

長寿科学総合研究事業班

平成10年度 研究報告書

平成11年3月31日

班長：丸山 征郎

(鹿児島大学医学部臨床検査医学)

長寿科学総合研究事業班

平成 10 年度 研究報告書

## まえがき

老化に伴い、種々の臓器は機能低下を来す。これは高齢者の日常の生活のクオリティを損ない、その個人のみか、社会にも大きな損失となる。従って老化に伴う生体各臓器の機能低下の原因を明らかにし、その防止を計り、臓器の機能を温存することは重要かつ、緊急な課題となっている。一方エイジングで機能低下に陥った臓器の組織像は各臓器毎に異なっており、機能低下のプロセスが必ずしも同一の機序ではないことを示唆している。

本研究班では、加齢に伴う臓器の機能低下の様式と診断法を考案して、その予防策を模索し、最終的には高齢者の臓器の機能低下防止策を考案することを目的とした。

平成 10 年 3 月 31 日

長寿科学総合研究事業班  
班 長 丸山 征郎

## = 目 次 =

- 1) まえがき . . . 班長 丸山征郎
- 2) 平成 10 年度研究班構成員名簿
- 3) 平成 10 年度総括研究報告書 . . . 班長 丸山征郎
- 4) 平成 10 年度分担研究報告書 . . . 班員 丸山征郎  
. . . 班員 清野 進  
. . . 班員 宮園浩平  
. . . 班員 中島利博  
. . . 班員 一瀬白帝  
. . . 班員 鄭 忠和  
. . . 班員 茆原順一
- 5) 平成 10 年度研究成果の刊行に関する一覧表

# 研究班構成員名簿

◇◆平成10年度 長寿科学総合研究事業研究者名簿◆◇

研究課題名 : 老年病分野に関する研究 (課題番号) H10-長寿-006						
区分	氏名	ふりがな	所属施設名及び職名(役職)	所属施設所在地	電話番号	FAX番号
主任	丸山 征郎	まるやま いくろう	鹿児島大学医学部臨床検査医学講座(教授)	〒890-8520 鹿児島市桜ヶ丘 8-35-1	099-275-5437	099-275-2629
分担	清野 進	せい の すずむ	千葉大学大学院医学研究科高次機能系統合機能学講座分子機能制御学(教授)	〒260-8676 千葉市中央区亥鼻 1-8-1	043-226-2189	043-226-2191
分担	宮園 浩平	みやぞの こうへい	(財)癌研究会癌研究所生化学(部長)	〒170-0012 東京都豊島区上池袋 1-37-1	03-3918-0111	03-3918-0342
分担	中島 利博	なかじま としひろ	筑波大学応用生物化学系(講師)	〒305-8572 つくば市天王台 1-1-1	0298-53-6048	0298-53-6048
分担	一瀬 白帝	いちのせ あきただ	山形大学医学部分子病態学講座(教授)	〒990-2331 山形市飯田西 2-2-2	0236-33-1122	0236-28-5280
分担	鄭 忠和	てい ちゅうわ	鹿児島大学医学部第一内科学講座(教授)	〒890-8520 鹿児島市桜ヶ丘 8-35-1	099-275-5316	099-265-8447
分担	荏原 順一	ちはら じゅんいち	秋田大学医学部臨床検査医学講座(教授)	〒010-8543 秋田市本道 1-1-1	0188-33-1166	0188-36-2624

経理事務担当者

区分	氏名	ふりがな	所属施設名及び職名(役職)	所属施設所在地	電話番号	FAX番号
経理	酒匂 和子	さこう かずこ	鹿児島大学医学部臨床検査講座(秘書)	〒890-8520 鹿児島市桜ヶ丘 8-35-1	099-275-5437	099-275-2629

# 総括研究報告書

## 老化に伴う臓器機能不全の分子病態に関する研究

丸山 征 郎  
(鹿児島大学医学部臨床検査医学・教授)

加齢に伴い、種々の臓器は機能低下に陥り、これが個々人の Quality of Life を損なう他、社会的にも大きな損失を与える。本研究プロジェクトは、1) 加齢に伴う各重要臓器の機能の低下を評価し、2) その分子病態を解明し、3) 各臓器の機能的低下の特殊性と普遍性を明らかにし、4) 最終的には加齢に伴う臓器の機能低下の防止策、治療法を立案することである。今回はこれらの点に関して、心-肺、膵、血管（凝固線溶）という臓器毎の視点を縦軸に、細胞の転写、老化という視点を縦軸に解析した。心臓の左室拡張能は加齢とともに徐々に低下することが、肺は支持組織が弛緩して、いわゆる「弛緩肺」に陥ることが判明した。前者に関しては、TGF- $\beta$ からのシグナルは、Smad 3,4 と共同して、伝達され、PAI-1 の発現を制御していることが判明した。発現された PAI-1 を介して、細胞外マトリックスの分解などが制御されて、加齢に伴う臓器の線維化などが調節されているものと想定される。後者に関しては、ヒト気道上皮が培養細胞系では Insulin like Growth Factor-1(IGF-1)に应答して増殖したことより、今後の治療を視座にいたれた研究の展望が開けた。膵からのインスリン分泌に関しては、インスリン分泌の鍵を握る  $K_{ATP}$  チャネル欠損マウスを作成し、加齢や肥満の影響を調べたところ、肥満や加齢で糖尿病発症が促進した。凝固線溶/血管系では atherogenic lipoprotein である Lp(a), F.XIII, plasminogen について調べた。プレリミナリーな結果では Lp(a)の発現調節には多型性があり、発現の高いものに、加齢というあと一つのリスクファクターが加算されると、中心動脈血栓や脳梗塞が増加することが示唆された。臍帯静脈由来の血管内皮細胞 (HUVEC)はテロメラーゼを発現していたが、鼻粘膜由来微小循環系由来の内皮細胞には発現していなかった。SV40 でトランスフォームして、不死化した細胞にも発現していなかった。これより、HUVEC がテロメラーゼを発現している理由はこれが胎児由来のためと考えられる。動脈硬化巣では転写統合因子 CBP/p300 のアセチルトランスフェラーゼ活性により、核内にアセチル化したタンパクが集積していることが判明し、hypernuclear acetylation (HNA) と命名した。

### A. 研究目的

加齢に伴い、種々の臓器は機能低下に陥り、これが個々人の quality of life を損なうほか、社会的にも大きな損失となっている。今後の未曾有の高齢化社会を考えると、加齢に伴う臓器の機能障害を防ぎ、個々人の健やかな老後を保証することは緊急の医学的課題である。今回のプロジェクトは加齢に伴う諸臓器の機能低下の分子細胞病態を明らかにして、機能低下の防止策を立案することである。縦軸としての視点から臓器として、1) 心臓、肺、を選び、横軸としての視点から、2) 転写制御、3) 細胞寿命制御、4) 細胞外マ

トリクス産生制御、5) 凝固線溶・血管機能、などの面から検討し、加齢に伴う諸臓器の機能低下の分子病態を明らかにし、その防止策を立案する。

### B. 研究方法

1. 加齢と心臓の機能：60歳以上の健常者117名と中年層、若年層の心機能を超音波心断層装置で調べた。  
2. 気道上皮の再生能と増殖因子：肺の機能が加齢とともに弛緩性となっていくのを確かめたので、次に気管支鏡下にバイオプシー目的で得たサンプルから気管支上皮細胞を培養して、IGF-1 に対する応答性を検討した。



3.加齢とインスリン分泌の関係:インスリン分泌のキーファクターとなる $K_{ATP}$ チャンネルをノックアウトしたマウスを使い、加齢と肥満の影響を調べた。

4.加齢と血管・凝固/線溶系:プラスミノゲン遺伝子の5プライム側の遺伝子増幅産物を制限酵素で切断してタイプの決定を行った。Lp(a)はその分子量からアイソフォームを決定した。

5.内皮細胞におけるテロメラーゼの発現と細胞レベルの老化:内皮細胞のテロメラーゼの活性を *teromeric RNA amplification protocol*(TRAP) で解析した。内皮細胞はヒト臍帯静脈由来のもの(HUVEC)、HUVECをSV40でトランスフォームして不死化したもの(HUVE-SV01)、ヒト鼻粘膜より樹立した内皮細胞株などを用いた。

6.TGF- $\beta$ は組織の線維化、リモデリングに関わることが判明している。そこでTGF- $\beta$ のシグナル伝達を明らかにするため、シグナルに関わる因子Smad

2, Smad3, Smad4 およびこれらのミュータントをCOS細胞に導入し、免疫沈降法、イムノブロットング法などで、リン酸化、タンパク同士の結合などを調べた。

7.転写統合装置CBP/RNAヘリケースAの機能がどのように血管病変の成立に関わっているのかを検討した。これにはアセチル化リジンに対する抗体を作成し、動脈硬化病変を染色した。またトロンビン刺激した血管平滑筋細胞のヒストンアセチルトランスフェラーゼ(HAT)活性を測定した。

### C. 研究結果

1.加齢とともに左室拡張能、末梢血管予備能が低下することが明らかになった。

2.肺は加齢とともにその支持組織が弛緩して機能が低下するが、気道上皮細胞はIGF-1に対して応答したので、今後動物などでの試みが期待された。

3. $K_{ATP}$ チャンネル欠損マウスでは加齢や肥満とともにインスリン分泌が低下した。

4.アポリポプロテイン(a)の濃度が高いものが脳梗塞、網膜中心動脈などの動脈血栓に多く、アポリポプロテイン(a)がこれらの危険因子であることが明らかになった。

5.ヒト臍帯静脈由来の内皮細胞はテロメラーゼ活性を有していたが、その他の内皮細胞にはテロメラーゼ活性はなかった。テロメラーゼ活性はジャイレースインヒビターで抑制しえた。

6.TGF- $\beta$ からのシグナルは細胞内ではSmad3,Smad4が共同して伝達され、plasminogen activator inhibitor type

1(PAI-1)の発現を強め、これがプラスミンの生成を制御して、マトリックスの分解の抑制、組織の線維化につながる可能性が浮かび上がってきた。

7.動脈硬化巣では増殖した血管平滑筋細胞の核内にアセチル化したタンパクが集積しているのが認められた(これをHypernuclear Acetylation, HNA)と命名した。そしてトロンビン刺激でHAT活性が上昇し、*in vivo*の系を再現しえた。

### D. 考察

加齢に伴う諸臓器の機能低下は必ずしも基本的な共通の基盤があるわけではない。例えば、心臓の場合には加齢とともに拡張能の低下、末梢血管予備能の低下が認められた。これは心血管のリモデリングや線維化が関係しているものと考えられるが、詳しい分子細胞メカニズムは今後の問題として残った。肺の場合は、肺弛緩が起こるが、これは肺支持組織の弛緩によるものである。しかし*in vitro*の実験系でIGF-1で気道上皮細胞が増殖したことから、今後の展開が期待される。

インスリンの分泌に重要な役割を果たす $K_{ATP}$ チャンネルノックアウトマウスを使った実験では、加齢あるいは肥満とともにインスリン分泌の低下が認められた。今後この分子細胞機構の解明をめざしたい。

LP(a)の高値は独立した動脈血栓のリスクファクターと見なされているが、これは中心動脈血栓の場合にも当てはまった。おそらく糖尿病や高脂血症などのリスクファクターが加わるとさらにこのリスクは増大するものと考えられ、今後それらとの関係を検討予定である。

ヒトは血管とともに老いると言われており、事実臨床統計では、脳血管、心血管の血栓の一番のリスクファクターは実は加齢である。しかしそのメカニズムに関しては不明である。そこでこれを解明するために、血管内皮細胞と老化の問題をテロメラーゼ活性の面から検討した。細胞不死が即テロメラーゼ(+)ではなかったが、その逆、すなわちテロメラーゼ(+)の細胞は細胞の寿命が長かった。

今回TGF- $\beta$ の細胞内のシグナルの一部が明らかになった。Smadファミリーの組み合わせにより、細胞内シグナルが変わるので、今後各臓器の加齢変化の違いがシグナル伝達レベルで解明しうる可能性が出てきた。

また動脈硬化巣ではアセチルトランスフェラーゼ活性が上昇し、細胞核内はHyper nuclear acetylation(HNA)とも言う状態になっていることが判明した。そし

てその原因の一つとして、トロンピンが考えられた。

## E. 結論

各臓器の加齢に伴う機能低下は必ずしも同一の基盤によるものではないことが、例えば心と肺を取り上げても明らかになった。動物モデルを使った場合の膵臓では加齢とともにインスリンの分泌が低下するのが観察された。TGF  $\beta$ からのシグナルの違いは細胞内 Smad システムの違いによる可能性も考えられた。またテロメラーゼの活性と細胞レベルの寿命は必ずしも 1:1 の対応はなしていないことがわかった。Lp (a) の高値は網膜中心動脈血栓症のリスクファクターでもある。

動脈硬化では血管平滑筋細胞の Hyper Nuclear Acetylation ともいふべき現象が観察されたが、これは血管壁細胞では活発な転写系の亢進があることを示している。

これらのことから加齢に伴う臓器の機能低下にも細胞レベル、臓器レベルで相は多彩であることが示された。今後これらを分子・細胞レベルで統一的に理解する理論が必要であろう。

次年度からこれらのことを課題として取り組みたい。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1.N.Maeno.,S.Takei.,K.Masuda.,H.Akaike.,K.Matsuo.,I.Kitajima.,I.Maruyama., and K.Miyata. Increased Serum Levels of Vascular Endothelial Growth Factor in Kawasaki Disease.Pediatric Research 1998;44(4):596-599.
- 2.Y.Motomiya.,N.Oyama.,H.Iwamoto.,T.Uchimura.,and I.Maruyama. N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl) lysine in blood from maintenance hemodialysis patients may contribute to dialysis-related amyloidosis. Kidney International 1998;54: 1357-1366.
- 3.H.Shin.,I.Kitajima.,T.Nakajima.,Q.Shao.,T.Tokioka.,I.Takasaki.,N.Hanyu.,T. Kubo.,I.Maruyama. Thrombin receptor mediated signals induce expressions of interleukin 6 and granulocyte colony stimulating factor via NF- $\kappa$  B activation in synovial fibroblasts. Annals of the Rheumatic Diseases 1999;58(1):55-60.
- 4.O.Watanabe.,I.Maruyama.,K.Arimura.,I.Kitajima.,H.Arimura.,M.Hanatani.,K. Matsuo.,T.Arisato.,and M.Osane. Overproduction of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is causative in Crow-Fukase(POEMS) syndrome. Muscle Nerve 1998;21:1390-97
- 5.M.Nakata.,T.Yada.,N.Soejima.,and I.Maruyama. Leptin promotes aggregation of human platelets via the long form of its receptor. Diabetes 1999; 48:426-29.
- 6.N.Mizuno.,E.Yoshitomi.,H.Ishida.,H.Kuromi.,J.Kawaki.,Y.Seino.and S.Seino. Altered bcl-2 and bax expression and intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling in apoptosis of pancreatic cells and the impairment of glucose-induced insulin secretion. Endocrinology 1998;139:1429-1439.
- 7.T.Miki.,K.Nagashima.,F.Tashiro.,K.Kotake.,H.Yoshitomi.,A.Tamamoto.,T. Gonoi.,T.Iwanaga.,J.Miyazaki.,and S.Seino. Defective insulin secretion and enhanced insulin action in K<sub>ATP</sub> channel-deficient mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998;95:10402-10406.
- 8.N.Inagaki.,and S.Seino. ATP-sensitive potassium channels : structures, functions, and pathophysiology. Jpn. J. Physiol. 1998;48:397-412.
- 9.J.A.Sanchez.,T.Gonoi.,N.Inagaki.,T.Katada.,and S.Seino. Modulation of reconstituted ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels by GTP-binding proteins in a mammalian cell line. J.Physiol 1998;507:315-324.
- 10.K.Ueda.,J.Komine.,M.Matsuo.,S.Seino.,and T.Amachi. Cooperative binding of ATP and MgADP in the sulfonylurea receptor is modulated by glibenclamide. Proc. Natl. Acad.Sci.USA 1999;96:1268-1272.
- 11.K.Tanabe.,S.J.Tucker.,M.Matsuo.,P.Proks.,F.M.Ashcroft.,S.Seino.,T.Amachi.,and K.Ueda. Direct photoaffinity labeling of the Kir6.2 subunit of the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel by 8-azido-ATP. J.Biol.Chem 1999;274(7):3931-3933.
- 12.S.Seino. ATP-sensitive potassium channels :a model of heteromultimeric potassium channel/receptor assemblies. Annu.Rev.Physiol 1999;61:337-362.

13. T. Miki, K. Nagashima, and S. Seino. The structure and function of the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in insulin-secreting pancreatic b-cells. *J. Mol. Endo.* (in press)
14. K. Yagi, D. Goto, T. Hamamoto, S. Takenoshita, M. Kato, and K. Miyazono. Alternatively Spliced Variant of Smad2 Lacking Exon 3. *The Journal of Biological Chemistry* 1999;274(2):703-709.
15. G. A. Blobel, T. Nakajima, R. Eckner, M. Montminy, and S. Orkin. CREB-binding protein cooperates with transcription factor GATA-1 and is required for erythroid differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998;95:2061-2066.
16. E. Yoshida, T. Nakajima, K. Murakami, A. Fukamizu. Identification of N-terminal minimal transactivation domain of CBP, p300 and *Caenorhabditis elegans* homologues. *GENE* 1998;208:307-314.
17. T. Ohsima, M. Iwama, Y. Ueno, F. Sugiyama, T. Nakajima, A. Fukamizu, and K. Yagami. Induction of apoptosis in vitro and in vivo by H-1 parvovirus infection. *Journal of General Virology* 1998;79:3067-3071.
18. S. F. Anderson, B. P. Schlegel, T. Nakajima, E. S. Wolpin, and J. D. Parvin. BRCA1 protein is linked to the RNA polymerase II holoenzyme complex via RNA helicase A. *Nature genetics* 1998;19:254-256.
19. J. Ishida, S. Asada, H. Daitoku, K. Fujiwara, Y. Kon, T. Sugaya, K. Murakami, T. Nakajima, Y. Kasuya, and A. Fukamizu. Expression and characterization of mouse angiotensin II type 1a receptor tagging hemagglutinin epitope in cultured cells. *International Journal of Molecular Medicine* 1999;3:263-270.
20. H. Shin, I. Kitajima, T. Nakajima, Q. Shao, T. Tokioka, I. Takasaki, N. Hanyu, T. Kubo, I. Maruyama. Thrombin receptor mediated signals induce expressions of interleukin 6 and granulocyte colony stimulating factor via NF- $\kappa$ B activation in synovial fibroblasts. *Annals of The Rheumatic Diseases* 1999;58(1):55-60.
21. 大島隆幸, 深見昭吉, 中島利博. 遺伝子発現における RNA ヘリケース A 複合体の役割 *細胞工学* 1998年; 17(10): 1512-1516.
22. T. Yamada, Y. Yoshiyama, N. Kawaguchi, A. Ichinose, T. Iwaki, S. Hirose, W. A. Jefferies. Possible Roles of Transglutaminases in Alzheimer's Disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 1998;9:103-110.
23. M. Kida, M. H. Kawabata, T. Yamazaki, A. Ichinose. Presence of Two Plasminogen Alleles in Normal Populations. *Thromb Haemost* 1998;79:150-154.
24. T. Izumi, U. Nagaoka, T. Saito, J. Takamatsu, H. Saito, A. Ichinose. Novel Deletion and Insertion Mutations Cause Splicing Defects, Leading to Severe Reduction in mRNA Levels of the A Subunit in Severe Factor VIII Deficiency. *Thromb Haemost* 1998; 79:479-485.
25. N. Takahashi, H. Tsukamoto, H. Umeyama, G. Castaman, F. Rodeghiero, and A. Ichinose. Molecular Mechanisms of Type II Factor VIII Deficiency: Novel Gly 562-Arg Mutation and C-Terminal Truncation of the A Subunit Cause Factor VIII Deficiency as Characterized in a Mammalian Expression System. *Blood* 1998;91(8): 2830-2838
26. K. Fujimaki, T. Yamazaki, M. Taniwaki, and A. Ichinose. The Gene for Human Protein Z Is Localized to chromosome 13 at Band q34 and Is Coded by Eight Regular Exons and One Alternative Exon. *Biochemistry* 1998;37(19):6838-6846.
27. A. Ichinose, H. Tsukamoto, T. Izumi, T. Yamazaki, M. Toghashi, J. Takamatsu, H. Saito, and H. Umeyama. Arg260-Cys mutation in severe factor VIII deficiency: conformational change of the A subunit is predicted by molecular modelling and mechanics. *British Journal of Haematology* 1998;101:264-272.
28. M. Soury, T. Izumi, Y. Higashi, A. Girolami, A. Ichinose. A Founder Effect Is Proposed for Factor VIII B Subunit Deficiency Caused by the Insertion of Triplet AAC in Exon III Encoding the Second Sushi Domain. *Thromb Haemost* 1998; 80:211-213

29.M.Murata.,T.Saito.,S.Takahashi.,and A.Ichinose.,  
Plasma Lipoprotein(a) Levels Are High in Patients with  
Central Retinal Artery Occlusion.Thrombosis Research  
1998;91:169-175.

30.N.Takabatake.,M.Souri.,and A.Ichinose. Multiple  
Novel Transcripts for Apolipoprotein(a)-Related Gene II  
Generated by Alternative Splicing in Tissue-and Cell Type-  
Specific Manners. J.Biochem 1998;124:540-546.

G. 知的所有権の取得状況

特になし

# 分担研究報告書

## 老化細胞とテロメラーゼに関する研究

丸山 征 郎  
(鹿児島大学医学部臨床検査医学・教授)

テロメラーゼの活性はテロメアの長さの保持に最重要な役割を果たしている。そしてテロメアの長さは細胞の寿命を規定している。そこで我々は血管内皮細胞におけるテロメラーゼ活性と細胞の不老化について検討した。ヒト臍帯静脈由来の内皮細胞は正常細胞であるのに拘わらず、テロメラーゼ活性が検出された。しかしヒト鼻粘膜微小循環由来の血管内皮細胞にはテロメラーゼ活性はなかった。SV40で不老化した内皮細胞株は不老化しているにも拘わらずテロメラーゼ活性はなかった。ヒトのテロメラーゼ活性はジヤイレース阻害剤 ofloxacin(OFLX)で抑制しえた。

### A. 研究目的

「ヒトは血管とともに老いる」と言われている。これは加齢とともに脳血栓や心筋梗塞などの血管合併症が多いことから言われ始めたことである。それでは果たして「血管自体は老いるのであろうか？」この命題にアプローチする手始めとして、血管内皮細胞の寿命とそれを規定していると言われているテロメラーゼの活性について検討した。

### B. 研究方法

- 1) 血管内皮細胞は、ヒト臍帯静脈由来のもの(HUVEC)とヒト鼻粘膜微小循環系から得た内皮細胞、HUVECをSV40/Ori(-)でトランスフォームした細胞株HUVE SV01を用いた。
- 2) テロメラーゼ活性は teromeric repeat amplification protocol assay(TRAP)で検討した。

### C. 研究結果

- 1) HUVEC はテロメラーゼ活性を有していた。
- 2) これに対しヒト鼻粘膜から確立した細胞株はテロメラーゼ活性が検出されなかった。
- 3) HUVE SV01 は不老化しているにも拘わらずテロメラーゼ活性が検出されなかった。
- 4) ジヤイレース阻害活性のある ofloxacin(OFLX) はテロメラーゼ活性を阻害した。膀胱癌細胞株 BOY の増殖は OFLX で阻害された。

### D. 考察

血管障害（血栓・塞栓）のリスクファクターとしては高脂血症、糖尿病、高血圧など種々のものが知られ

ているが、最大のリスクファクターは実は「加齢」である。しかし加齢とともに、なぜ血管障害が増えてくるのかについては、全く不明である。一方では「ヒトは血管とともに老いる」などと言われている。果たして血管も老いるのであろうか？これらを大きな命題として、まずは今回血管内皮細胞のテロメラーゼ活性に検討を加えた。結果、正常にも拘わらず、HUVEC にはテロメラーゼ活性が存在した。これはおそらく臍帯静脈の内皮細胞が胎児由来であることに因るものと考えられる。しかしヒト鼻粘膜由来の内皮細胞にはテロメラーゼ活性は検出しえなかった。一方 SV40 Ori(-) DNA のトランスフェクションで樹立した細胞株 HUVEC SV01 は不老化しているにも拘わらず、テロメラーゼ活性は検出しえなかった。その理由として、テロメア長が十分である可能性が推定された。テロメラーゼ活性は細菌のジヤイレース阻害剤で抑制され、それに伴い細胞は増殖がストップした。

### E. 結論

臍帯静脈由来の内皮細胞にはテロメラーゼ活性が検出された。これは臍帯静脈が胎児由来であるためと考えられる。テロメラーゼ活性があると細胞は増殖したが、不老化した細胞の HUVE SV01 にはテロメラーゼ活性はなかった。従ってテロメラーゼ活性があると細胞は寿命に延びるが、細胞の寿命が延びた細胞に必ずしもテロメラーゼ活性があるとは限らない。

### F. 研究発表

1. 論文発表

1.N.Maeno.,S.Takei.,K.Masuda.,H.Akaike.,K.Matsuo.,I.Kitajima.,I.Maruyama., and K.Miyata. Increased Serum Levels of Vascular Endothelial Growth Factor in Kawasaki Disease.Pediatric Research 1998;44(4):596-599.

2.Y.Motomiya.,N.Oyama.,H.Iwamono.,T.Uchimura.,and I.Maruyama. N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl) lysine in blood from maintenance hemodialysis patients may contribute to dialysis-related amyloidosis. Kidney International 1998;54: 1357-1366.

3.H.Shin.,I.Kitajima.,T.Nakajima.,Q.Shao.,T.Tokioka.,I.Takasaki.,N.Hanyu.,T. Kubo.,I.Maruyama. Thrombin receptor mediated signals induce expressions of interleukin 6 and granulocyte colony stimulating factor via NF- $\kappa$  B activation in synovial fibroblasts.Annals of the Rheumatic Diseases 1999;58(1):55-60.

4.O.Watanabe.,I.Maruyama.,K.Arimura.,I.Kitajima.,H.Arimura.,M.Hanatani.,K. Matsuo.,T.Arisato.,and M.Osame. Overproduction of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is causative in Crow-Fukase(POEMS) syndrome. Muscle Nerve 1998;21:1390-97

5.M.Nakata.,T.Yada.,N.Soejima.,and I.Maruyama. Leptin promotes aggregation of human platelets via the long form of its receptor. Diabetes 1999; 48:426-29

G. 知的所有権の取得状況

特になし

## 老化とインスリン分泌に関する研究

清野 進

（千葉大学大学院医学研究科・教授）

近年、我が国では老年者の糖尿病が増加している。我が国における糖尿病は発症早期よりインスリン分泌が低下していることが特徴である。老年者の糖尿病の発症の機序として、インスリン分泌障害の遺伝素因を有し、環境因子の負荷や加齢により糖尿病を発症する可能性があげられる。今回は、インスリン分泌調節の鍵となる  $K_{ATP}$  チャネルを欠損したマウスを用いて環境因子ならびに加齢の耐糖能に対する影響を観察した。 $K_{ATP}$  チャネル欠損マウスのうち肥満を伴う群では加齢とともに明らかな耐糖能障害が認められた。一方、対照マウスで肥満を伴う群では耐糖能障害は認められなかった。 $K_{ATP}$  チャネル欠損マウスはインスリン分泌障害を遺伝素因に有する者が環境因子の負荷や加齢により糖尿病を発症するとの糖尿病モデルとなり、糖尿病発症機構の研究に有用である。

### A. 研究目的

近年、高齢者の糖尿病が増加しているが、その機序は不明である。我々は、インスリン分泌障害を遺伝的に有する者では、過食、運動不足などの環境因子や加齢により、糖尿病を発症することを実験的に検証するため、グルコースによるインスリン分泌の鍵となる  $K_{ATP}$  チャネル欠損マウス ( $Kir6.2^{-/-}$ ) を作製し、加齢による耐糖能の変化について検討した。

### B. 研究方法

膵β細胞、心筋、骨格筋  $K_{ATP}$  チャネルは、内向き整流性  $K^+$  チャネルメンバーである  $Kir6.2$  がチャネルのポアを構成している。従って、 $Kir6.2$  遺伝子を破壊することにより  $K_{ATP}$  チャネル欠損マウスを作製した。作成されたマウスを用いて、膵β細胞機能及び耐糖能について検討を加えた。

### C. 研究結果

$K_{ATP}$  チャネル欠損マウスは外見上大きな変化を認めず、妊孕性であった。膵臓、心筋、脳組織いずれの組織においても、 $Kir6.2$  mRNA が発現していないことが reverse transcriptase/polymerase chain reaction (RT-PCR) により確認された。 $K_{ATP}$  チャネル欠損マウスから単離した膵β細胞を whole-cell recording および single patch clamp により解析したところ細胞膜の  $K_{ATP}$  チャネル活性が全く消失していることが示された。 $K_{ATP}$  チャネル欠損マウスの膵β細胞の静止膜電位は有意に上昇して

おり、非刺激時の細胞内  $Ca$  濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) も上昇していた。10 から 16 週齢の  $K_{ATP}$  チャネル欠損マウスにグルコース負荷試験を行ったところ、インスリン分泌は  $K_{ATP}$  チャネル欠損マウスで著明に障害されていたが、耐糖能障害は極く軽度であった。 $K_{ATP}$  チャネル欠損マウスにおいて加齢の影響を検討する目的でマウスを長期間飼育し 50 週齢で、ブドウ糖負荷試験を行った。 $K_{ATP}$  チャネル欠損マウスと対照マウスは長期飼育の結果、肥満群と非肥満群に分類された。肥満を伴う  $K_{ATP}$  チャネル欠損マウスは明らかに耐糖能障害が認められた。一方、肥満を伴う対照マウスでは耐糖能障害は認められなかった。 $K_{ATP}$  チャネル欠損マウスの膵島を組織学的に検討したところ膵島細胞の配列に異常が認められた。すなわち、正常では膵島の周辺に存在する  $\alpha$  細胞が  $K_{ATP}$  チャネル欠損マウスでは膵島の中央にも出現していた。そのため相対的に  $\alpha$  細胞は増加、 $\beta$  細胞は減少しており  $K_{ATP}$  チャネルが正常な膵島の形態維持に関与していることが示唆された。

### D. 考察

糖尿病発症の機序は多くが不明である。今回、インスリン分泌障害を遺伝素因として有する個体に、環境因子や加齢により、糖尿病を発症する可能性を実験的に検証することを試みた。 $K_{ATP}$  チャネル欠損マウスではグルコースに対するインスリン分泌不全と膵島の形態異常を認めた。しかし、20 週齢までは  $K_{ATP}$  チャネル



欠損マウスは明らかな耐糖能障害は認められなかった。長期飼育により加齢マウス（50週齢）で検討したところ、 $K_{ATP}$ チャネル欠損マウスでは耐糖能障害が認められた。 $K_{ATP}$ チャネル欠損マウスはインスリン分泌不全を遺伝素因として有する個体に環境因子や加齢の因子が加わると糖尿病を発症する糖尿病モデルとして有用であると考えられる。

#### E. 結論

$K_{ATP}$ チャネル欠損マウスの研究により、ヒトにおいてもグルコースに対するインスリン分泌不全を遺伝素因として有する者は環境因子の負荷や加齢の因子により糖尿病発症することが示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Mizuno, N., Yoshitomi, H., Ishida, H., Kuromi, H., Kawaki, J., Seino, Y. and Seino, S. Altered bcl-2 and bax expression and intracellular  $Ca^{2+}$  signaling in apoptosis of pancreatic cells and the impairment of glucose-induced insulin secretion. *Endocrinology* 139:1429-1439, 1998
2. Miki, T., Nagashima, K., Tashiro, F., Kotake, K., Yoshitomi, H., Tamamoto, A., Gono, T., Iwanaga, T., Miyazaki, J. and Seino, S. Defective insulin secretion and enhanced insulin action in  $K_{ATP}$  channel-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:10402-10406, 1998
3. Inagaki, N. and Seino, S. ATP sensitive potassium channels : structures, functions, and pathophysiology. *Jpn. J. Physiol.* 48:397-412, 1998
4. Sanchez J.A., Gono, T., Inagaki, N., Katada, T. and Seino, S. Modulation of reconstituted ATP-sensitive  $K^{+}$  channels by GTP-binding proteins in a mammalian cell line. *J. Physiol.* 1998;507:315-324
5. Ueda, K., Komine, J., Matsuo, M., Seino, S. and Amachi, T. Cooperative binding of ATP and MgADP in the sulfonylurea receptor is modulated by glibenclamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999;96:1268-1272
6. Tanabe, K., Tucker, S.J., Matsuo, M., Proks, P., Ashcroft, F.M., Seino, S., Amachi, T. and Ueda, K. Direct photoaffinity labeling of the Kir6.2 subunit of the ATP-sensitive  $K^{+}$  channel by 8-azido-ATP. *J. Biol. Chem.* 1999;274:3931-

3933

7. Seino, S. ATP-sensitive potassium channels: a model of heteromultimeric potassium channel/receptor assemblies. *Annu. Rev. Physiol.* 1999;61:337-362

8. Miki, T., Nagashima, K. and Seino, S. The structure and function of the ATP-sensitive  $K^{+}$  channel in insulin-secreting pancreatic  $\beta$ -cells. *J. Mol. Endo.* (in press)

#### G. 知的所有権の取得状況

特になし

## 臓器の線維化の分子細胞機構

宮園 浩平

（癌研究会癌研究所生化学部・部長）

本研究では Smad3 が Smad4 と協調して plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 の転写を調節することにより、TGF- $\beta$  のシグナルを伝達し、臓器の線維化に関与することを明らかにした。Smad2 は Smad3 と異なり DNA に結合せず、転写活性には Smad2 と Smad3 の間で相違が見られた。また転写の coactivator である p300 は Smad2 や Smad3 結合して Smad の転写活性を増強させる作用を示した。

### A. 研究目的

TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) は細胞外マトリックスの産生を促進するほか、細胞の増殖抑制など多彩な作用を持ったサイトカインである。TGF- $\beta$  のレセプターが活性化されると細胞内に存在する Smad のセリンがリン酸化され、核へ移行してさまざまな転写を促進する。Smad にはこれまで Smad1~8 が報告されている。本研究では Smad が plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 などのさまざまな標的遺伝子の転写をどのようなメカニズムで調節するかを検討し、臓器の線維化をどのように誘導するかを明らかにする目的で研究を行った。

### B. 研究方法

TGF- $\beta$  のシグナルに関与する Smad2、Smad3、Smad4、およびエクソン3を欠いた Smad2 や p300 の cDNA を TGF- $\beta$  のレセプター cDNA などとともに COS 細胞に導入して、免疫沈降とイムプロット法などで蛋白質のリン酸化、蛋白質同士の結合などを調べた。また p3TP-Lux などを用いて転写活性を調べた。

### C. 研究結果

① Smad2 と Smad3 は互いに 90% のアミノ酸配列の類似性があり、TGF- $\beta$  刺激によって特異的に活性化される。一方、Smad4 はこれらのアダプターである。我々は Smad2 と Smad3 が TGF- $\beta$  I 型レセプターによって活性化されことをすでに確認していたが、本研究で Smad は細胞内でモノマーとして存在し、レセプターの刺激によってオリゴマー（三量体）を形成することを明らかにした。その構造は Smad2（または Smad3）が 2 分子子に対し Smad4 が 1 分子からなることが示唆さ

れた。また Smad2 と Smad3、Smad4 の三者が TGF- $\beta$  の刺激で細胞内で複合体を作ることを確認した。こうして活性化されオリゴマーを形成した Smad は核内へ移行しさまざまな標的遺伝子のプロモーター領域に結合して転写を調節していることを明らかにし、Smad がレセプターによって活性化される転写因子であることを明らかにした。

② Smad2 は Smad3 に比べて PAI-1 などに対する転写活性が低いことなどが観察されており、その作用のメカニズムの検討が重要である。我々は Smad2 の N 末端側の MH1 領域に注目し、その DNA 結合能を検討した。Smad2 の MH1 領域にはエクソン3によってコードされる 30 アミノ酸からなる領域が存在するが、これに対応する領域は Smad3 やその他の Smad では見られない。またある種の細胞ではこのエクソン3を欠いた Smad2 (Smad2  $\Delta$  exon3) が作られる。そこで Smad2、Smad2  $\Delta$  exon3、Smad3 の転写活性能を調べたところ Smad2  $\Delta$  exon3 は Smad2 より強く、Smad3 とほぼ同等の転写活性能を持つことが明らかとなった。さらにその生化学的作用の検討を行った結果、Smad2  $\Delta$  exon3 と Smad3 は PAI-1 のプロモーター領域に結合するのに対し、Smad2 は結合しないことが明らかとなり、エクソン3に相当する部分が DNA への結合を阻害していることが明らかとなった。

Smad3 や Smad4 は CAGA もしくはこれに相補的な GTCT 配列に結合する。Smad2 だけでなく Smad1、Smad5 もこの DNA 配列には結合せず、DNA 結合能は Smad3/4 に特異的な作用であることが確認された。また Smad4 や活性化された Smad3 の存在下では Smad2 もこれらと

複合体を形成してDNAに結合した。

③ p300はさまざまな転写因子のcoactivatorとして作用する。我々はp300がTGF- $\beta$ による転写活性を増強することを明らかにし、その増強作用がTGF- $\beta$ レセプターの刺激依存性にSmad2やSmad3とp300が直接結合するためであることを明らかにした。Smad3はC末端側のMH2領域で、一方p300もC末端側の約600アミノ酸からなる、STATをはじめとする他の転写因子と結合することが報告されている部位とは異なる領域で結合することを示した。またp300のSmadとの結合部位は優勢抑制性にSmadによる転写を抑えることが明らかとなり、Smadによる転写調節機構におけるp300の役割が明らかとなった。

#### D. 考察

本研究でTGF- $\beta$ のシグナル伝達にはSmad2、Smad3、Smad4が重要であることが確認された。Smad2はSmad3より活性が弱いこれはエクソン3によってコードされる部分がDNAとの結合を阻害するためであった。転写のcoactivatorであるp300はSmadと協調して転写活性を増強させ、組織の線維化に参与しているものと考えられた。

#### E. 結論

TGF- $\beta$ の線維化のシグナルにはSmad3やSmad4を介したシステムが重要であり、p300などを介して組織の線維化を促進していることが示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- ① Inoue, H., Imamura, T., Ishidou, Y., Takase, M., Udagawa, Y., Tsuneizumi, K., Tabata, T., Miyazono, K., and Kawabata, M. (1998) Interplay of signal mediators of Decapentaplegic (Dpp): Molecular characterization of Mothers against dpp, Medea, and Daughters against Dpp. *Mol. Biol. Cell* 9, 2145-2156.
- ② Kawabata, M., Inoue, H., Hanyu, A., Imamura T., and Miyazono, K. (1998) Smad proteins exist as monomers in vivo and undergo homo- and hetero-oligomerization upon activation by serine/threonine kinase receptors. *EMBO J.* 17, 4056-4065.
- ③ Nishihara, A., Hanai, J.-i., Okamoto, N., Yanagisawa, J., Kato, S., Miyazono, K., and Kawabata, M. (1998) Role of p300, a transcriptional coactivator, in signaling of TGF- $\beta$ . *Genes to Cells* 3, 613-623.
- ④ Yagi, K., Goto, D, Hamamoto, T., Takenoshita, S., Kato, M. and Miyazono, K. (1999) Alternatively-spliced variant of

Smad2 lacking exon 3: Comparison with wild-type Smad2 and Smad3. *J. Biol. Chem.* 274, 703-709

⑤ Yanagisawa, J., Yanagi, Y., Masuhiro, Y., Suzawa, M., Toriyabe, T., Kashiwagi, K., Watanabe, M., Kawabata, M., Miyazono, K., and Kato, S. (1999) Convergence of transforming growth factor- $\beta$  and vitamin D signaling pathways on SMAD transcriptional coactivators. *Science* 283, 1317-1321.

⑥ Nakashima, K., Yanagisawa, M., Arakawa, H., Kimura, N., Hisatsune, T., Kawabata, M., Miyazono, K., and Taga, T. (1999) Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300. *Science in press.*

2. 学会発表

特になし

#### G. 知的所有権の取得状況

特になし

## 老年病分野に関する研究転写統合装置 CBP/ RNA ヘリケース A レベルからの加齢性疾患 の分子発症機構へのアプローチ

中 島 利 博

（筑波大学応用生物化学系・講師）

遺伝情報発現の分子機構，とりわけ核内コアクチベーター複合体のレベルからのアプローチを通じ，加齢性疾患・難治性疾患の病因・病態さらには治療法の開発を目指した。その結果，# 1. 乳癌原因遺伝子産物 BRCA1 が RNA ヘリケース A (RHA) と複合体を形成，この複合体が乳癌発症の成因となる可能性の呈示 # 2. 赤芽球の分化における GATA 1 / C B P 複合体の必要性。 # 3. コアクチベーター複合体による動脈硬化症，慢性関節リウマチの病巣形成細胞の hypernuclear acetylation ; HNA の発見した。これらの知見により，核内コアクチベーター複合体レベルからの加齢性疾患・難治性疾患のより詳細な理解・治療法の開発の可能性が開かれた。

### A. 研究目的

転写を中心とした遺伝情報発現機構を解析することにより種々の加齢性・難治性疾患の病因・病態さらには治療法の開発を行うことを目的とする。

### B. 研究方法

主として分子細胞生物学的手法に基づく転写研究法 (in vitro, in cell), yeast 2-hybrid 法, expression cloning などを行った。アセチル化抗体に関する研究は免疫組織学的・免疫細胞学的手法を用いた。

### C. 研究結果

平成 10 年度，申請者は本研究班・班員として # 1. 乳癌原因遺伝子産物 BRCA1 が RNA ヘリケース A (RHA) と複合体を形成し，細胞増殖の key molecule である p21 の発現を介して乳癌発症の成因となる可能性の呈示 (Nature Genetics 1998)。 # 2. 赤芽球の分化における GATA 1 / C B P 複合体の必要性 (PNAS 1998) を報告。 # 3. クロマチン化した DNA の転写制御の中心的役割を果たす蛋白質のアセチル化・脱アセチル化を検出する抗アセチル化リジン抗体の作成に世界に先駆けて成功。 # 4. 本抗体による動脈硬化症，慢性関節リウマチの免疫組織学的に検討により，病巣での有意な核内のアセチル化の亢進 (hypernuclear acetylation ; HNA) の発見とその分子機作の解明 (論文投稿中) を行った。

### D. 考察

上記 #1~#4 は世界に先駆け，一流誌に報告した知見。概念であり非常に高い評価を受けている。また，乳癌，動脈硬化症，慢性関節リウマチといった加齢性・難治性疾患の病因・病態さらには治療法の開発に大きく貢献できたと考える。今後，動物モデルの開発，創薬開発を積極的に進めたい。

### E. 結論

核内コアクチベーター複合体の加齢性疾患・難治性疾患における意義が示唆された。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. T. Ohshima, M. Iwama, Y. Ueno, F. Sugiyama, **T. Nakajima**, A. Fukamizu, K.-I. Yagami. In vitro and in vivo induction of apoptosis by H-1 parvovirus infection. *J. General Virology* 79 : 3067-3071, 1998.
2. S-F. Anderson, B- P. Schlegel, **T. Nakajima**, E- S. Wolpin, and J-D. Parvin. BRCA1 protein is linked to the RNA polymerase II holoenzyme complex via RNA helicase A. *Nature Genetics* 19 : 254-257, 1998.
3. G-A. Blobel, **T. Nakajima**, R. Eckner, M. Montminy, and S. H. Orkin. CREB-binding protein cooperates with transcription factor GATA-1 and is required for erythroid differentiation. *Proc. Natl. Acad.*