

平成11年度厚生科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

研 究 報 告 書

老化・老年病に対する栄養学的・薬理的・分子遺伝学的手法
による干渉に関する総合的研究

主任研究者 木 谷 健 一

国立療養所中部病院 長寿医療研究センター センター長

目 次

総括研究報告書

- 木谷 健一 (国立療養所中部病院 長寿医療研究センター センター長)
老化・老年病に対する栄養学的・薬理的・分子遺伝学的手法
による干渉に関する総合的研究・・・ 1

分担研究報告書

- 木谷 健一 (国立療養所中部病院 長寿医療研究センター センター長)
プロパジラミン類の齧歯類生存曲線延長作用の機序に関する研究・・・ 17

- 井上 正康 (大阪市立大学 医学部 第一生化学教室 教授)
組織特異活性酸素制御法の開発と血管源性加齢病態の解明・・・ 23

- 大星 博明 (九州大学大学院医学系研究科病態機能内科学 助手)
老化による脳の虚血脆弱性に関する研究
—アデノウイルスベクターを用いたin vivo遺伝子導入による研究—・・・ 31

- 大澤 俊彦 (名古屋大学大学院 生命農学研究科 教授)
食物の抗酸化成分の探索と加齢病態の制御・・・ 39

- 横澤 隆子 (富山医科薬科大学 和漢薬研究所 助教授)
フリーラジカル由来腎障害における地榆の評価・・・ 45

総括研究報告書

老化・老年病に対する
栄養学的・薬理的・分子遺伝学的手法による
干渉に関する総合的研究

木谷 健一

国立療養所中部病院 長寿医療研究センター センター長

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

老化・老年病に対する栄養学的・薬理的・分子遺伝学的手法による
干渉に関する総合的研究

主任研究者 木谷 健一 国立療養所中部病院長寿医療研究センター センター長

研究要旨 加齢のプロセスの解明及び加齢関連疾患（いわゆる老年病）の予防に関し、主として抗酸化ストラテジーに準拠し、micronutrients を主体とした栄養学的、地榆、プロバジラミン類による薬理学的手法を用いた老化・老年病に対する実験的介入、さらに老化脳の虚血脆弱性に対するアデノベクターを用いた *in vivo* 遺伝子導入の実験的研究を試みた。ゴマ種子より得たセサミノール配糖体（SG）は 12 週間投与により Watanabe 兔の血清中性脂肪を有意に低下させ、動脈硬化巣も低下した。また、血漿中の脂質過酸化物質指標（TBARS）も有意に低下させた。また、肝グルタチオントランスフェラーゼ（GST）活性を誘導した。クルクミン、テトラヒドロクルクミン投与はマウス肝のスーパーオキシドディスムターゼ（SOD）、カタラーゼ（CAT）、GST 活性を誘導した（大澤）。地榆の抗酸化活用を O_2 、NO が関与する腎障害モデルラットにより証明した（横澤）。ラサジリン、R-2HMP といったデプレニル以外のプロバジラミン類も脳ドーパミン作動性部位の SOD、CAT 活性が有意に上昇することを見出した。また、デプレニルを含め、3 種のプロバジラミンとも、脳以外のドーパミン作動性組織である心、腎（特に皮質）においても SOD、CAT 活性を上昇させること、デプレニルでは脾にもこの作用を認めた（木谷）。アポトーシスの経路にミトコンドリア依存性シグナルが加齢性変化と密接に関連し、その機構にライゾソーム系酵素が重要な役割を果たすことを見出した（井上）。老齢高血圧ラットについて脳虚血後の大腸菌 β -ガラクトシダーゼ遺伝子を組み込んだアデノビルベクターを用い、脳内発現を検討した。発現の程度は虚血中心部では不良であったが、辺縁部ではその発現は若齢成熟ラットに比し遜色なく、高齢者虚血性疾患にも、この方法による治療の可能性を示唆した（大星）。加齢 C57BL マウスにテトラヒドロクルクミン（木谷、大澤）、八味地黄丸（木谷、横澤）含有食の長期投与を開始し、生存率、疾病、過酸化物質生成などを指標とする長期研究をもスタートさせた。

分担研究者 井上 正康
大阪市立大学医学部
第一生化学教室
教授

分担研究者 大星 博明
九州大学大学院
医学系研究科
病態機能内科
助手

分担研究者 大澤 俊彦
名古屋大学大学院
生命農学研究科
食品機能科学研究室
教授

分担研究者 横澤 隆子
富山医科薬科大学
和漢薬研究所
助教授

A. 研究目的

加齢（老化）及び加齢関連疾患（いわゆる老年病）の発症機序に対する酸化ストレスの役割を直接解明に努めると共に逆にこれらのプロセスに介入する各種抗酸化ストラテジーの効果を検討することにより酸化ストレスの役割を明らかにすることを目的としている。これらの抗酸化ストラテジーのごく部分的な成功すら、加齢のフリーラジカル説の間接的証明となると共に現実的に加齢関連疾患（いわゆる老年病）の予防及び治療に結びつきうるものであり実際的なアプローチとして極めて必要性が高い。従来まで、和漢薬・

栄養学的アプローチは、分子遺伝学、遺伝子導入などの手法と全く別の次元で論じられてきた。本研究プロジェクトは、現在考えられるかぎり（栄養学的、薬理的、分子遺伝学的）のあらゆる手法を並列的に出来る限り *in vivo* の系で検討し、実験動物を用いた研究を通じ、ヒトの健康寿命延長への手段により科学的根拠を得ることを目標とした。

B. 研究方法

1) デプレニル及びそのアナログ薬（ラサジリン、R-2HMP）を用い、デプレニルによる齧歯類の生存曲線延長薬効の機序を検討するため、これらの物質の SOD、CAT 酵素活性上昇作用を検討した。また、テトラヒドロクルクミン、八味地黄丸の経口投与を加齢マウスで、開始した。これらの齧歯類生存曲線実験は長寿医療研究センターの完備した動物育成施設で行われている。（木谷）

2) 生体エネルギー代謝を活性酸素のクロストークが制御する様相を分子、ミトコンドリア（Mt）、細胞および組織のレベルで、オキシメーターや ESR による酸素関連代謝を中心に解析した。特に、Mt の加齢性変化に関しては老化促進マウス(SAM-8)を用いて解析した。（井上）

3) クリプトンレーザー照射による脳局所虚血モデルを用い、老齢動物

における虚血脆弱性の機序を検討した。老齢個体と若齢個体間の adenoviral vector による脳細胞、脳血管内皮細胞への大腸菌 β -ガラクトシデース遺伝子導入効率の差の検討を行った。(大星)

4) インド料理や生薬の主成分として伝統的に用いられてきた香辛料「ターメリック」の黄色色素クルクミンの体内代謝物テトラヒドロクルクミン及びゴマに含有されるセサミノール抗酸化物質セサミノール配糖体 (SG) などの大量精製を試みた。これらの抗酸化物質の実験動物への経口投与により、ワタナベ兔の動脈硬化、マウスの抗酸化系への影響を調べた。(大澤)

5) 腎虚血-再灌流モデル：Wistar 系雄性ラット (6 週齢, 体重 150 g 前後) に地榆エキスを 100 あるいは 200 mg/kg 体重/日を 30 日間連日経口投与し、次いで腎動静脈を 60 分間結紮、その後 24 時間再灌流し、血液、腎臓を採取した。

LPS 誘発腎不全モデル：Wistar 系雄性ラット (6 週齢, 体重 150 g 前後) に地榆エキスを 50 あるいは 100 mg/kg 体重/日を 30 日間経口投与した。次いで LPS (5 mg/kg 体重) を尾静脈内注射し、6 時間後に血液、腎臓を採取した。これらの動物から腎組織中の DNA を抽出、断片化の程度をアガロースゲル電気泳動、デンシトメーターで評価した。また尿素窒素、クレアチニン (Cr) は比色法、NO_x は Griess

法、iNOS は Vodovotz らの方法で測定した。(横澤)

C. 研究結果

1) ラサジリン投与ラットにおいてはラット脳内ドーパミン作動性部位である黒質、線状体などにおいて、デプレニルと同様 Mn-SOD、Cu、Zn-SOD、CAT の活性の有意な上昇を認めた。0.5mg/kg/day と 1.0mg/kg/day では前者の方がその効果は大で、デプレニルと同様過剰量ではその効果が低くなる逆 U 字効果のあることが示唆された。同様の効果は R-2HMP にも認められたが、酵素活性上昇効果はやや弱かった。デプレニルについても脳外組織について検討したところ、心、腎 (皮質)、脾などに強い活性上昇作用を認めた。(木谷)

2) 生体のエネルギー合成には酸素を運搬する動脈と末梢組織のミトコンドリアが重要であり、両者は活性酸素産生の主座でもある。解析の結果、NO とスーパーオキシドを主体とする酸素ラジカル間のクロストークが血流を介してエネルギー代謝をポジティブに、またミトコンドリアにおける ATP 合成反応をネガティブに制御し、両者のバランスにより局所のエネルギー産生量が精密に規定されていることが判明した。また、その代謝の歪みが高血圧や動脈硬化の病因に深く関与しすることが判明した。SAM と正常マウスの肝ミトコンド

リアを用いて解析した。肝や心のミトコンドリアを用いて解析した結果、SAM では加齢に伴い呼吸能や ATP 合成能が著しく低下していること、および加齢によりこの変化が増強することが判明した。特に、ミトコンドリア膜機能を保護してアポトーシスを抑制する発癌遺伝子産物 Bcl-2 は生後一年を過ぎると著明に低下していた。活性酸素はミトコンドリアやリソゾーム膜の脂質過酸化を介してシトクローム C やプロテアーゼを漏出させ、カスパーゼ-3 を活性化することも判明した。生殖能力の成熟点は老化の出発点でもあり、生殖系機能と活性酸素代謝系の加齢性変化は老化機構に重要である。In situ hybridization 法で解析した結果、卵巣や子宮における Mn-SOD の遺伝子発現が性周期に連動して変化すること、これが加齢により縮退すること、さらに精巣の glutathione peroxidase (GPX) の遺伝子発現が加齢により著明に低下することが判明した。(井上)

- 3) 成熟動物への遺伝子導入：成熟ラット脳虚血導入後の脳血流の変化は、虚血側では、虚血導入 10 分の時点ですでに血流低下がみられ、以後、虚血 60 分まで大きな変化は認めなかった。虚血の程度は、虚血中心部からの距離と相関し、正中から 2mm の部分 (I-2) では安静時の $74 \pm 7\%$ に、3 mm (I-3) で $38 \pm 5\%$ 、4 mm (I-4) では $21 \pm 2\%$ まで低

下した。対側 2 mm (C-2) の血流は変化が認められなかった。導入遺伝子の発現は、虚血 1 日後では、C-2 と I-2 の部分で著明に発現するが、虚血中心部に近い部分 (I-3, I-4) では発現は不良であった。しかし、虚血 4 日後では、虚血側の I-3 でも導入遺伝子の発現が著明に認められるものもあった。虚血 7 日では一般に虚血中心部に近い部分の発現は認めにくい傾向があった。導入遺伝子の発現の程度を vector の注入部位別にみると、発現は虚血中心部に近いほど不良であったが、血流低下が認められる虚血辺縁部でも発現は認められた。また、発現の程度を、時間経過によって検討すると、虚血中心部での発現は各時間経過で不良であったが、虚血 4 日後に発現のピークがみられた。虚血辺縁部に相当する I-3 の部分では、発現の程度と虚血 10 分での脳血流の関係をみると、score が 1 以下の発現不良な群では、score 2 以上の発現良好群に比し、脳血流が有意に低値であり ($32 \pm 2\%$ vs. $50 \pm 12\%$, $p < 0.05$)、安静時の 40% 以下で発現が不良であることが示された。老齢動物への遺伝子導入：老齢 SHR においても、vector 投与 4 日 (虚血後 4 日) の時点で、非虚血部位への遺伝子導入は良好に認められた。虚血中心部での発現は不良であったが、虚血辺縁部では導入遺伝子の発現が認められた。老齢動物への導入遺伝子発現の程度は、成熟動物と

比較して、明らかな違いは認められなかった。(大星)

- 4) セサミノール配糖体 (SG) の投与によりワタナベ兔血清総コレステロールレベルには大きな差は見られなかったが、中性脂質レベルはコントロールに較べて有意に低下していた。また、動脈硬化巢も、SG 投与群で有意に低下していた。脂質過酸化物の指標である TBARS の生成について検討を行ったところ、腎臓や肝臓では差は見られなかったが、血漿中では、SG 投与群で有意に低下しており、SG の酸化ストレス予防効果により、動脈硬化形成が抑制されたことが示唆された。さらに、SG 投与群では、解毒酵素として知られるグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) を誘導される、という興味ある結果を得ることができた。一方、クルクミンおよびテトラヒドロクルクミンのマウスへの投与の結果、抗酸化酵素である GPx はあまり変化しなかったが、SOD や CAT には有意な差が見られ、テトラヒドロクルクミンによる強い誘導能が見出された。さらに、解毒酵素である GST や NADPH キノンレダクターゼを有意に誘導し、特に、生体内代謝物である「テトラヒドロクルクミン」により強い誘導能が観測された。そこで、これらの誘導のメカニズムについて、蛋白、mRNA レベルでも検討を加え、NF- κ B の抑制にも関わる事が明らか

かとなった。(大澤)

- 5) 腎虚血-再灌流モデル：虚血-再灌流を施したラット腎の DNA にラダーが出現し、腎虚血-再灌流障害にアポトーシスが関与していることが示唆された。このような DNA の断片化は、地榆エキスを前もって 30 日間経口投与した場合、有意に抑制され、腎機能の指標の血中尿素窒素とクレアニチニンレベルも地榆エキス処理群で著しく低下していた。このことから、地榆はアポトーシスが関与した腎虚血-再灌流障害を軽減して、腎機能の回復をはかっているものと推測された。LPS 誘発腎不全モデル：LPS 投与によって血中尿素窒素、クレアニチンレベルが著しく上昇し、NOx も著しく上昇していた。これに対し、地榆エキスを前もって 30 日間経口投与した場合、これら値が有意に低下し、また腎組織中の iNOS 活性も地榆エキス投与群で抑制する結果が得られた。(横澤)
- 6) 加齢 C57Bl 雄マウスを用い、18 月齢よりテトラヒドロクルクミン (0.5%) 含有食投与を行い、現在 22 月齢生存率には未だ対照マウスとの有意差はない。八味地黄丸含有食 (1.0%) を調整、20 月齢マウスに投与を開始した。これらの結果の詳細は次年度に詳報の予定である。

(木谷、大澤、横澤)

D. 考察

抗酸化ストラテジーによる健康寿命 (health span) の延長は学界のみならず、各種のマスコミ、ミニコミにも喧伝されている。しかし、その正しい科学的方法論に基づいた薬効、薬効機序の解明は一般国民の期待に追いつかぬ状況と言えよう。本研究プロジェクトは micronutritions による栄養学的、東洋医学による地榆、八味地黄丸の効果、およびモノアミン酸化酵素 B 阻害薬で抗アポトーシス効果が注目されているプロパジラミン類による薬理的、さらには遺伝子導入を手段とする分子遺伝学的手法からそれぞれ上記の目的にアプローチする各分担研究者の研究を縦軸に各々研究者にとってアプローチの困難な加齢動物での長期効果の検討という息の長い実験系を横軸でつないだ極めてユニークな研究プロジェクトである。

第一年度の研究結果としては、デプレニルにのみ知られていた脳内ドーパミン作動性部位の SOD、CAT 活性上昇が他のプロパジラミンであるラサジリンや R-2HMP にも共通の興味ある薬理作用であること、さらに脳以外のドーパミン作動性組織である心、腎さらに脾といった重要組織にも抗酸化酵素活性上昇作用のあることが世界で初めて明らかにした。デプレニルの動物生存曲線延長作用は我々の報告を含め、ラット、マウス、ハムスター、ビーグル犬で報告されているが、その機序は明らかでない。今回、我々の研究でこれらのプロパジラミンの投与はラットにおいて脳ドーパミン作動性部分

のみか心、腎、脾などにも抗酸化酵素活性が上昇することが明らかとなった。デプレニルには生存曲線延長作用、抗アポトーシス作用の他、抗腫瘍作用、免疫調節作用が確認され、さらに向神経因子誘導作用が報告されているが、今回の心、腎、脾への作用は複雑なデプレニルの薬理作用の発現機序の解明に新しい手がかりをもたらすものと考えられる。

井上らの観察した諸所見は、アポトーシスの経路には TNF や Fas 等のサイトカイン依存性シグナルとミトコンドリア依存性シグナルが知られているが、後者にはライソゾーム系酵素が重要な役割を果たすことが証明した。これは加齢により生じる難消化性の色素沈着現象などに関係する可能性が考えられる。また、各種の細胞におけるミトコンドリア依存性アポトーシスがカルニチンにより著明に軽減することを明らかとし、その機構として、フォスホリパーゼ A2 の活性化により生じる遊離の長鎖脂肪酸がミトコンドリアの膜電位を低下させ、チトクローム c の遊離を促進することによりカスパーゼカスケードを活性化していること、およびその初期反応をアシルカルニチン形成を介して阻止することが保護作用機構であることが示唆された。また、老化現象における性差が生殖器における活性酸素関連代謝と極めて密接な相関性を有することを示唆した。

大星の研究結果は、アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入に対する脳虚血の影響は、虚血中心部での導入遺伝子の発現は不良であるが、虚血辺

縁部では発現が認められ、皮質での導入遺伝子の発現閾値が前値の約 40%であることを示した。また、今回の検討では、虚血辺縁部での導入遺伝子発現が認められたことから、ペナンブラ領域に対する遺伝子導入が脳虚血の治療法として有効である可能性が示唆された。さらに、老齢動物と成熟動物の比較では、発現の程度に差は認められず、老齢動物の虚血脳においても遺伝子導入が、脳虚血の治療法として有効である可能性が示唆された。

大澤の研究結果は、「セサミノール配糖体 (SG)」が、コレステロール負荷による動脈硬化発症の抑制だけでなく、遺伝的な高脂肪血症に対しても「酸化ストレス」予防により抑制効果を示すことを明らかとした。さらに、「クルクミン」や「テトラヒドロクルクミン」を用いて、最近、生体防御機構として注目を集めている「抗酸化酵素」や「解毒酵素」誘導の可能性について検討を行ったところ、クルクミン類、なかでも、「テトラヒドロクルクミン」に強力な酵素誘導能が見出され、その生理的意義をさらに追求する価値が認められた。

横澤の研究結果は、地榆エキスが腎障害モデルにおいて、 O_2^- と NO の両ラジカルの消去に関与している結果が得られた。一方、NO は EDRF としてのみならず、その殺菌作用や神経伝達作用など、さまざまな生理活性が注目されているが、他のフリーラジカル分子ともよく反応し、なかでも O_2^- との反応性は高く、NO の作用を消失させる因子でもあり、さらに NO と O_2^- の

反応産物の ONOO \cdot は強い細胞毒性を示すことが Shi らにより報告されている。このことから NO と O_2^- の消去とともに ONOO \cdot 生成の抑制が酸化的ストレスを是正する必須条件と考えられるが、地榆に ONOO \cdot 消去作用を有することを予試験的に認めており、酸素代謝制御を介した新たな治療薬開発の可能性を示唆した。

総体的に各アプローチはそれぞれに異なった或いは共通の作用機序により、加齢及び加齢関連疾患（いわゆる老人病）の予防に実験的に有効であることを示し、そのいずれもが臨床応用可能であることは、その将来性に大きな期待がもたれる。また、大星の β -ガラクトシデース遺伝子導入は高齢者の虚血性脳疾患への直接的な介入療法への基礎的実験結果として極めて期待が大きい。テトラヒドロクルクミン、八味地黄丸などの加齢マウスへの効果は現在まで全く検討されておらず、また、我が国以外では夢想もされていない新しい研究分野であり、次年度以後の結果が期待される。

E. 結論

プロパジラミン類、地榆を用いた薬理的介入、テトラヒドロクルクミン、SG を用いた栄養学的介入、遺伝子導入による分子遺伝学的介入は、いずれも諸種の老年病の予防、治療法の開発として新しい可能性を示している。さらに加齢動物を対象としてこれらの手段がいかなる効果をもたらすか次年、次々年度の研究結果が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

Katou S, Mitsui Y, Kitani K and Suzuki T. Hyperoxia induces the neuronal differentiated phenotype of PC12 cells via a sustained activity of mitogen-activated protein kinase induced by Bcl-2. *Biochem J* 338 : 465-470, 1999.

Cui Ping Chen, Yokozawa K, and Kitani K. Beneficial effects of *sanguisorbae radix* in renal dysfunction caused by endotoxin *in vivo*. *Biol Pharm Bull* 22:1327-1330, 1999.

Kitani K. Lateral mobility of proteins and lipid of cell surface membranes during aging: do the data support 'The Membrane Hypothesis of Aging'? *Mech Ageing Dev.* vol.107, 3 : 299-322, 1999.

木谷健一 高齢者の薬動・力学—精神科領域の薬を中心として— 第7回箱根精神薬理シンポジウム=講演記録集= pp1-16, 1999.

Kitani K, Kanai S, Ivy G.O. and Carrillo M.C. Pharmacological modifications of endogenous antioxidant enzymes with special reference to the effects of deprenyl: A possible antioxidant strategy. *Mech Ageing Dev* 111:211-221, 1999.

Kitani K and Goto S.(eds.) Roles of Proteins in Ageing and Age-Associated Disorders "Proceeding of the Second International NILS Workshop on Longevity Sciences" *Mech Ageing Dev.* vol.107, 3 : 219-369, 1999.

Carrillo MC, Minami C, Kitani K, Maruyama W, Ohashi K, Yamamoto T, Naoi M, Kanai S and Youdim MBH. Enhancing effect of rasagiline on superoxide dismutase and catalase activities in dopaminergic system in the rat. *Life Sci* (in press), 2000.

M. Kashiba, E. Kasahara, K. C. Chien, M. Inoue (1999). Fates and vascular action of s-nitrosoglutathione and related compounds in the circulation. *Arch Biochem Biophys* 363: 213-218

A. Kashiwagi, H. Hanada, M. Yabuki, T. Kanno, R. Ishisaka, J. Sasaki, M. Inoue, K. Utsumi (1999). Thyroxine enhancement and the role of reactive oxygen species in tadpole tail apoptosis. *Free Radic Biol & Med.* 26: 1001-1009

Y. Takehara, H. Nakahara, S. Okada, K. Yamaoka, K. Hamazaki, A. Yamazato, M. Inoue, K. Utsumi (1999). Oxygen concentration regulates NO-dependent relaxation of aortic smooth muscles. *Free Rad. Res.* 30: 287-294

- I. Imada, E. F. Sato, M. Miyamoto, Y. Ichimori, Y. Minamiyama, R. Konaka, M. Inoue (1999). Analysis of reactive oxygen species generated by neutrophils using a chemiluminescence probe L-012. *Anal Biochem* 271: 53-58
- Y. Minamiyama, S. Takemura, T. Akiyama, S. Imaoka, M. Inoue, Y. Funae, S. Okada (1999). Isoforms of cytochrome P450 on organic nitrate-derived nitric oxide release in human heart vessels. *FEBS Lett* 452: 165-169
- S. Takemura, Y. Minamiyama, S. Imaoka, Y. Funae, K. Hirohashi, M. Inoue, H. Kinoshita (1999). Hepatic cytochrome P450 is directly inactivated by nitric oxide, not by inflammatory cytokines, in the early phase of endotoxemia. *J. of Hepatology* 30: 1035-1044
- M. Inoue, M. Nishikawa, E. F. Sato, K. Matsuno, J. Sasaki (1999). Synthesis of superoxide dismutase derivative that specifically accumulates in renal proximal tubule cells. *Arch Biochem Biophys* 368: 354-360
- R. Konaka, E. Kasahara, W.C. Dunlap, Y. Yamamoto, K. Chien, M. Inoue (1999). Irradiation of titanium dioxide generates both singlet oxygen and superoxide anion. *Free Radic Biol. & Med.* 27: 294-300
- M. Inoue, M. Nishikawa, E. F. Sato, P. AH-Mee, M. Kashiba, Y. Takehara, K. Utsumi (1999). Cross-talk of NO, superoxide and molecular oxygen, A majesty of aerobic life. *Free Rad. Res.* 31: 251-260
- O. Pechanova, M. Kashiba, M. Inoue (1999). Role of glutathione in stabilization of nitric oxide during hypertension developed by inhibition of nitric oxide synthase in rat. *Jap J Pharmacol* 81:223-229
- Ooboshi H, Ibayashi S, Heistad DD, Fujishima M: Adenovirus-mediated gene transfer to cerebral blood vessels and ischemic brain - perivascular approach and ischemic threshold - . *Ischemic Blood Flow in the Brain*, Springer-Verlag, in press
- Ooboshi H, Ibayashi S, Heistad DD, Fujishima M: Adenovirus-mediated gene transfer to cerebral circulation. *Mech Ageing Dev*, in press
- 大星博明: アデノウイルスベクターを用いた eNOS 遺伝子導入と血管反応. *血管と内皮* 10: 35-41, 2000
- 大星博明: 脳血管障害における遺伝子治療の試み. pp69-74, *Annual Review 神経* 2000, 中外医学社, 2000

Lund DD, Faraci FM, Ooboshi H, Davidson BL, Heistad DD: Adenovirus-mediated gene transfer is augmented in basilar and carotid arteries of heritable hyperlipidemic rabbits. *Stroke* 30: 120-125, 1999

Christenson SD, Lund D, Ooboshi H, Faraci FM, Beverly, Davidson L, Heistad DD: Approaches to enhance expression after adenovirus-mediated gene transfer to the carotid artery. *Endothelium* 7: 75-82, 1999

大星博明, 井林雪郎, Donald D Heistad, 藤島正敏: 脳血管障害への遺伝子治療の試み - 非増殖性 adenoviral vector を用いた脳血管への遺伝子導入 -. *Brain Hypoxia* 13: 17-23, 1999

大星博明: 脳と分子生物学, 脳血管と遺伝子治療. *脳と循環* 4: 373-377, 1999

大星博明, 井林雪郎, Donald D Heistad, 藤島正敏: 脳血管障害への遺伝子治療の試み. *最新医学* 54: 326-330, 1999

Kato Y, Mori Y, Makino Y, Morimitsu Y, Hiroi S, Ishikawa T and Osawa T. Formation of N ϵ -(Hexanonyl)lysine in Protein Exposed to Lipid Hydroperoxide, A PLAUSIBLE MARKER FOR LIPID HYDROPEROXIDE-DERIVED PROTEIN MODIFICATION, *The Journal of Biological Chemistry*, 274 (29), pp20406-20414 (1999)

Okada K, Wangpoengtrakul C, Osawa T, Toyokuni S, Tanaka K and Uchida K. 4-Hydroxy-2-nonenal-mediated impairment of intracellular Proteolysis during Oxidative Stress. *J. of Biol. Chem.*, 274 (34), 23787-23793, (1999)

Uchida K, Shiraishi M, Naito, Y, Torii Y, Nakamura Y and Osawa T. Activation of Stress Signaling Pathways by the End Product of Lipid Peroxidation. *J. of Biol. Chem.*, 274 (4), 2234-2242, (1999)

Inano H, Onoda M, Inafuku N, Kubota M, Kamada Y, Osawa T, Kobayashi H and Wakabayashi K. Chemoprevention by Curcumin during the Promotion Stage of Tumorigenesis of Mammary Gland in Rats Irradiated with Gamma-Rays, *Carcinogenesis*, 20, 1011-1018 (1999)

M-H, Kang *et al.*, Dietary Deffated Sesame Flour Decreased the Susceptibility to Oxidative Stress in Hypercholestrolemic Rabbits, *J. Nutri.*, 129, 1885-1890 (1999)

Kang M-H, Naito M, Sakai K, Uchida K and Osawa T. Mode of Action of Sesame Lignans in Protecting Low-density Lipoprotein against Oxidative Damage *in vitro*, *Life Sciences*, 66, 161-171 (2000).

大澤俊彦、沖縄に特有のフードファクターと医食同源、FOOD STYLE 21, 3(7), 30-34 (1999)

大澤俊彦、天然抗酸化物質の探索とその応用、化学と生物、37(9), 616-624 (1999)

大澤俊彦、リグナン類の機能性：特にゴマリグナンを中心に、日本油化学会誌、48, 1041-1048 (1999)

Chen, C.P., Yokozawa, T. and Tanaka, T. Protective effect of *Sanguisorbae Radix* against apoptosis and function of renal tissues subjected to ischemia-reperfusion, *J. Trad. Med.*, 16, 97-101, 1999.

Chen, C.P., Yokozawa, T. and Kitani, K. Beneficial effects of *Sanguisorbae Radix* in renal dysfunction caused by endotoxin *in vivo*, *Biol. Pharm. Bull.*, 22, 1327-1330, 1999.

Yokozawa, T., Chen, C.P. and Tanaka, T. Direct scavenging of nitric oxide by traditional crude drugs, *Phytomedicine*, 6, 453-463, 1999.

Yokozawa, T., Chen, C.P., Tanaka, T. and Kitani, K. A study on the nitric oxide production-suppressing activity of *Sanguisorbae Radix* components, *Biol. Pharm. Bull.*, in press.

2. 学会発表

木谷健一 “日本医学会総会シンポジウム” “人の老化をいかにして測るか” 司会 1999年4月2日 東京

Carrillo M C, Minami C, Kitani K, Maruyama W, Ohashi K, Yamamoto T, Naoi M, Kanai S and Youdim M B H. Enhancing effect of rasagiline on superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities in dopaminergic system in the rat. 28th Annual meeting, American Aging Association, June 4-8, 1999, Seattle, USA.

Kitani K, Kanai S and Miyasaka K. Potentialities and limitations of aging rodents as an animal model for studies on aging. 6th Asia Oceania Regional Congress of Gerontology, June 7-11th, 1999, Seoul, Korea.

Kitani K and Tanaka S. Lateral diffusion coefficients of proteins in surface membranes of skeletal muscle cells as well as brain cortical cells in rodents also decline with age as those in hepatocyte surface membranes. 6th Asia Oceania Regional Congress of Gerontology, June 7-11th, 1999, Seoul, Korea.

木谷健一, 南知予子, 丸山和佳子, 山本貴子, 大橋憲太郎, 直井 信, 金井節子, Carrillo M C. 加齢動物の生理・生化学的パラメーターの変化: 特に public vs. private 変化の相違について. 第22回日本基礎老化学会 1999年6月16日-18日 京都

南知予子, 丸山和佳子, 木谷健一, 直井 信, 大橋憲太郎, 山本貴子, Carrillo M.C, 金井節子 ラット, ドーパミン作動性組織の抗酸化酵素活性を修飾する薬物: 特にラサジリンの効果 第22回日本基礎老化学会 1999年6月16日-18日 京都

木谷健一 ラット大脳皮質細胞表面膜の蛋白側方拡散定数に対する加齢の影響. 第41回日本老年医学界学術集会 1999年6月16日-18日 京都

木谷健一 韓国生科学会特別講演 "Current and future strategies in gerontology research in Japan, October, 1, 1999, Pusan, Korea.

木谷健一 介入: 老化・老年病の予防を目指して (Introduction と司会) 日本基礎老化学会主催基礎老化シンポジウム 1999年10月9日 東京

Kitani K. Common properties for propargylamines of enhancing superoxide dismutase and catalase activities in the dopaminergic system in the rat: Implications for the life prolonging effect of (-)deprenyl. 8th Winter Conference on Neurodegeneration. Feb.9-13, 2000, Tegernsee, Germany.

Kitani K. Do antioxidant strategies work against aging and age-associated disorders? Propargylamines: A possible antioxidant strategy. Symposium IV: Practical approach for functional longevity. 8th Congress of International Association of Biomedical Gerontology. Feb.21-24,2000, Kyongju, Korea.

佐藤英介, 山本祐司, 樋口允子, 井上正康: NO の消化器内の細菌に対する影響と感染防御, 第72回日本生化学会, 1999, 10 横浜

西川 学, 永富英彦, 大平 豪, 西島正剛, 佐藤英介, 井上正康, 抗ガン剤腎毒性の分子機構と腎指向性 SOD による制御, 第72回日本生化学会, 1999, 10 横浜

冨田益弘, 佐藤英介, 井上正康: 軟骨細胞に対する NO の影響, 第72回日本生化学会, 1999, 10 横浜

吉良幸美、寺村めぐみ、佐藤英介、井上正康：家族性筋萎縮側索硬化症の病態と活性酸素代謝の細胞内局在特性、第 72 回日本生化学会、1999、10 横浜

今田伊助、佐藤英介、南山幸子、井上正康：新規化学発光試薬 L-012 による白血球活性酸素代謝動態と加齢との相関性の解析、第 72 回日本生化学会、1999、10 横浜

南山幸子、竹村茂一、今岡 進、豊国伸哉、船江良彦、井上正康：エンドトキシン肝障害におけるチトクローム P450 の役割と活性酸素・フリーラジカルの意義、第 72 回日本生化学会、1999、10 横浜

三好真美、西川 学、井上正康：胃粘膜細胞に対する NO の影響、第 72 回日本生化学会、1999、10 横浜

大西康代、西川 学、井上正康：NO の酸素依存性循環エネルギー制御能と生体チオール¹の意義、第 72 回日本生化学会、1999、10 横浜

笠原恵美子、加柴美里、簡光章、井上正康：生体内アスコルビン酸の代謝動態、第 72 回日本生化学会、1999、10 横浜

井上正康、笠原恵美子、佐藤英介：酸化ストレスと疲労、第 5 回慢性疲労症候群研究会、2000、2 大阪

大星博明、井林雪郎、Donald D. Heistad、藤島正敏：脳血管障害への遺伝子導入の試み - アデノウイルスベクターを用いて -。第 76 回日本生理学会大会：シンポジウム、1999.3.28, 長崎

大星博明、井林雪郎、藤島正敏：アデノウイルスベクターを用いた eNOS 遺伝子導入と血管反応。第 8 回生体内 NO フォーラム：シンポジウム。1999.5.15, 神戸

Ooboshi H, Yao H, Ibayashi S, Fujishima M: Adenovirus-mediated gene transfer to ischemic brain - Ischemic flow threshold for transgene expression. XIXth International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function (Brain '99), 1999.6.15, Copenhagen

大星博明: Prospect of gene therapy for cerebrovascular disease - Adenovirus-mediated gene transfer to brain and blood vessels -.第 9 回脳血管シンポジウム：シンポジウム。1999.9.4, 大阪

大星博明：アデノウイルスベクターを用いた動脈硬化血管への遺伝子導入。第 1 回分子動脈研究会：1999.9.16, 福岡

Ooboshi H, Ibayashi S, Heistad DD, Fujishima M: Adenovirus-mediated gene transfer to cerebral blood vessels and ischemic brain - Perivascular approach and Ischemic threshold -. The 6th Keio University International Symposia for Life Science and Medicine. Ischemic Blood Flow in the Brain: Symposium, 1999.11.25, 東京

Ooboshi H, Ibayashi S, Heistad DD, Fujishima M: Adenovirus-Mediated Gene Transfer to Cerebral Circulation. 第4回 NLS 国際ワークショップ: 1999.12.2, 大府

大星博明、豊田一則、井林雪郎、藤島正敏: アデノウイルスベクターを用いた脳血管への遺伝子導入. 日本心血管作動物質学会: シンポジウム, 2000.2.5, 福岡

Osawa T. Physiological Activity of Dietary Phenolic Antioxidants, Functional Foods Symposium, 10th World Congress of Food Science and Technology, Sydney, Oct., 1999.

Okada K, Nakagawa S, Wangpoengtrakul C, Toyokuni S, Uchida K and Osawa T. Effects of Curcumin and Tetrahydrocurcumin on Induction of Antioxidative Enzymes. 2nd ICoFF Satellite Symposium "Oxidative Stress and Disease Prevention", December 19-20, 1999, Okinawa.

大澤俊彦、抗酸化ストレスシステムと食品、シンポジウム「食と健康/生命の研究フロンティア」、日本農芸化学会 1999 年度大会 (福岡)、1999 年 4 月

大澤俊彦、色素と健康をめぐって、ifia JAPAN '99 (東京)、1999 年 6 月

大澤俊彦、老化と脂質酸化、日本脂質栄養学会特別講演 (福山) 1999 年 9 月

陳 翠萍、横澤隆子、田中 隆、服部征雄: フリーラジカル由来腎障害モデルを用いた地榆の検討, 第 16 回和漢医薬学会大会, 1999, 8, 千葉.

横澤隆子: 抗老化薬開発への手掛かりを和漢薬に求めて, 第 21 回日本基礎老化学会シンポジウム, 1999, 10, 東京.

G. 知的所有権の取得状況
なし

分担研究報告書

プロパジラミン類の齧歯類生存曲線延長作用の機序
に関する研究

木谷 健一

国立療養所中部病院 長寿医療研究センター センター長

分担研究報告書

プロパジラミン類の齧歯類生存曲線延長作用の機序に関する研究

分担研究者 木谷 健一 国立療養所中部病院長寿医療研究センター センター長

研究要旨 デプレニルに類似したプロパジラミンの一種であるラサジリンを 3.5 週間雄性 F-344 ラットに皮内持続注入した後、脳内スーパーオキシドディスムターゼ（SOD）、カタラーゼ（CAT）活性を検討したところ、対照（生食注入）ラットに比し、線状体、黒質などドーパミン作動性部位でデプレニルと同様活性の有意な上昇がみられた。また、脳以外の組織、心、腎においても活性上昇を認めた。この性質はデプレニルにも確認され、さらに R-2HMP にもあることを見出し、この性質がプロパジラミン類の一般的な性質であることを示唆した。

A. 研究目的

モノアミン酸化酵素（MAOB）阻害作用をもつデプレニルは現在まで我々の報告を含め、少なくとも4種の動物種（ラット、マウス、ハムスター、犬）においてその生存曲線を延長させる効果が報告されているが、その作用機序は不明である。我々はデプレニルが脳内ドーパミン作動性部位の SOD、CAT 活性を上昇させる性質がその生存曲線延長作用機序の一つでないかとして研究を進めているが、最近デプレニル以外にも一連のプロパジラミンが開発され、主としてその抗アポトーシス作用について研究が進められている。我々はデプレニル以外に検討されたことのない一連のプロパジラミンの SOD、CAT 活性への作用を検討する目的で第一にラサジリンの作用を検討し

た。また、R-2HMP、デプレニルについても確認した。

B. 研究方法

F-344 雄性ラット 8.5 月齢を用い、オスモティックミニポンプを用い、ラサジリン、R-2HMP、デプレニルなどをそれぞれ3.5週間皮下持続注入した。対照群には生食水を注入した。薬物投与後、断頭と殺し、脳各部位及び心、腎について Mn-SOD、Cu、Zn-SOD、CAT 活性を測定した。

C. 研究結果

ラサジリン投与ラットにおいてはラット脳内ドーパミン作動性部位である黒質、線状体などにおいて、デプレニルと同様 Mn-SOD、Cu、Zn-SOD、CAT の活性の有意な上昇を認めた。

0.5mg/kg/day と 1.0mg/kg/day では前者の方がその効果は大で、デプレニルと同様過剰量ではその効果が低くなる逆U字効果のあることが示唆された。同様の効果は R-2HMP にも認められたが、酵素活性上昇効果はやや弱かった。デプレニルについても脳外組織について検討したところ、心、腎（皮質）、脾などに強いなどに強い活性上昇を認めた。

D. 考察

デプレニルには抗アポトーシス作用、MAOB 阻害作用の他多様な薬理作用があるが、中でも動物の生存曲線延長作用は、他の薬物に知られない特殊な作用であり、その作用機序の解明は加齢の生物学的機序の解明、抗老化薬の開発といった観点から極めて興味深いものである。我々の今回の研究結果は、少なくとも SOD、CAT 活性の上昇作用はデプレニルのみならず、他のプロパジラミン類にも共通に存在することを示唆している。デプレニル以外のプロパジラミンにこの作用を証明したことは世界で最初の報告であり、以後我々を含め、多くの研究者の研究対象となる現象と考える。現在、デプレニル、ラサジリンの他、多種のプロパジラミン（主として R-2HMP をプロトタイプとするアリファティックプロパジラミン）が、その効アポトーシス作用の点から開発されつつあるが、これらのプロパジラミン類にも SOD、CAT 活性の上昇作用がある可能性が高く、さらに検討が必要である。また、脳組織以外の効酸化酵素活性については、

我々は繰り返し肝について研究し、その効果が認められぬことを報告してきた。従って、デプレニルの酸化酵素活性に対する効果は脳内ドーパミン作動性部位に限られていると考えられてきた。今回、我々は世界で初めて脳以外の組織である心、腎にも活性上昇がみられることを見いだした。酸化酵素活性上昇がいかんして生存曲線に影響を与えるかは尚不明の点が多いが、齧歯類と異なり、血管系の老年病の頻度の多い（人を含めた）動物種のみかけの寿命に心、腎の酸化酵素活性上昇がいかんに関連するか、新しいかつ興味ある課題を提供したと考えられる。酸化酵素活性上昇のポテンシーは現在までの検討ではデプレニルの方がラサジリンより強い印象を受けるがプロパジラミン以外の化学構造の酸化酵素活性への影響も今後の重要な課題と考える。

E. 結論

デプレニルに関し、我々が繰り返し報告してきた脳内ドーパミン作動性部位の SOD、CAT 活性上昇作用はラサジリン及び R-2HMP にも見い出され、プロパジラミン一般の共通薬理作用である可能性が示唆された。また、今回初めて脳以外のドーパミン作動性組織である心、腎においても SOD、CAT 活性の上昇を認めたことはデプレニルに知られる動物生存曲線延長作用を説明する上でも極めて示唆に富む発見といえよう。