

厚生省厚生科学研究費補助金

長寿科学総合研究

平成11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し、p53 は防御蛋白として働くことを初年度に示した。同様に DNA 傷害性ストレスに誘導される蛋白のうち、機能の不明な GADD34 の研究をすすめて、GADD34 と結合する蛋白を多数クローニングした。GADD34 との結合の解析が進み、GADD34 高発現株の樹立、GADD34 欠損株の樹立を待って、これらの蛋白との相互作用を研究することで GADD34 の機能解析直前まできている。また、GADD34, GAHSP, Mn-SOD の転写解析が進み、老化を防御する可能性のある遺伝子の発現調節を明らかにしつつある。また、ROS のシグナル伝達系に与える変化で super-activation の機構を提唱した。老化ストレスとしての AGEs の役割、また、神経系の老化抑制を担うと思われるミクログリアの subtype の解析が進んだ。

キーワード；老化促進ストレス、GADD34, ROS, AGE, ミクログリア

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→名古屋大学医学部細菌助教授

中島 泉 名古屋大学医学部免疫教授

祖父江元 名古屋大学医学部神経内科教授

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、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られる。この仮説を実験的に検証するために我々は個体レベルの実験から、細胞、分子レベルまで様々な実験を進めた。本年は最後の年であり、これまでの実験をさらに進め、新たな展開をめざした。

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（Mn-SOD, GADD34, GAHSP40）の 5' 側領域あるいはエンハンサー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. 蛋白間相互作用

GADD34 との結合が酵母において確認された遺伝子について、以下の検討を行った。

- 1) 臓器における発現をノザン法にて解析した。
- 2) 酵母内以外での *in vitro* での結合を pull down 法で調べた。
- 3) GADD34 遺伝子と得られた遺伝子を *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培養細胞内での結合を解析した。

3、シグナル伝達系の解析

非受容体型 (c-Src, v-Src)、受容体型 (c-RET, RET)チロシンキナーゼを発現する NIH3T3 細胞に、NO を放出する SNAP や glyoxal、HNE などのカルボニル化合物を曝露させたり、紫外線を照射したりした後、細胞を溶解し、ウエスタンブロット、免疫沈降、試験管内キナーゼアッセイによってキナーゼ分子の発現と活性のレベルを測定した。site-directed mutagenesis 法によってチロシンキナーゼ分子の特定部位のチロシンまたはシステインをそれぞれフェニールアラニンやアラニンに置換したミュータント遺伝子を作製し、NIH3T3 細胞に導入した。

4、ミクログリア

1)GFP トランスジェニックマウスから骨髓細胞を回収し、細胞を尾静脈中に注入した。注入後生理食塩水で環流し、各臓器を摘出、Western blotting、組織解析をした。

2) GFP 発現骨髓細胞に由来する細胞の臓器分布を調べるために、RT-PCR により GFP 遺伝子発現を確認した。また、Western blotting により GFP タンパクの各臓器での検出を行った。

3) 凍結切片での注入細胞の同定：連続したおよそ7ミクロンの凍結切片を蛍光顕微鏡で観察し、その後 HE 染色または免疫染色を行った。

5.神経細胞

神経、ミクログリア、アストロサイト細胞株に glyoxal を 0.001~10mM の各濃度で添加し、cell viability と AGE の 1 種である CML の誘導を検討した。Cell viability は光顕的に細胞の形態変化を観察するとともに、MTT

assay を行い生存率を測定した。CML の産生の評価には、抗 CML 抗体を用いて培養細胞の免疫組織染色を行うとともに、Western blot analysis による検討を行った。さらに glyoxal 添加(0.1mM)による microglia 系と astrocyte 系細胞の cytokine (IL-1b, IL-2, IL-6, TNF- α) の産生を、RT-PCR と各 cytokine に対する特異抗体を用いた ELISA によって測定した。

C. 研究結果

1. GADD34 の遺伝子発現と結合する蛋白の解析 (磯部、長谷川)

1) GADD34 ゲノムの遺伝子構造をほぼ明らかにできた。TATAbox の 200bp 上流にアルキル剤処理(MMS)反応領域が存在し、この領域に含まれる Sp1, CREB 等が重要な役割を担う可能性が示唆された。

2) GADD34 との結合が認められた熱ショック蛋白 40 ファミリー、GAHSP40 は、既に報告されている H1J1 とホモロジーがある約 1.4kb の遺伝子である。N 末端に大腸菌 DnaJ とホモロジーをもつ Jドメインを含んでいた。マウスの臓器すべてにおいて発現が認められ、42 度の熱刺激のみならず、MMS による薬剤処理にても発現が誘導された。また、GAHSP40 ゲノムの構造もほぼすべてあきらかにし、転写解析により HSE が熱による反応性に必須であることを見つけた。

3) トランスリンは悪性リンパ腫の際、DNA 転座領域に結合する蛋白質である。我々はこの全長の cDNA を得た。

4) キネシンは細胞骨格の一つとして重要な蛋白質であり、我々はこのうち KIF3A の C 末端領域、すなわち rod α -herix 領域の一部と tail ドメインを含む cDNA を得た。

5) G34BP は約 1.9kb の cDNA であり MuRED として報告されている遺伝子とほぼ

同じ配列を有していた。マウスのすべての臓器に発現が認められた。

2. Mn-SOD の発現調節 (磯部)

昨年度、NIH3T3細胞あるいはRAW264細胞を感染ストレス刺激であるIL-1B, TNF- α , LPS, IFN- γ で刺激するとMn-SODmRNAの発現増強がみられこれに対応するMn-SODの転写活性をルシフェラーゼ活性で測定した時活性の増強がみられたことを報告した。また、IL-1B, TNF- α , LPS, IFN- γ 反応性領域が第二イントロンのC/EBP, NF κ Bに存在することを報告した。今年度はさらに進めて、C/EBP β , NF κ Bのp65, p50サブユニットの発現ベクターを細胞に遺伝子移入した。NIH3T3細胞ではp65をRAW264細胞ではp65あるいはp50いずれかをエンハンサー領域(+2119- +2420)を含むMn-SODプロモーターベクターとともに移入した時に無刺激の状態、ルシフェラーゼ活性が著しく上昇した。これらの活性上昇は刺激によりさらに上昇した。血小板増殖因子(PDGF)を培養液に加えたところMn-SODmRNAの上昇をみた。Mn-SODプロモーターベクターを移入し、PDGF反応性領域を検索したところGC-richなSp1結合領域であった。ゲルシフトアッセイでEgr-1転写因子が結合し、PDGF反応性転写因子であることが判明した。

3. 酸化ストレスとシグナル伝達 (中島)

(1) NOの作用で形成される分子間S-S結合を介して、非受容体型チロシンキナーゼであるc-Srcが構造を修飾され、その結果、通常受容体とリガンドの結合によって起動するシグナル伝達経路をバイパスして活性化することを示した。この経路では、従来知られるSrc分子C末端部の調節性チロシン(Y527)の脱リン酸化に依存することなく、活性

化の経路が起動した。このため、Y527を欠損して恒常的に活性化しているv-SrcがNOの作用でさらに強く活性化(スーパー活性化)した。一方、Y416を欠損するミュータントを用いた実験の結果から、キナーゼドメインの上にあるこのチロシン残基は活性化に必須であることも認めた。(2)がん遺伝子の発現制御が加齢に伴う継続的な紫外線照射によって破綻するであろう分子機序を、がん遺伝子RETについて一部明らかにした。すなわち、恒常的に活性化しているがん遺伝子産物Retチロシンキナーゼが紫外線の照射によって2次的にさらに高度に活性化(スーパー活性化)することを見いだした。この機序に関して、RETチロシンキナーゼの分子間S-S結合による2量体化が活性化と密接に関連して紫外線により促進されることを認めた。さらに、キナーゼドメインにある2つのシステインをアラニンに置換したミュータント分子に対する紫外線の作用を解析した実験の結果から、上記の2量体化に向けてRETチロシンキナーゼの細胞内キナーゼドメインC末端側に位置する特定のシステイン残基が紫外線の特に重要な標的となり得ることを示した

4. ミクログリアとストレス (澤田)

1) GFPトランスジェニックマウスの骨髄細胞を正常同型マウスに移植し骨髄キメラを作製し、GFP陽性細胞をレシピエントマウス体内において追跡できる系を確立した。レシピエントの脳と末梢臓器において、GFP陽性細胞が移行していることが確認でき、それらのほとんどはクラスターを形成していた。脳と肝臓のクラスターについて蛍光免疫染色を行うと、脳ではCD34陰性Mac-1陽性ER-MP12陽性を示すのに対し、肝臓ではCD34陰性Mac-1陽性ER-MP12陰性を示した。脳におけるクラスターは、末梢臓

器に比較して未分化であり通常の単球では発現しつか今後検討する必要がある。

えない抗原を発現していることを示した。

2) ミクログリアの発生的起源は、血液を循環している単球に由来するのではなく未分化な骨髄前駆細胞が脳実質中に移行し血球系の細胞とは独立した分化をとげたものである可能性を示唆できた。

5、神経細胞、ミクログリア、アストロサイトと酸化ストレス傷害(祖父江)

1) ミクログリア、神経細胞、アストロサイトの順に glyoxal による細胞死感受性が低かった。抗 CML による組織染色性を調べるとこの順により低濃度 glyoxal で CML 発現がみられた。

2) Microglia 系において、glyoxa 添加によって TNF-a の mRNA の誘導が認められた。また、IL-6 濃度の上昇が認められた。

D. 考察

1) GADD34 の機能解析への道具が揃った。

この3年間で GADD34 と結合する蛋白を yeast two hybrid 法で多数得た。これらの蛋白のうち Translin、KIF3 はその性質がかなり解っている。一方、BFCOL1、GAHSP40 等老化に関連しそうな興味深い蛋白もある。今後、GADD34 を高発現させる系を確立し、そこに、GADD34 と結合する蛋白をそのまま、あるいは dominant-dominant negative 型を遺伝子移入、GADD34 の細胞における機能を検索する予定である。

2) Mn-SOD の発現調節の研究は感染ストレスの実験が終了し、NFKB の役割が明らかになった。次に様々な刺激因子による発現制御の実験が進んでいる。

3) 紫外線、NO ラジカルがシグナル伝達系を高活性化状態に持っていくことを我々は見つけたが、このことが老化にいかなる意味を持

4) ミクログリアには subtype があり、骨髄由来ミクログリアは遺伝子操作後、生体内に簡単に戻せることが解った。今後、老化に正、負に働くミクログリアを明らかにすることが求められる。

5) AGEs は生体内ではゆるやかに発生するが、試験管内で急速に反応がおこることを見だし、この系で AGEs 産生のメカニズムを特に神経系の細胞で解析できるめどがたった。

E. 結論

1、Mn-SOD の発現上昇は TNF α 等感染ストレス刺激で引き起こされ、その発現調節機構を調べたところ、免疫系のシグナル伝達に類似していた。すなわち NFKB の p65 が重要な転写因子として働いていた。PDGF は細胞の代謝レベルをあげる同時に Mn-SOD 遺伝子発現を上昇させる。転写因子として Egr-1 が働いていることを見いだした。

2. GADD34 遺伝子産物と結合する蛋白質のクローニングを行い、熱ショック蛋白 40 ファミリー遺伝子、GAHSP40、トランスリン、キネシンファミリーに属する KIF3A、G34BP という四つのクローンを得てそれぞれの解析を行った。

3. NO の作用で非受容体型チロシンキナーゼ c-Src が分子間 S-S 結合等による分子修飾を受けて活性化することを示した。この活性化の経路において C 末端部の調節性チロシン (Y 527) の脱リン酸化は関与せず、Y 527 を欠損しこのため恒常的に活性化状態にある v-Src がスーパー活性化することを見いだした。紫外線の作用で受容体型チロシンキナーゼ RET 分子が S-S 結合で 2 量体化すること、この 2 量体化は RET の細胞内キナーゼドメイン C 末端側の特定のシステインを介する可能性

があることを示した。

4. 骨髄中には脳に親和性を持って脳に侵潤し、ミクログリアに変化する少数の細胞があることを発見した。

5. 神経細胞およびグリア細胞の培養系において、glyoxalによってCMLが誘導され、この際、ミクログリアから炎症性サイトカインが分泌された。

F.研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohkusu-Tsukada K, Tsukada T, Isobe K. Accelerated development and aging of the immune system in p53-deficient mice. *J Immunol* 163:1966-1972, 1999.
- 2) Hasegawa, T., Xiao, H., and Isobe, K. Cloning of a GADD34-like gene that interacts with the zinc-finger transcription factor which binds to the p21WAF1 promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 256, 249-254, 1999.
- 3) Xiao, H., Hasegawa, T., and Isobe, K. Both Sp1 and Sp3 are responsible for p21WAF1 promoter activity induced by histone deacetylase inhibitor in NIH3T3 cells. *J. Cell. Biochem.* 73, 291-302, 1999.
- 4) Maehara, K., Hasegawa, T., Xiao, H., Takeuchi, A., Abe, R. and Isobe, K. Cooperative interaction of NF- κ B- and C/EBP binding sites is necessary for manganese superoxide dismutase gene transcription mediated by lipopolysaccharide and interferon- γ . *FEBS Lett.* 449, 115-119, 1999.
- 5) Hasegawa, T. and Isobe, K. Evidence for the interaction of Translin and GADD34 in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1428, 161-168, 1999.
- 6) Xiao, H., Hasegawa, T., and Isobe, K. p300 collaborators with Sp1 and Sp3 in p21waf1/cip1 promoter activation induced by histone deacetylase inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 275, 1371-1376, 2000.
- 7) Hasegawa, T., Yagi, A., and Isobe, K. Interaction between GADD34 and kinesin superfamily, KIF3A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 267, 593-596, 2000.
- 8) Hasegawa, T., and Isobe, K. Characterization of a murine gene encoding an acidic-basic dipeptide repeat which interacts with GADD34. *J. Cell. Biochem.* in press.
- 9) Hasegawa, T., Takeuchi, A., Miyaishi, O., Xiao, H., Mao, J., and Isobe, K. PTRF is tissue-specific and interacts with the BFCOL1 zinc-finger transcription factor which binds to the two mouse type I collagen gene promoters. *Biochem. J.*, in press.
- 10) Nakashima, I., Akhand, A.A., Kato, M., Du, J., Liu, W., Hossain, K., Suzuki, H., Wu, J., Takeda, K., Takeuchi, K. and Yoshihara, M.: Oxidative stress and signal transduction in the immune system. *Recent Research Development in Immunology*, in press.
- 11) Du, J., Suzuki, H., Nagase, F., Akhand, A.A., Yokoyama, T., Miyata, T., Kurokawa, K. and Nakashima, I.: Methylglyoxal induces apoptosis in Jurkat leukemia T-cells by activating c-Jun N-terminal kinase. *J. Cell. Biochem.*, in press.

- 12) Du, J., Suzuki, H., Nagase, F., Akhand, A. A., Yokoyama, T. and Nakashima, I.: Evidence of a mercury-stimulated but interleukin 2-independent signal transduction pathway for the proliferation of a cytotoxic T cell line, CTL-2. *J. Cell. Biochem.*, in press.
- 13) Kato, M., Isobe, K., Dai, Y., Takahashi, M. and Nakashima, I.: Further characterization of the Sho-saiko-to-mediated anti-tumor effect on melanoma developed in RET-transgenic mice. *J. Invest. Dermatol.*, in press.
- 14) Kato, M., Iwashita, T., Takeda, K., Akhand, A.A., Liu, W., Yoshihara, M., Asai, N., Suzuki, H., Takahashi, M., and Nakashima, I.: Ultraviolet induces redox reaction-mediated dimerization and superactivation of oncogenic Ret tyrosine kinases. *Mol. Biol. Cell* 11:93-101, 2000.
- 15) Liu, W., Kato, M., Akhand, A.A., Hayakawa, A., Suzuki, H., Miyata, T., Kurokawa, K., Hotta, Y., Ishikawa, N. and Nakashima, I.: 4-Hydroxynonenal induces Fas-independent redox-related activation of caspase-3. *J. Cell. Sci.* 113:635-641, 2000.
- 16) Senga, T., Miyazaki, K., Machida, K., Iwata, H., Matsuda, S., Nakashima, I. and Hamaguchi, M. Clustered cysteine residues in the kinase domain of v-Src: critical role for protein stability, cell transformation and sensitivity to herbimycin A. *Oncogene* 19: 273-279, 2000.
- 17) Akhand, A.A., Pu, M., Senga, T., Kato, M., Suzuki, H., Miyata, T., Hamaguchi, M. and Nakashima, I.: Nitric oxide controls Src kinase activity through a sulfhydryl group modification-mediated Tyr527-independent and Tyr416-linked mechanism. *J. Biol. Chem.* 274: 25821-25826, 1999.
- 18) Liu, W., Akhand, A.A., Kato, M., Yokoyama, I., Uchida, K., Miyata, T., Kurokawa, K. and Nakashima, I.: 4-Hydroxynonenal triggers epidermal growth factor receptor-linked signal pathway for growth inhibition. *J. Cell Science* 112: 2409-2417, 1999.
- 19) 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., New York, pp.177-204, 1999.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) 中島 泉 : 環境応答と非レセプター型チロシンキナーゼ 蛋白質、核酸、酵素 増刊「環境応答・適応の分子機構」 44 (15): 2420-2426, 1999
- 25) 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」 医学部のあゆみ別冊、pp77-82, 1999
- 26) 中島 泉 : 新たなアポトーシス誘導因子 (AIF) の発見 特集Ⅱ「アポトーシスの新たな動向」 臨床免疫 32 (4) :417-425, 1999
- 27) 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.*, 72: 1466-1471, 1999.
- 28) Ono, K., Takii, T., Onozaki, K., Ikawa, M., Okabe, M., Sawada, M.: Migration of Exogenous Immature Hematopoietic Cells into Adult Mouse Brain Parenchyma under GFP-Expressing Bone Marrow Chimera. *Biochem Biophys Res Commun*, 262:610-614, 1999.
- 29) Suzumura, A., Ito, A., Yoshikawa, M., Sawada, M.: Ibuprofen suppresses TNF α production by glial cells functioning mainly as type III phosphodiesterase inhibitor in the CNS. *Brain Res.* 837, 203-212, 1999.
- 30) Inoue, H., Sawada, M., Ryo, A., Tanahashi, H., Wakatsuki, H., Hada, A., Kondoh, N., Nakagaki, K., Takahashi, K., Suzumura, A., Yamamoto, M., Tabira, T.: Serial analysis of gene expression in a microglial cell line. *Glia*, in press, 1999.
- 31) Suzumura, A., Sawada, M.: Effects of vesnarinone on cytokine production and activation of murine microglia. *Life Sciences*, 64:1197-1203, 1999.
- 32) Imai, F., Sawada, M., Suzuki, H., et al.: Exogenous microglia enter the brain and migrate into ischaemic hippocampal lesions. *Neurosci. Lett.* 272, 127-130, 1999.
- 33) 澤田誠 : アポトーシスとネクローシス. 生物試料分析, 22 : 93-100, 1999.
- 34) 澤田誠 : 神経系の分化とサイトカイン. *Clin. Neurosci.*, 16 : 406-408, 1999
- 35) 澤田誠 : グリア細胞とその機能 : 吉田孝人, 糸山泰人, 錫村明生 (編), 免疫学から見た神経系と神経疾患 pp99-108 日本医学館, 1999.
- 36) Hisayoshi Niwa, Akinori Takeda, Masakazu Wakai, Toshio Miyata, Yoshinari Yasuda, Terunori Mitsuma, Kiyoshi Kurokawa and Gen Sobue: 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.
- 37) Akinori Takeda, Takeshi Yasuda, Toshio Miyata, Yoji Goto, Masakazu Wakai, Masaki Watanabe, Yoshinari Yasuda, Katsunori Horie, Toshiaki Inagaki, Manabu Doyu, Kenji Maeda and Gen Sobue: Advanced glycation end products co-localized with astrocytes and microglial cells in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathologica* 95, 555-558, 1998.
- 38) Yasushi Kobayashi, Mei Li, Akito Kume, Manabu Doyu, Kenzo Ohtsuka and Gen Sobue: Chaperones, HSP 70 and HSP 40 suppress aggregate formation and

apoptosis in neuronal cells expressing
truncated androgen receptor with
expanded polyglutamine tract. *J. Biol.
Chem.* 2000, in press.

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）

活性酸素は紫外線、放射線、感染、あるいは内部の代謝により産生され、DNA、蛋白、脂質を障害し、老化の原因として最も注目されている。生体は活性酸素を消去する防御機構を持ち、その欠損は生存そのものに重大な影響を与える。本研究では、感染ストレス刺激により産生される各種サイトカインや細菌成分のLPSがMn-SOD遺伝子発現を上昇させその転写因子にNFkBという免疫共通の因子が深く関わっていることを示した。また、PDGF刺激もMn-SOD転写を上昇させることを見いだした。DNA傷害性ストレス刺激はp53やGADDシリーズの蛋白を発現させる。今回、GADD34そのものとそれに結合するGAHSP40遺伝子発現制御を検索し、GADD34のアルキル剤反応領域はTATAboxの200bp上流にあること、GAHSP40の熱反応領域はHSEにあることを見いだした。

キーワード：老化促進ストレス、Mn-SOD、遺伝子発現制御

A. 研究目的

1. ストレス刺激の内、活性酸素は紫外線、放射線、感染、あるいは内部の代謝により産生され、DNA、蛋白、脂質を障害し、老化の原因として最も注目されている。生体は活性酸素を消去する防御機構を持ち、その欠損は生存そのものに重大な影響を与える。消去酵素としてはスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ等がある。SODのうちMn-SODはミトコンドリアに存在し、その発現は紫外線、放射線、感染等ストレス刺激で誘導されることが知られてきている。我々も昨年までの研究でその発現制御をMn-SODのゲノムをクローニングし、プロモーター解析により報告してきた。本年度はその研究をさらに発展させると同時にMn-SODの発現と増殖刺激に関して研究を進めた。

2. DNA傷害性ストレス刺激はp53やGADDシリーズの蛋白を発現させる。p53は発現することにより細胞周期を止め、DNA修復を助け

たり、強く傷ついた細胞をアポトーシスの機構で除去し、老化防御蛋白としての機能を持っている。我々は初年度p53ノックアウトマウスを使用し、p53は免疫老化防止に重要な役割をもつことを示した。また、班員の長谷川を中心にGADD34と結合する蛋白を多数得てきた。本年はGADD34そのものとGADD34に結合するDnaJ類似蛋白GAHSPの遺伝子発現制御を検索した。

B. 研究方法

1. 遺伝子発現転写調節

マウスゲノムライブラリーよりMn-SOD、GADD34、GAHSP40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レポーター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、エンハンサー領域を含む各種の欠失、変異株作製した。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、各種刺激を加え、遺伝子発現をノザン解析で検索した。また、レポーターコンストラクト

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。

2、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。転写因子の特異性を知るために、抗体にてスーパーシフトアッセイを行った。

C. 研究結果

1. 昨年度、NIH3T3細胞あるいはRAW264細胞を感染ストレス刺激であるIL-1B, TNF-a, LPS, IFN-gで刺激するとMn-SODmRNAの発現増強がみられこれに対応するMn-SODの転写活性をルシフェラーゼ活性で測定した時活性の増強がみられたことを報告した。また、IL-1B, TNF-a, LPS, IFN-g反応性領域が第二イントロンのC/EBP, NFkBに存在することを報告した。今年度はさらに進めて、C/EBPb, NFkBのp65, p50サブユニットの発現ベクターを細胞に遺伝子移入した。NIH3T3細胞ではp65をRAW264細胞ではp65あるいはp50いずれかをエンハンサー領域(+2119- +2420)を含むMn-SODプロモーターベクターとともに移入した時に無刺激の状態、ルシフェラーゼ活性が著しく上昇した。これらの活性上昇は刺激によりさらに上昇した。血小板増殖因子(PDGF)を培養液に加えたところMn-SODmRNAの上昇をみた。Mn-SODプロモーターベクターを移入し、PDGF反応性領域を検索したところGC-richなSp1結合領域であった。ゲルシフトアッセイでEgr-1転写因子が結合し、PDGF反応性転写因子であることが判明した。

2、GADD34ゲノムの遺伝子構造をほぼ明らかにできた。TATAboxの200bp上流にアルキル剤処理(MMS)反応領域が存在し、この領域に含まれるSp1, CREB等が重要な役割を担う

可能性が示された。GAHSP40ゲノムの構造もほぼすべてあきらかにした。転写解析によりHSEが熱による反応性に必須であることを見つけた。

D. 考察

1、本研究では、いままでよく知られていなかったMn-SOD遺伝子の転写調節について実験し、感染ストレス刺激により産生される各種サイトカインや細菌成分のLPSがMn-SOD遺伝子発現を上昇させることを見いだした。さらにその時働く転写因子として免疫応答と同様にNFkBが重要な役割を担うこと、特にp65の重要性を明らかにした。しかし、そのほかにもラジカルそのものや、放射線、紫外線など多くのストレスでもMn-SODは誘導され、これらの調節機構は未だ不明である。

PDGFによりMn-SODの発現上昇がみられることは細胞が増殖シグナルを受けたときMn-SOD遺伝子発現が上昇することであり、いわば細胞の代謝レベルの上昇とMn-SOD発現上昇が平行しておこることを意味する。すなわちPDGFにより増殖シグナルをうけ、細胞より産生される活性酸素は産生の高まったSODにより効率よく消去される。膜よりEgr-1へのシグナル伝達系の解明を進めている。

2、アルキル剤に反応して発現が上昇する遺伝子としてGADD34, GADD45等があるがその転写因子、シス領域はまだ解っていない。これを明らかにし、さらに上流のシグナルを明らかにすることでGADD34の機能の解明、ストレス応答のメカニズムに近づけると考えている。GAHSP40は大腸菌のDnaJホモログであり、その発現制御と機能解析は哺乳類のストレス応答を知るのに重要な意味を持つと考えられる。

E. 結論

1、Mn-SOD の発現上昇は TNF α 等感染ストレス刺激で引き起こされ、その発現調節機構を調べたところ、免疫系のシグナル伝達に類似していた。すなわち NF κ B の p65 が重要な転写因子として働いていた。PDGF は細胞の代謝レベルをあげる同時に Mn-SOD 遺伝子発現を上昇させる。転写因子として Egr-1 が働いていることを見いだした。

2、GADD34 発現はアルキル剤処理で上昇し、その反応領域は TATAbox の 200bp 上流にあることが判明した。GAHSP40 は熱とアルキル剤処理で上昇し、その反応領域は HSE にあることが判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Ohkusu-Tsukada K, Tsukada T, Isobe, K
Accelerated development and aging of the immune system in p53-deficient mice. J Immunol 163:1966-1972, 1999.

2) Hasegawa, T., Xiao, H., and Isobe, K.
Cloning of a GADD34-like gene that interacts with the zinc-finger transcription factor which binds to the p21WAF promoter. Biochem. Biophys. Res. Commun. 256, 249-254, 1999.

3) Xiao, H., Hasegawa, T., and Isobe, K.
Both Sp1 and Sp3 are responsible for p21WAF1 promoter activity induced by histone deacetylase inhibitor in NIH3T3 cells. J. Cell. Biochem. 73, 291-302, 1999.

4) Maehara, K., Hasegawa, T., Xiao, H., Takeuchi, A., Abe, R. and Isobe, K.

Cooperative interaction of NF- κ B- and C/EBP binding sites is necessary for manganese superoxide dismutase gene transcription mediated by lipopolysaccharide and interferon- γ . FEBS Lett. 449, 115-119, 1999.

5) Hasegawa, T. and Isobe, K. Evidence for the interaction of Translin and GADD34 in mammalian cells. Biochim. Biophys. Acta 1428, 161-168, 1999.

6) Xiao, H., Hasegawa, T., and Isobe, K. p300 collaborates with Sp1 and Sp3 in p21waf1/cip1 promoter activation induced by histone deacetylase inhibitor. J. Biol. Chem., 275, 1371-1376, 2000.

7) Hasegawa, T., Yagi, A., and Isobe, K. Interaction between GADD34 and kinesin superfamily, KIF3A. Biochem. Biophys. Res. Commun., 267, 593-596, 2000.

8) Hasegawa, T., and Isobe, K. Characterization of a murine gene encoding an acidic-basic dipeptide repeat which interacts with GADD34. J. Cell. Biochem. in press.

9) Hasegawa, T., Takeuchi, A., Miyaishi, O., Xiao, H., Mao, J., and Isobe, K. PTRF is tissue-specific and interacts with the BFCOL1 zinc-finger transcription factor which binds to the two mouse type I collagen gene promoters. Biochem. J., in press.

2. 学会発表

①長谷川忠男、磯部健一

ストレス刺激による GADD34 と熱ショック蛋白 40 遺伝子発現第 2 回基礎老化学会 京都 平成 11 年 6 月

- ②肖 恒怡、長谷川忠男、李 強、磯部健一
p21/WAF1 プロモーター解析、第22回基礎
老化学会 京都 平成11年6月
- ③前原佳代子、長谷川忠男、磯部健一
NF- κ B によるマンガンスーパーオキシドジ
スムターゼ (Mn-SOD) 遺伝子の転写調節
第22回基礎老化学会 京都 平成11年6
月
- ④長谷川忠男、羽根田正隆、磯部健一
ストレス刺激により誘導される GADD34 遺
伝子の機能解析_Translin との関連第29回
日本免疫学会総会 京都 平成11年12月
- ⑤羽根田正隆、長谷川忠男、木村祐子、磯部
健一
ストレス刺激により誘導される GADD34 の
転写調節の解析
第29回日本免疫学会総会 京都 平成11
年12月
- ⑥長谷川忠男、八木文子、小島英嗣、羽根田
正隆、肖恒怡、磯部健一
GADD34 遺伝子と Zn-finger motif を持つ転
写因子との関連
第22回日本分子生物学会年会 福岡 平成
11年12月

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

がん遺伝子産物 v-Src および RET チロシンキナーゼが一酸化窒素(NO)または紫外線の作用でスーパー活性化することを見だし、活性化の機序に、キナーゼ分子上の特定システイン間の S-S 結合による分子の 2 (多) 量体化と関連する構造修飾が関与することを示した。

キーワード : Src、RET、スーパー活性化、NO、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) 同じモデルにおいて細胞表面から核に向けてのシグナル伝達カスケードの一部を明らかにした。(4) 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マウスモデルを樹立した。(5) がん遺伝子の発現制御機構の破綻に関わる加齢関連環境因子を解析するためのトランスジェニックマウスモデルを樹立した。(6) このモデルにおいて、加

齢に伴ってがんの進展にかかわる細胞内シグナル伝達カスケードの一部を明らかにするとともに、これを制御する植物性環境因子 (生薬) の作用を検出した。本年度は、(1) NO への曝露や紫外線の照射によって非受容体型チロシンキナーゼ c-Src および受容体型チロシンキナーゼ c-RET が活性化する機序、さらに活性型のがん遺伝子の産物である v-Src と RET が NO への曝露や紫外線の照射によってスーパー活性化する分子機序の解明を試みた。また、(2) 糖や脂質が酸化されてつくられる glyoxal, methylglyoxal, 4-hydroxynonenal (HNE) などのカルボニル化合物が、蛋白質リジンのアミノ基との Schiff-base 形成等を介して、非受容体型および受容体型チロシンキナーゼの活性をどのように修飾するかを予備的に調べた。

B. 研究方法

(1) 非受容体型 (c-Src, v-Src)、受容体型 (c-RET, RET) チロシンキナーゼを発現する NIH3T3 細胞に、NO を放出する SNAP や glyoxal、HNE などのカルボニル化合物を曝露させたり、紫外線を照射したりした後、細胞を溶解し、ウエスタンブロット、免疫沈降、試験管内キナーゼアッセイによってキナーゼ分子の発現と活性のレベルを測定した。

(2) site-directed mutagenesis 法によってチロ

シンキナーゼ分子の特定部位のチロシンまたはシステインをそれぞれフェニールアラニンやアラニンに置換したミュータント遺伝子を作製し、NIH3T3細胞に導入した。

C. 研究結果

(1) NOの作用で形成される分子間S-S結合を介して、非受容体型チロシンキナーゼであるc-Srcが構造を修飾され、その結果、通常の受容体とリガンドの結合によって起動するシグナル伝達経路をバイパスして活性化することを示した。この経路では、従来知られるSrc分子C末端部の調節性チロシン(Y 527)の脱リン酸化に依存することなく、活性化の経路が起動した。このため、Y 527を欠損して恒常的に活性化しているv-SrcがNOの作用でさらに強く活性化(スーパー活性化)した。一方、Y 416を欠損するミュータントを用いた実験の結果から、キナーゼドメインの上にあるこのチロシン残基は活性化に必須であることも認めた。(2) がん遺伝子の発現制御が加齢に伴う継続的な紫外線照射によって破綻するであろう分子機序を、がん遺伝子RETについて一部明らかにした。すなわち、恒常的に活性化しているがん遺伝子産物Retチロシンキナーゼが紫外線の照射によって2次的にさらに高度に活性化(スーパー活性化)することを見いだした。この機序に関して、RETチロシンキナーゼの分子間S-S結合による2量体化が活性化と密接に関連して紫外線により促進されることを認めた。さらに、キナーゼドメインにある2つのシステインをアラニンに置換したミュータント分子に対する紫外線の作用を解析した実験の結果から、上記の2量体化に向けてRETチロシンキナーゼの細胞内キナーゼドメインC末端側に位置する特定のシステイン残基が紫外線

の特に重要な標的となり得ることを示した

(3) 酸化ストレスによる

S-S結合による修飾とは別に、糖や脂質が酸化されてつくられるglyoxal, methylglyoxal, HNEなどのカルボニル化合物が蛋白質リジンなどのアミノ基とSchiff-base塩基を形成する化学修飾によっても、非受容体型、受容体型のチロシンキナーゼが、通常の受容体とリガンドの結合をバイパスして活性化することを予備的に示した。

D. 考察

本年度の研究により得られた成果から、細胞内シグナル伝達に重要な働きをする非受容体型、受容体型のチロシンキナーゼが、紫外線などの環境酸化ストレスや環境ストレスの作用を受けて細胞内で行われるNOなどのストレスによって、リガンド非依存性の新しい経路で活性化すること、この経路は、酸化ストレスがキナーゼ分子の特定のシステインを標的として作用することで起動する可能性があり、この経路による活性化によって遺伝的な欠陥によって恒常的に活性化しているがん遺伝子産物がさらに活性化(スーパー活性化)することが示された。これらの成績は、加齢効果が、従来知られるDNAの傷害の蓄積とは別に、遺伝子産物である蛋白質の構造修飾によるシグナル伝達の歪みの蓄積としてもおこり得ることを新たに示唆するものである。

E. 結論

1) NOの作用で非受容体型チロシンキナーゼc-Srcが分子間S-S結合等による分子修飾を受けて活性化することを示した。

2) この活性化の経路においてC末端部の調節性チロシン(Y 527)の脱リン酸化は関与せず、Y 527を欠損しこのため恒常的に活性化状態にあるv-Srcがスーパー活性化す

ることを見いだした。

3) 紫外線の作用で受容体型チロシンキナーゼ RET が活性化することを示した。

4) この活性化の機序において RET 分子が S-S 結合で 2 量体化すること、この 2 量体化は RET の細胞内キナーゼドメイン C 末端側の特定のシステインを介する可能性があることを示した。

5) 上記チロシンキナーゼの活性化が S-S 結合だけでなく Schiff-base 形成によっても起動する可能性を示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

① Nakashima, I., Akhand, A.A., Kato, M., Du, J., Liu, W., Hossain, K., Suzuki, H., Wu, J., Takeda, K., Takeuchi, K. and Yoshihara, M.: Oxidative stress and signal transduction in the immune system. Recent Research Development in Immunology, in press.

② Du, J., Suzuki, H., Nagase, F., Akhand, A.A., Yokoyama, T., Miyata, T., Kurokawa, K. and Nakashima, I.: Methylglyoxal induces apoptosis in Jurkat leukemia T-cells by activating c-Jun N-terminal kinase. J. Cell. Biochem., in press.

③ Du, J., Suzuki, H., Nagase, F., Akhand, A.A., Yokoyama, T. and Nakashima, I.: Evidence of a mercury-stimulated but interleukin 2-independent signal transduction pathway for the proliferation of a cytotoxic T cell line, CTL-L-2. J. Cell. Biochem., in press.

④ Kato, M., Isobe, K., Dai, Y., Takahashi, M. and Nakashima, I.: Further characterization of the Sho-saiko-to-mediated anti-tumor effect on melanoma developed in RET-transgenic mice. J. Invest. Dermatol., in press.

⑤ Kato, M., Iwashita, T., Takeda, K., Akhand,

A.A., Liu, W., Yoshihara, M., Asai, N., Suzuki, H., Takahashi, M., and Nakashima, I.: Ultraviolet induces redox reaction-mediated dimerization and superactivation of oncogenic Ret tyrosine kinases. Mol. Biol. Cell 11:93-101, 2000.

⑥ Liu, W., Kato, M., Akhand, A.A., Hayakawa, A., Suzuki, H., Miyata, T., Kurokawa, K., Hotta, Y., Ishikawa, N. and Nakashima, I.: 4-Hydroxynonenal induces Fas-independent redox-related activation of caspase-3. J. Cell. Sci. 113:635-641, 2000.

⑦ Senga, T., Miyazaki, K., Machida, K., Iwata, H., Matsuda, S., Nakashima, I. and Hamaguchi, M. Clustered cysteine residues in the kinase domain of v-Src: critical role for protein stability, cell transformation and sensitivity to herbimycin A. Oncogene 19: 273-279, 2000.

⑧ Akhand, A.A., Pu, M., Senga, T., Kato, M., Suzuki, H., Miyata, T., Hamaguchi, M. and Nakashima, I.: Nitric oxide controls Src kinase activity through a sulfhydryl group modification-mediated Tyr527-independent and Tyr416-linked mechanism. J. Biol. Chem. 274: 25821-25826, 1999.

⑨ Liu, W., Akhand, A.A., Kato, M., Yokoyama, I., Uchida, K., Miyata, T., Kurokawa, K. and Nakashima, I.: 4-Hydroxynonenal triggers epidermal growth factor receptor-linked signal pathway for growth inhibition. J. Cell Science 112: 2409-2417, 1999.

⑩ 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., New York, pp.177-204, 1999.

⑩ 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.

⑪ 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.

⑫ 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.

⑬ 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.

⑭ 中島 泉：環境応答と非レセプター型チロシンキナーゼ 蛋白質、核酸、酵素 増刊「環境応答・適応の分子機構」 44 (15): 2420-2426, 1999

⑮ 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」 医学部のあゆみ別冊、pp77-82, 1999

⑯ 中島 泉：新たなアポトーシス誘導因子 (AIF)の発見 特集 II「アポトーシスの新たな

な動向」 臨床免疫 32 (4) :417-425, 1999

2. 学会発表

① Akhand, A.A., Pu, M., Senga, T., Kato, M., Suzuki, H., Miyata, T., Hamaguchi, M. and Nakashima, I.: Nitric oxide controls Src kinase activity through a redox reaction-mediated Tyr527-independent and Tyr416-linked mechanism. International Symposium for Oxidative stress, Redox Regulation and Signal

Transduction; Clinical Implications. Kyodai Kaikan, Kyoto, November 4-6, 1999.

② Hossain, K., Akhand, A.A., Kato, M., Suzuki, H. and Nakashima, I.: Arsenic -induced caspase-dependent apoptosis of murine thymocytes is linked to activation of c-Jun amino-terminal kinase (JNK). International Symposium for Oxidative stress, Redox Regulation and Signal Transduction; Clinical Implications. Kyodai Kaikan, Kyoto, November 4-6, 1999.

③ Kato, M., Akhand, A.A., Liu, W., Takeda, K., Takeuchi, K., Yoshihara, M., Hossain, K., Suzuki, H. and Nakashima, I. : Mechanism of ultraviolet light-mediated Ret tyrosine kinase activation. International Symposium for Oxidative stress, Redox Regulation and Signal Transduction; Clinical Implications. Kyodai Kaikan, Kyoto, November 4-6, 1999.

④ Liu, W., Kato, M., Akhand, A.A., Suzuki, H. and Nakashima, I.: 4-hydroxynonenal induces Fas-independent redox-related activation of caspase-3. International Symposium for Oxidative stress, Redox Regulation and Signal Transduction; Clinical Implications. Kyodai Kaikan, Kyoto, November 4-6, 1999.

⑤ Akhand, A.A., Hossain, K., Kato, M., Du, J., Suzuki, H., Miyata, T. and Nakashima, I.:

Regulation of mitogen activated protein kinase (MAPK) in human endothelial cells by carbonyl stress. 第29回日本免疫学会総会, 京都, 1999.

⑥武田湖州恵、加藤昌志、Anwarul A. Akhand, 竹内啓、吉原基、Khaled Hossain, 中島泉：浸透圧ストレスは繊維芽細胞の細胞内シグナル伝達に影響を与える。第29回日本免疫学会総

会, 京都, 1999

⑦竹内啓、加藤昌志、Anwarul A. Akhand, 吉原基、武田湖州恵、Khaled Hossain、中島泉：アクロレインはヒトケラチオノサイトのアポトーシスを誘導する。第29回日本免疫学会総会, 京都, 1999

老化促進ストレスと神経細胞死

分担研究者 祖父江元 名古屋大学神経内科教授

神経系細胞 (neuro 2a、PC12) と、グリア系細胞 (astrocyte、microglia) の培養系において、glyoxal の細胞障害性、AGE (carboxymethyllysine : CML) 産生、さらに cytokine 産生を検討した。Glyoxal によって CML は時間・濃度依存的に誘導され、aminoguanidine によって阻害された。Glyoxal による CML 産生と細胞死の誘導されやすさは平行しており、microglia=neuro 2a>PC12(NGF 添加群)>PC12(NGF 非添加群)>astrocyte の順であった。また glyoxal により microglia が炎症性サイトカインを分泌することが認められた。老化による神経細胞障害に、CML をはじめとする advanced glycation endproducts (AGEs) が、炎症性サイトカインを介して関与している可能性がある。

キーワード：神経系細胞、AGE、細胞死

A. 研究目的

老化脳やアルツハイマー病脳などにおいて、advanced glycation endproducts(AGEs)が沈着していることが報告され、その病態への関連が注目されている。剖検脳を用いた我々の検討では、若年脳では AGEs の 1 つである CML はほとんど検出できないが、高齢では神経細胞内に多量の、神経細胞外に少量の CML の沈着がみられる。しかしアルツハイマー病脳では、CML は神経細胞内外にさらに多量に沈着しており、このうち神経細胞外のはアストロサイトとミクログリアに存在する。このことから、加齢やアルツハイマー病に伴う神経組織の病理変化において、CML をはじめとする AGEs が重要な役割を果たしている可能性があると考えられる。AGEs は、蛋白と糖が非酵素的に反応して生じる最終産物で、受容体を介して様々な生理活性を示す。AGEs の生成には長時間が必要とされていたが、近年、酸化ストレス環境下で生成される glyoxal などの中間代謝物質によってその生

成が促進されることがわかってきた。そこで神経系細胞 (neuro 2a および PC12) と、グリア系細胞 (マウス由来 astrocyte と microglia) について glyoxal による carboxymethyllysine (CML) の誘導と細胞障害性を検討し、その影響を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

神経系の培養 cell line として neuro2a、PC12 を、microglia 系として 6-1、6-3、Ra2 を、astrocyte 系として AST-1、AST-3 を用いた。特に neuro2a と PC12 については retinoic acid と NGF をそれぞれ添加し、神経系細胞へ分化誘導した。これらに glyoxal を 0.001～10mM の各濃度で添加し、cell viability と AGE の 1 種である CML の誘導を検討した。また、AGEs の生成阻害物質である aminoguanidine を glyoxal と同じ濃度で添加し、CML の誘導が阻害されるか否かを検討した。Cell viability は光顕的に細胞の形態変化を観察するとともに、MTT assay を行い

生存率を測定した。CMLの産生の評価には、抗CML抗体(和光純薬)を用いて培養細胞の免疫組織染色を行うとともに、Western blot analysisによる検討を行った。さらにglyoxal添加(0.1mM)によるmicroglia系とastrocyte系細胞のcytokine(IL-1b, IL-2, IL-6, TNF-a)の産生を、RT-PCRと各cytokineに対する特異抗体を用いたELISAによって測定した。

C. 研究結果

1. cell viability

神経系細胞では、アストロサイト系細胞に比べて低濃度のglyoxalで細胞障害、細胞死が見られた(ED50: neuro2a 1mM, astrocyte 8~10mM)。PC12ではNGF添加群の方が、非添加群よりもglyoxalに対して脆弱であった(ED50: NGF添加群 3.4mM、NGF非添加群: 5.5mM)。Microgliaでは、低濃度のglyoxalで細胞死が誘導された(ED50: 0.5~1.8mM)

2. CMLの産生

神経系細胞の培養系では、glyoxalの濃度依存性に、抗CML抗体による組織染色性が高くなった。また、グリア細胞の培養系でも、astrocyteとmicrogliaともに、glyoxalの濃度が濃くなるにしたがって染色性は高くなった。また、これらの染色性はaminoguanidineによって濃度依存的に阻害された。またWestern blot analysisにより、いずれの培養系でも、glyoxalの濃度が濃くなるにしたがって、抗CML抗体による広範なsmear bandが検出された。これらのbandはaminoguanidineによって濃度依存的に抑制された。このglyoxalのCML誘導の程度はcell lineageによって大きな差異が見られ、astrocyte系がもっとも高濃度のglyoxalによ

りCMLの誘導が見られ、neuron系とmicroglia系は数十~百倍低濃度で誘導が見られた。また、PC12ではNGFの添加と非添加でCMLの誘導が異なっており、添加群の方が、非添加群よりも低濃度でbandが誘導された。

3. Cytokineの産生

Microglia6-3系において、glyoxal 0.1mMの添加によってTNF-aのmRNAの誘導が認められた。また、IL-6は283.6pg/mlから434.1pg/mlへ、TNF-aは検出不能から90.7pg/mlへと濃度の上昇が認められた。IL-1b、IL-2には特に変化はみられなかった。Astrocyte系では、IL-1b、IL-2、IL-6、TNF-aのいずれも、mRNA、濃度とも特に変化はみられなかった。

D. 考察

我々の剖検脳を用いた検討では、若年脳ではCMLの沈着は全く検出できないが、老齢では神経細胞内に多量の、神経細胞外に少量のCMLの沈着がみられている。また、加齢に関連して発症するアルツハイマー病脳では、CMLは神経細胞内外に多量に沈着しており、このうち神経細胞外のはアストロサイトとミクログリアに存在する。このことから、加齢に伴う中枢神経組織の病理変化において、CMLをはじめとするAGEsが重要な役割を果たしている可能性があると考えられる。AGEsは、蛋白と糖が非酵素的に反応(メイラード反応)して生じる不可逆的な物質で、褐色で、蛍光を有し、各種酵素に抵抗性で非常に分解されにくいなどの特性を持つ。最近、老化のみならず、糖尿病や腎不全合併症にも関係することが知られる様になり、注目されているところである。AGEsは、受容体(Receptor of