

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

ストレス応答の加齢変化に関する研究

主任研究者 城川哲也 (国立療養所中部病院 長寿医療研究センター
老化機構研究部 生理室長)

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
総括研究報告書

ストレス応答の加齢変化に関する研究

主任研究者 城川哲也（国立療養所中部病院 長寿医療研究センター
老化機構研究部 生理室長）

老化は、加齢による個体の生理機能の低下と考えられるが、機能の低下がどのような細胞機能の老化の集積によるのかについては未だ十分な知見が得られていない。一方、ストレスは、個体さらにはそれを構成する細胞のレベルに様々な影響を与え、その寿命を左右することが示唆されている。しかしストレスがどのような機序によって個体および細胞に受容され、また老化に対してどのように働くのかについては不明である。本研究では、個体のストレス受容として中枢ノルアドレナリン系をモデルとし、細胞におけるストレス受容のモデルとして培養線維芽細胞におけるコラーゲン合成系を用い、ストレスがそれらの老化にどのような影響を与えるのかについて解析する。

〔分担研究者〕

宮石 理（国立療養所中部病院 長寿医療研究センター 老化機構研究部病理室長）

A. 研究目的

ストレスがどのような機序によって脳に受容され、それが脳の老化に対してどのように働くのかについては不明である。本研究では、1) 中枢ノルアドレナリン系の加齢変化を定量的に捉え、2) 様々なストレスがその加齢変化にどのような影響を与えるのかについて検討し、3) 中枢ノルアドレナリン系のストレス受容の機序の解析を行うことを目的とする。

一方、コラーゲン合成系が老化に伴いどのように変化するかを明らかにすることを目的とした研究では、コラーゲンに含まれるリジン残基の修飾酵素であるリジルヒドロキシラーゼ、リジルオキシダーゼの発現そのものと、これら酵素の活性が阻害されたときの誘導を蛋白、m-RNA レベルで検索する。

B. 研究方法

ウレタン麻酔下の F344 雄ラット(7-27 カ月齢) 青斑核より約 60 個の単一ニューロンを細胞外記録した。青斑核からの投射密度を知るために、大脳皮質および海馬歯状回の電気刺激に対して逆向性応答するニューロンの出現頻

度（逆向性応答を示したニューロン数／記録したニューロン数）を求める。また青斑核ニューロンの軸索終末分岐の程度を知るために、複数の逆向性スパイクを出すニューロンの出現頻度（複数の逆向性スパイクを出すニューロン数／逆向性応答を示したニューロン数）を求めた。

青斑核からのノルアドレナリン線維を同定するために、ドーパミン→ノルアドレナリン変換酵素である dopamine- β -hydroxylase の抗体による免疫組織化学的検索を行った。大脳皮質および海馬歯状回におけるノルアドレナリン線維に特徴的な varicosity の密度を計測し、その加齢変化を比較した。

ヒト培養線維芽細胞を用い、リジルヒドロキシラーゼ、リジルオキシダーゼについて、発現、誘導の老化に伴う変化を検索した。

- 1) ヒト培養線維芽細胞 (TIG-1) を継代し、PDL (Population Doubling Lenel) の異なった細胞を得た。
- 2) ヒトリジルヒドロキシラーゼ、リジルオキシダーゼの cDNA probe を、ヒト線維芽細胞の total RNA を template して、RT-PCR 法にて調製した。
- 3) 老若それぞれの細胞群を a) beta-aminopropionitrile b) 2,2'-dipyridyl で処理し、これらの処理を施した細胞での mRNA の発現量を調べた。
- 4) 各細胞群にリジルヒドロキシラーゼ、リジルオキシダーゼの antisense-DNA を加え、各々の発現の阻害が細胞にどのような影響を与えるか検索し

た。

C. 研究結果

青斑核からの投射密度は、大脳皮質では加齢に伴い減少した。海馬歯状回では、15 カ月齢までは減少したが、その後 27 カ月齢まで投射密度は維持された。一方、複数の逆向性スパイクを出すニューロンの出現頻度は、大脳皮質では 15 カ月齢と 17 カ月齢の間で顕著に増加し、24 カ月齢でピークが見られた。海馬歯状回では 15 カ月齢以降 24 カ月齢にかけて徐々に増加した。複数の逆向性スパイクを出すニューロンの出現頻度はいずれの部位でも 27 カ月齢で減少した。

ノルアドレナリン線維の varicosity 密度は、大脳皮質では加齢変化に対応した減少が見られた。それに対して海馬歯状回では、多形細胞層では 19 カ月齢で急激な減少が見られたのに対して、神経線維層および顆粒細胞層では 7 カ月齢から 27 カ月齢にかけて徐々に減少し、層特異的な変化が見られた。

老化した細胞ではすでに定常的狀態での発現量が両酵素とも若い細胞よりも高いことが判明した。リジルヒドロキシラーゼ活性を 2,2'-dipyridyl で阻害すると発現量は上昇したが、上昇の程度は若い細胞の方が著しかった。同様にリジルオキシダーゼについては beta-aminopropionitrile (BAPN)、2,2'-dipyridyl (dP) により活性を阻害したところ BAPN では若い細胞、老化細胞とともに発現低下、dP では発現上昇

したが細胞の発現量の変化は両細胞でほぼ等しかった。尚、抗体作製を試みたが免疫沈降法に使用できるものは得られなかった。また antisense-DNA を用いた発現阻害実験でも有意な結果は得られなかった。

D. 考察

青斑核から大脳皮質および海馬歯状回への投射が加齢に伴い減少すると同時に終末部位での分岐・発芽がおこなっていることが示唆された。この加齢変化の機序は不明であるが、この変化の時間経過が部位および層で異なることから、投射部位に特異的に存在する神経栄養因子などが関与する可能性がある⁽¹⁾。また青斑核にはグルココルチコイド受容体が高密度に存在すること⁽²⁾、ストレス負荷により青斑核ニューロン終末部位での分岐・発芽が起こることから⁽³⁾、今後は青斑核投射の加齢変化とストレス受容に共通の機序が存在する可能性について検討する。

老化による線維芽細胞の機能の変化はコラーゲン合成系に限っても強く現われるものから比較的軽微なものまで一様ではなかった。今後は、1) 細胞老化の過程では脱落する細胞が存在すると見込まれるが、この脱落が細胞集団としての機能変化にどのように寄与しているかを解明する、2) 三次元培養のようなより複雑な系を老若の細胞で構築したときの差がどのような機能変化に基づくかを検索する、3) 細胞老化における変化は基本的には遺伝子

の異常によるという仮定し、各遺伝子の変化の方面から追及する等の方法が考えられる。

E. 結論

大脳皮質および海馬歯状回では青斑核からのノルアドレナリン投射が加齢に伴って減少するものの、その線維終末部位では分岐・発芽がおこなっていることが明らかになった。この可塑的变化は、加齢に伴うノルアドレナリン投射の減少を補償していると結論された。

老化による線維芽細胞の機能の変化はコラーゲン合成系に限っても強く現われるものから比較的軽微なものまであり、決して一様ではないと結論された。

F. 参考文献

- 1) Arenas et al. *Neuron* 15, 1465-1473 (1995).
- 2) Morimoto et al. *Neurosci. Res.* 26, 235-269 (1996).
- 3) Nakamura et al. *Neurosci. Lett.* 100, 147-152 (1989).

G. 研究発表

学会発表

城川哲也、石田佳幸、磯部健一 中枢ノルアドレナリン皮質投射の加齢変化 第21回日本基礎老化学会大会, 1998.

石田佳幸、城川哲也、宮石理、小松由紀
夫、磯部健一 中枢ノルアドレナリン
海馬投射の加齢変化 第 21 回日本基
礎老化学会大会, 1998.

Shirokawa T, Ishida Y and Isobe K.
Age-related changes in cortical and
hippocampal innervations of rat locus
coeruleus neurons. 28th Annual Meeting
of Society for Neuroscience.
November 7-12, 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

中枢ノルアドレナリン系のストレス応答の加齢変化
に関する研究

主任研究者 城川哲也（国立療養所中部病院 長寿医療研究センター
老化機構研究部 生理室長）

外界からのストレスがどのように脳に受容されるのかについては明らかではないが、中枢ノルアドレナリン系の青斑核ニューロンは、痛みなどの侵害刺激に対して選択的に応答することから、ストレス受容に関与することが示唆されている。中枢ノルアドレナリン系をモデルとした解析を進めることによって、脳の老化機序を遺伝子レベルで解明する上で重要な基礎データを提出しうるものと考えられる。

A. 研究目的

青斑核からは大脳皮質および海馬への広範な投射が知られているが、我々はその投射が加齢に伴って変化することを最近明らかにした。本研究では、1) 中枢ノルアドレナリン系の加齢変化を定量的に捉え、2) 様々なストレスがその加齢変化にどのような影響を与えるのかについて検討し、3) 中枢ノルアドレナリン系のストレス受容の機序の解析を行うことを目的とした。

B. 研究方法

ウレタン麻酔下の F344 雄ラット(7-27 カ月齢) 青斑核より約 60 個の単一ニューロンを細胞外記録した。青斑核からの投射密度を知るために、大脳皮

質および海馬歯状回の電気刺激に対して逆向性応答するニューロンの出現頻度 (P-index: 逆向性応答を示したニューロン数/記録したニューロン数) を求めた。また青斑核ニューロンの軸索終末分岐の程度を知るために、複数の逆向性スパイクを出すニューロンの出現頻度 (M-index: 複数の逆向性スパイクを出すニューロン数/逆向性応答を示したニューロン数) を求めた。

青斑核からのノルアドレナリン線維を同定するために、ドーパミン→ノルアドレナリン変換酵素である dopamine- β -hydroxylase の抗体による免疫組織化学的検索を行った。大脳皮質および海馬歯状回におけるノルアドレナリン線維に特徴的な varicosity の密度を計測し、その加齢変化を比較した。

C. 研究結果

青斑核からの投射密度を示す電気生理学的指標である P-index は、大脳皮質では 7 カ月齢 (58.2 ± 6.0)、15 カ月齢 (46.6 ± 7.4)、27 カ月齢 (36.0 ± 7.7) と加齢に伴い減少した。海馬歯状回では、7 カ月齢 (37.8 ± 3.1)、15 カ月齢 (25.2 ± 3.7) と減少したが、その後 27 カ月齢 (27.9 ± 8.3) と P-index は維持された。一方 M-index は、大脳皮質では 15 カ月齢 (24.7 ± 5.1) と 17 カ月齢 (63.5 ± 14.4) の間で顕著に増加し、24 カ月齢 (72.3 ± 9.5) でピークが見られた。海馬歯状回では 15 カ月齢 (25.7 ± 11.9) 以降 24 カ月齢 (70.9 ± 12.4) にかけて徐々に増加した。M-index はいずれの部位でも 27 カ月齢で減少した。

ノルアドレナリン線維の varicosity 密度 ($/100 \times 100 \mu m^2$) は、大脳皮質ではほぼ P-index の加齢変化に対応した減少が見られた (9 カ月齢、 125.6 ± 28.0 ; 13 カ月齢、 64.5 ± 22.5 ; 25 カ月齢、 79.5 ± 43.1)。それに対して海馬歯状回では、多形細胞層では 19 カ月齢で急激な減少が見られたのに対して (7 カ月齢、 247.7 ± 12.2 ; 19 カ月齢、 157.8 ± 19.5)、神経線維層および顆粒細胞層では 7 カ月齢から 27 カ月齢にかけて徐々に減少する (神経線維層; 7 カ月齢、 130.1 ± 17.7 ; 27 カ月齢、 108.2 ± 5.9) (顆粒細胞層; 7 カ月齢、 164.5 ± 25.3 ; 27 カ月齢、 124.1 ± 26.0) という層特異的な変化が見られた。

D. 考察

以上の結果から、青斑核から大脳皮質および海馬歯状回への投射が加齢に伴い減少すると同時に終末部位での分岐・発芽がおこなっていることが示唆された。この加齢変化の機序は不明であるが、この変化の時間経過が部位および層で異なることから、投射部位に特異的に存在する神経栄養因子などが関与する可能性がある⁽¹⁾。また青斑核にはグルココルチコイド受容体が高密度に存在すること⁽²⁾、ストレス負荷により青斑核ニューロン終末部位での分岐・発芽が起こることから⁽³⁾、今後は青斑核投射の加齢変化とストレス受容に共通の機序が存在する可能性について検討する。

E. 結論

大脳皮質および海馬歯状回では青斑核からのノルアドレナリン投射が加齢に伴って減少するものの、その線維終末部位では分岐・発芽がおこなっていることが明らかになった。この可塑的变化は、加齢に伴うノルアドレナリン投射の減少を補償していると結論された。

F. 参考文献

- 1) Arenas et al. *Neuron* 15, 1465-1473 (1995).
- 2) Morimoto et al. *Neurosci. Res.* 26, 235-269 (1996).
- 3) Nakamura et al. *Neurosci. Lett.* 100, 147-152 (1989).

G. 研究発表

学会発表

城川哲也、石田佳幸、磯部健一 中枢ノルアドレナリン皮質投射の加齢変化 第21回日本基礎老化学会大会, 1998.

石田佳幸、城川哲也、宮石理、小松由紀夫、磯部健一 中枢ノルアドレナリン海馬投射の加齢変化 第21回日本基礎老化学会大会, 1998.

Shirokawa T, Ishida Y and Isobe K.
Age-related changes in cortical and hippocampal innervations of rat locus coeruleus neurons. 28th Annual Meeting of Society for Neuroscience. November 7-12, 1998.

コラーゲン合成系のストレス反応の加齢変化に関する研究

分担研究者 宮石 理（国立療養所中部病院 長寿医療研究センター
老化機構研究部 病理研究室長）

ヒト培養線維芽細胞を用い、コラーゲン合成系が老化に伴いどのように変化するかを検討する目的でコラーゲンに含まれるリジン残基の修飾酵素であるリジルヒドロキシラーゼ、リジルオキシダーゼの定常状態の発現と、活性が阻害されたときの誘導を検討した。老化した細胞ではすでに定常状態での発現量が両酵素とも若い細胞よりも高いものの、活性を阻害したときの誘導の様態を老若の細胞で比較すると両酵素で差が見られた。

A. 研究目的

一般にさまざまなストレス蛋白の誘導は老化にともなって下がること示されている。細胞レベルの蛋白誘導はさまざまな状態で起こるはずで、狭義のストレス以外の状況における蛋白誘導については不明なことが多い。本研究では培養線維芽細胞を用い、この細胞の最も本質的な機能と目されるコラーゲン合成系に着目し、定常状態でのコラーゲン合成にかかわる酵素の発現を検索した。またこれら酵素の活性阻害は広義のストレスを考えられるが、このような培養条件の変動に対するこれら酵素の発現の変化を検討した。

B. 研究方法

ヒト培養線維芽細胞を用い、リジルヒドロキシラーゼ、リジルオキシダーゼについて、発現、誘導の老化に伴う変化を検索する。

1. ヒト培養線維芽細胞（TIG-1）を継代し、PDL (Population Doubling Lenel) の異なった細胞を得る。
2. ヒトリジルヒドロキシラーゼ、リジルオキシダーゼのcDNA probeを、ヒト線維芽細胞のtotal RNAを

templateして、RT-PCR法にて調製する。

3. 老若それぞれの細胞群を a) beta-aminopropionitrile b) 2,2'-dipyridyl で処理し、これらの処理を施した細胞でのm-RNAの発現量を調べる。
4. 各細胞群にリジルヒドロキシラーゼ、リジルオキシダーゼの antisense-DNA を加え、各々の発現の阻害が細胞にどのような影響を与えるか検索する。

C. 研究結果

リジルヒドロキシラーゼ、リジルオキシダーゼの発現そのものと、これら酵素の活性を阻害したときの誘導を検索した。その結果、老化した細胞ではすでに定常状態での発現量が両酵素とも若い細胞よりも高いことが判明した。リジルヒドロキシラーゼ活性を 2,2'-dipyridyl (dP) で阻害すると発現量は上昇したが、上昇の程度は若い細胞の方が著しかった。同様にリジルオキシダーゼについては beta-aminopropionitrile (BAPN)、dP に

より活性を阻害したところ若い細胞、老化細胞でともに BAPN 存在下では発現低下、dP 存在下では発現上昇したが、これらの発現量の変化は老若両細胞でほぼ等しかった。なお、抗体作製を試みたが免疫沈降法に使用できるものは得られなかった。また antisense-DNA を用いた発現阻害実験でも有意な結果は得られなかった。

D. 考察

分担研究者はすでに種々のシャペロン等の発現を老若の細胞で比較検討し、種々の細胞機能により細胞老化による変化が一様でないことを確認している。老化による線維芽細胞の機能の変化がコラーゲン合成という線維芽細胞に本質的な機能に限っても強く現われるものから比較的軽微なものまであり、量的にも、質的にも決して一様ではないことを確認しえた。このことを踏まえて考察すると、今後の研究の進め方としては 1. 細胞老化の過程では脱落する細胞が存在すると見込まれるが、この脱落が細胞集団としての機能変化にどのように寄与しているかを解明する 2. 3次元培養のようなより複雑な系を老若の細胞で構築したときの差を見出し、それがどのような機能変化に基づくかを検索する 3. 細胞老化における変化は基本的には遺伝子の異常によるという仮定し、各遺伝子の変化の方面から追及する 等の方法が考えられる。

E. 結論

細胞老化に伴う細胞機能の変化を検索し、その一つであるコラーゲン合成系内でも各分子種により変化の程度、様態がさまざまなことを示し、今後の細胞老化に関わる細胞生物学的研究の方針を提起した。