

平成22年3月31日現在

研究種目：学術創成研究費
研究期間：2004～2008
課題番号：16GS0315
研究課題名（和文） オートファジー性神経細胞死の分子細胞生物学的研究
研究課題名（英文） Molecular mechanisms of autophagic neuron death
研究代表者
内山 安男（UCHIYAMA YASUO）
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号：10049091

研究成果の概要（和文）：新生仔マウスを用いた低酸素-脳虚血負荷モデルは、ヒト新生児の低酸素-虚血性脳症に類似する。しかし、これまでその傷害の実態は不明であった。私達は、オートファジーをできないマウスを用いて低酸素負荷実験を行ない、海馬錐体細胞の死が防御されることを示した。即ち、本研究で低酸素-脳虚血負荷による錐体細胞の死がオートファジー性によることを遺伝学的に初めて実証することができた。この結果は、治療手段を考える上で極めて重要である。

研究成果の概要（英文）：Hypoxia/ischemia (H/I) brain injury at birth is an important cause of cerebral palsy, mental retardation, and epilepsy. The H/I insult also causes energy failure, oxidative stress, and unbalanced ion fluxes, leading to high induction of autophagy in brain neurons. Induction of neuronal autophagy after H/I injury is generally considered neuroprotective, as it maintains cellular homeostasis. However, our recent results show that cell death of hippocampal pyramidal neurons following neonatal H/I injury is largely prevented by Atg7 deficiency. This is the first report that we are aware of providing direct evidence for autophagy-induced neuron death after neonatal mouse H/I brain injury, using mice that cannot execute autophagy specifically in CNS tissue. Thus, therapeutic strategies to inhibit autophagy-induced neuron death may prove beneficial in the treatment of both pediatric and adult H/I brain injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度	85,800,000	25,740,000	111,540,000
2005年度	84,300,000	25,290,000	109,590,000
2006年度	82,200,000	24,660,000	106,860,000
2007年度	62,400,000	18,720,000	81,120,000
2008年度	55,600,000	16,680,000	72,280,000
総計	370,300,000	111,090,000	481,390,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：オートファジー、神経細胞、リソソーム、カテプシン、脳虚血

1. 研究開始当初の背景

(1) オートファジーと細胞死

リソソームは酸性条件下で加水分解する酵素を含むオルガネラで、細胞内の不要なポリマーを生物活性のあるモノマーまで分解し、その多くは細胞内で再利用される。この分解系には、オートファジー（自食作用）が主役をなす。オートファジーは、生理的にも重要な現象であるが、飢餓、炎症等で誘導され、自らの構造を壊すことで細胞の生命を維持するように働く。しかし、胎生期の一部の神経細胞の死やある種の神経疾患による細胞死は、明らかにアポトーシスやネクローシスの像と異なり、細胞質にオートファゴソームが充満した形態で死に至る。この死は、リソソーム性/オートファジー性細胞死（2型神経細胞死；Clarke, P. (1991)）と呼ばれる。近年、多くの神経変性疾患でポリグルタミン鎖に代表されるように細胞内封入体の形成と細胞死との関係が報告されている。細胞内の不要なポリペプチド鎖は、可溶性であればユビキチン-プロテアソーム系で分解され、不溶性であればオートファジー（自食作用）によりリソソーム系で分解されることが予想される。実際、多くの神経細胞死でオートファジーが誘導される。しかし、その構造を正確に把握し、分子レベルでオートファゴソームであることを指摘した研究はない。

(2) 遅延型神経細胞死とオートファジーの誘導

私達は、小胞体ストレスとの関連性が高い、短時間脳虚血に伴う遅延型神経細胞死では、リソソーム/オートファジーが関与する積極的細胞死であることを指摘した (Nitatori et al., 1995)。また、オートファジー/リソソームに注目して、細胞死の分子機構をラット褐色細胞腫由来のPC12細胞で検討した結果、血清除去に基づくPC12細胞の細胞死には、カスパーゼ依存性の経路と独立して、オートファジーと、その下流でリソソームカテプシンDとBで制御される細胞死の経路が存在することを明らかにした (Shibata et al., 1998; Isahara et al., 1999)。

2. 研究の目的

本研究は、創造的・革新的・学際的学問領域を創成する研究を目指している。本研究は“オートファジー性細胞死”が実態としてあるのか、あればどのような意義があるのかという観点で、短時間脳虚血モデルや培養神経細胞系を用いて“リソソーム/オートファジー性神経細胞死の分子機構”を解明することを目的とする。

この研究においては、(1) ERストレスに基づくオートファジー性神経細胞死の存在の有無を、短時間あるいは低酸素脳虚血負荷後に生じる海馬錐体細胞死で検討し、(2) もし存在すれば、この細胞死はカスパーゼに依

存するか否か、さらに、(3) その死の分子機構に、特に、リソソームカテプシンDとBがどのように働くか、を中心に解析することを目指す。また、(4) カテプシンDは細胞死誘導活性があるが、その基質については不明である。それと同時に、(5) アルツハイマー病や神経変性疾患モデル動物（例えばリソソームカテプシン欠損マウス）を使って、オートファジーがどのように組み込まれているかを、形態学、免疫組織細胞化学法を用いて解析する。これによって、オートファジーが誘導される神経細胞の形態に共通する変化を理解することが期待される。さらに、(6) DNA マイクロアレイ法により、ラットの発生時期から、成長過程、老化に至る変化を解析し、DNA発現からみたオートファジー/リソソーム系の変化を解析する。

3. 研究の方法

(1) オートファジー関連遺伝子 Atg7 を臓器特異的に欠損したマウスを用いた研究
田中啓二博士（臨床医学研究所）との共同研究。Atg7はオートファゴソーム形成に必須のタンパク質LC3のC末端グリシンにリン脂質を付加するためのE1酵素で、E2酵素のAtg3と共にLC3-I（細胞質型）をLC3-II（膜結合型）に変換する。

①脳で特異的にAtg7を欠損するマウス

②肝臓で特異的にAtg7を欠損するマウス

③肝臓および脳におけるAtg7とp62のダブル欠損マウス、を用いて、超微形態的解析および光学顕微鏡レベルの免疫組織細胞学的解析を行う。

(2) オートファジー性（神経）細胞死の解析

①低酸素脳虚血(HI)負荷実験：生後7日齢と8週齢のマウスの片側総頸動脈を結紮し、1時間放置後、7日齢では45分間、8週齢では35分間のHI負荷をかける。3、8、12、24、72時間後に、組織解析と生化学的解析のために海馬組織を採取。同様に、Atg7を中枢で欠損するマウスおよびカスパーゼ-3、CAD（カスパーゼ依存性DNase, CAD）をそれぞれ欠損するマウスを用いて同様の解析を行なう。

②冷保存/移植再灌流後の肝不全に関する研究：24時間冷保存し、同種ラットに肝移植して再灌流すると、移植肝は肝不全に陥り、ほぼ全例で6時間から24時間以内に個体死に陥る。この過程を検討したところ、移植後早期からオートファジーが誘導されることから、オートファジーあるいはリソソームカテプシンの抑制と肝細胞死および個体死との関係を解析する。24時間の冷保存後、移植再灌流15、30、60、120分後に組織解析と生化学的解析用移植片を採取する。

③TNF- α /actinomycin D(TNF/ActD)刺激による初代培養肝細胞死の分子機構：本研究は、オートファジー性細胞死の分子機構を詳細に検討するために実施する。近年、TNF/ActD

の誘導による細胞死は、カスパーゼ依存性であり、その過程でリソソームから漏出したカテプシンBが関与すると報告されている。私達は、リソソーム酵素が細胞質に出ることや、カテプシンBのみが関与することはあり得ないと考え、カテプシンLを欠損するマウスおよび肝細胞だけでカテプシンDを欠損するコンディショナル欠損マウスを作製して、初代培養肝細胞を用いて、TNF/ActD 刺激後の細胞死をMTTアッセイ法で検討する。これまでリソソーム/オートファジーの経路で細胞死を制御する経路をCAD欠損するマウス肝細胞や各種インヒビターを用いて検討する。

(3) リソソームプロテアーゼ/オートファジーに関する研究

① 神経性セロイドリポフスチン蓄積症 (NCL)、アルツハイマー病 (AD) などとオートファジーに関する解析: リソソームカテプシンDを欠損するマウスはNCLのモデルマウスで、神経細胞にリソソームが蓄積する。同様に、カテプシンBとLをダブルで欠損するマウスもリソソームが蓄積することを見いだした。これらマウスの神経細胞にどのようにリソソームが蓄積するかを形態学的に解析する。さらに、カテプシンDとAtg7あるいはp62とダブルで欠損するマウスの作製と形態学的解析を行う。

② カテプシンDのコンディショナル欠損マウス: カテプシンDを脳においてのみ欠損するマウスを作成し形態学的に解析する。

(3) LC3欠損マウスの作製: LC3BとLC3Aをそれぞれ欠損するマウスの作成・解析を行う。

(4) Atg4、9に関する研究: Atg4と9Aの抗体を作製する。各組織における発現について生化学的、形態学的研究を行う。

(5) カテプシンDの基質に関する研究: カテプシンDの基質をカテプシンD欠損マウスと対照群の脳を使って解析する。米国のアラバマ大学のグループとの共同研究。

(6) LC3分子と脂肪代謝: LC3Bの膜型分子は脂肪滴に局在することを見いだした。そこで、この分子と脂肪滴との関係を肝臓特異的Atg7欠損マウスの肝細胞、野生型マウスの肝細胞と心筋細胞において、LC3Bと脂肪滴との関係を生化学的、形態学的に解析する。

(7) DNAマイクロアレイによる解析: ラット胎仔から老齢ラットに至るまでの様々な臓器600検体を用いた解析を行う。

4. 研究成果

(1) Atg7遺伝子の臓器特異的欠損マウスの解析

① 脳特異的欠損: ユビキチンがオートファジーを介するタンパク質分解にも関与し、オートファジーができないと神経変性疾患に陥ることが分かった。ユビキチンタンパク質複合体が封入体として神経細胞や軸索に蓄積し、神経変性疾患を考える上で非常に重要なことが明らかとなった。ユビキチン凝集体は時間と共に増えるが、神経細胞の脱落は凝集体の量に反比例し、凝集体を形成することで細胞の死を防いでいる、と考えられる。

② 肝臓での解析: 肝細胞の腫大による肝肥大

と肝炎に陥る。オートファゴソーム形成に小胞体が重要であること、分解されない変形したミトコンドリア、過剰のペルオキシソームが認められることが明らかとなった。肝細胞においてもユビキチン複合体が認められ、多機能タンパク質p62もこの凝集体に取り込まれる。p62を更に欠損させたダブルノックアウトマウスでは、肝細胞の腫大化や肝炎が治まる。しかし、ペルオキシソームなどの量は依然多く、不要なオルガネラの分解が起きていないことが分かった。中枢でもユビキチン凝集体の数も有意に減少するが、変性を抑制できないことが分かった。

(2) オートファジー性神経細胞死:

① 生後7日齢のマウスの片側総頸動脈を結紮し、45分間のHI負荷をかけると、24時間以内に海馬領域を中心に錐体細胞死が引き起こされる。これまで様々な原因が提示されてきたが、未だ解決をみない。海馬CA1錐体細胞層でみると、ほとんどはカスパーゼ非依存性の細胞死で、オートファジーのマーカーである膜型のLC3が増え、免疫染色で陽性顆粒(カテプシンD陽性)が増加する。カスパーゼ-3やCADを欠損するマウスでは全く錐体細胞が保護されることはなかった。特に、CAD欠損マウスでは、患側海馬でもゲノムDNAの電気泳動で、ラダーが見られた。一方、脳でAtg7を欠損するマウスにHI負荷をかけたところ、4例で海馬錐体領域の一部に細胞死を認めただけで他の13例では全く細胞死が認められなかった。負荷後7日目で海馬の萎縮度を調べると、対照群では50%の萎縮が起こるのに比し、Atg7欠損マウスの萎縮度は14%であった。このことは、ERストレスに基づくオートファジーによって細胞死が誘導されることを示している。特に、Atg7欠損マウスは生後4週以降で個体死を起こすため成獣のHI負荷モデルでは使えなかったが、成獣の野生型マウスのHI負荷モデルにおけるオートファジーの誘導、カスパーゼの活性化が起きないこと、細胞死の像はオートファジー性であること、成獣のカスパーゼ-3ないしCAD欠損マウスにおいて全く保護作用がないこと、を示したことは、治療手段を考える上で非常に重要であると思われる。これまでオートファジーは細胞保護に働くと考えられてきたが、本研究結果は、オートファジーが細胞死の原因になることを遺伝学的に世界で初めて示すものであり、この分野で非常に高いインパクトを与えたと考えている。2007年のアメリカ神経科学会の学術集会で、内山を中心にミニシンポジウムが組まれ、その発表に1000人の観客が集まったことは、注目度が高いことを示している。

② ラット移植肝の長期冷保存-移植再灌流後の肝不全で死に至るが、再灌流によって移植肝細胞にオートファジーが誘導されること分かった。そこで、Wortmanninなどのオートファジーやカテプシンの阻害剤でその活性を抑制すると、細胞死や移植後肝不全による個体死が抑制されることを証明した。

③ 現在、初代培養肝細胞にTNF/ActD刺激実験より、アポトーシスの経路と独立してオー

トファジーとその下流にリソソームカテプシン、DNaseII が関与する細胞死の経路があることを示すことができ、現在、論文をまとめている。

これらの結果は、これまで2型細胞死と言われたオートファジー性細胞死が、実際に存在し、その経路にはリソソームカテプシンとDNaseII が関与することを示している。リソソームの酵素がどのように細胞の核にアクセスするかは、現在不明であるが、本学術創成研究の研究費補助によって全く新しい研究分野を創成できたと考えている。さらに、本研究の結果は、オートファジーやリソソームカテプシンを阻害する物質を探索することで、新しい虚血性疾患を治療する手段を開発できることを示している。

(3) リソソームカテプシン欠損に基づくリソソーム蓄積症の解析

リソソームカテプシンDあるいはBとLを欠損するマウスでは、NCLと同様の症状を呈することを初めて報告した。その後、2006年になってカテプシンDの低活性を示す若年者が見つかり、カテプシンDがNCLの10番目の遺伝子(CLN10)として認められた。このことで、内山は2009年の国際NCL学会のInvited Speakerとして招待された。このリソソーム蓄積にはオートファジーが関与することを私達は報告し、現在、カテプシンDとAtg7のダブル欠損マウスを作製し、これを証明できた(論文作製中)。

(4) カテプシンDの基質

カテプシンDの基質を解析していたが、米国のアラバマ大学のグループとの共同研究で、カテプシンDを欠損するマウスの脳では、 α シヌクレインが蓄積することを示した。

(5) Atg4, Atg9Aの解析

これらのタンパク質産物の抗体を作製し、組織分布を解析。両者は神経系に高い発現が見られ、神経細胞に高い発現が見られる。Atg4については報告済みであるが、Atg9Aは現在細胞内の分布を解析中であるが、小胞体における分布も見られ、オートファゴソーム形成の起点との関係で検索を進めている。さらに、神経組織においては、Atg9Aは神経細胞体だけでなく軸索やシナプス終末に豊富に分布することが明らかとなった。

(6) LC3のC末端修飾と脂肪滴形成

私達は、LC3の解析を進める中で、膜結合型のLC3が脂肪滴に局在することを見いだした。そこで、Atg7欠損マウスを解析したところ、同マウスの肝細胞では脂肪滴形成が抑制されることを見いだしたことを既に報告した。しかし、この結果はごく最近Nature誌に出た結果と全く逆の結果であり、オートファジーによって脂肪滴が壊されると報告されている。私達は、この点を十分検討しており、さらに、LC3Bが関与することも確かめている。この発見は、LC3が脂肪滴の成長に必須であること、オートファゴソーム形成に際しての膜の供給に関与することを示しているため、きわめて重要な結果と考えている。

(7) DNAアレイによる解析

ラット発生期、生後発達、加齢等で各組織の

遺伝子発現を600以上の検体で解析した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計60件)

① Shibata M, Yoshimura K, Tamura H, Ueno T, Nishimura T, Inoue T, Sasaki M, Koike M, Arai H, Kominami E, Uchiyama Y (2010) LC3, a microtubule-associated protein1A/B light chain3, is involved in cytoplasmic lipid droplet formation. BBRC 393:274-279

② Tamura H, Shibata M, Koike M, Sasaki M, Uchiyama Y (2010) Atg9A protein, an autophagy-related membrane protein, is localized in the neurons of mouse brains. J Histochem Cytochem 58: 443-453

③ Yagita Y, Horie K, Yamanaka I, Koinuma S, Shigeyoshi Y, Kawakami K, Takeda J, Uchiyama Y (2010) Chondrogenesis during the ES cell differentiation in vitro. PNAS 107:3846-3851

④ Shibata M*, Yoshimura K*, Furuya M, Koike M, Ueno T, Komatsu M, Arai H, Tanaka K, Kominami E, Uchiyama Y (2009) The MAP1-LC3 conjugation system is involved in lipid droplet formation. BBRC 382: 419-423 (* equally contributed)

⑤ Nada S*, Hondo A*, Kasai A*, Koike M*, Saito K, Uchiyama Y, Okada M (2009) The novel lipid raft adaptor p18 controls endosome dynamics by anchoring the MEK-ERK pathway to late endosomes. EMBO J 28: 477-489 (* equally contributed)

⑥ Gotoh K, Lu Z, Morita M, Shibata M, Koike M, Waguri S, Dono K, Doki Y, Kominami E, Sugioka A, Monden M, Uchiyama Y (2009) Participation of autophagy in the initiation of graft dysfunction after rat liver transplantation. Autophagy 5:351-360

⑦ Uchiyama Y, Shibata M, Koike M, Yoshimura K, Sasaki M (2008) Autophagy - Physiology and Pathophysiology. Histochem Cell Biol 129: 407-420

⑧ Uchiyama Y, Koike M, Shibata M (2008) Autophagic neuron death in neonatal brain ischemia/hypoxia. Autophagy 4:404-408

⑨ Koike M, Shibata S, Tadakoshi T, Gotoh K, Komatsu M, Waguri S, Kawahara N, Kuida K, Nagata S, Kominami E, Tanaka K, Uchiyama Y (2008) Inhibition of autophagy prevents hippocampal pyramidal neuron death after hypoxic-ischemic injury. Am J Pathol 172: 454-469

⑩ Qiao L, Hamamichi S, Caldwell KA, Caldwell GA, Yacoubian TA, Wilson S, Xie Z-L, Speake LD, Parks R, Crabtree D, Liang Q, Crimmins S, Schneider L, Uchiyama Y, Iwatsubo T, Zhou Y, Peng L, Lu YM, Standaert DG, Walls KC, Shacka JJ, Roth KA, Zhang J (2008) Lysosomal enzyme cathepsin D protects against alpha-synuclein aggregation and toxicity. Mol Brain 1:17

⑪ Sou YS, Waguri S, Iwata JI, Ueno T, Fujimura T, Hara T, Sawada N, Yamada A, Mizushima N, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka

- K, Komatsu M (2008) The Atg8 conjugation system is indispensable for proper development of autophagic isolation membranes in mice. *Mol Biol Cell* 19: 4762-4775
- ⑫Maeda Y, Ide T, Koike M, Uchiyama Y, Kinoshita T (2008) GPHR is a novel anion channel critical for acidification and functions of the Golgi apparatus. *Nat Cell Biol* 10: 1135-1145
- ⑬Mori Y*, Koike M*, Moriishi E, Kawabata A, Tang H, Oyaizu H, Uchiyama Y, Yamanishi K (2008) Human herpesvirus-6 induces MVB formation and virus egress occurs via an exosomal release pathway. *Traffic* 9:1728-1742 (* equally contributed)
- ⑭Oppenheim RW, Blomgren K, Ethell DW, Koike M, Komatsu M, Prevette D, Roth KA, Uchiyama Y, Vinsant S, Zhu C (2008) Developing postmitotic mammalian neurons in vivo lacking Apaf-1 undergo programmed cell death by a caspase-independent, nonapoptotic pathway involving autophagy. *J Neurosci* 28: 1490-1497
- ⑮Suzuki C, Takabatake Y, Tanaka H, Koike M, Shibata M, Uchiyama Y, Takahara S, Imai E, Isaka Y (2008) Participation of autophagy in renal ischemia/reperfusion injury. *BBRC* 368:100-106
- ⑯Klionsky DJ et al. (alphabetical) 220 番目 (2008) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 4: 151-175
- ⑰Hida T, Ikeda H, Kametaka S, Akazawa S, Kohsaka S, Ebisu S, Uchiyama Y, Waguri S (2007) Specific depletion of GGA2 causes cathepsin D missorting in HeLa cells. *Arch Histol Cytol* 70:303-312
- ⑱Miyaniishi M, Tada K, Koike M, Uchiyama Y, Kitamura T, Nagata S (2007) Identification of Tim-4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature* 450: 435-439
- ⑲Komatsu M, Waguri S, Koike M, Soul Y, Ueno T, Hara H, Mizushima N, Iwata J, Ezaki J, Murata S, Hamayaki J, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Yanagawa T, Uwayama J, Warabi E, Yoshida H, Ishii T, Kobayashi A, Yamamoto M, Yue Z, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka T (2007) Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* 131: 1149-1163
- ⑳Yamasaki R, Zhang J, Koshiishi I, Suniarti DFS, Wu Z, Peters C, Schwake M, Uchiyama Y, Kira J, Saftig P, Utsumi H, Nakanishi H (2007) Involvement of lysosomal storage-induced p38 MAP kinase activation in the overproduction of nitric oxide by microglia in cathepsin D-deficient mice. *Mol Cell Neurosci* 35: 573-584
- ㉑Nakahara M, Nagasaka A, Koike M, Uchida K, Kawane K, Uchiyama Y, Nagata S (2007) Degradation of nuclear DNA by DNase II-like acid DNase in cortical fiber cells of mouse eye lens. *FEBS J* 274: 3055-3064
- ㉒Komatsu M, Ueno T, Waguri S, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K (2007) Constitutive autophagy: vital role in clearance of unfavorable proteins in neurons. *Cell Death Diff* 14:887-894
- ㉓Shacka JJ, Klocke BJ, Young C, Shibata M, Olney JW, Uchiyama Y, Saftig P, Roth KA (2007) Cathepsin D Deficiency Induces Persistent Neurodegeneration in the Absence of Bax-Dependent Apoptosis. *J Neurosci*, 27: 2081-2090
- ㉔Shacka JJ, Lu J, Xie ZL, Uchiyama Y, Roth KA, Zhang J (2007) Kainic acid induces early and transient autophagic stress in mouse hippocampus. *Neurosci Lett*. 414: 57-60
- ㉕Zhu JH, Horbinski C, Guo F, Watkins S, Uchiyama Y, Chu CT (2006) Regulation of autophagy by extracellular signal regulated protein kinases during 1-methyl-4-phenylpyridinium injury. *Am J Pathol* 170:75-86
- ㉖Waguri S, Tomiyama Y, Hida T, Sakai N, Taniike M, Wakasugi M, Ebisu S, Uchiyama Y (2006) The luminal domain participates in the endosomal trafficking of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *Exp. Cell Res*. 312: 4090-4107
- ㉗Yoshimura K, Shibata M, Koike M, Gotoh K, Fukaya M, Watanabe M, Uchiyama Y (2006) Effects of RNA interference of Atg4B on the limited proteolysis of LC3 in PC12 cells and expression of Atg4B in various rat tissues. *Autophagy* 2: 200-208
- ㉘Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration. *Nature* 441: 880-884
- ㉙Zhu C, Xu F, Wang X, Shibata M, Uchiyama Y, Blomgren K, Hagberg H (2006) Different apoptotic mechanisms are activated in male and female brains after neonatal hypoxia-ischaemia. *J Neurochem*, 96: 1016-1027
- ㉚Shacka JJ, Klocke BJ, Shibata M, Uchiyama Y, Datta G, Schmidt RE, Roth KA (2006) Bafilomycin A1 Inhibits Chloroquine-Induced Death of Cerebellar Granule Neurons. *Mol Pharmacol* 69: 1125-1136
- ㉛Koike M, Shibata M, Waguri S, Yoshimura K, Tanida I, Kominami E, Gotow G, Peters C, Figura Kv, Mizushima N, Saftig P and Uchiyama Y (2005) Participation of autophagy in storage of lysosomes in neurons from mouse models of neuronal ceroid-lipofuscinoses (Batten disease). *Am J Pathol* 167:1713-1728
- ㉜Yu WH, Cuervo AM, Kumar A, Peterhoff CM, Schmidt SD, Lee JH, Mohan PS, Mercken M, Farmery MR, Tjernberg LO, Jiang Y, Duff K, Uchiyama Y, J Näslund, Mathews PM, Cataldo AM, Nixon RA (2005) Macroautophagy—a novel amyloid- β (Ab) peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 171: 87-98
- ㉝Yoshida H, Kawane K, Koike M, Mori Y, Uchiyama Y, Nagata, S (2005)

Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells. *Nature* 434: 754-758

③ Shimizu T, Hayashi Y, Yamada J, Zhang J, Yamasaki J, Ukai K, Koike M, Mine K, Figura Kv, Peters C, Saftig P, Fukuda T, Uchiyama Y, Nakanishi H (2005) Proteolytic Degradation of Glutamate Decarboxylase Mediates Disinhibition of Hippocampal CA3 Pyramidal Cells in Cathepsin D-deficient Mice. *J Neurochem* 94:680-690

④ Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, Ezaki J, Mizushima N, Ohsumi Y, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K, Chiba T (2005) Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol* 169: 425-434

⑤ Lu Z, Dono K, Gotoh K, Shibata M, Koike M, Marubashi S, Miyamoto A, Takeda Y, Nagano H, Umeshita K, Uchiyama Y, Monden M (2005) Participation of autophagy in the degeneration process of rat hepatocytes after transplantation following prolonged cold preservation. *Arch Histol Cytol* 68: 71-80

⑥ Zhu C, Wang X, Xu F, Bahr BA, Shibata M, Uchiyama Y, Hagberg H, Blomgren K (2005) The influence of age on apoptotic and other mechanisms of cell death after cerebral hypoxia-ischemia. *Cell Death Differ* 12:162-176

⑦ Yu WH, Kumar A, Peterhoff C, Shapiro Kulnane L, Uchiyama Y, Lamb BT, Cuervo AM, Nixon RA (2004) Autophagic vacuoles are enriched in amyloid precursor protein-secretase activities: implications for beta-amyloid peptide over-production and localization in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 2531-2540.

⑧ Tomiyama Y, Waguri S, Kanamori S, Kametaka S, Wakasugi M, Shibata M, Ebisu S, Uchiyama Y (2004) Early-phase redistribution of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor by U18666A treatment in HeLa cells. *Cell Tissue Res* 317: 253-264

⑨ Hanayama R, Tanaka M, Miyasaka K, Aozasa K, Koike M, Uchiyama Y, Nagata S (2004) Autoimmune Disease and Impaired Uptake of Apoptotic Cells in MFG-E8-Deficient Mice. *Science* 304:1147-1150

[学会発表] (計 20 件)

① Uchiyama Y: Involvement of autophagy in pathogenesis of neuronal ceroid lipofuscinosis. 12th International Congress on Neuronal Ceroid Lipofuscinoses (NCL) in Hamburg, Germany, 3-6 June 2009

② Uchiyama Y: Impairment and acceleration of autophagy result in neurodegeneration. The 5th Asia Pacific International Congress of Anatomists. Tehran, May 16-19, 2008

③ Uchiyama Y: p62/A170/SQSTM1, a binding partner of ubiquitin and LC3, and lysosomal storage disorder. *Neuroscience* 2008 in the 31st Annual Meeting in Tokyo,

July 9-11, 2008

④ Uchiyama Y: Impairment and acceleration of autophagy: neurodegeneration. In the 20th International Symposium on Morphological Science in Timisoara, Sep 12-17, 2008 (Plenary Lecture)

⑤ 内山安男: オートファジー/リソソーム制御防止の分子細胞生物学的研究. 平成 20 年度顕微鏡学会瀬藤賞受賞講演 2008/10/17 (千葉大学)

⑥ Uchiyama Y: Impairment and acceleration of autophagy result in neurodegeneration. In: Neuronal macroautophagy, autophagic stress, and neurological diseases. *Neuroscience* 2007, Dec 3-7 in San Diego

⑦ Uchiyama Y: Involvement of autophagy in neuron death of neonatal mouse brains after hypoxic-ischemic injury. In: The 4th International Symposium of Autophagy. Oct 1-5, 2006 in Mishima

⑧ Uchiyama Y, Shibata M, Koike M: Participation of autophagy in storage of lysosomes in neurons from mouse models of neuronal ceroid-lipofuscinoses (Batten Disease). International conference on serine-carboxyl peptidases and related enzymes in Kyoto. (Nov. 10, 2005)

⑨ Uchiyama Y: Roles of lysosomal proteinases in autophagic cell death. 2005 Gordon Research Conference on "Autophagy in Stress, Development & Disease" in Il Ciocco. (April 24-29, 2005)

⑩ Uchiyama Y: cathepsin D deficiency induces caspase dependent and independent neuron death. Symp-55, 16th International congress of the IFAA, August 22-27, 2004 [図書] (計 4 件)

① Uchiyama Y, Koike M, Shibata M (2010) Autophagy and cell death. In: *Molecular imaging for integrated medical therapy and drug development*. Springer Japan. Eds. Nagara Tamaki and Yuji Kuge, 176-188.

② Uchiyama Y, Koike M, Shibata M, Sasaki M (2009) Autophagic neuron death. In: *Methods Enzymol. Vol.453 (Autophagy in Disease and Clinical Applications, Part C)* Ed. Daniel J. Klionsky, 33-51.

[その他]

ホームページ等

http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/lab/shinkei_kozo/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内山 安男 (UCHIYAMA YASUO)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号: 10049091

(2) 研究分担者

和栗 聡 (WAGURI SATOSHI)
福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 30244908
柴田 昌宏 (SHIBATA MASAHIRO)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号: 10343253
小池 正人 (KOIKE MASATO)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号: 80347210

(3) 連携研究者 なし