

性酸素種産生を考慮に入れ、抗酸化物質による影響についても検討を行った。

## B. 研究方法

1. MT-III mRNA 発現を検討するグリア細胞としては、マウスグリア細胞株 (VR-2g) を用いた。この細胞はグリア細胞の骨格蛋白である glial fibrillary acidic protein (GFAP) 陽性で、且つ神経栄養因子を発現する。この VR-2g 細胞を  $2.5 \times 10^4 / \text{cm}^2$  で播き込み 24 時間培養後、薬剤を添加した。

2. MT-III mRNA 発現を調べるため、VR-2g 細胞より total RNA を AGPC 法にて抽出し、さらに DNaseI 処理した RNA を、マウス MT-III cDNA より設計したプライマーを用いて RT-PCR 反応を行った。また、PCR 反応の内部標準として glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) mRNA を同時に増幅させた。PCR 反応の際、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  を取り込ませ、得られた PCR 増幅産物をポリアクリルアミド電気泳動後、バイオイメージングアナライザー (Fuji Bas 2000) にて MT-III mRNA 発現量を定量的に解析した。なお、RT-PCR 反応に用いる RNA 量および cycle 数は、PCR 増幅産物が mRNA 発現量と比例関係を示す範囲内で設定した。

3. DA 作用時の MT-III mRNA 発現量の経時的変化を観察するため、DA (100  $\mu\text{M}$ ) を VR-2g 細胞へ添加後 12, 24, 48, 72 時間後に RNA を抽出した。

4. DA の他にドパミン系化合物として 6-hydroxydopamine (6-OHDA) を 0~200  $\mu\text{M}$  の濃度で 24 時間作用させた後の MT-III mRNA 発現量を調べた。

5. DA レセプターアゴニストとして、SKF38393 (D1 アゴニスト; 0.001~0.1  $\mu\text{M}$ ) および bromocriptine (D2 アゴニスト; 0.01~1  $\mu\text{M}$ ) を用いた。また、DA レセプターアンタゴニストとして、SCH23390 (D1 アンタゴニスト; 50,100  $\mu\text{M}$ ) および sulpiride (D2 アンタゴニスト; 188,376  $\mu\text{M}$ ) を用い、DA

(100  $\mu\text{M}$ ) を添加する 30 分前に作用させた。  
6. 抗酸化物質として還元型グルタチオン (GSH; 250~750  $\mu\text{M}$ )、アスコルビン酸 (AA; 0.1~0.5  $\mu\text{M}$ )、ビタミン E (VE;  $\alpha$ -(+) tocopherol) (VE; 50~100  $\mu\text{M}$ ) を用い、DA (100  $\mu\text{M}$ ) とほぼ同時に添加し共存下で培養した。

## C. 研究結果

1. DA による MT-III mRNA 発現量の経時的変化

DA (100  $\mu\text{M}$ ) 添加後 12, 24, 48, 72 時間後の MT-III mRNA 発現量の変化は、無添加の場合と比較して、24 時間後に最も MT-III mRNA 発現量が増加していた。また、DA 無添加の状態でも細胞の増殖に伴い MT-III mRNA の発現量は徐々に増加していた (Fig.1)。

2. 6-OHDA による MT-III mRNA 発現量の変化

6-OHDA (0~200  $\mu\text{M}$ ) 添加 24 時間後の MT-III mRNA 発現量は 50  $\mu\text{M}$  添加時が最も高く、0  $\mu\text{M}$  と比較して約 2 倍になっていた (Fig.2)。

3. DA レセプターアゴニストによる MT-III mRNA 発現量の変化

SKF38393 (D1 アゴニスト; 0.001~0.1  $\mu\text{M}$ ) および bromocriptine (D2 アゴニスト; 0.01~1  $\mu\text{M}$ ) を 24 時間作用させた後の MT-III mRNA 発現量は control とほとんど変わらなかった (Fig.3)。

4. DA による MT-III mRNA 発現量の増加に対する DA レセプターアンタゴニストの影響

SCH23390 (D1 アンタゴニスト; 50,100  $\mu\text{M}$ ) および sulpiride (D2 アンタゴニスト; 188,376  $\mu\text{M}$ ) を DA (100  $\mu\text{M}$ ) 添加の 30 分前に添加したが、DA によって MT-III mRNA が約 2 倍に増加するのをいずれのアンタゴニストも抑制しなかった (Fig.4)。

5. DA による MT-III mRNA 発現量の増加に対する抗酸化物質の影響

いずれの抗酸化物質によっても DA による MT-III mRNA の発現量の増加が抑えられたが、中でも GSH 750  $\mu$  M によって完全に増加が抑えられた (Fig.5).

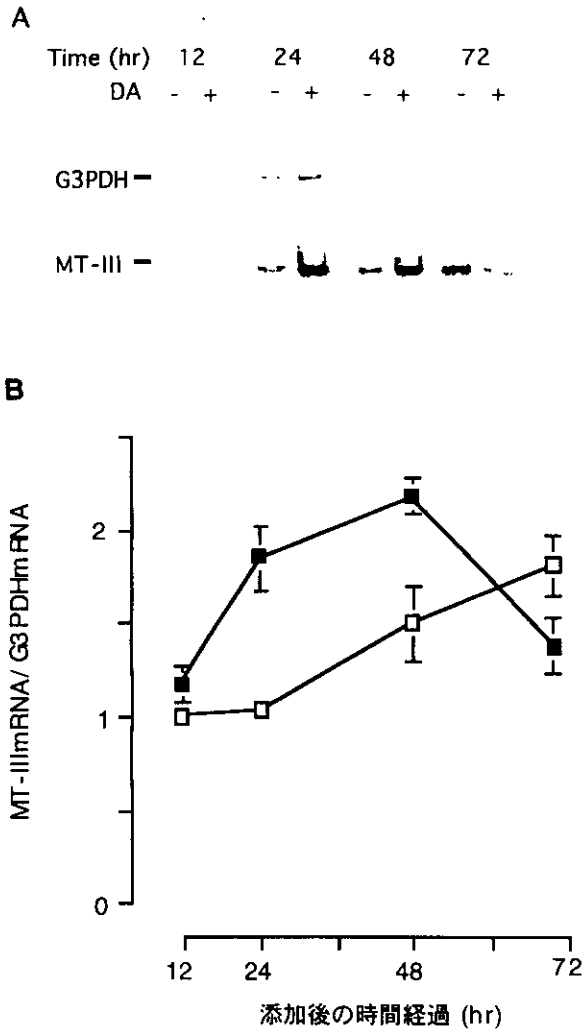


Fig 1 DA 添加後の MT-III mRNA 発現量の経時変化

A : MT-III mRNA 発現量の経時変化 (BAS2000 による) B : 解析結果 ■ : DA (100  $\mu$  M) 添加, □ : 無添加 (結果は無添加 12 時間後の発現量を 1 とした数値の mean  $\pm$  S.D (n=4) で表示した. )

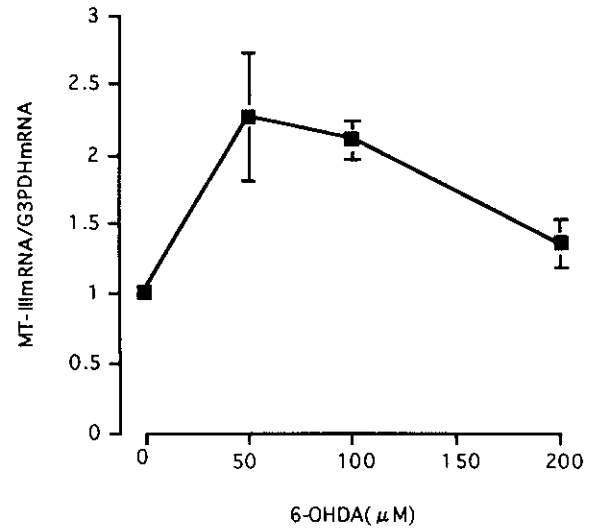


Fig. 2 6-OHDA 添加時の MT-III mRNA 発現量の変化 (結果は無添加の発現量を 1 とした数値の mean  $\pm$  S.D. (n=4) で表示した. )

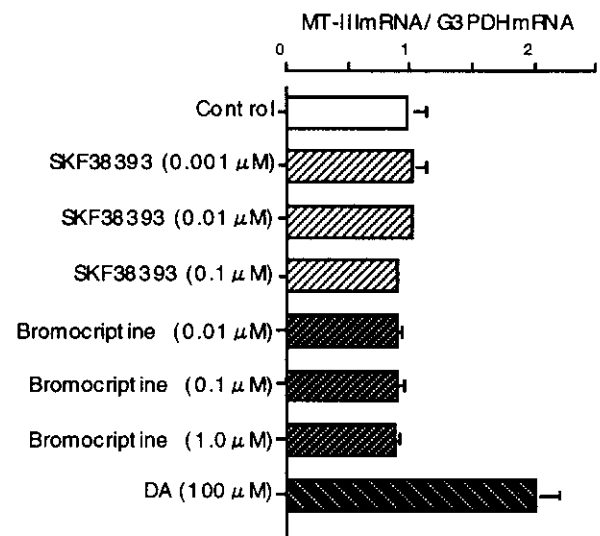


Fig.3 DA アゴニスト添加時の MT-III mRNA 発現量 (結果は control の発現量を 1 とした数値の mean  $\pm$  S.D. (n=4) で表示した. )

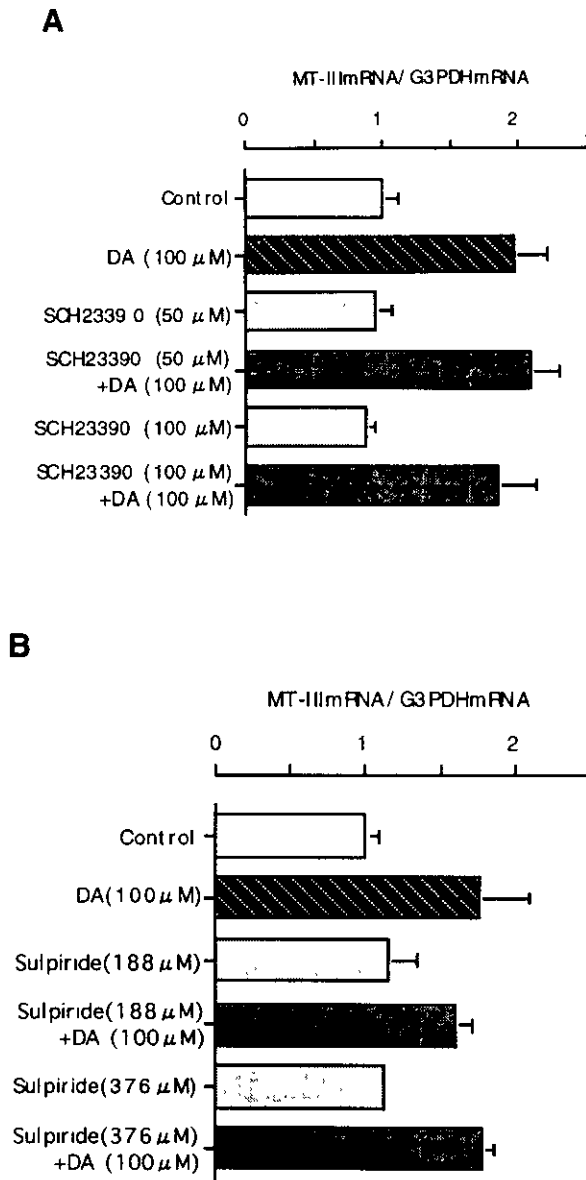


Fig 4 DA アンタゴニストの MT-III mRNA 発現誘導に対する影響  
 A: D1 アンタゴニスト, B: D2 アンタゴニスト (結果はそれぞれの control の発現量を 1 した数値の mean ± S.D. (n=4) で表示した.)

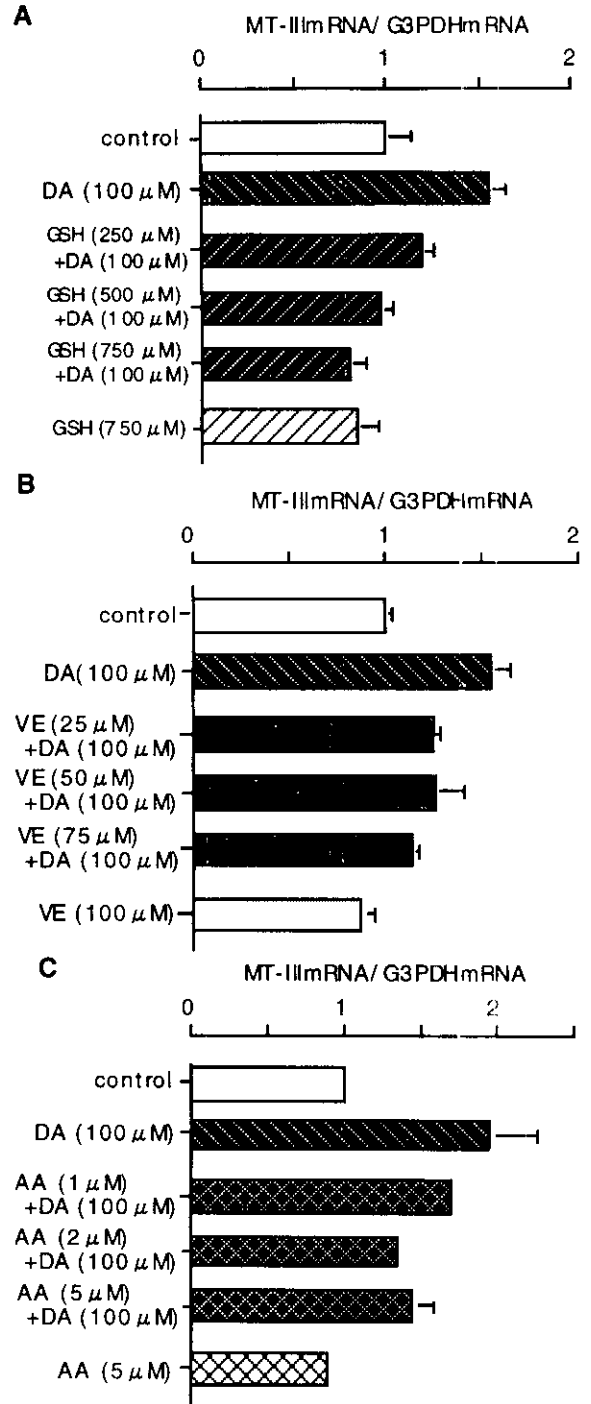


Fig 5 抗酸化物質共存下での DA による MT-III mRNA 発現誘導の変化  
 A: 還元型グルタチオン (GSH), B: ビタミン E (VE), C: アスコルビン酸 (AA) (結果はそれぞれの control の発現量を 1 した数値の mean ± S.D. (n=4) で表示した.)

#### D. 考察

昨年の報告で、DA が培養グリア細胞で MT-III mRNA 発現誘導を強く促進した。しかし、本研究の結果より、培養グリア細胞において DA アゴニストおよびアンタゴニストによる MT-III mRNA 発現誘導への影響はみられなかった。よって、DA による MT-III mRNA の発現誘導は DA レセプターを介する発現制御機構を経たものではないと考えられる。一方、DA よりも細胞毒性が強く、活性酸素を産生すると報告のある 6-OHDA では、DA よりも低濃度で MT-III mRNA の誘導がみられた。さらに DA による誘導は抗酸化物質によって抑制された。以上のことから、MT-III mRNA の発現は細胞内で産生される活性酸素やフリーラジカルによって促進されていると考えられる。MT-III はフリーラジカル消去作用を有すると報告されていることから、フリーラジカルによって誘導された MT-III は細胞障害防御機構に働いていると考えられる。

#### E. 結論

DA による MT-III の発現誘導は活性酸素やフリーラジカルによって制御されていることを培養グリア細胞を用いた実験によって明らかにした。このことから、DA 系化合物のラジカル産生や消去、細胞障害性といった二面性に対して、脳内 MT-III 発現は深く関わっていると考えられる。また、MT-III はその金属結合性から脳内の金属代謝調節に関わっているといわれており、その観点からも老化や老化関連疾患に伴い引き起こされる金属代謝異常と DA 低下による神経細胞死に深く関与しているといえる。そして、種々の神経変性疾患における MT-III の発現低下の是正は、神経細胞死を防止するための新しい方法として応用できる可能性があり、そのためにも MT-III 蛋白の細胞障害への関わりをさらに解明していくことが必要である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- ① Aoki, C., Nakanishi, T., Sogawa, N., Ishii, K., Ogawa, N., Takigawa, M. and Furuta, H.: Stimulatory effects of 4-methylcatechol, dopamine and levodopa on the expression of metallothionein-III (GIF) mRNA in immortalized mouse brain glial cells (VR-2g). *Brain Res.*, 792: 335-339, 1998.
- ② 十川紀夫, 十川千春, 中野 誠, 福岡隆治, 古田裕昭: エンドトキシン急性致死毒性に対するプロパジルグリシンの影響とセファランチンの防御効果について. *岡山歯学会雑誌*, 17: 251-259, 1998.

##### 2. 学会発表

- ① 中野 誠, 十川千春, 十川紀夫, 古田裕昭: 2種類のヒト舌扁平上皮細胞株におけるシスプラチン感受性とメタロチオネイン合成誘導能の相関について, 第52回日本口腔科学会総会, 1998.
- ② 宮崎育子, 十川千春, 中西 徹, 加太英明, 岩田恵美, 近藤洋一, 浅沼幹人, 飯田基之, 小川紀雄: hemi-parkinsonism モデルラットの基底核における MT-III mRNA 発現と levodopa による誘導調節, 第21回日本神経科学, 第41回日本神経化学全国大会, 1998.
- ③ 十川千春, 十川紀夫, 古田裕昭: ラット歯髄におけるメタロチオネインの発現, 第40回歯科基礎医学会学術大会, 1998.
- ④ 十川千春, 十川紀夫, 宮崎育子, 浅沼幹人, 小川紀雄, 古田裕昭: マウスグリア細胞株 (VR-2g) におけるドーパミンにより誘導されるメタロチオネイン-III (GIF) mRNA の発現制御機構, 第72回日本薬理学会年会, 1999.
- ⑤ 十川紀夫, 中野 誠, 十川千春, 古田裕昭: シスプラチンによるヒト舌癌細胞株でのメタロチオネイン類の mRNA 発現, 第72回日本薬理学会年会, 1999.

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
分担研究報告書

鉄代謝のマスター蛋白、IRP2 の神経変性疾患への関与に関する研究

分担研究者 岩井 一宏

京都大学大学院医学研究科免疫細胞生物学教室 助教授

研究要旨

神経変性疾患では病巣部での鉄等の金属，蛋白の酸化的变化が認められ、組織障害への関与が注目されている。鉄代謝のマスター制御因子である RNA 結合蛋白，IRP2 は脳で発現が高く，アルツハイマー病巣に蓄積していることが報告されている。IRP2 の RNA 結合活性がアルミニウムの存在により鉄非依存的に増強される事よりのトランスフェリン受容体の産生増強，フェリチンの産生低下を生じ，ラジカル産生を高める可能性を示唆した。アルツハイマー病とアルミニウムの関連については，現在は否定的であると考えられていることから，我々はアルミニウムにはとらわれず，IRP2 の安定化を来す因子の更なる検索を進め，神経変性疾患における鉄代謝異常への IRP2 の関与の解析を進めていく予定である。

A. 研究目的

アルツハイマー病等の神経変性疾患においては病巣部での鉄等の金属イオン，ユビキチン化蛋白の沈着，蛋白の酸化的变化が認められ，その病態形成との関連が注目されている。しかしながら，鉄イオンの蓄積機序に関する研究は進んでいないのが現状である。我々はこれまで高い相同性を有した2種の RNA 結合蛋白，IRP1 及び IRP2 を中心に哺乳類細胞における鉄イオン代謝の解析を進めてきた。IRP は細胞内鉄イオン濃度が低い場合にのみ鉄代謝に関与する分子をコードする mRNA 上にある stem-loop 構造をした iron responsive element (IRE) と特異的に結合することにより細胞内遊離鉄イオン濃度を一定に保つように制御している鉄代謝のマスター制御因子である(1)。鉄イオンの有無に関わらず安定な蛋白である IRP1 は iron-sulfur cluster が assembly/disassembly することにより IRE 結合活性が制御されているのに対し(2)，IRP2 は鉄イオン

存在下で鉄イオンが結合することにより受ける酸化变化がシグナルとなり，ユビキチン依存性にプロテアソームで急速に分解されることによりその活性が制御されている(3-5)。鉄イオン存在下でも IRE 結合活性を有する IRP1 ミュータントを細胞株に導入することにより細胞質内の鉄イオン濃度が高くなり，細胞死が観察されることから(6)，鉄イオン以外の要因で IRP1 または IRP2 の IRE 結合活性が増強されることにより細胞内遊離鉄イオン濃度の亢進するを介して，フリーラジカル産生が高まることが，神経細胞死に関与していると考えられる。実際，NO や H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> により IRP1 の IRE 結合活性は増強されることが報告されている(7,8)。神経系においては IRP2 の発現が高く，アルツハイマー病巣において IRP2 蛋白の蓄積が報告されていることから(9)，神経変性疾患の病巣における鉄イオンの蓄積，神経細胞死には IRP2 の関与が考えられる。そこで，本研究においては IRP2 の神経変

性疾患への関与について検討することを目指し、IRP2 の RNA 結合活性増強を介したトランスフェリン受容体(TfR)発現亢進、フェリチン(Ft)発現抑制により細胞内遊離鉄イオン濃度の上昇によるフリーラジカル産生を高める鉄イオン以外の因子の検索、また、発生工学的手法を用いて、IRP2 蛋白の神経変性疾患における意義を検索を進めた。

## B. 研究方法

1. 神経芽細胞腫株 Neuro2A を、鉄イオン、鉄イオンキレーター、アルミニウム、亜鉛等の金属イオンの存在下で培養し、IRP2 の RNA 結合活性を RNA gel shift assay で、また、IRP2 より発現が制御される TfR、Ft の産生量を免疫沈降法で検索した。
2. バキュロウイルス発現系を用いて精製した IRP2 を用い、IRP2 の酸化変化を *in vitro* oxidation assay 系を用いて解析した。
3. 常法に従い、IRP1 及び IRP2 ノックアウトマウスを作製した。

## C. 研究結果

IRP2 の IRE 結合活性を増強させる因子の報告はこれまでにはない。前述のように、IRP2 は鉄イオンが結合することにより生じる酸化変化がシグナルとなって分解されることによって制御されていることから、他の金属イオンが IRP2 の鉄結合部位に競合的に結合することにより安定化し IRE 結合活性が増強することが考えられる。そこで、マウス神経芽細胞腫株 Neuro 2A を各種金属イオン存在下で培養したところ、アルミニウムの添加により IRP2 の RNA 結合活性、蛋白量ともに増加することが観察された。加えてアルミニウム添加による IRP2 の IRE 結合活性の増強を介する、TfR の産生増強、Ft の産生低下が認められ、アルミニウムにより誘導される IRP2 の IRE 結合活性により細胞内遊離鉄イオン濃度が上昇し、フリーラジカル産生を高める可能性が示唆された。また、精製 IRP2 を用いた *in*

*vitro* oxidation assay で鉄イオンによる IRP2 の酸化修飾がアルミニウムの共存により抑制されたことから、IRP2 の鉄結合部位にアルミニウムが競合的に結合すると考えられた。アルミニウム自身には酸化能がないことから、鉄イオンによる酸化がシグナルとなる IRP2 のユビキチン修飾に抑制的に働き、IRP2 を安定化することにより、IRP2 の IRE 結合活性が増強すると考えられた。

IRP1 ノックアウトマウスは、少なくとも 15 カ月齢まで異常が認められず、IRP1 ノックアウトマウスより樹立した胎児線維芽細胞は鉄イオンの有無による TfR、Ft の発現調節には異常が認められなかった。これに対し、IRP2 ノックアウトマウスは樹立されて間もないため今後の検討を待たねばならないが、加齢により十二指腸上皮での鉄イオンの蓄積が認められるのに加え、歩行異常を来すことから神経系にも異常が生じている可能性を考えられ、現在解析を進めている。

## D. 考察

鉄イオンは各種神経変性疾患の病巣に蓄積しているのみならず、フェロオキシダーゼであるセルロプラスミン欠損患者において神経細胞死が認められることから(10)、鉄代謝異常自体が神経細胞死の引き金となると考えられる。それゆえ、鉄代謝のマスター制御因子である IRP の神経変性疾患における意義の検索は重要であるといえる。今回我々はアルミニウムが IRP2 の IRE 結合活性増強因子であることを示した。アルミニウムと神経疾患についてはこれまでに種々の報告がある。いわゆる透析痴呆におけるアルミニウムの関与は疑う余地はない。しかしながら、病巣での IRP2 の蓄積が示されているアルツハイマー病とアルミニウムの関連については、現在は否定的であると考えられている。我々はアルミニウムにはとらわれず、IRP2 の安定化を来す因子の更なる検索を進め、神経変性疾患における鉄代謝異常への IRP2 の関与に関して神経細

胞死との関連との観点から解析を進めていく予定である。また、IRP1 ノックアウトマウスは少なくとも 15 カ月齢までは異常が見られないのに対し、IRP2 ノックアウトマウスにおいては十二指腸上皮での鉄の蓄積、歩行異常という症状が認められることから、神経変性疾患における IRP2 の重要性が示唆される。今後、IRP2 ノックアウトマウスのフェノタイプの解析を進め、IRP2 の神経系における役割を解析してゆきたい。また、IRE に対して同等の親和性、特異性を持った 2 種の IRP それぞれの欠損マウスで表現型が異なることから、これらマウスを用いて 2 種の IRP の生体内における役割、各種疾患における役割を検索し得ると考えている。また、我々の樹立した IRP2 に対するモノクローナル抗体を用いて、各種神経変性疾患病巣における IRP2 量の検討などを進めてゆく予定にしている。

## E. 文献

- (1) Klausner, R. D., Rouault, T. A. and Harford, J.B.: Regulating the fate of mRNA: the control of cellular iron metabolism. *Cell* 72: 19-28, 1993
- (2) Haile, D.J., Rouault, T.A., Harford, J.B. et al.: Cellular regulation of the iron-responsive element binding protein: disassembly of the cubane iron-sulfur cluster results in high-affinity RNA binding. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 89: 11735-11739, 1992
- (3) Samaniego, F., Chin, J., Iwai, K. et al.: Molecular characterization of a second iron-responsive element binding protein, iron regulatory protein 2. Structure, function, and post-translational regulation. *J. Biol. Chem.* 269: 30904-30910, 1994
- (4) Iwai, K., Klausner, R.D. and Rouault, T.A.: Requirements for iron-regulated degradation of the RNA binding protein, iron regulatory protein 2. *EMBO J.* 14: 5350-5357, 1995
- (5) Iwai, K., Drake, S.K., Wehr, N.B. et al.: Iron-dependent oxidation, ubiquitination, and degradation of iron regulatory protein 2: implications for degradation of oxidized proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 95: 4924-4928, 1998
- (6) DeRusso, P.A., Philpott, C.C., Iwai, K. et al.: Expression of constitutive mutant of iron regulatory protein 1 abolishes iron homeostasis in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 270: 15451-15454, 1995
- (7) Pantopoulos, K. and Hentze, M.W.: Nitric oxide signaling to iron-regulatory protein: direct control of ferritin mRNA translation and transferrin receptor mRNA stability in transfected fibroblasts. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 92: 1267-1271, 1995
- (8) Pantopoulos, K. and Hentze, M.W.: Rapid responses to oxidative stress mediated by iron regulatory protein. *EMBO J.* 14: 2917-2924, 1995
- (9) Smith, M.A., Wehr, K., Harris, P.L.R. et al.: Abnormal localization of iron regulatory protein in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 788: 232-236, 1998
- (10) Yoshida, K., Furihata, K., Takeda, S. et al.: A mutation in the ceruloplasmin gene is associated with systemic hemosiderosis in humans. *Nat. Genet.* 9: 267-272, 1995

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- ① Yamanaka, K., Kimura, J., Minato, N. and Iwai, K.: Stabilization of iron regulatory protein 2, IRP2, by aluminum. submitted
- ② Gonen, H., Bercovich, B., Orian, A., Carrano, A., Takizawa, C., Pagano, M., Iwai, K. and Ciechanover, A.: UbcH5b and UbcH5c are the ubiquitin carrier proteins, E2s, involved in signal-induced degradation of I $\kappa$ B $\alpha$ , the

inhibitor of the transcription factor NF- $\kappa$ B.  
submitted.

71 回日本生化学会大会, 1998.

- ③ Nakamura, E., Sato, M., Yang, H., Miyagawa, F., Harazaki, M., Tomita, K., Matsuoka, H., Noma, A., Iwai, K. and Minato, N.: 4F2 (CD98) Heavy Chain is associated covalently with an amino acid transporter and controls intracellular trafficking and membrane topology of 4F2 heterodimer. *J. Biol. Chem.*, 274: 3009-3016, 1999.
- ④ Iwai, K., Drake, S.K., Wehr, N.B., Weissman, A.M., LaVaute, T.M., Minato, N., Klausner, R.D., Levine, R.L. and Rouault, T.A.: Iron-dependent oxidation, ubiquitination, and degradation of iron regulatory protein 2: Implications for degradation of oxidized proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 4924-4928, 1998.
- ⑤ 岩井一宏: アミノ酸トランスポーター4F2 L鎖の同定: 4F2 L鎖は4F2 H鎖(CD98)とヘテロダイマーを形成することにより細胞表面に発現する, *細胞工学* 18: 86-87, 1999.
- ⑥ 岩井一宏: ユビキチンシステムとストレス応答, *蛋白質 核酸 酵素*, 印刷中.

## 2. 学会発表

- ① Iwai, K., Klausner, R.D., Weissman, A.M., Levine R.L., Minato, N., Rouault, T.A.: Oxidative modification is the signal of the iron-dependent degradation of iron regulatory protein 2 (IRP2) via ubiquitin-proteasome pathway, The 13<sup>th</sup> Rinnshoken International Conference, 1998.
- ② 山中宏二, 岩井一宏, 木村 淳, 湊 長博: 神経細胞株における鉄イオン制御蛋白 IRPの金属イオンによる変動, 第39回日本神経学会総会, 1998.
- ③ 岩井一宏, 湊 長博: 酸化変化がシグナルとなるユビキチン依存性選択的蛋白分解: その細胞機能制御における意義, 第



厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
分担研究報告書

老化を示すヒト正常線維芽細胞と不死化ヒト線維芽細胞とに対する  
鉄イオンの影響に関する研究

分担研究者 難波 正義

岡山大学医学部分子細胞医学研究施設細胞生物部門 教授

研究要旨

ヒト正常細胞は一定の回数分裂を終えると分裂を停止する。この現象は細胞の老化と言われている。そして、この老化現象は遺伝的に優性の形質を示す。すなわち、老化細胞と老化を免れ不死化した細胞との融合細胞は老化形質を示す。このことから、我々は老化細胞で発現しているが、不死化細胞で発現の減少あるいは消失する遺伝子の同定を進めている。この研究の過程で、老化を示すヒト正常線維芽細胞はその不死化細胞に比べ、多くのトランスフェリンを産生していることをみいだした。トランスフェリンは鉄をキレートし、鉄の関与するラジカル発生を抑制し、鉄による細胞傷害を防いでいる可能性がある。したがって、今回、ヒト正常細胞と不死化細胞に対する鉄の影響を調べた。その結果、鉄の細胞増殖抑制、コロニー形成率の抑制、ミトコンドリア傷害は、正常細胞に比べ不死化細胞のほうに強く認められた。

A. 研究目的

ヒト細胞の老化は、細胞の分裂ごとにテロメアが短縮することで、説明できるようになったが、しかし、これで完全に老化の機構が解明されたとは言えない。すなわち、正常細胞にテロメラーゼ遺伝子を導入し、発現させても、細胞は老化する場合が多いからである。我々は、ヒト細胞の老化・不死化に関連する遺伝子をみいだすことを研究の目的としている。研究の要旨の始めに記したように、老化の形質は優性に発現するので、老化を示す正常細胞で発現し、不死化した細胞で発現の低下あるいは消失する遺伝子を探索している。この研究の過程で、ヒト正常線維芽細胞は不死化した細胞に比べ多くのトランスフェリンを合成していることをみいだした。トランスフェリンは鉄をキレートし、鉄の関与するラジカル発生を抑え、細胞傷害を抑制している

可能性がある。したがって、今回の研究の目的は、ヒト正常細胞と不死化細胞に対する鉄の傷害作用に差があるかどうかを、研究の目的とした。

B. 研究方法

1. 細胞と培養

正常ヒト線維芽細胞(OUMS-36)と、正常ヒト線維芽細胞をコバルト-60ガンマー線で照射し不死化した細胞(KMST-6)を用いた。培地は10%牛胎児血清を添加したMEMを用いた。また、MTTアッセイではMEMのみで6日間培養した細胞を用いた。細胞の継代は0.1%のトリプシンで行った。これらの細胞の培養方法とその不死化方法の詳細は別に報告した(Namba et al., Mutat. Res., 199: 415, 1988)。

## 2. 細胞の増殖に対する鉄の影響

鉄は水にきわめて溶けにくいので Nitrirolotriacetate 2 ナトリウム塩(NTA) 4 モルに硝酸鉄 1 モル比でキレートして溶かした。細胞の増殖は、1) 細胞増殖率と 2) コロニー形成率の 2 方法で調べた。細胞増殖率による方法は、約 10 万個の細胞を 2 ml の培地を含む 35 mm 径のシャーレにまき、24 時間後、種々の濃度の鉄を添加し、96 時間後の細胞を数えた。そして、鉄を添加していない対照群の増殖した細胞数を 100%として、鉄添加群の細胞の増殖抑制率を求めた。

コロニー形成率による方法は、約 500 個の細胞を 5 ml の培地を含む 6 cm シャーレにまき、約 6 時間後に細胞がシャーレ面に接着した時期に種々の濃度の鉄を添加し、さらに 7~10 日間培養し、細胞をメタノール固定後、ギムザ染色し、コロニーを数えた。そして、鉄を添加していない対照群のコロニー数を 100%として、鉄添加群の細胞のコロニー形成がどれだけ抑制されたか算定した。

### 3. MTT アッセイ

以上、1), 2) の方法で細胞の増殖およびコロニー形成に及ぼす鉄の影響を調べたが、この方法では血清を含む培地を使用しているので、鉄の細胞に対する影響をみられない可能性がある。すなわち、血清に含まれるトランスフェリンに添加した鉄が反応するからである。そこで、正常および不死化細胞を無血清で培養した後、MTT アッセイ (同仁, MTT アッセイキット) を行った。

### 4. LDH アッセイ

MTT アッセイを行ったとき、同時に培地中に細胞から LDH が遊出するかどうかを調べた。極東試薬 LDH キットを使用した。

## C. 研究結果

### 1. 細胞の増殖に対する鉄の影響

表 1 に示したように、正常細胞に比べ不死化細胞のほうが鉄に対する感受性が高く、強い細胞傷害を示した。

表 1. 鉄のヒト正常 (OUMS-36) 及び不死化 (KMST-6) 線維芽細胞の増殖に及ぼす影響\*

Fe (μg/ml)	細胞数(×10 <sup>4</sup> )/シャーレ	
	OUMS-38	KMST-6
0	31.5±1.1	101±2.4
10	33.0±1.1	96±4.4
20	28.0±2.7	74±3.0**

\*細胞を 35 mm シャーレにまきこみ、24 時間後、鉄を添加し、96 時間後、細胞を数えた。実験値は 3 枚のシャーレの平均と標準誤差。

\*\*p<0.05

### 2. コロニー形成に対する鉄の影響

表 2 に示すように、不死化細胞のほうが正常細胞に比べより強くコロニー形成が阻害された。

表 2. 鉄のヒト正常 (OUMS-36) 及び不死化 (KMST-6) 細胞に対するコロニー形成率

Fe (μg/ml)	% of control	
	OUMS-38	KMST-6
0	100	100
0.3	95	76*
1.0	86	55*
3.0	95	47*

\*p<0.01

### 3. 鉄処理後の細胞の MTT アッセイ

細胞を無血清で培養した後に鉄の影響をみた (図 1)。この場合も、鉄の傷害作用は不死化細胞のほうが正常細胞に比べ有意に大きかった。

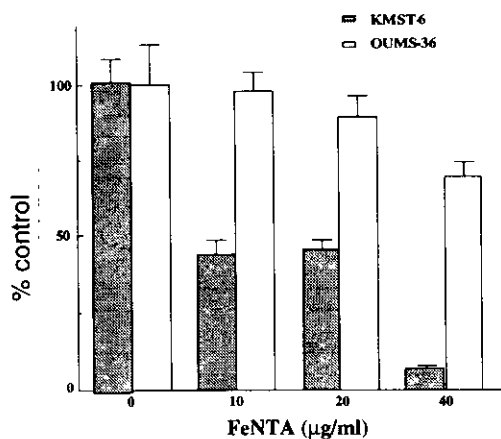


図1. 鉄処理後のヒト正常 (OUMS-36) 及び不死化 (KMST-6) 細胞のミトコンドリア傷害

#### 4. LDH アッセイ

上記の MTT アッセイと同時に、細胞から培地に遊出する LDH 活性を測定した。その結果、10 mg/ml 濃度までの鉄では、正常細胞と不死化細胞とで有意な LDH の遊出は認められなかった（データは省略）。

このことは、細胞の鉄による傷害は細胞の膜ではなく、ミトコンドリアをターゲットにしていることが判明した。

#### D. 考察

##### 1. 老化形質を示すヒト正常線維芽細胞と不死化細胞とに対する鉄の作用

我々は、昨年報告書で、ヒト正常線維芽細胞は不死化細胞に比べ多くのトランスフェリンを合成していることを記した。ヒト正常線維芽細胞が培養条件下でトランスフェリンを合成している生理的意味として、鉄の関与するラジカルによる細胞傷害を防いでいるのではないかと推測した。そして、正常細胞のほうが不死化細胞に比べ多くのトランスフェリンを合成しているため、鉄の細胞傷害作用は不死化細胞に比べ正常細胞のほうが軽いのではないかと予想した。

そこで、今回はヒト正常線維芽細胞とその不死化細胞とに対する鉄の細胞傷害を、細胞の増殖、コロニー形成能、ミトコンドリアの機能の観点から検討した。その結果、予想予想されたように不死化細胞のほうが正常細胞にくらべ鉄の細胞傷害を強く示すことが分かった。また、MTT, LDH アッセイの結果より、鉄の細胞傷害はミトコンドリアをターゲットにしていることが分かった。

不死化細胞は著しい染色体の変化を示し、長期にわたって培養されると腫瘍性になる場合が多い (Mihara et al., Int. J. Cancer, 50: 639, 1992)。このことは、不死化細胞が遺伝的に変異しやすいこと（遺伝子の不安定性）を示している。トランスフェリンの減少している不死化細胞は、正常細胞に比べてラジカルに高感受性になっていると考えられる。このことは、不死化細胞の遺伝子を変異し易くする原因になっているのかもしれない。

##### 2. ヒト正常細胞と不死化細胞の鉄処理後のラジカル量

今回の実験では鉄処理後に正常細胞内と不死化細胞内とのラジカル量は測定していない。実際に両細胞でどのような種類のラジカルがどれだけ生じているかを、今後、測定する必要がある。また、ラジカル消去系、すなわち、カタラーゼ、SOD, glutathione peroxidase などの発現と活性が、ヒト正常細胞と、不死化細胞とで差があるかどうかとも検討されるべき問題である。

#### E. 結論

老化現象をおこすヒト正常細胞は不死化した細胞に比べ多くのトランスフェリンを産生していた。このことは、鉄の関与するラジカルの細胞傷害作用を正常細胞は不死化細胞に比べ効率よく防いでいると考えられる。この仮定のもとで、鉄処理後の両細胞の細胞傷害を比較したところ、正常細胞のほうが不死化細胞に比べ軽度であった。不死化細胞はラジカルなどの細胞傷害作用を受けやすく、その

ため、染色体の変化や腫瘍性への変化をおこし易くなっていると考えられる。一方、ヒト正常細胞はラジカルの細胞傷害を不死化細胞に比べ受けにくく、そのため、細胞の形質が安定に保たれていると考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- ① Sakaguchi, M., Kondo, T., Pu, H. and Namba, M.: Transferrin synthesized in cultured human fibroblasts is associated with tubulins and has iron binding capacity. Cell Struct. Funct., in press.
- ② Kondo, A., Miyazaki, M., Pu, H., Gao, C. and Namba, M.: Establishment and cellular characteristics of a hepatocyte cell line (OUMS-31) derived from an acatalasemic mouse. In Vitro Cell Dev. Biol., in press.
- ③ Sakaguchi, M., Kondo, T., Pu, H. and Namba, M.: Differential localization of two types of transferrin: Produced by human fibroblasts or incorporated from culture medium. Cell Struct. Funct., 23: 69-72, 1998.
- ④ Kondo, T, Sakaguchi, M. and Namba, M.: Characteristics of intracellular transferrin produced by human fibroblasts: Its posttranscriptional regulation and association with tubulin. Exp. Cell Res., 242: 38-44, 1998.
- ⑤ Kondo, T., Sakaguchi, M., Yamada, H. and Namba, M.: Two-dimensional gel electrophoretic analysis of the changes after immortalization of human cells: Decrease of intracellular  $\alpha$ -2-macroglobulin fragment. Electrophoresis 19: 1836-1840, 1998.

### 2. 学会発表

- ① 阪口政清, 近藤 格, 難波正義: ヒト線維芽細胞の産生するトランスフェリンと培地由来の細胞内トランスフェリンの細胞内局在は異なる, 日本組織培養学会第 71

回大会, 1998.

- ② 難波正義, 宮崎正博, 大橋龍一郎: ヒト正常線維芽細胞とその不死化細胞の 2 次元電気泳動による蛋白質の解析, 第 57 回日本癌学会総会, 1998.

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
分担研究報告書

老化性疾患と金属代謝に関するデータベースの作成

分担研究者 三野 善央  
岡山大学医学部衛生学講座 助教授

研究要旨

老化性疾患と金属代謝との関連についての過去の研究成果は少ない上、利用しやすい形式でまとめられていないことから、これについてのデータベースを作成しようと考えた。全研究班員を対象に質問紙調査を行い、上記研究に関するキーワード表を作成した。これに基づいて Medline での文献検索を行い、上記研究に関連する論文のデータベースを作成した。このような試みが、研究班内での活発なコミュニケーションを生みだし、新たなアイデアの創出、新たな研究の発展に寄与する可能性を示唆した。

A. 研究目的

がんやアルツハイマー病などの老化性疾患あるいは老化現象と金属イオンとの関連が注目されている。しかしながらこの分野の研究は最近始まったばかりであり、研究成果は多くない。また、これらの研究成果を活用するための情報が十分にはまとめられていないのが現状である。したがってこうした情報を活用しやすい形でまとめ直す必要性が生じた。また、情報をまとめる過程で研究組織の有機的な連携を形成しようと考えた。本研究の目的は、老化関連疾患の病態形成における生体内金属イオン調節機構の役割に関する研究のデータベースを作成することである。

B. 研究方法

まず、データベース作成の基礎となるキーワードを網羅的に収集するために全研究班員を対象とした質問紙調査を行った。質問票は二部構成とし、まず全体のテーマに沿った内容で、現在取り組んでいる、あるいは関心を持っている分野に関して、「物質」、「方法・部位、方法に密接に関連する物質」、「病態

の3項目に関してキーワードを記入するものとした。また、全体のテーマに沿った内容で、今後発展が見込まれる分野に関して、同様の方法で記入してもらった。

次に、それらのキーワードを含む医学論文を収集した。論文の検索のためのデータベースとしては「Medline」を選んだ。最新の情報を得るためにインターネット上で Medline 検索が可能なホームページ探索し、適切なものとして PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>)を選んだ。ここのキーワードごとに過去の研究論文を検索し、当該論文数および各論文の著者名、論文タイトル、雑誌名、巻、ページ、年などの情報を集めた。

これらの情報をもとにして老化性疾患と金属代謝との関連に関するデータベースを作成した。

C. 研究結果

表1に研究班員があげた「全体に沿った内容で、現在取り組んでいる、あるいは関心を持っている分野」でのキーワードをあげた。あげられた「物質」のキーワードはアルミニ

ウム(Aluminum: Al), メタロチオネイン (metallothionein: MT), 鉄制御タンパク(iron regulatory protein: IRP), 水酸化ラジカル (hydroxyl radical)など 31 個, 「方法・部位, 方法に関連する物質」では免疫組織化学 (immunocytochemistry), GFAP (glia fibrillary acidic protein), 6-OHDA (6-hydroxydopamine), 大脳皮質(cerebral cortex) など 28 個, 「病態など」ではアルツハイマー

病(Alzheimer's disease), パーキンソン病 (Parkinson's disease), 不死化細胞(immortalized cell), がん(cancer)など 13 個があげられた。

表 2 に「全体のテーマに沿った内容で, 今後発展が見込まれる分野」でのキーワードをあげた。ここでは表 1 と重複していないキーワードのみをあげている。「物質」では脂質 (不飽和脂肪酸) (unsaturated lipid)など 6 個, 「方法・部位, 方法に関連する物質」では B-65

表 1 キーワード一覧

全体のテーマに沿った内容で, 現在取り組んでいる, あるいは関心を持っている分野

物質	検索論文数	方法・部位 方法に密接に関連する物質	検索論文数	病態・など	検索論文数
アスコルビン酸(ascorbate)	5,846	アポトーシス(apoptosis)	22,876	筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS)	4,785
アルミニウム(Aluminum Al)	15,819	アストログリア細胞(astroglia cell)	9,433	不死化	-
Ba	1,827	大脳皮質(cerebral cortex)	105,294	老化(aging)	111,267
Bcl-2	4,526	DNA 断片化(DNA fragmentation)	4,784	アルツハイマー病(Alzheimer's disease)	22,780
Bcl-x	580	DNA ラダー法(DNA ladderng)	296	脳虚血(brain ischemia)	17,036
カスパーゼ(caspase)	1,539	ドパミン(dopamine DA)	69,900	がん(cancer)	1,195,117
カタラーゼ(catalase)	15,815	電子スピン共鳴装置 (electron spin resonance spectrometer ESR)	115	DNA damage	16,724
銅(Copper Cu)	32,845	ヘモジデリン(haemosiderin)	1,460	咀嚼(mastication)	4,976
DNA	524,608	海馬(hippocampus)	43,635	神経保護(neuroprotection)	879
フェリチン(ferritin)	11,696	6-OHDA (6-hydroxy dopamine)	6,125	神経修復(neurorestoration)	36
フリーラジカル(free radical)	35,839	免疫組織化学(immunocytochemistry)	6	神経細胞死(neuronal death)	236,825
グルタチオン(glutathione)	39,021	in situ ハイブリダイゼーション(in situ hybridization)	37,784	組織障害(organs damage)	2,108
過酸化水素(hydrogen peroxide)	17,568	レボドパ(Levodopa L-DOPA)	8,935	パーキンソン病(Parkinson's disease)	20,853
水酸化ラジカル(hydroxyl radical HR)	938	ネクローシス=壊死(necrosis)	103,521		
Hypoxia Inducible factor 1	161	神経細胞(neuron)	198,414		
ICE	5,993	酸化変性蛋白(oxidative modified protein OMP)	598		
イムノフィリン(immunophilin)	252	ピロキノリンキノン(pyroloquinolinequinone)	6		
鉄(iron)	60,163	RNA	270,162		
鉄制御タンパク(iron regulatory protein IRP)	256	RNA gel shift assay	584		
脂質過酸化(lipid peroxidation)	17,093	RT-PCR	463		
メタロチオネイン-III(metallothionein - III)	5,024	(reverse transcriptional polymerase chain reaction)	25,672		
一酸化窒素(nitric oxide NO)	26,543	線条体(statum)	25,672		
プロテアソーム(proteasome)	1,701	TUNEL 法	-		
スーパーオキシドアニオンラジカル (superoxide anion radical)	3,261	(terminal deoxynucleotide transferase-mediated dUTP-biotin nick-end labelling)	2,057		
スーパーオキシドディスムターゼ (superoxide dismutase SOD1)	16,900	過酸化脂質関連化合物 (thiobarbituric acid CTBA TBARS)	421		
チオバルビツール酸反応物 (thiobarbituric acid reactive substance TBARS)	204	UV-Vis(UV-visible spectrometers)	34,402		
トランスフェリン(transferrin)	16,068	ウェスタンブロッティング(Western blotting)			
ユビキチン(ubiquitin)	3,744	原子吸光光度計			
亜鉛(Zinc Zn)	39,984	培養ヒト細胞 細胞の形質変化			

表 2 キーワード一覧

全体のテーマに沿った内容で, 今後発展が見込まれる分野

物質	検索論文数	方法・部位 方法に密接に関連する物質	検索論文数	病態・など	検索論文数
脂質(不飽和脂肪酸)(unsaturated lipid)	15,212	B-65(ドパミン系の cell line)	3,197	脳血流慢性低カール流モデル (cerebral hypoperfusion)	1,188
溶解酸素(dissolved oxygen)	987	C6(グリア系の cell line)	5,773	ヘミパーキンソニズム (hemiparkinsonism)	112
酵素(enzyme)	1,116,140	細胞膜(cell membrane)	215,638	縮小細胞死(necrosis)	103,521
メラニン(melanin)	7,005	シクロスポリン A(cyclosporine A)	11,566	神経変性疾患 (neurodegenerative disease)	68,084
蛋白(protein)	2,099,312	FK506	3,536	酸化ストレスによるタンパク分解	
転写因子(transcription factor)	75,450	ジエンターゲティング(gene targeting)	2,198	鉄などの金属代謝機構とその調節	
糖鎖		GPI 1046	2	プログラム細胞死	-
鉄・アルミニウムなどと結合・相互作用及び 細胞膜・細胞内 蛋白質、糖蛋白質、糖脂質		イムノフィリン結合薬(immunophilin ligard)	-		
		in situ ハイブリダイゼーション(in situ hybridization)	37,784		
		in vitro transcription	22,489		
		in vitro ubiquitination assay	36		
		金属酵素(metal enzyme)	103,664		
		金属蛋白(metal protein)	170,300		
		ミクログリア(microglia)	3,082		
		ミトコンドリア(mitochondria)	81,379		
		PC12(ドパミン系 cell line)	4,512		
		初代培養(primary culture)	24,130		
		活性酸素種(reactive oxygen species)	7,633		
		Southwestern 法(Southwestern analysis)	4,129		
		発生工学的的手法			

(ドパミン系の cell line), C6 (グリア系の cell line) など 22 個, 「病態など」ではアポトーシス(apoptosis)など 7 個があげられた。

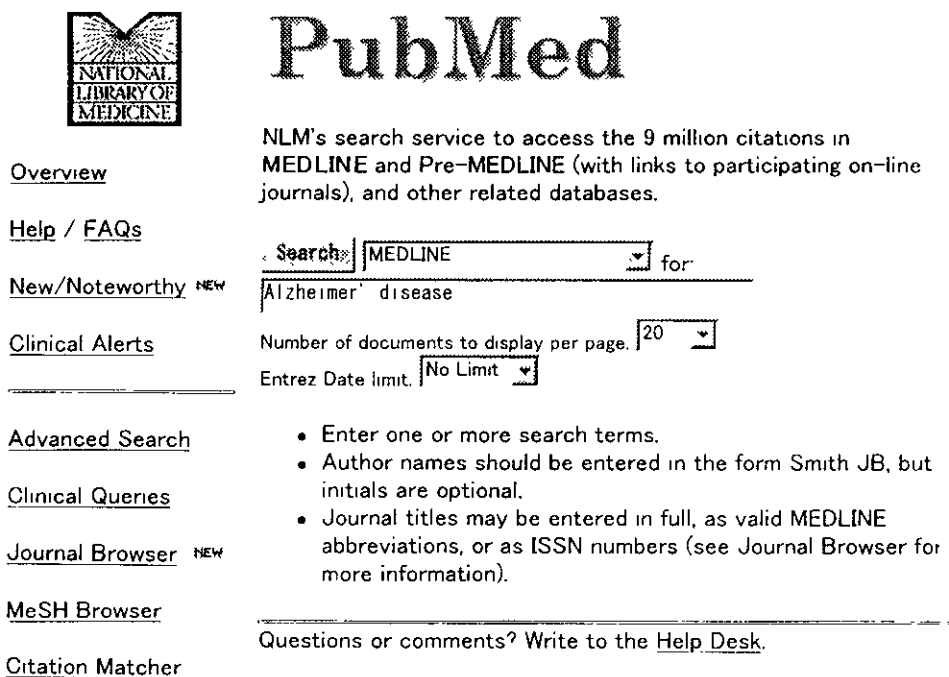
次にこれらのキーワードで文献検索を行ったが, そのインターネットでの Medline 検索サイトである PubMed でのキーワード入力場面を図 1 に示した。表 1 および 2 に各キーワードでの検索論文数を示した。これらの情報をもとにデータベースを作成したが, その一例を図 2 に示した。


#### D. 考察

まず最初に研究班員を対象に, 老化関連疾患の病態形成における生体内金属イオン調節機構の役割に関連しての重要なキーワードを調査した。あげられたキーワードは特に「物質」および「方法・部位, 方法に関連する物質」で多く提出されており, これらの分野での研究の発展が予想される。

このような様々な背景と研究領域を持つ班員で構成された研究班においては, 今回のような情報の共有化によって新たな研究を組織できる可能性がある。たとえばアルツハイマー病に関連するある物質に取り組んでいる研究者がいると仮定する。その研究者が研究班の他の研究者が新しい分析方法に取り組んでいることを, 今回のような情報の共有化によって知ることになる。研究者はこれまで取り組んできた物質について, その新たな分析方法によって研究し, より明確な知見を出しうる可能性があると考える。その後, 研究者同士が連絡を取り合い, そうしたテーマで新たな研究が行われる。今回のような試みによってこのような新たな研究の発展が期待できるのである。実際, 本研究班内でもこうした情報の共有化によって新たな研究のアイデアが討論されている。

キーワードを用いての論文検索は, 最近で



 **PubMed**

NLM's search service to access the 9 million citations in MEDLINE and Pre-MEDLINE (with links to participating on-line journals), and other related databases.

[Overview](#)

[Help / FAQs](#)

[New/Noteworthy](#) NEW

[Clinical Alerts](#)

[Advanced Search](#)

[Clinical Queries](#)

[Journal Browser](#) NEW

[MeSH Browser](#)

[Citation Matcher](#)

Search:  for

Number of documents to display per page:

Entrez Date limit:

- Enter one or more search terms.
- Author names should be entered in the form Smith JB, but initials are optional.
- Journal titles may be entered in full, as valid MEDLINE abbreviations, or as ISSN numbers (see Journal Browser for more information).

Questions or comments? Write to the [Help Desk](#).

図 1 Medline 検索のキーワード入力例

は Medline を用いて行われることが多くなった。これまでは図書館などで CD-ROM を借りだし、検索することが必要であったが、現在では学内 LAN の整備によって図書館にアクセスし文献検索することができるし、インターネットの文献検索サイトに直接アクセスすることも可能になった。今回もこうしたインターネットを活用することによりより簡便に、早急に必要な文献を検索できた。情報の伝達、獲得の手段として、インターネットは今後ますます大きな役割を果たすようになるであろう。

## E. 結論

老化関連疾患の病態形成における生体内での金属イオン調節機構の役割に関する研究について、研究班員を対象に質問紙調査を行い、上記研究に関するキーワード表を作成した。これに基づいて Medline での文献検索を行い、研究に関連する論文のデータベースを作成した。このような試みが、研究班内での活発なコミュニケーションを生みだし、新たなアイデアの創出、新たな研究の発展に寄与する可能性を示唆した。

- ┌ Shaw CA, et al.  
Did consumption of flour bleached by the agene process contribute to the incidence of neurological disease?  
Med Hypotheses. 1998 Dec;51(6):477-81.  
[MEDLINE record in process]  
PMID: 10052866; UI: 99160231.
  
- ┌ McCarty MF.  
Vascular nitric oxide may lessen Alzheimer's risk.  
Med Hypotheses. 1998 Dec;51(6):465-76.  
[MEDLINE record in process]  
PMID: 10052865; UI: 99160230.
  
- ┌ Chaurasia CS, et al.  
Effects of tamoxifen on striatal dopamine and 5-hydroxytryptamine release in freely moving male rats: an in-vivo microdialysis investigation.  
J Pharm Pharmacol. 1998 Dec;50(12):1377-85.  
[MEDLINE record in process]  
PMID: 10052853; UI: 99160218.
  
- ┌ Eustache F, et al.  
Preservation of the attribute knowledge of concepts in normal aging groups.  
Percept Mot Skills. 1998 Dec;87(3 Pt 2):1155-62.  
[MEDLINE record in process]  
PMID: 10052072; UI: 99161224.
  
- ┌ Mitnitski AB, et al.  
The rate of decline in function in Alzheimer's disease and other dementias.  
J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 1999 Feb;54(2):M65-9.  
[MEDLINE record in process]  
PMID: 10051857; UI: 99161009.
  
- ┌ Westlund B, et al.  
Reverse genetic analysis of Caenorhabditis elegans presenilins reveals redundant but unequal roles for sel-12 and hop-1 in Notch-pathway signaling.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Mar 2;96(5):2497-2502.  
[Record as supplied by publisher]  
PMID: 10051671.

## 図2 データベースの一例



## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- ① Mino, Y., Inoue, S., Shimodera, S., Tanaka, S., Tsuda, T. and Yamamoto, E.: Expressed emotion of families and negative/depressive symptoms in schizophrenia: A cohort study in Japan. *Schizophr. Res.*, 34: 159-168, 1998.
- ② Shimodera, S., Inoue, S., Tanaka, S. and Mino, Y.: Critical comments made to schizophrenics by their families. *Compr. Psychiatry*, 39: 85-90, 1998.
- ③ Babazono, A., Weiner, J., Hamada, H., Tsuda, T., Mino, Y. and Hillman, A.L.: Health policy in transition: terminal care and site of death in Japan. *J. Health Serv. Res. Policy*, 3: 77-81, 1998.
- ④ Babazono, A., Weiner, J., Tsuda, T., Mino, Y. and Hillman, A.L.: The effect of a redistribution system for health care for the elderly on the financial performance of health insurance societies in Japan. *Int. J. Technol. Assess. Health Care*, 14: 458-66, 1998.
- ⑤ Tsuda, T., Mino, Y., Babazono, A., Shigemi, J., Otsu, T. and Yamamoto, E.: An epidemiological study on silica, silicosis, and lung cancer in the south east of Okayama Prefecture, Japan. In: *Advances in the Prevention of Occupational Respiratory Diseases*. (eds. K. Chiyotani, Y. Hosoda, Y. Aizawa), Elsevier Science, Tokyo, pp211-215, 1998.
- ⑥ Mino, Y., Shigemi, J., Tsuda, T., Yasuda, N. and Bebbington, P.: Perceived job stress and mental health in precision machine workers of Japan: A 2-year cohort study. *Occup. Environ. Med.*, 56: 41-45, 1999.