

200100173A

平成 13 年度

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

発生工学を利用した老化・老化病モデルマウスの開発
とこれに基づいた新規薬物設計に関する研究

平成 14（2002）年 3 月

主任研究者 本山 昇

目 次

I.	総括研究報告書 発生工学を利用した老化・老化病モデルマウスの開発と これに基づいた新規薬物設計に関する研究	1
II.	研究成果の刊行に関する一覧表	43
III.	研究成果の刊行物・別刷	44

I. 総括研究報告書

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

発生工学を利用した老化・老化病モデルマウスの開発とこれに基づいた 新規薬物設計に関する研究

主任研究者 本山 昇

国立長寿医療研究センター老年病研究部東洋医学・薬物療法開発室長

研究要旨

寿命関連遺伝子 Daf-16 の哺乳類ホモログ FOXO ファミリーの活性型 AFX-TM 発現誘導株を用い筋細胞分化及び間葉系幹細胞分化における機能を解析した。FOXO ファミリーは、IGF-PI3K-Akt/PKB シグナルによってリン酸化され不活性化されていることが筋細胞分化の開始及び維持・成熟に必須であることが明らかになった。また、間葉系細胞の分化決定において C/EBP α の発現誘導を介して筋細胞・骨芽細胞分化を抑制し、脂肪細胞分化への commitment を促進している。これらの結果、高齢者の寝たきり状態の要因となる筋萎縮（廃用性筋萎縮症）や生活習慣病の予防・治療法開発の基礎的研究となると思われる。また、ターゲット遺伝子の同定を行い、酸化ストレス等の成体ストレスにตอบสนองして FOXO ファミリーは活性化され、GADD45 等の細胞周期停止・DNA 修復・ストレス抵抗性を誘導する遺伝子の発現を制御していることが明らかになった。種々の長寿命を示す変異動物ではストレス抵抗性を示すことが知られているが、本研究で開発した FKHL1 loss-of-function 及び gain-of-function マウスは、今後生体ストレスと寿命及び老年病発症との関係を明らかにするための有用なモデルマウスとなると考えられる。

早期老化症 AT の原因遺伝子産物 ATM の下流因子である Chk2 ががん抑制遺伝子 p53 の機能制御を行っていることを明らかにした。p53 は細胞老化さらに個体老化との関係が報告されており、Chk2 ノックアウトマウスも同様に有用なモデルマウスとなると考えられる。

DNA の修復に関与すると思われる Pol λ ノックアウトマウスは、水頭症・慢性副鼻腔炎・雄不妊・臓器逆位などの症状を呈した。そこで、Pol λ ノックアウトマウスは、immotile cilia syndrome のモデルマウスとして有用であると思われる。

本山 昇
国立長寿医療研究センター
老年病研究部
東洋医学・薬物療法開発室
室長

中山 啓子
九州大学
成体防御医学研究所
附属発生工学実験施設
助教授

澤 洋文
北海道大学
医学部
分子細胞病理
助教授

A. 研究目的

老化の過程では、紫外線・電離放射線等の外界からの DNA 障害性ストレス及び代謝の結果内因的に生じる活性酸素等の酸化ストレスに対する抵抗性・監視機構の減弱が重要な役割を果たしていると考えられている。このような監視機構の破綻は、早期老化症やがんをはじめとする多くの老年病の原因となる。線虫やショウジョウ

バエにおいて長寿命を示す変異体の多くが生体ストレスに対して抵抗性を示すことが示されている。これらの変異体においては、インスリン様レセプターのシグナル伝達経路に関わる遺伝子群が同定されているが、哺乳類でのこの経路と老化との関係やストレス抵抗性の獲得メカニズムについては明らかにされていない。また、ヒトの早老症患者において DNA 障害性ストレスに対して、ゲノム DNA の安定性を監視維持するメカニズムに関与する分子の変異が同定されているが、早老症発症のメカニズムについては解明されていない。老化とストレスとの相関、老化及び老年病に対する創薬や治療法の開発には、哺乳類のモデル動物の作成が必須である。

生体ストレスに関わる分子として、線虫において寿命及びストレス抵抗性に関与する Daf-2、Age-1、Daf-16 等及び早老症を呈する Ataxia telangiectasia の原因遺伝子 ATM や NF- κ B、SAPK が考えられる。そこで本研究では、線虫において老化関連遺伝子やストレス抵抗性に関与する遺伝子の発現を制御していると考えられるフォークヘッド型転写因子 Daf-16 の哺乳類ホモログ及び ATM のターゲット分子である Chk1、Cds1 (Chk2) に着目して、老化と

生体ストレスの関連を明らかにする目的で、Gene Targeting によるノックアウトマウス、さらに組織特異的・誘導型ノックアウトマウスの作成を中心に老化モデル動物を作成し、個体レベルでの研究を進め生体ストレスに対する抵抗性の獲得メカニズムを明らかにするとともに老年病に対する薬物開発を企図することを目的として研究を進めた。

B. 研究方法

1. Daf-16 マウスホモログ FOXO ファミリーの機能解析

(1) AFX のターゲット遺伝子の同定

活性型 AFX-TM を Cre/loxP システムによって発現誘導可能なマウス筋芽細胞 C2C12 細胞株を樹立した。この細胞に Cre レコンビナーゼを発現するアデノウイルス (Ad-Cre) を感染させることで活性型 AFX-TM を発現誘導し、RNA を抽出して DNA チップ解析により発現遺伝子の解析を行った。

(2) FKHL1 の gain-of-function および loss-of-function マウスの作成

転写開始点の直下から第一コーディングエクソンを loxP/neo/loxP-FALG-FKHRL1-TM (活性型) で置換した FKHL1 loss-of-function

(FKHL1 KO) マウスを作成した。また、FKHL1 KO マウスを CAG-Cre トランスジェニックマウスと交配することにより neo を欠損し活性型 FLAG-FKHRL1-TM を発現する gain-of-function (FKHL1-TM) マウスを作成した。

2. 早老症 AT の下流分子 Chk2 ノックアウトマウスの作成と解析

(2) Chk2 ノックアウトマウス

定法に従ってノックアウトマウスを作成した。また、高濃度 G418 選択により Chk2^{-/-}ES 細胞を樹立した。さらに、Chk2^{+/-}マウス同士を交配し、E13.5 日の胎児より MEF (マウス胚性繊維芽細胞) を樹立し、これから定法により 3T3 化を行った。

3. DNA Polymerase λ ノックアウトマウスの作成と解析

胚性幹 (ES) 細胞における相同性組換えを用いエクソン 1~6 を欠損する Pol λ ノックアウトマウスを 3 系統樹立した。3 系統は同じ表現形を示した。

組織病理解析のため、組織は 4% パラフォルムアルデヒドリン酸緩衝液で固定し、パラフィン包埋し、薄切切片を作成し、HE 染色を行った。電子顕微鏡用の試料作成は、組織

を2%グルタルアルデヒドで固定し、1%オスミウム酸処理した。精巢の組織はブアン溶液で固定した。

C. 研究結果と考察

1. Daf-16 のマウスホモログ FOXO ファミリーの機能解析

(1) 間葉系細胞の分化における FOXO ファミリーの機能

昨年度、活性型 AFX-TM を Cre/loxP システムによって発現誘導可能なマウス筋芽細胞 C2C12 細胞株 (C2C12-AFX-TM 細胞) を樹立した (図 1、2)。筋細胞分化においては、IGF-PI3K-Akt/PKB シグナルが必須であることが知られている。FOXO ファミリーは Akt/PKB キナーゼによってリン酸化され細胞質に局在するようになり、転写因子としては不活性化される。そこで、筋細胞分化における AFX の機能を解析した。C2C12 細胞は低血清培地で培養することによって、autocrine に IGF が産生され PI3K-Akt/PKB シグナルが活性化され筋細胞分化が誘導される。C2C12 を分化誘導培地 (DM) で培養すると myotube の形成が認められた。また、筋細胞分化のマーカである myogenin、myosine heavy chain (MHC) 及び p21 の発現誘導が認められた。PI3K の特異的阻害剤である LY294002 で処

理すると myotube の形成、myogenin、MHC 及び p21 の発現誘導が阻害された。このような系において内在性の AFX のリン酸化状態を検討した結果、AFX は筋細胞分化とともにリン酸化されるが、そのリン酸化は LY294002 によって阻害されることが明らかになった。即ち、AFX は筋細胞分化において Akt/PKB によってリン酸化され不活性化されていると思われる (図 3)。

C2C12-AFX-TM 細胞を Ad-Cre で感染し活性型 AFX-TM を発現誘導した後、DM で培養したところ、細胞は巨大化・扁平化し myotube は形成されなかった。また、myogenin、MHC 及び p21 の発現上昇も認められなかった。一方、コントロールアデノウイルス感染細胞では筋細胞分化が認められた。即ち、活性型 AFX-TM によって筋細胞分化が阻害されることを見出した (図 4)。IGF-PI3K-Akt/PKB シグナルの活性化は筋細胞分化の維持・成熟に必須であることが知られている。そこで、C2C12-AFX-TM 細胞を DM で 3 日間培養し、筋細胞へ分化誘導した細胞に活性型 AFX を発現誘導した。3 日間の培養で myotube の形成、myogenin、MHC 及び p21 の発現誘導が認められた。コントロールアデノウイルスを感染した細胞では、さらに MHC の発現が増大し筋細胞分化が進んでいた。一方、Ad-Cre

を感染させ活性型 AFX-TM を発現誘導した場合は、細胞は巨大化・扁平化し myotube は認められなかった。また、myogenin、MHC 及び p21 は分化誘導前のレベルまで減少していた。さらに、MyoD の発現は分化誘導前のレベル以下に減少していた。これらのことから、活性型 AFX-TM は筋細胞分化の維持・成熟を阻害することが明らかになった(図5)。即ち、AFX が Akt/PKB キナーゼによって恒常的にリン酸化され細胞質に局在し不活性化されていることが筋細胞分化の開始及び維持に必須であることを示した。老化にともない筋肉の萎縮が生じること、また廃用性筋萎縮などは高齢者の寝たきり状態につながると考えられている。FOXO ファミリーが筋細胞の分化・成熟・維持において重要な機能を果たしていることが明らかになったが、この基礎的な結果は、筋萎縮に対する予防・治療などへの応用が期待される。

また、マウス C2C12 は間葉系幹細胞の性質を持っており、骨芽細胞及び脂肪細胞にも分化誘導が可能である(図6)。そこで、それらの細胞分化における AFX の機能を解析した。C2C12 細胞を BMP-2 及び BMP-4 で処理すると骨芽細胞へと分化する。C2C12-AFX-TM 細胞に Ad-Cre を感染し活性型 AFX-TM を発現誘導し、BMP-2 及び BMP-4

処理によって骨芽細胞分化を誘導した結果、骨芽細胞分化が阻害されることを見出した(図7)。次に、脂肪細胞分化を Troglitazone で誘導したが、活性型 AFX-TM の発現によって脂肪細胞分化は阻害されなかった(図8)。活性型 AFX-TM によって発現誘導されるターゲット遺伝子の解析の結果、その一つに脂肪細胞分化に重要な機能を果たす C/EBP α が発現誘導されることを見出した。これらのことから間葉系細胞分化において、AFX もしくは他の FOXO ファミリーは C/EBP α を発現誘導することによって分化の方向性を脂肪細胞へと決定もしくは誘導している可能性を明らかにした(図9)。

(2) 酸化ストレスと FOXO ファミリー

C2C12-AFX-TM 細胞に Ad-Cre を感染させ活性型 AFX-TM を発現誘導すると、細胞増殖の抑制が起こった。細胞周期を解析した結果、G2/M 期の細胞が蓄積していた(図10)。M 期に特異的にリン酸化されるヒストン H3-Ser10 のリン酸化を検討したところ減少していた。これらの結果から活性型 AFX-TM は G2 アレストを誘導することが明らかになった(図10)。DNA チップを用いた解析によって、活性型 AFX-TM によって発現誘導されるターゲット遺伝子の

一つに、DNA 傷害ストレスによって発現上昇し、細胞周期のチェックポイントや DNA 修復及びアポトーシスを誘導する GADD45 を同定している。GADD45 は電離放射線による DNA 傷害に応答してがん抑制遺伝子産物 p53 によって発現誘導されることが知られているが、p53 非依存的な発現誘導も起こることが報告されている。FOXO ファミリーによって GADD45 は発現誘導されているかどうかを確かめるために、C2C12-AFX-TM に Ad-Cre を感染させ活性型 AFX-TM を発現誘導した細胞から RNA 及びたんぱく質を抽出し、ノザンブロット解析及びウエスタンブロット解析によって、mRNA レベル及びたんぱく質レベルで GADD45 の発現が上昇していることを明らかにした (図 1 1)。GADD45 のプロモータ領域の配列には、FOXO ファミリーの結合モチーフが-1114bp と-507bp に存在していた (図 1 2)。そこで GADD45 のプロモータ領域をルシフェラーゼアッセイによって検討した結果、AFX 及び FKHL1 によってプロモータ活性が上昇した。さらに deletion mutant を作成し 2 箇所の FOXO ファミリー結合モチーフがその転写活性に必須であるかを検討した結果、2 箇所のモチーフを欠損したものではプロモータ活性が消失した (図 1 3)。また、-507bp

のモチーフを変異したものではプロモータ活性が消失していた (図 1 4)。これらのことから、-507bp の FOXO ファミリー結合モチーフを介して FOXO ファミリーは GADD45 の転写を誘導することが明らかになった。線虫やショウジョウバエ、さらにはマウスにおいて長寿命の表現型を示す変異体は、UV や活性酸素等などの酸化ストレスに対して抵抗性を獲得している。GADD45 は DNA 修復を促進する機能を持ったストレス応答性の遺伝子であることから、酸化ストレスなどの生体ストレスに応答して FOXO ファミリーが活性化されストレス応答性遺伝子の転写誘導を行っている可能性が考えられる。そこで、その可能性を検討するために、GADD45-ルシフェラーゼリポータ遺伝子を細胞に導入し過酸化水素で処理後、リポータ活性を測定した結果、過酸化水素処理によって GADD45 プロモータ活性は増大した (図 1 5)。しかしながら、FOXO ファミリー結合モチーフの変異体では変化しなかった。C2C12 細胞を過酸化水素で処理すると内在性の GADD45 の発現が誘導された (図 1 6)。これらの結果から、活性酸素等の酸化ストレスに応答して FOXO ファミリーが活性化、即ち核内に移行し GADD45 をはじめとする細胞周期停止・DNA 修復などを誘導するス

トレス応答性の遺伝子の発現を誘導することが明らかになった。

(3) FOXO ファミリーの発現パターン

胎生 14.5 日 (E14.5) 及び成体の脳における FOXO ファミリーの AFX、FKHRL1 及び FKHR の発現パターンを、in situ hybridization によって検討した (図 17)。

AFX は E14.5 では、大脳神経上皮細胞、椎間軟骨、心臓、また、成体の脳においては陰性であった。FKHRL1 は E14.5 では、肝臓、大脳神経上皮細胞、椎間軟骨、消化管上皮、舌、脊策、また、成体の脳では、海馬の CA1~CA3 領域及び歯状回、小脳の顆粒細胞及びプルキンエ細胞やその他の神経細胞が陽性であった。FKHR は E14.5 では、大脳神経上皮細胞、舌、消化管上皮細胞、椎間軟骨、また、成体の脳においては海馬の歯状回及び線状体と小脳の顆粒細胞が陽性であった。このように胎生期にはかなりオーバーラップして発現しているが、成体の脳では非常に興味深い発現パターンを示した。

(4) FKHRL1 loss-of-function マウス及び gain-of-function マウス

昨年度までに、FKHRL1 の転写開始点下

流から第一コーディングエクソンを loxP-neo-loxP-FKHRL1-TM で置換した FKHRL1 KO マウスを作成した (図 18)。FKHRL1 KO マウスは、正常に生まれることができ見かけ上の異常は認められなかった。また、FKHRL1 KO マウスを CAG-Cre トランスジェニックマウスと交配し、loxP 間でリコンビナーションを起こし、FKHRL1-TM を発現する gain-of-function (FKHRL1-TM) マウスを作成した (図 18)。FKHRL1-TM マウスでは、内在性の FKHRL1 が発現する組織、例えば脳・腎臓において FKHRL1-TM の高い発現がノザンブロット解析で認められた。このマウスも正常に生まれることができ、見かけ上の異常は認められなかった。上述したように、FOXO ファミリーはストレス応答性遺伝子 GADD45 の発現を制御していることがわかったので、FKHRL1 KO マウス及び FKHRL1-TM マウスにおいて GADD45 の発現レベルをノザンブロット解析で検討した結果、FKHRL1 KO マウスでは発現の変化は認められなかったが、FKHRL1-TM マウスでは脳において GADD45 が高い発現を示した (図 19)。脳神経系は、エネルギー代謝が活発で活性酸素の発生率も高いと考えられており、酸化ストレスを受けていると考えられている。FKHRL1-TM マウスでは、GADD45 の発現レベ

ルが恒常的に上昇しているということから、内在的に生じた酸化ストレスに耐性になっていると考えられ、p66Shc KO マウスと同様に長寿命の表現型を示す可能性が考えられた。そこで今後、虚血再還流を行い神経細胞に酸化ストレスを負荷した場合の、酸化ストレス耐性、特に海馬 CA1～CA3 領域は、FKHRL1 のみが強く発現しているので、この領域を中心に検討を進めている。さらに、寿命のコホート解析を進めているところである。

2. 早期老化症 AT の原因遺伝子産物 ATM の下流因子である Chk2 のノックアウトマウスの解析

昨年度 Chk2 ノックアウトマウスが放射線誘導によるがん抑制遺伝子産物である p53 依存的アポトーシスに耐性を示すことを示した (図 20、21)。また、p53 依存的な G1 チェックポイントにも異常があることを明らかにし (図 22)、Chk2 は p53 の機能制御に重要な機能を果たしていることを明らかにしてきた。そこで、Chk2 がどのように p53 の機能制御を行っているかを検討した。

p53 は通常 Mdm2 と結合しユビキチン化されプロテアソーム依存的に分解されており、細胞内で非常に低いレベルに保たれ

ている。しかし、DNA 傷害等のストレスが生じると p53 はリン酸化等の修飾を受け Mdm2 との会合が離れ安定化しタンパクレベルの上昇が認められ、細胞周期停止・DNA 修復・アポトーシスなどを誘導するターゲット遺伝子の転写を引き起こすと考えられている。そこで、放射線照射後の p53 分子の安定化を検討した結果、興味深いことに Chk2 ノックアウトマウスでも p53 は安定化していた。しかし、その安定化は野性型と比較して 30 から 50% 減少していた (図 23)。ATM/ATR の阻害剤を添加することにより Chk2 及び野性型で見られた p53 の安定化は減少した。これらのことから Chk2 は p53 の安定化に関与しているが、主には ATM/ATR に依存し Chk2 を介さない経路によって p53 は安定化することを示した (図 24)。

Chk2^{-/-}細胞において p53 は安定化するが、p53 依存的に生じるアポトーシス及び G1/S チェックポイントは異常であった。そこで、p53 標的遺伝子である p21 や Noxa 等 p53 の転写ターゲット遺伝子の発現を検討した結果、放射線照射によって発現誘導が起こらないことが明らかになった (図 25)。

放射線照射によって活性化された Chk2 は p53 の Ser20 をリン酸化して p53 の安定

化を誘導するという報告がある。また、アセチル化を介して転写活性を活性化することが報告されている。そこで、Chk2 ノックアウトマウスにおいて放射線照射後の p53 のリン酸化及びについて検討した結果、p53 の安定化及び活性化に重要とされる p53 の Ser15 や Ser20 のリン酸化は正常に起こっていた (図 2 6)。また、アセチル化については、野性型と同様におこっていた (図 2 6)。さらに、アデノウイルスを用いてヒト p53 を野性型及び Chk2 MEF に導入し、放射線照射後のヒト p53 の安定化とリン酸化を検討した結果、Chk2 MEF においても安定化が認められ、また、Ser-20 のリン酸化も認められた (図 2 7)。

Chk2 が p53 の機能制御に重要な機能を果たすことや、ある種のがんにおいて Chk2 の変異が見出されていることから、Chk2 とがん化について検討するために、Chk2 ノックアウトマウスの自然発がん率及び放射線照射後の発がん率のコホート解析を進めた。現在のところ生後 1 年までは自然発生の腫瘍は形成されないことが分った。

Chk2 は Chk1 と異なり個体発生や細胞の増殖には必須でないことが分った。また、上流のキナーゼ ATM ノックアウトマウスに見られる急性の放射線感受性は Chk2 ノ

ックアウトマウスでは認められなかったことから ATM シグナルの別の経路が関与していることがわかった。一方、Chk2 ノックアウトマウスでは p53 ノックアウトマウスと同様、即ち p53 依存的なアポトーシス、細胞周期チェックポイントに異常が認められた。これらのことから Chk2 は p53 の機能制御を行っていることが明らかになった。しかし、Chk2 ノックアウトマウスにおいても p53 は安定化しており、この安定化に主に ATM/ATR を介した Chk2 非依存性のメカニズムによって生じていることが分った。従来提唱されていた Chk2 は p53 の Ser20 のリン酸化を介して p53 の安定化を制御しているのではなく、Ser20 のリン酸化は Plk3 などの他の ATM によって活性化されるキナーゼが行っていると思われる。しかし、p53 は安定化しているにも関わらず p53 のターゲット遺伝子の発現誘導及びその結果として生じるアポトーシス・細胞周期停止に異常が認められたことから、Chk2 は p53 の同定されていない部位のリン酸化もしくは同定されていない分子のリン酸化を介して安定化のみならず p53 の転写活性を制御していると考えられた。今後 Chk2 による p53 の転写活性制御メカニズムの解明はがん抑制遺伝子 p53 の機能制御を明らかにする上で

極めて重要であると思われる。また、Chk2 ノックアウトマウスが、DNA 傷害のゲートキーパーとして機能しているかどうかを詳細に検討し、がん抑制遺伝子として作用しているかどうかについて今後私たちの Chk2 ノックアウトマウスは有用なモデルマウスとなると思われる。

3. DNA 修復酵素である DNA polymerase λ ノックアウトマウスの作成と解析

(1) Pol λ ノックアウトマウスは水頭症・内臓逆位・慢性副鼻腔炎を示す

Pol λ ノックアウトマウスは、生後発育遅延を示し 3 週までに約半数、さらに 9 週では約 70% が死亡した (MCB, Fig. 2)。生後すぐは見かけ上異常は認められなかったが、2 から 4 週までに頭部肥大が認められ、ドーム型の頭部を特徴とする水頭症を発症していた (MCB, Fig. 2)。側脳室が著しく拡張しており、また第 3 脳室も若干の拡張が認められ、著しい大脳皮質の薄化が観察された。水頭症の発症時期を明らかにするために、胎児及び新生児の脳を組織化学的に検討した。胎生 13.5 日から 18.5 日までは、脳室の拡張は認められなかった。生後 1 日目において側脳室の拡張が認められる個体が少数存在していた。この結果から、Pol λ ノックアウトマウスは生後

1 日目から水頭症を発症することが明らかになった。さらに、Pol λ ノックアウトマウスは、脾臓・肝臓などの内臓全逆位及び心臓の逆位など臓器逆位、すなわち左右軸の決定に異常が生じていることが明らかになった (MCB, Fig. 2)。これらの所見は、繊毛の運動異常を原因とする immotile cilia syndrome の所見と類似していた。そこで、immotile cilia syndrome の特徴である気管支関係の異常を検討した結果、Pol λ ノックアウトマウスは慢性副鼻腔炎を呈していることが分かった (MCB, Fig. 3)。

(2) Pol λ ノックアウトマウスの繊毛は inner dynein arm を欠損している

水頭症・臓器逆位・慢性副鼻腔炎などの所見から、Pol λ ノックアウトマウスは immotile cilia syndrome の症状を呈していることが明らかになった。immotile cilia syndrome は繊毛の構造異常などによる繊毛不動性が原因となっているので、Pol λ ノックアウトマウスにおける繊毛の構造を電子顕微鏡で検討した結果、inner dynein arm が欠損していることが明らかになった (MCB, Fig. 3)。Inner dynein arm は特に運動性に重要で、ヒトの疾患の場合、inner dynein arm が欠損していると繊毛

は完全に運動性を失っている。以上の結果より、Pol λ ノックアウトマウスの繊毛は、inner dynein arm を欠損することによって運動性を失っていると考えられた。

(3) 雄の Pol λ ノックアウトマウスは不妊である

immotile cilia syndrome のもう一つの特徴は、精子の鞭毛の異常により不妊になることである。そこで、Pol λ ノックアウトマウスの繁殖能を検討した結果、雄は不妊であることが明らかになった。雌に関しては正常であった。精巣上体より精子を取り出し観察した結果、Pol λ ノックアウトマウスの精子は運動性を示さなかった (MCB, Fig. 4)。また、精巣を組織化学的に検討した結果、精子形成過程の後期に正常の精子がほとんど認められなかった (MCB, Fig. 4)。また、Pol λ ノックアウトマウスの精子頭部を顕微受精することにより正常に仔が生まれたことより、減数分裂には異常がないと考えられた。以上の結果より、Pol λ ノックアウトマウスの精子は鞭毛の運動異常を示し、その結果として不妊であると考えられた。

(4) Pol λ は細胞増殖及び DNA 損傷における DNA 修復には必須ではない

細胞増殖及び DNA 修復における Pol λ の機能を検討するために、Pol λ 欠損 ES 細胞を樹立した。Pol λ 欠損 ES 細胞は増殖及び見かけ上も野性型と比べて異常は認められなかった。電離放射線・UV・酸化ストレス・アルキル化剤に対する感受性を検討したが、野性型と同様であった。以上の結果から、Pol λ は塩基除去修復・ヌクレオチド除去修復・相同組換えなどの DNA 修復には必須でないことが明らかになった (MCB, Fig. 5)。

D. 結論

1. 虫寿命関連遺伝子 Daf-16 の哺乳類ホモログ FOXO ファミリーが、筋細胞分化において IGF-PI3K-Akt/PKB シグナルによってリン酸化され不活性化されていることが筋細胞分化の開始、維持・成熟に必須であることが明らかになった。この知見は、高齢者の寝たきりの原因となる筋萎縮(廃用性筋萎縮症)に対する予防・治療などへの応用が期待される。また、間葉系幹細胞分化において C/EBP α 等の遺伝子発現を誘導し、筋細胞分化・骨芽細胞分化を抑制し、脂肪細胞分化への commitment を行っている可能性を示した。脂肪細胞は肥満等エネルギー代謝と密接に関わっており、高齢者の生活習慣病の発症メカニズムを明らか

にするための貴重な知見となると考えられる。

2. FOXO ファミリーが酸化ストレスなどの成体ストレスに応答して、ストレス応答性遺伝子で細胞周期停止・DNA修復やストレス耐性を獲得するような遺伝子の発現を制御していることを明らかにした。種々の長寿命を示す変異動物ではストレス抵抗性を示すことが知られているが、本研究で開発した FKHRL1 loss-of-function 及び gain-of-function マウスは、今後成体ストレスと寿命及び老年病発症との関係を明らかにするための有用なモデルマウスとなると考えられる。

3. 早期老化症 AT の原因遺伝子の下流で働く Chk2 は、がん抑制遺伝子産物 p53 の機能を p53 タンパクの安定化のみならず転写活性を制御していることが明らかになった。p53 は細胞老化さらに個体老化との関係が報告されており、Chk2 ノックアウトマウスも同様に有用なモデルマウスとなると考えられる。

4. Pol λ ノックアウトマウスは生後ドーム型の頭部を特徴とする水頭症を発症し、9 週齢までに約 70% が死亡する。脳室上

衣細胞の繊毛において inner dynein arm が欠損しておりその結果として繊毛不動性となる。Pol λ ノックアウトマウスは immotile cilia syndrome のモデルマウスとして有用であると考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

Kobayashi Y, Watanabe M, Okada Y, Sawa H, Takai H, Nakanishi M, Kawase Y, Suzuki H, Nagashima K, Ikeda K, Motoyama N. Hydrocephalus, Situs Inversus, Chronic Sinusitis, and Male Infertility in DNA Polymerase λ -Deficient Mice: Possible Implication for the Pathogenesis of Immotile Cilia Syndrome. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 2769-2776, 2002.

本山昇. 細胞周期チェックポイント制御因子 Chk1 と Chk2. *分子細胞治療*, **2** (5): 543-545, 2001.

Takai H, Naka, K, Okada Y, Watanabe M, Harada N, Saito S, Anderson CW, Appella E, Nakanishi M, Suzuki H, Nagashima K, Sawa H, Ikeda K, Motoyama N. Chk2-deficient mice exhibit increased resistance to ionizing radiation and defective p53-mediated

transcription. 2002, submitted.

Yoshida-Araki K, Furukawa-Hibi Y, Ikeda K, Motoyama N. Blockage and Reversal of Myogenic Differentiation by A Constitutively Active Form of Forkhead Transcription Factor AFX. 2002, submitted.

Furukawa-Hibi Y, Yoshida-Araki K, Ohta T, Ikeda K, Motoyama N. Forkhead transcription factor AFX regulates stress activate gene GADD45 in response to oxidative stress. 2002, submitted.

2. 学会発表

Yoshida-Araki K, Ikeda K and Motoyama N. Forkhead transcription factor AFX induces cell cycle arrest at G1/S and G2/M phases. The Salk Institute, The Cell Cycle Meeting. La Jolla, CA, USA, Jun 22-26, 2001.

小林洋介、渡部美穂、岡田由紀、高井裕之、澤 洋文、鈴木宏志、中西 真、長嶋和郎、池田恭治、本山 昇. DNA Polymerase λ KO マウスは Kartagener 症候群類似の病態を示す 第 38 回日本臨床分子医学会学術総会 8 月 2 日-3 日 札幌

Naka K, Ikeda K and Motoyama N. Recruitment of NBS1 into PML oncogene domains via interaction with SP100 protein. Keystone Symposia, Genomics and Genetics of Senescence and Cancer. Keystone, CO, USA, Jan 22-27, 2002.

日比陽子、荒木聖美、池田恭治、本山 昇. マウス筋芽細胞 C2C12 の分化および脱分化におけるフォークヘッド型転写因子 AFX の機能解析 日本分子生物学会第 24 回年会 12 月 9 日-12 日 横浜

高井裕之、渡部美穂、原田直樹、岡田由紀、澤 洋文、青木秀年、鈴木宏志、中西 真、長嶋和郎、池田恭治、本山 昇. p53 の安定化と機能制御における Chk2 の役割 日本分子生物学会第 24 回年会 (ワークショップ) 12 月 9 日-12 日 横浜

小林洋介、渡部美穂、岡田由紀、澤 洋文、高井裕之、中西 真、鈴木宏志、長嶋和郎、池田恭治、本山 昇. DNA polymerase λ KO マウスは繊毛形成不全により水頭症、内臓逆位、不妊といった immotile cilia syndrome の病態を示す 日本分子生物学会第 24 回年会 12 月 9 日-12 日 横浜

Naka K, Ikeda K, Motoyama N. Recruitment
of NBS1 into PML oncogenic domains
(PODs) via interaction with Sp100 protein
日本分子生物学会第 24 回年会 12 月 9 日
-12 日 横浜

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

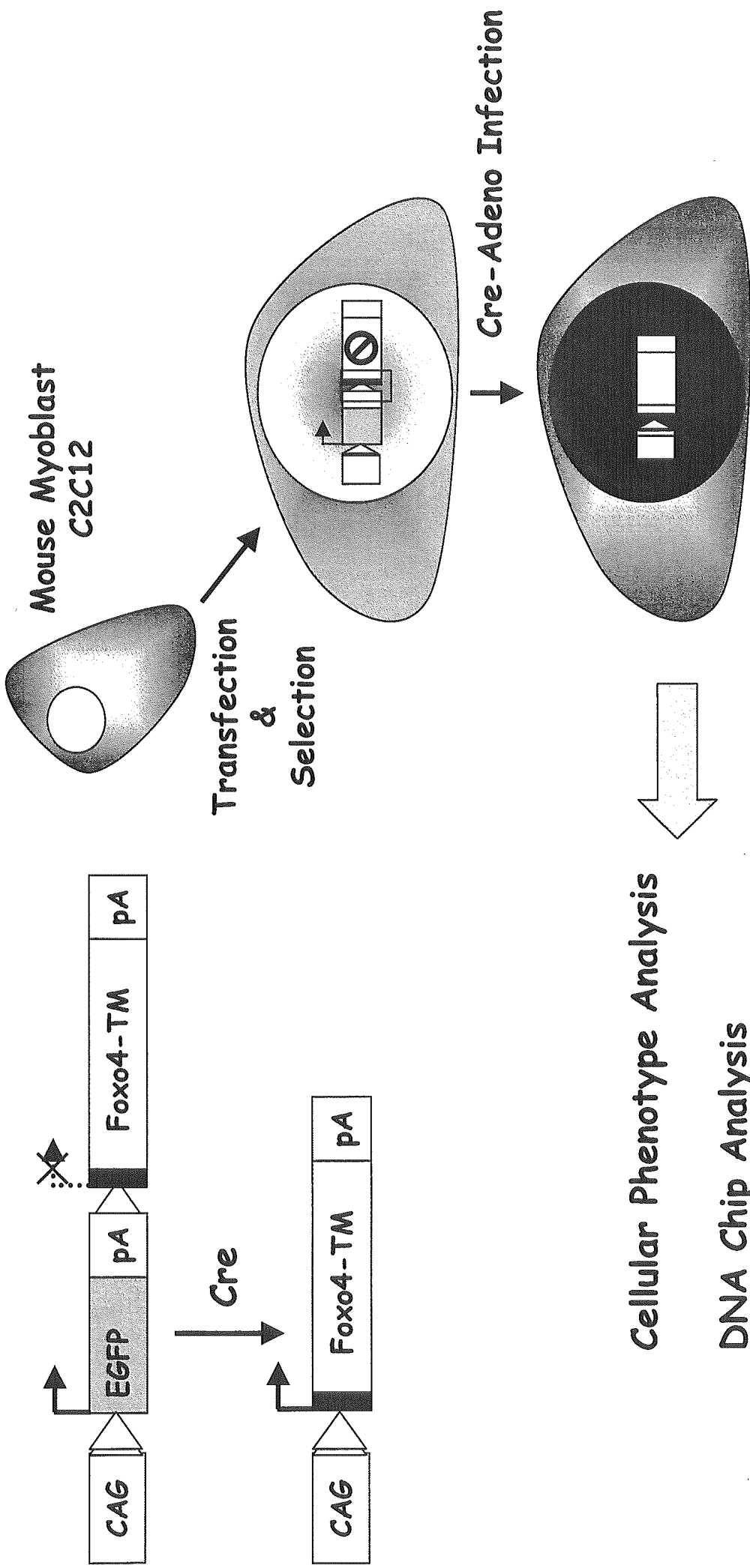
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

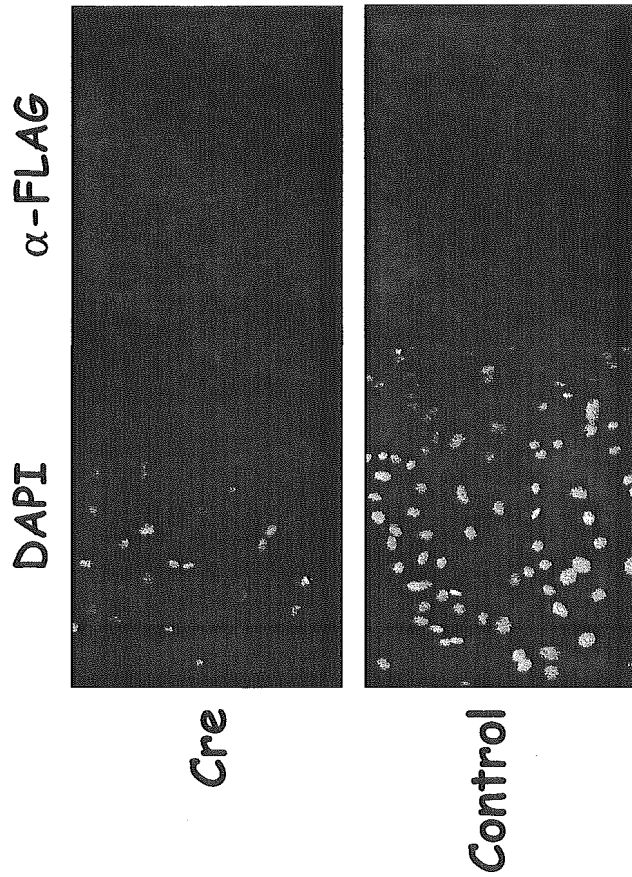
Cre/loxP Mediated Inducible Expression System



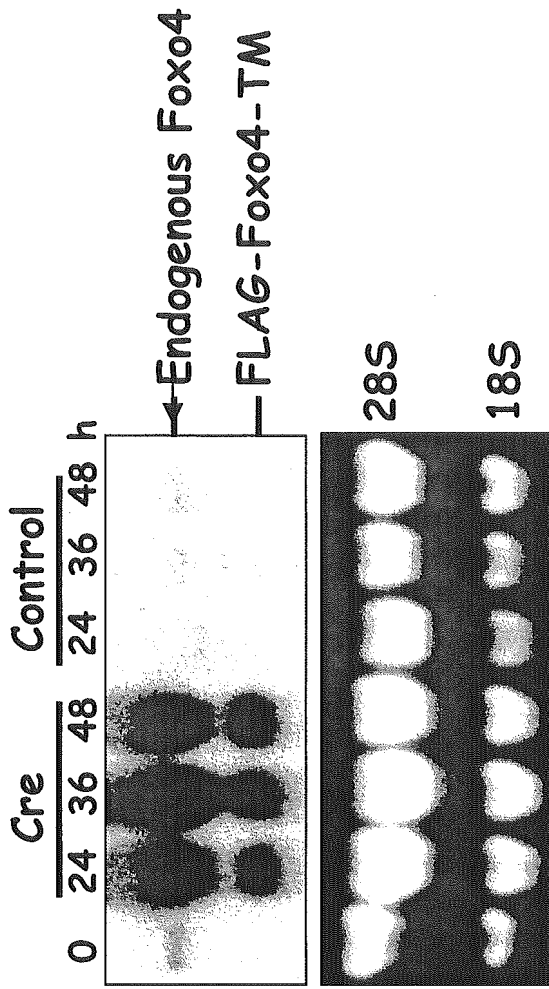
(1)

Cre/loxP-Mediated Inducible Expression of Foxo4-TM

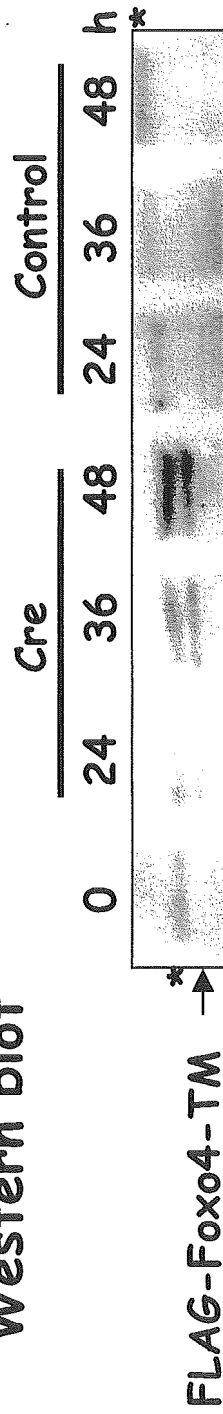
Cell Staining



Northern blot



Western blot



(图2)

Requirement of PI-3K/Akt Pathway for Myogenesis in C2C12

