

methyglyoxal 等) を用いた。これらの因子を細胞に作用させた後、細胞表面の GPI アンカー膜蛋白や膜貫通蛋白の細胞表面における動態を、蛍光抗体法等によって膜蛋白とラフトを 2 重染色した後、蛍光顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。また、細胞内で行われる活性酸素の量は hydroethidine の酸化により発光する蛍光を指標としてフローサイトメーターで測定した。

受容体型チロシンキナーゼ (RET 等) と非受容体型チロシンキナーゼ (Src 等) の活性を試験管内キナーゼアッセイにより、また、アポトーシスの誘導にかかわるカスパーゼの発現レベルと活性を SDS-PAGE とウエスタンブロット法で測定した。

酸化ストレスシグナルにおけるラフトの関与の有無を調べるため、ラフトの主要成分の一つであるコレステロールを除去したり不活性化したりする β -cyclodextrin, filipin または nystatin を細胞に作用させてラフトを破壊し、その影響を解析した。

C. 研究結果

重金属ストレスやカルボニルストレスを T リンパ球やヒト T 細胞性白血病細胞等に作用させると、細胞表面の GPI-アンカー膜蛋白が架橋され、ラフトともども凝集することを認めた。GPI アンカーの凝集は、薬物でラフトを破壊すると消失したことから、重金属やカルボニル化合物による直接的な化学結合とともにラフト

の働きに依存すると考えられた。重金属等による細胞表面蛋白とラフトの凝集に伴って細胞内に活性酸素が産生されることを認めた。この活性酸素の産生も、重金属等を作用させるのに先立ってラフトを破壊しておくこと消失したことから、ラフトに依存することが判明した。重金属等を細胞に作用させると、一方で受容体型および非受容体型のチロシンキナーゼがキナーゼドメインの特定のシステインを標的とする構造修飾によって活性化するとともに、カスパーゼの活性化や DNA の断片化を伴って細胞のアポトーシスが誘導された。このいずれも還元活性を持つ cysteine や N-acetylcysteine を重金属等やカルボニル化合物に先立って作用させると阻止されたこと等から、いずれに対してもラフトに依存してつくられる活性酸素がセカンドメッセンジャーとして働くことが示唆された。

D. 考察

本年度は、酸化ストレスとカルボニルストレスが細胞の表面に作用して細胞表面蛋白を化学修飾してシグナルを起動する機序において、細胞膜のコレステロールに富むマイクロドメインであるラフトの働きと、その働きに依存してつくられる活性酸素がセカンドメッセンジャーとして重要であることを明らかにした。近年、細胞表面の受容体とリガンドが結合して起動するシグナル伝達に細胞膜

ラフトが、シグナル伝達分子のプラットフォームとして重要な働きをすることが知られてきている。また、炎症性のサイトカインや増殖因子が受容体に作用すると、細胞内に活性経路を利用すること、さらに、その経路でラフトに依存して活性酸素の産生が誘導され、この活性酸素がチロシンキナーゼの活性化とアポトーシス誘導のセカンドメッセンジャーとなるという考え方を示した。加齢に伴って細胞に反復作用する酸化ストレスとカルボニルストレスによって細胞表面でストレスシグナルが起動するの新しい機序となると考える。

E. 結論

重金属による酸化ストレスとカルボニルストレスのモデルにおいて、これらのストレスが細胞表面に作用すると、ラフトの働きに依存して細胞表面蛋白が架橋されてラフトとともに凝集すること、それに伴ってラフトの働きに依存して活性酸素の産生が誘導されること、産生された活性酸素はセカンドメッセンジャーとしてチロシンキナーゼの酸化的構造修飾による活性化とアポトーシス誘導シグナルを起動することを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakashima, I., Suzuki, H., Akhand, A.A. and Kato, M.: Redox control of T cell death. *Antioxidants & Redox Signaling*, in press.
- 2) Nakashima, I., Kato, M., Akhand, A.A., Suzuki, H., Takeda, K., Hossain, K. and Kawamoto, Y.: Redox-linked signal transduction pathway for protein tyrosine kinase activation. *Antioxidants & Redox Signaling*, in press.
- 3) Akhand, A.A., Du, J., Liu, W., Hossain, K., Miyata, T., Nagase, F., Kato, M., Suzuki, H. and Nakashima, I.: Redox-linked cell surface-oriented signaling for T-cell death. *Antioxidants & Redox Signaling*, in press.
- 4) Kamei, K., Nimura, Y., Nagino, M., Aono, K. and Nakashima, I.: Surgical stress reduces mortality from endotoxin shock, *Langenbeck's Archives of Surgery*, in press.
- 5) Akhand, A.A., Hossain, K., Kato, M., Miyata, T., Du, J., Suzuki, H., Kurokawa, K. and Nakashima, I.: Glyoxal and methylglyoxal induce aggregation and inactivation of ERK in human endothelial cells. *Free Radical Biol. & Med.* 31:20-30, 2001.
- 6) Dai Y, Kato M, Takeda K, Kawamoto Y, Akhand AA, Hossain K, Suzuki H, Nakashima I. T-cell-immunity-based inhibitory effects of orally administered herbal medicine juzen-taiho-to on the growth of primarily developed melanocytic tumors in RET-transgenic

- mice. *J Invest Dermatol.* 117:694-701, 2001.
- 7) Liu, W., Kato, M., Itoigawa, M., Murakami, H., Yajima, M., Wu, J., Ishikawa, N. and Nakashima, I.: Distinct involvement of NF-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase pathways in serum deprivation-mediated stimulation of inducible nitric oxide synthase and its inhibition by 4-hydroxynonenal. *J. Cell. Biochem.* 83:271-280, 2001.
- 8) Du, J., Suzuki, H., Nagase, F., Akhand, A.A., Ma, Z., Yokoyama, T., Miyata, T. and Nakashima, I.: Superoxide-mediated early oxidation and activation of ASK1 are important for initiating methylglyoxal-induced apoptosis process. *Free Rad. Biol. Med.* 31:469-478, 2001.
- 9) Akhand, A.A., Hossain, K., Mitsui, H., Kato, M., Miyata, T., Inagi, R., Du, J., Takeda, K., Kawamoto, Y., Suzuki, H., Kurokawa, K. and Nakashima, I.: Glyoxal and methylglyoxal trigger distinct signals for MAP family kinases and caspase activation in human endothelial cells. *Free Rad. Biol. Med.* 31:20-30, 2001.
- 10) 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.* 3:473-482, 2001.
- 11) Takeuchi, K., Kato, N., Suzuki, H., Akhand, A.A., Wu, J., Hossain, K., Miyata, T., 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.* 81: 679-688, 2001.
2. 学会発表
- 1) Hossain, K., Nakashima, I. et al.: Arsenite triggers a redox-linked Akt pathway in a membrane raft-dependent way. 第31回日本免疫学会総会、大阪、2001
- 2) Akhand, A.A., Nakashima, I. et al.: 1,4-butanediyl-bis methanethiosulfonate (BMTS) induces apoptosis of murine T lymphocytes accompanying aggregation of membrane rafts and ROS production. 第31回日本免疫学会総会、大阪、2001
- 3) Akhand A. A., Nakashima I. et al.: Glyoxal and methylglyoxal trigger distinct signals for MAP family kinases and caspase activation in human endothelial cells. The 11th International Congress of Immunology, Stockholm, July 22-27, 2001.
- 4) 川本善之、中島泉等：細胞膜脂質ラフトにおける酸化ストレスによるチロシンキナーゼの活性化と機序。第31回日本免疫学会総会、大阪、2001
- 5) Hossain, K., Nakashima I. et al.: Arsenite triggers membrane rafts-linked apoptotic and anti-apoptotic signals. the

11th International Congress of Immunology , Stockholm, July 22-27, 2001.

6) Nakashima I: Oxidative stress and protein tyrosine kinase activation. ICRO International Symposium: Molecular aspects of modern biology, Shanhai, China, Lecture Hall on Campus in 320 Yue Yang Road, 20 April (Friday), 2001

7) Nakashima, I et al.: Melanoma deveopment in RET-transgenic mice. The Fifth World Conference on Melanoma, Venice, Feb. 28-Mar. 3, 2001.

分担研究報告書

老化における抗酸化酵素の破綻およびその防御機構

分担研究者

谷口直之 (大阪大学大学院 教授)

研究要旨 血管平滑筋や血管内皮細胞は酸化ストレスに抵抗性を有することが知られている。今回、血管平滑筋細胞の、NOにより引き起こされる酸化ストレスに対する耐性メカニズムを検討した。NOは平滑筋細胞において濃度、時間依存的にHB-EGFの発現を誘導した。そのメカニズムを検討した結果、NOは細胞内のGPx活性を阻害し、細胞内の過酸化水素濃度を上昇させ、それがシグナルとなりJNKやAP-1を活性化し、HB-EGFが誘導されることが明らかとなった。さらに、NOにより誘導されるHB-EGFは抗アポトーシス作用を有し、細胞死に対する防御因子として機能していることも明らかとなった。以上のことから血管平滑筋細胞は、細胞内のレドックス状態を変化させ、細胞の生存、維持に重要な遺伝子の発現を調節していることが示唆された。さらにこれらの酸化ストレスに対する防御機構の破綻は、老化を促進する可能性が考えられる。

A. 研究目的

酸素は生体にとって有用なものであるが、その反応副産物として活性酸素が発生する。生体には、これらを消去する抗酸化酵素や低分子抗酸化物質が存在しホメオスタシスを保っている。しかし活性酸素種、活性窒素種の産生が消去系を凌駕した場合、いわゆる酸化ストレスが引き起こされ、老化や様々な病態に関与することが知られている。一方、活性酸素種、活性窒素種の標的細胞である血

管内皮細胞や血管平滑筋細胞は酸化ストレスに対して抵抗性を有することが知られているがそのメカニズムは明らかとなっていない。我々の研究室では、メチルグリオキサール(MG)や3-デオキシグルコソン(3-DG)等のジカルボニル化合物が、平滑筋細胞において抗酸化酵素の一つであるグルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)を不活化し、細胞内の過酸化水素濃度を上昇させ、それがシグナルとなりEGFファミリーの一つである

heparin binding EGF (HB-EGF)の発現を誘導することを報告した。そこで本年は血管平滑筋細胞において、活性窒素 NO による酸化ストレスに対しても HB-EGF の発現が誘導されることを見出し、その誘導メカニズムおよび生理的意義を検討した。

B. 研究方法

血管平滑筋はラット大動脈から単離、初代培養したものをを用い、NO ドナーとして SNAP を用いた。SNAP 処理後、細胞より RNA を抽出し、ラット HB-EGF cDNA をプローブとしてノーザンブロットングを行った。また細胞抽出液を SDS-PAGE 後、c-Jun のモノクローナル抗体を用いてウエスタンブロットングを行った。細胞内の過酸化物の測定は蛍光指示薬 H₂DCF-DA を用い、FACS にて解析した。Mammalian expression vector に組み込まれた JNK の wild type および dominant negative は、LipofectAMINE を用いて平滑筋細胞に導入し、強制発現させた。アポトーシスの検出は、DNA ladder、DAPI 染色、propidium iodide 染色を用いて行った。

C. 研究結果

血管平滑筋細胞を 0-100 μ M の SNAP で刺激すると、0.1 μ M の低濃度から HB-EGF mRNA が誘導され、濃度、

時間依存的に HB-EGF mRNA が誘導された。以前我々の研究室では NO により抗酸化酵素 GPx が不活化されることを報告しており、SNAP 添加によって平滑筋細胞の GPx 活性が低下するか否かを検討した結果、GPx 活性はコントロールの 71.2%に、有意に低下していた。GPx の活性低下に伴い細胞内の過酸化物も有意に増加していた。過酸化水素を代謝するカタラーゼや N-acetylcysteine の添加により、HB-EGF の誘導が抑制されることから、細胞内に増加した過酸化水素がシグナルとなり、HB-EGF が誘導されることが示唆された。HB-EGF のプロモーター領域に AP-1 site が存在することが報告されていることから、JNK1/c-Jun の活性化を検討した。SNAP 添加後 30 分より c-Jun の発現が上昇した。また c-Jun/AP-1 のインヒビターである curcumin は NO による HB-EGF の発現誘導を抑制した。さらに SNAP 添加後 30 分より JNK が活性化された。JNK1 の dominant negative (T183A/Y185F)を平滑筋細胞に導入した結果、HB-EGF の誘導は抑制された。以上のことから JNK1/c-Jun の活性化を介して HB-EGF が誘導されることが明らかとなった。次に誘導される HB-EGF のアポトーシスに対する影響を検討した。TNF- α + actinomycin (AcD)を平滑筋細胞に添加

すると、アポトーシスが誘導されるが、SNAP を15時間前に処理するとアポトーシスは抑制された。また血清除去による平滑筋細胞の viability の低下は、SNAP 添加により抑制されたが、HB-EGF の antisense oligonucleotide の添加により viability はさらに低下した。以上のことから SNAP により誘導される HB-EGF は平滑筋細胞において抗アポトーシス作用があることが明らかとなった。

D. 考察

今回の結果から、NO は平滑筋細胞において、GPx 活性を阻害し細胞内の過酸化水素濃度を上昇させる。それがシグナルとなり、JNK1/c-Jun を活性化し、抗アポトーシス作用を有する HB-EGF を発現誘導することが明らかとなった。以前我々の研究室では、老化とともに濃度が上昇するジカルボニル化合物によっても、GPx の活性阻害を介して HB-EGF が誘導されることを報告した。以上のことを考えあわせると、血管平滑筋は酸化ストレスに対して、細胞の生存、維持に重要な遺伝子の発現を誘導することで、酸化ストレスに対する抵抗性を発揮すると考えられる。また、このような酸化ストレスに対する防御メカニズムが破綻した場合は、老化を促進する可能性が考えられる。

E. 結論

血管平滑筋細胞の、過酸化水素をシグナルとし JNK1/c-Jun の活性化を介した HB-EGF の発現誘導は、酸化ストレス耐性メカニズムの一つと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. T. Fujii, J. Fujii and T. Taniguchi: Augmented expression of peroxiredoxinVI in rat lung and kidney after birth implies an antioxidative role. , *Eur. J. Biochem.*, 268, 218-224, 2001.
2. N. Fujiwara, T. Fujii, J. Fujii and N. Taniguchi: Roles of n-terminal active cysteines and c-terminal cysteine-selenocysteine in the catalytic mechanism of mammalian thioredoxin reductase. , *J. Biochem.*, 129, 803-812, 2001.
3. K. Hisamoto, M. Ohmichi, H. Kurachi, J. Hayakawa, Y. Kanda, Y. Nishio, K. Adachi, K. Tasaka, E. Miyoshi, N. Fujiwara, N. Taniguchi and Y. Murata: Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. , *J. Biol. Chem.*, 3459-3467, 2001.

4. K. Hisamoto, M. Ohmichi, Y. Kanda, K. Adachi, Y. Nishio, J. Hayakawa, S. Mabuchi, K. Takahashi, K. Tasaka, Y. Miyamoto, N. Taniguchi and Y. Murata: Induction of endothelial nitric oxide synthase phosphorylation by the raloxifene analog LY117018 is differentially mediated by Akt and extracellular signal-regulated protein kinase in vascular endothelial cells. , J. Biol. Chem., in press, 2001.

5. Y. H. Koh, K. Suzuki, W. Che, Y. S. Park, Y. Miyamoto, S. Higashiyama and N. Taniguchi: Inactivation of glutathione peroxidase by NO leads to the accumulation of H₂O₂ and the induction of HB-EGF via c-Jun NH₂-terminal kinase in rat aortic smooth muscle cells. , FASEB J., 1472-1474, 2001.

6. Y. H. Koh, W. Che, S. Higashiyama, M. Takahashi, Y. Miyamoto, K. Suzuki and N. Taniguchi: Osmotic Stress Induces HB-EGF Gene Expression via Ca²⁺/Pyk2/JNK Signal Cascades in Rat Aortic Smooth Muscle Cells. , J. Biochem., 130, 351-358, 2001.

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)

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。本年度はサブタイプ間で神経細胞に対する作用が異なるかどうかを混合培養系を用いて検討した。その結果、刺激して活性化されたミクログリアには神経保護作用を示すものと傷害された神経の細胞死を促進するものがあることがわかった。このとき両者のミクログリアでの ROS の産生量が大きく異なることがわかった。さらに、神経保護的に作用しているミクログリアに HIV 由来 nef 遺伝子を導入すると ROS 産生量が増大し、神経傷害作用を示すように変化することがわかった。

キーワード：ミクログリア、活性酸素、HIV 由来 nef

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。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、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。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。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。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思われる。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。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、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。

本年度はサブタイプ間で神経細胞に対する作用が異なるかどうかを混合培養系において、ROS の産生量の違いやミクログリアの機能を調節する因子に作用する遺伝子を導入したミクログリアをもちいて検討した。

B. 研究方法

1. ミクログリアの共培養での作用の解析：神経細胞死のモデルとして無血清時の N18 のアポトーシスに注目し、一次培養または株化ミクログリアの Ra2, 6-3, 6-1 と共培養したときの N18 の生存率の変化を WST 法と PI 染色による FACS 分析で無刺激およびミクログリア活性化条件で検討した。さらに N18 の細胞死に対して保護的である Ra2 に HIV 由来 nef を導入した細胞も共培養に用いた。
2. 活性酸素産生量の定量：無刺激および活性化条件での一次培養、株

化ミクログリア、nef 導入 Ra2 についてチトクローム C 法で細胞外に放出される活性酸素を測定し、細胞内活性酸素蛍光指示薬である H2DCF を用いた FACS 分析により細胞内活性酸素産生量を定量した。

C. 研究結果

Ra2 は無刺激時、刺激時において無血清によって誘導した N18 細胞死を抑制する一方、6-3, 6-1 などは促進することがわかった。さらに保護的である Ra2 に HIV 由来 nef 遺伝子を強制発現させた細胞は作用が逆転し無血清によって誘導した N18 細胞死を促進する事がわかった。このとき、活性酸素産生量は神経細胞死を促進するものでは産生量が高いことがわかった。

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害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。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と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、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し、老化促進ストレスの原因物質である活性酸素の産生システムが異なることが明らかになった。活性酸素産生量が多いミクログリアは障害を受けた神経細胞との共培養では神経細胞にとって毒性に働くが、活性酸素産生量が少ないミクログリアは反対に傷害を受けた神経細胞に保護的に働くことがわかった。また、神経細胞に保護的に働くミクログリアに HIV 由来遺伝子である *nef* を発現させると活性酸素産生量が増大すると同時に神経保護作用が無くなり、傷害神経にとって毒性に働くようになることがわかった。

我々は脳の一次培養から明確に分離できる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。

F. 研究発表

[論文発表]

- 1 Suzuki, H., Imai, F., Kanno, T., Sawada, M.: Preservation of neurotrophin expression in microglia that migrate into the gerbil's brain across the blood brain barrier. *Neurosci. Lett.* 312:95-98, 2001.
- 2 Iwata, A., Miura, S., Kanazawa, I., Sawada, M., Nukina, N.: a-Synuclein forms a complex with transcription factor Elk-1. *J. Neurochem.* 77; 239-252, 2001.
- 3 Katoh, Y., Niimi, M., Yamamoto, Y., Kawamura, T., Morimoto-Ishizuka, T., Sawada, M., Takemori, H., Yamatodani, A.: Histamine production by cultured microglial cells of the mouse. *Neurosci. Lett.* 305; 181-184, 2001.
- 4 Ishiguro, H., Yamada, K., Sawada, H., Nishii, K., Ichino, N., Sawada, M., et al (other 7 persons): Age-dependent and tissue-specific CAG repeat instability occurs in mouse knock-in for a mutant Huntington's disease gene. *J. Neurosci. Res.* 65; 289-297, 2001.
- 5 Imamura, K., Sawada, M., Ozaki, N., Naito, H., Iwata, N., Ishihara, R., Takeuchi, T., Shibayama, H.: Activation mechanism of brain microglia in patients with diffuse

neurofibrillary tangles with calcification: a comparison with Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 15; 45-50, 2001.

[新聞報道など]

1. 中日新聞 2001.11.16 第3面、脳に薬剤運ぶ細胞増殖法の開発成功 — 藤田保健衛生大の澤田教授
2. 神戸新聞 2001.11.16 第3面、脳に薬はこぶ細胞増殖 — 愛知の大学教授が開発、幹部に直接作用
3. 北海道新聞 2001.11.16 ミクログリア、運びや細胞増殖に成功 — まるでミクロの決死圏、血管通り薬剤を直接脳疾患部へ
4. 長野日報 2001.11.16 脳疾患治療に道開く、薬はこぶバイオ技術開発 — 藤田保健大澤田教授、国際特許を申請
5. 日本工業新聞 2001.11.19 脳に薬を効率運搬、藤田保健衛生大がバイオ技術、痴呆治療などに道開く

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家族性筋萎縮性側索硬化症は、変異 SOD1 による運動ニューロン変性を来すが、その病態発現機序として変異 SOD1 による aggregate 形成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。培養神経系細胞への遺伝子導入実験において、HSP は変異 SOD1 による aggregate 形成を抑制し、また変異 SOD1 による神経突起形成抑制を解除する効果を認めた。この結果は aggregate 形成が変異 SOD1 による運動ニューロン変性の病態発現機序への関与を示唆している。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は進行性に運動ニューロンに変性を来し、死に至る神経難病の一つである。その多くは孤発性(SALS)であるが、10-20%に遺伝性(FALS)を認める。遺伝性のうち約 20%のものに SOD1 遺伝子変異を認め、これらはほとんどが常染色体性優性遺伝形式を示す。主に脊髄前角運動ニューロン認められる Lewy 小体様封入体と呼ばれる変異 SOD1 タンパクより成る細胞質内の封入体はその病理学的な特徴の一つである。SOD1 変異と SOD1 活性とは必ずしも相関しないことや、常染色体性優性遺伝形式を示すことから病態発現機序として gain of a toxic function が考えられている。その病態発現機構としては、変異 SOD1 タンパクからなる aggregate を形成

することが病態形成に関与すると考えられているが、その詳細な機序は未だ解明されていない。最近の報告では変性を来す運動ニューロンで apoptosis 関連分子(caspase-1&3)の up-regulate や、apoptosis 抑制因子による FALS 動物モデルでの治療効果などが言われている。しかしながらその病理像や分子生物学的手法では典型的な apoptosis 像は明かにされていない。また FALS 動物モデルでは病理学的な変化起こる以前より運動機能低下などの臨床症状を認め、他の神経変性疾患と同様に神経機能障害が前景に立っているとも考えられている。この神経機能障害を来す原因としては神経軸索変性や軸索トランスポートの障害などがあることが既に FALS 動物モデルで明らかにされている。これらの障害は

変異 SOD1 タンパクからなる aggregate 形成が原因ではないかと考えられている。そこで我々は熱ショック蛋白により変異 SOD1 タンパクからなる aggregate 形成を抑制することで aggregate がどのように病態形成に関与するかを検討した。

B. 研究方法 Neuro2a cell line を用いた。SOD1G93A(G93A) および wild type SOD1(WT) の C 末端に GFP 遺伝子を挿入した。CMV promotor で発現される WT または G93A と共に HSP70, HSP40 の construct を co-transfection した。Transfection 後 24 時間 48 時間及び 72 時間後に固定した。TOTO-3 で核染色後、共焦点レーザーで観察した。神経突起伸展測定では 1 細胞体以上の進展を示した神経突起を保つ細胞を神経突起陽性細胞とした。細胞死判定には propidium iodide test を用い、さらに cytotoxic assay with luciferase を使った。western blot では各計測ポイントでタンパクを調整後使用し、抗 SOD1 抗体で染色した。

C. 研究結果

Transient expression assay

Neuro2a に CMV promotor で発現される WT および G93A を transient expression すると、transfection 後 48 時間後には G93A 群では transfection された細胞の約 20% に凝集体を認めるも WT 群では全く認めなかつ

た。また 72 時間後の死細胞数も G93A 群は約 30% 認めるが WT 群ほとんど認めなかった。また 48 時間後の神経突起含有細胞率は、WT 群で約 40% であるのに対して G93A 群では約 8% であった。この系に HSP70, HSP40 を単独および相互に G93A と共に co-transfection した。48 時間後の凝集体陽性率は G93A 単独群 20%, +HSP70 群 8%, +HSP40 群 16%, +HSP70/HSP40 群 2% であり HSP40 群以外では細胞内凝集体形成の減少効果を見た。特に +HSP70/HSP40 群で著明であった。しかし transfection 48, 72 時間後の死細胞数は凝集体形成の減少効果を認めた +HSP70 群および +HSP70/HSP40 群でも多少の減少傾向を認めたのみであった。一方神経突起含有細胞率では +HSP70/HSP40 群では WT 群のほぼ半分である約 20% に +HSP40 群で約 15% と改善を見た。western blot で SOD1 タンパクの発現量を見ると WT 群は内因性 SOD1 に比し約 30 倍の外来タンパクの発現を見る、同様に G93A 群は約 15 倍であった。HSP70 群, +HSP40 群, +HSP70/HSP40 群ではいずれも約 15 倍と G93A 単独群と変化はなかった。

D. 考察

この結果でわかるように、HSP は変異 SOD1 による aggregate 形成抑

制効果を持つ。また変異 SOD1 による aggregate 形成抑制を示した HSP(HSP70 及び HSP70/HSP40)は培養細胞の神経突起含有率の改善効果および細胞死抑制効果も示したことは, aggregate が変異 SOD1 による運動ニューロン変性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 は変異 SOD1 による神経細胞変性に対する治療への応用が期待されうる。

G. 研究発表

1) Kobayashi Y, Sobue G: Protective effect of chaperones on polyglutamine diseases. *Brain Res Bull*, 56(3-4): 165-8, 2001

2) Hishikawa N, Hashizume Y, Yoshida M, Sobue G: Widespread occurrence of argyrophilic glial inclusions in Parkinson's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 27(5): 362-72, 2001

3) Mori K, Koike H, Misu K, Hattori N, Ichimura M, Sobue G: Spinal cord magnetic resonance imaging demonstrates sensory neuronal involvement and clinical severity in neuronopathy associated with Sjogren's syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 71(4): 488-92, 2001

4) Yamamoto M, Li M, Mitsuma N,

Ito S, Kato M, Takahashi M, Sobue G: Preserved phosphorylation of RET receptor protein in spinal motor neurons of patients with amyotrophic lateral sclerosis: an immunohistochemical study by a phosphorylation-specific antibody at tyrosine 1062. *Brain Res*, 912(1): 89-94, 2001

5) Koike H, Misu K, Hattori N, Ito S, Ichimura M, Ito H, Hirayama M, Nagamatsu M, Sasaki I, Sobue G: Postgastrectomy polyneuropathy with thiamine deficiency. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 71(3): 357-362, 2001

6) Koike H, Mori K, Misu K, Hattori N, Ito H, Hirayama M, Sobue G: Painful alcoholic polyneuropathy with predominant small-fiber loss and normal thiamine status. *Neurology*, 56(12): 1727-1732, 2001

7) Watanabe H, Ieda T, Katayama T, Takeda A, Aiba I, Doyu M, Hirayama M, Sobue G: Cardiac (123)I-meta-iodobenzylguanidine (MIBG) uptake in dementia with Lewy bodies: comparison with Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 70(6): 781-783, 2001

8) Hashimoto Y, Niikura T, Tajima H, Yasukawa T, Sudo H, Ito Y, Kita Y, Kawasumi M, Kouyama K, Doyu M, Sobue G, Koide T, Tsuji S, Lang J, Kurokawa K, Nishimoto I: A rescue factor abolishing neuronal cell death

- by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and A_β. Proc Natl Acad Sci U S A, 98(11): 6336-41, 2001
- 9) Yamamoto M, Ito Y, Mitsuma N, Li M, Hattori N, Sobue G: Pathology-related differential expression regulation of NGF, GDNF, CNTF, and IL-6 mRNAs in human vasculitic neuropathy. Muscle & Nerve, 24(6): 830-833, 2001
- 10) Adachi H, Kume A, Li M, Nakagomi Y, Niwa H, Do J, Sang C, Kobayashi Y, Doyu M, Sobue G: 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, 10(10): 1039-1048, 2001
- 11) Niwa J, Ishigaki S, Doyu M, Suzuki T, Tanaka K, Sobue G: A novel centrosomal ring-finger protein, dorfin, mediates ubiquitin ligase activity. Biochem Biophys Res Commun, 281(3): 706-13, 2001
- 12) Doyu M, Sawada K, Mitsuma N, Niwa J, Yoshimoto M, Fujii Y, Sobue G, Kato K: Gene expression profile in Alzheimer's brain screened by molecular indexing. Brain Res, Mol Brain Res, 87(1): 1-11, 2001
- 13) Takeda A, Wakai M, Niwa H, Dei R, Yamamoto M, Li M, Goto Y, Yasuda T, Nakagomi Y, Watanabe M, Inagaki T, Yasuda Y, Miyata T, Sobue G: Neuronal and glial advanced glycation end product [Nepsilon-(carboxymethyl)lysine]] in Alzheimer's disease brains. Acta Neuropathol (Berl), 101(1): 27-35, 2001
- 14) Qiao S, Iwashita T, Furukawa T, Yamamoto M, Sobue G, Takahashi M: Differential effects of leukocyte common antigen-related protein on biochemical and biological activities of RET-MEN2A and RET-MEN2B mutant proteins. J Biol Chem, 276(12): 9460-7, 2001
- 15) Ochi K, Nozaki H, Tanaka F, Kato S, Fukuzawa R, Sobue G, Fukuchi Y, Toyama Y, Hata J, Umezawa A: Specific bisulfite modification of CTG triplet repeats of the androgen receptor gene, a gene associated with the triplet repeat disease. X-linked spinal and bulbar muscular atrophy (Kennedy disease). Neurosci Res Commun, 28(1): 1-10, 2001
- 16) Kobayashi Y, Takeuchi H, Li M, Doyu M, Ohtsuka K, Sobue G: Amelioration of motor neuron disease model with molecular chaperones with special reference to spinal and bulbar muscular atrophy. Molecular Mechanism and Therapeutics of Amyotrophic Lateral Sclerosis, 307-316, 2001
- 17) Ikeda S, Nakazato M, Ando Y,

Sobue G: Familial transthyretin type amyloid polyneuropathy in Japan: clinical and genetic heterogeneity.

Neurology, in press, 2002

18) Mori K, Hattori N, Sugiura M, Koike H, Misu K, Ichimura M, Hirayama M, Sobue G: Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy presenting with features of GBS. Neurology, in press, 2002

19) Yamamoto M, Ito Y, Mitsuma N, Li M, Hattori N, Sobue G: Parallel expression of neurotrophic factors and their receptors in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. Muscle & Nerve, in press, 2002

20) Yoshihara T, Ishigaki S, Yamamoto M, Liang Y, Niwa J, Takeuchi H, Doyu M, Sobue G: Differential expression of inflammation- and apoptosis-related genes in spinal cord of a mutant SOD1 transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. J Neurochem, in press, 2002

21) Watanabe H, Saito Y, Terao S, Acta Neuropathol, in press, 2002

Ando T, Kachi T, Mukai E, Aiba I, Abe Y, Tamakoshi A, Doyu M, Hirayama M, Sobue G: Progression and prognosis in multiple system atrophy: An analysis of 230 Japanese patients. Brain, in press, 2002

22) Hideyuki Takeuchi, Yasushi Kobayashi, Tsuyoshi Yoshihara, Jun-ichi Niwa, Manabu Doyu, Kenzo Ohtsuka, Gen Sobue: Hsp70 and Hsp40 improve neurite outgrowth and suppress intracytoplasmic aggregate formation in cultured neuronal cells expressing mutant SOD1. Brain Res, in press, 2002

23) Iwai K, Yamamoto M, Yoshihara T, Sobue G: Anticipation in familial amyotrophic lateral sclerosis with SOD1-G93S mutation. J Neurol Neurosurg Psychiatry, in press, 2002

24) Dei R, Takeda A, Niwa H, Li M, Nakagaomi Y, Watanabe M, Inagaki T, Washimi Y, Yasuda Y, Horie K, Miyata T, Sobue G: Lipid peroxidation and advanced glycation endproducts in the brain in normal aging and in Alzheimer's disease. Acta Neuropathol, in press

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。ウイルス感染を初めとする様々なストレスを受けた際に、インターフェロン（IFN）- α/β の転写が誘導される。IFN 転写誘導に関わる転写因子としての IRF-7 に注目し、IRF-7 欠損マウスを作製し解析した。IRF-7 欠損マウスはウイルス感染に対する IFN の産生が著しく減弱していた。更に、獲得免疫系の異常も認められ、抗原特異的抗体産生が著しく低下しており、また病原体関連分子刺激時の樹状細胞の活性化も減弱していた。IRF-7 は IFN α/β シグナルを制御することにより、病原体感染ストレスに対する免疫系の誘導において、重要な役割を果たしていると考えられた。

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 IFN- α/β 転写を制御する IRF-7 欠損マウスにおける異常を検索する。

B. 研究方法

1、IRF-7 欠損マウスは通常のノックアウトマウス作製法で作製した。
2、免疫学的検索；抗原特異的抗体産生応答は、TNP-KLH を CFA と共に皮下に注射後、8 日目の血清を回収し、ELISA で抗体価を検討した。樹状細胞は、骨髓細胞を GM-CSF 下で培養する事で得た。病原体関連分子で刺激後、FACS にて MHC 分子や B7 分子の発現を解析した。また、

樹状細胞の T 細胞活性化能は、allogeneic T 細胞に対する増殖誘導能で検索した。

（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。

C. 研究結果

1. IRF-7 欠損マウス (IRF-7^{-/-}) 由来の胎児線維芽細胞の、ウイルス感染に対する IFN 産生能を Northern blot 解析で検討した。IRF-7^{-/-} 由来胎児線維芽細胞は、予想通り IFN- α の発現は全く認められず、 β 産生は著しく低下していた。

2. さらに IRF-7 の獲得免疫系における役割を検討するため、抗原特異

的抗体産性能を検討した。TKP-KLH を皮下に注射後、8日目に血清を回収し IgM, IgG1, IgG2a, IgG2, IgG3 の抗体価を検討した。IRF-7^{-/-} マウスにおいては、IgM の抗体価は野生型マウスと同程度であったものの、IgG サブクラスのいずれも、野生型マウスと比べて著しく低いことが解った。

3. 様々なストレスに対し獲得免疫系の発動に関わると考えられている樹状細胞に機能異常があると予測し、病原体関連分子刺激時における樹状細胞の活性化能を検討した。IRF-7^{-/-} マウス由来樹状細胞は、LPS を初めとする様々な病原体関連分子いずれに対しても、野生型マウスで見られるような MHC class II や B7 の発現増強が認められなかった。従って、IRF-7 は IFN α/β シグナルを制御することにより、ストレスに対する生体防御において重要な役割を果たしていると考えられた。

D. 考察

IRF-7 は IFN- α/β の転写を制御することで、病原体感染に対する生体の応答が保たれているが、IRF-7 が欠損することで、IFN α/β シグナルが活性化されず、免疫応答が適切に誘導できないと考えられる。

E. 結論

IRF-7^{-/-} マウスはウイルス感染に対する IFN- α/β の転写誘導が十分に起こらない。また、IRF-7 欠損により、抗原提示細胞の活性化に異常が生じ、抗体応答が適切に起こらなくなる。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

論文発表

1. Taniguchi T, Takaoka A.; The interferon-alpha/beta system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. (2002) *Curr. Opin Immunol.*, 14, 111-6
2. Sato K, Hida S, Takayanagi H, Yokochi T, Kayagaki N, Takeda K, Yagita H, Okumura K, Tanaka N, Taniguchi T, Ogasawara K; Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta. (2001) *Eur J Immunol.*, 31, 3138-46.
3. Mitani Y, Takaoka A, Kim SH, Kato Y, Yokochi T, Tanaka N, Taniguchi T.; Cross talk of the interferon-alpha/beta signalling complex with gp130 for effective interleukin-6 signalling. (2001) *Genes Cells*, 6, 631-40.
4. Hata N, Sato M, Takaoka A, Asagiri M, Tanaka N, Taniguchi T.; Constitutive IFN-alpha/beta signal for efficient IFN-alpha/beta gene induction by virus. (2001) *Biochem Biophys Res Commun.* 285, 518-25.
5. Nakaya T, Sato M, Hata N, Asagiri M, Suemori H, Noguchi S, Tanaka N, Taniguchi T.; Gene induction pathways

mediated by distinct IRFs during viral infection. (2001) *Biochem Biophys Res Commun.*, 283, 1150-6.

6. Taniguchi T, Takaoka A.; A weak signal for strong responses: interferon-alpha/beta revisited. (2001) *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2, 378-86.

7. Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, Tanaka N.; IRF family of transcription factors as regulators of host defense. (2001) *Annu Rev Immunol.*, 19, 623-55.

学会発表

日本分子生物学会年会（パシフィコ横浜）2001年12月10日

「病原体由来分子による IRF3 および IRF7 を介した IFN- α / β 発現誘導とその意義」

本田賢也、朝霧成挙、高岡晃教、谷口維紹