz, F. J. C., Saio, T., Nagasawa, K., Nomura, T., Ishimori, K. (2016) Conformational Disorder of the Most Immature Cu, Zn-Superoxide Dismutase Leading to Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Biol. Chem.* 291: 4144-55.
- Ogawa, M., Shidara, H., Oka, K., Kurosawa, M., Nukina, N., \***Furukawa, Y.** (2015) Cysteine residues in Cu, Zn-superoxide dismutase are essential to toxicity in *Caenorhabditis elegans* model of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 463: 1196-202.
- \***古川良明** (2015) タンパク質を再現性よく凝集させるコツ 実験医学 1月号, 羊土社, 93-97
- Sakurai, Y., Anzai, I., \***Furukawa, Y.** (2014) A primary role for disulfide formation in the productive folding of prokaryotic Cu, Zn-superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 289: 20139-49.
- \***Furukawa, Y.** (2014) Chapter 19: Polymorphism of Tau fibrils. *Bio-Nanoimaging: Insights into Protein Misfolding and Aggregation* (Uversky, V. and Lyubchenko, Y. Eds) published by Elsevier, 213-222

### 【加藤総夫 (A02 公募班)】

- 永瀬将志, \***加藤総夫** (2014). シナプス伝達維持におけるアストロサイト・ニューロン間エネルギー共生. 遺伝子医学 MOOK26号: 163-8. 査読無.
- 永瀬将志, \***加藤総夫** (2014). 興奮性シナプス伝達のエネルギーはどのように供給されているか? *Clinical Neuroscience* 32巻: 1310-1. 査読無.

### 【檜山武史 (A02 公募班)】

- Matsumoto M., **Hiyama T.Y.**, Kuboyama K., Suzuki R., Fujikawa A., \*Noda M. (2015) Channel properties of Nax expressed in neurons. *PLoS One* 10: e0126109.
- \*Noda M., **Hiyama T.Y.** (2015) Sodium sensing in the brain. *Pflugers Arch.* 467: 465-74.
- \*Noda M., **Hiyama T.Y.** (2015) The Nax Channel: What It Is and What It Does. *Neuroscientist*, 21: 399-412.

### 【田中謙二 (A02 公募班)】

- Zhou Z, **Tanaka KE**, Matsunaga S, Iseki M, Watanabe M, Matsuki N, Ikegaya Y, \*Koyama R. (2016) Photoactivated

- adenylyl cyclase (PAC) reveals novel mechanisms underlying cAMP-dependent axonal morphogenesis. *Sci Rep.* 5: 19679.
- Sata?a G, Duszy?ska B, Stachowicz K, Rafalo A, Pochwat B, Luckhart C, Albert PR, Daigle M, **Tanaka KE**, Hen R, Lenda T, Nowak G, Bojarski AJ, \*Szewczyk B. (2015) Concentration-Dependent Dual Mode of Zn Action at Serotonin 5-HT1A Receptors: In Vitro and In Vivo Studies. *Mol Neurobiol*. In press
  - Trischler J, Shiomi T, Turner DL, Sklepkiwicz PL, Goldklang MP, **Tanaka KE**, Xu M, Farber DL, \*D'Armiento JM. (2015) Immune Modulation of the T Cell Response in Asthma Through Wnt10b. *Am J Respir Cell Mol Biol*. In press
  - Samuels BA, Anacker C, Hu A, Levinstein MR, Pickenhagen A, Tsetsenis T, Madronal N, Donaldson ZR, Drew LJ, Dranovsky A, Gross CT, **Tanaka KE**, \*Hen R. (2015) 5-HT1A receptors on mature dentate gyrus granule cells are critical for the antidepressant response. *Nat Neurosci.* 18(11): 1606-16.
  - Ishii K, Kubo K, Endo T, Yoshida K, Benner S, Ito Y, Aizawa H, Aramaki M, Yamanaka A, Tanaka K, Takata N, **Tanaka KE**, Mimura M, Tohyama C, Takeyama M, \*Nakajima K. (2015) Neuronal Heterotopias Affect the Activities of Distant Brain Areas and Lead to Behavioral Deficits. *J Neurosci.* 35(36): 12432-45.
  - Seo DO, Carillo MA, Chih-Hsiung Lim S, **Tanaka KE**, \*Drew MR. (2015) Adult Hippocampal Neurogenesis Modulates Fear Learning through Associative and Nonassociative Mechanisms. *J Neurosci.* 35(32): 11330-45.
  - Masamoto K, Uekawa M, Watanabe T, Toriumi H, Takuwa H, Kawaguchi H, Kanno I, Matsui K, **Tanaka KE**, Tomita Y, \*Suzuki N. (2015) Unveiling astrocytic control of cerebral blood flow with optogenetics. *Sci Rep.* 5: 11455.
  - Natsubori A, Takata N, \***Tanaka KE**. (2015) Observation and manipulation of glial cell function by virtue of sufficient probe expression. *Front Cell Neurosci.* 9: 176.
  - Aida T, Chiyo K, Usami T, Ishikubo H, Imahashi R, Wada Y, **Tanaka KE**, Sakuma T, Yamamoto T, \*Tanaka K. (2015) Cloning-free CRISPR/Cas system facilitates functional cassette knock-in in mice. *Genome Biol.* 16: 87.
  - Yoshida K, Xu M, Natsubori A, Mimura M, Takata N, \***Tanaka KE**. (2015) Identification of the extent of cortical spreading depression propagation by Npas4 mRNA expression. *Neurosci Res.* 98: 1-8.
  - Nautiyal KM, **Tanaka KE**, Barr MM, Tritschler L, Le Dantec Y, David DJ, Gardier AM, Blanco C, Hen R, \*Ahmari SE. (2015) Distinct Circuits Underlie the Effects of 5-HT1B Receptors on Aggression and Impulsivity. *Neuron.* 86(3): 813-26.
  - Takata N, Yoshida K, Komaki Y, Xu M, Sakai Y, Hikishima K, Mimura M, Okano H, \***Tanaka KE**. (2015) Optogenetic activation of CA1 pyramidal neurons at the dorsal and ventral hippocampus evokes distinct brain-wide responses revealed by mouse fMRI. *PLoS One.* 10(3): e0121417.
  - Aida T, Yoshida J, Nomura M, Tanimura A, Iino Y, Soma M, Bai N, Ito Y, Cui W, Aizawa H, Yanagisawa M, Nagai T, Takata N, **Tanaka KE**, Takayanagi R, Kano M, Gotz M, Hirase H, \*Tanaka K. (2015) Astroglial glutamate transporter deficiency increases synaptic excitability and leads to pathological repetitive behaviors in mice. *Neuropsychopharmacology.* 40(7): 1569-79.
  - Miyazaki KW, Miyazaki K, **Tanaka KE**, Yamanaka A, Takahashi A, Tabuchi S, \*Doya K. (2014) Optogenetic activation of dorsal raphe serotonin neurons enhances patience for future rewards. *Curr Biol.* 24(17): 2033-40.
  - Fujii S, **Tanaka KE**, Ikenaka K, \*Yamazaki Y. (2014) Increased adenosine levels in mice expressing mutant glial fibrillary acidic protein in astrocytes result in failure of induction of LTP reversal (depotential) in hippocampal



- CA1 neurons. *Brain Res.* 1578: 1-13.
16. Denny CA, Kheirbek MA, Alba EL, **Tanaka KE**, Brachman RA, Laughman KB, Tomm NK, Turi GF, Losonczy A, \*Hen R. (2014) Hippocampal memory traces are differentially modulated by experience, time, and adult neurogenesis. *Neuron*. 83(1): 189-201.
  17. Kanemaru K, Sekiya H, Xu M, Satoh K, Kitajima N, Yoshida K, Okubo Y, Sasaki T, Moritoh S, Hasuwa H, Mimura M, Horikawa K, Matsui K, Nagai T, \*Iino M, \***Tanaka KE**. (2014) In vivo visualization of subtle, transient, and local activity of astrocytes using an ultrasensitive Ca (2+) indicator. *Cell Rep.* 8(1): 311-8.  
プレスリリース有り  
慶應義塾大学プレスリリース  
[http://www.keio.ac.jp/ja/press\\_release/2014/osa3qr0000004muh.html](http://www.keio.ac.jp/ja/press_release/2014/osa3qr0000004muh.html)  
グリア細胞内の微細なカルシウム活動も見逃さない新しい生体内イメージング技術の開発
  18. \*Ohmura Y, **Tanaka KE**, Tsunematsu T, Yamanaka A, \*Yoshioka M. (2014) Optogenetic activation of serotonergic neurons enhances anxiety-like behaviour in mice. *Int J Neuropsychopharmacol.* 17(11): 1777-83.
  19. Tsunematsu T, Ueno T, Tabuchi S, Inutsuka A, **Tanaka KE**, Hasuwa H, Kilduff TS, Terao A, \*Yamanaka A. (2014) Optogenetic manipulation of activity and temporally controlled cell-specific ablation reveal a role for MCH neurons in sleep/wake regulation. *J Neurosci.* 34(20): 6896-909.
  20. \*Yamazaki Y, Fujiwara H, Kaneko K, Hozumi Y, Xu M, Ikenaka K, Fujii S, **Tanaka KE**. (2014) Short- and long-term functional plasticity of white matter induced by oligodendrocyte depolarization in the hippocampus. *Glia.* 62(8): 1299-312.
  21. **田中謙二** (2016) オプトジェネティクスの精神医学への応用 日本レーザー医学会誌 36(4): 478-481
  22. 木村生, **田中謙二** (2015) オプトジェネティクス研究の変遷とこれから 実験医学 33, 3054-3058
  23. 田中優衣, 日野宇太郎, **田中謙二** (2014) 遺伝子改変マウスを"小さく"維持するコツ 実験医学 32, 2973-2979
  24. **田中謙二** (2014) MicrodialysisとOptogenetics 分子のささやきを聴く マイクロダイアリス研究のあゆみと展開 129-136
  25. **田中謙二** (2014) 展望 オプトジェネティクス, 精神医学 56(4): 281-284
  26. **田中謙二** (2014) オプトジェネティクスを始めましょう, 日本薬理学雑誌 143(4): 193-197
  27. 夏堀晃世, **田中謙二** (2014) Optogeneticsが拓く精神疾患の未来 Medical Science Digest 40(5) 13-15
  28. **田中謙二**, 三村将, 高田則雄 (2014) オプトジェネティクスと小動物 functional MRIの融合による脳内環境変化の解析 遺伝子医学 MOOK26号 脳内環境—維持機構と破綻がもたらす疾患研究 125-129
- Research*, 13, 31-35. (invited issues, 査読あり)
5. Machida M, Asashima M. **Kuwabara T\*** (2012) The Insulin Regulatory Network in Adult Hippocampus and Pancreatic endocrine system. *Stem Cells Int.* vol. 2012, 1-8. (査読あり)
  6. **Kuwabara T** and Asashima M (2012) Prospects for regeneration therapy with stem cells, *Inflammation and Regeneration*, 32, 438-445.
  7. **Kuwabara T\*** (2012) Environmental activation of retroelements during adult neurogenesis, *Environment and Epigenetics*.
  8. Antoszczyk S, Terashima K, Warashina M, Asashima M, **Kuwabara T\*** (2012) Active expression of retroelements in neurons differentiated from adult hippocampal neural stem cells. *Neural Stem Cells and Therapy*, 11, 223-238. 査読あり

#### 【富永真琴 (A02 公募班)】

1. Uchida, K., Demirkhanyan, L., Asuthkar, S., Cohen, A., **Tominaga, M.**, \*Zakharian, E. (2016) Stimulation-dependent gating of TRPM3 channel in planar lipid bilayers. *FASEB J.* 30: 1306-1316.
2. Sun, W., Uchida, K., Suzuki, Y., Zhou, Y., Kim, M., Takayama, Y., Takahashi, N., Goto, T., Wakabayashi, S., Kawada, T., Iwata, Y., \***Tominaga, M.** (2016) Lack of TRPV2 impairs thermogenesis in mouse brown adipose tissue. *EMBO reports* 17: 383-399.
3. Takaishi, M., Uchida, K., Suzuki, Y., Matsui, H., Shimada, T., Fujita, F., \***Tominaga, M.** (2016) Reciprocal effects of capsaicin and menthol on thermo-sensation through regulated activities of TRPV1 and TRPM8. *J. Physiol. Sci.* 66: 143-155.
4. Yatsu, R., Miyagawa, S., Kohno, S., Saito, S., Lowers, R. H., Ogino, Y., Fukuta, N., Katsu, Y., Ohta, Y., **Tominaga, M.**, Guillelte, Jr L. J., \*Iguchi, T. (2015) TRPV4 associates environmental temperature and sex determination in the American alligator. *Sci. Rep.* 5: 18581.
5. Kim, M., Goto, T., Yu, R., Uchida, K., **Tominaga, M.**, Kano, Y., Takahashi, N., \*Kawada, T. (2015) Fish oil intake induces UCP1 upregulation in brown and white adipose tissue via the sympathetic nervous system. *Sci. Rep.* 5: 18013.
6. Watanabe, M., Suzuki, Y., Uchida, K., Miyazaki, N., Murata, K., Matsumoto, S., Kakizaki, H., \***Tominaga, M.** (2015) Trpm7 contributes to intercellular junction formation in mouse urothelium. *J. Biol. Chem.* 290: 29882-29893.
7. Suzuki, N., Mihara, H., Nishizono, H., **Tominaga, M.**, \*Sugiyama, T. (2015) Protease- Activated Receptor-2 Up-Regulates Transient Receptor Potential Vanilloid 4 Function in Mouse Esophageal Keratinocyte. *Dig. Dis. Sci.* 60: 3570-3578.
8. Kurashina, T., Dezaki, K., Yoshida, M., Sukma, Rita R., Ito, K., Taguchi, M., Miura, R., **Tominaga, M.**, Ishibashi, S., Kakei, M., \*Yada, T. (2015) The  $\beta$ -cell GHSR and downstream cAMP/TRPM2 signaling account for insulinostatic and glycemic effects of ghrelin. *Sci. Rep.* 5: 14041.
9. Jang, Y., Lee, S. H., Lee, B., Jung, S., Khalid, A., Uchida, K., **Tominaga, M.**, Jeon, D. J., \*Oh, U. (2015) TRPM2, a Susceptibility Gene for Bipolar Disorder, Regulates Glycogen Synthase Kinase-3 Activity in the Brain. *J. Neurosci.* 35: 11811-11823.
10. Nishimoto, R., Kashio, M., \***Tominaga, M.** (2015) Propofol-induced pain sensation involves multiple mechanisms in sensory neurons. *Pfluger Archiv. Eur. J. Physiol.* 467: 20101-2020.
11. Peng, G., Kashio, M., Morimoto, T., Li, T., Zhu, J., **Tominaga, M.**, \*Kadowaki, T. (2015) Conserved and novel activation mechanisms of honey bee ectoparasitic mite TRPA1 and potential use of the activating compounds in apiculture. *Cell*

#### 【桑原知子 (A02 公募班)】

1. Hidaka R, Machida M, Terashima K, Fujimaki S, Asashima M. **Kuwabara T\*** (2013) Monitoring neurodegeneration in diabetes using adult neural stem cells derived from the olfactory bulb. *Stem Cell Res Ther.*, 4, 51 (査読あり)
2. Fujimaki S, Masanao M, Hidaka R, Takemasa T, Asashima M and **Kuwabara T\*** Intrinsic ability of adult stem cell in skeletal muscle: an effective and replenishable resource to establishment of pluripotent stem cells. *Stem Cells Int.*, 2013, 1-18 (査読あり)
3. **Kuwabara T** and Asashima M (2012) Regenerative medicine using adult neural stem cells: Potentials for diabetes therapy and other pharmaceutical applications. *J. Mol. Cell Biol.*, 4, 133-139. (査読あり)
4. **Kuwabara T\*** and Asashima M (2012) Olfactory bulb-derived neural stem cells of diabetes therapy, *Aroma*

- Rep. 12: 190-202.
12. Yoshiyama, M., Mochizuki, T., Nakagomi, H., Miyamoto, T., Kira, S., Mizumachi, R., Sokabe, T., Takayama, Y., **Tominaga, M.**, \*Takeda, M. (2015) Functional roles of TRPV1 and TRPV4 in control of lower urinary tract activity: dual analysis of behavior and reflex during the micturition cycle. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 308: F1128-F1134.
  13. Hatakeyama, Y., Takahashi, K., **Tominaga, M.**, Kimura, H., \*Ohta, T. (2015) Polysulfide evokes acute pain through the activation of nociceptive TRPA1 in mouse sensory neurons. *Molec. Pain* 11: 24.
  14. Kashio, M., \***Tominaga, M.** (2015) Redox signal-mediated enhancement of the temperature sensitivity of Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) elevated glucose-induced insulin secretion from pancreatic islets. *J. Biol. Chem.* 290: 12435-12442.
  15. Takayama, Y., Uta, D., Furue, H., \***Tominaga, M.** (2015) Pain-enhancing mechanism through interaction between TRPV1 and anoctamin 1 in sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112: 5213-5218.
  16. \*Shibasaki, K., **Tominaga, M.**, Ishizaki, Y. (2015) Biochem. Hippocampal neuronal maturation triggers post-synaptic clustering of brain temperature-sensor TRPV4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 458: 168-173.
  17. \*Ohara, K., Fukuda, T., Okada, H., Kitao, S., Ishida, Y., Kato, K., Takahashi, C., Katayama, M., Uchida, K., **Tominaga, M.** (2015) Identification of Significant Amino Acids in Multiple Transmembrane Domains of Human Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) for Activation by Eudesmol, an Oxygenized Sesquiterpene in Hop Essential Oil. *J. Biol. Chem.* 290: 3161-3171.
  18. Aijima, R., Wang, B., Takao, T., Mihara, H., Kashio, M., Ohsaki, Y., Zhang, J-Q., Mizuno, A., Suzuki, M., Yamashita, Y., Masuko, S., Goto, M., **Tominaga, M.**, \*Kido, AM. (2015) The thermosensitive TRPV3 channel contributes to rapid wound healing in oral epithelia. *FASEB J.* 29: 182-192.
- e0019-15. doi: 10.1523/ENEURO.0019-15.2015.
7. Wakimoto M, Sehara K, Ebisu H, Hoshiba Y, Tsunoda S, Ichikawa Y, **Kawasaki H.** (2015) Classic cadherins mediate selective intracortical circuit formation in the mouse neocortex. *Cerebral Cortex* 25, 3535-3546. doi: 10.1093/cercor/bhu197.
  8. **Kawasaki H.** (2015) Spatio-temporal regulation of the formation of the somatosensory system. *Development, Growth & Differentiation* 57, 193-199. doi: 10.1111/dgd.12208.
  9. **Kawasaki H.** (2015) Genetic manipulation of gyrencephalic carnivores using in utero electroporation, in *Electroporation Methods and Neuroscience*, Saito T ed., Springer Publishers, New York, pp105-113.
  10. Fujishiro T, **Kawasaki H.**, Aihara M, Saeki T, Yamagishi R, Atarashi T, Mayama C, Araie M. (2014) Establishment of an experimental ferret ocular hypertension model for the analysis of central visual pathway damage. *Scientific Reports* 4, 6501. doi: 10.1038/srep06501.
  11. **Kawasaki H.** (2014) Molecular investigations of the brain of higher mammals using gyrencephalic carnivore ferrets. *Neuroscience Research* 86, 59-65. doi: 10.1016/j.neures.2014.06.006.
  12. Toda T, **Kawasaki H.** (2014) The development of suckling behavior of neonatal mice is regulated by birth. *Molecular Brain* 7, 8. doi: 10.1186/1756-6606-7-8.

#### 【村松里衣子 (A02公募班)】

1. **Muramatsu R.**, Kuroda M, Matoba K, Lin H, Takahashi C, Koyama Y, Yamashita T. (2015) Prostacyclin prevents pericyte loss and demyelination induced by lysophosphatidylcholine in the central nervous system. *J Biol Chem*, 290: 11515-25.
2. Miyake S, **Muramatsu R.** Hamaguchi M, Yamashita T. (2015) Prolyl hydroxylase regulates axonal rewiring and motor recovery after traumatic brain injury. *Cell Death Dis*, 6: e1638

#### 【河崎洋志 (A02公募班)】

1. Shinmyo Y, Tanaka S, Tsunoda S, Hosomichi K, Tajima A, **Kawasaki H.** CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in the mouse brain using in utero electroporation, *Scientific Reports*, 2016, 6, 20611. doi: 10.1038/srep20611.
2. Shinmyo Y, Masuda K, Hoshiba Y, Ebisu H, **Kawasaki H.** Molecular investigations of the structure and development of the brain of carnivores, in *Brain Evolution by Design*, Shigeno S, Murakami Y, Nomura T eds., Springer Publishers, New York, in press
3. Shinmyo Y, Riyadh MA, Ahmed G, Naser IB, Hossain M, Takebayashi H, **Kawasaki H.**, Ohta K, Tanaka H. (2015) Draxin from neocortical neurons controls the guidance of thalamocortical projections into the neocortex. *Nature Communications* 6, 10232. doi: 10.1038/ncomms10232.
4. Sadakane O, Masamizu Y, Watakabe A, Terada S, Ohtsuka M, Takaji M, Mizukami H, Ozawa K, **Kawasaki H.**, Matsuzaki M, Yamamori T. (2015) Long-term two-photon calcium imaging of neuronal populations with subcellular resolution in adult non-human primates. *Cell Reports* 13, 1989-1999. doi: 10.1016/j.celrep.2015.10.050.
5. Masuda K, Toda T, Shinmyo Y, Ebisu H, Hoshiba Y, Wakimoto M, Ichikawa Y, **Kawasaki H.** (2015) Pathophysiological analyses of cortical malformation using gyrencephalic mammals. *Scientific Reports* 5, 15370. doi: 10.1038/srep15370.
6. Sadakane O, Watakabe A, Ohtsuka M, Takaji M, Sasaki T, Kasai M, Isa T, Kato G, Nabekura J, Mizukami H, Ozawa K, **Kawasaki H.**, Yamamori T. (2015) In vivo two-photon imaging of dendritic spines in marmoset neocortex. *eNeuro* 2,

#### 【平井宏和 (A02公募班)】

1. Matsuzaki Y, Konno A, Mukai R, Honda F, Hirato M, Yoshimoto Y, **Hirai H.** (2016) Transduction Profile of the Marmoset Central Nervous System Using Adeno-Associated Virus Serotype 9 Vectors. *Mol Neurobiol.* 2016 Feb 16. [Epub ahead of print] DOI: 10.1007/s12035-016-9777-6
2. Conceicao M, Mendonca L, Nobrega C, Gomes C, Costa P, **Hirai H.** Moreira JN, Lima MC, Manjunath N, Pereira de Almeida L. (2016) Intravenous administration of brain-targeted stable nucleic acid lipid particles alleviates Machado-Joseph disease neurological phenotype. *Biomaterials*. Mar;82: 124-37. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.12.021.
3. Mieda T, Suto N, Iizuka A, Matsuura S, Iizuka H, Takagishi K, Nakamura K, **Hirai H.** (2016) Mesenchymal stem cells attenuate peripheral neuronal degeneration in spinocerebellar ataxia type 1 knockin mice. *J Neurosci Res*. Mar;94(3): 246-52. DOI: 10.1002/jnr.23698.
4. Nobrega C, Carmo-Silva S, Albuquerque D, Vasconcelos-Ferreira A, Vijayakumar UG, Mendonca L, **Hirai H.** Pereira de Almeida L. (2015) Re-establishing ataxin-2 downregulates translation of mutant ataxin-3 and alleviates Machado-Joseph disease. *Brain*. Dec;138(Pt 12): 3537-54. DOI: 10.1093/brain/awv298.
5. Duarte-Neves J, Goncalves N, Cunha-Santos J, Simoes AT, den Dunnen WF, **Hirai H.** Kugler S, Cavadas C, Pereira de Almeida L. (2015) Neuropeptide Y mitigates neuropathology

gy and motor deficits in mouse models of Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet.* Oct 1;24(19): 5451-63. DOI: 10.1093/hmg/ddv271.

6. Iizuka A, Matsuzaki Y, Konno A, **Hirai H.** (2016) Plasticity of the developmentally arrested staggerer cerebellum in response to exogenous ROR  $\alpha$ . *Brain Struct Funct.* Jun 30. [Epub ahead of print] DOI: 10.1007/s00429-015-1077-9
7. Kusakari S, Saitow F, Ago Y, Shibasaki K, Sato-Hashimoto M, Matsuzaki Y, Kotani T, Murata Y, **Hirai H.** Matsuda T, Suzuki H, Matozaki T, Ohnishi H. (2015) Shp2 in forebrain neurons regulates synaptic plasticity, locomotion, and memory formation in mice. *Mol Cell Biol.* May 1;35(9): 1557-72. DOI: 1128/MCB. 01339-14.
8. Nakamura K, Mieda T, Suto N, Matsuura S, **Hirai H.** (2015) Mesenchymal stem cells as a potential therapeutic tool for spinocerebellar ataxia. *Cerebellum.* Apr;14(2): 165-70. DOI: 10.1007/s12311-014-0604-1.
9. Matsuura S, Shuvaev AN, Iizuka A, Nakamura K, **Hirai H.** (2014) Mesenchymal stem cells ameliorate cerebellar pathology in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 1. *Cerebellum.* Jun;13(3): 323-30. DOI: 10.1007/s12311-013-0536-1.

## A03公募班

### 【武田 篤 (A03公募班)】

1. Odagiri H., Baba T., Nishio Y., Iizuka O., Matsuda M., Inoue K., Kikuchi A., Hasegawa T., Aoki M., **Takeda A.**, Taki Y., Mori E., On the Utility of MIBG SPECT/CT in Evaluating Cardiac Sympathetic Dysfunction in Lewy Body Diseases. *PLoS One.* 11: e0152746, 2016.
2. Kawasaki I., Baba T., **Takeda A.**, Mori E., Loss of awareness of hyposmia is associated with mild cognitive impairment in Parkinson's disease., *Parkinsonism & related dis.* 22: 74-79, 2016.
3. Uchiyama M., Nishio Y., Yokoi K., Hosokai Y., **Takeda A.**, Mori E., Pareidolia in Parkinson's disease without dementia: A positron emission tomography study., *Parkinsonism & relat. disord.* 21: 603-9, 2015.
4. Baba T., Estrada-Bellmann I., Mori E., **Takeda A.**, Visual function in Parkinson's disease., Chaudhuri KR., Tolosa E, Schapira AHV., & Poewe W. (ed.) ; Non-motor symptoms of Parkinson's disease 2nded., p342-353, Oxford University Press, Oxford, UK, 2014.
5. Sugeno N., Hasegawa T., Tanaka N., Fukuda M., Wakabayashi K., Oshima R., Konno M., Miura E., Kikuchi A., Baba T., Anan T., Nakao M., Geisler S., Aoki M., **Takeda A.**, K63-linked ubiquitination by Nedd4-1 facilitates endosomal sequestration of internalized alpha-synuclein., *J. Biol. Chem.* 289: 18137-18151, 2014.
6. Miura E., Hasegawa T., Konno M., Suzuki M., Sugeno N., Fujikake N., Geisler S., Tabuchi M., Oshima R., Kikuchi A., Baba T., Wada K., Nagai Y., **Takeda A.**, Aoki M., VPS35 dysfunction impairs lysosomal degradation of  $\alpha$ -synuclein and exacerbates neurotoxicity in a Drosophila model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease* 71: 1-13, 2014.
7. Shoji Y., Nishio Y., Baba T., Uchiyama M., Yokoi K., Ishioka T., Hosokai Y., Hirayama K., Fukuda H., Aoki M., Hasegawa T., **Takeda A.**, Mori E., Neural substrates of cognitive subtypes in Parkinson's disease: a 3-year longitudinal study., *PLoS One.* 9: e110547, 2014.
8. **Takeda A.**, Baba T., Kikuchi A., Hasegawa T., Sugeno N., Konno M., Miura E., Mori E., Olfactory dysfunction and dementia in Parkinson's disease. *J. Parkinsons Dis.* 4: 181-187, 2014.
9. Stankovic I., Krismer F., Jesic A., Antonini A., Benke T., Brown RG., Burn DJ., Holton JL., Kaufmann H., Kostic VS., Ling H., Meissner WG., Poewe W., Semnic M., Seppi K., **Takeda A.**, Weintraub D., Wenning GK., Cognitive impairment in multiple system atrophy: A position statement by the Neuropsychology Task Force of the MDS multiple system atrophy (MODMSA) Study Group., *Movement Disorders* 29: 857-867, 2014.

### 【林 崇 (A03公募班)】

1. **\*Hayashi T.** (2015) The origin and diversity of PICK1 palmitoylation in the Eutheria. *Neurotransmitter.* 2: e802.
2. **\*Hayashi T.** (2014) Evolutionarily conserved palmitoylation-dependent regulation of ionotropic glutamate receptors in vertebrates. *Neurotransmitter.* 1: e388.
3. Hori K, Nagai T, Shan W, Sakamoto A, Taya S, Hashimoto R, **Hayashi T.** Abe M, Yamazaki M, Nakao K, Nishioka T, Sakimura K, Yamada K, Kaibuchi K, \*Hoshino M. (2014) Cytoskeletal regulation by AUTS2 in neuronal migration and neuritogenesis. *Cell Reports.* 9: 2166-2179.
4. Thomas GM, **\*Hayashi T.** (2013) Smarter neuronal signaling complexes from existing components: How regulatory mod-

ifications were acquired during animal evolution. *Bioessays*. 35: 929-939. [chosen as highlight]

### 【米田 誠 (A03公募班)】

1. Ikawa M, Okazawa H, Tsujikawa T, Matsunaga A, Yamamura O, Mori T, Hamano T, Kiyono Y, Nakamoto Y, \*Yoneda M. Increased oxidative stress is related to disease severity in the ALS motor cortex: A PET study. *Neurology* 2015; 84(20): 2033-9.
2. \*Okazawa H, Ikawa M, Tsujikawa T, Kiyono Y, Yoneda M. Brain imaging for oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2014;58: 1-2 (Review)

### 【遠山育夫 (A03公募班)】

1. \*Tooyama I, Yanagisawa D, Taguchi H, Kato T, Hirao K, Shirai N, Sogabe T, Ibrahim NF, Inubushi T, Morikawa S: Amyloid imaging using fluorine-19 magnetic resonance imaging (19F-MRI). *Ageing Research Reviews* (in press).
2. Sonoda Y, \*Tooyama I, Mukai H, Maeda K, Akiyama H, Kawamata T: S6 kinase phosphorylated at T229 is involved in tau and actin pathologies in Alzheimer's disease. *Neuropathology* (in press).
3. Yanagisawa D, Taguchi H, Morikawa S, Kato T, Hirao K, Shirai N, \*Tooyama I (2015) Novel curcumin derivatives as potent inhibitors of amyloid s aggregation. *Biochem Biophys Report* 4: 357-368.
4. Vigers P, Shiino A, Tooyama I (2015) Diagnosis of amyloid-positive mild cognitive impairment using structural magnetic resonance imaging: the worth of multiple regions of interest. *Integrative Molecular Medicine*. 2: 205-213.
5. Kato T, Konishi Y, Shimohama S, Beach TG, Akatsu H, \*Tooyama I. (2015) Alpha 1-chimaerin, a Rac1 GTPase-activating protein, is expressed at reduced mRNA levels in the brain of Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett* 591: 19-24.
6. Taguchi H, Yanagisawa D, Morikawa S, Hirao K, Shirai N, \*Tooyama I (2015) Synthesis and Tautomerism of Curcumin Derivatives and Related Compounds. *Australian Journal of Chemistry* 68: 224-229.
7. Yang H, Guan H, Yang M, Liu Z, Takeuchi S, Yanagisawa D, Vincent SR, Zhao S, \*Tooyama I (2015) Up-regulation of mitochondrial ferritin by proinflammatory cytokines: Implications for a role in Alzheimer's disease. *J Alzheimer Dis* 45: 797-811.
8. Yanagisawa D, Ibrahim NF, Taguchi H, Morikawa S, Hirao K, Shirai N, Sogabe T, \*Tooyama I (2015) Curcumin derivative with the substitution at C-4 position, but not curcumin, is effective against amyloid pathology in APP/PS1 mice. *Neurobiol Aging* 36: 201-210.
9. McClure R, Yanagisawa D, Stec D, Koktysh D, Xhillari D, Jaeger R, Chekmenev E, Tooyama I, Gore1 JC, Pham W 8 (2015) Inhalable Curcumin: Offering the Potential for Translation to Imaging and Treatment of Alzheimer's Disease. *J Alzheimer Dis* 144: 283-295.

### 【柿澤 昌 (A03公募班)】

1. Van, B., Nishi, M., Komazaki, S., Ichimura, A., Kakizawa, S., Nakanaga, K., Aoki, J., Park, K. H., Ma, J., Ueyama, T., Ogata, T., Maruyama, N., \*Takehima, H. (2015) Mitsugumin 56 (hedgehog acyltransferase-like) is a sarcoplasmic reticulum-resident protein essential for postnatal muscle maturation. *FEBS Letters* 589: 1095-1104.
2. \*Kakizawa, S., Kaiya, H., Takahashi, A. (2014) Posttranslational modification of intercellular messenger

systems. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5: 27.

3. \*Yamamoto, S., Yamazaki, T., Komazaki, S., Yamashita, T., Osaki, M., Matsubayashi, M., Kidoya, H., Takakura, N., Yamazaki, D., Kakizawa, S. (2014) Contribution of calumin to embryogenesis through participation in the endoplasmic reticulum-associated degradation activity. *Developmental Biology* 393: 33-43.
4. \*Kakizawa, S. (2013) Nitric Oxide-Induced Calcium Release: Activation of Type 1 Ryanodine Receptor, a Calcium Release Channel, through Non-Enzymatic Post-Translational Modification by Nitric Oxide. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4: 142.
5. Tao, S., Yamazaki, D., Komazaki, S., Zhao, C., Iida, T., Kakizawa, S., Imaizumi, Y., \*Takehima, H. (2013) Facilitated hyperpolarization signaling in vascular smooth muscle-overexpressing TRIC-A channels. *J Biol Chem* 288: 15581-15589.
6. \*Kakizawa, S., Yamazawa, T., Iino, M. (2013) Nitric oxide-induced calcium release: activation of type 1 ryanodine receptor by endogenous nitric oxide. *Channels (Austin)* 7: 1-5.
7. \*Kakizawa, S., Takehima, H., Iino, M. (2012) Nitric Oxide-Induced Calcium Release: A Novel Calcium-Mobilizing Mechanism Mediated by S-nitrosylation-Dependent Modulation of Ryanodine Receptor. *Messenger* 1: 133-140.
8. Nishi, M., Aoyama, F., Kisa, F., Zhu, H., Sun, M., Lin, P., Ohta, H., Van, B., Yamamoto, S., Kakizawa, S., Sakai, H., Ma, J., Sawaguchi, A., \*Takehima, H. (2012) TRIM50 protein regulates vesicular trafficking for acid secretion in gastric parietal cells. *J Biol Chem* 287: 33523-33532.
9. \*Kakizawa, S., Yamazawa, T., Chen, Y., Ito, A., Murayama, T., Oyamada, H., Kurebayashi, N., Sato, O., Watanabe, M., Mori, N., Oguchi, K., Sakurai, T., Takehima, H., Saito, N., Iino, M. (2012) Nitric oxide-induced calcium release via ryanodine receptors regulates neuronal function. *EMBO J* 31: 417-428.
10. \*Kakizawa, S., Shibasaki, M., Mori, N. (2012) Protein oxidation inhibits NO-mediated signaling pathway for synaptic plasticity. *Neurobiol Aging* 33: 535-545.
11. \*Kakizawa, S. (2016) Nitric Oxide. Essentials of the Cerebellum (ed. Gruol, D., Koibuchi, N., Manto, M., Molinari, M., Schmähmann, J., Shen, Y.), Springer, (in press)
12. \*山澤徳志子, 柿澤昌 (2016) 脳における新規細胞内カルシウム放出機構—酸化窒素依存的カルシウム放出: 神経細胞死への関与, 日本薬理学雑誌, in press
13. \*柿澤昌, 山澤徳志子 (2016) 脳における新規細胞内カルシウム放出機構—酸化窒素依存的カルシウム放出: 制御機構と神経機能への関与, 日本薬理学雑誌, in press
14. \*Kakizawa, S., Mori, N. (2015) Critical Roles of Oxidative Signals in Age-Related Decline of Cerebellar Synaptic Plasticity. *Aging Mechanisms: Cells, Metabolism, Longevity, and Brain Aging* (ed. Mori, N., Mook-Jung, I.), Springer, 275-289
15. \*Kakizawa, S. (2015) Apelin. *Hormone Handbook* (ed. Takei, Y., Ando, H., Tsutsui, K.), Elsevier, 277-278
16. \*Kakizawa, S. (2015) Somatolactin. *Hormone Handbook* (ed. Takei, Y., Ando, H., Tsutsui, K.), Elsevier, 114-115
17. \*柿澤昌 (2014) 内因性チャンネルを用いた脳内レドックス環境イメージングと老化・病態脳研究への応用. 遺伝子医学MOOK26号 脳内環境—恒常性維持機構の破綻と病気 (高橋良輔, 漆谷真, 山中宏二, 樋口真人編), メディカルドゥ, 178-184
18. \*柿澤昌 (2014) 非酵素的翻訳後修飾による脳機能制御機構, ブレインサイエンス・レビュー2014 (廣川信隆編), クバプロ, 57-78
19. \*柿澤昌 (2013) ジャンクトフィリン, 脳科学辞典 (林康紀編), Web辞典, <http://bsd.neuroinf.jp/wiki/ジャンクトフィリン>
20. \*柿澤昌 (2012) リアノジン受容体, 脳科学辞典 (林康紀編), (Web辞典), <http://bsd.neuroinf.jp/wiki/リアノジン受容体>

## 【矢尾育子 (A03公募班)】

1. 矢尾育子. (2016). アセチルコリンの質量分析イメージング. *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan*. 64: 31-3.
2. Hossen, A., 他10名, **Yao, I.** 9番目. (2015). Decreased level of phosphatidylcholine (16: 0/20: 4) in multiple myeloma cells compared to plasma cells: A single-cell MALDI-IMS approach. *Anal Bioanal Chem*. 407: 5273-80. DOI: 10.1007/s00216-015-8741-z
3. **Yao, I.**, Romero GA, Nicolaescu D, Setou M. (T Yokomizo ed) (2015). Lipid machinery investigation using MALDI imaging mass spectrometry. Springer Japan (Tokyo)
4. Setou, M., **Yao, I.** Alisa G. (2015). Woods and Costel C. Darie (Eds.): Advancements of mass spectrometry in biomedical. *Anal Bioanal Chem*. 407: 1283-8. DOI: 10.1007/s00216-014-8372-9
5. Romero, GA., Takei, S., **Yao, I.** (2015). Imaging Mass Spectrometric Analysis of Neurotransmitters: A Review. *Mass Spectrometry (Tokyo)*. 3: S0049. DOI: 10.5702/massspectrometry.S0049
6. 矢尾育子 (高橋良輔, 漆谷真, 山中宏二, 樋口真人編). (2014). 質量分析イメージングによる脳内環境の可視化. 遺伝子医学MOOK 26号 207-211.
7. 武井史郎, 矢尾育子. (2014). 質量分析イメージングの最新動向—質量顕微鏡法について. *インナービジョン* 29: 53-57.
8. Yuki, D., 他11名, **Yao, I.** 6番目. (2014). DHA-PC and PSD-95 decrease after loss of synaptophysin and before neuronal loss in patients with Alzheimer's disease. *Sci Rep*. 4: 7130 DOI: 10.1038/srep07130
9. Lu, J., **Yao, I.**, 他5名. (2014) Identification of nitrated tyrosine residues of protein kinase G-1a by mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 406: 1387-96. DOI: 10.1038/srep07130
10. Eriksson, C., Masaki, N., **Yao, I.**, Hayasaka, T., Setou, M. (2013). MALDI Imaging Mass Spectrometry-A Mini Review of Methods and Recent Developments. *Mass Spectrom (Tokyo)*. S0022 DOI: 10.5702/massspectrometry.S0022
11. 矢尾育子. (2013). 脳内物質のイメージング質量分析. *JSBMS Letters*. 38: 41-46.
12. 矢尾育子, 伊藤誠二. (2013). 神経科学領域における質量分析イメージング. *臨床化学*. 42: 332-337.
13. Takagi, H., Setou, M., Ito, S., **Yao, I.** (2012). SCRAPER Regulates the Thresholds of Long-Term Potentiation/Depression, the Bidirectional Synaptic Plasticity in Hippocampal CA3-CA1 Synapses. *Neural Plasticity*. 352829: 7. DOI: 10.1155/2012/352829
14. Sugiura, Y., **Yao, I.**, Setou, M.. (2012) Imaging Mass Spectrometry (IMS) for Biological Application. *Mass Spectrometry Handbook* 41-83. DOI: DOI: 10.1002/9781118180730.ch3
15. Sugiura, Y., Zaima, N., Setou, M., Ito, S., **Yao, I.** (2012) Visualization of acetylcholine distribution in central nervous system tissue sections by tandem imaging mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 403: 1851-61. DOI: 10.1007/s00216-012-5988-5

## 【船曳和雄 (A03公募班)】

1. Isosaka T, Matsuo T, Yamaguchi T, **Funabiki K.** Nakanishi S, Kobayakawa R, Kobayakawa K. (2015) Htr2a-Expressing Cells in the Central Amygdala Control the Hierarchy between Innate and Learned Fear. *Cell*. 19;163(5): 1153-64.
2. Yamaguchi T, Goto A, Nakahara I, Yawata S, Hikida T, Matsuda M, **Funabiki K.** Nakanishi S. (2015) Role of PKA signaling in D2 receptor-expressing neurons in the core of the nucleus accumbens in aversive learning. *Proc Natl Acad Sci USA*. Sep8; 112(36): 11383-8.

*Sci USA*. Sep8; 112(36): 11383-8.

3. Goto A, Nakahara I, Yamaguchi T, Kamioka Y, Sumiyama K, Matsuda M, Nakanishi S, **Funabiki K.** (2015) Circuit-dependent striatal PKA and ERK signaling underlies rapid behavioral shift in mating reaction of male mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. May 26;112(21): 6718-23.
4. Johkura K, Kawabata Y, Amano Y, Kudo Y, Murata H, Kirimura S, **Funabiki K.** (2015) Bedside evaluation of smooth pursuit eye movements in acute sensory stroke patients. *J Neurol Sci*. Jan 15;348(1-2): 269-71.
5. Taura A, **Funabiki K.** Ohgita H, Ogino E, Torii H, Matsunaga M, Ito J. (2014) One-third of vertiginous episodes during the follow-up period are caused by benign paroxysmal positional vertigo in patients with Meniere's disease. *Acta Otolaryngol*. 134(11): 1140-5.
6. Hayashi Y, Nabeshima Y, Kobayashi K, Miyakawa T, Tanda K, Takao K, Suzuki H, Esumi E, Noguchi S, Matsuda Y, Sasaoka T, Noda T, Miyazaki J, Mishina M, **Funabiki K.** Nabeshima Y. (2014) Enhanced stability of hippocampal place representation caused by reduced magnesium block of NMDA receptors in the dentate gyrus. *Mol Brain*. 4;7: 44.
7. Danjo T, Yoshimi K, **Funabiki K.** Yawata S, Nakanishi S. (2014) Aversive behavior induced by optogenetic inactivation of ventral tegmental area dopamine neurons is mediated by dopamine D2 receptors in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci USA*. 29;111(17): 6455-60.

## 【高橋琢哉 (A03公募班)】

1. Tada H, Koide M, Ara W, Shibata Y, Funabashi T, Suyama K, Goto T, **Takahashi T.** (2015) Estrous Cycle-Dependent Phasic Changes in the Stoichiometry of Hippocampal Synaptic AMPA Receptors in Rats. *Plos One*, 10(6): e0131359.
2. Jitsuki S, Nakajima W, Takemoto K, Sano A, Tada H, Takahashi-Jitsuki A and **Takahashi T.** (2016) Nogo Receptor Signaling Restricts Adult Neural Plasticity by Limiting Synaptic AMPA Receptor Delivery. *Cereb. Cortex*, 26(1): 427-39.
3. Waki N, Susumu J, Akane S, and **Takuya T.** (2016) Sustained enhancement of lateral inhibitory circuit maintains cross modal cortical reorganization. *Plos One*, in press
4. **高橋琢哉:** シナプス可塑性: 基礎研究から臨床応用へ 第57回日本小児神経学会学術集会, 2015. 5. (依頼公演)
5. **高橋琢哉:** Molecular and cellular mechanisms underlying learning, 第92回日本生理学会大会, 2015. 3. (依頼公演)
6. **高橋琢哉:** Synaptic plasticity: from bench to bedside. 慶應義塾大学, 2015. 8. 5 (セミナー講演依頼)
7. **高橋琢哉:** 恐怖記憶が形成される際の脳神経細胞の分子メカニズム. 第8回セファロ・ニューロ・サイコロウマトロジー研究会, 大阪, 2015. 10. (招待講演)
8. **高橋琢哉:** 脳の病気の診断治療の最前線. 第二回シンポジウム 神奈川県ヘルスケア・ニューフロンティア講座実施業務委託事業 最先端技術による次世代健康科学の創出にむけて. 横浜, 2016. 12. (招待講演)

## 【野口潤 (A03公募班)】

1. Nagaoka A, Takehara H, Hayashi-Takagi A, **Noguchi J.** 他5名, \*Kasai H. (2016) Abnormal intrinsic dynamics of dendritic spines in a fragile X syndrome mouse model in vivo. *Sci Rep*. 6: 26651.
2. Takahashi N#, Sawada W#, **Noguchi J#.** Watanabe S#, Ucar H, Hayashi-Takagi A, Yagishita S, Ohno M, Tokumaru H & Kasai H. (#Equally contributed). Two-photon fluorescence lifetime imaging of primed SNARE complexes in presynaptic terminals and  $\beta$  cells. *Nature Communications*. 2015: 6: 8531. doi: 10.1038/ncomms9531.

プレスリリース有

Nature Japanホームページ

<https://www.natureasia.com/ja-jp/ncomms/abstracts/70178>

医療ニュース

<http://www.qlifepro.com/news/20151009/elucidated-the-mystery-of-the-secretion-rate-of-neurotransmitter-and-insulin.html>

3. Takehara H, Nagaoka A, **Noguchi J**, Akagi T, Kasai H, Ichiki T. Lab-on-a-brain: Implantable micro-optical fluidic devices for neural cell analysis in vivo. Scientific Report. 2014; 4: 6721. doi: 10.1038/srep06721.

プレスリリース有

Nature Japanホームページ

<http://www.natureasia.com/ja-jp/jobs/tokushu/detail/344>

4. Boinapally S, Huang B, Abe M, Katan C, **Noguchi J**, Watanabe S, Kasai H, Xue B, Kobayashi T. Caged Glutamates with  $\pi$ -Extended 1, 2-Dihydronaphthalene Chromophore: Design, Synthesis, Two-Photon Absorption Property, and Photochemical Reactivity. J Org Chem. 2014; 79(17): 7822-7830. doi: 10.1021/jo501425p.

## 研究班

## 【高橋良輔 (研究代表者) &amp; 漆谷 真 (研究分担者)】

1. Honjo Y, Horibe T, Torisawa A, Ito H, Nakanishi A, Mori H, Komiya T, **Takahashi R**, Kawakami K. (2014) Protein Disulfide Isomerase P5-Immunopositive Inclusions in Patients with Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 38(3): 601-609. DOI: 10.3233/JAD-130632
2. Oono M, Okado-Matsumoto A, Shodai A, Ido A, Ohta Y, Abe K, Ayaki T, Ito H, **Takahashi R**, Taniguchi N, Urushitani M. (2014). Transglutaminase 2 accelerates neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis through interaction with misfolded superoxide dismutase 1. *J Neurochem*. 128(3) 403-418. DOI: 10.1111/jnc. 12441
3. Itokazu T, Hayano Y, **Takahashi R**, Yamashita T. (2014). Involvement of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in the development of neuropathic pain. *Neurosci Res*. 79. 34-40. DOI: 10.1016/j.neures. 2013. 12. 002.
4. Kawamoto Y, Ito H, Ihara M, **Takahashi R**. (2014). XIAP immunoreactivity in glial and neuronal cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Clin Neuropathol*. 33(1) 76-83. DOI: 10.5414/NP300610.
5. Fumoto N, Mashimo T, Masui A, Ishida S, Mizuguchi Y, Minamimoto S, Ikeda A, **Takahashi R**, Serikawa T, Ohno Y. (2014). Evaluation of seizure foci and genes in the Lgi1L385R/+ mutant rat. *Neurosci Res*. pii: S0168-0102(13) 00290-3. DOI: 10.1016/j.neures. 2013. 12. 008.
6. Ansai S, Inohaya K, Yoshiura Y, Schartl M, Uemura N, **Takahashi R**, Kinoshita M. (2014) Design, evaluation and screening methods for efficient targeted mutagenesis with TALENs in medaka. *Dev. Growth Differ*. 56(1) 98-107 DOI: 10.1111/dgd. 12104
7. Ohno M, Hiraoka Y, Lichtenthaler SF, Nishi K, Saijo S, Matsuoka T, Tomimoto H, Araki W, **Takahashi R**, Kita T, Kimura T, Nishi E. (2014) Nardilysin prevents amyloid plaque formation by enhancing  $\alpha$ -secretase activity in an Alzheimer's disease mouse model. *Neurobiol Aging*. 35(1) 213-22. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging. 2013. 07. 014.
8. Morimura T, Numata Y, Nakamura S, Hirano E, Gotoh L, Goto YI, Urushitani M, Inoue K. (2014) Attenuation of endoplasmic reticulum stress in Pelizaeus-Merzbacher disease by an anti-malaria drug, chloroquine. *Exp Biol Med*. 239: 489. 501
9. Mitsueda-Ono T, Ikeda A, Sawamoto N, Aso T, Hanakawa T, Kinoshita M, Matsumoto R, Mikuni N, Amano S, Fukuyama H, **Takahashi R**. (2013) Internal structural changes in the hippocampus observed on 3-tesla MRI in patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Intern Med*. 52(8) 877-885 DOI: 10.2169/internalmedicine. 52. 8852
10. Matsui H, Uemura N, Yamakado H, Takeda S, **Takahashi R**. (2013) Exploring the Pathogenetic Mechanisms underlying Parkinson's Disease in Medaka Fish. *Parkinsons Dis. J Parkinsons Dis*. 2013 Dec 23. [Epub ahead of print]
11. Minakawa EN, Yamakado H, Tanaka A, Uemura K, Takeda S, **Takahashi R**. (2013) Chicken DT40 cell line lacking DJ-1, the gene responsible for familial Parkinson's disease, displays mitochondrial dysfunction. *Neurosci Res*. 77(4) 228-233 DOI: 10.1016/j.clinph. 2013. 05. 011
12. Hitomi T, Kobayashi K, Jingami N, Nakagawa T, Imamura H, Matsumoto R, Kondo T, Chin K, **Takahashi R**, Ikeda A. (2013) Increased clinical anticipation with maternal transmission in benign adult familial myoclonus epilepsy in Japan. *Epileptic Disord*. 15(4) 428-32. DOI: 10.1684/epd. 2013. 0608.
13. Yamakado H, **Takahashi R**. (2013) The function of parkin: revisited. *Mov Disord*. 28(14) 1936. DOI: 10.1002/mds. 25711.
14. **Takahashi R**, Yamakado H. (2013) Genetic correction will be a standard method for the patient-derived ips cell research? *Mov Disord*. 28(14) 1935. DOI: 10.1002/mds. 25710. Epub 2013 Nov 14.
15. Morimoto E, Okada T, Kanagaki M, Yamamoto A, Fushimi Y, Matsumoto R, Takaya S, Ikeda A, Kunieda T, Kikuchi T, Paul D, Miyamoto S, **Takahashi R**, Togashi K. (2013) Evaluation of focus laterality in temporal lobe epilepsy: a quantitative study comparing double inversion-recovery MR imaging at 3T with FDG-PET. *Epilepsia*. 54(12) 2174-83 DOI: 10.1111/epi. 12396.
16. Inouchi M, Matsumoto R, Taki J, Kikuchi T, Mitsueda-Ono T, Mikuni N, Wheaton L, Hallett M, Fukuyama H, Shibasaki H, **Takahashi R**, Ikeda A. (2013) Role of posterior parietal cortex in reaching movements in humans: Clinical implication for 'optic ataxia. *Clin Neurophysiol*. 124(11) 2230-41 DOI: 10.1016/j.clinph. 2013. 05. 011
17. Akizuki M, Yamashita H, Uemura K, Maruyama H, Kawakami H, Ito H, **Takahashi R**. (2013) Optineurin suppression causes neuronal cell death via NF- $\kappa$ B pathway. *J Neurochem*. 126(6) 699-704
18. Ono M, Cheng Y, Kimura H, Watanabe H, Matsumura K, Yoshimura M, Iikuni S, Okamoto Y, Ihara M, **Takahashi R**, Saji H. (2013) Development of Novel I-123-Labeled Pyridyl Benzofuran Derivatives for SPECT Imaging of beta-Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease. *PLoS One*. 13;8(9) e74104 DOI: 10.1371/journal.pone. 0074104
19. Maesako M, Uemura K, Iwata A, Kubota M, Watanabe K, Uemura M, Noda Y, Asada-Utsugi M, Kihara T, **Takahashi R**, Shimohama S, Kinoshita A. (2013) Continuation of Exercise Is Necessary to Inhibit High Fat Diet-Induced  $\beta$ -Amyloid Deposition and Memory Deficit in Amyloid Precursor Protein Transgenic Mice. *PLoS One*. 8(9) e72796 DOI: 10.1371/journal.pone. 0072796
20. Ageta-Ishihara N, Yamakado H, Morita T, Hattori S, Takao K, Miyakawa T, **Takahashi R**, Kinoshita M. (2013) Chronic overload of SEPT4, a parkin substrate that aggregates in Parkinson's disease, causes behavioral alterations but not neurodegeneration in mice. *Mol Brain*. 6. 11;6: 35. DOI: 10.1186/1756-6606-6-35
21. Fumuro T, Matsuhashi M, Mitsueda T, Inouchi M, Hitomi T, Nakagawa T, Matsumoto R, Kawamata J, Inoue H, Mima T, **Takahashi R**, Ikeda A. (2013) Bereitschaftspotential augmentation by neuro-feedback training in Parkinson's disease. *Clin Neurophysiol*. 124(7) 1398-1405 DOI: 10.1684/epd. 2013. 0567
22. Murahara T, Kinoshita M, Usami K, Matsui M, Yamashita K, **Takahashi R**, Ikeda A. (2013) Prolonged ictal monoparesis with parietal Periodic Lateralised Epileptiform Discharges (PLEDs). *Epileptic Disord*. 15(2) 197-202 DOI: 10.1684/epd. 2013. 0567
23. Noda Y, Asada M, Kubota M, Maesako M, Watanabe K, Uemura M, Kihara T, Shimohama S, **Takahashi R**, Kinoshita A, Uemura K. (2013) Copper enhances APP dimerization and promotes A $\beta$  production. *Neurosci Lett*. 54710-15 DOI: 10.1016/j.neulet. 2013. 04. 057.
24. Matsui H, Gavinio R, Asano T, Uemura N, Ito H, Taniguchi Y, Kobayashi Y, Maki T, Shen J, Takeda S, Uemura K, Yamakado H, **Takahashi R**. (2013) PINK1 and Parkin complementarily protect dopaminergic neurons in vertebrates. *Hum Mol Genet*. 22(12) 2423-2434 DOI: 10.1093/hmg/ddt311

- 10.1093/hmg/ddt095
25. Egawa N, Kitaoka S, Tsukita K, Naitoh M, Takahashi K, Yamamoto T, Adachi F, Kondo T, Okita K, Asaka I, Aoi T, Watanabe A, Yamada Y, Morizane A, Takahashi J, Ayaki T, Ito H, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Watanabe D, Hioki H, Kaneko T, Makioka K, Okamoto K, Takuma H, Tamaoka A, Hasegawa K, Nonaka T, Hasegawa M, Kawata A, Yoshida M, Nakahata T, **Takahashi R**, Marchetto MC, Gage FH, Yamanaka S, Inoue H. (2012) Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Sci Transl Med.* 4(145): 145ra104. DOI: 10.1126/scitranslmed.3004052.
  26. M, Kawata A, Yoshida M, Nakahata T, **Takahashi R**, Marchetto MC, Gage FH, Yamanaka S, Inoue H. (2013) Response to comment on "Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells". *Sci Transl Med.* 5(188) 188lr2. DOI: 10.1126/scitranslmed.3005697.
  27. Matsumura K, Ono M, Yoshimura M, Kimura H, Watanabe H, Okamoto Y, Ihara M, **Takahashi R**, Saji H. (2013) Synthesis and biological evaluation of novel styryl benzimidazole derivatives as probes for imaging of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Bioorg Med Chem.* 21(11) 3356-62. DOI: 10.1016/j.bmc.2013.02.054.
  28. Iguchi Y, Katsuno M, Niwa J, Takagi S, Ishigaki S, Ikenaka K, Kawai K, Watanabe H, Yamanaka K, **Takahashi R**, Misawa H, Sasaki S, Tanaka F, Sobue G. (2013) Loss of TDP-43 causes age-dependent progressive motor neuron degeneration. *Brain.* 136(Pt 5) 1371-82. DOI: 10.1093/brain/awt029.
  29. Shodai A, Morimura T, Ido A, Uchida T, Ayaki T, Takahashi R, Kitazawa S, Suzuki S, Shirouzu M, Kigawa T, Muto Y, Yokoyama S, **Takahashi R**, Kitahara R, Ito H, Fujiwara N, Urushitani M. (2013) Aberrant assembly of RNA-recognition motif 1 links to pathogenic conversion of TAR DNA-binding protein-43 (TDP-43). *J Biol Chem.* 288(21) 14886-14905 DOI: 10.1074/jbc.M113.451849
  30. Matsui H, Sato F, Sato S, Koike M, Taruno Y, Saiki S, Funayama M, Ito H, Taniguchi Y, Uemura N, Toyoda A, Sakaki Y, Takeda S, Uchiyama Y, Hattori N, **Takahashi R**. (2013) ATP13A2 deficiency induces a decrease in cathepsin D activity, fingerprint-like inclusion body formation, and selective degeneration of dopaminergic neurons. *FEBS Lett.* 587(9) 1316-1325 DOI: 10.1016/j.febslet.2013.02.046
  31. Usami K, Matsumoto R, Kunieda T, Shimotake A, Matsuhashi M, Miyamoto S, Fukuyama H, **Takahashi R**, Ikeda A. (2013) Pre-SMA actively engages in conflict processing in human: A combined study of epicortical ERPs and direct cortical stimulation. *Neuropsychologia.* 51. 1011-1017 DOI: 10.1016/j.neuropsychologia.2013.02.002
  32. Okuchi S, Okada T, Ihara M, Gotoh K, Kido A, Fujimoto K, Yamamoto A, Kanagaki M, Tanaka S, **Takahashi R**, Togashi K. (2013) Visualization of Lenticulostriate Arteries by Flow-Sensitive Black-Blood MR Angiography on a 1.5T MRI System: A Comparative Study between Subjects with and without Stroke. *AJNR Am J Neuroradiol.* 34(4) 780-4 DOI: 10.3174/ajnr.A3310.
  33. Kondo T, Asai M, Tsukita K, Kutoku Y, Ohsawa Y, Sunada Y, Imamura K, Egawa N, Yahata N, Okita K, Takahashi K, Asaka I, Aoi T, Watanabe A, Watanabe K, Kadoya C, Nakano R, Watanabe D, Maruyama K, Hori O, Hibino S, Choshi T, Nakahata T, Hioki H, Kaneko T, Naitoh M, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Hata R, Ueno S, Seki T, Kobayashi K, Toda T, Murakami K, Irie K, Klein WL, Mori H, Asada T, **Takahashi R**, Iwata N, Yamanaka S, Inoue H. (2013) Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A $\beta$  and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell.* 12(4) 487-96. DOI: 10.1016/j.stem.2013.01.009.
  34. Kawamoto Y, Ito H, Ihara M, **Takahashi R**. (2012) Immunohistochemical localization of X-linked inhibitor of apoptosis protein in brainstem-type and cortical Lewy bodies. *Neuroreport.* 162-167.
  35. Kanao T, Sawada T, Davies SA, Ichinose H, Hasegawa K, **Takahashi R**, Hattori N, Imai Y. (2012) The Nitric Oxide-Cyclic GMP Pathway Regulates FoxO and Alters Dopaminergic Neuron Survival in Drosophila. *PLoS One.* 7: e30958. Epub 2012 Feb 29.
  36. Liu S, Sawada T, Lee S, Yu W, Silverio G, Alapatt P, Millan I, Shen A, Saxton W, Kanao T, **Takahashi R**, Hattori N, Imai Y, Lu B. (2012) Parkinson's Disease-Associated Kinase PINK1 Regulates Miro Protein Level and Axonal Transport of Mitochondria. *PLoS Genet.* 8: e1002537. Epub 2012 Mar 1.
  37. Kuroda Y, Sako W, Goto S, Sawada T, Uchida D, Izumi Y, Takahashi T, Kagawa N, Matsumoto M, Matsumoto M, **Takahashi R**, Kaji R, Mitsui T. (2012) Parkin interacts with Klok1 for mitochondrial import and maintenance of membrane potential. *Hum Mol Genet* 21: 991-1003.
  38. Yamakado H, Moriwaki Y, Yamasaki N, Miyakawa T, Kurisu J, Uemura K, Inoue H, Takahashi M, **Takahashi R**. (2012)  $\alpha$ -Synuclein BAC transgenic mice as a model for Parkinson's disease manifested decreased anxiety-like behavior and hyperlocomotion. *Neurosci Res.* 73(2): 173-7
  39. Yeo CW, Ng FS, Chai C, Tan JM, Koh GR, Chong YK, Koh LW, Foong CS, Sandanaraj E, Holbrook JD, Ang BT, **Takahashi R**, Tang C, Lim KL. (2012) Parkin pathway activation mitigates glioma cell proliferation and predicts patient survival. *Cancer Res* 72: 2543-2253.
  40. Hashida K, Kitao Y, Sudo H, Awa Y, Maeda S, Mori K, **Takahashi R**, Iinuma M, Hori O. (2012) ATF6 $\alpha$  promotes astroglial activation and neuronal survival in a chronic mouse model of Parkinson's disease. *PLoS One.* 7(10): e47950. DOI: 10.1371/journal.pone.0047950. Epub 2012 Oct 24.
  41. Nuber S, Harmuth F, Kohl Z, Adame A, Trejo M, Schonig K, Zimmermann F, Bauer C, Casadei N, Giel C, Calaminus C, Pichler BJ, Jensen PH, Muller CP, Amato D, Kornhuber J, Teismann P, Yamakado H, **Takahashi R**, Winkler J, Masliah E, Riess O. (2012) A Progressive Dopaminergic Phenotype Associated with Neurotoxic Conversion of alpha-Synuclein in BAC Transgenic Rats. *Brain.* 136(Pt 2): 412-32. DOI: 10.1093/brain/awt358.
  42. Fujita Y, Kuchimaru T, Kadonosono T, Tanaka S, Hase Y, Tomimoto H, Hiraoka M, Kizaka-Kondoh S, Ihara M, **Takahashi R**. In vivo imaging of brain ischemia using an oxygen-dependent degradative fusion protein probe. *PLoS One.* 7(10): e48051 Epub 2012 Oct 19.
  43. Baulac S, Ishida S, Mashimo T, Boillot M, Fumoto N, Kuwamura M, Ohno Y, Takizawa A, Aoto T, Ueda M, Ikeda A, Leguern E, **Takahashi R**, Serikawa T. (2012) A rat model for LGI1-related epilepsies. *Hum Mol Genet.* 21(16): 3546-57.
  44. Kajiwara M, Aoi T, Okita K, **Takahashi R**, Inoue H, Takayama N, Endo H, Eto K, Toguchida J, Uemoto S, Yamanaka S. (2012) Donor-dependent variations in hepatic differentiation from human-induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(31): 12538-43.
  45. Egawa N, Kitaoka S, Tsukita K, Naitoh M, Takahashi K, Yamamoto T, Adachi F, Kondo T, Okita K, Asaka I, Aoi T, Watanabe A, Yamada Y, Morizane A, Takahashi J, Ayaki T, Ito H, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Watanabe D, Hioki H, Kaneko T, Makioka K, Okamoto K, Takuma H, Tamaoka A, Hasegawa K, Nonaka T, Hasegawa M, Kawata A, Yoshida M, Nakahata T, **Takahashi R**, Marchetto MC, Gage FH, Yamanaka S, Inoue H. (2012) Drug Screening for ALS Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells.



- Sci Transl Med.* 4(145): 145ra104.
46. Kasahara S, Miki Y, Kanagaki M, Kondo T, Yamamoto A, Morimoto E, Okada T, Ito H, **Takahashi R**, Togashi K. (2012) "Hot cross bun" sign in multiple system atrophy with predominant cerebellar ataxia: A comparison between proton density-weighted imaging and T2-weighted imaging. *Eur J Radiol.* 81(10): 2848-52.
  47. Tashiro Y, Urushitani M, Inoue H, Koike M, Uchiyama Y, 他6名, \*Ito H, \***Takahashi R**. (2012) Motor neuron-specific disruption of proteasomes, but not autophagy, replicates amyotrophic lateral sclerosis. *J. Biol. Chem.* 287: 42984-94
  48. Okamoto Y, Ihara M, Urushitani M, Yamashita H, Kondo T, Tanigaki A, Oono M, Kawamata J, Ikemoto A, Kawamoto Y, **Takahashi R**, Ito H. (2011) An autopsy case of SOD1-related ALS with TDP-43 positive inclusions. *Neurology.* 77(22): 1993-5.
  49. Okamoto Y, Shirakashi Y, Ihara M, Urushitani M, Oono M, Kawamoto Y, Yamashita H, Shimohama S, Kato S, Hirano A, Tomimoto H, Ito H. & **Takahashi R**. (2011) Colocalization of 14-3-3 proteins with SOD1 in Lewy body-like hyaline inclusions in familial amyotrophic lateral sclerosis cases and the animal model. *PLoS One.* 6(5): e20427.
  50. 守村敏史, **高橋良輔**, 漆谷 真. (2013) ミスフォールド蛋白質による神経細胞死と治療戦略. MOOK別冊「細胞死研究の今ー疾患との関わり, 創薬に向けてのアプローチ」 2013. 44
  51. **高橋良輔**. (2013) 脳内環境とその変調. Medical Science Digest 39巻
  52. 浅野剛史, **高橋良輔**. (2013) 変性疾患【1】鉄と神経変性疾患, 神経 5巻
  53. 澤田知世, 今居 謙, **高橋良輔**. (2013) ミトコンドリア病としてのパーキンソン病. 脳 21 16巻(1) 65 -70
  54. 糸数隆秀, **高橋良輔**, 山下俊英. (2013) 錐体路の機能回復メカニズム Annual Review 神経, 2013. 8
  55. Urushitani M and Morimura T (2013) Amyotrophic Lateral Sclerosis: Symptoms, Treatment and Prognosis. Nova Science Publishers, Inc. 2013. 5-108
  56. 漆谷 真. すべてがわかる筋萎縮性側索硬化症・運動ニューロン疾患, 中山書店, 2013
  57. **Takahashi R**. (2013) JSN treatment guideline for Parkinson's disease: its editorial policy and problems to be addressed. *Rinsyo Shinkeigaku.* 53(11) 1343-5.
  58. Kondo T, Inoue H, **Takahashi R**. (2013) New and future treatments for neurological disorders--knowledge essential to daily clinics and future prospects. *Topics: 15. Therapeutic application of iPS cells.* *Nihon Naika Gakkai Zasshi.* 102(8) 2015-22.
  59. Nakaoku Y, Maki T, Kanazawa K, Matsumoto R, Fukuyama H, **Takahashi R**, Ikeda A. (2013) A case of smoldering anti-leucine-rich glioma-inactivated 1 (LGI1) antibody-associated limbic encephalitis with faciobrachial dystonic seizure. *Rinsho Shinkeigaku.* 53(9) 706-11.
  60. 小芝 泰, **高橋良輔**. (2013) 孤発性パーキンソン病におけるiPS細胞研究, 医学のあゆみ, 247. 1115-1118
  61. 山下博史, **高橋良輔**. (2013) 脳神経科学イラストレイテッド第3版(羊土社) ALSなど運動ニューロン病 p300-311
  62. 山下博史, 山中宏二 (2012) ALS病態におけるグリアの役割 脳 21 vol. 15 No. 1 p28-33
  63. 山下博史, 山中宏二 (2011) ALS-SOD1の発症機序 *Clinical Neuroscience* vol. 29 no. 9 (2011-9) p1044-45
  - 2014 Jan 21;10 (4). [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24451648.
  2. Matsui H, Sato F, Sato S, Koike M, Taruno Y, Saiki S, Funayama M, Ito H, Taniguchi Y, Uemura N, Toyoda A, Sakaki Y, Takeda S, Uchiyama Y, **Hattori N**, Takahashi R. ATP13A2 deficiency induces a decrease in cathepsin D activity, fingerprint-like inclusion body formation, and selective degeneration of dopaminergic neurons. *FEBS Lett.* 2013 May 2;587(9): 1316-25. doi: 10.1016/j.febslet.2013.02.046. Epub 2013 Mar 13. PubMed PMID: 23499937.
  3. Ando M, Funayama M, Li Y, Kashihara K, Murakami Y, Ishizu N, Toyoda C, Noguchi K, Hashimoto T, Nakano N, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Ogaki K, Yamashita C, Yoshino H, Hatano T, Tomiyama H, **Hattori N**. VPS35 mutation in Japanese patients with typical Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2012 Sep 15;27(11): 1413-7. doi: 10.1002/mds.25145. Epub 2012 Sep 18. PubMed PMID: 22991136.
  4. Imaizumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Koike M, Kuzumaki N, Hayakawa H, Nihira T, Kobayashi T, Ohyama M, Sato S, Takanashi M, Funayama M, Hirayama A, Soga T, Hishiki T, Suematsu M, Yagi T, Ito D, Kosakai A, Hayashi K, Shouji M, Nakanishi A, Suzuki N, Mizuno Y, Mizushima N, Amagai M, Uchiyama Y, Mochizuki H, **Hattori N**, Okano H. Mitochondrial dysfunction associated with increased oxidative stress and  $\alpha$ -synuclein accumulation in PARK2 iPSC-derived neurons and postmortem brain tissue. *Mol Brain.* 2012 Oct 6;5: 35. doi: 10.1186/1756-6606-5-35. PubMed PMID: 23039195; PubMed Central PMCID: PMC3546866.
  5. Okatsu K, Oka T, Iguchi M, Imamura K, Kosako H, Tani N, Kimura M, Go E, Koyano F, Funayama M, Shiba-Fukushima K, Sato S, Shimizu H, Fukunaga Y, Taniguchi H, Komatsu M, **Hattori N**, Mihara K, Tanaka K, Matsuda N. PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria. *Nat Commun.* 2012;3: 1016. doi: 10.1038/ncomms2016. PubMed PMID: 22910362; PubMed Central PMCID: PMC3432468.
  6. Shiba-Fukushima K, Imai Y, Yoshida S, Ishihama Y, Kanao T, Sato S, **Hattori N**. PINK1-mediated phosphorylation of the Parkin ubiquitin-like domain primes mitochondrial translocation of Parkin and regulates mitophagy. *Sci Rep.* 2012;2: 1002. doi: 10.1038/srep01002. Epub 2012 Dec 19. PubMed PMID: 23256036; PubMed Central PMCID: PMC3525937.
  7. Ujiie S, Hatano T, Kubo S, Imai S, Sato S, Uchiyama T, Yagishita S, Hasegawa K, Kowa H, Sakai F, **Hattori N**. LRRK2 I2020T mutation is associated with tau pathology. *Parkinsonism Relat Disord.* 2012 Aug;18(7): 819-23. doi: 10.1016/j.parkreldis.2012.03.024. Epub 2012 Apr 22. PubMed PMID: 22525366.
  8. Saiki S, Sato S, **Hattori N**. Molecular pathogenesis of Parkinson's disease: update. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2012 Apr;83(4): 430-6. doi: 10.1136/jnnp-2011-301205. Epub 2011 Dec 3. Review. PubMed PMID: 22138181.
  9. Nishino K, **Hattori N**, Sato S, Arai Y, Tanaka S, Nagy A, Shiota K. Non-CpG methylation occurs in the regulatory region of the Sry gene. *J Reprod Dev.* 2011 Oct;57(5): 586-93. Epub 2011 Jun 3. PubMed PMID: 21636956.
  10. Kawajiri S, Saiki S, Sato S, **Hattori N**. Genetic mutations and functions of PINK1. *Trends Pharmacol Sci.* 2011 Oct;32(10): 573-80. doi: 10.1016/j.tips.2011.06.001. Epub 2011 Jul 23. Review. PubMed PMID: 21784538.
  11. **Hattori N**, Eguchi H, Imaizumi M, Saiki S, Sato S, Nagamatsu S. [The pathomechanisms of young-onset Parkinson's disease (PD), approach to the causes of PD form the mechanisms of insulin secretion system]. *Rinsho*

#### 【服部信孝 (AO1 計画班)】

1. Furuya N, Ikeda SI, Sato S, Soma S, Ezaki J, Trejo JA, Takeda-Ezaki M, Fujimura T, Arikawa-Hirasawa E, Tada N, Komatsu M, Tanaka K, Kominami E, **Hattori N**, Ueno T. PARK2/Parkin-mediated mitochondrial clearance contributes to proteasome activation during slow-twitch muscle atrophy via NFE2L1 nuclear translocation. *Autophagy.*

Shinkeigaku. 2011 Nov;51(11): 986-7. Japanese. PubMed PMID: 22277450.

12. Usami Y, Hatano T, Imai S, Kubo S, Sato S, Saiki S, Fujioka Y, Ohba Y, Sato F, Funayama M, Eguchi H, Shiba K, Ariga H, Shen J, **Hattori N**. DJ-1 associates with synaptic membranes. *Neurobiol Dis*. 2011 Sep;43(3): 651-62. doi: 10.1016/j.nbd.2011.05.014. Epub 2011 May 30. PubMed PMID: 21645620.
13. Sato S, **Hattori N**. Genetic mutations and mitochondrial toxins shed new light on the pathogenesis of Parkinson's disease. *Parkinsons Dis*. 2011;2011: 979231. doi: 10.4061/2011/979231.

### 【内山安男 (研究代表者)】

1. \*Nakafuku-Fukuda, M., Hirata, T., Keto, Y., Yamano, M., Yokoyama, T., **Uchiyama, Y.** (2014) Inhibitory effect of the selective secretion 5-HT receptor antagonist ramosetron on duodenal acidification-induced gastric hypersensitivity in rats. *Eur J Pharmacol* doi: 10.1016/j.ejphar.2014.02.040.
2. Yamanaka, T., Tosaki, A., Kurosawa, M., Matsumoto, G., Koike, M., **Uchiyama, Y.**, Maity, S. N., Shimogori, T., Hattori, N., \*Nukina, N. (2014) NF-Y inactivation causes atypical neurodegeneration characterized by ubiquitin and p62 accumulation and endoplasmic reticulum disorganization. *Nat Commun* doi: 10.1038/ncomms4354
3. \*Yokono, M., Takasu, T., Hayashizaki, Y., Mitsuoka, K., Kihara, R., Muramatsu, Y., Miyoshi, S., Tahara, A., Kurosaka, E., Li, Q., Tomiyama, H., Sasamata, M., Shibasaki, M., **Uchiyama, Y.** (2014) SGLT2 selective inhibitor ipragliflozin reduces body fat mass by increasing fatty acid oxidation in high-fat diet-induced obese rats. *Eur J Pharmacol* doi: 10.1016/j.ejphar.2014.01.004
4. Awazawa, M., Futami, T., Sakada, M., Kaneko, K., Ohsugi, M., Nakaya, K., Terai, A., Suzuki, R., Koike, M., **Uchiyama, Y.**, Kadowaki, T., Ueki, K. (2014) Deregulation of Pancreas-Specific Oxidoreductin ERO1 $\beta$  in the Pathogenesis of Diabetes Mellitus. *Mol Cell Biol* doi: 10.1128/MCB.01647-13
5. Nonomura, K., Yamaguchi, Y., Hamachi, M., Koike, M., **Uchiyama, Y.**, Nakazato, K., Mochizuki, A., Sakaue-Sawano, A., Miyawaki, A., Yoshida, H., Kuida, K., \*Miura, M. (2013) Local apoptosis modulates early mammalian brain development through the elimination of morphogen-producing cells. *Dev Cell* 27: 621-634
6. Abe, H., Uchida, T., Hara, A., Mizukami, H., Komiya, K., Koike, M., Shighara, N., Toyofuku, Y., Oghihara, T., **Uchiyama, Y.**, Yagihashi, S., Fujitani, Y., Watada, H. (2013) Exendin-4 improves beta cell function in autophagy-deficient beta cells. *Endocrinology* 154: 4512-4524
7. Sakata, K., Ohmuraya, M., Araki, K., Suzuki C, Ida S, Hashimoto D, Wang J, **Uchiyama Y**, Baba H, \*Yamamura K (2014) Generation and analysis of serine protease inhibitor Kazal type 3-Cre driver mice. *Exp Animals* 63: 45-53
8. Kashima, J., Shintani-Ishida, K., Nakajima, M., Maeda, H., Unuma, K., **Uchiyama, Y.**, \*Yoshida, K. (2013) Immunocytochemical study of the autophagy marker microtubule-associated protein 1 light chain 3 in normal and steatotic human livers. *Hepatology Research*, DOI: 10.1111/hepr.12183
9. Okura, H., Kobayashi, T., Koike, M., Ohsawa, M., Zhang, D., Arai, H., **Uchiyama, Y.**, \*Hino O (2013) Tuberin activates and controls the distribution of Rac1 via association with p62 and ubiquitin through the mTORC1 signaling pathway. *Int J Oncol* 43: 447-456
10. Adachi, T., Takahara, K., Taneo, J., **Uchiyama, Y.**, \*Inaba, K. (2013) Particle size of latex beads dictates IL-1 production mechanism. *PLoS One* 8(7): e68499
11. #Koike, M., #\*Tanida, I., Nanao, N., Tada, N., Iwata, J., Ueno, T., Kominami, E., **\*Uchiyama, Y.** (2013) Enrichment of GABARAP relative to LC3 in the axonal initial segments of neurons. *PLoS One* 8: e63568 (#equally contributed)
12. #Matsui, H., #Sato, F., Sato, S., Koike, M., Taruno, Y., Saiki, S., Funayama, M., Ito, H., Taniguchi, Y., Uemura, N., Toyoda, A., Sakaki, Y., Takeda, S., **Uchiyama, Y.**, Hattori, N., \*Takahashi, R. ATP13A2 deficiency induces a decrease in cathepsin D activity, fingerprint-like inclusion body formation, and selective degeneration of dopaminergic neurons. *FEBS letters* 587(9): 1316-25, 2013. (#These authors contributed equally to this work)
13. Ohkouchi S, Shibata M, Sasaki M, Koike M, Safig P, Peters C, Nagata S, **\*Uchiyama Y** (2013) Biogenesis and proteolytic processing of lysosomal DNase II. *PLoS One*, 8: e59148
14. Furuta, A., Wakabayashi, K., Haratake, J., Kikuchi, H., Kabuta, T., Mori, F., Tokonami, F., Katsumi, Y., Tanioka, F., **Uchiyama, Y.**, Nishino, I., Wada, K. (2013) Lysosomal storage and advanced senescence in the brain of LAMP-2-deficient Danon disease. *Acta Neuropathol*, 125: 459-461
15. \*Koike, M., Shibata, M., Ezaki, J., Peters, C., Saftig, P., Kominami, E., **Uchiyama, Y.** (2013) Differences in expression patterns of cathepsin C/dipeptidyl peptidase I in normal, pathological and aged mouse central nervous systems. *Eur J Neurosci*, 37: 816-830
16. Piao, X., Komazawa-Sakon, S., Nishida, T., Koike, M., Piao, J. H., Ehlfen, H., Kurihara, H., Hara, M., van Rooijen, N., Schutz, G., Ohmuraya, M., **Uchiyama, Y.**, Yagita, H., Okumura, K., He, Y. W., Nakano, H. (2012) c-FLIP maintains tissue homeostasis by preventing apoptosis and programmed necrosis. *Sci Signal* doi: 10.1126/scsignal.2003448
17. Tashiro, Y., Urushitani, M., Inoue, H., Koike, M., **Uchiyama, Y.**, Komatsu, M., Tanaka, K., Yamazaki, M., Abe, M., Misawa, H., Sakimura, K., Ito, H., \*Takahashi, R. (2012) Motor Neuron-specific Disruption of Proteasomes, but not Autophagy, Replicates Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Biol Chem*, 287: 42984-42994
18. Unno, T., Wakamori, M., Koike, M., **Uchiyama, Y.**, Ishikawa, K., Kubota, H., Yoshida, T., Sasakawa, H., Peters, C., Mizusawa, H., \*Watase, K. (1912) Development of Purkinje cell degeneration in a knockin mouse model reveals lysosomal involvement in the pathogenesis of SCA6. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109: 17693-17698
19. Hayakawa, N., Shiozaki, M., Shibata, M., Koike, M., **Uchiyama, Y.**, Matsuura, M., \*Gotow, T. (2012) Resveratrol affects undifferentiated and differentiated PC12 cells differently, particularly with respect to possible differences in mitochondrial and autophagic functions. *Eur J Neurosci*, 92: 30-43
20. Sekine, S., Kanamaru, Y., Koike, M., Nishihara, A., Okada, M., Kinoshita, H., Kamiyama, J., Maruyama, J., **Uchiyama, Y.**, Ishihara, N., Takeda, K., \*Ichijo, H. (2012) Rhomboid protease PARL mediates the mitochondrial membrane potential loss-induced cleavage of PGAM5. *J Biol Chem*, 287: 34635-34645, PMID: 22915595
21. Imaizumi, Y., Okada, Y., Akamatsu, W., Koike, M., Kuzumaki, N., Hayakawa, H., Nihira, T., Kobayashi, T., Ohyama, M., Sato, S., Takanashi, M., Funayama, M., Hirayama, A., Soga, T., Hishiki, T., Suematsu, M., Yagi, T., Ito, D., Kosakai, A., Hayashi, K., Shouji, M., Nakanishi, A., Suzuki, N., Mizushima, N., Amagai, M., **Uchiyama, Y.**, Mochizuki, H., Hattori, N., \*Okano, H. (2012) Mitochondrial dysfunction associated with increased oxidative stress and -synuclein accumulation in PARK2 iPSC-derived neurons and postmortem brain tissue. *Mol Brain*, 5: 35. doi: 10.1186/1756-6606-5-35.
22. \*Klionsky, D. et al. (2012) Guidelines for the use and inter-

- pretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8: 4, 1-100
23. 14. Kuwahara Y, Oikawa T, Ochiai Y, Roudkenar MH, Fukumoto M, Shimura T, Ohtake Y, Ohkubo Y, Mori S, **Uchiyama Y**, Fukumoto M (2011) Enhancement of autophagy is a potential modality for tumors refractory to radiotherapy. *Cell Death Dis.* 2: e177
  24. Shiozaki M, Hayakawa N, Shibata M, Koike M, **Uchiyama Y**, Gotow T (2011) Closer association of mitochondria with lipid droplets in hepatocytes and activation of Kupffer cells in resveratrol-treated senescence-accelerated mice. *Histochem Cell Biol.* 136: 475-489
  25. 16. Nori S, Okada Y, Yasuda A, Tsuji O, Takahashi Y, Kobayashi Y, Fujiyoshi K, Koike M, **Uchiyama Y**, Ikeda E, Toyama Y, Yamanaka S, Nakamura M, Okano H (2011) Grafted human-induced pluripotent stem-cell-derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 16825-16830
  26. 17. Uchida Y, Hasegawa J, Chinnapen D, Inoue T, Okazaki S, Kato R, Wakatsuki S, Misaki R, Koike M, **Uchiyama Y**, Iemura S, Natsume T, Kuwahara R, Nakagawa T, Nishikawa K, Mukai K, Miyoshi E, Taniguchi N, Sheff D, Lencer WI, Taguchi T, Arai H (2011) Intracellular phosphatidylserine is essential for retrograde membrane traffic through endosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 15846-15851
  27. Koyanagi M, Asahara A, Matsuda T, Hashimoto N, Shigeyama Y, Shibutani Y, Hosooka T, Inoue H, Matsumoto H, Koike M, **Uchiyama Y**, Noda T, Seino S, Kasuga M, Kido Y (2011) Ablation of TSC2 enhances insulin secretion by increasing the number of mitochondria through activation of mTORC1. *PLoS One* 6: e23238
  28. **Uchiyama Y**, Kominami E (2013) Autophagy regulates lipid droplet formation and adipogenesis. In: *Lipid metabolism*. Ed by Rodrigo Valenzuela Baez. *InTech*, Chapter 7, pp149-162
  29. Komatsu M, Koike M, Ichimura Y, **Uchiyama Y** (2012) Genetic mouse models for elucidation of autophagy-lysosomal systems in neurons under physiologic and pathologic conditions. In Ed. Zhenyu yue, Charleen T Chu: *Autophagy of the nervous system. Cellular self-digestion in neurons and neurological diseases*. World Scientific, Chapter 8, pp175-204
  30. **内山安男**, 小池正人「リソソーム内の分解機構」オートファジー生命をささえる細胞の自己分解システム (水島昇・吉森保編集) (化学同人), 67-76, 2012.
  31. **内山安男**, 小池正人「リソソームプロテアーゼの多様性とその病態生理学的役割」*実験医学増刊号* 29(12): 1903-1908; 2011.
  32. **内山安男**「虚血性細胞死とオートファジー」*神経内科* 75(2): 169-175, 2011
  5. Nalavadi, V. C., Griffin, L. E., Picard-Fraser, P., Swanson, A. M., **Takumi, T.**, Bassell, G. J. (2012) Regulation of ABP1 transport dynamics in axons by MyosinVa. *J. Neurosci.* 32: 15133-15141.
  6. Mazzocchi, G., Francavilla, M., Paziienza, V., Piepoli, A., Benegiamo, G., Vinciguerra, M., Giuliani, F., Yamamoto, T., **Takumi, T.** (2012) Differential patterns in the periodicity and dynamics of clock gene expression in mouse liver and stomach. *Chronobiol. Int.* 29: 1300-1311.
  7. Rogeli, B., Easton, L. E., Bogu, G., Stanton, L. W., Rot, G., Curk, T., Zupan, B., Sugimoto, Y., Modic, M., Gaberman, N., Tollervey, J., Fujii, R., **Takumi, T.**, Shaw, C. E., Ule, J. (2012) Widespread binding of FUS along nascent RNA regulates alternative splicing in the brain. *Sci. Rep.* 2: 603.
  8. Farook, M. F., DeCupreve, M., Hyland, K., **Takumi, T.**, LeDoux, M. S., Reiter, L. T. (2012) Altered serotonin, dopamine and norepinephrine levels in 15q duplication and Angelman syndrome mouse models reveals significant changes in regional serotonin, dopamine and norepinephrine levels. *PLoS ONE* 7: e43030.
  9. Mazzocchi, G., Cai, Y., Liu, M., Francavilla, M., Giuliani, F., Piepoli, A., Paziienza, V., Vinciguerra, M., Yamamoto, T., **Takumi, T.** (2012) REV-ERBa and the clock gene machinery in mouse peripheral tissues: a possible role as a synchronizing hinge. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 26: 265-276.
  10. Nomura, J., **Takumi, T.** (2012) Animal models of psychiatric disorders that reflect human copy number variation (CNV). *Neural Plast.* 2012: 589524.
  11. Bulayeva, K. B., Lencz, T., Glatt, S., Bulayev, O. A., **Takumi, T.**, Morino, H., Maruyama, H. and Kawakami, H. (2012) Mapping genes of early onset major depressive disorder in Dagestan genetic isolates. *Turkish J. Psychiatry* 23: 161-170.
  12. **Takumi, T.** (2011) The neurobiology of mouse models syntenic to human chromosome 15q. *J. Neurodev. Disord.* 3: 270-281.
  13. Kim, W., Matsui, T., Yamao, M., Ishibashi, M., Tamada, K., **Takumi, T.**, Kohno, K., Oba, S., Ishii, S., Sakumura, Y., Bessho Y. (2011) The period of the somite segmentation clock is sensitive to Notch activity. *Mol. Biol. Cell* 22: 3541-3549.
  14. Fujii R., **Takumi, T.** (2011) Animal models of ALS. J. Avila, J. J. Lucas and F. Hernandez eds: *Animal models for neurodegenerative disease*. RSC Publishing, Cambridge, UK, pp177-213.

#### 【山中宏二 (研究代表者) & 三澤日出巳 (分担研究者)】

#### 【内匠 透 (AO1 計画班)】

1. Matsumura, R., Matsubara, C., Node, K., **Takumi, T.**, Akashi, M. (2013) Nuclear receptor-mediated cell-autonomous oscillatory expression of the circadian transcription factor, neuronal PAS domain protein 2. *J. Biol. Chem.* 288: 36548-36553.
2. Adachi, A. A., Fujioka, A., Nagano, M., Matsumoto, K. H., **Takumi, T.**, Yoshimura, T., Ebihara, S., Yokota Y., Shigeyoshi Y. (2013) Helix-loop-helix protein Id2 stabilizes mammalian circadian oscillation under constant light conditions. *Zool. Sci.* 30: 1011-1018.
3. Nakamura, T., **Takumi, T.**, Takano, A., Hatanaka, F., Yamamoto, Y. (2013) Characterization and modeling of intermittent locomotor dynamics in clock gene-deficient mice. *PLoS ONE* 8: e58884.
4. Myung, J., Hong, S., Hatanaka, F., Nakajima, Y., De Schutter, E., **Takumi, T.** (2012) Period coding of Bmal1 oscillators in the suprachiasmatic nucleus. *J. Neurosci.* 32: 8900-8918.
1. Austin, J. J., Wright G. S., Watanabe, S., Grossmann, G., Antonyuk, S. V., **Yamanaka, K.**, Hasnain, S. S. (2014) Disease causing mutants of TDP-43 nucleic acid binding domains are resistant to aggregation and have increased stability and half-life. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 4309-4314.
2. Nomura, T., Watanabe, S., Kaneko, K., **Yamanaka, K.**, Nukina, N., Furukawa, Y. (2014) Intranuclear aggregation of mutant FUS/TLS as a molecular pathomechanism of amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 289: 1192-1202.
3. Lecomte, M.-J., Bertolus, C., Santamaria, J., Bauchet, A.-L., Herbin, M., Saurini, F., Misawa, H., Maisonobe, T., Pradat, P.-F. Nosten-Bertrand, M., Mallet, J. and **Berrard S.** (2014) Selective disruption of acetylcholine synthesis in subsets of motor neurons: A new model of late-onset motor neuron disease. *Neurobiol Dis* 65: 102-111.
4. Furukawa, Y., Kaneko K., Watanabe, S., **Yamanaka, K.**, Nukina, N. (2013) Intracellular seeded aggregation of

- mutant Cu, Zn-superoxide dismutase associated with amyotrophic lateral sclerosis. *FEBS Lett* 587: 2500-2505.
5. Iguchi, Y., Katsuno, M., Niwa, J. I., Takagi, S., Ishigaki, S., Ikenaka, K., Kawai, K., Watanabe, H., Yamanaka, K., Takahashi, R., Misawa, H., Sasaki, S., Tanaka, F. and \*Sobue, G. (2013) Loss of TDP-43 causes age-dependent progressive motor neuron degeneration. *Brain* 136: 1371-1382.
  6. Toichi, K., Yamanaka, K., \*Furukawa, Y. (2013) Disulfide scrambling describes the oligomer formation of superoxide dismutase (SOD1) proteins in the familial form of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Biol. Chem.* 288: 4970-4980.
  7. Tsuiji, H., Iguchi, Y., Furuya, A., Kataoka, A., Hatsuta, H., Atsuta, N., Tanaka, F., Hashizume, Y., Akatsu, H., Murayama, S., Sobue, G., Yamanaka, K. (2013) Spliceosome Integrity is defective in Motor Neuron Diseases, ALS and SMA. *EMBO Mol. Med.* 5: 221-234.  
プレスリリース有  
脳内環境  
<http://www.neurol.med.kyoto-u.ac.jp/brainenvironment/J/result/press/p201301-2/p201301-2.html>  
独立行政法人 理化学研究所  
[http://www.riken.jp/pr/press/2013/20130125\\_1/](http://www.riken.jp/pr/press/2013/20130125_1/)
  8. Watanabe, S., Kaneko, K., Yamanaka, K. (2013) Accelerated disease onset with stabilized familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS) -linked mutant TDP-43 proteins. *J. Biol. Chem.* 288: 3641-3654.  
プレスリリース有  
脳内環境  
<http://www.neurol.med.kyoto-u.ac.jp/brainenvironment/J/result/press/p201212/p201212.html>  
独立行政法人 理化学研究所  
<http://www.riken.jp/pr/press/2012/20121218/>
  9. Mishra, A., Maheshwari, M., Chhangani, D., Fujimori-Tonou, N., Endo, F., Joshi, A. P., Jana, N. R., Yamanaka, K. (2013) E6-AP association promotes SOD1 aggregates degradation and suppresses toxicity. *Neurobiol. Aging* 34: 1310. e11-23.
  10. Tashiro, Y., Urushitani, M., Inoue, H., Koike, M., Uchiyama, Y., Komatsu, M., Tanaka, K., Yamazaki, M., Abe, M., Misawa, H., Sakimura, K., Ito, H. and \*Takahashi, R. (2012) Motor neuron-specific disruption of proteasome, but not autophagy, replicates amyotrophic lateral sclerosis. *J. Biol. Chem.* 287: 42984-42994.
  11. \*Misawa, H., Hara, M., Tanabe, S., Niikura, M., Moriwaki, Y. and Okuda, T. (2012) Osteopontin is an alpha motor neuron marker in the mouse spinal cord. *J. Neurosci. Res.* 90: 732-742.
  12. \*Okuda, T., Konishi, A., Misawa, H. and Haga, T. (2011) Substrate-induced internalization of the high-affinity choline transporter. *J. Neurosci.* 31: 14989-14997.
  13. Zhai, J., Zhou, W., Li, J., Hayworth C. R., Zhang, L., Misawa, H., Klein, R., Scherer, S. S., Balice-Gordon, R. J. and \*Kalb, R. (2011) The in vivo contribution of motor neuron TrkB receptors to the mutant SOD1 motor neuron disease. *Hum. Mol. Genet.* 20: 4116-4131.
  3. Natividad MMJ, Kiyama H. 他8名, (2013) Differential induction of antimicrobial REGIII by intestinal microbiota and *Bifidobacterium breve* NCC2950, *Appl Environ Microbiol* 79(24): 7745-7754. (doi: 10.1128/AEM.02470-13).
  4. Tokizane K, Konishi H, Yasui M, Ogawa T, Sasaki K, Minamino N, \*Kiyama H. (2013) Continuous stress promotes expression of VGF in melanotroph via suppression of dopamine, *Mol Cell Endocrinol* 372(1-2): 49-56
  5. \*Taguchi T, Yasui M, Kubo A, Abe M, Kiyama H. Yamanaka A, Mizumura K, (2013) Nociception originating from the crural fascia in rats, *Pain* 154(7): 1103-1114.
  6. Konishi H, Matsumoto S, Namikawa K, \*Kiyama H (2013) N-terminal Cleaved Pancreatitis-associated Protein-III (PAP-III) Serves as a Scaffold for Neurites and Promotes Neurite Outgrowth, *J Biol Chem.* 288(15): 10205-10213
  7. Matsumoto S, Konishi H, Maeda R, Kiryu-Seo S, \*Kiyama H (2012) Expression analysis of the regenerating gene (Reg) family members Reg-III  $\beta$  and Reg-III  $\gamma$  in the mouse during development, *J Comp Neurol.* 520(3): 479-494.
  8. \*Kiryu-Seo S, Kiyama H. The nuclear events guiding successful nerve regeneration (2011) *Front Mol Neurosci.* 2011;4: 53. (Review)
  9. Ohno N, Kidd GJ, Mahad D, Kiryu-Seo S, (他3名) (2011) Myelination and axonal electrical activity modulate the distribution and motility of mitochondria at CNS nodes of Ranvier. *J Neurosci.* 31(20): 7249-7258.
  10. Luo X., Kiryu-Seo S, (他9名) (2011) Cleavage of neuregulin-1 by BACE1 or ADAM10 protein produces differential effects on myelination. *J Biol Chem.*, 286(27): 23967-23974.
  11. Kawahara S, Konishi H, Morino M, Ohata K, \*Kiyama H (2011) Pancreatitis-associated protein-I and pancreatitis-associated protein-III expression in a rat model of kainic acid-induced seizure, *Neuroscience*, 175: 273-280.
  12. Maeda M, Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, \*Kiyama H. (2010) Nerve injury-activated microglia engulf myelinated axons in a P2Y12 signaling-dependent manner in the dorsal horn. *Glia*, 58(15): 1838-1846
  13. 木山博資, (2013) 損傷神経の生存と軸索再生の分子基盤, 日本精神神経薬理学会誌, Vol. 33(1): 11-16.
  14. 桐生寿美子, 木山博資 (2013) ミエリンと軸索ホメオスタシス, 脳 21, 16(4), 410-414.
  15. 木山博資, 桐生寿美子, 松本早紀子, 運動神経軸索再生とプロテアーゼ, (2013) *Peripheral Nerve* 24(2) 214-218.
  16. 木山博資, 脳内環境を制御するミクログリア, (2013) *Medical Science Digest (MSD)*, Vol. 39, No. 5, 207-210
  17. 木山博資, 損傷運動ニューロンの再生・変性とグリア・ニューロン連関, (2012) *臨床神経* 52(11): 934-936

#### 【川上秀史 (研究代表者) & 加藤英政 (研究分担者)】

1. \*Mochizuki Y, Kawata A, Hashimoto T, Akiyama H, Kawakami H. Komori T, Oyanagi K, Mizutani T, Matsubara S. (2014). An autopsy case of familial amyotrophic lateral sclerosis with FUS R521G mutation. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 15(3-4): 305-8. DOI: 10.3109/21678421.2014.881500. Epub 2014 Feb 28.
2. Ono T, 他5名, Kato H, Torii R, \*Sato N. (2014) A single-cell and feeder-free culture system for monkey embryonic stem cells. *PLoS One.* 9: e88346.
3. Yagi R, Miyamoto R, Morino H, Izumi Y, Kuramochi M, Kurashige T, Maruyama H, Mizuno N, Kurihara H, \*Kawakami H. (2014). Detecting gene mutations in Japanese Alzheimer's patients by semiconductor sequencing. *Neurobiol Aging.* 35(7): 1780. e1-5. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.023. Epub 2014 Jan 25.
4. \*Morino H, Miyamoto R, Ohnishi S, Maruyama H, Kawakami H. (2014). Exome sequencing reveals a novel TTC19 muta-

#### 【木山博資 (A02計画班)】

1. \*Lee S, Toda T, Kiyama H. and Yamashita T. (2014) Weakened rate-dependent depression of Hoffmann's reflex and increased motoneuron hyperactivity after motor cortical infarction in mice, *Cell Death & Disease*, 5: e1007.
2. Nagata K, Hama I, Kiryu-Seo S and \*Kiyama H. (2014) microRNA-124 is down regulated in nerve injured motor neurons and it potentially targets mRNAs for KLF6 and STAT3, *Neuroscience* 256: 426-432.

- tion in an autosomal recessive spinocerebellar ataxia patient. *BMC Neurol.* 7;14: 5. DOI: 10.1186/1471-2377-14-5.
5. Ono T, Suzuki Y, Kato Y, Fujita R, Araki T, Yamashita T, Kato H, Torii R, \*Sato N. (2014). single-cell and feeder-free culture system for monkey embryonic stem cells. *PLoS One.* 9(2): e88346.
  6. Lohmann K, Schmidt A, Schillert A, Winkler S, Albanese A, Baas F, Bentivoglio AR, Borngraber F, Bruggemann N, Defazio G, Del Sorbo F, Deuschl G, Edwards MJ, Gasser T, Gomez-Garre P, Graf J, Groen JL, Grunewald A, Hagenah J, Hemmelmann C, Jabusch HC, Kaji R, Kasten M, **Kawakami H**, Kostic VS, Liguori M, Mir P, Munchau A, Ricchiuti F, Schreiber S, Siegesmund K, Svetel M, Tijssen MA, Valente EM, Westenberger A, Zeuner KE, Zittel S, Altenmuller E, Ziegler A, \*Klein C. (2014). Genome-wide association study in musician's dystonia: a risk variant at the arylsulfatase G locus? *Mov Disord.* 29(7): 921-7. DOI: 10.1002/mds.25791. Epub 2013 Dec 26.
  7. \*Miyamoto R, Morino H, Yoshizawa A, Miyazaki Y, Maruyama H, Murakami N, Fukada K, Izumi Y, Matsuura S, Kaji R, **Kawakami H**. (2014). Exome sequencing reveals a novel MRE11 mutation in a patient with progressive myoclonic ataxia. *J Neurol Sci.* 337(1-2): 219-23.
  8. \*Miyamoto R, Koizumi H, Morino H, Kawarai T, Maruyama H, Mukai Y, Miyashiro A, Sako W, Izumi Y, **Kawakami H**, Kaji R. (2014). DYT6 in Japan-genetic screening and clinical characteristics of the patients. *Mov Disord.* 29(2): 278-80. DOI: 10.1002/mds.25745. Epub 2013 Nov 13.
  9. Kamada M, \*Izumi Y, Ayaki T, Nakamura M, Kagawa S, Kudo E, Sako W, Maruyama H, Nishida Y, **Kawakami H**, \*Ito H, Kaji R. (2014). Clinicopathologic features of autosomal recessive amyotrophic lateral sclerosis associated with optineurin mutation. *Neuropathology.* 34(1): 64-70. DOI: 10.1111/neup.12051. Epub 2013 Jul 29.
  10. \*Nakamura S, Wate R, Kaneko S, Ito H, Oki M, Tsuge A, Nagashima M, Asayama S, Fujita K, Nakamura M, Maruyama H, **Kawakami H**, Kusaka H. (2014). An autopsy case of sporadic amyotrophic lateral sclerosis associated with the I113T SOD1 mutation. *Neuropathology.* 34(1): 58-63. DOI: 10.1111/neup.12049. Epub 2013 Jun 17.
  11. Kamon M, Katano M, Hiraki-Kamon K, Hishida T, Nakachi Y, Mizuno Y, Okazaki Y, Suzuki A, Hirasaki M, Ueda A, Nishimoto M, Kato H, \*Okuda A. (2013). Identification of Ccr4-Not Complex Components as Regulators of Transition from Partial to Genuine Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Dev.*
  12. Akizuki M, \*Yamashita H, Uemura K, Maruyama H, **Kawakami H**, Ito H, Takahashi R. (2013). Optineurin suppression causes neuronal cell death via NF- $\kappa$ B pathway. *J Neurochem.* 126(6): 699-704.
  13. \*Maruyama H, Morino H, Miyamoto R, Murakami N Hamano T, **Kawakami H**. (2013) Exome sequencing reveals a novel ANO10 mutation in a Japanese patient with autosomal recessive spinocerebellar ataxia. *Clinical Genetics* online: 4 APR 2013. DOI: 10.1111/cge.12140
  14. Nishimoto M, Katano M, Yamagishi T, Hishida T, Kamon M, Suzuki A, Hirasaki M, Nabeshima Y, Nabeshima Y, Katsura Y, Satta Y, Deakin JE, Graves JA, Kuroki Y, Ono R, Ishino F, Ema M, Takahashi S, Kato H, \*Okuda A. (2013). In vivo function and evolution of the eutherian-specific pluripotency marker UTF1. *PLoS One.* 8(7): e68119.
  15. \*Maruyama H, Morino H, Izumi Y, Noda K, **Kawakami H**. (2013) Convenient diagnosis of spinal and bulbar muscular atrophy using a microchip electrophoresis system. *Am J Neurodegener Dis.* 2: 35-9.
  16. \*Miyashiro A, Sugihara K, Kawarai T, Miyamoto R, Izumi Y, Morino H, Maruyama H, Orlacchio A, **Kawakami H**, Kaji R. (2013). Oromandibular dystonia associated with SCA36. *Mov Disord.* 28(4): 558-9.
  17. Izumi Y, Miyamoto R, Morino H, Yoshizawa A, Nishinaka K, Udaka F, Kameyama M, \*Maruyama H, **Kawakami H**. (2013). Cerebellar ataxia with SYNE1 mutation accompanying motor neuron disease. *Neurology.* 80(6): 600-1.
  18. Kamon M, 他10名, Kato H, \*Okuda A. (2013) Identification of Ccr4-Not complex components as regulators of transition from partial to genuine induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev., In press* (PMID: 24200330)
  19. Nishimoto M, 他17名, Kato H, \*Okuda A. (2013) In vivo function and evolution of the eutherian-specific pluripotency marker UTF1. *PLoS One.* 8: e68119.
  20. \*Maruyama H, **Kawakami H**. (2012). Optineurin and amyotrophic lateral sclerosis. *Geriatr Gerontol Int.* DOI: 10.1111/ggi.12022.
  21. Sugihara K, \*Maruyama H, Morino H, Miyamoto R, Ueno H, Matsumoto M, Kaji R, Kitaguchi H, Yukitake M, Higashi Y, Nishinaka K, Oda M, Izumi Y, **Kawakami H**. (2012). The clinical characteristics of spinocerebellar ataxia 36: a study of 2121 Japanese ataxia patients. *Mov Disord.* 27(9): 1158-63.
  22. Fujino N, Ota C, Suzuki T, Suzuki S, Hegab AE, Yamada M, Takahashi T, He M, Kondo T, Kato H, Yamaya M, \*Kubo H. (2012). Analysis of gene expression profiles in alveolar epithelial type II-like cells differentiated from human alveolar epithelial progenitor cells. *Respir Investig.* 50(3): 110-6.
  23. Hirose H, \*Kato H, Kikuchi-Taura A, Soma T, Taguchi A. (2012). Mouse ES cells maintained in different pluripotency-promoting conditions differ in their neural differentiation propensity. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 48: 143-148.
  24. Kohama C, \*Kato H, Numata K, Hirose M, Takemasa T, Ogura A, Kiyosawa H. (2012). ES cell differentiation system recapitulates the establishment of imprinted gene expression in a cell-type-specific manner. *Hum Mol Genet.* 21: 1391-1401
  25. \*Ueno H, Kobatake K, Matsumoto M, Morino H, Maruyama H, **Kawakami H**. (2011). Severe brain atrophy after long-term survival seen in siblings with familial amyotrophic lateral sclerosis and a mutation in the optineurin gene: a case series. *J Med Case Rep.* 5(1): 573.
  26. \*Tanaka E, Maruyama H, Morino H, **Kawakami H**. (2011). Detection of large expansions in SCA8 using a fluorescent repeat-primed PCR assay. *Hiroshima J Med Sci.* 60(3): 63-6.
  27. \*Sakaguchi T, Irie T, Kawabata R, Yoshida A, Maruyama H, **Kawakami H**. (2011). Optineurin with amyotrophic lateral sclerosis-related mutations abrogates inhibition of interferon regulatory factor-3 activation. *Neurosci Lett.* 505(3): 279-81.
  28. \*Hagiwara K, Morino H Shiihara J, Tanaka T, Miyazawa H, Suzuki T, Kohda M, Okazaki Y, Seyama K, **Kawakami H**. (2011). Homozygosity mapping on homozygosity haplotype analysis to detect recessive disease-causing genes from a small number of unrelated, outbred patients. *PLoS One.* 6(9): e25059.

#### 【樋口真人 (A03計画班)】

1. \*Sahara, N., 他3名, Sahara, T., **Higuchi, M.** (2014) Tau oligomers as potential targets for early diagnosis of tauopathy. *J. Alzheimers Dis.*, in press.
2. \*Sahara, N., Murayama, M., **Higuchi, M.**, Sahara, T., Takashima, A. (2014) Biochemical distribution of tau protein in synaptosomal fraction of transgenic mice expressing human P301L tau. *Front. Neurol.* 5: 26.
3. \*Wang, B., 他8名, **Higuchi, M.**, Fujimori, A., Uehara, Y., Nakajima, T., Sahara, T., Neno, M. (2014) Low-dose total

- body carbon-ion irradiations induce early transcriptional alteration without late Alzheimer's disease-like pathogenesis and memory impairment in mice. *J. Neurosci. Res.*, in press.
4. \*Ito H, 他11名, **Higuchi, M.**, Fukumura, T., Suhara, T. (2014) Imaging of amyloid deposition in human brain using positron emission tomography and [<sup>18</sup>F]FACT: comparison with [<sup>11</sup>C]PIB. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 41: 745-754.
  5. \*Wang, B., 他8名, **Higuchi, M.**, Fujimori, A., Uehara, Y., Nakajima, T., Suhara, T., Ono, T., Neno, M. (2014) Total body 100-mGy X-irradiation does not induce Alzheimer's disease-like pathogenesis or memory impairment in mice. *J. Radiat. Res.* 55: 84-96.
  6. Hattori, S., 他4名, Suhara, T., **Higuchi, M.**, \*Miyakawa, T. (2013) In vivo evaluation of cellular activity in  $\alpha$ CaMKII heterozygous knockout mice using manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI). *Front. Integr. Neurosci.* 7: 76.
  7. Maruyama, M., Shimada, H., Suhara, T., Shinotoh, H., Ji, B., Maeda, J., 他18名, **Higuchi, M.** (2013) Imaging of tau pathology in a tauopathy mouse model and in Alzheimer patients compared to normal controls. *Neuron* 79: 1094-1108.
  8. Ji, B., 他9名, Suhara, T., **Higuchi, M.** (2013) Assessment of radioligands for PET imaging of cyclooxygenase-2 in an ischemic neuronal injury model. *Brain Res.* 1533: 152-162.
  9. Oi, N., 他7名, Suhara, T., **Higuchi, M.** (2013) Synthesis and evaluation of novel radioligands for positron emission tomography imaging of the orexin-2 receptor. *J. Med. Chem.* 56: 6371-6385.
  10. Nakatani, Y., Suzuki, M., Tokunaga, M., Maeda J, 他5名, Suhara, T., **Higuchi, M.** (2013) A small-animal pharmacokinetic/pharmacodynamic PET study of central serotonin 1A receptor occupancy by a potential therapeutic agent for overactive bladder. *PLoS ONE* 8: e75040.
  11. \*Shin, R. M., **Higuchi, M.**, Suhara, T. (2013) Nitric oxide signaling exerts bidirectional effects on plasticity inductions in amygdala. *PLoS ONE* 8: e74668.
  12. Kanekiyo, K., 他3名, Maeda, J., **Higuchi, M.**, Kizuka, Y., Korekane, H., Matsuo, I., Honke, K., \*Taniguchi, N. (2013) Loss of branched O-mannosyl glycans in astrocytes accelerates remyelination. *J. Neurosci.* 33: 10037-10047.
  13. Takao, K., 他10名, Maeda, J., 他8名, **Higuchi, M.**, Usuda, N., Suhara, T., Nishi, A., Matsumoto, M., Ishii, S., \*Miyakawa, T. (2013) Deficiency of Schnurri-2, an MHC enhancer binding protein, induces mild chronic inflammation in the brain and confers molecular, neuronal, and behavioral phenotypes related to schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 38: 1409-1425.
  14. \*Iwata, N., 他5名, **Higuchi, M.**, Staufenbiel, M., Muramatsu, S., Saido, T. C. (2013) Global brain delivery of neprilysin gene by intravascular administration of AAV vector in mice. *Sci. Rep.* 3: 1472.
  15. Yamada, M., 他10名, **Higuchi, M.**, \*Suhara, T. (2013) Superiority illusion arises from resting-state brain networks modulated by dopamine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 110: 4363-4367.
  16. Shimada, H., 他9名, **Higuchi, M.**, Kuwabara, S., \*Suhara, T. (2013)  $\beta$ -amyloid in Lewy body disease is related to Alzheimer's disease-like atrophy. *Mov. Disord.* 28: 169-175.
  17. Harada, R., 他4名, **Higuchi, M.**, Yoshikawa, T., Arai, H., Iwata, R., Kudo, Y., \*Yanai, K. (2013) Comparison of the binding characteristics of [<sup>18</sup>F]THK-523 and other amyloid imaging tracers to Alzheimer's disease pathology. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 40: 125-132.
  18. \*Ando, K., 他4名, **Higuchi, M.**, Inoue, T., Itoh, T., Suhara, T. (2012) PET analysis of dopaminergic neurodegeneration in relation to immobility in the MPTP-treated common marmoset, a model for Parkinson's disease. *PLoS ONE* 7: e46371.
  19. Saijo, T., Maeda, J., 他7名, Suhara, T., **Higuchi, M.** (2012) Presynaptic selectivity of a ligand for serotonin 1A receptors revealed by in vivo PET assays of rat brain. *PLoS ONE* 7: e42589.
  20. **Higuchi, M.**, Maeda, J., 他6名, Suhara, T. (2012) PET Applications in animal models of neurodegenerative and neuroinflammatory disorders. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 11: 45-64.
  21. Mori, T., Maeda, J., Shimada, H., **Higuchi, M.**, Shinotoh, H., Ueno, S., \*Suhara, T. (2012) Molecular imaging of dementia. *Psychogeriatrics* 12: 106-114.
  22. \*Kobayashi, K., Haneda, E., **Higuchi, M.**, Suhara, T., Suzuki, H. (2012) Chronic fluoxetine selectively upregulates dopamine D1-like receptors in the hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 37: 1500-1508.
  23. Yasuno, F., Kosaka, J., Ota, M., **Higuchi, M.**, 他6名, \*Suhara, T. (2012) Increased binding of peripheral benzodiazepine receptor in mild cognitive impairment-dementia converter measured by positron emission tomography with [<sup>11</sup>C]DAA1106. *Psychiatry Res.* 203: 67-74.
  24. Shimazawa, M., Ito, Y., Yamanaka, H., Hayashi, T., Ji, B., **Higuchi, M.**, Suhara, T., 他4名, \*Hara H. (2012) An alteration in the lateral geniculate nucleus of experimental glaucoma monkeys: In vivo positron emission tomography imaging of glial activation. *PLoS ONE* 7: e30526.
  25. **Higuchi, M.**, 他4名, Maeda, J., Ji, B., Ono, M., Staufenbiel, M., Suhara, T., \*Saido, T. C. (2012) Mechanistic involvement of the calpain-calpastatin system in Alzheimer neuropathology. *FASEB J.* 26: 1204-1217.
  26. Yamasaki, T., Fujinaga, M., Maeda, J., 他6名, **Higuchi, M.**, Suhara, T., Fukumura, T., \*Zhang, M. R. (2012) Imaging for metabotropic glutamate receptor subtype 1 in rat and monkey brains using PET with [<sup>18</sup>F]FITM. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 39: 632-641.
  27. Fujinaga, M., Maeda, J., 他7名, **Higuchi, M.**, Suhara, T., Fukumura, T., \*Zhang, M. R. (2012) Characterization of 1-(2-[[<sup>18</sup>F]fluoro-3-pyridyl]-4-(2-isopropyl-1-oxo-isoindoline-5-yl)-5-methyl-1H-1, 2, 3-triazole, a PET ligand for imaging the metabotropic glutamate receptor type 1 in rat and monkey brains. *J. Neurochem.* 121: 115-124.
  28. Takeuchi, H., Iba, M., \*Inoue, H., **Higuchi, M.**, 他4名, Miyakawa, T., Suhara, T., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. Y., Takahashi, R. (2011) P301S mutant human tau transgenic mice manifest early symptoms of human tauopathies with dementia and altered sensorimotor gating. *PLoS ONE* 6: e21050.
  29. Maeda J, 他14名, Suhara, T., **Higuchi, M.** (2011) In vivo positron emission tomographic imaging of glial responses to amyloid- $\beta$  and tau pathologies in mouse models of Alzheimer's disease and related disorders. *J. Neurosci.* 31: 4720-4730.
  30. Kawamura, K., Maeda, J., Hatori, A., Okauchi, T., Nagai, Y., **Higuchi, M.**, Suhara, T., Fukumura, T., \*Zhang, M. R. (2011) In vivo and in vitro imaging of I (2) imidazoline receptors in the monkey brain. *Synapse* 65: 452-455.
  31. **樋口真人** (2014) アルツハイマー病の発症前診断は可能か?, 応用物理 83(4): 308-309
  32. **樋口真人**, 丸山将浩, 島田 斉, 篠遠仁, 張明栄, 須原哲也 (2014) タウイメージングの開発, 老年精神医学雑誌 25 (増刊号-I): 69-75
  33. **樋口真人**, 須原哲也 (2014) Brain Imaging の課題と展望 - 認知症のモデル動物の画像研究も含めて -, 老年精神医学雑誌 25(1): 89-96
  34. **樋口真人**, 丸山将浩, 島田 斉, 張明栄, 須原哲也 (2014) タウイメージングの開発, *Pharma Medica* 32(1): 43-49
  35. 島田 斉, **樋口真人** (2014) ミクログリア PET, *Annual Review 神*

経 2014 51-51.

36. 樋口真人 (2013) 認知症のバイオマーカーイメージング, *Cognition and Dementia* 12(1): 34-40
37. 季斌, 樋口真人, 須原哲也 (2012) 神経変性疾患における神経炎症の PET イメージング, *脳循環代謝* 23(2): 46-51
38. 樋口真人 (2012) 画像・バイオマーカーによるアルツハイマー病の早期診断, *カレントセラピー* 30(4): 22-29
39. 季斌, 樋口真人, 須原哲也 (2011) アルツハイマー病のホールマークと神経炎症の分子イメージング, *最新医学* 66(10): 77-83
40. 小野麻衣子, 樋口真人 (2011) 微小管機能とタウ, *日本臨床* 69 増刊号 8 認知症学 (上) 64-68

## A01 公募班

### 【鶴田文憲 (A01 公募班)】

1. #Ebina, M., #\***Tsuruta, F.**, Katoh, M. C., Kigoshi, Y., Someya, A., \*Chiba, T. (#These authors contributed equally to this work, \*co-corresponding) (2013) Myeloma overexpressed 2 (Myeov2) regulates L11 subnuclear localization through Nedd8 modification. *PLoS ONE* 8: e65285 (2013)
2. Qian, M. X., Pang, Y., Liu, C. H., Haratake, K., 他16名, Komatsu, T., **Tsuruta, F.**, Li, H., Cao, C., Li, Wei., Li, G. H., Cheng, Y., Chiba, T. Wang, L., Goldberg, A. L., Shen, Y., \*Qui, X. B. (2013) Acetylation-Mediated Proteasomal Degradation of Core Histones during DNA Repair and Spermatogenesis. *Cell* 153: 1012-1024.
3. Hall, D. D., Dai, S., Tseng, P. Y., Malik, Z., Nguyen, M., Matt, L., Schnizler, K., Shephard, A., Mohapatra, D. P., **Tsuruta, F.**, Dolmetsch, R. E., Christel, C. J., Lee, A., Burette, A., Weinberg, R. J. \*Hell, J. W. (2013) Competition between  $\alpha$ -actinin and Ca<sup>2+</sup>-calmodulin controls surface retention of the L-type Ca<sup>2+</sup> channel CaV1. 2. *Neuron* 78: 483-49
4. #Takashima, O., #**Tsuruta, F.**, Kigoshi, Y., Nakamura, S., Kim, J., Katoh, M. C., Fukuda, T., Irie, K., \*Chiba, T. (#These authors contributed equally to this work) (2013) Brap2 regulates temporal control of NF- $\kappa$ B localization mediated by inflammatory response T. *PLoS ONE* 8: e58911
5. Takahashi, M., Obayashi, M., Ishiguro, T., 他6名, **Tsuruta, F.**, Dolmetsch, R., Yamada, M., Takahashi, H., Kato, T., Mori, O., Eishi, Y., Mizusawa, H., \*Ishikawa, K. (2013) Cytoplasmic location of  $\alpha$ 1A voltage-gated calcium channel C-terminal fragment (CaV2.1-CTF) aggregate as sufficient to cause cell death. *PLoS ONE* 8: e50121

### 【田中 敦 (A01 公募班)】

1. Minakawa EN, Yamakado H, **Tanaka A.** Uemura K, Takeda S, \*Takahashi R. Chicken DT40 cell line lacking DJ-1, the gene responsible for familial Parkinson's disease, displays mitochondrial dysfunction. *Neurosci Res.* 2013 Dec(77) 4: 228-33.
2. \***田中 敦** (2014) 「問題」は膜で包んで分解へ 羊土社 実験医学 2014年4月号 Vol32 No. 6 890-891
3. \***田中 敦** (2012) 「損傷ミトコンドリアの処理機構-PINK1/Parkin 依存性マイトファジー」医学書院 生体の科学 Vol63, No. 5: 496-497
4. \***田中 敦** (2012) 「選択的オートファジーによるミトコンドリア品質管理機構」医歯薬出版株式会社 医学のあゆみ Vol241, No. 4: 239-244

### 【五十嵐道弘 (A01 公募班)】

1. Namba, T., Kibe, Y., Funahashi, Y., Nakamuta, S., Takano, T., Ueno, T., Shimada, A., Kozawa, S., Okamoto, M., Shimoda, Y., Oda, K., Wada, Y., Masuda, T., Sakakibara, A., **Igarashi, M.**, Miyata, T., Faivre-Sarrailh, C., Takeuchi, K., \*Kaibuchi, K. (2014) Pioneering axons regulate neuronal polarization in the developing cerebral cortex. *Neuron* 81: 814-829.
2. Nagaoka, T., Ohashi, R., Inutsuka, A., Sakai, S., Fujisawa, N., Yokoyama, M., Huang, YH., **Igarashi, M.**, \*Kishi, M. (2014) The Wnt/Planar Cell Polarity Pathway Component Vangl2 Induces Synapse Formation through Direct Control of N-Cadherin. *Cell Rep.* 6: 916-927.
3. Uemura, S., Nagaoka, T., Yokoyama, M., **Igarashi, M.**, \*Kishi, M. (2013) A simple and highly efficient method to identify the integration site of a transgene in the animal genome. *Neurosci. Res.* pii: S0168-0102(13) 00267-8.
4. Watanabe, Y., Katayama, N., Takeuchi, K., Togano, T., Itoh,

- R., Sato, M., Yamazaki, M., Abe, M., Sato, T., Oda, K., Yokoyama, M., Takao, K., Fukaya, M., Miyakawa, T., Watanabe, M., Sakimura, K., Manabe, T., \*Igarashi, M. (2013) Point mutation in syntaxin-1A causes abnormal vesicle recycling, behaviors, and short term plasticity. *J. Biol. Chem.* 288: 34906-34919.
5. Takeuchi, K., Yoshioka, N., Higa Onaga, S., Watanabe, Y., Miyata, S., Wada, Y., Kudo, C., Okada, M., Ohko, K., Oda, K., Sato, T., Yokoyama, M., Matsushita, N., Nakamura, M., Okano, H., Sakimura, K., Kawano, H., Kitagawa, H., \*Igarashi, M. (2013) Chondroitin sulphate N-acetylgalactosaminyl-transferase-1 inhibits recovery from neural injury. *Nat. Commun.* 4: 2740. doi: 10.1038/ncomms3740.
6. Ando, K., Kudo, Y., Aoyagi, K., Ishikawa, R., Igarashi, M., \*Takahashi, M. (2013) Calmodulin-dependent regulation of neurotransmitter release differs in subsets of neuronal cells. *Brain Res* 1535: 1-13.
7. Oyamatsu, H., Koga, D., \*Igarashi, M., \*Shibata, M., \*Ushiki, T. (2012) Morphological assessment of early axonal regeneration in end-to-side nerve coaptation models. *J. Plast. Surg. Hand. Surg.* 46: 299-307.
8. \*五十嵐道弘 (2012) 成長円錐の蛋白質構成から見たその機能的分子基盤. *生化学* 84: 753-766 (日本生化学会依頼総説)

### 【木下彩栄 (A01 公募班)】

1. Maesako M, \*Uemura K, Iwata A, Kubota M, Watanabe K, Uemura M, Noda Y, Asada-Utsugi M, Kihara T, Takahashi R, Shimohama S, Kinoshita A (2013): Continuation of exercise is necessary to inhibit high fat diet-induced A $\beta$  deposition and memory deficit in amyloid precursor protein transgenic mice. *PLoS ONE*; 8(9): e72796.
2. Hiyoshi-Taniguchi K, \*Becker CB, Kinoshita A (2013): Social workers can use sense of coherence to predict burnout of end-of-life care-givers (Research report from Japan) *British Journal of Social Work*; May 30: 1-15.
3. Noda Y, Asada M, Kubota M, Maesako M, Watanabe K, Uemura M, Kihara T, Shimohama S, Takahashi R, \*Kinoshita A, Uemura K (2013): Copper enhances APP dimerization and promotes A $\beta$  production. *Neurosci Lett*; 547: 10-5. 2013
4. \*Kubota M, Hosoda K, Eguchi K, Furuya A, Nishijima Y, Nakao K, Kinoshita A (2013): Videophone-based multimodal home telecare support system for patients with diabetes. *Diabetology International*; 4: 52-59
5. Ly PT, Wu Y, Zou H, Wang R, Zhou W, Kinoshita A, Zhang M, Yang Y, Cai F, Woodgett J, \*Song W.: Inhibition of GSK3  $\beta$ -mediated BACE1 expression reduces Alzheimer-associated phenotypes (2013). *J Clin Invest* 123: 224-35
6. Maesako M, Uemura K, Kubota M, Kuzuya A, Sasaki K, Hayashida N, Asada-Utsugi M, Watanabe K, Uemura M, Kihara T, Takahashi R, Shimohama S and \*Kinoshita A (2012): Exercise is more effective than diet control in preventing high fat diet-induced  $\beta$ -amyloid deposition and memory deficit in amyloid precursor protein transgenic mice. *J. Biol Chem* 29;287: 23024-33  
プレスリリース有  
脳内環境  
<http://www.neurol.med.kyoto-u.ac.jp/brainenvironment/J/result/press/p201205/p201205.html>  
京都大学  
[http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news\\_data/h/h1/news6/2012/120507\\_1.htm](http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news_data/h/h1/news6/2012/120507_1.htm) Science Portal, [http://scienceportal.jp/news/newsflash\\_review/newsflash/2012/05/20120516\\_01.html](http://scienceportal.jp/news/newsflash_review/newsflash/2012/05/20120516_01.html) National Geographic Japan  
[http://www.nationalgeographic.co.jp/news/news\\_article.php?file\\_id=00020120516003](http://www.nationalgeographic.co.jp/news/news_article.php?file_id=00020120516003)  
日本経済新聞

[http://www.nikkei.com/article/DGXNASDG0705B\\_Y2A500C1CR0000/](http://www.nikkei.com/article/DGXNASDG0705B_Y2A500C1CR0000/)

7. Maesako M, Uemura K, Kuzuya A, Sasaki K, Asada M, Watanabe K, Ando K, Kubota M, Akiyama H, Takahashi R, Kihara T, Shimohama S, \*Kinoshita A (2012): Gain of function by phosphorylation in Presenilin 1-mediated regulation of insulin signaling. *J Neurochem* Jun;121: 964-73
8. Maesako M, Uemura K, Kubota M, Kuzuya A, Sasaki K, Asada M, Watanabe K, Hayashida N, Ihara M, Ito H, Kihara T, \*Kinoshita A (2012). Environmental enrichment ameliorated high fat diet-induced A $\beta$  deposition and memory deficit in APP transgenic mice. *Neurobiology of Aging* 33: 1011. e11-23
9. 木下彩栄「認知症」井村裕夫編 わかりやすい内科学 第4版 文光堂 (東京) p592-632 2014
10. 木下彩栄「教育歴と認知症」中島健二ら編 認知症ハンドブック 医学書院 (東京) p202-205, 2013

### 【岡村 均 (A01 公募班)】

1. Yamaguchi Y, Suzuki T, Mizoro Y, Kori H, Okada K, Chen Y, Fustin JM, Yamazaki F, Mizuguchi N, Zhang J, Dong X, Tsujimoto G, Okuno Y, Doi M, \*Okamura H. (2013) Mice Genetically Deficient in Vasopressin V1a and V1b Receptors Are Resistant to Jet Lag. *Science* 342: 85-90.  
プレスリリース有  
脳内環境  
<http://www.neurol.med.kyoto-u.ac.jp/brainenvironment/J/result/press/p201310/p201310.html>  
京都大学  
[http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news\\_data/h/h1/news6/2013\\_1/131004\\_1.htm](http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news_data/h/h1/news6/2013_1/131004_1.htm)  
日刊工業新聞  
<http://www.nikkan.co.jp/news/nkx1020131004eaad.html>  
BBC News  
<http://www.bbc.com/news/health-24387491>  
Telegraph  
<http://www.telegraph.co.uk/news/worldnews/asia/japan/10365956/Scientists-on-verge-of-cure-for-jet-lag-after-finding-brains-reset-button.html>  
The Independent  
<http://www.independent.co.uk/news/science/a-cure-for-jetlag-scientists-discover-body-clock-reset-button-8858326.html>  
The Sun Daily  
<http://www.thesundaily.my/news/849170>  
LiveScience  
<http://www.livescience.com/40161-jet-lag-hormone-identified.html>  
National Geographic  
<http://news.nationalgeographic.com/news/2013/10/131003-jet-lag-vasopressin-circadian-rhythm-clock-science/>  
Science News  
<https://www.sciencenews.org/article/blocking-hormone-helps-mice-beat-lengthy-jet-lag>
2. Negoro H, Kanematsu A, Matsuo M, Okamura H, Tabata Y, \*Ogawa O. (2013) Development of diurnal micturition pattern in mice after weaning. *J Urol.* 189: 740-746.
3. Negoro H., 他 14名, \*Okamura H., Tabata Y., \*Ogawa O. (2012) Involvement of urinary bladder Connexin43 and the circadian clock in coordination of diurnal micturition rhythm. *Nat. Commun.* 3: 809.
4. Ota T., Fustin J. M., Yamada H., Doi M., \*Okamura H. (2012) Circadian clock signals in the adrenal cortex. *Mol. Cell Endocrinol.* 349: 30-37.
5. Fustin J. M., Doi M., Yamada H., Komatsu R., Shimba S., \*Okamura H. (2012) Rhythmic nucleotide synthesis in the liver: temporal segregation of metabolites. *Cell Rep.* 1: 341-



- 349.
6. \*Imanishi M, Yamamoto K, Yamada H, Hirose Y, **Okamura H**, Futaki S. (2012) Construction of a rhythm transfer system that mimics the cellular clock. *ACS Chem Biol.* 7: 1817-1821.
  7. 山口賀章, **岡村 均**. (2013) 【代謝内分泌神経ネットワーク】生物時計と臓器ネットワーク 時差の体内機構. *BIO Clinica* 28: 1319-24.
  8. 山口賀章, 鈴木 暢, **岡村 均**. (2013) 【ライフサイエンス新着論文レビュー FIRST AUTHOR'S】パンプレッシン受容体 V1a および V1b を欠損したマウスは時差症状を示さない. <http://first.life-sciencedb.jp/archives/7777>.
  9. 山口賀章, **岡村 均**: 神経インパルスからホルモンへの時間変換機構 (特集: 【最新臨床睡眠学-睡眠障害の基礎と臨床】), *日本臨床*, 71, 705-710, 2013.
  10. 山口賀章, **岡村 均**: 視交叉上核, *脳科学辞典 (オンラインジャーナル)* <http://bsd.neuroinf.jp/w/index.php?title=%E8%A6%96%E4%BA%A4%E5%8F%89%E4%B8%8A%E6%A0%B8&oldid=21150,2013>.
  11. **岡村 均**, Fustin J.M.: 生体時計ネットワークによる動的ホメオスタシスとその破綻, *実験医学増刊 Vol. 31 No. 5*, 765-772, 臓器円環による生体恒常性のダイナミクス (編: 永井良三, 入来篤史), 羊土社, 2013. (ISBN 978-4-7581-0329-9)
  12. Yamaguchi Y., **Okamura H**. (2012) [Molecular oscillatory machinery of circadian rhythms]. *Nihon rinsho Japanese journal of clinical medicine* 70: 1115-1120.

#### 【萬代研二 (AO1 公募班)】

1. Toyoshima, D., \***Mandai, K.**, Maruo, T., Supriyanto, I., Togashi, H., Inoue, T., Mori, M., and \*Takai, Y. (2014) (\*co-corresponding authors) Afadin Regulates Puncta Adherentia Junction Formation and Presynaptic Differentiation in Hippocampal Neurons. *PLoS One*, 9(2): e89763.
2. Yamamoto, H., Maruo, T., Majima, T., Ishizaki, H., Tanaka-Okamoto, M., Miyoshi, J., \***Mandai, K.**, and \*Takai, Y. (2013) (\*co-corresponding authors) Genetic deletion of afadin causes hydrocephalus by destruction of adherens junctions in radial glial and ependymal cells in the midbrain. *PLoS One*, 8(11): e80356.

#### 総説

3. Rikitake, Y., **Mandai, K.**, and \*Takai, Y. (2012) Nectins in adhesion of different types of cells. *J. Cell Sci.*, 125: 3713-3722.

#### 書籍

4. Shimono, Y., Rikitake, Y., **Mandai, K.**, Mori, M., \*Takai, Y. (2012) Immunoglobulin superfamily receptors and adherens junctions. In *Adherens Junctions: from Molecular Mechanisms to Tissue Development and Disease* (Harris T. ed.), Springer, Vol 60, part 3: 137-170.
5. **Mandai, K.**, Rikitake, Y., Shimono, Y., and \*Takai, Y. (2013) Afadin/AF-6 and Canoe: roles in cell adhesion and beyond. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Conn P. M. ed.), Elsevier, 116: 433-454.
6. Mori, M., Rikitake, Y., **Mandai, K.**, and \*Takai, Y. (2014) Roles of nectins and nectin-like molecules in the nervous system. In *Cell adhesion molecules: implications in neurological diseases*, *Advances in Neurobiology* (Berezin, V. and Walmond, P. S., eds.), Springer, 8: 91-116.

#### 【岡野 ジェイムス 洋尚 (AO1 公募班)】

1. \*Nakamura, S., Igarashi, M., Kinoshita, M., **Okano, H.J.**, Okano, H. Proposing a new RNA quadruplex structure: j-motif, with possible links to neural development. *J Biochem*. In press.
2. Ince-Dunn, G., **Okano, H.J.**, Jensen, KB., Park, WY., Zhong, R., Ule, J., 他7名, \*Darnell, RB. (2012) HITS-CLIP reveals nElav

(Hu) proteins regulate RNA splicing and abundance to control brain glutamate levels and neuronal excitability. *Neuron*. 75: 1067-80.

#### 【柳 茂 (AO1 公募班)】

1. Nagashima, S., Tokuyama, T., Yonashiro, R., Inatome, R., and \***Yanagi S.** (2014) Roles of mitochondrial ubiquitin ligase MITOL/MARCH5 in mitochondrial dynamics and diseases. *J. Biochem, Review*, in press
2. Konno, A., Shuvaev A. N., Miyake, N., Miyake, K., Iizuka, A., Matsuura, S., Huda, F., Nakamura, K., **Yanagi, S.**, Shimada, T., and \*Hirai, H. (2013) Mutant Ataxin-3 with an abnormally expanded polyglutamine chain disrupts dendritic development and metabotropic glutamate receptor signaling in mouse cerebellar purkinje cells. *Cerebellum*. 13: 29-41. doi: 10.1007/s12311-013-0516-5.
3. Nishiyama, T., Hasegawa, E., **Yanagi, S.**, Kudo, Y., Hamada, R., Matsumura, N., Tomino, M., Muromachi, Y., Hatakeyama, K., and \*Uchino, H. (2013) Simultaneous measurement of cytosolic and mitochondrial Ca (2+) during ischemia in mice whole-brain slice preparation and its application to drug evaluation. *Acta Neurochir. Suppl.* 118: 65-70
4. Sugiura, A., Nagashima, S., Tokuyama, T., Amo, T., Matsuki, Y., Ishido, S., Kudo, Y., McBride, H. M., Fukuda, T., Matsushita, T., Inatome, R., and \***Yanagi, S.** (2013) MITOL Regulates Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Contacts via Mitofusin2 *Mol. Cell* 51: 1-15.
5. 長島 駿, \***柳 茂** (2014) MITOLによるミトコンドリアダイナミクス制御と破綻による疾患. *生化学, 総説*, 86: 63-67

#### 【宮川 剛 (AO1 公募班)】

1. Akers, KG., 他8名 Shoji, H., Ohira, K., Richards, BA., **Miyakawa, T.**, Josselyn, SA., \*Frankland, PW. Hippocampal neurogenesis regulates forgetting during adulthood and infancy. *Science* (in press)
2. Kobayashi M, 他5名, Takao, K., **Miyakawa, T.**, \*Matsuoka I. (2014) Absence of BRINP1 in mice causes increase of hippocampal neurogenesis and behavioral alterations relevant to human psychiatric disorders. *Mol. Brain* 7: 12.
3. Hazama, K., **Miyakawa, T.**, 他10名, \*Hashimoto H. (2014) Increased behavioral and neuronal responses to a hallucinogenic drug in PACAP heterozygous mutant mice. *PLoS One* 9: e89153.
4. Koshimizu, H., Takao, K., Matozaki T, Ohnishi H, \***Miyakawa, T.** (2014) Comprehensive behavioral analysis of cluster of differentiation 47 knockout mice. *PLoS One* 9: e89584.
5. Shoji H, Takao, K., Hattori S, \***Miyakawa, T.** (2014) Contextual and cued fear conditioning test using a video analyzing system in mice. *J. Vis. Exp.* 85: e50871.
6. Onouchi, T., Takao, K., **Miyakawa, T.**, 他12名, \*Senda T. (2014) Targeted deletion of the C-terminus of the mouse adenomatous polyposis coli tumor suppressor results in neurologic phenotypes related to schizophrenia. *Mol. Brain* 7: 21.
7. Takao, K., Kobayashi, K., Hagihara, H., Ohira, K., Shoji, H., Hattori, S., Koshimizu, H., Umemori, J., 他18名, \***Miyakawa, T.** (2013) Deficiency of Schnurri-2, an MHC Enhancer Binding Protein, Induces Mild Chronic Inflammation in the Brain and Confers Molecular, Neuronal, and Behavioral Phenotypes Related to Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 38: 1409-25.
8. Ohira, K., Kobayashi, K., Toyama, K., Nakamura, HK., Shoji, H., Takao, K., 他5名, \***Miyakawa, T.** (2013) Synaptosomal-associated protein 25 mutation induces immaturity of the dentate granule cells of adult mice. *Mol. Brain* 6: 12.
9. Shin, R., Kobayashi, K., Hagihara, H., 他8名, **Miyakawa, T.**,

- \*Matsumoto, M. (2013) The immature dentate gyrus represents a shared phenotype of mouse models of epilepsy and psychiatric disease. *Bipolar Disord.* 15: 405-21.
- Hagihara, H., Takao, K., Walton, N.M., Matsumoto, M., \*Miyakawa, T. (2013) Immature dentate gyrus: an endophenotype of neuropsychiatric disorders. *Neural Plast.* 2013: 318596.
  - Umemori, J., Takao, K., Koshimizu, H., Hattori, S., Furuse, T., Wakana, S., \*Miyakawa, T. (2013) ENU-mutagenesis mice with a non-synonymous mutation in Grin1 exhibit abnormal anxiety-like behaviors, impaired fear memory, and decreased acoustic startle response. *BMC Res. Notes* 6: 203.
  - Ageta-Ishihara, N., Takao, K., Miyakawa, T., 他4名, \*Kinoshita, M. (2013) Chronic overload of SEPT4, a parkin substrate that aggregates in Parkinson's disease, causes behavioral alterations but not neurodegeneration in mice. *Mol. Brain* 6: 35.  
プレスリリース有  
・脳内環境  
<http://www.neurol.med.kyoto-u.ac.jp/brainenvironment/J/result/press/p201311-2/p201311.html>
  - Watanabe, Y., Takao, K., Miyakawa, T., 他14名, \*Igarashi, M. (2013) Point Mutation in Syntaxin-1A Causes Abnormal Vesicle Recycling, Behaviors, and Short-term Plasticity. *J. Biol. Chem.* 288: 34906-19.
  - Ohira, K., Takeuchi R, Iwanaga T, \*Miyakawa, T. (2013) Chronic fluoxetine treatment reduces parvalbumin expression and perineuronal nets in gamma-aminobutyric acidergic interneurons of the frontal cortex in adult mice. *Mol. Brain* 6: 43.
  - Hattori S, Hagihara, H., Ohira, K., 他4名, \*Miyakawa, T. (2013) In vivo evaluation of cellular activity in  $\alpha$  CaMKII heterozygous knockout mice using manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI). *Front. Integr. Neurosci.* 7: 76.
  - Paemka, L., Takao, K., Miyakawa, T., 他21名, \*Bassuk, A.G. (2013) PRICKLE1 interaction with SYNAPSIN I reveals a role in autism spectrum disorders. *PLoS One.* 8: e80737.
  - Yamashita N, Takahashi A, Takao, K., Yamamoto T, Kolattukudy P, Miyakawa, T., \*Goshima Y. (2013) Mice lacking collapsin response mediator protein 1 manifest hyperactivity, impaired learning and memory, and impaired prepulse inhibition. *Front. Behav. Neurosci.* 7: 216.

#### 【山中智行 (AO1 公募班)】

- Yamanaka T, Wong HK, Tosaki A, Bauer PO, Wada K, Kurosawa M, Shimogori T, Hattori N, Nukina N\*. (2014) Large-scale RNA interference screening in mammalian cells identifies novel regulators of mutant huntingtin aggregation. *PLoS One.* 9(4): e93891.
- Yamanaka T, Tosaki A, Kurosawa M, Matsumoto G, Koike M, Uchiyama Y, Maity SN, Shimogori T, Hattori N, Nukina N\*. (2014) NF-Y inactivation causes atypical neurodegeneration characterized by ubiquitin and p62 accumulation and endoplasmic reticulum disorganization. *Nat Commun.* 10: 1038/ncmms4354.  
プレスリリース有  
・脳内環境  
<http://www.neurol.med.kyoto-u.ac.jp/brainenvironment/J/result/press/p201403-2/p201403-2.html>  
・順天堂大学  
<http://www.juntendo.ac.jp/graduate/pdf/news06.pdf>
- Yamanaka T\*, Tosaki A, Kurosawa M, Akimoto K, Hirose T, Ohno S, Hattori N, Nukina N\*. (2013) Loss of aPKC  $\lambda$  in differentiated neurons disrupts the polarity complex but does not induce obvious neuronal loss or disorientation in mouse

brains. *PLoS One.* 8(12): e84036.

#### 【松本 弦 (AO1 公募班)】

- Yamanaka, T., Tosaki, A., Kurosawa, M., Matsumoto, G., Koike, M., Uchiyama, Y., Maity, S. N., Shimogori, T., Hattori, N., and \*Nukina, N. (2014) NF-Y inactivation causes atypical neurodegeneration characterized by ubiquitin and p62 accumulation and endoplasmic reticulum disorganization. *Nature Commun.* 5, 3354
- Kitamura, A., Inada, N., Kubota, H., Matsumoto, G., Kinjo, M., Morimoto, R. I., \*Nagata, K. (2014) Dysregulation of the Proteasome Enhances the Toxicity of ALS-linked Mutant SOD1. *Genes Cells* 19, 209-24
- Bauar, P. O., Hudec, R., Goswami, A., Kurosawa, M., Matsumoto, G., Mikoshiba, K. and \*Nukina, N. (2012) ROCK-phosphorylated vimentin modifies mutant huntingtin aggregation via sequestration of IRBIT. *Mol. Neurodegrad.* 7, 43- 2012
- \*松本 弦, 貴名信行 著, p62 のリン酸化とオートファジー, Annual Review 2013 神経, 編集: 鈴木則宏, 祖父江元, 荒木信夫, 宇川義一, 川原信隆, 29-36, 2013, 中外医学社, 東京
- \*松本 弦, 貴名信行 選択的オートファジーによるユビキチン化タンパク質の処理機構, 生体の科学 細胞の分子構造と機能—核以外の細胞小器官, 63 巻 5 号, p490-491, 2012 Sep-Oct
- \*松本 弦, 貴名信行 p62 のリン酸化と選択的オートファジー, BIO Clinica 「神経筋疾患の分子標的治療開発」の各論, 2012 年 9 月号, 27 巻 10 号, p18-22

#### 【野中 隆 (AO1 公募班)】

- Hosokawa M, Arai T, Yamashita M, Tsuji H, Nonaka T, 他3名, \*Akiyama H (2013) Differential diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis from Guillain-Barre syndrome by quantitative determination of TDP-43 in cerebrospinal fluid. *Int J Neurosci.* in press.
- Dan A, Takahashi M, Masuda-Suzukake M, Kametani F, Nonaka T, 他7名, \*Hasegawa M (2013) Extensive deamidation at asparagine residue 279 accounts for weak immunoreactivity of tau with RD4 antibody in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol Commun.* 1: 54.
- Liu R, Yang G, Nonaka T, Arai T, Jia Wand, \*Cynader MS. (2013) Reducing TDP-43 aggregation does not prevent its cytotoxicity. *Acta Neuropathol Commun.* 1: 49.
- \*Nonaka T, 他9名, \*Hasegawa M (2013) Prion-like Properties of Pathological TDP-43 Aggregates from Diseased Brains. *Cell Rep.*, 4: 124-134.  
プレスリリース有  
脳内環境  
<http://www.neurol.med.kyoto-u.ac.jp/brainenvironment/J/result/press/p201309-1/p201307.html>  
公益財団法人 東京都医学総合研究所  
<http://www.igakuken.or.jp/research/topics/2013/0704.html>
- Moujalled D, James JL, Parker SJ, Lidgerwood GE, Duncan C, Meyerowitz J, Nonaka T, 他5名, \*White AR. (2013) Kinase Inhibitor Screening Identifies Cyclin-Dependent Kinases and Glycogen Synthase Kinase 3 as Potential Modulators of TDP-43 Cytosolic Accumulation during Cell Stress. *PLoS ONE*, 8: e67433.
- Masuda-Suzukake, M., Nonaka, T., 他5名, \*Hasegawa, M. (2013) Prion-like spreading of pathological alpha-synuclein in brain. *Brain*, 136: 1128-1138.
- Ogaki, K., Li, Y., Takanashi, M., Ishikawa, K., Kobayashi, T., Nonaka, T., 他13名, \*Hattori, N. (2013) Analyses of the MAPT, PGRN, and C9orf72 mutations in Japanese patients with FTLD, PSP, and CBS. *Parkinsonism Relat Disord.* 19: 15-20.

8. Egawa, N., 他27名, Nonaka, T., 他4名, Takahashi, R., Marchetto, MC., Gage, FH., Yamanaka, S., \*Inoue, H. (2012) Drug Screening for ALS Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Sci. Transl. Med.* 4(145): 145ra104.
9. Parker, SJ., 他3名, Nonaka, T., 他6名, \*White AR (2012) Inhibition of TDP-43 Accumulation by Bis (thiosemicarbazonato) -Copper Complexes. *PLoS ONE*. 7(8): e42277.
10. Tsuji, H., Arai, T., Kametani, F., Nonaka, T., 他9名, \*Hasegawa, M., Mann, DM., Tamaoka, A. (2012) Molecular analysis and biochemical classification of TDP-43 proteinopathy. *Brain* 135(Pt 11): 3380-91
11. Hosokawa, M., Arai, T., Masuda-Suzukake, M., Nonaka, T., Yamashita, M., \*Akiyama, H., Hasegawa, M. (2012) Methylene Blue Reduced Abnormal Tau Accumulation in P301L Tau Transgenic Mice. *PLoS ONE*, 7: e52389.
12. Takahashi, M., Tin, Y., Nonaka, T., Hasegawa, M., \*Watanabe, N., and Arai, T. (2012) Prolonged nitric oxide treatment induces tau aggregation in SH-SY5Y cells. *Neurosci. Lett.* 510: 48-52.
13. Tsuji, H., Nonaka, T., 他6名, \*Hasegawa M (2012) Epitope mapping of antibodies against TDP-43 and detection of protease-resistant fragments of pathological TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 417: 116-121.

#### 【松田憲之 (A01 公募班)】

1. Koyano F, Okatsu K, Kosako H, Tamura Y, Go E, Kimura M, Kimura Y, Tsuchiya H, Yoshihara H, Hirokawa T, Endo T, Fon EA, Trempe JF, Saeki Y, Tanaka K, Matsuda N. (2014) Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature*, 2014 Apr 30;[Epub ahead of print] doi: 10.1038/nature13392.  
プレスリリース有  
脳内環境  
<http://www.neurol.med.kyoto-u.ac.jp/beForum/>  
公益財団法人 東京都医学総合研究所  
<http://www.igakuken.or.jp/research/topics/2014/0501.html>
2. Okatsu, K., Uno, M., Koyano, F., Go, E., Kimura, M., Oka, T., \*Tanaka, K., and \*Matsuda, N. (2013) A dyadic PINK1-containing complex on depolarized mitochondria stimulates Parkin recruitment. *J. Biol. Chem.*, 288: 36372-36384.
3. \*Kimura Y, Fukushi J, Hori S, Matsuda N. Okatsu K, Kakiyama Y, Kawawaki J, Kakizuka A, Tanaka K. (2013) Different dynamic movements of wild-type and pathogenic VCPs and their cofactors to damaged mitochondria in a Parkin-mediated mitochondrial quality control system. *Genes Cells*. 18: 1131-43.
4. Iguchi, M., Kujuro, Y., Okatsu, K., Koyano, F., Kosako, H., 他3名, \*Tanaka, K., \*Matsuda, N. (2012) Parkin catalyzed ubiquitin-ester transfer is triggered by PINK1-dependent phosphorylation. *J Biol Chem.*, 288: 22019-32.
5. Koyano, F., Okatsu, K., Ishigaki, S., 他2名., Sobue, G., \*Tanaka, K., \*Matsuda, N. (2013) The principal PINK1 and Parkin cellular events triggered in response to dissipation of mitochondrial membrane potential occur in primary neurons. *Genes to Cells*, 18: 672-81.
6. Okatsu, K., Iemura, S-I., Koyano, F., Go, E., Kimura, M., Natsume, T., \*Tanaka, K., \*Matsuda, N. (2012) Mitochondrial hexokinase HKI is a novel substrate of the Parkin ubiquitin ligase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 428: 197-202.
7. Okatsu, K., Oka, T., 他13名, Komatsu, M., Hattori, N., Mihara, K., Tanaka, K., \*Matsuda, N. (2012) PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria.

*Nat. Commun.* 3: 1016 (10 pages)

プレスリリース有

脳内環境

<http://www.neurol.med.kyoto-u.ac.jp/brainenvironment/J/result/press/p201208/p201208.html> 公

公益財団法人 東京都医学総合研究所

<http://www.igakuken.or.jp/research/topics/2012/0822.html>

#### 【若月修二 (A01 公募班)】

1. Wakatsuki, S. \*, Araki T., Sehara-Fujisawa A. Neuregulin-1/glia growth factor stimulates Schwann cell migration by inducing  $\alpha 5 \beta 1$  integrin-ErbB2-focal adhesion kinase complex formation. *Genes Cells* (2014) 19, 66-77. \*corresponding author (査読あり)
2. Togashi, K#, Wakatsuki, S#, Furuno, A, Tokunaga, S, Nagai, Y, Araki, T. (2013) Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers induce autophagy in neurons and inhibit polyglutamine-induced aggregate formation. *PLoS ONE* (2013) 8, e81313. #co-first author (査読あり)
3. 若月修二, 荒木敏之 第35回生化学特集「酵母から動植物まで包括するユビキチン・プロテアソーム系の新展開」ユビキチン・プロテアソーム系によって制御される軸索変性の分子メカニズム. 生化学 (2012) 84, 463-471. (査読なし)

#### 【高島明彦 (A01 公募班)】

1. \*N. Sahara, M. Murayama, M. Higuchi, T. Sahara, A. Takashima. Biochemical distribution of tau protein in synaptosomal fraction of transgenic mice expressing human P301L tau, *Front Neurol*. 2014 Mar 11;5: 26. doi: 10.3389/fneur.2014.00026. eCollection 2014. PMID: 24653715
2. Umeda T, Maekawa S, Kimura T, Takashima A. \*Tomiya T, Mori H. Neurofibrillary tangle formation by introducing wild-type human tau into APP transgenic mice. *Acta Neuropathol.* 2014 May;127(5): 685-98. doi: 10.1007/s00401-014-1259-1. Epub 2014 Feb 15. PMID: 24531886
3. Kimura T, Whitcomb DJ, Jo J, Regan P, Piers T, Heo S, Brown C, Hashikawa T, Murayama M, Seok H, Sotiropoulos I, Kim E, Collingridge GL, \*Takashima A. and \*Cho K. Microtubule-associated protein tau is essential for long-term depression in the hippocampus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2013 Dec 2;369(1633): 20130144. doi: 10.1098/rstb.2013.0144. Print 2014 Jan 5. PMID: 24298146
4. M. Arioka, F. \*Takahashi-Yanaga, M. Sasaki, T. Yoshihara, S. Morimoto, A. Takashima, Y. Mori, T. Sasaguri, Acceleration of bone development and regeneration through the Wnt/s-catenin signaling pathway in mice heterozygously deficient for GSK-3s. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Nov 1;440(4): 677-82. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.09.126. Epub2013 Oct 4. PMID: 24099767
5. M. Maruyama, H. Shimada, T. Sahara, H. Shinotoh, B. Ji, J. Maeda, MR. Zhang, JQ. Trojanowski, VM. Lee, M. Ono, K. Masamoto, H. Takano, N. Sahara, N. Iwata, N. Okamura, S. Furumoto, Y. Kudo, Q. Chang, TC. Saido, A. Takashima, J. Lewis, MK. Jang, I. Aoki, H. Ito, \*M. Higuchi. Imaging of tau pathology in a tauopathy mouse model and in Alzheimer patients compared to normal controls. *Neuron*, 2013 Sep 18;79(6): 1094-108. Doi: 10.1016/j.neuron.2013.07.037. PMID24050400
6. Umeda T, Yamashita T, Kimura T, Ohnishi K, Takuma H, Ozeki T, Takashima A. Tomiyama T, \*Mori H. Neurodegenerative disorder FTDP-17-related tau intron 10 +16C → T mutation increases tau exon 10 splicing and

causes tauopathy in transgenic mice. *Am J Pathol.* 2013 Jul;183(1): 211-25. doi: 10.1016/j.ajpath. 2013. 03. 015. Epub 2013 May 13. PMID: 23680655

- Ono K, Li L, Takamura Y, Yoshiike Y, Zhu L, Han F, Mao X, Ikeda T, Takasaki J, Nishijo H, **Takashima A**, Teplow DB, \*Zagorski MG, \*Yamada M. Phenolic compounds prevent amyloid  $\beta$ -protein oligomerization and synaptic dysfunction by site-specific binding. *J Biol Chem.* 2012 Apr 27;287(18): 14631-43. doi: 10.1074/jbc. M111. 325456. Epub 2012 Mar 5. PubMed PMID: 22393064; PubMed Central PMCID: PMC3340280.
- Takashima A**. GSK-3 $\beta$  and memory formation. *Front Mol Neurosci.* 2012;5: 47. doi: 10.3389/fnmol. 2012. 00047. Epub 2012 Apr 23. PubMed PMID: 22536172; PubMed Central PMCID: PMC3332229.

## A02公募班

### 【宮井和政 (A02公募班)】

- Sonderegger, P. and **Matsumoto-Miyai, K**. Activity-controlled proteolytic cleavage at the synapse. *Trends Neurosci.* submitted.

### 【下川哲明 (A02公募班)】

- \***Shimokawa, N.** (2014) Downregulation of Receptor Tyrosine Kinases through Ubiquitination: Analysis by Immunodetections. *Methods Mol. Biol.*, in press.
- Shimokawa, N.**, Yousefi B, Morioka S, Yamaguchi S, Ohsawa A, Hayashi H, Azuma A, Mizuno H, Kasagi M, Masuda H, Jingu H, Furudate SI, Haijima A, Takatsuru Y, Iwasaki T, Umezu M, Koibuchi N. (2014) *J. Neuroendocrinol.* 26: 164-75.
- \***Shimokawa, N.**, and Koibuchi N. (2013) Defect of CIN85 in brain and neurobehavioral disorder: involvement in excess dopamine signal (Review). *Horm. Stud.*, doi: 10.7243/2052-8000-1-2.
- Takatsuru, Y., Eto, K., Kaneko, R., Masuda, H., **Shimokawa, N.**, Koibuchi, N., \*Nabekura, J. (2013) Critical role of the astrocyte for functional remodeling in contralateral hemisphere of somatosensory cortex after stroke. *J. Neurosci.* 33: 4683-92.
- Itoh, M., \***Shimokawa, N.**, Tajika, Y., Murakami, T., Aotsuka, N., Lesmana, R., Farenia, R., Iwasaki, T., Okada, J., Yorifuji, H., Koibuchi, N. (2013) Alterations of biochemical marker levels and myonuclear numbers in rat skeletal muscle after ischemia-reperfusion. *Mol. Cell. Biochem.* 373: 11-8.
- Lesmana, R., \***Shimokawa, N.**, Takatsuru, Y., Iwasaki, T., Koibuchi, N. (2013) Lactational exposure to hydroxylated polychlorinated biphenyl (OH-PCB 106) causes hyperactivity in male rat pups by aberrant increase in dopamine and its receptor. *Environ. Toxicol.*, in press.
- Xu, M., Sulkowski, Z. L., Parekh, P., Khan, A., Chen, T., Midha, S., Iwasaki, T., **Shimokawa, N.**, Koibuchi, N., Zavacki, A. M., \*Sajdel-Sulkowska, E. M. (2013) Effects of perinatal lipopolysaccharide (LPS) exposure on the developing rat brain; modeling the effect of maternal infection on the developing human CNS. *Cerebellum* 2: 572-86.
- Hirooka-Masui, K., Lesmana, R., \*Iwasaki, T., Xu, M., Hayasaka, K., Haraguchi, M., Takeshita, A., **Shimokawa, N.**, Yamamoto, K., Koibuchi, N. Interaction of silencing mediator for retinoid and thyroid receptors with steroid and xenobiotic receptor on multidrug resistance 1 promoter. *Life Sci.* 92: 911-5.

### 【柴崎貢志 (A02公募班)】

- \***Shibasaki K**, Ikenaka K, Tamalu F, Tominaga M, Ishizaki Y. A novel subtype of astrocytes expressing TRPV4 regulates neuronal excitability via release of gliotransmitters. *J. Biol. Chem.* in press \*責任著者
- Takayama Y, **Shibasaki K**, Suzuki Y, Yamanaka A, Tominaga M. (2014) Modulation of water efflux through functional interaction between TRPV4 and TMEM16A/anoctamin 1. *FASEB J.* 28(5): 2238-48. doi: 10.1096/fj. 13-243436. Epub 2014 Feb 7.
- Kayakabe M, Kakizaki T, Kaneko R, Sasaki A, Nakazato Y, **Shibasaki K**, Ishizaki Y, Yanagawa Y. (2014) Motor dysfunction in cerebellar Purkinje cell specific-vesicular GABA transporter knockout mice. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7: 286. doi: 10.3389/fncel. 2013. 00286. 2014

4. \***Shibasaki K.**, Ishizaki Y, Mandadi S. (2013) Astrocytes express functional TRPV2 ion channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 441: 327-332, 2013 \*責任著者
5. Okano-Uchida T, Naruse M, Ikezawa T, **Shibasaki K.**, Ishizaki Y. (2013) Cerebellar neural stem cells differentiate into two distinct subtypes of astrocytes in response to CNTF and BMP2. *Neuroscience Letters* 552:15-20, 2013
6. #Naruse M. \*#**Shibasaki K.** 他 3名. (2013) Dynamic Changes of CD44 Expression from Progenitors to Subpopulations of Astrocytes and Neurons in Developing Cerebellum. *PLoS ONE* 8(1): e53109. #Co-1<sup>st</sup> author  
プレスリリース有  
・脳内環境  
<http://www.neurol.med.kyoto-u.ac.jp/brainenvironment/J/result/press/p201301/p201301.html>
7. #Matsumoto H, #**Shibasaki K.** 他3名, (2012) Implication of the Communication from Photoreceptor to Retinal Pigment Epithelium. *PLoS ONE* 7: e42841. #Co-1<sup>st</sup> author
8. Konno M, 他 7名, **Shibasaki K.**, Kaneko S. (2012) Stimulation of transient receptor potential vanilloid 4 channel suppresses abnormal activation of microglia induced by lipopolysaccharide. *GLIA* 60(5): 761-70.
9. Puentes S, Kurachi M, **Shibasaki K.** 他5名, (2012) Brain microvascular endothelial cell transplantation ameliorates ischemic white matter damage. *Brain Res.* 1469: 43-53.
10. Cai N, Kurachi M, **Shibasaki K.** 他2名, (2012) CD44-positive cells are candidates for astrocyte precursor cells in developing mouse cerebellum. *Cerebellum* 11: 181-193.

#### 【大西浩史 (A02 公募班)】

1. Koshimizu, H., Takao, K., Matozaki, T., \***Ohnishi, H.**, \*Miyakawa, T. (2014) Comprehensive behavioral analysis of Cluster of Differentiation 47 knockout mice. *PLoS ONE* 9(2): e89584.
2. Murata, Y., Saito, Y., Kaneko, T., Kotani, T., Kaneko, Y., **Ohnishi, H.**, \*Matozaki, T. (2014) Autoimmune animal models in the analysis of the CD47-SIRP  $\alpha$  signaling pathway. *Methods* 65: 254-259.
3. Zen, K., Guo, Y., Bian, Z., Lv, Z., Zhu, D., **Ohnishi, H.**, Matozaki, T., \*Liu, Y. (2013) Inflammation-induced proteolytic processing of the SIRP  $\alpha$  cytoplasmic ITIM in neutrophils propagates a proinflammatory state. *Nat. Commun.* 4: 2436.
4. Takahashi, S., Tomioka, M., \*Hiromura, K., Sakairi, T., Hamatani, H., Watanabe, M., Ikeuchi, H., Kaneko, Y., Maeshima, A., Aoki, T., **Ohnishi, H.**, Matozaki, T., Nojima, Y. (2013) SIRP  $\alpha$  signaling regulates podocyte structure and function. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 305: F861-870.
5. Hayashi, Y., Kusakari, S., Sato-Hashimoto, M., Urano, E., Shigeno, M., Sekijima, T., Kotani, T., Murata, Y., Murakami, H., Matozaki, T., \***Ohnishi, H.** (2012) Hypothermia-dependent and -independent effects of forced swim on the phosphorylation states of signaling molecules in mouse hippocampus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 428: 475-81.
6. Maruyama, T., Kusakari, S., Sato-Hashimoto, M., Hayashi, Y., Kotani, T., Murata Y., Okazawa, H., Oldenborg, P. -A., Kishi, S., \*Matozaki, T., \***Ohnishi, H.** (2012) Hypothermia-induced tyrosine phosphorylation of SIRP  $\alpha$  in the brain. *J. Neurochem.* 121: 891-902.
7. Wang, L., Lu, Y., Deng, S., Zhang, Y., Yang, L., Guan, Y., Matozaki, T., **Ohnishi, H.**, \*Jiang, H., \*Li, H. (2012) SHPS-1 deficiency induces robust neuroprotection against experimental stroke by attenuating oxidative stress. *J. Neurochem.* 122: 834-843.

#### 【大倉正道 (A02 公募班)】

1. Kobayashi, C., **Ohkura, M.**, Nakai, J., Matsuki, N., Ikegaya, Y., \*Sasaki, T.: Large-scale imaging of subcellular calcium dynamics of cortical neurons with G-CaMP6-actin. *NeuroReport* 25: 501-506, 2014.
2. Hiroi, M., **Ohkura, M.**, Nakai, J., Matsuda, N., Hashimoto, K., Inoue, K., Fiala, A., \*Tabata, T.: Principal component analysis of odor coding at the level of third-order olfactory neurons in *Drosophila*. *Genes Cells* 18, 1070-1081, 2013.
3. Mera, T., Itoh, T., Kita, S., Kodama, S., Kojima, D., Nishinakamura, H., Okamoto, K., **Ohkura, M.**, Nakai, J., Iyoda, T., Iwamoto, T., Matsuda, T., Baba, A., Omori, K., Ono, J., Watarai, H., Taniguchi, M., \*Yasunami, Y.: Pretreatment of donor islets with the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger inhibitor improves the efficiency of islet transplantation. *Am J Transplantation* 13, 2154-2160, 2013.
4. #Muto, A., #**Ohkura, M.**, Abe, G., \*Nakai, J., \*Kawakami, K. (2013) Real-time visualization of neuronal activity during perception. *Curr. Biol.* 23: 1-5. #Co-first Authors.
5. #\***Ohkura, M.**, #Sasaki, T., Sadakari, J., Gengyo-Ando, K., Kagawa-Nagamura, Y., Kobayashi, C., \*Ikegaya, Y., \*Nakai, J. (2012) Genetically encoded green fluorescent Ca<sup>2+</sup> indicators with improved detectability for neuronal Ca<sup>2+</sup> signals. *PLoS One* 7: e51286. #Co-first Authors.
6. #\***Ohkura, M.**, #Sasaki, T., Kobayashi, C., Ikegaya, Y., \*Nakai, J. (2012) An improved genetically encoded red fluorescent Ca<sup>2+</sup> indicator for detecting optically evoked action potentials. *PLoS One* 7: e39933. #Co-first Authors.
7. Takata, N., Shinohara, Y., **Ohkura, M.**, Mishima, T., Nakai, J., \*Hirase, H.: Imaging of astrocytic activity in living rodents. "Optical imaging of neocortical dynamics" Springer, *NeuroMethods* 85, 191-207, 2014.
8. \***大倉正道**, \*中井淳一 (2013) 蛍光 Ca<sup>2+</sup> プローブタンパク質を用いた神経細胞とアストロサイトの Ca<sup>2+</sup> イメージング. *日本薬理学雑誌* 142: 226-230.
9. \***大倉正道**, \*中井淳一 (2013) 蛍光バイオセンサーの開発. 「進化分子工学～高速分子進化によるタンパク質・核酸の開発～」第3編第1章第6節: 267-273.
10. \***大倉正道**, \*中井淳一 (2013) 光遺伝学ツールを用いた光制御および蛍光測定手法の開発. 「オプトジェネティクス (光遺伝学)」第2編第2章第1節: 107-117.
11. \***大倉正道**, \*中井淳一 (2013) 遺伝子コード型赤色蛍光 Ca<sup>2+</sup> プローブ R-CaMP1.07. *日本薬理学雑誌* 141: 175-175.
12. \***大倉正道**, 貞莉純子, \*中井淳一 (2012) タンパク質でできた高性能な蛍光カルシウムセンサー. *ケミカルエンジニアリング* 57: 926-931.

#### 【富田泰輔 (A02 公募班)】

1. Ishifune, C., Maruyama, S., Sasaki, Y., Yagita, H., Hozumi, K., **Tomita, T.**, Kishihara, K., \*Yasutomo, K. (2014) Differentiation of CD11c+CX3CR1+ cells in the small intestine requires Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* in press
2. Kanatsu, K., Morohashi, Y., Suzuki, M., Kuroda, H., Watanabe, T., \***Tomita, T.**, Iwatsubo, T. (2014) Decreased CALM expression reduces A $\beta$  42 to total A $\beta$  through clathrin-mediated endocytosis of  $\gamma$ -secretase. *Nat Comm* 5, Article number: 3386.
3. Ohki, Y., Shimada, N., Higo, T., Tokoshima, S., Fukuyama, T., \***Tomita, T.**, Iwatsubo, T. (2014) Binding of longer A $\beta$  to transmembrane domain 1 of presenilin 1 impacts on A $\beta$  42 generation. *Mol Neurodegener* 9(1): 7.
4. Taniguchi, A., Sasaki, D., Shiohara, A., Iwatsubo, T., **Tomita, T.**, Sohma, Y., \*Kanai, M. (2014) Attenuated aggregation and neurotoxicity of amyloid- $\beta$  peptide by catalytic photo-oxidation. *Angew Chem Int Ed Engl* 53(5): 1382-1385.

5. Li, Y., Hsueh-Jeng Lu, S., Tsai, C. J., Bohm, C., Qamar, S., Dodd, R. B., McDonald, B., Meadows, W., Jeoh, A., McLeod, A., Chen, F., Arimon, M., Berezovska, O., Hyman, B. T., **Tomita, T.**, Iwatsubo, T., Schmitt-Ulms, S., Fraser, P., \*St. George-Hyslop, P. (2014) Biophysical analysis of reciprocal allosteric interactions between  $\gamma$ -secretase inhibitor and initial substrate binding sites give insight into human presenilin-1 complex function. *Structure* 22(1): 125-135.
6. Hoshi, M., Ohki, Y., Ito, K., **Tomita, T.**, Iwatsubo, T., Ishimaru, Y., Abe, K., \*Asakura, T. (2013) Experimental detection of proteolytic activity in a signal peptide peptidase of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Biochem* 14: 16.
7. Morohashi, Y., \***Tomita, T.** (2013) Protein trafficking and maturation regulates intramembrane proteolysis. *BBA-Biomembranes* 1828(12): 2855-2861
8. \***Tomita, T.**, Iwatsubo, T. (2013) Structural biology of presenilins and signal peptide peptidases (Minireview). *J Biol Chem* 288(21): 14673-14680.
9. Takasugi, N., Sasaki, T., Ebinuma, I., Osawa, S., Isshiki, H., Takeo, K., \***Tomita, T.**, Iwatsubo, T. (2013) FTY720/Fingolimod, a sphingosine analogue, reduces amyloid- $\beta$  production in neurons. *Plos ONE* 8(5): e64050
10. Imamura, Y., Umezawa, N., Osawa, S., Shimada, N., Higo, T., Yokoshima, S., Fukuyama, T., Iwatsubo, T., Kato, N., \***Tomita, T.**, Higuchi, T. (2013) Effect of helical conformation and side-chain structure on  $\gamma$ -secretase inhibition by  $\beta$ -peptide foldamers: Insight into substrate recognition. *J Med Chem* 56(4): 1443-1454
11. Takagi-Niidome, S., Osawa, S., \***Tomita, T.**, Iwatsubo, T. (2013) Inhibition of  $\gamma$ -secretase activity by a monoclonal antibody against the extracellular hydrophilic loop of presenilin 1. *Biochemistry* 52(1): 61-69
12. Suzuki, K., Hayashi, Y., Nakahara, S., Kumazaki, H., Prox, J., Horiuchi, K., Zeng, M., Tanimura, S., Nishiyama, Y., Osawa, S., Sehara-Fujisawa, A., Saftig, P., Yokoshima, S., Fukuyama, T., Matsuki, N., Koyama, R., \***Tomita, T.**, Iwatsubo, T. (2012) Activity-dependent Cleavage of Neuroligin 1. *Neuron* 76(2): 410-422, 2012  
プレスリリース有  
・脳内環境  
<http://www.neurol.med.kyoto-u.ac.jp/brainenvironment/J/result/press/p201210-3/p201210-3.html>  
・東京大学  
[http://www.u-tokyo.ac.jp/public/public01\\_241018\\_j.html](http://www.u-tokyo.ac.jp/public/public01_241018_j.html)
13. Takeo, K., Watanabe, N., \***Tomita, T.**, Iwatsubo, T. (2012) Contribution of  $\gamma$ -secretase cofactors to the formation of catalytic pore of presenilin 1. *J Biol Chem* 287(31): 25834-25843

#### 【山田清文 (A02公募班)】

1. Yamada, S., Nagai, T., Nakai, T., Ibi, D., Nakajima, A., \***Yamada, K.** (2014) Matrix metalloproteinase-3 is a possible mediator of neurodevelopmental impairment due to polyI: C-induced innate immune activation of astrocytes. *Brain Behav. Immun.*, 38: 272-282.
2. Ibi, D., Nagai, T., Nakajima, A., 他13名, \***Yamada, K.** (2013) Astroglial IFITM3 mediates neuronal impairments following neonatal immune challenge in mice. *GLIA* 61: 679-693.

#### 【大海雄介 (A02公募班)】

1. **Ohmi, Y.**, Ohkawa Y, Tajima O, Sugiura Y, Furukawa K, \*Furukawa K. Ganglioside deficiency causes inflammation and neurodegeneration via the activation of complement system in the spinal cord. *J Neuroinflammation*. 2014. in press.
2. **Ohmi, Y.**, Ohkawa, Y., Yamauchi, Y., Tajima, O., Furukawa, K.,

\*Furukawa, K. (2012) Essential roles of gangliosides in the formation and maintenance of membrane microdomains in brain tissues. *Neurochem Res*. 37: 1185-91

3. Furukawa, K., Hamamura, K., Ohkawa, Y., **Ohmi, Y.**, Furukawa, K. (2012) Disialyl gangliosides enhance tumor phenotypes with differential modalities. *Glycoconj J*. 29: 579-584
4. Furukawa, K., Ohkawa, Y., Yamauchi, Y., Hamamura, K., **Ohmi, Y.**, Furukawa, K. Fine tuning of cell signals by glycosylation. *J Biochem*. 151, 573-8, 2012.
5. 古川綱一, **大海雄介**, 大川祐樹, 古川圭子, 田島織絵: 神経疾患と糖鎖の関わり, Annual Review神経 2013 (株)中外医学, pp37-45, 2013
6. 古川綱一, **大海雄介**, 大川祐樹, 徳田典代, 古川圭子: GM3 合成酵素欠損症, 日本臨床 別冊 新領域別症候群シリーズ 20 「先天代謝異常症候群」 617 - 620, 2012
7. KoichiFurukawa, **Yusuke Ohmi**, Yuji Kondo, Yuki Ohkawa, Orié Tajima, Keiko Furukawa: The role of Glycosphingolipids in Lipid rafts: lessons from Knockout mice. In Lipid Rafts, Properties, Controversies and Roles in Signal Transduction. Cell Biology Research Progress, Ed by Dan Sillence, pp1-20, Nova Science Publishers, Inc., New York, 2013

#### 【竹内英之 (A02公募班)】

1. \***Takeuchi, H.** (2014) Midkine and multiple sclerosis. *British Journal of Pharmacology* 171(4): 931-935.
2. Parajuli B., Sonobe Y., Horiuchi H., **Takeuchi, H.**, Mizuno T., Suzumura A. (2013) Oligomeric amyloid  $\beta$  induces IL-1  $\beta$  processing via production of ROS: implication in Alzheimer's disease. *Cell Death and Dis.* 4: e975.
3. Hirano K., Ohgomori T., Kobayashi K., Tanaka F., Matsumoto T., Natori T., Matsuyama Y., Uchimura K., Sakamoto K., **Takeuchi, H.**, Hirakawa A., Suzumura A., Sobue G., Ishiguro N., Imagama S., Kadomatsu K. (2013) Ablation of Keratan Sulfate Accelerates Early Phase Pathogenesis of ALS. *PLoS One* 8(6): e66969.
4. \***Takeuchi, H.** (2013) Microglia and glutamate. *Advances in Neuroimmune Biology* 4: 77-83.
5. \***Takeuchi, H.** (2013) Chapter 8, Glial Communication via Gap Junction in Neuroinflammation. *Advances in Neurobiology: vol.7 Neuron-Glia interaction in Neuroinflammation* (eds. Ikenaka K. and Suzumura A.)
6. Doi, Y., \***Takeuchi, H.**, Horiuchi, H., Hanyu, T., Kawanokuchi, J., Jin, S., Parajuli, B., Sonobe, Y., Mizuno, T., Suzumura, A. (2013) Fingolimod phosphate attenuates oligomeric amyloid  $\beta$ -induced neurotoxicity via increased brain-derived neurotrophic factor expression in neurons. *PLoS One*. 8(4): e61988.
7. Kobayashi, K., Imagama, S., Ohgomori, T., Hirano, K., Uchimura, K., Sakamoto, K., Hirakawa, A., **Takeuchi, H.**, Suzumura, A., Ishiguro, N., \*Kadomatsu, K. (2013) Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. *Cell Death Dis.* 4: e525.
8. Noda, H., \***Takeuchi, H.**, Mizuno, T., Suzumura, A. (2013) Fingolimod phosphate promotes the neuroprotective effects of microglia. *J. Neuroimmunol.* 256(1-2): 13-18.
9. Parajuli, B., \*Sonobe, Y., Kawanokuchi, J., Doi, Y., Noda, M., Takeuchi, H., Mizuno, T., Suzumura, A. (2012) GM-CSF increases LPS-induced production of proinflammatory mediators via upregulation of TLR4 and CD14 in murine microglia. *J. Neuroinflammation.* 9: 268.
10. Ma, D., Doi, Y., Jin, S., Li, E., Sonobe, Y., **Takeuchi, H.**, \*Mizuno, T., Suzumura, A. (2012) TGF- $\beta$  induced by interleukin-34-stimulated microglia regulates microglial proliferation and attenuates oligomeric amyloid  $\beta$  neurotoxicity. *Neurosci. Lett.* 529(1): 86-91.
11. Li, E., Noda, M., Doi, Y., Parajuli, B., Kawanokuchi, J., Sonobe,

- Y., **Takeuchi, H.**, \*Mizuno, T., Suzumura, A. (2012) The neuroprotective effects of milk fat globule-EGF factor 8 against oligomeric amyloid  $\beta$  toxicity. *J. Neuroinflammation*. 9: 148.
12. Parajuli, B., \*Sonobe, Y., Kawanokuchi, J., Doi, Y., Noda, M., **Takeuchi, H.**, Mizuno, T., Suzumura, A. (2012) Immunoglobulin G1 immune complex upregulates interferon-nitric oxide production via ERK1/2 activation in murine microglia. *J. Neuroimmunol*. 244(1-2): 57-62.
13. \*Sonobe, Y., Li, H., Jin, S., Kishida, S., Kadomatsu, K., **Takeuchi, H.**, Mizuno, T., Suzumura, A. (2012) Midkine inhibits inducible regulatory T cell differentiation by suppressing the development of tolerogenic dendritic cells. *J. Immunol*. 188(6): 2602-11.

### 【中川貴之 (A02公募班)】

1. Nishitani, N., Nagayasu, K., Asaoka, N., Yamashiro, M., Shirakawa, H., \***Nakagawa, T.**, Kaneko, S. (2014) Raphe AMPA receptors and nicotinic acetylcholine receptors mediate ketamine-induced serotonin release in the rat prefrontal cortex. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, in press.
2. Zhao, M., Nakamura, S., Miyake, T., So, K., Shirakawa, H., Tokuyama, S., Narita, M., \***Nakagawa, T.**, Kaneko, S. (2014) Pharmacological characterization of standard analgesics on oxaliplatin-induced acute cold hypersensitivity in mice. *J. Pharmacol. Sci.* in press.
3. Miyake, T., Shirakawa, H., Kusano, A., Sakimoto, S., Konno, M., **Nakagawa, T.**, Mori, Y., \*Kaneko, S. (2014) TRPM2 contributes to LPS/IFN  $\gamma$ -induced production of nitric oxide via the p38/JNK pathway in microglia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 444: 212-7.
4. Sakakiyama, M., Maeda, S., Isami, K., Asakura, K., So, K., Shirakawa, H., \***Nakagawa, T.**, Kaneko, S. (2014) Preventive and alleviative effect of tramadol on neuropathic pain in rats: roles of  $\alpha$ 2-adrenoceptors and spinal astrocytes. *J. Pharmacol. Sci.*, 124: 244-57.
5. Nagayasu, K., Kitaichi, M., Nishitani, N., Asaoka, N., Shirakawa, H., \***Nakagawa, T.**, Kaneko, S. (2013) Chronic effects of antidepressants on serotonin release in rat raphe slice cultures: high potency of milnacipran in the augmentation of serotonin release. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 16: 2295-306.
6. Isami, K., Haraguchi, K., So, K., Maeda, S., Asakura, K., Shirakawa, H., Mori, Y., \***Nakagawa, T.**, Kaneko, S. (2013) Involvement of TRPM2 in peripheral nerve injury-induced infiltration of peripheral immune cells into the spinal cord in mouse neuropathic pain model. *PLOS ONE*, 8: e66410.
7. Munakata, M., Shirakawa, H., Nagayasu, K., Miyano, J., Miyake, T., **Nakagawa, T.**, Katsuki, H., \*Kaneko, S. (2013) The TRPC3 inhibitor Pyr3 improves outcomes and attenuates astrogliosis after intracerebral hemorrhage in mice. *Stroke*, 44: 1981-7.
8. Homan, T., Tsuzuki, T., Dogishi, K., Shirakawa, H., Oyama, T., **Nakagawa, T.**, \*Kaneko, S. (2013) A novel mouse model of chronic inflammatory and overactive bladder by a single intravesical injection of hydrogen peroxide. *J. Pharmacol. Sci.* 121: 327-37.
9. Sakai, H., Sagara, A., Matsumoto, K., Hasegawa, S., Sato, K., Nishizaki, M., Shoji, T., Horie, S., **Nakagawa, T.**, Tokuyama, S., \*Narita, M. (2013) 5-Fluorouracil induces diarrhea with changes in the expression of inflammatory cytokines and aquaporins in mouse intestines. *PLOS ONE* 8: e54788.
10. \***Nakagawa, T.**, Nagayasu, K., Nishitani, N., Shirakawa, H., Sekiguchi, K., Ikarashi, Y., Kase, Y., Kaneko, S. (2012) Yokukansan inhibits morphine tolerance and physical dependence in mice: the role of  $\alpha$ 2a-adrenoceptor.
11. Zhao, M., Isami, K., Nakamura, S., Shirakawa, H., \***Nakagawa, T.**, Kaneko, S. (2012) Acute cold hypersensitivity characteristically induced by oxaliplatin is caused by the enhanced responsiveness of TRPA1 in mice. *Mol. Pain* 8: 55.
12. Haraguchi, K., Kawamoto, A., Isami, K., Maeda, S., Kusano, A., Asakura, K., Shirakawa, H., Mori, Y., \***Nakagawa, T.**, Kaneko, S. (2012) TRPM2 contributes to inflammatory and neuropathic pain through the aggravation of pronociceptive inflammatory responses in mice. *J. Neurosci.* 32: 3931-41.
13. \***中川貴之**, 白川久志, 金子周司 (2014) 末梢神経損傷により中枢移行する免疫系細胞と神経障害性疼痛の関連. 遺伝子医学 MOOK, in press
14. \***中川貴之**, 勇 昂一, 原口佳代, 宗 可奈子, 朝倉佳代子, 白川久志, 金子周司 (2014) 神経障害性疼痛における免疫系細胞に発現する TRPM2 チャネルの役割. 薬学雑誌, 134: 379-86.
15. \***中川貴之** (2014) 痛みの発生と慢性化における TRP チャネルの役割~新規鎮痛薬標的としての可能性~. 実験医学, 32: 519-26.
16. \***中川貴之**, 勇 昂一, 原口佳代, 宗 可奈子, 朝倉佳代子, 白川久志, 金子周司 (2013) 末梢神経損傷により脊髄内浸潤する免疫系細胞と神経障害性疼痛の関わり —TRPM2 チャネルの役割—. 日本薬理学雑誌, 142: 210-4.
17. \*白川久志, **中川貴之**, 金子周司 (2013) Neurovascular Unit におけるミクログリアの多様な役割 ~神経機能に対する積極的な調節とその善悪二面性~. 実験医学, 31, 2210-7
18. \***中川貴之** (2013) 痛みの受容機構と新規鎮痛薬創製の可能性. 生化学 85: 561-5.
19. \***中川貴之**, 趙 萌, 白川久志, 金子周司 (2013) オキサリプラチンに特徴的な急性末梢神経障害における TRPA1 の役割. 日本薬理学雑誌 141: 76-80.
20. \***中川貴之** (2012) 疼痛治療の分子標的薬. 日本臨牀 2012 年増刊号 70: 388-92.
21. \***中川貴之**, 金子周司 (2012) 炎症性および神経障害性疼痛における TRPM2 の役割. 医学のあゆみ 242: 265-6.
22. \***中川貴之** (2012) 慢性疼痛とオピオイドの鎮痛効果. オピオイド: 基礎を知って臨床で使いこなす (垣花 学, 成田 年 編), 克誠堂出版社, 158-62.

### 【望月秀樹 (A02公募班)】

1. Tada S, Yasui T, Nakatsuji Y, Okuno T, Koda T, **Mochizuki H.** (他2人). (2013) BAFF controls neural cell survival through BAFF receptor. *PLoS One* 8(7): e70924, 2013
2. Honorat JA, Kinoshita M, Okuno T, (他6人), **Mochizuki H.** Nakatsuji Y. (2013) Xanthine oxidase mediates axonal and myelin loss in a murine model of multiple sclerosis. *PLoS One* 8(8): e71329, 2013
3. Fujimoto H., Mihara M., Hattori N., Hatakenaka M., Kawano T., Yagura H., Miyai I., \***Mochizuki H.** (2013) Cortical changes underlying balance recovery in patients with hemiplegic stroke. *Neuroimage*. 15;85 Pt 1: 547-54. doi: 10.1016/j.neuroimage.2013.05.014. Epub 2013 May 16.
4. Nojima S., (他4名), Okuno T., (他13名), Takahashi M., \*Kumanogoh A. (2013) A point mutation in Semaphorin 4A associates with defective endosomal sorting and causes retinal degeneration. *Nature Communication*. 4: 1406.
5. Miyakawa S., (他12名), \***Mochizuki H.**, (2013) Lewy body pathology in a patient with a homozygous parkin deletion. Lewy body pathology in a patient with a homozygous parkin deletion. *Mov Disord*. 28(3): 388-91.
6. Funabe S., (他8名), **Mochizuki H.**, Hattori N., \*Murayama S., (2013) Neuropathologic analysis of Lewy-related  $\alpha$ -synucleinopathy in olfactory mucosa. *Neuropathology*. 33(1): 47-58
7. Nakata Y., (他11名), \***Mochizuki H.** (2012) Accumulation of  $\alpha$ -synuclein triggered by presynaptic dysfunction. *J Neurosci*. 32(48): 17186-96.

プレスリリース有

・脳内環境

<http://www.neurol.med.kyoto-u.ac.jp/brainenvironment/J/result/press/p201211/p201211.html>

・大阪大学

[http://www.osaka-u.ac.jp/ja/news/ResearchRelease/2012/11/20121129\\_1](http://www.osaka-u.ac.jp/ja/news/ResearchRelease/2012/11/20121129_1)

- Muramatsu R., Takahashi C., Miyake S., Fujimura H., **Mochizuki H.**, \*Yamashita T. (2012) Angiogenesis induced by CNS inflammation promotes neuronal remodeling through vessel-derived prostacyclin. *Nat Med.* 2012;18(11): 1658-64.
- Nakatsuji Y., Okuno T., (他17名), **Mochizuki H.**, \*Kumanogoh A. (2012) Elevation of Sema4A implicates Th cell skewing and the efficacy of interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *J. Immunology* 188(10): 4858-4865.
- Kokunai Y., (他6名), **Mochizuki H.**, Sahashi K., \*Takahashi MP. (2012) A sodium channel myotonia due to a novel SCN4A mutation accompanied by acquired autoimmune myasthenia gravis. *Neurosci Lett.* 21;519(1): 67-72.
- Fujimoto H., Mezaki T., Yokoe M., \***Mochizuki H.** (2012) Sonographic guidance provides a low-risk approach to the longus colli muscle. *Mov Disord.* 27(7): 928-9.
- Nakatsuji Y., Okuno T., (他4名), **Mochizuki H.** (2012) Roles of Sema4A in Multiple Sclerosis and IFN- $\beta$  Therapy Efficacy. *Clin Exp Neuroimmunol* 188(10): 4858-65. doi: 10.4049/jimmunol.1102023. Epub 2012 Apr 9.

#### 【浅沼幹人 (A02 公募班)】

- \*Kita, T., **Asanuma, M.**, Miyazaki, I., Takeshima, M. (2014) Protective effects of phytochemical antioxidants on neurotoxin-induced degeneration of dopaminergic neurons. *J. Pharmacol. Sci.*, in press.
- Onoue, Y., Kuwatsuka, K., Miyazaki, I., **Asanuma, M.**, \*Kitamura, Y., Sendo, T. (2014) Effects of bupropion and pramipexole on cell proliferation in the hippocampus of adrenocorticotrophic hormone-treated rats. *Biol. Pharm. Bull.*, 37: 327-330.
- Tachibana, H., \*Ogawa, D., Sogawa, N., **Asanuma, M.**, Miyazaki, I., Terami, N., Hatanaka, T., Horiguchi, C. S., Nakatsuka, A., Eguchi, J., Wada, J., Yamada, H., Takei, K., Makino, H. (2014) Metallothionein deficiency exacerbates diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic mice. *Am. J. Physiol.-Renal Physiol.*, 306(1): F105-115.
- Miyazaki, I., \***Asanuma, M.**, Murakami, S., Takeshima, M., Torigoe, N., Kitamura, Y., Miyoshi, K. (2013) Targeting 5-HT1A receptors in astrocytes to protect dopaminergic neurons in parkinsonian models. *Neurobiol. Dis.*, 59: 244-256.
- \***浅沼幹人**, 宮崎育子 (2013) アストロサイトと Parkinson 病治療. *神経内科*, 79(2): 257-261.
- \***Asanuma, M.**, Miyazaki, I., Diaz-Corrales, F. J., Higashi, Y., Namba, M., Ogawa, N. (2013) Transplantation of melanocytes obtained from the skin ameliorates apomorphine-induced abnormal behavior in rodent hemi-parkinsonian models. *PLoS ONE*, 8(6): e65983. doi: 10.1371/journal.pone.0065983.  
プレリリース有 (山陽新聞 2013. 6. 25)
- Kuwatsuka, K., Hayashi, H., Onoue, Y., Miyazaki, I., Koyama, T., **Asanuma, M.**, \*Kitamura, Y., Sendo, T. (2013) The mechanisms of electroconvulsive stimuli in BrdU-positive cells of the dentate gyrus in ACTH-treated rats. *J. Pharmacol. Sci.*, 122: 34-41.
- \***Asanuma, M.**, Miyazaki, I., Kikkawa, Y., Kimoto, N., Takeshima, M., Murakami, S., Miyoshi, K. (2012) Cyclooxygenase-independent neuroprotective effects of aspirin against dopamine quinone-induced neurotoxicity. *Neurochem. Res.*, 37: 1944-1951.

- \*Tanaka, K., Ogo, H., Kaji, H., Miyatake, K., Tokudome, E., Sonoda, K., Ogawa, N., **Asanuma, M.** (2012) Dipeptidyl compounds ameliorate the serum-deprivation-induced reduction in cell viability via the neurotrophin-activating effect in SH-SY5Y cells. *Neurol. Res.*, 34: 619-622.
- \*Diaz-Corrales, F. J., Miyazaki, I., **Asanuma, M.**, Ruano, D., \*Rios, R. M. (2012) Centrosomal aggregates and Golgi fragmentation disrupt vesicular trafficking of DAT. *Neurobiol. Aging*, 33: 2462-2477.

#### 【田口明子 (A02 公募班)】

- Miyoshi K, **Taguchi A.** 他10名. (2013) Epithelial Pten controls acute lung injury and fibrosis by regulating alveolar epithelial cell integrity. *Am J Respir Crit Care Med*, 187: 262-75.
- \***田口明子** (2014) インスリン様シグナルとアルツハイマー病—認知機能調節における脳インスリン様シグナルの役割— 医学のあゆみ (In press)
- \***田口明子** (2014) 脳の老化とインスリン様シグナル 脳 21, Vol. 17 No. 2 110-115.
- 福岡屋航, \***田口明子**. (2013) 糖尿病関連神経変性疾患—アルツハイマー病発 機構についての新たな視点. *Diabetes Frontier*, 24(3): 253-261
- \***田口明子**, 倉田栄子, 福岡屋航. (2012) 代謝調節分子の中樞神経系における役割—脳内インスリン様受容体シグナル分子 IRS2 を介した神経機能調節機構— 心と体のクロストークから解く精神・神経疾患, 実験医学増刊号, 30: 2057-2061.
- \***田口明子**. (2012) インスリン様シグナルと寿命・老化の制御. 糖尿病学イラストレイティッド, 291-296. 1

#### 【竹居光太郎 (A02 公募班)】

- \*Goshima, Y. and **Takei, K.**, Micro-CALI to investigate the localized role of the Semaphorin signaling component CRMP in axon growth. *Methods in Molecular Biology*, in press.
- Yamashita, N., Usui, H., Nakamura, F., Chen, S., Sasaki, Y., Hida, T., Suto, F., Taniguchi, M., **Takei, K.**, \*Goshima, Y. (2014) PlexinA4-dependent retrograde Semaphorin3A signaling regulates the dendritic localization of GluA2-containing AMPA receptors. *Nature Communications*, 5: 3424 (DOI: 10.1038/ncomms4424).
- Iketani, M., Iizuka, A., Sengoku, K., Kurihara, Y., Nakamura, F., Sasaki, Y., Sato, Y., Yamane, M., Matsuhita, M., Nairn, A. C., Takamatsu, K., Goshima, Y., \***Takei, K.** (2012) Regulation of neurite outgrowth mediated by localized phosphorylation of protein translational factor eEF2 in growth cones. *Developmental Neurobiology*, 73: 230-246 (DOI 10.1002/dneu.22058).
- Higurashi, M., Iketani, M., \***Takei, K.**, Yamashita, N., Aoki, R., Kawahara, N., \*Goshima, Y. (2012) Localized role of CRMP1 and CRMP2 in neurite outgrowth and growth cone steering. *Developmental Neurobiology*, 72: 1528-1540 (DOI 10.1002/dneu.22017).
- Kurihara, Y., Arie, Y., Iketani, M., Ito, H., Nishiyama, K., Sato, Y., Nakamura, F., Mizuki, N., Goshima, Y., \***Takei, K.** (2012) The carboxyl-terminal region of Crtac1b/LOTUS acts as a functional domain in endogenous antagonism to Nogo receptor-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 418: 390-395.
- \***竹居光太郎** (2014) 神経再生促進物質 LOTUS の生理機能解析. プレインサイエンスレビュー2014, クバプロ, 印刷中
- 栗原裕司, \***竹居光太郎** (2013) LOTUS による神経回路形成機構. *Annual Review 2013 神経* p. 63-67, 中外医学社.
- \***竹居光太郎** (2013) 脳内環境制御による軸索再生: LOTUS による軸索再生. *Bio Clinica* 28(13): 43-48, 北隆館.
- \***竹居光太郎** (2013) 哺乳類中枢神経系の新しい神経回路形成機構.



神経束形成因子 LOTUS の発見. 生化学 85: 328-335.

10. 栗原裕司, \***竹居光太郎** (2013) LOTUS による神経回路形成機構. Annual Review 2013 神経 p. 63-67, 中外医学社.
11. \***竹居光太郎** (2013) 神経回路形成分子 LOTUS の機能. 横浜医学 63(4): 635-640.
12. **竹居光太郎** (2012) 光照射分子不活性化法 (CALI 法). 日本薬理学会雑誌 (Folia Pharmacology Japan) 140: 226-230.
13. 池谷真澄, 栗原裕司, 佐藤泰史, 五嶋良郎, \***竹居光太郎** (2012) 内在性 Nogo 受容体アンタゴニスト LOTUS の嗅索形成における生理的役割. 実験医学 30(3): 479-482.

### 【古川良明 (A02 公募班)】

1. Mitomi, Y., Nomura, T., Kurosawa, M., Nukina, N., \***Furukawa, Y.** (2012) Post-aggregation oxidation of mutant huntingtin controls the interactions between aggregates. *J. Biol. Chem.* 287: 34764-75.
2. Toichi, K., Yamanaka, K., \***Furukawa, Y.** (2013) Disulfide scrambling describes the oligomerization of superoxide dismutase (SOD1) proteins in the familial form of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Biol. Chem.* 288: 4970-80.
3. \***Furukawa, Y.**, \*Nukina, N. (2013) Functional diversity of protein fibrillar aggregates from physiology to RNA granules to neurodegenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1832: 1271-8.
4. \***Furukawa, Y.**, Kaneko, K., Watanabe, S., Yamanaka, K., Nukina, N. (2013) Intracellular seeded aggregation of mutant Cu, Zn-superoxide dismutase associated with amyotrophic lateral sclerosis. *FEBS Lett.* 587: 2500-5.
5. \***Furukawa, Y.** (2013) Redox environment is an intracellular factor to operate distinct pathways for aggregation of Cu, Zn-superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Front. Cell. Neurosci.* 7: Article 240.
6. Nomura, T., Watanabe, S., Kaneko, K., Yamanaka, K., Nukina, N., \***Furukawa, Y.** (2014) Intranuclear aggregation of mutant FUS/TLS as a molecular pathomechanism of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Biol. Chem.* 289: 1192-202.
7. Ogawa, M., \***Furukawa, Y.** (2014) A seeded propagation of Cu, Zn-superoxide dismutase aggregates in amyotrophic lateral sclerosis. *Front. Cell. Neurosci.* 8: Article 83.

### 【加藤総夫 (A02 公募班)】

1. Masashi Nagase, Yukari Takahashi, Ayako M Watabe, Yoshihiro Kubo, \***Fusao Kato** (2014). On-site energy supply at synapses through monocarboxylate transporters maintains excitatory synaptic transmission. *J Neurosci.* 34: 2605-17. 査読有
2. 永瀬将志, \***加藤総夫** (2014). シナプス伝達維持におけるアストロサイト・ニューロン間エネルギー共生. 遺伝子医学 MOOK26 号; 印刷中. 査読無.

### 【檜山武史 (A02 公募班)】

1. Unezaki S., Katano T., **Hiyama T.Y.**, Tu N.H., Yoshii S., Noda M., \*Ito S. (2014) Involvement of Nax sodium channel in peripheral nerve regeneration via lactate signaling. *Eur. J. Neurosci.* 39: 720-29.
2. **Hiyama T.Y.**, Yoshida M., Matsumoto M., Suzuki R., Matsuda T., Watanabe E., \*Noda M. (2013) Endothelin-3 expression in the subfornical organ enhances the sensitivity of Nax, the brain sodium-level sensor, to suppress salt intake. *Cell Metab.* 17: 507-19.  
プレスリリース有  
・脳内環境  
<http://www.neurol.med.kyoto-u.ac.jp/brainenvironment/J/result/press/p201304-2/p201304.html>  
・2013年4月19日 科学新聞4面

「体液 Na 濃度センサー 基生研 調節機構を解明」

・ Cell Metabolism 誌 Web ページ issue Highlights

<http://www.cell.com/cell-metabolism/>

・2013年4月4日 マイナビニュース

「NIBB, ヒトの体液のナトリウム濃度を一定の値に維持する仕組みを発見」

<http://news.mynavi.jp/news/2013/04/04/237/index.html>

3. Matsumoto M., Fujikawa A., Suzuki R., Shimizu H., Kuboyama K., **Hiyama T.Y.**, Hall R.A., \*Noda M. (2012) SAP97 promotes the stability of Na<sub>x</sub> channels at the plasma membrane. *FEBS Lett.* 586: 3805-12.

### 【田中謙二 (A02 公募班)】

1. Beppu K, Sasaki T, **Tanaka KF**, Yamanaka A, Fukazawa Y, Shigemoto R, \*Matsui K (2014) Optogenetic countering of glial acidosis suppress glial glutamate release and ischemic brain damage. *Neuron.* 81(2): 314-20
2. Shimizu T, **Tanaka KF**, Takebayashi H, Higashi M, Wisemsmith W, Ono K, Hitoshi S, \*Ikenaka K. (2013) Olig2-lineage cells preferentially differentiate into oligodendrocytes but their processes degenerate at the chronic demyelinating stage of proteolipid protein-overexpressing mouse. *J Neurosci Res.* 91(2): 178-86.
3. Lee HU, Yamazaki Y, \***Tanaka KF**, Furuya K, Sokabe M, Hida H, Takao K, Miyakawa T, Fujii S, Ikenaka K. (2013) Increased astrocytic ATP release results in enhanced excitability of the hippocampus. *Glia.* 61(2): 210-24.
4. Tabuchi S, Tsunematsu T, Kilduff TS, Sugio S, Xu M, **Tanaka KF**, Takahashi S, Tominaga M, \*Yamanaka A. (2013) Influence of inhibitory serotonergic inputs to orexin/hypocretin neurons on the diurnal rhythm of sleep and wakefulness. *Sleep.* 2013;36(9): 1391-404.
5. Tsunematsu T, Tabuchi S, **Tanaka KF**, Boyden ES, Tominaga M, \*Yamanaka A. (2013) Long-lasting silencing of orexin/hypocretin neurons using archaerhodopsin induces slow-wave sleep in mice. *Behav Brain Res.* 255: 64-74.
6. Baudouin SJ, Gaudias J, Gerharz S, Hatstatt L, Zhou K, Punnakkal P, **Tanaka KF**, Spooren W, Hen R, De Zeeuw CI, Vogt K, \*Scheiffele P. (2012) Shared Synaptic Pathophysiology in Syndromic and Nonsyndromic Rodent Models of Autism. *Science*;338(6103): 128-32.
7. Koizumi A, **Tanaka KF**, \*Yamanaka A. (2012) The manipulation of neural and cellular activities by ectopic expression of melanopsin. *Neurosci Res*;75: 3-5
8. **Tanaka KF**, Samuels BA, \*Hen R. (2012) Serotonin receptor expression along the dorsal-ventral axis of mouse hippocampus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*;367(1601): 2395-401.
9. Tsunematsu T, **Tanaka KF**, Yamanaka A, \*Koizumi A. (2012) Ectopic expression of melanopsin in orexin/hypocretin neurons enables control of wakefulness of mice in vivo by blue light. *Neurosci Res*;75: 23-28
10. \***Tanaka KF**, Matsui K, Sasaki T, Sano H, Sugio S, Fan K, Hen R, Nakai J, Yanagawa Y, Hasuwa H, Okabe M, Deisseroth K, Ikenaka K, Yamanaka A. (2012) Expanding the Repertoire of Optogenetically Targeted Cells with an Enhanced Gene Expression System. *Cell Rep*;2(2): 397-406.  
プレスリリース有  
・脳内環境  
<http://www.neurol.med.kyoto-u.ac.jp/brainenvironment/J/result/press/p201207/p201207.html>  
・自然科学研究機構生理学研究所プレスリリース  
「体液 Na 濃度センサー 基生研 調節機構を解明」  
<http://www.nips.ac.jp/contents/release/entry/2012/07/post-219.html>
11. Inamura N, Sugio S, Macklin WB, Tomita K, \***Tanaka KF**, Ikenaka K (2012) Gene induction in mature oligodendro-

- cytes with a PLP-tTA mouse line. *Genesis*;50(5): 424-8.
12. Gire DH, Franks KM, Zak JD, **Tanaka KF**, Whitesell JD, Mulligan AA, Hen R, \*Schoppa NE. (2012) Mitral cells in the olfactory bulb are mainly excited through a multistep signaling path. *J Neurosci.* 32(9): 2964-75.
  13. Bepari AK, Sano H, Tamamaki N, Nambu A, \***Tanaka KF**, \*Takebayashi H. (2012) Identification of optogenetically activated striatal medium spiny neurons by npas4 expression. *PLoS One*;7(12): e52783.
  14. Sasaki T, Beppu K, **Tanaka KF**, Fukazawa Y, Shigemoto R, \*Matsui K. (2012) Application of an optogenetic byway for perturbing neuronal activity via glial photostimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*;109(50): 20720-5.
  15. \*Okada Y, Sasaki T, Oku Y, Takahashi N, Seki M, Ujita S, **Tanaka KF**, Matsuki N, \*Ikegaya Y. (2012) Preinspiratory calcium rise in putative pre-Botzinger complex astrocytes. *J Physiol*;590(Pt 19): 4933-44.
  16. **田中謙二** (2014) 光遺伝学による有用な遺伝子改変マウス 細胞工学 33(3): 260-263
  17. **田中謙二**, 高田則雄, 三村 将 (2013) In vivo でグリアを見る・操作するための機能遺伝子発現方法 実験医学 31(7): 1736-1741
  18. **田中謙二**, 高田則雄, 三村 将 (2013) オプトジェネティクスと精神医学 精神神経学雑誌 115(12): 1211-1215
  19. **田中謙二** (2012) オプトジェネティクスと精神疾患研究への応用 分子精神医学 12(3): p30-33
- T., Ohta, T., \***Tominaga, M.** (2012) Analysis of Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) in frogs and lizards illuminates both nociceptive heat and chemical sensitivities and coexpression with TRP Vanilloid 1 (TRPV1) in ancestral vertebrates. *J. Biol. Chem.* 287: 30743-30754.
  9. Uchida, K., Miura, Y., Naga, M., \***Tominaga, M.** (2012) Isothiocyanates from *Wasabia japonica* activate transient receptor potential ankyrin 1 channel. *Chemical Senses* 37: 809-818.
  10. Takaishi, M., Fujita, F., Uchida, K., Yamamoto, S., Sawada, M., Hatai, C., Shimizu, M., \***Tominaga, M.** (2012) 1, 8-cineole, a TRPM8 agonist, is a novel natural antagonist of human TRPA1. *Mol. Pain* 8: 86.

#### 【富永真琴 (A02公募班)】

1. Takayama, Y., Shibasaki, K., Suzuki, Y., Yamanaka, A., \***Tominaga, M.** (2014) Modulation of water efflux through functional interaction between TRPV4 and TMEM16A/anoctamin 1. *FASEB J.* (in press)
2. \***Tominaga, M.**, Takayama, Y. (2014) Interaction between TRP and Ca<sup>2+</sup>-activated chloride channels. *CHANNELS* (in press)  
(1のFASEB J論文のonline publicationを受けて、CHANNELS誌からCommentary執筆依頼を受けたものです)
3. Fujita, F., Uchida, K., Takaishi, M., Sokabe, T., \***Tominaga, M.** (2013) Ambient temperature affects the temperature threshold for TRPM8 activation through interaction of phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J. Neurosci.* 33: 6154-6159.  
上記論文3について、新聞紹介された。2013年4月11日中日新聞「冷たさ感じる温度こう調節」、日経産業新聞2013年4月30日「冷たさの感覚 周囲温度で変化」など
4. Shintaku, K., Uchida, K., Suzuki, Y., Zhou, Y., Fushik, i T., Watanabe, T., Yazawa, S., \***Tominaga, M.** (2012) Activation of TRPA1 by a non-pungent capsaicin-like compound, capsiate. *Br. J. Pharmacol.* 165: 1476-1486.
5. Komatsu, T., Uchida, K., Fujita, F., Zhou, Y., \***Tominaga, M.** (2012) Primary alcohols activate human TRPA1 channel in a carbon chain length-dependent manner. *Pfluger Archiv. Eur. J. Physiol.* 463: 549-59.
6. Kida, N., Sokabe, T., Kashio, M., Haruna, K., Mizuno, Y., Suga, Y., Nishikawa, K., Kanamaru, A., Hongo, M., Oba, A., \***Tominaga, M.** (2012) Importance of transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) in epidermal barrier function in human skin keratinocytes. *Pfluger Archiv. Eur. J. Physiol.* 463: 715-25.
7. Kashio, M., Sokabe, T., Shintaku, K., Uematsu, T., Fukuta, N., Kobayashi, N., Mori, Y., \***Tominaga, M.** (2012) Redox signal-mediated sensitization of Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) to temperature affects macrophage functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 6745-6750.  
上記論文7について、NatureAsia website等で紹介されるとともに、2012年4月27日の科学新聞で「免疫を担うマクロファージ体温で活性化の仕組み解明」として紹介された。
8. Saito, S., Nakatsuka, K., Takahashi, K., Fukuta, N., Imagawa,

## A03公募班

## 【武田 篤 (A03公募班)】

1. Kikuchi A, Baba T, Hasegawa T, Kobayashi M, Sugeno N, Konno M, Miura E, Hosokai Y, Ishioka T, Nishio Y, Hirayama K, Suzuki K, Aoki M, Takahashi S, Fukuda H, Itoyama Y, Mori E, \***Takeda A**. Hypometabolism in the supplementary and anterior cingulate cortices is related to dysphagia in Parkinson's disease: a cross-sectional and 3-year longitudinal cohort study. *BMJ Open* 2013; 3: e002249
2. \*Nagayama H, Kubo S, Hatano T, Hamada S, Maeda, T, Hasegawa T, 他13名. Validity and reliability assessment of a Japanese version of the Snaith-Hamilton pleasure scale. *Intern Med* 2012; 51(8): 865-869
3. Konno M, \*Hasegawa T, Baba T, Miura E, Sugeno N, Kikuchi A, Fiesel FC, Sasaki T, Aoki M, Itoyama Y, **Takeda A**. Suppression of dynamin GTPase decreases alpha-synuclein uptake by neuronal and oligodendroglial cells: a potent therapeutic target for synucleinopathy. *MolNeurodegener* 2012; 7(1), 38
4. \*Sugeno N, Kawaguchi N, Hasegawa T, 他5名. A case with anti-galactocerebroside antibody-positive Mycoplasma pneumoniae meningoencephalitis presenting secondary hypersomnia. *NeuroSci* 2012; 33(6): 1473-1476
5. Kaneko K, Tano O, \*Kikuchi A, Hasegawa T, Tateyama M, Yoshioka M, Saito H, Watanabe O, **Takeda A**, Aoki M. Anti-voltage-gated potassium channel antibody is associated with chronic autonomic and sensory neuropathy. *J Neurol* 2012; 260: 315-317
6. \*Hasegawa T, Konno M, Baba T, Sugeno N, Kikuchi A, Kobayashi M, Miura E, Tanaka N, Tamai K, Furukawa K, Arai H, Mori F, Wakabayashi K, Aoki M, Itoyama Y, **Takeda A**. The AAA-ATPase VPS4 regulates extracellular secretion and lysosomal targeting of alpha-synuclein. *PLoS One* 2011, 6(12), e29460.

## 【林 崇 (A03公募班)】

1. Thomas, G. M., **Hayashi, T.**, \*Huganir, R. L., \*Linden, D. J. (2013) DHHC8-dependent PICK1 palmitoylation is required for induction of cerebellar long-term synaptic depression. *J. Neurosci.* 33: 15401-07.
2. **Hayashi, T.**, Yoshida, T., Ra, M., Taguchi, R., \*Mishina, M. (2013) IL1RAPL1 associated with mental retardation and autism regulates the formation and stabilization of glutamatergic synapses of cortical neurons through RhoA signaling pathway. *PLoS One.* 8: e66254  
プレスリリース有  
・脳内環境  
<http://www.neurol.med.kyoto-u.ac.jp/brainenvironment/J/result/press/p201307-1/p201307.html>
3. Mattison, H.A., **Hayashi, T.**, \*Barria, A. (2012) Palmitoylation at two cysteine clusters on the C-terminus of GluN2A and GluN2B differentially control synaptic targeting of NMDARs. *PLoS One.* 7: e49089.

## 【米田 誠 (A03公募班)】

1. Ikawa, M., Arakawa, K., Hamano, T., Nagata, M., Nakamoto, Y., Kuriyama, M., Koga, Y. \***Yoneda, M.** Evaluation of Systemic Redox States in Patients Carrying MELAS A3243G Mutation in Mitochondrial DNA. *Eur Neurol* 2012;67(4): 232-7.
2. \*Tsujiyama T, Yamamoto T, Ikawa M, **Yoneda M**, Kimura H. Crossed cerebellar hyperperfusion after MELAS attack followed up by whole brain continuous arterial spin labeling per-

fusion imaging. *Acta Radiol.* 2012 Mar 1;53(2): 220-2.

3. \*Yoshii Y, **Yoneda M**, Ikawa M, Furukawa T, Kiyono Y, Mori T, Yoshii H, Oyama N, Okazawa H, Saga T, Fujibayashi Y. Radiolabeled Cu-ATSM as a novel indicator of overreduced intracellular state due to mitochondrial dysfunction: studies with mitochondrial DNA-less  $\rho 0$  cells and cybrids carrying MELAS mitochondrial DNA mutation. *Nucl Med Biol.* 2012 Feb;39(2): 177-85.
4. \***Yoneda M**, Ikawa M, Arakawa K, Kudo T, Kimura H, Fujibayashi Y, Okazawa H. In vivo functional brain imaging and a therapeutic trial of L-arginine in MELAS patients. *Biochim Biophys Acta.* 2012 May;1820(5): 615-8.
5. 井川正道, **米田 誠**. ミトコンドリア病. *PHARMSTAGE.* 2012; 12, 48-52.
6. Masamichi Ikawa, \***Makoto Yoneda**, Tomoko Muramatsu, Akiko Matsunaga, Tetsuya Tsujikawa, Tatsuya Yamamoto, Nobuyuki Kosaka, Kazuyuki Kinoshita, Osamu Yamamura, Tadanori Hamano, Yasunari Nakamoto, Hirohiko Kimura. Detection of preclinically latent hyperperfusion due to stroke-like episodes by arterial spin-labeling perfusion MRI in MELAS patients. *Mitochondrion* 2013 Oct;13: 676-680.
7. 井川正道, 岡沢秀彦, **米田 誠**.  $^{62}\text{Cu}$ -ATSM PET-. *Modern physician* 2013;33, 577-579.

## 【遠山育夫 (A03公募班)】

1. Yanagisawa, D., Taguchi, H., Ibrahim, N. F., Morikawa, S., Shiino, A., Inubushi, T., Hirao, K., Shirai, N., Sogabe, T., \***Tooyama, I.** (2014) Preferred features of a fluorine-19 MRI probe for amyloid detection in the brain. *J Alzheimer's Dis* 39: 617-631.
2. Yang, H., Yang, M., Guan, H., Liu, Z., Zhao, S., Takeuchi, S., Yanagisawa, D., \***Tooyama, I.** (2013) Mitochondrial ferritin in neurodegenerative diseases. *Neurosci Res.* 77: 1-7.
3. Kameshima, N., Yanagisawa, D., \***Tooyama, I.** (2013)  $\beta$ -Amyloid peptide (1-40) in the brain reaches the nasal cavity via a non-blood pathway. *Neurosci. Res.* 76: 169-172, 2013.
4. \*Yezdimer, E. M., Umemoto, T., Yamada, H., Makino, S., **Tooyama I** (2013) Visualizing Hepatic Copper Release in Long-Evans Cinnamon Rats Using Single-Photon Emission Computed Tomography. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 170: 1138-1150.
5. Makino S, Umemoto T, Yamada H, \*Yezdimer EM, **Tooyama I** (2012) In Vivo Detection of Copper Ions by Magnetic Resonance Imaging Using a Prion-Based Contrast Agent. *Appl Biochem Biotechnol.* 168: 504-518.

## 【柿澤 昌 (A03公募班)】

1. \***Kakizawa, S.**, Kaiya, H., Takahashi, A. (2014) Posttranslational Modification of Intercellular Messenger Systems (Editorial article). *Front Endocrinol* 5: 27. doi: 10.3389/fendo.2014.00027.
2. Tao, S., Yamazaki, D., Komazaki, S., Zhao, C., Iida, T., **Kakizawa, S.**, Imaizumi, Y., \*Takeshima, H. (2013) Facilitated hyperpolarization signaling in vascular smooth muscle overexpressing TRIC-A channels. *J Biol Chem* 288: 15581-15589.
3. \***Kakizawa, S.** (2013) Nitric oxide-induced calcium release: activation of type 1 ryanodine receptor, a calcium release channel, through non-enzymatic posttranslational modification by nitric oxide. *Front Endocrinol* 4: 142. doi: 10.3389/fendo.2013.00142.
4. \***Kakizawa, S.**, Yamazawa, T., Iino, M. (2013) Nitric oxide-induced calcium release: Activation of type 1 ryanodine receptor by endogenous nitric oxide. *Channels* 7: 1-5.
5. Nishi, M., Aoyama, F., Kisa, F., Zhu, H., Sun, M., Lin, P., Ohta,

- H., Van, B., Yamamoto, S., **Kakizawa, S.**, Sakai, H., Ma, J., Sawaguchi, A., \*Takeshima, H. (2012) TRIM50 regulates vesicular trafficking for acid secretion in gastric parietal cells. *J Biol Chem* 287: 33523-33532.
6. \***Kakizawa, S.**, \*Takeshima, H., Iino, M. (2012) Nitric Oxide-Induced Calcium Release: A Novel Calcium-Mobilizing Mechanism Mediated by S-nitrosylation-Dependent Modulation of Ryanodine Receptor. *Messenger* 1: 133-140.
  7. \***Kakizawa, S.**, Yamazawa, T., Chen, Y., Ito, A., Murayama, T., Oyamada, H., Kurebayashi, N., Sato, O., Watanabe, M., Mori, N., Oguchi, K., Sakurai, T., Takeshima, H., Saito, N., \*Iino, M. (2012) Nitric oxide-induced calcium release via ryanodine receptors regulates neuronal function. *EMBO J* 31: 417-428.
  1. \***Kakizawa, S.**, Shibasaki, M., \*Mori, N. (2012) Protein oxidation inhibits NO-mediated signaling pathway for synaptic plasticity. *Neurobiol Aging* 33: 535-545.
  8. \***柿澤 昌** (2014) 非酵素的翻訳後修飾による脳機能制御機構. *ブレインサイエンス・レビュー2014* 廣川信隆編, クバプロ, 東京, pp57-78.
  9. \***柿澤 昌** (2014) 27 内因性チャネルを用いた脳内レドックス環境イメージングと老化・病態脳研究への応用. 高橋良輔, 漆谷 真, 山中宏二, 樋口真人 (編), 遺伝子医学 MOOK26号 脳内環境—恒常性維持機構の破綻と病気, 印刷中, メディカルドゥ, 大阪
  10. \***柿澤 昌** (2013) ジャンクトフィリン. 林 康紀 (編), 脳科学辞典, <http://bsd.neuroinf.jp/wiki/ジャンクトフィリン>, Web辞典.
  11. \***柿澤 昌** (2012) リアノジン受容体. 林 康紀 (編), 脳科学辞典, <http://bsd.neuroinf.jp/wiki/リアノジン受容体>, Web辞典.
  12. \***柿澤 昌** (2012) 8章 恒常性. 新 医歯薬学系学生のための基礎生命科学 竹島 浩 編, 京都廣川書店, 京都, pp185-216.

#### 【船曳和雄 (A03公募班)】

1. Danjo T, Yoshimi K, **Funabiki K.**, Yawata S, \*Nakanishi S. (2014) Aversive behavior induced by optogenetic inactivation of ventral tegmental area dopamine neurons is mediated by dopamine D2 receptors in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* in press
2. Wada N, **Funabiki K.**, \*Nakanishi S. (2014) Role of granule-cell transmission in memory trace of cerebellum-dependent optokinetic motor learning. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111(14): 5373-8.
3. \*Ashida G, **Funabiki K.**, Carr CE. (2013) Theoretical foundations of the sound analog membrane potential that underlies coincidence detection in the barn owl. *Front Comput Neurosci.* 7: 151. 1-11
4. \*Ashida G, **Funabiki K.**, Carr CE. (2013) Biophysical basis of the sound analog membrane potential that underlies coincidence detection in the barn owl. *Front Comput Neurosci.* 7: 102. 1-13
5. \*Hayashi Y, Tagawa Y, Yawata S, Nakanishi S, **Funabiki K.** (2012) Spatio-temporal control of neural activity in vivo using fluorescence microendoscopy. *Eur J Neurosci.* 36: 2722-32.
6. Ashida G, **Funabiki K.**, Kuokkanen PT, Kempter R, \*Carr CE. (2012) Signal-to-noise ratio in the membrane potential of the owl's auditory coincidence detectors. *J. Neurophysiol.* 108: 2837-45.

平成23-27年度 文部科学省科学研究費補助金「新学術領域研究(研究領域提案型)」  
**脳内環境：恒常性維持機構とその破綻**  
**研究成果報告書**

---

平成29(2017)年3月

領域代表者

高橋 良輔

京都大学

大学院医学研究科・教授

---

〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町54