

分担研究報告書

老化促進ストレスとシグナル伝達

分担研究者 中島 泉

(名古屋大学大学院医学研究科免疫学教授)

研究要旨：ラジカルと関連因子が蛋白修飾を介してどのように細胞内にシグナルを伝達するか、またそれがどのように加齢に伴う病態の形成に関わるかを解析した。その結果、紫外線、重金属などの酸化ストレスによる蛋白質の酸化的化学修飾によって、細胞表面受容体分子と細胞膜ラフト構造のリガンド非依存性の架橋がおこるとともに、チロシンキナーゼ分子の細胞内ドメインを標的とした構造修飾がおこり、それらがストレス関連シグナル伝達に重要な役割を担うことを明らかにした。併せて、こうした機序がマウス個体において病態形成にかかわる可能性があることを先に樹立したトランスジェニックマウス系で示した。さらに、糖や脂質の酸化的代謝でつくられるカルボニル化合物が別の化学反応を介してシグナルを伝達する経路も存在し、これが加齢に伴う病態形成にかかわることも示唆した。

A. 研究目的

活性酸素に代表されるラジカルとラジカルの産生を誘導する紫外線などは核内の遺伝子 (DNA) や細胞膜脂質に作用してこれらを直接的に傷害し、傷害の修復が完全に行われない場合、傷害が蓄積して老化につながると理解される。これとは別に筆者らはラジカルとその周辺因子は、遺伝子の産物である蛋白を標的として直接的に作用し、その構造を修飾する。これによって蛋白が持つ酵素活性などの働きが変化し、この蛋白が関わる生体のシグナル伝達が促進または抑制されることを示してきた。また、蛋白の化学修飾によるシグナル伝達の修飾は、脂質や糖の酸化

的代謝でつくられる glyoxal や 4-hydroxynonenal などのカルボニル化合物によってもおこることを最近明らかとした。本研究では、(1) ラジカルとその関連因子がどのような仕組みでシグナル伝達にかかわる蛋白を修飾するか、(2) 修飾された蛋白はどのように下流のシグナルを変化させてその結果どのような細胞の働きの変化 (細胞の増殖、蛋白合成、細胞死) を誘導するか、(3) その結果どのような細胞の働きの変化が加齢とともに蓄積してどのような老化病態を誘導するか、を解明することをめざす。

B. 研究方法

ラジカルとその関連因子として、紫外線、重金属 (Hg、As)、カルボニル化合物 (glyoxal、methylglyoxal) などを用いる。これらのラジカルや関連因子を細胞に作用させることで起動するシグナル伝達のカスケードを、受容体型チロシンキナーゼ (RET、EGFR)、非受容体型チロシンキナーゼ (Src、Lck)、セリン・スレオニンキナーゼ (MAP ファミリーキナーゼ)、転写因子 (c-Jun、NF-kB)、カパーゼなどの発現レベルと活性を SDS-PAGE とウエスタンブロット法および試験管内キナーゼアッセイなどにより測定することによって解析する。また、そうしたシグナル伝達によって生ずる効果を、細胞増殖/サイトカインの産生/アポトーシスの誘導の生物学的、分子遺伝学的、免疫学的方法により検出して解析する。さらに、こうした効果の蓄積と老化の病態形成との関係を、先に樹立した活性型シグナル伝達分子遺伝子トランスジェニックマウス系 (PKCa トランスジェニックマウス: T リンパの老化促進モデル; Ret トランスジェニックマウス: 加齢に伴うメラノーマ自然発症系) を用いて解析する。

C. 研究結果

[1] 酸化ストレスによってチロシンキナーゼが活性化する機序の解析

加齢とともに反復して個体に作用すると考えられる紫外線などの酸化ストレスによって、シグナル伝達の起始点で重要な働きをする受容

体型、非受容体型のチロシンキナーゼが活性化する分子機序を解析し、以下の結果を得た。

2) 酸化ストレスによるチロシンキナーゼの活性化と 2 量体化の標的となるアミノ酸は、細胞外と細胞内の両方にある。

3) 細胞内にある標的アミノ酸の一つは、細胞内キナーゼドメインの C 末端側にある特定のアミノ酸である可能性が大きい。

[2] カルボニルストレスによる細胞内シグナル伝達カスケードの解析

糖の酸化的代謝でつくられる glyoxal や methylglyoxal が細胞表面または細胞内の蛋白質を化学修飾し、これによって細胞の活性化や細胞死を誘導するシグナル伝達の経路を解析した。その結果、以下の結果を得た。

1) Glyoxal や methylglyoxal は細胞表面の GPI アンカー蛋白を Schiff-base 形成によって架橋する。そしてこれが引き金となって細胞内にシグナルが伝達される。

2) この場合、GPI アンカー蛋白が付着するラフトと呼ばれる膜ドメインがクラスターをつくり、ラフトに細胞内で付着する非受容体型チロシンキナーゼがまず活性化する。

3) この非受容体型チロシンキナーゼの活性化に続いて MAK ファミリーのキナーゼが活性化する。

4) MAK ファミリーの特定のキナーゼの活性化とリンクして細胞の増殖または細胞死が誘導される。

[3] モデル動物を用いた老化に

における酸化ストレスの役割の解析先に樹立した RET がん遺伝子チロシンキナーゼ遺伝子トランスジェニックマウスを用いて、がん遺伝子の発現制御機構の破綻に関わる環境因子の作用を検討した。その結果、紫外線には、従来知られる DNA 傷害作用とは別に、シグナル伝達分子である蛋白質に作用して活性を増大させる活性があり、この活性はマウスの個体レベルでも働くこと、そしてこのことが導入したがん遺伝子による発がんのプロセスに重要であることを示唆した。

D. 考察

ラジカルとその関連因子による細胞の傷害の蓄積が細胞と個体の老化に深くかかわる可能性が内外の多くの研究者によって指摘され、活発な研究が展開されつつある。その中で、蛋白質の酸化ストレスによる化学修飾が老化にどのようにかかわるかを示した報告は少ない。本研究では、細胞内のチロシンキナーゼ分子が酸化ストレスの直接の標的となり、その結果その構造と機能が変化することを始めて示し得たと考える。

また最近、脂質や糖が酸化されてつくられるカルボニル化合物が蛋白質を別の様式で化学修飾し、それに続く AGEs の形成と蓄積が細胞と組織・個体の老化に重要な役割をすることが内外で報告されている。本研究では、AGEs 形成の初期過程で蛋白質の構修飾を介してチロシンキナーゼと下流のシグナル伝達分子が活性化することを

明らかにした。

こうした新しい機序によるシグナル伝達は、加齢に伴う様々な病態形成に重要な役割を担うものと推定される。

E. 結論

紫外線、重金属などの酸化ストレスによる蛋白質の酸化的化学修飾によって、細胞表面受容体分子と細胞膜ラフト構造のリガンド非依存性の架橋がおこり、さらに、チロシンキナーゼ分子の細胞内ドメインを標的とした構造修飾もおこることを明らかにした。こうした蛋白質の化学修飾は、チロシンキナーゼの活性化に始まるストレス関連シグナル伝達に重要な役割を担い、マウス個体における加齢に伴う病態形成にかかわる可能性があることが示された。併せて、糖や脂質の酸化的代謝でつくられるカルボニル化合物が起動するシグナル伝達の別経路が存在することも示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 論文発表

1) Takeda, K., Kato, M., Wu, J., Iwashita, T., Suzuki, H., Takahashi, M. and Nakashima, I.: Osmotic stress-mediated activation of RET kinases involves intracellular disulfide-bonded dimer formation. *Antioxidants & Redox Signaling*, in press

2) Kato, M., Iwashita, T., Akhand, A.A., Liu, W., Takeda, K., Takeuchi, K., Yoshihara, M., Hossain, K., Wu, J., Du, J., Oh, C., Kawamoto,

- Y., Suzuki, K., Takahashi, M. and Nakashima, I.: Molecular mechanism of activation and superactivation of Ret tyrosine kinases by ultraviolet light irradiation. *Antiox. Redox. Signalling pathway in cells of the immune system. Current Trends in Immunology* 3:45-58, 2000.
- 3) Takeuchi, K., Kato, N., Suzuki, H., Akhand, A.A., Wu, J., Hossain, K., Miyata, T., 7) Hossain, K., Akhand, A.A., Kato, M., Du, J., Matsumoto, Y., Nimura, Y. and Nakashima, I.: Acrolein induces activation of the epidermal growth factor receptor of human keratinocytes for cell death. *J. Cell. Biochem.*, in press. Suzuki, H. and Nakashima, I.: Arsenic induces apoptosis of murine T lymphocytes through membrane rafts-linked signaling for activation of c-Jun amino terminal kinase (JNK). *J. Immunol.* 165:4290-4297, 2000.
- 4) Wu, J., Suzuki, H., Zhou, Y.W., Liu, W., Yoshihara, M., Kato, M., Akhand, A.A., 8) Du, J., Suzuki, H., Nagase, F., Akhand, A., Hayakawa, A., Takeuchi, K., Hossain, K., A., Yokoyama, T. and Nakashima, I.: Evidence of a mercury-stimulated but interleukin 2-independent signal transduction pathway for the proliferation of acytotoxic T cell line, CCTL-2. *J. Cell. Biochem.* 78:500-508, 2000. Kurosawa, M. and Nakashima, I.: Cepharantine activates caspases and induces apoptosis in Jurkat and K562 human leukemia cell lines. *J. Cell. Biochem.*, in press.
- 5) Kato, M., Liu, W., Akhand, A.A., Hossain, K., Takeda, K., Takahashi, M. and Nakashima, I.: Ultraviolet radiation induces both full activation of Ret kinase and malignant melanocytic tumor promotion in RFP-RET-transgenic mice. *J. Invest. Dermatol.* 115:1157-1158, 2000. 9) 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.* 114:599-601, 2000.
- 6) Nakashima, I., Kato, M., Akhand, A.A., Du, J., Liu, W., Dai, Y., Suzuki, H., Senga, T., Hamaguchi, M., Iwashita, T., Takahashi, M., Miyata, T., Hossain, K., Takeda, K., 10) 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.* 77:333-344, 2000.
- 11) Liu, W., Kato, M., Akhand, A.A.,

Hayakawa, A., Suzuki, H., Miyata, T., Kurokawa, K., Hotta, Y., Ishikawa, N. and Nakashima, I.: Hydroxynonenal induces a cellular redox status-related activation of the caspase cascade for apoptotic cell death. J. Cell. Sci. 113:635-641, 2000.

12) 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.

13) 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.

2. 学会発表

1) 中島 泉
酸化ストレスとアポトーシス。
第11回 The Meeting of Liver and Immunology 特別講演 東京
平成12年9月

2) 中島 泉、加藤昌志、アンワルル

A. アカンド、武田湖州恵、川本善之、鈴木治彦

4-レドックス分子修飾によるチロシンキナーゼの活性調節 (Control of protein tyrosine kinase activity by a redox-mediated structural modification)

日本学術振興会レドックス生命科学第170委員会 第2回研究会 東京 平成12年7月

3) Izumi Nakashima, Masashi Kato, Yan Dai, Kozue Takeda, Yoshiyuki Kawamoto, Anwarul A. Akhand, Haruhiko Suzuki and Tommaso A. Dragani
MELANOMA DEVELOPMENT IN RET-TRANSGENIC MICE.

The Fifth World Conference on Melanoma, Venice, Feb. 28-Mar. 3, 2001.

4) 武田湖州恵、加藤昌志、Anwarul A. Akhand、伍江紅、吉原基、Khaled Hossain、川本善之、鈴木治彦、中島泉
浸透圧ストレスによる RET キナーゼ活性化には細胞内のジスルフィド結合による二量体形成が関与する第30回日本免疫学会総会 仙台 平成12年11月

5) 杜軍、鈴木治彦、長瀬文彦、馬秀、Anwarul A. Akhand、中島泉
Methylglyoxal による活性酸素の産生及びASK1 活性化とアポトーシスの誘導
第30回日本免疫学会総会 仙台 平成12年11月

6) Anwarul A. Akhand, Khaled Hossain,

Masashi Kato, Jun Du, Kozue Takeda,
Haruhiko Suzuki, Toshio Miyata and
Izumi Nakashima

Carbonyl compound-mediated signaling for
MAP family kinases and caspase
activation in human endothelial cells.

第30回日本免疫学会総会 仙台
平成12年11月

分担研究報告書

生体防御の異常と老化ストレスに関する研究

分担研究者 谷口維紹（東京大学大学院教授）

研究要旨：生体は複雑なサイトカインネットワークを形成し恒常性を保っているがストレスによるこれらの破綻が老化を導くと考えられる。このことを検証するためにインターフェロンを負に制御する IRF-2 欠損マウスを作製し解析した。その結果、生後 8 週後に炎症性皮膚疾患の自然発症、CD8T 細胞の異常活性化、インターフェロン（IFN）誘導遺伝子の発現亢進を見いだした。これらの表現型は IFN シグナル伝達経路を遮断してやることで解消することが判明した。従って、IRF-2 は IFN シグナルを負に制御することによって個体の老化にともなう IFN の有害な免疫調節作用を抑制すると考えられる。

A. 研究目的

生体は複雑なサイトカインネットワークを形成し恒常性を保っているがストレスによるこれらの破綻が老化を導くと考えられる。このことを検証するためにインターフェロンを負に制御する IRF-2 欠損マウスの老化様病変を検索する。

MHC を発現する BALB/c 由来の脾細胞を放射線照射することで刺激し、増殖能を検索した。

（倫理面への配慮）動物実験はマウス個体を使用した。長寿医療研究センター動物施設実験指針に従って研究を行った。

B. 研究方法

1、IRF-2 欠損マウスは通常のノックアウトマウス作製法で作製後、C57BL6 に 6 回戻し交配した。組織切片は通常の方法で、また BrDU をマウスに投与後凍結切片を作製した。抗 CD4 あるいは抗 CD8 により免疫染色を行った。

2、免疫学的検索；細胞を抗体で染色後、FACS にて解析した。マウスに抗体を投与することで、特定に T 細胞を除去した。T 細胞を allogeneic

C. 研究結果

1、IRF-2 欠損マウス（IRF-2^{-/-}）は 8 週齢より、皮膚炎を発症してきた。炎症は加齢とともに全身に広がり、5 カ月齢では皮膚の潰瘍と脱毛を伴ってきた。BrdU 取り込み実験で病変はケラチノサイトの異常増殖であることが判明した。

2、皮膚基底膜に CD4 あるいは C 陽性細胞が浸潤していたため、免疫細胞の関与の有無を知るため、抗 CD8

あるいは抗 CD4 抗体を投与し、病変を観察した。その結果、抗 CD8 抗体投与でのみ病変発現が遅延した。Allogeneic な H-2d で刺激すると (IRF-2-/-) マウスの CD8+ T 細胞は持続的に増殖した。(IRF-2-/-) マウスは病変の現れる以前は T,B 細胞の割合に大きな変化はなかったが、3 カ月齢で病変進行とともに CD44^{high} Ly-6C⁺ 細胞の割合が徐々に増え、5 カ月齢では 80% に達した。

3、IFN により誘導され chemokine である IP-10 と MIG が (IRF-2-/-) マウスの皮膚で著しく上昇していた。これらが IFN α/β からのシグナルに過剰に反応していることが示唆された。

D. 考察

IRF2 は IFN α/β からのシグナルを負に制御することで、生体の恒常性が保たれているが、IRF-2 が欠損することで、IFN α/β シグナルに応答する遺伝子が活性化され、異常な皮膚病変が発症するものと考えられる。

E. 結論

(IRF-2-/-) マウスは加齢に伴い、皮膚病変を発症してくる。皮膚のケラチノサイトの増殖と反応性 CD8 陽性 T 細胞の増殖が病変を形成する。IRF-2 欠損により、IFN α/β に反応する IP-10 と MIG が病変形成に関与していると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T. and Tanaka, N.; Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family, and candidate mediator of p53-induced apoptosis. (2000). *Science*, 288, 1053-1058.

2. Takaoka, A., Mitani, Y., Suemori, H., Sato, S., Yokochi, T., Noguchi, S., Tanaka, N., and Taniguchi, T.; Crosstalk between interferon-g and -a/b signaling components at caveolar membrane domain.. (2000). *Science*, 288, 2357-2360.

3. Ohki, R., Nemoto, J., Murasawa, H., Oda, E., Inazawa, J., Tanaka, N., and Taniguchi, T.; Reprimo: A new candidate mediator of the p53-mediated cell cycle arrest at the G2 phase. (2000). *J. Biol. Chem.*, 275, 22627-22630.

4. Sato, M., Suemori, H., Hata, N., Asagiri, M., Ogasawara, K., Nakao, K., Nakaya, T., Katsuki, M., Noguchi, S., Tanaka, N., and Taniguchi, T.; Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-a/b gene induction. (2000). *Immunity*, 13, 539-548.

5. Hida, S., Ogasawara, K., Sato, K., Abe, M., Takayanagi, H., Yokochi, T., Sato, T., Hirose, S., Shirai, T., Taki, S., and Taniguchi, T.; CD8+ T cell-mediated skin disease in mice lacking IRF-2, the transcriptional attenuator of interferon a/b signaling. (2000). *Immunity*, 13, 643-655.

6. Takayanagi, H., Ogasawara, K., Hida, H., Chiba, T., Murata, S., Sato, K., Takaoka, A., Yokochi, T., Oda, H., Tanaka, K., Nakamura, K., and Taniguchi, T.; T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-g. (2000). *Nature*, 408, 600-605.

分担研究報告書

老化における生体防御機構としての活性酸素消去酵素の破綻機構

分担研究者

谷口直之 (大阪大学 大学院 教授)

研究要旨：GR(グルタチオンレダクターゼ)、GPx (グルタチオンペルオキシダーゼ) が、活性窒素およびカルボニル化合物のストレス刺激によりどのような影響をうけるかを検討した。活性窒素は濃度依存性に GPx 活性を抑制し、GPx のセレノシステイン 45 とシステイン 91 を酸化、架橋することにより活性を阻害することが判明した。カルボニル化合物である methylglyoxal、phenylglyoxal も GPx 活性を濃度依存性に抑制した。また活性窒素およびカルボニル化合物は培養細胞内の過酸化水素を上昇させた。これらのことは、活性窒素およびカルボニル化合物のストレス刺激は GPx を阻害することにより細胞内の過酸化物を増加させ、細胞死、老化促進に関与する可能性を示唆する。

A. 研究目的

様々な外的ストレス（紫外線、放射線、感染等）や、酸素呼吸によって生体内で代謝活動の副産物として活性酸素が発生する。これらは、細胞内では SOD や GSH によりすみやかに消去されるため、細胞は恒常性を保っている。活性酸素消去酵素発現の低下は酸素ラジカルによる老化促進作用をきたすと考えられる。本年は NO (活性窒素) およびカルボニル化合物によるストレス刺激が、GSH を還元状態に保つ GR (Glutathione reductase) 活性に与える影響と、GPx (Glutathion peroxidase) 活性に与える影響を検索し、NO

の老化促進作用を検討した。

B. 研究方法

1) GR、Gpx の cDNA をクローニングし、Sf21 細胞に発現させ、純化した。

2) NO 産生試薬 GSBNO, SIN-1, SNAP やカルボニル化合物である methylglyoxal、phenylglyoxal を純化した酵素に作用させ、酵素活性を測定した。

(倫理葛への配慮) 動物実験はマウス個体を使用した。長寿医療研究センター動物施設実験指針に従って研究を行った。

B. 研究結果

1) 活性窒素 donor である GSNO, SIN-1, SNAP は 1mM で GR の酵

素活性をそれぞれ 39%, 15%, 12% 抑制した。

2) 活性窒素は濃度依存性に GPx 活性を抑制し、GPx のセレノシステイン 45 とシステイン 91 を酸化、架橋することにより活性を阻害することが判明した。カルボニル化合物である methylglyoxal、phenylglyoxal も GPx 活性を濃度依存性に抑制した。また活性窒素およびカルボニル化合物は培養細胞内の過酸化水素を上昇させた。

D. 考察

活性酸素は代謝により産生され、細胞にとり常に生存を脅かされている。ただし、通常は消去酵素である、SOD や、GSH がすみやかにその消去をし、恒常性を保っている。GR は GSH を還元状態に保つ重要な酵素であり、Gpx は peroxidase を還元している。感染等非常に強いストレスは NO を産生し、これらの酵素活性を低下させ、酸素ラジカルが細胞成分を酸化し、老化を促進してする可能性が示唆される。

E. 結論

活性窒素は GR あるいは Gpx 活性を低下させ、酸化ストレスを増大させ、老化を促進する。

F.

G. 研究発表

論文発表

(1) Okado-Matsumoto A, Matusmoto Fujii J. and Taniguchi N.: Peroxiredoxin IV is a secretable protein with heparin-binding properties under reduced

conditions., J. Biochem., 127, 493-501, 2000.

(2). Fujii T., Hamaoka R., Fujii J. and Taniguchi N.: Redox capacity of cells affects inactivation of glutathione reductase by nitrosative stress., Archives of Biochemistry and Biophysics, 378, 123-130, 2000.

(3) Endo T., Fujii T., Sato K., Taniguchi N. and Fujii J.: A pivotal role of Zn-binding residues in the function of the copper chaperone for SOD1., Biochem. Biophys. Res. Commun., 276, 999-1004, 2000.

(4) Nakao C., Ookawara T., Sato Y., Kizaki T., Imazeki N., matsubara O., Haga S., Suzuki K., Taniguchi N. and Ohno H.: Extracellular Superoxide dismutase in tissues from obese (ob/ob) mice., Free. Rad. Res., 33, 229-241, 2000.

(5) Kim Y. H., Takahashi M., Noguchi N., Suzuki E., Suzuki K., Taniguchi N. and Niki E.: Inhibition of c-Jun expression induces antioxidant enzymes under serum deprivation., Arch. Biochem. Biophys., 374, 339-346, 2000.

(6) Hisamoto K, Ohmichi M, Kurachi H, Hayakawa J, Kanda Y, Nishio Y, Adachi K, Tasaka K, Miyoshi E, Fujiwara N, Taniguchi N., Murata Y. Estrogen Induces

the Akt-dependent Activation of Endothelial Nitric-oxide Synthase in Vascular Endothelial Cells. *J Biol Chem.* 2001 Feb 2;276(5):3459-3467. *J Biol Chem.* 2;276:3459-3467.2001.

(6) Koh YH, Park YS, Takahashi M, Suzuki K, Taniguchi N. Aldehyde reductase gene expression by lipid peroxidation end products, MDA and HNE. *Free Radic Res.*;33(6):739-46. 2000.

(7) Nishida M., Miyagawa J., Yamashita S., Higashiyama S., Nakata A., Ouchi N., Tamura R., Yamamori K., Kihara S., Taniguchi N. and Matsuzawa Y.:Localization of CD9, an enhancer protein for proheparin-binding EGF-like growth factor, in human atherosclerotic plaques - Possible involvement of juxtacrine growth mechanism on smooth muscle cell proliferation.,*Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 20, 1236-1243, 2000.

(8) Naka M., Nanbu T., Kobayashi K., Kamanaka Y., Komeno M., Yanase R.,Fukutomi T., Fujimura S., Seo H. G., Fujiwara N., Ohuchida S., Suzuki K., Kondo K. and Taniguchi N.: A potent inhibitor of inducible nitric oxide synthase, ONO-1714, a cyclic amidine derivative., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 270, 663-667, 2000.

(9) Park Y. S., Suzuki K., Mumby S.,

Taniguchi N. and Gutteridge J. M. C.: Antioxidant binding of caeruloplasmin to myeloperoxidase: myeloperoxidase is inhibited, but oxidase, peroxidase and immunoreactive properties of caeruloplasmin remain intact., *Free. Rad. Res.*, 33, 261-265, 2000.

分担研究報告書

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)

各種神経変性疾患は早期老化現象モデルの一つとして考えることができる。神経変性疾患である CAG リピート病の病態発現機序としてポリグルタミン鎖による aggregate の関与が問題となっている。そこで熱ショック蛋白(HSP)による aggregate 形成抑制効果を検討した。In vitro aggregate assay と培養神経系細胞への遺伝子導入実験において、HSP は truncated androgen receptor による aggregate 形成を著明に抑制し、また細胞生存率の改善効果を認めた。この結果は aggregate 形成が CAG リピート病の病態発現機序に関与を示唆しており、また HSP の CAG リピート病治療応用への可能性をも示している

A. 研究目的

球脊髄性筋萎縮症(Spinal and bulbar muscular atrophy; SBMA)は性染色体劣性遺伝の緩徐進行性の運動ニューロン病である。1991年に La Spada らによりアンドロゲン受容体遺伝子(AR)の第1エクソン内の CAG リピートが延長することが、SBMA の原因であることを見出された。これがその後相次いで発見される CAG リピート病の発端となった。現在のところ CAG リピート病としてはハンチントン舞踏病(HD)、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)、各種脊髄小脳萎縮症(SCA1, 2, 3, 6, 7)などが知られている。これら CAG リピート病は延長した CAG リピートに対応するポリグルタミン鎖によって引き起こされる gain of a toxic function を共通の病態発現機構として持つと考えられている。

その病態発現機構としては、各責任遺伝子産物のポリグルタミン鎖部分を核とした部分に processing を受けることが重要な病因の一つであると考えられている。そして processing をうけたポリグルタミン鎖が polar zipper 構造や transglutaminase による cross-linking などにより aggregate を形成し、CAG リピート病の病態形成に関与すると考えられている。(processing μ aggregate 仮説)。さらに最近の報告では各 CAG リピート病の主要病変部に責任遺伝子産物よりなる核内封入体の存在も確認されている。この核内封入体は基本的には各責任遺伝子産物のポリグルタミン鎖近傍のみより構成されており、processing μ aggregate 仮説を支持する根拠となっている。しかし最近、Saudou らは核内封入体は CAG リピート病

の直接的な病態発現機構とは関係ないと報告しており、この processing Δ aggregate 仮説にも更なる検証が必要となっている。そこで我々は processing Δ aggregate 仮説の検証と共に CAG リピート病の治療法を探るために熱ショック蛋白によるポリグルタミン鎖の aggregate 形成抑制効果を検討した。

B. 研究方法

In vitro aggregation assay

大腸菌を用い gst-truncated AR 65-HA, HSC70-His, HSP40-His を精製した。

gst-truncated AR 65-HA(0.5nM) に対し Mol 比 1:20 で HSC70-His, HSP40-His を加え 30 分 incubate 後 Western blotting を施行した。抗 HA 抗体で免疫染色し、ECL で検出した。Densitometry で信号強度を測定した。Transient expression assay Neuro2a cell line を用いた。CMV promotor で発現される truncated AR97-GFP と共に HSP70, HSP40, HSDJ の construct を co-transfection した。Transfection 後 24 時間及び 72 時間後に固定した。propidium iodide で核染色後、共焦点レーザーで観察した。

C. 研究結果

In vitro aggregation assay ;

truncated AR65 による aggregate 形成の HSP の添加による変化を Western blotting 解析で見ると、monomer は約 50Kd の位置の信号を認めるが、SDS-PAGE の well 直下に相応する部位に aggregate による信号をも認める。HSP の添加によりこの aggregate の信号強度は種々の変化を示している。この変化を aggregate/monomer 比で見ると、control 0.45, +BSA 0.19,+HSC70 0.08, +HSP40 0.6, +HSC70/HSP40 0.01 であった。HSC70 と HSC70/HSP40 では truncated AR65 による aggregate 形成を著明に抑制した。

Transient expression assay

Neuro2a に CMV promotor で発現される truncated AR24-GFP および truncated AR97-GFP を transient expression すると、transfection 後 48 時間後には truncated AR97-GFP 群では transfection された細胞のほぼ 100%に aggregate を認めるも truncated AR24-GFP 群では全く認めなかった。また 48 時間後の生存細胞数も truncated AR97-GFP 群は truncated AR24-GFP 群の半分程度に減少する(data not shown)。この系に HSP70,HSP40, HSDJ を単独および相互に truncated AR97-GFP と共に co-

transfection した。凝集体陽性率は truncated AR97-GFP 単独 95%, +HSP70 30%, +HSP40 40%, +HSDJ90%, +HSP70/HSP40 13%, +HSP70/HSDJ 40% であり HSDJ 群以外では細胞内 aggregate の減少効果を見た。特に +HSP70/HSP40 群で著明であった。これは in vitro aggregation assay の結果とほぼ同様であった。また transfection 72 時間後の生存細胞数も aggregate の減少効果を認めた +HSP70 群および +HSP70/HSP40 群で明らかに増加傾向を認めた。

D. 考察

この結果でわかるように、HSP はポリグルタミン鎖による aggregate 形成抑制効果を持つ。また truncated AR97-GFP による aggregate 形成抑制を示した HSP(HSP70 及び HSP70/HSP40) は培養細胞の生存率の改善効果も示したことは、aggregate が CAG リピート病の病態発現機構に関与をしている可能性を示唆していると考えられる。

E. 結論

HSP は CAG リピート病の治療への応用が期待される。

G. 研究発表

1. Niwa J, Ishigaki S, Doyu M, Suzuki T, Tanaka K, Sobue G: A novel centrodome RING-finger protein, Dorfin, mediates ubiquitin ligase activity. *Biochem Biophys Res Com*, in press, 2001

2. Adachi H, Sobue G, et al: Transgenic mice with an expanded CAG repeat controlled by the human AR promoter show polyglutamine nuclear inclusions and neuronal dysfunction without neuronal cell death. *Hum Mol Genet*, in press, 2001

3. Shanlou Q, Iwashita T, Furukawa T, Yamamoto M, Sobue G, Takahashi M: Differential effects of LAR on biochemical and biological activities of RET-MEN2A and RET-MEN2B mutant protein. *J Biol Chem*, in press, 2001

4. McCampbell A, Taylor JP, Taye AA, Robitschek J, Li M, Walcott J, Merry D, Chai Y, Paulson H, Sobue G, Fischbeck KH: CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine. *Hum. Mol. Genet*, 9: 2197-2202, 2000

5. Kobayashi Y, Kume A, Li M,

Doyu M, Hata M, Ohtsuka K, Sobue G: Chaperones, Hsp70 and Hsp40, suppress aggregate formation and apoptosis in cultured neuronal cells expressing truncated androgen receptor protein with expanded polyglutamine tract. *J Biol Chem*, 275(12): 8772-8778, 2000

6. Watanabe H, Tanaka F, Doyu M, Riku S, Yoshida M, Hashizume Y, Sobue G: Differential somatic CAG repeat instability in variable brain cell

lineage in dentatorubral pallidoluysian atrophy (DRPLA): a laser-captured microdissection (LCM)-based analysis. *Hum Genet*, 107: 452-457, 2000

7. Ishigaki S, Niwa J, Yoshihara T, Mitsuma N, Doyu M, Sobue G: Two novel genes, human neugrin and mouse m-neugrin, are upregulated with neuronal differentiation in neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Com*, 279 526-533, 2000

分担研究報告書

ミクログリアとストレス

分担研究者 澤田誠

(藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・教授)

研究要旨：本研究は老化促進に関わる刺激が加わったときのミクログリアの反応を *in vitro* と *in vivo* で検討し、脳の老化のメカニズムやそれを抑制する手段について検索することを目的としておこなうものである。ミクログリアには複数のサブタイプが存在し、そのサブタイプによってストレス刺激による応答性が異なり、サイトカイン産生のスペクトラムや細胞表面機能分子の発現などが異なることがわかった。また、酸化ストレス物質である NO を産生する酵素である NOS は大量の NO を生成する iNOS を発現するサブタイプと少量の生理的濃度の NO を生成する nNOS を発現するサブタイプとがありその役割が異なることがわかった。

A. 研究目的

ミクログリアはマクロファージ様の性質を持つ中枢神経系細胞で、炎症反応やウイルス感染において免疫担当細胞として働いたり変性した細胞を取り除く貪食細胞として働くほか、サイトカイン、プロテアーゼ、プロスタグランジン、NO、スーパーオキシドなどの生物活性因子を産生する脳内サイトカインネットワークの中心的な細胞である(1)。また最近では学習や記憶といった高次の脳機能の発現にも不可欠であることが示され(2)、脳に特異的な役割を持った特殊化した細胞であると考えられている。現在までのところミクログリアの起源は周産期に脳内に侵入した単球が特殊化して分化すると考え

られている(3)。しかし最近我々は脳に対する親和性や浸潤できるか否かについてマクロファージとミクログリアが決定的に異なることを示した(4)。さらに両者を識別する方法で染色してその分布を調べたところ、ミクログリアが発生の早い段階から脳内に存在することを示した(5)。したがってミクログリアは骨髄で分化成熟する単球由来ではなく、脳に特異的な親和性を持った細胞群が発生の初期に脳内に侵入し、脳の形態形成や記憶学習といった高次機能まで調節するようになると考えられる(6)。このようにミクログリアは外的および内的微小環境の変化に応答しての脳機能を形成したり維持したりする脳内ストレス応答系としての役割を

果たしていると考えられる(7)。最近アルツハイマー病などの脳の老化にミクログリアが深く関わっていることが示されているが(8)、その詳細な分子機構についてはわかっていない。そこで本研究は脳の老化に関わる刺激が加えられたときのミクログリアの反応を *in vivo* と *in vitro* で検討し、脳の老化のメカニズムやそれを抑制する手段について検索することを目的とする。

今回の研究はミクログリアのサブタイプによる NO 産生の様式の違いを比較するために蛍光基質を使って細胞から産生された NO を可視化し、直接定量する事を行った。また、サブタイプにおける NO 合成酵素の発現の違いを Western blot により同定した。

B. 研究方法

1. 細胞の調製：C57black6 マウス新生仔から混合グリア培養を作成し、2種類の分画法により typeI および typeII のミクログリアを精製した。株化ミクログリアは primary 培養で得られるミクログリアのサブタイプのそれぞれに性質が類似している細胞として C57black6 マウスから樹立した Ra2 および 6-3 を使用した。

2. 蛍光基質 DAF2 および DAF2DA による NO 産生の可視化および定量化：蛍光基質 DAF2 および DAF2DA (第一化学) は NO と反応して蛍光を発する。DAF2 は細胞膜を透過しないため、細胞から放出された NO

の培養液中の総量を測定できる。一方、DAF2DA は細胞膜を通過し細胞質中に取り込まれた後すみやかに加水分解され DAF2 となって細胞質中で NO と反応する。蛍光反応産物は細胞膜を透過しないため NO 産生細胞を可視化、同定することができる。

株化ミクログリアを 10000 cells/well で TP24 テストプレートにまきこみ、DAF2, DAF2DA 添加 24 時間前および同時に LPS 100 ng/ml または interferon 100 U/ml で刺激して蛍光基質を添加し、4 時間後の蛍光強度を AcentFL 蛍光プレートリーダーで定量、BX50-Sensys1400 蛍光顕微鏡画像取得システムで可視化した。

3. Western blot による NO 合成酵素の発現の違いの同定：LPS 100 ng/ml または interferon 100 U/ml で刺激したミクログリア 4×10^6 cells からホモジネートを作成し、iNOS, eNOS, nNOS 抗体を用いて Western bolt をおこなった。

(倫理面への配慮) 動物実験はマウス個体を使用した。長寿医療研究センター動物施設実験指針に従って研究を行った。

C. 研究結果

活性化されたミクログリアは NO を産生するが、今回 DAF2DA を用いることにより NO 産生細胞を可視化することに成功した。また、DAF2 による NO 産生の定量化により NO

の産生には早い反応（刺激直後～2－3時間後まで）と遅い反応（刺激後6時間－24時間）の2相性が見られた。この反応には2種類のNO合成酵素が関与しており、その分布はミクログリアのサブタイプにより異なることがわかった。ミクログリアのサブタイプでは大量のNOを生成するiNOSを発現するサブタイプ（type I, clone 6-3）と少量の生理的濃度のNOを生成するnNOSを発現するサブタイプ（type II, clone Ra2）とがありその役割が異なることがわかった。

D. 考察

これまでの研究によって、ミクログリアはサブタイプによってストレス刺激による応答性が異なり、種々のサイトカイン産生のスペクトラムや細胞表面機能分子の発現などが異なることがわかった。また、我々の樹立した複数の株化ミクログリアのいくつかはミクログリアのサブタイプに一致した性質を持っていることがわかった。虚血ストレス負荷によって生じる遅延性神経細胞死において非侵襲的脳内導入ミクログリアは神経変性部位に集まりやすく、さらに細胞死から神経を保護するようなtrophicな作用を持つことがわかった。したがって、老化促進ストレスから脳を保護する方法の一つとして、ミクログリアを用いた非侵襲的脳のバイオターゲティング系を用いて老化ストレスを抑制する薬物やサイトカ

インを脳に導入したり、遺伝子治療を行う可能性が示唆できた。

一方で、ミクログリアは単離培養条件下では活性酸素、NO、蛋白分解酵素、アラキドン酸誘導体、興奮性アミノ酸、キノリン酸、サイトカイン、 β -アミロイドタンパクなど、多くの細胞障害性もしくは細胞毒生を持った物質を産生する。実際にある培養条件では神経細胞との共培養でミクログリアが神経細胞のアポトーシスを誘導し、また、ミクログリアが産生するTNF α により培養オリゴデンドロサイトの細胞死がおこる。また最近ではinterferon- γ により活性化されたミクログリアがアミロイドペプチドにより神経細胞障害性の物質を産生することが報告され、アルツハイマー病のような神経変性疾患の発症に深く関与している可能性が示されている。さらにいくつかのノックアウトマウスでは標的遺伝子がミクログリアの機能遺伝子として働いていることから、損傷に応答したミクログリアの活性化やそれにもなってみられる神経細胞死が見られなくなるという事実も知られている。

しかしin vivoにおいて活性化ミクログリアの集積や増殖が観察されることが知られている脳虚血や神経線維切断による神経細胞の変性のモデルにおいて、損傷を受けていない神経細胞に対してミクログリアがアポトーシスを誘導する証拠はまったくない。むしろ、ミクログリアの細胞

毒生を媒介すると考えられている TNF α の受容体ノックアウトマウスでは細胞死が増大することが報告されている。また、一過性脳虚血では海馬全体のミクログリアが活性化されるが、神経細胞死がおこらない CA2、CA3 や歯状回でのミクログリアは TGF β mRNA を発現し神経変性を抑制するように働いていることも示唆されている。実際に培養下では活性化ミクログリアは細胞毒性を持った因子を産生すると同時に多くの神経保護作用を持った因子も産生する。

今回の研究結果から、ミクログリアには役割の異なる複数のサブタイプが存在することが明らかになった。今回は特に酸化ストレス物質である NO を産生する酵素である NOS の発現について、同じミクログリアでも iNOS を発現するサブタイプと nNOS を発現するサブタイプとがあり、おそらく前者は大量の NO を生成し炎症反応に関与するミクログリアであり、それに対して後者は少量の生理的濃度の NO を生成するミクログリアであると考えられ、その役割が異なることが考えられた。我々は脳の一次培養から明確に分画できる2つのサブタイプを同定しており、それらは細胞表面抗原の発現や増殖因子依存性が異なるほか、刺激に対する感受性やその応答も異なり、活性化の調節メカニズムや役割などが異なったミクログリアであると考えられる。したがって、ミクログリアの両面性はひょっとしたら役割の異なる

サブタイプが存在することで説明できるかも知れない。

E. 結論

ミクログリアには複数のサブタイプが存在し、ミクログリアのストレス応答の役割やメカニズムを考える場合においてサブタイプの性質を明確にすることが必要である。

引用文献

- 1) M. Sawada et al: Cytokine network in the central nervous system and its roles in growth and differentiation of glial and neuronal cells, *Int. J. Dev. Neurosci.*, Vol 13, No3/4: 253-264, 1995.
- 2) Tsirka et al: Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator, *Nature*, 377: 340-344, 1995.
- 3) H. Lassmann et al: Bone marrow derived elements and resident microglia in brain inflammation, *Glia*, Vol 7, No 1, 19-24, 1993.
- 4) F. Imai, M. Sawada et al: Permeability of blood-brain barrier to microglia and macrophage in vivo, *Neurosci. Lett.* Vol 237, No1, 49-52, 1997.
- 5) T. Tanaka, M. Sawada et al: Presence of CD59-positive microglia in mouse brain. *Neurosci. Lett.* Vol 239, No1, 17-20, 1997.
- 6) 澤田誠: ミクログリアの多様性と発生学的起源, *細胞*, 27,5:193-

198,1995.

7) 澤田誠:脳のサイトカインネットワーク,蛋白質核酸酵素, 42: 504-511, 1997.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

Hasegawa, Y., T. Inagaki, M. Sawada and A. Suzumura (2000). Impaired cytokine production by peripheral blood mononuclear cells and monocytes/macrophages in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand* 101(3): 159-64.

Hasegawa, Y., M. Sawada, N. Ozaki, T. Inagaki and A. Suzumura (2000). Increased soluble tumor necrosis factor receptor levels in the serum of elderly people. *Gerontology* 46(4): 185-8.

Kanzawa, T., M. Sawada, K. Kato, K. Yamamoto, H. Mori and R. Tanaka (2000). Differentiated regulation of allo-antigen presentation by different types of murine microglial cell lines [In Process Citation]. *J Neurosci Res* 62(3): 383-388.

Morihata, H., J. Kawawaki, H. Sakai, M. Sawada, T. Tsutada and M. Kuno (2000). Temporal fluctuations of voltage-gated proton currents in rat spinal microglia via pH-dependent and -independent mechanisms [In Process Citation]. *Neurosci Res* 38(3): 265-271.

澤田誠：細胞を使って脳の疾患を治療する試み 治療, 82, 128-130, 2000.

澤田誠：細胞周期とアポトーシス

Clinical Neuroscience 18(4) 407-409, 2000.

2. 学会発表

[国際学会]

Sawada, M., Imai, F., Suzuki, H., Kanno, T. (2000) Brain-Specific Migration and Protective Roles in Ischemic Brain Lesion of Microglia. IV European Meeting on Glial Cell Function in Health and Disease. Barcelona, May 24-27.

Sawada, M. (2000) Identification of novel characteristics and possible origin of microglia. Int MPO Meeting, Atami, June 25-26.

[招待講演・シンポジウム]

1. 澤田誠 (2000) ミクログリアの新規な性質と細胞起源 (シンポジウム) 第 43 回日本神経化学会、金沢、Oct 18-20.
2. 澤田誠 (2000) 細胞を使って脳の疾患を治療する (特別講演) Cell Biology Meeting 2000, 修善寺 July, 1-2.
3. 澤田誠 (2000) ミクログリアの新規な性質と細胞起源 (シンポジウム) 第 56 回リンパ網内系学会、浜松

[一般講演]

1. 小野健治、瀧井猛将、小野崎菊夫、澤田誠 (2000) 骨髄キメラマウスでの脳移行性細胞の解析、第 73 回日本生化学会大会、横浜 October 11-14.
2. 鈴木弘美、今井文博、神野哲夫、澤田誠 (2000) 脳虚血におけるミクログリアの神経細胞に対する保護作用、第 73 回日本生化学会大会、横浜 October 11-14.
3. 鈴木弘美、今井文博、神野哲夫、澤田誠 (2000) 脳虚血におけるミ