

厚生省厚生科学研究費補助金

長寿科学総合研究

平成10年度研究報告

基礎老化010

老化促進ストレス刺激と生体防御に関する研究

主任研究者 磯部健一（国立療養所中部病院長寿医療研究センター部長）

老化促進ストレス刺激と生体防御に関する研究

主任研究者 磯部健一 (国立療養所中部病院長寿医療研究センター部長)

老化促進ストレス刺激に対する細胞の遺伝子発現制御とシグナル伝達経路を線維芽細胞、マクロファージ、ミクログリア、神経細胞で解析し、p21/WAF1, GADD34を中心とした新しい経路を発見した。また、ミクログリアが脳で重要な役割を持つ証拠を得た。これらのストレス刺激に対して生体は防御作用を持ちそれが寿命に関係する。その一つでありラジカル消去作用を持つ Mn-SOD 遺伝子の発現制御を明らかにした。細胞レベルの解析を個体に発展させ、UV ストレス刺激と老化を解析できるモデルマウスを開発した。

分担研究者

磯部健一 国立療養所中部病院長寿医療研究センター部長

長谷川忠男 国立療養所中部病院長寿医療研究センター室長

中島 泉 名古屋大学医学部教授

祖父江元 名古屋大学神経内科教授

澤田誠 藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教授

A. 研究目的

外界からの様々なストレス刺激さらには内部の代謝によって生じるラジカルがDNA, 蛋白, 脂肪を傷害あるいは修飾し、その蓄積として老化が促進される。我々はストレス刺激のうち老化を引き起こすものを老化促進ストレスと呼び、生体はそれに対する防御反応を持ち、その強弱により寿命が変化すると考えた。本研究はこの仮説を実験的に検証することにある。まず、我々はストレス刺激に対するシグナル伝達系の全体像の解明とその機能を細胞レベルで明らかにすることを目指した。現在判明している経路には p53 を中心とした経路がある。すなわち、ストレス刺激、

特に DNA 傷害性ストレス刺激に対して細胞は p53 を発現させ、p21/WAF1 を介して、細胞周期を止め、DNA の修復をしている。あるいは、BaX 等を介して傷ついた細胞を除去している。我々は p53 非依存性のストレス応答の新しい経路を見いだした。GADD34 を中心とする新しい経路の解明に我々は酵母の Two hybrid 法を利用した。現在いくつかの役者がそろいその 1 つ 1 つが細胞にとってどのような役割を持つか検索を開始した (長谷川、磯部)。我々は感染ストレスが SOD の発現を誘導することを明らかにしてきた。SOD 遺伝子は個体の寿命に関係することが、マウス、ショウジョウバエの系で明らかにされておりこの発現調節のメカニズムを明らかにすることが老化機構を解明することに重要である。本年度は Mn-SOD の転写制御の解明をめざした (磯部)。

ストレス応答シグナルと生体防御が老化に果たす役割をより個体レベルで検索するため我々の開発した RET, PKC トランスジェニックマウスの系の研究を発展させた (中島)。ミクログリアは外的および内的微小環境の変化に反応して脳内ストレス応答系としての役

割を果たしていると考えられる。我々は脳の老化に関わる刺激が加えられたときのミクログリアの反応を *in vivo* と *in vitro* で検討し、脳の老化のメカニズムやそれを抑制する手段について検索することを目的として研究を開始した。その第2年目として *in vitro* でミクログリアのサブタイプの性質の違いについて、*in vivo* では脳一過性虚血負荷時の非侵害的脳内導入ミクログリアの動態について調べた（澤田）。近年、酸化ストレスにより老化脳などにおいて、advanced glycation endproducts (AGEs)が沈着することが報告され、その病態への関連が注目されている。我々は、神経細胞とグリア細胞の培養系において、AGEsの主要成分である carboxymethyllysine (CML)を実験的に誘導し、その病態を明らかにすることを目的とした（祖父江）。

B. 研究方法

1. 遺伝子発現制御

遺伝子発現調節領域を決定するためにゲノム (p21/WAF1, Mn-SOD)の5'側プロモーターと思われる領域あるいはエンハンサーと思われる領域をルシフェラーゼ発現ベクターに組み込み、それらをもとに様々な変異遺伝子を作製した。遺伝子を細胞内移入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。この解析により転写に必要なシスエレメントを決定し、それに結合する転写因子をゲルシフトアッセイで決定した。また、転写因子を発現ベクターに組み込み遺伝子移入し、レポーター遺伝子の活性を測定した。

2. Yeast two hybrid 法

GADD34 遺伝子産物と生体内で結合する蛋白質のクローニングを two hybrid 法を用い

て行った。*in vitro*での結合を確認するために GST との融合蛋白、³⁵S でラベルした蛋白質を作成し混合させた後、洗い SDS ページにて分離し、結合の有無を確認した。あるいは培養細胞内での結合を確認するため GADD34 遺伝子と得られた cDNA を pACT, pBIND の *in vivo two hybrid* 用のベクターに組み込み NIH3T3 細胞にトランスフェクションした後、ルシフェラーゼ活性を指標として解析した。

3. トランスジェニックマウス

我々が樹立した3系統の RET がん遺伝子トランスジェニックマウスのうち、304系と192系では皮膚の黒色化に加えて加齢とともにメラノサイト系腫瘍が発生する(304は悪性、192は良性)のに対して、242系では皮膚の黒色化はおこるが腫瘍は発生しない。この良性の192系腫瘍に紫外線を照射し、細胞内での Ret チロシンキナーゼの発現と活性のレベルをウエスタンブロット法または試験管内キナーゼアッセイ法により測定した。同時に、腫瘍の増殖や悪性変異への紫外線照射の影響を加齢因子との関連で調べた。

4. ミクログリア

ミクログリアは新生 B6 マウス脳より調製した混合グリア培養から分離精製した。昨年度株価ミクログリア細胞の性質を報告したが、今年度はそれをラット腋下動脈に注入した。注入後48時間、経時的実験ではさらに注入後1、2および3週間で麻酔下生理食塩水で環流し、各臓器を摘出、OCT液中で凍結した。また、一過性前脳虚血砂ネズミの腋下動脈よりミクログリアを投与し経時的に剖検し、海馬CA1領域の錐体細胞の遅延性神経細胞死と導入したミクログリアの動態を観察した。

5. 神経細胞

ラット後根神経節を用い、コラーゲンゲル包埋法を用いた explant culture を行った

。培養液中に CML を誘導する glyoxal を 0.001~10mM の各濃度で添加し、1~6 日間培養した。抗 CML 抗体を用いて免疫組織染色と Western blot analysis を行い、CML の誘導を検討した。また、glyoxal 0.1mM に対し、AGEs の生成を阻害する物質である aminoguanidine を 0.1~10mM の各濃度で添加し、CML の誘導が阻害されるか否かを検討した。

C. 研究結果

1. ストレス応答の新しい経路

GADD34 遺伝子産物と結合する蛋白質のクローニングを two hybrid 法で行い 4 クローンが得られた。トランスリンは切断 DNA と結合することが報告されている。IK10) と呼ばれる 2 型組織適合抗原の発現を調節する因子と相同性のある遺伝子は過去に報告されている物の約 2 倍長の cDNA であった (G34BP と命名)。他にキネシンファミリーに属する KIF3 の C 末端部分、更にヒトの HLJ1 とよばれる熱ショック蛋白 40 ファミリー遺伝子のマウスホモログが得られ、GAHSP40 と命名した。in vitro の結合、培養細胞内での結合を解析したところすべて GADD34 との結合が確認された。GADD34 あるいは GA34BP は NIH3T3 にトランスフェクションすると細胞増殖が阻害された。GAHSP40 は MMS 投与のみならず熱ショックにても顕著な誘導が確認された。ストレス応答は蛋白合成の抑制に働くが GADD34 は C 末端の γ_1 34.5 により蛋白合成を阻害を抑制する働きが想定される。GAHSP40 はその働きを助けていると考えられる。

2. 線維芽細胞の老化

NIH3T3 細胞はヒストンアセチル化剤 (TSA、butyrate) により老化様形態を示し、強い p21mRNA 上昇と p21 プロモーター活性の上昇を示した。未刺激あるいは TSA 刺激に対する p21 コアプロモーター活性は転写開始点から上流-100bp 内にあり、Sp1 あるいは Sp3 の遺伝子移入で上昇した。また、ヒストンアセチル化酵素の遺伝子 p300 の遺伝子移入でも上昇した。p300 のドミナントネガティブ体の遺伝子移入ではプロモーター活性が低下した。以上の結果は p53 を欠損する 10(1) マウス線維芽細胞でも同様にみられ、この p21 の上昇は p53 非依存性であることが判明した。

3. Mn-SOD の発現調節

線維芽細胞株 NIH3T3 あるいはマクロファージ細胞株 RAW264 を感染ストレス刺激である IL-1 β , TNF- α , LPS, IFN- γ で刺激すると Mn-SOD mRNA の発現増強がみられた。これに対応する Mn-SOD の転写活性を調べるため、まず転写開始点上流 6Kb のルシフェラーゼ活性を測定した。GC-rich 領域に非刺激のコアプロモーター活性が存在することが判明したが、刺激にはわずかな上昇が見られるのみであった。ストレス刺激に反応する領域は第 2 イントロンにみられ、NF κ B サイトを塩基置換するとルシフェラーゼ活性は著しく低下した。隣接する C/EBP サイトの塩基置換でも活性は低下した。NF κ B 遺伝子を細胞内移入で発現させるとルシフェラーゼ活性は著明に増加した。

4. RET がん遺伝子トランスジェニックマウスと老化促進刺激

加齢によっても悪性には変異しない RET がん遺伝子トランスジェニックマウス 192 系に発生する良性のメラノサイト系腫瘍に、6

ヶ月間にわたって合計4950 kJの紫外線(UVB)を反復照射して影響を調べた。その結果、この紫外線の照射によってRETがん遺伝子の発現制御機構が破綻し、腫瘍細胞内のRETがん遺伝子が強く発現するようになることが見い出された。Ret 蛋白の一定蛋白量あたりのチロシンキナーゼ活性のレベルを比較したところ、RETがん遺伝子産物(Rfp/Ret)の活性はプロトオンコジン c-RET の産物(c-Ret)のそれより高く、Rfp-Retの活性は紫外線照射によってさらに増加することを認めた。こうした変化に伴って良性のメラノサイト系腫瘍から転移を伴う悪性メラノーマが出現した。

5、ミクログリアとストレス応答

脳内での抑制性の作用が指摘されているIL-10がストレス応答に関わるミクログリアの炎症性サイトカイン産生、スーパーオキシドラジカル産生、増殖、MHC class II発現などの機能を抑制するほか、今回新たにIL-2、IL-6などの炎症性サイトカイン受容体の発現も抑制し、ミクログリアの機能のdown regulationをする事がわかった。ミクログリアはサブタイプによってストレス刺激による応答性が異なり、種々のサイトカイン産生のスペクトラムや細胞表面機能分子の発現などが異なることがわかった。また、我々の樹立した複数の株化ミクログリアのいくつかはミクログリアのサブタイプに一致した性質を持っていることがわかった。さらに我々が樹立したミクログリア株細胞に外来性遺伝子を導入し、独自に開発した脳特異的バイオターゲティング法を用いることによって、目的遺伝子を脳に特異的に発現させることに成功した。さらに一過性前脳虚血モデルにおいて脳特異的バイオターゲティング法でミクログ

リアを虚血性神経細胞死巣に導入してin vivoで直接ミクログリアの老化促進ストレス応答を検討するシステムを開発した。

6、脳と酸化ストレス

神経細胞、グリア細胞ともに免疫組織染色およびWestern blot analysisとともに、glyoxalによってCMLが時間・濃度依存的に誘導され、これはaminoguanidineによって濃度依存的に阻害された。ミクログリアではglyoxal 0.1mMの添加によってIL-6、TNF- α の濃度の上昇が認められた。RT-PCRではミクログリアにおいてglyoxal 0.1mMの添加によってTNF- α のmRNAの誘導が認められた。

D. 考察

1、ストレス応答遺伝子の新しい経路

GADD34の機能はその一部の領域がヘルペスウイルスのあるcDNA配列と相同性があるためそこから推定される蛋白合成のshut offを阻害する機能が考えられる。GADD34に結合する蛋白のうちトランスリンはリンパ腫発生の際に認められる染色体の転座部位の一本鎖DNAに結合する遺伝子であり、ストレス刺激におけるDNA傷害との関係が示唆された。KIF3はストレス刺激における細胞分裂に関与している可能性があった。熱ショック蛋白40ファミリー遺伝子GAHSP40は、MMS処理によりGADD34と同様に発現誘導され、DNA傷害に対してGADD34と関連してストレス応答を司っている可能性が予想された。老化促進ストレスのうちDNA傷害性ストレス刺激は細胞の様々な遺伝子を誘導し、これらが細胞の機能保持のための役割を果たしていると考えられる。さらに詳細な機能解析に進む予定である。

2、Mn-SODの発現制御

活性酸素はSODやカタラーゼで消去される。細胞は活性酸素を通常の代謝過程で産生するが外部からのストレス刺激でより多く産生すると考えられる。今年度は感染ストレス刺激によりMn-SOD産生が増強するメカニズムをその転写レベルで解析した。その結果LPS等の刺激により活性化されるNFκBが最も重要な転写因子であることを見つけた。すなわち、Mn-SODも通常の免疫応答遺伝子と同様に活性化されることが判明した。

3、ストレス刺激と老化モデル動物

我々の開発したRETがん遺伝子トランスジェニックマウスは癌化がUV照射により促進された。RET産物のリン酸化が促進されていることがわかり、UVがどの様にリン酸化に関与するか明らかにすることは一般の老化と癌化の関係を老化促進ストレス刺激から考える時非常によいモデルとなる。

4、ミクログリアと老化促進ストレス刺激

ミクログリアはサブタイプの違いによりストレス応答が異なることがわかり、これらが今後神経細胞に傷害性に働くのか保護的に働くのか検討する必要がある。また、株化ミクログリアに遺伝子導入し、脳内に移行させる実験に成功した。このことは老化ストレスの防御の方策を探る実験の端緒となりうる。また、IL-10のストレス抑制作用の発見がその老化抑制作用につながる可能性を秘めている。

5、活性酸素ラジカルと神経細胞の老化

活性酸素ラジカルは代謝で盛んに産生され、AGEs産物を神経細胞に生じさせる。これらがミクログリアを活性化させ、神経細胞にtoxicに働くことも考えられる。

E. 結論

1、GADD34を中心とした新しいストレス応

答遺伝子群を見いだした。

2、p21/WAF1は細胞老化で上昇する。アセチル化剤は細胞老化のモデル実験系となった。p21/WAF1転写にはSp1ファミリーが不可欠であった。

3、感染ストレスで発現の上昇するMn-SODの転写にはNFκBが最も重要な役割をもつ。

4、ミクログリアに遺伝子移入し、ラット脳内に移入する実験に成功した。ストレス刺激とミクログリアの作用の分子レベルの解析と個体レベルの解析が進行している。

5、酸化ストレスにより神経細胞にAGEs産物が蓄積した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) H. Xiao, T. Hasegawa, and K. Isobe, Both Sp1 and Sp3 are responsible for p21/WAF1 promoter activity induced by histone deacetylase inhibitor in NIH3T3 cells, *J Cell Biochem*, 1999 in press.

2) T. Hasegawa, H. Xiao, and K. Isobe, Cloning of a GADD34-like gene that interacts with the zinc-finger transcription factor which binds to the p21/WAF promoter, *Biochem Biophys Res Commun*, 1999 in press.

3) Takeuchi A, Isobe K, Miyaishi O, Sawada M, Fan Z-H, Nakashima I and Kiuchi K. Microglial NO induces delayed neuronal death following acute injury in the striatum.

4) Nakashima, L, Akhand, A.A., Pu, M., Kato, M., Hamaguchi, M., Senga, T., Miyata, T., Suzuki, H., Parashah, A., Du, J., Liu, W. and Umeda, Y.: Redox-oriented chemical events in signal transduction in cells. In *Redox Regulation of Cell Signaling and its Clinical Applications* (Eds, J.

- Yodoian L. Packer), Marcel Dekker, Inc., in
- 5) Kato, M., Liu, W., Akhand, A. A., Dai, Y., Ohbayashi, M., Tuzuki, T., Suzuki, H., Isobe, K., Takahashi, M. and Nakashima, I.: Linkage between melanocytic tumor development and early burst of Ret protein expression for tolerance induction in metallothionein-I/ret transgenic mice. *Oncogene*.18:837-842, 1999.
 - 6) Asai, M., Kato, M., Asai, N., Iwashita, T., Murakami, H., Kawai, K., Nakashima, I. and Takahashi, M.: Differential regulation of MMP-9 and TIMP-2 expression in malignant melanoma developed in metallothionein/RET transgenic mice. *Jpn. J. Cancer Res.* 90:86-92, 1999.
 - 7) Akhand, A.A., Kato, M., Suzuki, H., Liu, W., Du, J., Hamaguchi, M., Miyata, T., Kurokawa, K. and Nakashima, I.: Carbonyl compounds cross-link cellular proteins and activate protein-tyrosine kinase p60c-src *J. Cell. Biochem.* 72:1-7, 1999.
 - 8) Parashar, A., Akhand, A.A., Rawar, R., Furuno, T., Nakanishi, M., Kato, M., Suzuki, H. and Nakashima, I.: Mercuric chloride induces increases in both cytoplasmic and nuclear free calcium ions through a protein phosphorylation-linked mechanism. *Free Radical Biol. Med.* 26:227-231, 1999.
 - 9) Kato, M., Liu, W., Yi, H., Asai, N., Hayakawa, A., Kozaki, K., Takahashi, M., Nakashima, I.: The herbal medicine sho-saiko-to inhibits growth and metastasis of malignant melanoma primarily developed in ret-transgenic mice through control of matrix. *J. Invest. Dermatol.* 111:640-644, 1998.
 - 10) Akhand, A. A., Kato, M., Suzuki, H., Miyata, T. and Nakashima, I. : Magnitude of HgCl₂-mediated phosphorylation of intracellular proteins determines death of thymic T-lymphocytes with or without DNA fragmentation. *J. Cell. Biochem.* 71:243-253, 1998.
 - 11) Kato, M., Takahashi, M., Akhand, A.A., Liu, W., Dai, Y., Shimizu, S., Iwamoto, T., Suzuki, H. and Nakashima, I.: Transgenic mouse model for skin malignant melanoma. *Oncogene* 17:1885-1889, 1998.
 - 12) Liu, W., Kato, M., Akhand, A.A., Hayakawa, A., Takemura, M., Yoshida, S., Suzuki, H. and Nakashima, I.; The herbal medicine sho-saiko-to inhibits the growth of malignant melanoma cells by upregulating Fas-mediated apoptosis and arresting cell cycle through downregulation of cyclin dependent kinases. *Int. J. Oncol.* 12:1321, 1998.
 - 13) Sawada, M., Imai, F., Suzuki, H., Hayakawa, M., Kanno, T., Nagatsu, T.: Brain-specific gene expression by immortalized microglial cell-mediated gene transfer in the mammalian brain. *FEBS Lett.*, 433:37-40, 1998.
 - 14) Sawada, M., Suzumura, A., Hosoya, H., Marunouchi, T., Nagatsu, T.: IL-10 inhibits both production of cytokines and expression of cytokine receptors in microglia. *J. Neurochem.*, in press, 1998.
 - 15) Suzumura, A., Sawada, M., Takayanagi, T.: Production of interleukin-12 and expression of its receptors by murine microglia. *Brain Research*, 787:139-142, 1998.
 - 16) Suzumura, A. and Sawada, M. Effects of vesnalinone on cytokine production and activation of murine microglia. *Life Sci.* in press.
 - 17) Suzumura, A., Sawada, M. and Makiuo, M. Propentofylline inhibits production of TNF α and infection of LP-BM5 murine leukemia virus in glial

cells. J. Neurovirol. in press.

18) Tanaka, M., Sawada, M., Miura, M., Marunouchi, T.: Insulin-like growth factor-I analogue prevents apoptosis mediated through an interleukin-1 β conof LP-BM5 murine leukemia virus in glial cells. J. Neurovirol. in press.

19) Niwa, H., Takeda, A., Wakai, M., Miyata, T., Yasuda, Y., Mitsuma, T., Kurokawa, K. and Sobue, G.: Accelerated formation of N ϵ -(carboxymethyl)lysine, an advanced glycation end product, by glyoxal and 3-deoxyglucosone in cultured rat sensory neurons. Biochemical and Biophysical Research Communications 248, 93-97, 1998.

20) Takeda, A., Yasuda, T., Miyata, T., Goto, Y., Wakai, M., Watanabe, M., Yasuda, Y., Horie, K., Inagaki, T., Doyu, M., Maeda K. and Sobue, G.: Advanced glycation end products co-localized with astrocytes and microglial cells in Alzheimer's disease brain. Acta Neuropathologica 95, 555-558, 1998.

老化促進ストレスと生体防御

分担研究者 磯部健一（国立療養所中部病院長寿医療研究センター部長）

老化促進ストレス刺激に対する生体防御を細胞レベルで調べた。ストレス刺激が細胞に加わると細胞は細胞周期を止め、その間に傷を修復させる。細胞周期停止は p21/WAF1 上昇を伴う。我々はその発現調節領域を詳細に検討した。細胞はまたラジカルを消去する酵素を持つ。我々は Mn-SOD 発現がストレス刺激で上昇することを示し、その上昇のメカニズムを転写レベルで明らかにした。

キーワード：老化促進ストレス、Mn-SOD, p21WAF1

A. 研究目的

外界からの様々なストレス刺激さらには内部の代謝によって生じるラジカルが DNA, 蛋白、脂肪を傷害あるいは修飾し、その蓄積として老化が促進される。現在最もよく調べられているストレス応答としては p53 を中心とするものがある。様々な外的ストレスで p53 遺伝子が活性化され、p21/WAF1 (p21)を介して細胞周期を停止し、その間に遺伝子の修復が行われることが知られている。初年度我々は p21 遺伝子発現をプロモーターレベルで検索し p21 遺伝子発現に p53 に依存しない経路が存在することを示した(1)。本年度はこれをさらに発展させ、p21 の最小プロモーター領域を決定した。また、ヒストンアセチル化剤が線維芽細胞を老化様形態に誘導することから、p21 とヒストンアセチル化との関連を追求した。生体はストレスに対する防御反応を持ち、その強弱により寿命が変化すると考えられる。特に酸化ストレスと寿命との関係は広く知られている(2)。シヨウジョウバエでカタラーゼあるいは Cu/ZnSOD を欠損させると酸素ストレスに対する抵抗性を低下させ、極端に寿命を短くさせる。我々は感染ストレス、放射線ストレスが NO ラジカルを産生し、組

織を損傷させること、それに対し生体は、SOD 遺伝子を誘導しラジカルの損傷作用を防御していることを示してきた。また、脳組織をエタノールで破壊するという外傷ストレスを加えることのみで NO ラジカルがマイクログリアより産生されそれがさらに周辺の脳神経細胞を破壊することを見いだした。この場合も SOD 遺伝子発現が脳組織にみられた。これらの実験結果をふまえ、SOD 遺伝子の発現調節機構の解明に着手した。初年度 Mn-SOD ゲノム遺伝子のクローニングに成功し、今年度はその転写活性を検討することでストレス刺激に対し生体がどのようなメカニズムで防御しているかを明らかにし、老化促進ストレス刺激に対する防御方法を考える手だてとした。

B. 研究方法

- 1、細胞老化に伴い発現の上昇する p21 プロモーターその様々なミュータントは前年度作製したものを使用した。Sp1 ファミリー遺伝子、p300 遺伝子を CMV ベクターに組み込み、遺伝子移入で NIH3T3 細胞に発現させた。
- 2、マウスゲノムライブラリーより Mn-SOD 遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定後、ルシフェラーゼアッセイ様の pGL3 レポータ

一ベクターに組み込んだ。組み換え技術を用いて、プロモーター領域を5'側から欠損させた。また、第二イントロンをエンハンサー領域に組み込んだ。繊維芽細胞として NIH3T3 をマクロファージ細胞として RAW264 を培養し、感染ストレス刺激として、TNF- α , IL-1 β , LPS, IFN- γ を加え、Mn-SOD の mRNA をノザン解析で検索した。また、Mn-SOD を含むベクターを遺伝子移入し、転写活性をルシフェラーゼアッセイで測定した。また、C/EBP, NFkB 遺伝子を CMV に組み込み、遺伝子移入により NIH3T3, RAW264 細胞に発現させた。3、細胞から核蛋白質を抽出し、ゲルシフト法にて転写因子の検討を行った。

C. 研究結果

1. NIH3T3 細胞はヒストンアセチル化剤 (TSA) により老化様形態を示し、強い p21 mRNA 上昇と p21 プロモーター活性の上昇を示した。未刺激あるいは TSA 刺激に対する p21 コアプロモーター活性は転写開始点から上流-100bp 内にあり、SP1 あるいは SP3 の遺伝子移入で上昇した。また、ヒストンアセチル化阻害剤の遺伝子 p300 の遺伝子移入でも上昇した。p300 のドミナントネガティブ体の遺伝子移入ではプロモーター活性が低下した。以上の結果は p53 を欠損する 10(1) マウス繊維芽細胞でも同様にみられこの p21 の上昇は p53 非依存性であった。

2. NIH3T3 細胞あるいは RAW264 細胞を感染ストレス刺激である IL-1 β , TNF- α , LPS, IFN- γ で刺激すると Mn-SOD mRNA の発現増強がみられた。これに対応する Mn-SOD の転写活性を調べるため、まず転写開始点上流 6Kb のルシフェラーゼ活性を測定した。GC-rich 領域に非刺激のコアプロモーター活性が存在する

ことが判明したが、刺激にはわずかな上昇が見られるのみであった。ストレス刺激に反応する領域は第2イントロンにみられ、NFkB サイトを塩基置換するとルシフェラーゼ活性は著しく低下した。隣接する C/EBP サイトの塩基置換でも活性は低下した。NFkB 遺伝子を細胞内移入で発現させるとルシフェラーゼ活性は著明に増加した。

D. 考察

1、細胞老化はまず細胞の分裂停止にはじまる。このことのメカニズム解明を進め、ヒストンのアセチル化の重要性を見いだした。同時に p21 転写の上昇が p53 非依存的に生じる経路が存在することも見だし、新しい経路を検索中である。分裂停止後も細胞は生き続けるが、この場合老化を促進させるものとして代謝によって生じるラジカルや外的ストレス刺激が重要となる。

2、Mn-SOD は活性酸素を消去する。我々は感染ストレス刺激が Mn-SOD の遺伝子発現に重要な役割をもつことを見いだした。免疫系の他の遺伝子の転写因子として重要な役割をもつ NFkB が Mn-SOD の転写に最も重要な転写因子であることを発見した。SOD 遺伝子導入ジョウジョウバエの寿命が延長すること、SOD 遺伝子ノックアウトマウスが早死にすることが報告されているが、ストレス刺激によりあるいは代謝により産生される酸素ラジカルを消去すべく個体は Mn-SOD 発現をあげることは老化の生体防御を考える大きなヒントとあるだろう。

E. 結論

1、p21 WAF1 は細胞老化で上昇する。アセチル化剤は細胞老化のモデル実験系となった。

p21WAF1 転写には Sp1 ファミリーが不可欠であった。

2、感染ストレスで発現の上昇する Mn-SOD の転写には NFκB が最も重要な役割をもつ。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) H. Xiao, T. Hasegawa, and K. Isobe, Both Sp1 and Sp3 are responsible for p21WAF1 promoter activity induced by histone deacetylase inhibitor in NIH3T3 cells, *J Cell Biochem*, 1999 in press.

2) T. Hasegawa, H. Xiao, and K. Isobe, Cloning of a GADD34-like gene that interacts with the zinc-finger transcription factor which binds to the p21WAF promoter, *Biochem Biophys Res Commun*, 1999 in press.

3) Takeuchi A, Isobe K, Miyaiishi O, Sawada M, Fan Z-H, Nakashima I and Kiuchi K. Microglial NO induces delayed neuronal death following acute injury in the striatum. *Eur. J. Neuroscience*. 10:1613-1620, 1998.

4) Kato, M., Liu, W., Akhand, A. A., Dai, Y., Ohbayashi, M., Tuzuki, T., Suzuki, H., Isobe, K., Takahashi, M. and Nakashima, I.: Linkage between melanocytic tumor development and early burst of Ret protein expression for tolerance induction in metallothionein-I/ret transgenic mice. *Oncogene*. 18:837-842, 1999.

2、学会発表

1) 肖 恒怡、長谷川忠男、宮石 理、磯部健一 p21/WAF1 プロモーター解析—第2報 基礎老化学会 1998年6月

2) 前原佳代子、長谷川忠男、阿部量一、武内章英、肖恒怡、磯部健一 ラジカル消去蛋白マンガンスーパーオキシドジスムターゼ

(Mn-SOD) の遺伝子発現調節 基礎老化学会 1998年6月

3) 前原佳代子、長谷川忠男、磯部健一 RAW264.7cell における MnSOD 遺伝子転写の解析 第28回日本免疫学会総会 1998年12月

4) 武内章英、宮石理、磯部健一、中島泉 脳損傷部周囲に誘導されるSOD遺伝子による遅発性神経細胞死の阻害 第28回日本免疫学会総会 1998年12月

5) 磯部健一、肖恒怡、長谷川忠男、ヒストンアセチル化剤による p21WAF プロモーター解析、第21回日本分子生物学会年会 1998年12月

6) 前原佳代子、長谷川忠男、武内章英、肖恒怡、磯部健一、NIH3T3 cell における Mn-SOD 遺伝子転写の解析、第21回日本分子生物学会年会 1998年12月

老化促進ストレスと遺伝子発現

分担研究者 長谷川忠男 (国立療養所中部病院長寿医療研究センター室長)

老化促進ストレス刺激により様々な遺伝子が誘導される。それらの遺伝子の中で GADD34 遺伝子に注目し、その機能を解明する目的で遺伝子産物と結合する蛋白質のクローニングを試み、得られた cDNA の解析を行った。GADD34 自身は Zn-finger 型転写因子、BFCOL1 の DNA 結合能に関与することが明らかになり、ツーハイブリッド法で得られた熱ショック蛋白 40 ファミリー遺伝子は GADD34 とともに DNA 傷害性の薬剤により発現が誘導された。

キーワード：老化促進ストレス、GADD ファミリー遺伝子、熱ショック蛋白 40

A. 研究目的

老化は外界からの様々な刺激により促進され、それに対する生体側の防御反応の強弱が寿命に関係し、老化促進ストレス刺激（薬物、放射線、微生物感染、ラジカル等）により誘導される遺伝子が老化に重要な役割を果たしていると考えられる。事実線虫やショウジョウバエで寿命が延長する系統はストレス刺激に対して抵抗性を示す。我々はストレス刺激によりどのようなシグナルが細胞内に入りどのような遺伝子が誘導されるのか、その誘導される遺伝子の発現機序、生物学的機能を明らかにすることが老化のメカニズムを解明し最終的には老化の予防につながると考えている。

我々はマウス I 型コラーゲン遺伝子プロモーターの GC-rich シークエンスに結合する転写因子 BFCOL1 をクローニングし 1)、その遺伝子産物と結合する GADD ファミリーの遺伝子をクローニングした 2)。GADD ファミリー遺伝子には GADD34, GADD45 などがあり、いずれも薬剤や放射線などのいわゆる growth arrest and DNA damage 刺激により誘導される一連の遺伝子である 3-6)。今回我々は新しくクローニングした GADD ファミリー遺伝子に注目しこの遺伝子構

造を明らかにするとともに、その生物学的機能を解明する目的でこれと関連する蛋白のクローニングを行った。

B. 研究方式

1. 我々がクローニングした BFCOL1 遺伝子 1) を *in vitro* transcription, translation の系、あるいは GST-fusion の系にて蛋白合成し、p21 近位プロモーターへの結合をゲルシフト法にて解析した。同様に GADD34 蛋白を作成し、BFCOL1 の DNA 結合に対する影響を解析した。GADD34 遺伝子のストレス刺激に対する応答をみるため 10% 牛血清下で培養した NIH3T3, p53 欠損株である 10(1)細胞に methyl methane sulfonate(MMS)を投与し経時的に RNA を抽出し mRNA レベルをノザン法にて解析した。
2. GADD34 遺伝子産物と生体内で結合する蛋白質のクローニングを two hybrid 法を用いて行った。この遺伝子 cDNA を酵母内で GAL4 転写因子の DNA 結合ドメインとの融合蛋白が発現するベクターに組み込んだ後、Y190 酵母にトランスフォーメーションした。トランスフォーメーションした酵母に更に GAL4 の転写活性ドメインとの融合蛋白を発現する cDNA ライブラリー

をトランスフォーメーションしヒスチジン要求性を指標として発育のよい酵母を選択した。酵母からライブラリーcDNAを抽出し確認のためのトランスフォーメーションを再度行い、再び陽性となったcDNAのシーケンスを行った。酵母内以外での *in vitro* での結合を確認するために GST との融合蛋白、35S でラベルした蛋白質を作成し混合させた後、洗い SDS ページにて分離し、結合の有無を確認した。あるいは培養細胞内での結合を確認するため GADD34 遺伝子と得られた cDNA を pACT, pBIND の *in vivo* two hybrid 用のベクターに組み込み NIH3T3 細胞にトランスフェクションした後、ルシフェラーゼ活性を指標として解析した。更に得られた cDNA の DNA 傷害性薬剤投与の際の発現誘導をノザン法にて定量した。一部の cDNA は NIH3T3 細胞にトランスフェクションし、細胞増殖に対する影響を WST-1 法にて解析した。

C. 研究結果

1. 細胞老化に重要な役割を果たしている p21 の発現誘導には近位プロモーターの GC-rich な領域が重要であることが我々の研究で明らかになった(7, 8)。Sp1 ファミリーが最も重要な転写因子であることが示唆されたが、他の GC-rich なシーケンスに結合する転写因子の関与も考えられたため、我々が独自に得ていた転写因子 BFCOL1 が関与しているか否かを検討した。ゲルシフト法にてシーケンス特異的な結合が確認された。我々の GADD34 クローンは BFCOL1 の DNA 結合領域を含む cDNA を bait として two hybrid 法にてクローニングされたものである。次に GADD34 産物の BFCOL1 転写因子の DNA 結合能に及ぼす影響を同じくゲルシフト法にて解析した。*in vitro* で作られた GADD34 を BFCOL1 とラベルした DNA との反応液に加

えたところ dose dependent に結合の阻害が観察された。次に GADD34 は p53-independent に誘導されるとの報告があったが、その確認のため NIH3T3 細胞と p53 の欠損株、10(1)細胞に MMS を投与し mRNA レベルをノザン法にて解析した。両細胞とも投与後わずか1時間で著名な誘導が確認され、4 から 8 時間後においても誘導は持続していた。

2. GADD34 遺伝子のストレス刺激における生物学的機能を探るため、遺伝子産物と結合する蛋白質のクローニングを行った。5 クローンが two hybrid 法上ポジティブであることが確認された。シーケンスを行ったところ 2 クローンがトランスリン 9), 1 クローンは IK10) と呼ばれる 2 型組織適合抗原の発現を調節する因子と相同性のある遺伝子であるが過去に報告されている物の約 2 倍長の cDNA であった(G34BP と命名)。1 クローンはキネシンファミリーに属する KIF311) の C 末端部分、更にもう一つのクローンはヒトの HLJ112) とよばれる熱ショック蛋白 40 ファミリー遺伝子のマウスホモログと考えられ、GAHSP40 と命名した。*in vitro* の結合、培養細胞内での結合を解析したところすべて GADD34 との結合が確認された。GAHSP40 のみが MMS 投与により発現誘導が GADD34 と同様に認められたが、他のクローンは変動がなかった。GAHSP40 は熱ショックにても顕著な誘導が確認されたが、この際、GADD34 も程度は低いものの誘導が認められた。最後に GA34BP は NIH3T3 にトランスフェクションすると細胞増殖が阻害され、GADD34 も細胞にトランスフェクションすると同様の現象が認められ、相互関連を現在解析中である。

D. 考察

GADD34 の機能はその一部の領域がヘルペスウ

イルスのある cDNA 配列と相同性があるためそこから推定される蛋白合成の shut off を阻害する機能が考えられているが、未だ確固たる結論は得られていない。今回始めて GADD34 の機能を示唆する結果を得た。すなわち転写因子の DNA に対する結合能を修飾することである。Zn-finger 型の転写因子 BFCOL1 のみの結果であるが、Sp1 ファミリーも Zn-finger 構造を持っているため、これに対する影響も考えられる。事実プレリミナリーではあるがそれを示唆する結果を得ている。もし GADD34 がこの DNA 結合を修飾することにより転写調節に関わっているならば、GADD153 といった転写因子そのものもあるが、新たなストレス応答と転写の関係が明らかになるであろう。更に間接的ではあるが GADD34 の機能を探る目的で GADD34 と蛋白質レベルで結合する cDNA をクローニングし 4 クローンが得られた。トランスリンはリンパ腫発生の際に認められる染色体の転座部位の一本鎖 DNA に結合する遺伝子であり、ストレス刺激における DNA 傷害との関係が示唆された。KIF3 はストレス刺激における細胞分裂に関与している可能性があった。熱ショック蛋白 40 ファミリー遺伝子 GAHSP40 は、MMS 処理により GADD34 と同様に発現誘導され、DNA 傷害に対して GADD34 と関連してストレス応答を司っている可能性が予想された。今後はこれらの遺伝子の相互作用を更に解析するとともに、老化に伴いこれらの発現がいかに変動するかが明らかにすべき問題である。

E. 結論

ストレス刺激により誘導される遺伝子群のうち、今回 GADD34 遺伝子ファミリーに注目し解析した。GADD34 遺伝子は転写因子の DNA 結合能を修飾することにより転写に影響を与える可

能性が示唆された。それ以外の生物学的機能を探るため、遺伝子産物と結合する蛋白質のクローニングを行い、トランスリン、IK 類似遺伝子 (GA34BP)、キネシンファミリーに属する KIF3、熱ショック蛋白 40 ファミリー遺伝子 (GAHSP40) という四つのクローンを得た。今後これらの遺伝子産物の相互作用を更に解析し、遺伝子発現制御を明らかにすることで老化のメカニズム解明の一助となり、薬剤などのストレス刺激に対する防御機構の詳細な解明につながると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① T. Hasegawa, H. Xiao, and K. Isobe, Cloning of a GADD34-like gene that interacts with the zinc-finger transcription factor which binds to the p21WAF promoter, *Biochem Biophys Res Commun*, 1999 in press.
- ② H. Xiao, T. Hasegawa, and K. Isobe, Both Sp1 and Sp3 are responsible for p21WAF1 promoter activity induced by histone deacetylase inhibitor in NIH3T3 cells, *J Cell Biochem*, 1999 in press.
- ③ 長谷川忠男、線維化疾患と I 型コラーゲン遺伝子発現、*現代医学* 46: 147-152, 1998.

2. 学会発表

- ④ 長谷川忠男、木村祐子他、薬剤刺激ストレスによる gadd34 関連遺伝子発現、第 21 回日本基礎老化学会大会、1998.
- ⑤ 長谷川忠男、磯部健一、ストレス刺激と転写因子、第 1 回ストレスと老化シンポジウム、1998.
- ⑥ 長谷川忠男、木村祐子他、ストレス刺激のより誘導される gadd34 関連遺伝子の機能解析、第 28 回日本免疫学会総会、1998.
- ⑦ 長谷川忠男、木村祐子他、gadd34 遺伝子産物

と結合し薬剤刺激により誘導されるマウス Hsp40 ファミリー遺伝子のクローニング、第2
1回日本分子生物学会年会、1998.

老化促進ストレスとシグナル伝達

分担研究者 中島 泉 名古屋大学医学部教授

がん遺伝子制御機構の加齢に伴う破綻の機構を解析するための実験動物モデルを樹立するとともに、そのモデルにおける加齢効果と遺伝子および環境ストレス（紫外線）の関係を示した。

キーワード：がん遺伝子制御、加齢効果、環境ストレス、紫外線

A. 研究目的

老化は、遺伝子の相互規制によるホメオスタシスが加齢に伴う環境ストレス効果の蓄積によって破綻することで進行すると推定される。本研究では、環境ストレスによる細胞内情報伝達修飾の分子レベルの機序を解明し、最終的には生体レベルの老化促進機構の解明をめざす。筆者らは、現在までの研究で、

(1) 環境ストレスの直接的な作用点の一つが細胞膜から核に至る細胞内情報伝達の起始部にあることを重金属ストレスモデルにおいて示し、

(2) そのモデル等において、非受容体型チロシンキナーゼ p60src (Src) の活性が従来から知られるC末端チロシン残基(Y527)のリン酸化・脱リン酸化とは独立の新たなレドックス機序で調節されることを明らかにした。

(3) また、immunosenescence の成立機序に関し、情報伝達分子 PKC α 遺伝子の発現制御機構を加齢とともに破綻させる環境酸化ストレスの作用点を解析できるトランスジェニックモデルを樹立した。

今年度は、(1) これらの研究の一層の展開を目指すとともに、以下の(2)から(4)を目的とした。

筆者らは、先に RET がん遺伝子チロシンキ

ナーゼ遺伝子のトランスジェニックマウ

ス系を樹立したが、このマウス系における RET 遺伝子の発現と活性のレベルは加齢とともに変化することから、がん遺伝子制御機構の加齢に伴う破綻の機序を遺伝子と環境ストレスの作用を比較して解析できる良いモデルとなると考えられた。そこで、(2) このモデルのさらなる整備を試みるとともに、そのモデルにおいて、(3) 出生時に働く遺伝子と環境ストレスが加齢効果に及ぼす影響を明らかにし、(4) 環境ストレスの一つである紫外線が、がん遺伝子制御機構の加齢に伴う破綻にどのような係るかを解明することを目指した。

B. 研究方法

(1) ウェスタンブロット、免疫沈降、試験管内キナーゼアッセイなどの各種方法を用いて、酸化ストレスによって細胞内に導入されるシグナルの解析を行った。

(2) 先に筆者らが樹立した RET がん遺伝子 (RFP-RET: プロトオンコジン c-RET と DNA 結合蛋白遺伝子 RFP のハイブリッドである活性型のがん遺伝子) トランスジェニックマウス 304 系では、出生時に黒色皮膚を呈し、加齢とともに良性のメラノサイト系腫瘍 (ネーブス) が発生するが、こ

の腫瘍は加齢によって悪性変異することはない。この304系をC57BL/6系にバッククロスして新しい系の樹立をめざした。

(3) 筆者らが樹立した3系統のRETがん遺伝子トランスジェニックマウスのうち、304系と192系では皮膚の黒色化に加えて加齢とともにメラノサイト系腫瘍が発生するのに対して、242系では皮膚の黒色化はおこるが腫瘍は発生しない。この遺伝的背景を探る目的で、出生前後のRETがん遺伝子の発現レベルをウエスタンブロット法で解析し、Ret抗原に対する免疫応答または免疫寛容とがん遺伝子制御機構の破綻の関係を調べた。

(4) RET 遺伝子トランスジェニックマウス192系では、304系の場合と同様出生時に黒色皮膚を呈し、加齢とともにメラノサイト系腫瘍が発生するが、この腫瘍は加齢によって悪性変異することはない。この良性的腫瘍に紫外線を照射し、細胞内のRetチロシンキナーゼの発現と活性のレベルをウエスタンブロット法または試験管内キナーゼアッセイ法により測定した。同時に、腫瘍の増殖や悪性変異への紫外線照射の影響を加齢因子との関連で調べた。

C. 研究結果

(1) 重金属ストレスによりTリンパ球にアポトーシスが誘導される場合の情報伝達経路を解析し、チロシンキナーゼの活性化に続いて細胞内Ca²⁺濃度の上昇とShc, MAPキナーゼ, Fos/Junの活性化が誘導されることを示した。

(2) RETがん遺伝子トランスジェニックマウス304系は、もともとBALB/cとC57BL/6のF1のバックグラウンドを持つが、この系

をC57BL/6(B6)系にバッククロスすると、メラノサイト系腫瘍の発生と増殖が促進され、逆に、BALB/cとバッククロスすると、その発生と増殖が抑制された。そこで、304系を反復してB6系にバッククロスしたところ、そのマウスに発生する腫瘍は、加齢とともに組織学的にヒトの悪性メラノーマに酷似し転位も見られる腫瘍に変異するようになった。この系を304/B6系と命名した。本系は他の系と比較解析することで、がん遺伝子制御機構の加齢に伴う破綻に関する遺伝因子の解析を進める上で有用であると考えらる。

(3) 加齢とともにメラノサイト系腫瘍が発生するRETがん遺伝子トランスジェニックマウス304系と192系およびそうした腫瘍が発生しない242系について、出生前後のRETがん遺伝子の発現レベルを比較解析した。その結果、304系と192系では出生直後に、242系では出生6日目に一過性に強くRet抗原が発現することを認めた。この現象とリンクして、Ret抗原に対する免疫寛容が304系と192系で成立するのに対し、242系では成立しないことが、Tリンパ球のRet抗原に対する試験管内増殖応答試験で明らかとなった。これはRet抗原の発現を調節する遺伝的機序が免疫系への作用を介してがん遺伝子発現制御機構の加齢に伴う破綻を規制していることを示す。

(4) RETがん遺伝子トランスジェニックマウス192系に発生する良性的メラノサイト系腫瘍は、加齢によっても悪性には変異しない。この系のマウスに発生した良性的腫瘍に、6ヶ月間にわたって合計4950kJの紫外線(UVB)を反復照射して影響

を調べた。その結果、この紫外線の照射によって RET がん遺伝子の発現制御機構が破綻し、腫瘍細胞内の RET がん遺伝子が強く発現するようになることが見いだされた。Ret 蛋白の一定蛋白量あたりのチロシンキナーゼ活性のレベルを比較したところ、RET がん遺伝子産物 (Rfp/Ret) の活性はプロトオンコジン c-RET の産物 (c-Ret) のそれより高く、Rfp-Ret の活性は紫外線照射によってさらに増加することを認めた。こうした変化に伴って良性のメラノサイト系腫瘍から転移を伴う悪性メラノーマが出現した。この結果は、本来遺伝的に制御されている活性型のがん遺伝子の発現と活性が環境ストレスによって破綻することが、加齢に伴う遺伝子性のがんの発がんに重要な役割をするという新しい考え方を支持する。

D. 考察

本年度に得られた成果から、酸化ストレスシグナルの細胞内伝達経路に新たな所見を加えるとともに、がん遺伝子の発現制御機構とその加齢に伴う破綻の機序を遺伝子と環境ストレスの作用の両面から解明するための実験動物モデルを確立することができた。同時にこのモデルでの解析の結果、腫瘍の進展に関わる加齢効果が遺伝子と環境ストレスの従来報告されていない新たなレベルの相互作用が含まれることを示唆した。

E. 結論

- 1) 酸化ストレスによる細胞内シグナル伝達経路の一部を明らかにした。
- 2) がん遺伝子の発現制御機構の破綻に関わる加齢因子を解析するトランスジェニックマウスモデルを樹立した。

3) 上記モデルにおいて、出生時がん遺伝子の発現調節と加齢効果の関係を示した。

4) 上記モデルにおいて、がん遺伝子の発現制御に関する加齢効果と環境ストレス（紫外線）の関係を示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

① Nakashima, I., Akhand, A.A., Pu, M., Kato, M., Hamaguchi, M., Senga, T., Miyata, T., Suzuki, H., Parashah, A., Du, J., Liu, W. and Umeda, Y.: Redox-oriented chemical events in signal transduction in cells. In Redox Regulation of Cell Signaling and its Clinical Applications (Eds, J. Yodoi and L. Packer), Marcel Dekker, Inc., in press.

② 中島 泉:酸化ストレスとシグナル伝達「生体応答学の新展開」医学のあゆみ別冊、印刷中

③ 中島 泉:環境応答と非レセプター型チロシンキナーゼ「環境応答・適応の分子機構」蛋白質、核酸、酵素 増刊号、印刷中

④ Kato, M., Liu, W., Akhand, A. A., Dai, Y., Ohbayashi, M., Tuzuki, T., Suzuki, H., Isobe, K., Takahashi, M. and Nakashima, I.: Linkage between melanocytic tumor development and early burst of Ret protein expression fortolerance induction in metallothionein-I/ret transgenic mice. Oncogene.18:837-842, 1999.

⑤ Asai, M., Kato, M., Asai, N., Iwashita, T., Murakami, H., Kawai, K., Nakashima, I. and Takahashi, M.: Differential regulation of MMP-9 and TIMP-2 expression in malignant melanoma developed in metallothionein/RET transgenic mice.

Jpn. J. Cancer Res. 90:86-92, 1999.

⑥ Akhand, A.A., Kato, M., Suzuki, H., Liu, W., Du, J., Hamaguchi, M., Miyata, T., Kurokawa, K. and Nakashima, I.: Carbonyl compounds cross-link cellular proteins and activate protein-tyrosine kinase p60c-src J.Cell. Biochem. 72:1-7, 1999.

⑦ Parashar, A., Akhand, A.A., Rawar, R., Furuno, T., Nakanishi, M., Kato, M., Suzuki, H. and Nakashima, I.: Mercuric chloride induces increases in both cytoplasmic and nuclear free calcium ions through a proteinphosphorylation-linked mechanism. Free Radical Biol. Med. 26:227-231, 1999.

⑧ Takeuchi, A., Isobe, K., Miyaishi, O., Sawada, M., Fan, Z.-H., Nakashima, I. and Kiuchi, K.: Microglial NO induces delayed neuronal death following acute injury in the striatum. Eur. J. Neuroscience. 10:1613-1620, 1998.

⑨ Kato, M., Liu, W., Yi, H., Asai, N., Hayakawa, A., Kozaki, K., Takahashi, M., Nakashima, I.: The herval medicine sho-saiko-to inhibits growth and metastasis of malignant melanoma primarily developed in ret-transgenic mice through control of matrix. J. Invest. Dermatol. 111:640-644, 1998.

⑩ Akhand, A. A., Kato, M., Suzuki, H., Miyata, T. and Nakashima, I. : Magnitude of HgCl₂-mediated phosphorylation of intracellular proteins determines death of thymic T-lymphocytes with or without DNA fragmentation. J. Cell. Biochem. 71:243-253, 1998.

⑪ Kato, M., Takahashi, M., Akhand, A.A., Liu, W., Dai, Y., Shimizu, S., Iwamoto, T., Suzuki, H. and Nakashima, I.: Transgenic mouse model for skin malignant melanoma. Oncogene 17:1885-1889, 1998.

⑫ Liu, W., Kato, M., Akhand, A.A., Hayakawa, A., Takemura, M., Yoshida, S., Suzuki, H. and Nakashima, I.; The herbal medicine sho-saiko-to inhibits the growth of malignant melanoma cells by upregulating Fas-mediated apoptosis and arresting cell cycle through downregulation of cyclin dependent kinases. Int. J. Oncol. 12:1321, 1998.

⑬ 加藤昌史、中島 泉、高橋雅英：悪性黒色腫およびヒルシュレブリング病の失陥モデルマウス 病理と臨床 16:1149-1152, 1998

2. 学会発表

① Nakashima, I., Akhand, A. A., Pu, M., Liu, W., Kato, M., Suzuki, H., Hamaguchi, M. and Miyata, T. : Oxidative stress and signal transduction. International Symposium on Oxidative Stress. Valdivia, Chile. 1998.

② Akhand, A. A., Kato, M., Suzuki, H., Hamaguchi, M., Miyata, T., Kurokawa, K. and Nakashima, I.: Signal transduction into murine T lymphocytes and fibroblasts after chemical stimulation. International Congress of Immunology, New Delhi, 1-6 November, 1998 (The Immunologists, Supplement 1, p391)

③ Kato, M., Liu, W., Dai, Y., Akhand, A.A., Ohbayashi, H., Suzuki, H., Takahashi, M. and Nakashima, I.: Early burst of Ret protein expression for tolerance induction determines tumor development in ret-transgenic mouse

lines. International Congress of Immunology, New Delhi, 1-6 November, 1998

(The Immunologists, Supplement 1, p209)

④ Takeuchi, K., Kato, M., Akhand, A. A., Liu, W., Nimura, Y. and Nakashi

ma, I.: Acrolein induces apoptotic death of murine thymocytes.

International Congress of Immunology, New Delhi, 1-6 November, 1998 (The

Immunologists, Supplement 1, p.389)

⑤ Akhand, A. A., Kato, M., Suzuki, H., Liu, W., Du, J., Hamaguchi, M., M

iyata, T., Kurokawa, K. and Nakashima, I.: Glyoxal cross-links cellular

proteins and activates non-receptor protein-tyrosine kinases in T

lymphocytes and fibroblasts. 第28回日本免疫学会総会 1998.

⑥ Du, J., Suzuki, H., Nagase, F., Akhand,

A.A., Yokoyama, T. and Nakash

ima, I.: Mercuric chloride induces proliferation of CTLL-2 through an

IL-2-independent signaling pathway. 第28回日本免疫学会総会 1998.

⑦ Kato, M., Dai, Y., Akhand, A.A., Takeuchi, K., Yoshihara, M., Takeda,

K., Suzuki, H. and Nakashima, I.: Sho-saiko-to suppresses growth and

metastasis of melanoma developed in ret-transgenic mice. 第28回日本免疫学

会総会 1998.

⑧ 加藤昌志、中島泉: UVストレスとシグナル伝達。「ストレスと老化シンポジウ

ム」, 大府、1998