

長寿科学総合研究事業

平成11年度 研究報告書

平成12年3月31日

老化に伴う臓器機能不全の分子病態に関する研究

班長：丸山 征郎

(鹿児島大学医学部臨床検査医学)

長寿科学総合研究事業

# 平成 11 年度 研究報告書

老化に伴う臓器機能不全の分子病態に関する研究

## まえがき

老化に伴い、種々の臓器は機能低下を来す。これは高齢者の日常の生活のクオリティを損ない、その個人のみか、社会にも大きな損失となる。従って老化に伴う生体各臓器の機能低下の原因を明らかにし、その防止を計り、臓器の機能を温存することは重要かつ、緊急な課題となっている。一方エイジングで機能低下に陥った臓器の組織像は各臓器毎に異なっており、機能低下のプロセスが必ずしも同一の機序ではないことを示唆している。

本研究班では、加齢に伴う代表的臓器の機能低下のメカニズムを明らかにし、その診断法を考案して、その予防策を模索し、最終的には高齢者の臓器の機能低下防止策を考案することを目的とした。

平成 12 年 3 月 31 日

長寿科学総合研究事業班  
班 長 丸山 征郎

## 目 次

- |                           |     |    |      |
|---------------------------|-----|----|------|
| 1) まえがき                   | ・・・ | 班長 | 丸山征郎 |
| 2) 平成 11 年度研究班構成員名簿       |     |    |      |
| 3) 平成 11 年度総括研究報告書        | ・・・ | 班長 | 丸山征郎 |
| 4) 平成 11 年度分担研究報告書        | ・・・ | 班員 | 丸山征郎 |
|                           | ・・・ | 班員 | 清野 進 |
|                           | ・・・ | 班員 | 宮園浩平 |
|                           | ・・・ | 班員 | 中島利博 |
|                           | ・・・ | 班員 | 一瀬白帝 |
|                           | ・・・ | 班員 | 鄭 忠和 |
|                           | ・・・ | 班員 | 茆原順一 |
| 5) 平成 11 年度研究成果の刊行に関する一覧表 |     |    |      |

# 研究班構成員名簿

平成11年度 長寿科学総合研究事業 研究者名簿

研究課題名：老化に伴う臓器機能不全の分子病態に関する研究 (課題番号) H10-長寿-006						
区分	氏名	ふりがな	所属施設名及び職名(役職)	所属施設所在地	電話番号	FAX番号
主任	丸山 征郎	まるやま いくろう	鹿児島大学医学部臨床検査医学講座(教授) rinken@khosp2.kufm.kagoshima-u.ac.jp	〒890-8520 鹿児島市桜ヶ丘8-35-1	099-275-5437	099-275-2629
分担	清野 進	せい の すすむ	千葉大学大学院医学研究科高次機能系 統合機能学講座分子機能制御学(教授) seino@molmed.m.chiba-u.ac.jp	〒260-8676 千葉市中央区亥鼻1-8-1	043-226-2187	043-221-7803
分担	宮園 浩平	みやぞの こうへい	(財)癌研究会癌研究所生化学(部長) miyazono-ind@umin.ac.jp	〒170-0012 東京都豊島区上池袋1-37-1	03-3918-0111	03-3918-0342
分担	中島 利博	なかじま としひろ	筑波大学応用生物化学系(講師) nakashit@sakura.cc.tsukuba.ac.jp	〒305-8572 つくば市天王台 1-1-1 筑波大学第2学系共同 利用棟A318 応用生物化学系	0298-53-7300	0298-53-7300
分担	一瀬 白帝	いちのせ あきただ	山形大学医学部分子病態学講座(教授) aichinos@med.id.yamagata-u.ac.jp	〒990-9585 山形市飯田西2-2-2	023-628-5276	023-628-5280
分担	鄭 忠和	てい ちゅうわ	鹿児島大学医学部第一内科学講座(教授) tei@med2.kufm.kagoshima-u.ac.jp	〒890-8520 鹿児島市桜ヶ丘8-35-1	099-275-5316	099-265-8447
分担	荻原 順一	ちはら じゅんいち	秋田大学医学部臨床検査医学講座(教授) chihara@hos.akita-u.ac.jp	〒010-8543 秋田市本道1-1-1	018-884-6180	018-836-2624

経理事務担当者

区分	氏名	ふりがな	所属施設名及び職名(役職)	所属施設所在地	電話番号	FAX番号
経理	酒匂 和子	さこう かずこ	鹿児島大学医学部臨床検査講座(秘書) hanako@med2.kurm.kagoshima-u.ac.jp	〒890-8520 鹿児島市桜ヶ丘8-35-1	099-275-5437	099-275-2629

# 総括研究報告書

## 老化に伴う臓器機能不全の分子病態に関する研究

丸山 征郎

（鹿児島大学医学部臨床検査医学・教授）

加齢に伴い、種々の臓器は機能低下に陥り、これが個々人の Quality of Life を損なう他、社会的にも大きな損失を与える。本研究プロジェクトは、1) 加齢に伴う各重要臓器の機能の低下を評価し、2) その分子病態を解明し、3) 各臓器の機能的低下の特殊性と普遍性を明らかにし、4) 最終的には加齢に伴う臓器の機能低下の防止策、治療法を立案することである。今回はこれらの点に関して、心一肺、脾、（脳）血管（凝固線溶）という臓器毎の視点を縦軸に、細胞のダイナミクス、遺伝子の転写、老化という視点を横軸にして解析した。

心臓の機能を左右する冠動脈ではリスクファクターの有無に拘らず、加齢とともにアテロームの面積が拡がり、かつアデノシン、アセチルコリンに対する拡張性反応が低下した。

肺は加齢とともに支持組織が弛緩して、いわゆる「弛緩肺」に陥るが、気道上皮細胞は IGF-1 受容体を発現しており、試験管内では IGF-1 に対して増殖した。このことは今後の治療に展望を与えるものである。

また細胞外マトリックスの産生を介して組織の線維化、リモデリングに関与する TGF- $\beta$  からのシグナルに関わる Smad のうち、抑制型 Smad は、TGF- $\beta$ 、BMP からのシグナルを抑制することが明らかとなった。

糖尿病の発生病理にミトコンドリアが関係する例が存在することが明らかになっているが、今回ミトコンドリアの機能に関する新規 ABC 蛋白遺伝子をクローニングし、MTABC3 と命名した。これと脾からのインスリン分泌に関しては、今後の問題である。

凝固線溶/血管系では F.XIII, plasminogen の発現に関わる 5' のプロモーターに多型性があること、これにアジア人と白人、さらにアジア人間でも発現頻度に違いがあることが明らかになった。これと血栓発症の関係の解明が待たれる。

脳血管障害後には脳局所でトロンピンが生成される。今回このトロンピンは神経細胞にアポトーシスを誘導することを見出し、その制御法についても 2、3 の薬剤を発見した。

動脈硬化巣では転写統合因子 CBP/p300 のアセチルトランスフェラーゼ活性により、核内にアセチル化したタンパクが集積していることが判明し、hypernuclear acetylation (HNA) と命名した。この HNA はトロンピン/トロンピン受容体から、MAPK を介すシグナル伝達経路でも起こりうるということが明らかになった。

### A. 研究目的

加齢に伴い、種々の臓器は機能低下に陥り、これが個々人の quality of life を損なうほか、社会的にも大きな損失となっている。今後の未曾有の高齢化社会を考えると、加齢に伴う臓器の機能障害を防ぎ、個々人の健やかな老後を保障することは緊急の医学的課題で

ある。このプロジェクトは加齢に伴う諸臓器の機能低下の仕組みを各臓器、細胞、分子、遺伝子/転写因子の各レベルで明らかにして、機能低下の防止策を立案することである。縦軸としての視点から臓器として、1) 脳、心臓、肺、を選び、横軸としての視点から、2) 転写制御、3) 細胞死（アポトーシスとネクロー



シス)、4)細胞外マトリクス産生に関与する TGF- $\beta$ 、BMP のシグナル伝達、5)凝固線溶・血管機能、などの面、6)トロンビンの神経細胞に対する影響、などの面から検討し、加齢に伴う諸臓器の機能低下の分子病態を明らかにし、その防止策を立案する。

## B. 研究方法

1.加齢と心機能：冠動脈造影、血管内超音波を施行しえた26名の患者について、アテロームの面積、内皮機能(アデノシン、アセチルコリンに対する応答性)を調べた。

2.気道上皮の再生能と増殖因子：加齢とともに弛緩性となっていく肺の治療を最終目標として、気管支上皮細胞の IGF-1 に対する応答性を検討した。

3.インスリン分泌とミトコンドリア機能の関係：インスリン分泌、糖尿病発症に関わるミトコンドリアの新規 ABC 蛋白遺伝子をクローニングを試みた。

4.加齢と血管・凝固/線溶系：プラスミノゲン、第 X III 遺伝子の5'プライム側の遺伝子多型性とその頻度を調べた。

5.トロンビンの神経毒性：トロンビンの神経毒性を neuro-2A 細胞を用いて検討した。

6.TGF- $\beta$  は組織の線維化、リモデリングに関わることが判明している。そこで TGF- $\beta$  のシグナル伝達を明らかにするため、シグナルに関わる因子 Smad 類について検討した。

7.転写統合装置 CBP/RNA ヘリケース A の機能がどのように動脈硬化病変の成立に関わっているのかを、特異的抗イプシロンアセチル化リジン抗体を作成して検討した。またトロンビン刺激した血管平滑筋細胞のヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT) 活性を測定した。

## C. 研究結果

1.冠危険因子が無くても、冠動脈のアテローム病変は加齢とともに拡がるのが明らかになった。また加齢とともに冠動脈の内皮機能が低下することが判明した。

2.気道上皮細胞は IGF-1 受容体を発現し、IGF-1 刺激に応答して増殖した。

3.ミトコンドリア機能に関わる新規 ABC 蛋白のホモログ；MTABC3 遺伝子をクローニングした。

4.FX III、プラスミノゲン遺伝子の5'を解析し、それぞれプロモーター領域に多型性があり、これに人種差があることを見出した。

5.トロンピンはトロンピン受容体 PAR-1 を介して、神経細胞にアポトーシスを誘導することを明らかにし

た。このトロンピン誘発性アポトーシスはリコンビナント TM、トロンピン受容体シグナル遮断剤 (E5510)、抗酸化剤 NAC で抑制された。

6.TGF  $\beta$ 、MBP からのシグナルは抑制性 Smad で抑制された。

7.動脈硬化巣では増殖した血管平滑筋細胞の核内にアセチル化したタンパクが集積しているのが認められた(これを Hypernuclear Acetylation, HNA) と命名したが、これは試験管内でトロンピン刺激で再現しえた。またこの場合のシグナル伝達は MAPK を介するものであった。

## D. 考察

加齢に伴う諸臓器の機能低下は必ずしも基本的な共通の基盤があるわけではない。例えば、心臓の場合にはなんら既知の冠危険因子が無くとも、加齢とともに冠動脈のアテローム病変の面積が拡がり、また冠動脈内皮細胞機能が低下することが判明した。このことから、冠動脈の最も重要な危険因子は「aging」であるともいえる。肺の場合の加齢変化；肺弛緩には、IGF-1 で気道上皮細胞が増殖したことから、今後の展開が期待される。

新規ミトコンドリアの ABC 蛋白；MTABC3 をクローニングしたが、これと膵機能、さらにインスリンの分泌の関係は今後の課題である。今後この分子細胞機構の解明をめざしたい。

F.X III、プラスミノゲン5'プロモーターの多型性を見出したが、これらと血栓との関係を今後の問題としたい。

トロンピン誘発性神経細胞アポトーシスと臨床の病態、例えば遅発性神経細胞死との対応が興味あることである。最近 PAR-2 が神経細胞に発現しており、トリプターゼで活性化され、神経細胞から substance P, CGRP が放出されるという報告がなされたので、今後これらとの関係も重要である。

今回 TGF  $\beta$  の細胞内のシグナルの一部が明らかになった。Smad ファミリーの組み合わせにより、細胞内シグナルが変わるので、今後各臓器の加齢変化の違いがシグナル伝達レベルで解明しうる可能性が出てきた。

また動脈硬化巣ではアセチルトランスフェラーゼ活性が上昇し、細胞核内は Hyper nuclear acetylation(HNA)ともいえる状態になっていることが判明した。そしてその原因の一つとして、トロンピンが考えられた。

## E. 結論

各臓器の加齢に伴う機能低下は必ずしも同一の基盤によるものではないことが、例えば心と肺を取り上げても明らかになった。動物モデルを使った場合の膵臓では加齢とともにインスリンの分泌が低下するの事を昨年明らかにしていたが、これには今回の研究でミトコンドリアの機能が関係している可能性が推定された。TGF $\beta$ からのシグナルの違いは細胞内 Smad システムの違いによる可能性も考えられた。またトロンピンはトロンピン受容体を介して直接神経細胞にアポトーシスを誘導することが明らかになった。

動脈硬化では血管平滑筋細胞の Hyper Nuclear Acetylation ともいふべき現象が観察されたが、これは血管壁細胞では活発な転写系の亢進があることを示している。

これらのことから加齢に伴う臓器の機能低下にも細胞レベル、臓器レベルで相は多彩であることが示された。今後これらを分子・細胞レベルで統一的に理解する理論が必要であろう。

本年度はこれらのことを課題として取り組みたい。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Mitsuhashi, N., Miki, T., Senbongi, H., Yokoi, N., Yano, H., Miyazaki, M., Nakajima, N., Iwanaga, T., Yokoyama, Y., Shibata, T., and **Seino, S.** MTABC3, a novel mitochondrial ABC protein involved in iron homeostasis. *J. Biol. Chem.* (In press)
- 2) Brown, H., Meister, B., Berggren, P-O., Rhodes, C.J., **Seino, S.**, and Fried, G. Synaptotagmin isoforms are distinctly compartmentalized in pancreatic endocrine cells. *Diabetes*. (In press)
- 3) **Seino, S.**, Iwanaga, T., Nagashima, K., and Miki, T. Perspective in Diabetes: Diverse roles of K<sub>ATP</sub> Channels learned from Kir6.2 genetically engineered mice. *Diabetes*. 49:311-318, 2000
- 4) Liu, M., **Seino, S.**, and Kirchgessner, A.L. Identification and characterization of glucoresponsive neurons in the enteric nervous system. *J. Neurosci.* 19:10305-10317, 1999
- 5) Sunaga, Y., Inagaki, N., Gono, T., Yamada, Y., Ishida, H., Seino, Y., and **Seino, S.** Troglitazone but not pioglitazone affects ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel activity. *Eur. J. Pharmacol.* 381:71-76, 1999
- 6) Suzuki, M., Fujikura, K., Kotake, K., Inagaki, N., **Seino, S.**, and Takata, K. Immuno-localization of sulfonylurea receptor 1 in rat pancreas. *Diabetologia*. 42:1204-1211, 1999
- 7) Beguin, P., Nagashima, K., Nishimura, M., Gono, T., and **Seino, S.** PKA-mediated phosphorylation of the human K<sub>ATP</sub> channel: separate roles of Kir6.2 and SUR1 subunit phosphorylation. *EMBO J.* 18:4722-4732, 1999
- 8) Kawaki, J., Nagashima, K., Tanaka, J., Miki, T., Miyazaki, M., Gono, T., Mitsuhashi, N., Nakajima, N., Iwanaga, T., Yano, H., and **Seino, S.** Unresponsiveness to glibenclamide during chronic treatment induced by reduction of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel activity. *Diabetes*. 48: 2001-2006, 1999
- 9) Nishimura, M., Miki, T., Yashima, R., Yokoi, N., Sato, Y., and **Seino, S.** Angiotensin-3, A novel member of the angiotensin family. *FEBS Lett.* 448:254-256, 1999
- 10) Miki, T., Nagashima, K., and **Seino, S.** The structure and function of the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in pancreatic  $\beta$ -cells. *J. Mol. Endo.* 22:113-123, 1999
- 11) Nishihara, A., Hanai, J., Imamura, T., **Miyazono, K.**, and Kawabata, M. E1A inhibits transforming growth factor- $\beta$  signaling through binding to Smad proteins. *J. Biol. Chem.* 274(40):28716-28723, 1999
- 12) Nakao, A., Fujii, M., Matsumura, R., Kumano, K., Saito, Y., **Miyazono, K.**, and Iwamoto, I. Transient gene transfer and expression of Smad7 prevents bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *J. Clin. Invest.* 104(1):5-11, 1999
- 13) Fujii, M., Takeda, K., Imamura, T., Aoki, H., Sampath, T. K., Enomoto, S., Kawabata, M., Kato, M., Ichijo, H., **Miyazono, K.** Roles of bone morphogenetic protein type I receptors and Smad proteins in osteoblastic and chondroblastic differentiation. *Mol. Biol. Cell.* 10(11):3801-3813, 1999
- 14) Hanai, J., L.F. Chen., Kanno, T., Ohtani-Fujita, N., W. Y. Kim., W.H. Guo., Imamura, T., Ishidou, Y., Fukuchi, M., M.J. Shi., J. Stavnezer., Kawabata, M., **Miyazono, K.**, and Ito, Y. Interaction and functional cooperation of PEBP2/CBF with Smads: Synergistic induction of the immunoglobulin germline Ca promoter. *J. Biol. Chem.* 274(44):31577-31582, 1999

- 15) Akiyoshi, S., Inoue, H., Hanai, J.-i., Kusanagi, K., Nemoto, N., **Miyazono, K.**, and Kawabata, M. c-Ski acts as a transcriptional corepressor in TGF- $\beta$  signaling through interaction with Smads. *J. Biol. Chem.* 274(49):35269-35278, 1999
- 16) Tada, K., Inoue, H., Ebisawa, T., Makuuchi, M., Kawabata, M., Imamura, T., and **Miyazono, K.** Region between  $\alpha$ -helices 3 and 4 of the Mad homology 2 domain of Smad4: Functional roles in oligomer formation and transcriptional activation. *Genes Cells.* 4(12):731-741, 1999
- 17) Kusanagi, K., Inoue, H., Ishidou, Y., K. Mishima, H., Kawabata, M., and **Miyazono, K.** Characterization of a bone morphogenetic protein-responsive Smad binding element. *Mol. Biol. Cell.* 11(2):555-565, 2000
- 18) Ishida, W., Hamamoto, K., Kusanagi, K., Yagi, K., Kawabata, M., Takehara, K., T.K. Sampath, Kato, M., and **Miyazono, K.** Smad6 is a Smad1/5-induced Smad inhibitor: Characterization of bone morphogenetic protein-responsive element in the mouse Smad6 promoter. *J. Biol. Chem.* 275(9):6075-6079, 2000
- 19) **Miyazono, K.** Positive and negative regulation of TGF- $\beta$  signaling. *J. Cell Sci.* 2000 (In press)
- 20) Beppu, H., Kawabata, M., Hamamoto, T., Chytil, A., Minowa, O., Noda, T., and **Miyazono, K.** BMP type II receptor is required for gastrulation and early development of mouse embryos. *Dev. Biol.* 2000 (In press)
- 21) J. Pitkänen., Vassilis Doucas, T. Sternsdorf., **Nakajima, T.**, Aratani, S., K. Jensen., H. Will., Perttu Vähämurto., J. Ollila., V. Mauno., H.S. Scott., S.E. Antonarakis., Kudoh, J., Shimizu, N., K. Krohn., and P. Peterson. APECED protein AIRE has transcriptional transactivating properties and interacts with common co-activator CBP. *J. Biol. Chem.* (In press)
- 22) Nakazawa, M., Hasunuma, T., Ohshima, T., Kobata, T., Nishioka, K., and **Nakajima, T.** CBP: a target molecule of HTLV-1 Tax in synovial cell activation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (In press)
- 23) Miyagishi, M., Ohshima, T., Ishida, J.-i., Fujii, R., **Nakajima, T.**, and Fukamizu, A. Cell type-dependent transactivation or repression of mesoderm-restricted basic helix-loop-helix protein, POD-1/Capsulin. *Molecular and Cellular Biochem.* (In press)
- 24) Koya, D., J.W. Dennis., C.E. Warren., Y.-W. Lin., F.J. Schoen., Nishio, Y., **Nakajima, T.**, Takahara, N., M. Lipes., M.R. Montminy., and G.L. King. Overexpression of Core 2 N-acetylglucosaminyltransferase Enhanced Cytokine Actions and Induced Hypertrophic Myocardium in Transgenic Mice. *FASEB J.* 13:2329-2337, 1999
- 25) Kawahara, K.-I., Watanabe, S., Ohshima, T., Soejima, Y., Oishi, T., Aratani, S., Amano, T., Fujii, R., Hagiwara, M., Fukamizu, A., and **Nakajima, T.** Hypernuclear acetylation in atherosclerotic lesions and activated vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 266:417-424, 1999
- 26) K.P. Sarker., Abeyama, K., Nishi, J.-I., Nakata, M., Tokioka, T., **Nakajima, T.**, Kitajima, I., and Maruyama, I. Inhibition of Thrombin-induced Neuronal Cell Death by Recombinant Thrombomodulin and E5510, a Synthetic Thrombin Receptor Signaling Inhibitor. *Thrombosis and Haemostasis.* 82:1071-1077, 1999
- 27) Miyagishi, M., **Nakajima, T.**, and Fukamizu, A. Molecular characterization of mesoderm-restricted basic helix-loop-helix protein, POD-1/capsulin. *International Journal of Molecular Medicine.* 5:27-31, 1999
- 28) Ohshima, T., **Nakajima, T.**, Aratani, S., Oishi, T., Fukamizu, A., and Yagami, K.-I. CRM1 mediates nuclear export of parvovirus minute virus of mice nonstructural protein NS2. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 264:155-160, 1999
- 29) K.P. Sarker., Uchimura, T., **Nakajima, T.**, Sorimachi, M., Kitajima, I., and Maruyama, I. Inhibition of Nitric oxide (NO)-induced Neuronal Cells Death by Epinephrine. *Neurosci. Res. Commun.* 26:157-162, 1999
- 30) K.P. Sarker., Nakata, M., **Nakajima, T.**, Kitajima, I., and Maruyama, I. Increased Production of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) by Angiotensin II in Neuro-2a cells. *Neurosci. Res. Commun.* 26:157-162, 1999
- 31) Shin, H., Kitajima, I., **Nakajima, T.**, Shao, Q., Tokioka, T., Takasaki, I., Hanyu, N., Kubo, T., and Maruyama, I. Thrombin receptor mediated signals induce expressions of interleukin 6 and granulocyte colony stimulating factor via NF- $\kappa$ B activation in synovial

fibroblasts. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 58:55-60,1999

32) Ishida, J., Asada, S., Daitoku, H., Fujiwara, K., Kon, Y., Murakami, K., Nakajima, T., Kasuya, Y., and Fukamizu, A. Expression and characterization of mouse angiotensin II type 1a receptor tagging hemagglutinin epitope in cultured cells. *International Journal of Molecular Medicine*. 3:263-270,1999

33) Uakji, F., Kitajima, I., Kubo, T., Shimizu, C., Nakajima, T., and Maruyama, I. Serum samples of patients with rheumatoid arthritis contain a specific autoantibody to "denatured" aldolase A in the osteoblast-like cell line, MG-63. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 58:169-174,1999

34) Kida, M., Souri, M., Yamamoto, M., Saito, H., and Ichinose, A. Transcriptional Regulation of Cell Type-Specific Expression of the TATA-Less A Subunit Gene for Human Coagulation Factor XIII. *J. Biol. Chem.* 274(10):6138-6147,1999

35) Ooe, A., Kida, M., Yamazaki, T., Sang-Chul Park, Hamaguchi, H., Antonio Girolami, Ichinose, A. Common Mutation of Plasminogen Detected in Three Asian Populations by an Amplification Refractory Mutation System and Rapid Automated Capillary Electrophoresis. *Thromb. Haemost.* 82(4):1342-1346,1999

36) Oyamada, H., Kayaba, H., Kamada, Y., Kuwasaki, T., Yamada, Y., Kobayashi, Y., Cui, C. H., Honda, K., Saito, N., Chihara, J. An optimal condition of bronchial cell proliferation stimulated by insulin-like growth factor I. *Int Arch Allergy Immunol.* (in press)

37) Nakata, M., Yata, J., Soejima, N., Maruyama, I. Leptin potentiates platelet function via leptin receptor. *Diabetes*. 48:426-429,1999

38) Kishida, A., Nakashima, M., Sakamoto, N., Serizawa, T., Maruyama, I., Akashi, M. Study on Complex Formation Between Recombinant Human Thrombomodulin Fragment and Thrombin Using Surface Plasmon Resonance. *American Journal of Hematology* 63:136-140,2000

39) Sarker, P. K., Abeyama, K., Nishi, J., Nakata, M., Tokioka, T., Nakajima, T., Kitajima, I., Maruyama, I. Inhibition of Thrombin-induced Neuronal Cell Death by Recombinant Thrombomodulin and E5510, a Synthetic Thrombin

Receptor Signaling Inhibitor. *Thromb Haemost* 82:1071-7,1999

40) Nakata, M., Uto, N., Maruyama, I., Yada, T. Nitric Oxide Induces Apoptosis via  $Ca^{+2}$ -Dependent Processes in the Pancreatic b-cell Line MIN6. *Cell STRUCTURE AND FUNCTION* 24:451-455,1999

#### G. 知的所有権の取得状況

特になし

# 分担研究報告書

## トロンビンの神経毒性に関する研究

丸山 征郎

（鹿児島大学医学部臨床検査医学・教授）

血液凝固カスケードの最終産物であるトロンピンはフィブリノゲン→フィブリン転換のみならず、神経細胞株（PC 12、neuro-2a）に神経細胞死を誘導することを見出した。この神経細胞死は、DNA 電気泳動によるラダー形成、核の濃縮、カスパーゼカスケードの活性化などの証拠から、アポトーシスによるものと考えられた。そしてトロンピン受容体(PAR-1) のアゴニストペプチドでも細胞死が誘導されること、PAR-1 から以下のシグナルを遮断する薬剤として我々が先に見い出していた E-5510 でこの細胞死がブロックされることから、このトロンピンによる神経細胞死は PAR-1 を介するものであろうと推定された。

脳の構成細胞は組織因子を豊富に含有しており、外因系が活性化されやすい臓器となっている。従って血液が血管外に出ると、ただちに外因系凝固カスケードが活性化され、トロンピンが生成される。このような血液の血管外漏出は脳出血の場合にはもちろんのこと、脳梗塞の際の出血性梗塞にも起こる。従ってこの血管外で生成されたトロンピンの運命は脳血管障害後の病巣の拡大縮小に大きく影響するものと考えられ、トロンピンの制御は臨床的にも重要な課題と考えられた。

### A. 研究目的

脳出血、脳梗塞等の脳血管障害は本邦においては、死因の第3位に位置している。さらに死にいたらなくとも、程度の差こそあれ知的機能、運動機能双方に、障害を残し、その患者自身の QOL のみならず、社会にも大きな負担をかける。従って脳血管障害を予防すること、たとえ発症しても、その後遺症を出来得る限り軽く抑えることは重要な課題である。

これらを前提として、今回は脳血管障害後の神経細胞死の仕組みを検討して、その防御策を模索することとした。

### B. 研究方法

- 1) ヒト神経細胞：neuroblastoma 株である neuro 2a を使用した。
- 2) 細胞死の同定：propidium iodide(PI) と MTT アッセイを組み合わせ、フローサイトメーターを使って検討した。

### C. 研究結果

- 1) トロンピン（50-150 単位/ml）は neuro-2a に細胞死を誘導した。この細胞死はカスパーゼの活性化、

核の濃縮、形態よりアポトーシスと考えられた。

- 2) 細胞死は 12 時間目より誘導された。
- 3) トロンピン刺激で細胞内には速やかに H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が蓄積した。
- 4) トロンピンによるこの細胞死は、トロンボモジュリン (TM)、トロンピン受容体からのシグナルを遮断する E5510、抗酸化剤である N-Aetylcystein(NAC) で抑制しえた。

### D. 考察

血管障害（血栓・塞栓）は今なお最も重要な臨床的課題であり、発症の予防、発症後の軽少化などが重要である。特に発症後の出来るだけ病巣の神経細胞死、遅発性神経細胞死を軽減して、知的あるいは運動機能の後遺症を抑える事が重要である。

今回のこの研究では、脳血管障害時に脳局所で生成しうるトロンピンがその受容体を介して神経細胞にアポトーシスを誘導することを明らかにした。そしてこの細胞死は、トロンボモジュリン、NAC、E5510 で抑制しえた。これらの知見は脳血管障害後の病巣縮小にヒントを与えるものと考えられる。

## E. 結論

トロンピンは脳血管障害時に当該血管周囲で生成しうる。今回の研究でトロンピンはその受容体 (PAR-1) を介して、神経細胞にアポトーシスを誘導することが明らかになった。このアポトーシスは細胞内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生をともなっていたことから、レドックスを介し、カスパーゼカスケードを経由したものであろうと想定された。

このトロンピン惹起神経細胞アポトーシスはリコンビナント TM、NAC、E5510 でブロックしえた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Nakata, M., Yata, J. Soejima, N. **Maruyama, I.** Leptin potentiates platelet function via leptin receptor. *Diabetes*. 48:426-429,1999
- 2) Kishida, A., Nakashima, M., Sakamoto, N., Serizawa, T., **Maruyama, I.**, Akashi, M. Study on Complex Formation Between Recombinant Human Thrombomodulin Fragment and Thrombin Using Surface Plasmon Resonance. *American Journal of Hematology* 63:136-140,2000
- 3) Sarker, P.K., Abeyama, K., Nishi, J., Nakata, M., Tokioka, T., Nakajima, T., Kitajima, I., **Maruyama, I.** Inhibition of Thrombin-induced Neuronal Cell Death by Recombinant Thrombomodulin and E5510, a Synthetic Thrombin Receptor Signaling Inhibitor. *Thromb Haemost* 82:1071-7,1999
- 4) Nakata, M., Uto, N., **Maruyama, I.**, Yada, T. Nitric Oxide Induces Apoptosis via Ca<sup>2+</sup>-Dependent Processes in the Pancreatic b-cell Line MIN6. *Cell STRUCTURE AND FUNCTION* 24:451-455,1999

## G. 知的所有権の取得状況

特になし

## 老化とインスリン分泌に関する研究 -新規ミトコンドリア ABC 蛋白遺伝子の単離と機能解析-

清野 進

（千葉大学大学院医学研究科・教授）

老化の進行とともに耐糖能が低下する。インスリン分泌のメカニズムにおいてミトコンドリアは重要な役割を演じ、加齢に伴うミトコンドリア(Mt)機能の低下や Mt DNA の損傷の蓄積は、老化の進行や糖尿病につながると考えられている。Mt は主要なエネルギー産生部位であり、その酸素を利用する ATP 産生結果、必然的に活性酸素種を副産物として発生することが知られている。この活性酸素種は、遊離鉄の共存により Fenton 反応を介して反応性の高いヒドロキシラジカルを発生させ、Mt 内部の脂質、蛋白質、DNA などに損傷を与えることが明らかとなっている。実際に Mt に鉄蓄積が認められる中枢神経系の疾患がいくつか報告されており、Mt における鉄蓄積と Mt 機能低下との因果関係が注目されている。ATM1 は *S.cerevisiae* Mt に存在する ABC (ATP-binding cassette) 蛋白で、鉄代謝に関与することが報告されている。ABC 蛋白は種をこえて保存されているものが多く、その機能異常は多くの疾患や薬剤耐性などを引き起こすことから臨床的にも注目されている。そこで今回我々は ATM1 に着目し、そのヒトホモログの cDNA および遺伝子の単離と機能解析を試みた。得られた ATM1 のヒトホモログを MTABC3 と命名した。MTABC3 は half type ABC 蛋白であり、Mt に局在すること、*S.cerevisiae* において ATM1 の機能を相補することから鉄代謝に関与していると考えられること、ヒト MTABC3 遺伝子は全長約 11kb で 19 個のエクソンを含み第 2 染色体 q36 に位置すること明らかにした。ATM1 遺伝子の異常は老化や糖尿病の発症に関与している可能性が示唆された。

キーワード：ミトコンドリア機能障害、ミトコンドリア DNA 損傷、鉄代謝、ABC 蛋白

### A. 研究目的

老化や糖尿病と深い関連を有する Mt 内の鉄代謝調節蛋白の単離と機能解析を行うことを目的とする。

### B. 研究方法

Mt 内膜に存在し、鉄代謝に関与していることが既に表示されている *S.cerevisiae* の ATM1 遺伝子の塩基配列をもとにヒト EST database を検索し、類似性の高い EST45597 (肝臓由来) を得た。この EST45597 の塩基配列をもとに probe を作成し、ヒト肝臓 cDNA library をスクリーニングした結果新規の ABC 蛋白をコードする cDNA を単離した。MTABC3 の組織発現はノザン法により検討した。MTABC3 の細胞内局在を明らかにする目的で 1. CHO cell に FLAG-tag を付加した MTABC3 cDNA を安定に発現させた細胞株を樹立し、

この細胞株を用いて細胞分画を調整し Immunoblot 法で検討した。2. Confocal laser microscopy による解析を行った。MTABC3 の機能は、ATM1 と同様の機能を持つ可能性が高いと考えられたため、ATM1 機能の部分欠損株である *atm1-1 mutant cell* に対してヒト MTABC3 を形質導入することでその機能が代償されるか否かによって推測した。さらに ABC 蛋白の機能障害は種々の疾患の原因となることが明らかとなっており、MTABC3 遺伝子は老化やある種の疾患と関連している可能性がある。そこでヒト MTABC3 遺伝子の構造を決定するために、ヒト genomic library のスクリーニングを行い、エクソン-イントロン構造を決定した。さらに、ヒト MTABC3 遺伝子の染色体上の局在を FISH 法及び Radiation Hybrid mapping を用いて決定した。



### C. 研究結果

MTABC3 は 842 個のアミノ酸で構成され、N 端側に 8 個の膜貫通部からなる膜貫通領域と C 端側に 1 つの NBF を有することからいわゆる half type の ABC 蛋白であることを明らかにした。MTABC3 mRNA は検討した全ての組織、細胞株に発現を認めた。MTABC3 の細胞内局在は、Immunoblot 法で Mt 蛋白のマーカーである cytochrome c oxidase subunit IV と一致した。さらに、Confocal laser microscopy を用いた検討においても Mt 蛋白のマーカーである MitoTracker Red CMXRos と完全に一致し、Mt に存在することが確認された。S.cerevisiae ATM1 機能の部分欠損株である YM13-1(atm1-1 mutant cell) は、YPD medium で culture すると Mt への鉄蓄積、Mt DNA の損傷、Mt 呼吸能の消失が生じることが報告されている。同細胞株に MTABC3 を形質導入することでこれらの形質は代償され、MTABC3 は、ATM1 同様に鉄代謝に関与していることを明らかにした。ヒト MTABC3 遺伝子は全長約 11kb で 19 個のエクソンと 18 個のイントロンにより構成されていること明らかにし、各エクソン-イントロン境界の塩基配列を決定した。さらにヒト MTABC3 遺伝子は FISH 法で第 2 染色体 q36 に、Radiation Hybridization 法で D2S1297 と SHGC-32531 の間に存在することを明らかにした。

### D. 考察

Mt DNA 損傷や Mt 機能異常は老化や種々の疾患に関与していることが示されている。MTABC3 は Mt に存在するヒトの新規 ABC 蛋白であり、ATM1 の機能を相補することを示した。すなわち MTABC3 の機能異常は Mt への鉄蓄積とそれに伴う酸化ストレスを引き起こし Mt DNA の損傷とその機能障害を生じることが示唆された。染色体上の MTABC3 遺伝子の近傍には、数種類のいわゆるミトコンドリア病がすでに mapping されており、これらの疾患のメカニズムを解明することによって、老化や糖尿病の原因の一部が明らかにされることが期待される。

### E. 結論

新規ヒトミトコンドリア ABC 蛋白である MTABC3 を単離し、同蛋白が鉄代謝に関与しさらに老化や糖尿病の一因であるミトコンドリア DNA の損傷およびミトコンドリア機能の障害に関連している可能性を示唆した。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Mitsuhashi, N., Miki, T., Senbongi, H., Yokoi, N., Yano, H., Miyazaki, M., Nakajima, N., Iwanaga, T., Yokoyama, Y., Shibata, T. and Seino, S. MTABC3, a novel mitochondrial ABC protein involved in iron homeostasis. *J. Biol. Chem.* (In press)
- 2) Brown, H., Meister, B., Berggren, P-O., Rhodes, C.J., Seino, S. and Fried, G. Synaptotagmin isoforms are distinctly compartmentalized in pancreatic endocrine cells. *Diabetes* (in press)
- 3) Seino, S., Iwanaga, T., Nagashima, K. and Miki, T. Perspectives in Diabetes : Diverse roles of KATP channels learned from Kir6.2 genetically engineered mice. *Diabetes* 49:311-318, 2000
- 4) Liu, M., Seino, S. and Kirchgessner A.L. Identification and characterization of glucoresponsive neurons in the enteric nervous system. *J. Neurosci.* 19:10305-10317, 1999
- 5) Sunaga, Y., Ingaki, N., Gono, T., Yamada, Y., Ishida, H., Seino, Y. and Seino, S. Troglitazone but not pioglitazone affects ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel activity. *Eur. J. Pharmacol.* 381:71-76, 1999
- 6) Suzuki, M., Fujikura, K., Kotake, K., Inagaki, N., Seino, S. and Takata, K. Immuno-localization of sulfonylurea receptor 1 in rat pancreas. *Diabetologia* 42:1204-1211, 1999
- 7) Beguin, P., Nagashima, K., Nishimura, M., Gono, T. and Seino, S. PKA-mediated phosphorylation of the human KATP channel : separate roles of Kir6.2 and SUR1 subunit phosphorylation. *EMBO J.* 18:4722-4732, 1999
- 8) Kawaki, J., Nagashima, K., Tanaka, J., Miki, T., Miyazaki, M., Gono, T., Mitsuhashi, N., Nakajima, N., Iwanaga, T., Yano, H. and Seino, S. Unresponsiveness to glibenclamide during chronic treatment induced by reduction of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel activity. *Diabetes*. 48:2001-2006, 1999
- 9) Nishimura, M., Miki, T., Yashima, R., Yokoi, N., Sato, Y. and Seino, S. Angiotensin-3, a novel member of the angiotensin family. *FEBS Lett.* 448:254-256, 1999
- 10) Miki, T., Nagashima, K. and Seino, S. The structure and function of the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in pancreatic  $\beta$ -cells. *J. Mol. Endo.* 22:113-123, 1999

#### 2. 学会発表

特に無し

G. 知的所有権の取得状況

特に無し

## 臓器の線維化の分子細胞機構

宮園 浩平

（癌研究会癌研究所生化学部・部長）

本研究では Smad がさまざまな転写因子と協調して働くことに注目し、転写因子 PEBP2 が Smad と結合してさまざまな遺伝子の転写に関わっていることを示した。また転写のコレプレッサーである c-Ski が Smad と結合して転写に抑制的に働くことを示した。さらにアデノウイルスベクターに組み込んだ抑制型 Smad が TGF- $\beta$  や BMP のシグナルに抑制的に働くことを示し、TGF- $\beta$  シグナルの調節の可能性を示した。

キーワード： TGF- $\beta$ 、シグナル伝達、Smad、転写調節

### A. 研究目的

TGF- $\beta$  は細胞の増殖を抑制するほか、コラーゲンやフィブロネクチン、テネイシンなどの産生を促進し、臓器の線維化を来す因子である。TGF- $\beta$  の細胞内シグナル伝達分子 Smad は最近、I 型コラーゲンのプロモーター領域などに結合することが明らかとなった。本研究では細胞外マトリックス蛋白をはじめとするさまざまなプロモーターに対する Smad の転写調節機構を明らかにし、臓器の線維化のメカニズムを分子生物学的に研究する。

### B. 研究方法

TGF- $\beta$  のシグナルに関与する Smad、p300、c-Ski、および PEBP2 などの cDNA を TGF- $\beta$  のレセプター cDNA などとともに COS 細胞に導入して、免疫沈降とイムプロット法などで蛋白質のリン酸化、蛋白質同士の結合などを調べた。また p3TP-Lux などを用いて転写活性を調べた。またアデノウイルスベクターに組み込んだ Smad を作り、C2C12 細胞などに投与することによってその作用を調べた。本研究は主として培養細胞を用い、当該研究施設の実験のガイドラインに従い、倫理的側面を配慮して実験を行った。

### C. 研究結果

① TGF- $\beta$  のシグナル伝達因子 Smad は転写因子として作用するがさまざまな転写因子と結合して特異的な作用を発揮する。我々は Smad と PEBP2 の協調作用を検討した。PEBP2 の 3 種の  $\alpha$  subunit ( $\alpha$  A、 $\alpha$  B、 $\alpha$  C) は、それぞれ R-Smad (Smad1、5、2、3) と結合し、R-Smad、Co-Smad、PEBP2  $\alpha$  の 3 者による複合体

が検出された。IgA C  $\alpha$  プロモーターの TGF- $\beta$  responsive element (T  $\beta$  RE) には、Smad3/4 と PEBP2 の結合配列があり、両者の蛋白が複合体を形成して同 element に結合することをゲルシフト法により証明した。さらに同プロモーターを用いて R-Smad と PEBP2  $\alpha$  の機能的関連を検討すると、両蛋白の結合配列に依存して協調的に Smad3 と PEBP2  $\alpha$  によって活性化され、ドミナントネガティブ型の Smad3 で抑制された。以上から PEBP2/CBF は R-Smad と結合し、TGF- $\beta$  superfamily のシグナル伝達経路における核内 target として機能していると結論した。

② 我々は yeast two hybrid cloning により、癌原遺伝子産物である c-Ski が Smad2 と酵母の系で結合することを確認した。培養細胞を用いて Smad と c-Ski の結合をみたところ、TGF- $\beta$  シグナルを伝える Smad2/3 はリガンド刺激下で c-Ski との結合がみられた。また Smad4 はリガンド刺激のない状態でも結合した。一方、BMP シグナルを伝える Smad1/5 や抑制型 Smad である Smad6/7 との間には結合は認められなかった。Smad 内での c-Ski 結合部位は C 端側の MH2 部位であった。c-Ski 内の Smad 結合部位は Smad2/3 は c-Ski 分子の 2 ヲ所であり、一方 Smad4 の結合部位は N 端側の 1 ヲ所であることが確認された。

c-Ski が TGF- $\beta$  シグナルに及ぼす影響について p3TP-Lux を用いたルシフェラーゼアッセイを行なったところ、TGF- $\beta$  の転写活性を抑制することが示された。転写共役因子である p300 は TGF- $\beta$  シグナルに協調的に働くのに対し、c-Ski はその作用も抑えた。ゲルシフト

アッセイの結果 Smad-DNA 複合体に c-Ski が結合し、c-Ski は Smad の DNA への結合を阻害しなかった。一方、Smad3 への p300 の結合は c-Ski によって阻害された。さらに Smad と複合体を形成した p300 の HAT 活性に対する c-Ski の影響を *in vitro* HAT アッセイで検討したところ、c-Ski 存在下でヒストンのアセチル化が抑制された。さらに Smad-c-Ski 複合体に mSin3A を介してヒストン脱アセチル活性を持つ HDAC1 が結合することを明らかにし、ヒストンデアセチラーゼ複合体を通じて転写抑制を行なっていることが明らかとなった。以上から TGF- $\beta$  シグナルは DNA に結合した Smad が HAT 活性を持つコアクチベーターやヒストン脱アセチル活性をもつコプレッサーをリクルートすることで調節されていると考えられ、c-Ski がある条件下では線維化の抑制にも働きうる可能性を示唆した。

③ 抑制型 Smad は Smad によるシグナルに抑制的に働くがその生物学的活性の研究は十分には行われていない。C2C12 はマウスの未分化な間葉系細胞で、BMP の刺激により筋肉細胞への分化が抑制されて骨芽細胞への分化の道をたどる。BMP による C2C12 細胞の骨芽細胞への分化に Smad がどのように関わっていくかを、アデノウィルスベクターによる発現系を用いて検討した。BMP 処理を行った細胞で、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の上昇が認められるが、BMP 特異型 R-Smad である Smad1 及び Smad5 を過剰発現された細胞ではその活性が更に増強された。しかし Smad2 を過剰発現させた細胞ではコントロールと変わらず、Smad6 及び Smad7 (抑制型 Smad) を過剰発現させた細胞では、逆に ALP 活性の低下が認められた。これらのことから、C2C12 細胞における BMP による骨芽細胞への分化に Smad のシグナル伝達系が強く関与していると考えられた。このことはまた、さまざまな線維化をともなう難病に抑制型 Smad が有用である可能性を示唆した。

#### D. 考察

本研究で TGF- $\beta$  のシグナル伝達分子 Smad が PEBP2 に結合してさまざまな特異的信号を伝達することを示した。また c-Ski や抑制型 Smad による TGF- $\beta$  シグナルの制御機構を明らかにした。TGF- $\beta$  は線維化を促進することからその調節を行うメカニズムの解明が待たれており、本研究の成果は今後極めて有用になると思われる。

#### E. 結論

TGF- $\beta$  のシグナルには Smad3 とさまざまな転写因

子を介したシステムが重要であり、さらに c-Ski や抑制型 Smad などによって TGF- $\beta$  シグナルの制御が行われることが示された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- ① Nishihara, A., Hanai, J.-i., Imamura, T., Miyazono, K., and Kawabata, M. (1999) E1A inhibits transforming growth factor- $\beta$  signaling through binding to Smad proteins. *J. Biol. Chem.*, 274 (40), 28716-28723.
- ② Nakao, A., Fujii, M., Matsumura, R., Kumano, K., Saito, Y., Miyazono, K., and Iwamoto, I. (1999) Transient gene transfer and expression of Smad7 prevents bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *J. Clin. Invest.* 104 (1), 5-11.
- ③ Fujii, M., Takeda, K., Imamura, T., Aoki, H., Sampath, T.K., Enomoto, S., Kawabata, M., Kato, M., Ichijo, H., Miyazono, K. (1999) Roles of bone morphogenetic protein type I receptors and Smad proteins in osteoblastic and chondroblastic differentiation. *Mol. Biol. Cell* 10 (11), 3801-3813.
- ④ Hanai, J.-i., Chen, L.F., Kanno, T., Ohtani-Fujita, N., Kim, W.Y., Guo, W.-H., Imamura, T., Ishidou, Y., Fukuchi, M., Shi, M.-J., Stavnezer, J., Kawabata, M., Miyazono, K., and Ito, Y. (1999) Interaction and functional cooperation of PEBP2/CBF with Smads: Synergistic induction of the immunoglobulin germline Ca promoter. *J. Biol. Chem.* 274 (44), 31577-31582.
- ⑤ Akiyoshi, S., Inoue, H., Hanai, J.-i., Kusanagi, K., Nemoto, N., Miyazono, K., and Kawabata, M. (1999) c-Ski acts as a transcriptional co-repressor in TGF- $\beta$  signaling through interaction with Smads. *J. Biol. Chem.* 274 (49), 35269-35278.
- ⑥ Tada, K., Inoue, H., Ebisawa, T., Makuuchi, M., Kawabata, M., Imamura, T., and Miyazono, K. (1999) Region between  $\alpha$ -helices 3 and 4 of the Mad homology 2 domain of Smad4: Functional roles in oligomer formation and transcriptional activation. *Genes Cells* 4 (12), 731-741.
- ⑦ Kusanagi, K., Inoue, H., Ishidou, Y., Mishima, H.K., Kawabata, M., and Miyazono, K. (2000) Characterization of a bone morphogenetic protein-responsive Smad binding element. *Mol. Biol. Cell* 11 (2), 555-565.
- ⑧ Ishida, W., Hamamoto, K., Kusanagi, K., Yagi, K., Kawabata, M., Takehara, K., Sampath, T.K., Kato, M., and Miyazono, K. (2000) Smad6 is a Smad1/5-induced Smad inhibitor: Characterization of bone morphogenetic protein-