

厚生科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

加齢に伴う多臓器障害発症機序と予防に関する基礎的研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 丸山 直記

平成14（2002）年3月

## 目 次

### I. 総括研究報告

- 加齢に伴う多臓器障害発症機序と予防に関する基礎的研究・・・・・・・・・・ 1  
丸山直記

### II. 分担研究報告書

1. 加齢指標蛋白質 SMP30 と多臓器障害発症機序に関する基礎的研究・・・・・・・・ 6  
丸山 直記
2. 加齢臓器障害発症因子の分子解析と創薬の基礎的研究・・・・・・・・・・ 31  
後藤 佐多良
3. 血管作動性分子と臓器障害・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 35  
下澤 達雄

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

加齢に伴う多臓器障害発症機序と予防に関する基礎的研究

主任研究者 丸山 直記 東京都老人総合研究所・分子病理部門・研究部長

研究要旨 高齢者疾患の背後にある生体機能低下や障害のメカニズムを分子病理学的に解析した。SMP30の減少や欠損は細胞外からの種々の傷害に対して抵抗性が低下する原因となる。特にSMP30が細胞膜カルシウムポンプ活性に必須な分子であり、その欠損は細胞膜およびミトコンドリア膜の障害を誘導する。その結果ミトコンドリア機能不全が発生し細胞機能あるいは臓器機能の低下が誘導され高齢者が疾病を罹患した場合の予後を悪化させる。この分子は酸化ストレスによりその発現が抑制されることからカロリー制限食により発現を維持あるいは亢進することにより老化を遅延させる可能性が明らかとなった。臓器障害の指標として蛋白質の酸化修飾（カルボニル化）を種々の組織蛋白質について解析した結果、高齢の腎臓において顕著な増加を認めた。尿中のアルブミンの酸化修飾は血漿中のアルブミンに比べて2倍以上のカルボニル化が認められた。この結果は加齢に伴い発症する腎臓障害が蛋白質に対する酸化傷害により惹起されている可能性を示唆している。アドレノメデュリンは細胞の増殖を抑制する機能を持つことを証明し、結果的に細胞底質作用を持つ分子であることがわかった。以上の結果から加齢臓器障害を予防する技術開発の基礎的知見が得られた。

【研究組織】

分担研究者

丸山直記 東京都老人総合研究所・  
分子病理部門・研究部長  
佐藤信紘 順天堂大学医学部・内科学・  
教授  
長田道夫 筑波大学医学専門群・  
病理学・助教授  
後藤佐多良 東邦大学薬学部・生化学・  
教授  
下澤達雄 東京大学医学部・  
臨床検査医学・助手

A. 研究目的

加齢に伴い複数の臓器に様々な障害が発症することは高齢者の生活の質が低下するばかりではなく医療経済学的にも重要な問題となっている。本研究はこの加齢に伴う多臓器障害の発症機序をゲノム・蛋白質レベルから解析し、予防法開発に資する基礎的研究を行い実際の高齢者医療に外挿し高度先進医療に貢献することを目的とする。  
加齢に伴う生体分子の減少と臓器障害に関する研究は多いが、ほとんどは既知の分子を中心に行われている。本研究は2つの特徴的な機能分子の加齢に伴う減少が多臓

器障害の発症機序に関与していることを遺伝子組み換え動物を用いて基礎的に解析し、その結果を基に臨床研究で検証する点が特徴的である。一つは加齢研究の過程で発見された新規の老化指標蛋白質 SMP30 である。SMP30 は脳、肝臓、腎臓、脾臓など、ほぼ全身の臓器に発現している。この分子は動物種間でアミノ酸配列が高度に保存されているカルシウム結合蛋白質で細胞内カルシウムホメオスターシスに関与し数多くの細胞機能に関与していることが明らかとなっている。もう一つの機能分子である血管作動性物質アドレノメデュリンは臓器保護作用があることが証明されている。これらの分子機能と蛋白高次構造の解析には創薬の可能性が含まれている。

## B. 研究方法

1. 老化指標蛋白質 SMP30 欠損マウスの樹立と発症する病態の解析：マウス SMP30 遺伝子の第3エクソンに Neo 遺伝子を挿入し SMP30 欠損マウスを作製し C57BL/6 マウスに退交配し純系として確立した。
2. アポトーシス感受性実験：初代肝細胞培養系を用いて TNF $\alpha$  と actinomycin によるアポトーシスへの感受性を検討した。また抗 Fas 抗体投与によるアポトーシス誘導を行い感受性を検討した。
3. カルシウムポンプ活性の検討：初代肝細胞培養株に  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  を取り込ませた後、ATP で刺激し細胞外に排出された  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  を測定した。
4. 酸化ストレスによる遺伝子発現調節：加齢に伴う SMP30 分子の発現調節を四塩化炭素、カロリー制限食法および

LPS 刺激により解析した。

5. SMP30 に対するモノクローナル抗体作製：臨床応用を目指して SMP30 の高感度測定系用の抗 SMP30 モノクローナル抗体を作製した。
6. 蛋白質の酸化の解析：蛋白質アミノ酸側鎖のカルボニル体への変化を DNPH との特異的反応で比色定量した。
7. アドレノメデュリン (AM) の細胞庇護作用の解析：正常腎線維芽細胞 (NRK49F) に対する AM の細胞増殖抑制機能について解析した。

## C. 結果

1. SMP30 欠損動物を遺伝子破壊法により作製し C57BL/6 を遺伝的背景とした純系マウスを確立した。SMP30 遺伝子欠損マウスは外見的には正常マウスとは特に差は無いが、孤立性腎嚢胞の発症率が高かった。SMP30 の発現が多い肝細胞では正常マウスに比較して欠損マウスでは脂肪滴が多く、ライソソームの数が増加し、リボソームの発達が悪く、ミトコンドリアの変性が強かった。SMP30 欠損顎下腺ではさらにミトコンドリアの変性が強かった。
2. SMP30 欠損マウスは TNF $\alpha$  と抗 Fas 抗体によるアポトーシスに対する感受性が低下していた。この事実は加齢に伴い SMP30 が減少すると種々の細胞傷害に対する閾値が低下し細胞数が減少したり細胞機能が低下する。
3. SMP30 が欠損した肝細胞のカルシウムポンプ活性が失われていた。この事実は SMP30 欠損あるいは減少した細胞がアポトーシスに対する感受性が亢

進することを説明するものである。

4. 四塩化炭素を投与すると細胞死が誘導される。細胞死が誘導される前には SMP30 の発現が急激に抑制された。四塩化炭素は急性の酸化ストレスを誘導する物質であることから SMP30 は酸化ストレスにより発現が抑制されることを明らかにした。細胞死後に肝細胞の再生が観察されるが SMP30 欠損マウス肝臓では細胞分裂像が野生型マウスの場合より多いことが明らかとなった。この事実 SMP30 が細胞増殖に対して抑制的に働くことがわかった。
5. カロリー制限食により SMP30 発現亢進を誘導することを発見した。カロリー制限食は実験動物の寿命を延長することから SMP30 が健康老化の良い指標となる可能性を示唆した。LPS によっても SMP30 の発現が抑制されることを観察した。
6. SMP30 が細胞接着を亢進することを証明した。
7. SMP30 分子は動物種間で高度にアミノ酸配列が保存されており一部に RNA polymerase と類似した配列を持っていた。またリン酸化を受けることを明らかにした。
8. ヒト SMP30 のアミノ酸配列は殆ど変異が無いことを明らかにした。この事実は SMP30 の生物学的重要性を示唆するものである。
9. 加齢に伴い蛋白質のカルボニル化が進行することを明らかにした。
10. 血管作動性分子アドレノメデュリンは細胞保護作用を持つことを明らかにした。

#### D. 考察および今後の課題

本課題は我々が発見した加齢に伴う臓器障害を分子レベルで解析するものである。その中心となるものはカルシウム結合蛋白質である老化指標蛋白質 SMP30 であり、加齢に伴い SMP30 が減少する機序とその影響について解析したものである。また血管作動性分子アドレノメデュリンの機能解析により細胞・臓器の保護を解析した。臓器障害の指標となる蛋白質の酸化（カルボニル化）を検討した。

加齢に伴い生体は様々な内的・外的な障害を受けている。それらの障害に対して抵抗性が減弱している状態が老化と考えることができる。SMP30 欠損マウスにおいてカルシウムポンプの機能が不活性化されていることは細胞の障害に対する抵抗性の閾値が低下していることになる。実際にアポトーシス誘導性は SMP30 欠損マウスにおいて亢進していることで加齢に伴う細胞障害性の亢進を説明することができる。同様にアドレノメデュリンは細胞保護作用を持つことからその低下は加齢に伴う臓器障害の原因となる可能性を示唆された。すなわち加齢に伴う細胞保護分子の減少は高齢者の臓器障害の重要な因子であることが明らかとなった。

SMP30 はほぼ全身の細胞に発現されており動物種間を超えてアミノ酸配列が高度に保持されていることが特徴である。高度なアミノ酸配列の保存性は対象とする蛋白質の生物学的な重要性を示しているのが一般的である。このような観点からヒト、特に本研究では日本人集団であるが SNP 解析により、60 人のアミノ酸配列に全く差異が無かったことは SMP30 分子が重

要な機能を持っていることを示すものである。遺伝子多型と疾患の関連を考える場合にはイントロンや発現調節領域の SNP 解析が必要と考えられる。また他の動物種においても各々の動物種間でアミノ酸配列に変異が殆ど無いことが予想される結果である。以上の結果は SMP30 の機能の探索を更に推し進める重要性を示唆している。またアドレノメデュリンの発現もほぼ全身にわたり、その減少は SMP30 と同様に加齢臓器障害の原因になると思われる。

SMP30 は加齢に伴い減少するがその重要な要因が酸化ストレスであることを示唆する結果を得た。急性の酸化ストレス物質である四塩化炭素は投与初期に肝臓において SMP30 の発現を急激に抑制する。ところがアルブミンの発現量は変化しないことから SMP30 の減少が単なる細胞障害によるものではないことは明らかである。さらにラットを用いたカロリー制限食実験では SMP30 の加齢に伴う減少は認められなかった。カロリー制限食は酸化ストレスの減少をもたらすことから結果的に SMP30 の発現を亢進させたと考えられる。カロリー制限では実験動物の寿命延長が得られるので SMP30 発現量は長寿の良い指標になる可能性が示唆された。また LPS 投与により活性酸素種 (ROS) が誘導され同時に SMP30 の発現も減少することも上記の解釈を支持するものである。ただこの場合、加齢に伴い LPS による ROS 誘導は減少するという結果があるために他の要因も考慮しなければならない。おそらく活性酸素の消去系も加齢に伴い低下していることが原因と考えられる。このような活性酸素消去系の加齢に伴う低下は酸化ストレスを亢進

させ蛋白質のカルボニル化を誘導する。その臓器障害作用の解析と予防法の開発は今後の課題である。

加齢に伴い酸化ストレスは増加すると同時に LPS 誘導による酸化ストレス (ROS) も増加する。この現象には加齢に伴う ROS 消去系の不全も関与していると考えられる。本研究ではもう一つの要因があることが明らかとなった。肝臓の超微形態学的観察では SMP30 の究極の減少である SMP30 欠損マウスは様々な所見を示している。そのなかでもミトコンドリアの変性が野生型マウスよりも強いことが示されている。このようなミトコンドリアの変性は顎下腺での所見はさらに強いものになっていた。ミトコンドリアが腫脹膨大している像が多数観察された。また cytochrome oxidase の発現も低下していた。現在、我々は SMP30 欠損マウスにおけるミトコンドリアの変性は細胞内カルシウム恒常性の失調によるものであろうと考えている。また加齢に伴いミトコンドリア変性が増加する。SMP30 欠損マウスでは細胞膜カルシウムポンプ ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) が活性化されないことを今年度は示したが、この細胞膜カルシウムポンプは細胞質内からミトコンドリアへのカルシウム移行にも重要な役割を果たしている。すなわち細胞質内からのカルシウム移動が障害されているためにミトコンドリア障害が誘導され機能不全に陥ると考えることができる。この事実は加齢に伴う LPS 誘導性 ROS 産生低下を合理的に説明できる。今年度の研究により対象とした 2 つの生体分子は共に細胞保護的に働くことが明らかとなった。今後はこの 2 つの生体分子と蛋白質のカルボニル化や脂質の酸化との

関連を解析することも重要と考えられる。また本年はアドレノメデュリンの細胞増殖抑制作用を明らかにしたが SMP30 についても解析を行いたい。特に基礎的な老化学研究領域では老化と増殖（腫瘍化すなわち不死化）は常に表裏一体に語られることが多いからである。

#### E. 結論

加齢に伴い酸化ストレスが増加した結果、老化指標蛋白質 SMP30 の発現が抑制される。SMP30 は細胞に対する種々の傷害に対

して細胞底護的に機能する。それゆえに加齢に伴う SMP30 の減少はミトコンドリア機能不全と細胞障害を誘導し臓器障害の背景となる。この様な状態は高齢者疾患を誘導したり予後を低下させることとなる。また SMP30 はカルシウム結合蛋白質の性状を有しており、その減少は多くの細胞機能の低下を誘導することが明らかとなった。同様にアドレノメデュリンの低下は細胞保護機能の低下を誘導する。最細胞機能低下や細胞保護機能の低下は結果的に老年病の発症の背景となることを示唆している。

厚生科学研究費補助金（長寿科学研究事業）

分担研究報告書

加齢指標蛋白質 SMP30 と多臓器障害発症機序に関する基礎的研究

主任研究者 丸山 直記 東京都老人総合研究所・研究部長

**研究要旨** 高齢者疾患の背後にある生体機能低下や障害のメカニズムを加齢指標蛋白質 SMP30 を中心に分子病理学的に解析した。SMP30 の減少や欠損は細胞外からの種々の傷害に対して抵抗性が低下する原因となる。特に SMP30 が細胞膜カルシウムポンプ活性に必須な分子であり、その欠損は細胞膜およびミトコンドリア膜の障害を誘導する。その結果ミトコンドリア機能不全が発生し細胞機能あるいは臓器機能の低下が誘導され高齢者が疾病を罹患した場合の予後を悪化させる。この分子は酸化ストレスによりその発現が抑制されるところからカロリー制限食により発現を維持あるいは亢進することにより老化を遅延させる可能性が明らかとなった。

分担研究者

長田道夫・筑波大学医学専門群病理学・  
助教授

佐藤信紘・順天堂大学・医学部・教授

A. 研究目的

加齢に伴う多様な病態は高齢者に必然的に出現する。疾病と認識されない場合でも、高齢者では明らかに細胞機能あるいは臓器の機能の低下、言い換えると臓器の予備能が低下している。このような病態あるいは予備能の低下は観察される個人により様々に異なっている。このような個体差は病態や機能低下には多くの因子が関与しているために生ずると考えられる。したがって加齢疾患は多因子性疾患としても扱うことができる。本課題では加齢病態発症に関与し数多くある候補因子のうちもっとも重要な因子を同定し、その性状を基礎的に解析し、

それを基に応用法を開発することにより高齢者医療に貢献しようとするものである。

本課題を独創性あるものにするために我々は SMP30 とアドレノメデュリンという2種類の分子を中心に加齢病態の基礎的解析を行っている。本研究における研究対象は加齢研究の過程で本報告者によって発見された老化指標蛋白質 SMP30 である。SMP30 はほぼ全身の臓器に発現しており分子量約3万で299個のアミノ酸から構成され、その配列は高等動物種間では極めて高い相同性を有しているカルシウム結合蛋白質である。このような蛋白質は重要な機能を持っていると考えられるところから本研究では SMP30 分子の減少と加齢病変との関連について基礎的な解析を行い臨床応用への可能性を探索した。



## B. 研究方法

### 1. SMP30 遺伝子破壊による SMP30 欠損マウス系の確立

129/Sv マウス由来 genomic DNA library からラット SMP30 cDNA を用いてマウス genomic DNA をクローニングして、その塩基配列を解析した。その結果に基づき第3エクソン内に挿入されるように Neo 遺伝子を含んだターゲットベクターを作製し ES 細胞に移入し SMP30 遺伝子の組み換えを行った (図1)。その結果 502 個の組み換え ES 細胞から 3 個体の SMP30 遺伝子組み換えマウスを得ることができた。そのうちの 1 個体を用いて C57BL/6 マウスに退交配を 8 代以上行い C57BL/6 マウスの遺伝的背景を持つ SMP30 欠損マウスを純系として確立した。

### 2. 免疫組織学的解析

精製したラット SMP30 を家兎に免疫して作製した抗体と FITC 結合抗家兎免疫グロブリン抗体を用いた。抗ラット SMP30 抗体はヒト及びマウス SMP30 に対して反応するものである。同時に免疫染色と同時にローダミン・ファロイジンでアクチンの染色を行った。Western blotting は常法に従って行った。

### 3. マウス初代肝細胞培養

マウス肝臓からの肝実質細胞の分離はコラゲナーゼ灌流により行った。コラゲナーゼ処理後にナイロンメッシュおよび遠心分離法で非実質細胞を除去した。培養液は aprotinin と dexamethazone および FCS を加えた Williams 培地を用いラット I 型コラーゲンを塗布したプレートで培養した。

### 4. アポトーシスの誘導と検出

in vitro でのアポトーシスの誘導は TNF  $\alpha$  の系を使用した。初代培養肝細胞を 20 ng/ml の濃度で TNF  $\alpha$  処理した。この量の TNF  $\alpha$  ではアポトーシスが十分に誘導されないのでアクチノマイシン D を併用した。アポトーシスの評価は annexin V の染色度で行った。また Caspase-8 の測定は Caspase-8 Colorimetric Assay キット (Bio Vision Research Products) を用いた。

in vivo のアポトーシス誘導は抗 Fas 抗体 (Jo ; Pharmingen) を用いて行った。非致死量 (3  $\mu$ g/25 g マウス体重) をマウス尾静脈から投与した。投与後 6 時間で肝臓を切除し組織学的な解析を行った。同時に TUNEL 法によりアポトーシスを生じた細胞を検出した。

### 5. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

TNF  $\alpha$  処理後の NF  $\kappa$  B の活性化を EMSA により検討した。核蛋白質を抽出し [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (Amersham) で NF  $\kappa$  B 特異的オリゴヌクレオチドを標識した。その後、核蛋白質と反応させ電気泳動を行った。特異性の確認を抗 p50 あるいは抗 p65 抗体を用いて行った。また NF  $\kappa$  B 特異的な非標識オリゴヌクレオチドで競合試験を行い特異性を確認した。

### 6. カルシウムポンプ活性化の測定

細胞膜カルシウムポンプ活性の測定は初代肝細胞培養株を <sup>45</sup>Ca で標識した後、ATP により細胞を刺激して細胞外に排出された放射活性を測定して検討した。

## 7. 四塩化炭素投与実験

四塩化炭素をマウスに経口投与 (2  $\mu$ g/body weight) した後に肝臓を観察した。

## 8. カロリー制限食

Fischer344 を用いてカロリー制限食実験を行った。制限食の構成は大豆蛋白 21%、ショ糖 15%、デキストリン 43.65%、コーンオイル 10%、 $\alpha$ メチオニン 0.15%、コリンクロライド 0.2%、塩類ミックス 5%、ビタミンミックス 2%、Solka-Floc 3%であった。実験動物は生後 6 週間までは自由摂取とし、その後、2 群に分けた 1 群をカロリー制限食摂取群とした。制限食群は自由摂取群の約 60%のカロリーであった。

## 9. LPS による活性酸素種 (ROS) 誘導

LPS 5 mg/kg を腹腔内に投与し、ROS の産生を測定した。ROS 産生の定量は測定試料に DCFDA (2, 7'-dichlorofluorescein diacetate) を加え比色反応にて定量化した。

## B. 研究結果

### 1. 加齢指標蛋白質 SMP30 欠損マウスの樹立と病態

#### ①SMP30 欠損マウスの樹立

SMP30 欠損マウスは正常に出産することが確認された。生後も外形的には野生型と比較して特に異常な差異は認められなかった。3 種類の遺伝子型のマウス肝細胞における SMP30 の発現を抗 SMP30 抗体で免疫染色を行った (図 2)。野生型 (SMP30<sup>+/+</sup>) マウスでは全ての肝細胞に SMP30 が発現されていた。SMP30 欠損 (SMP30<sup>-/-</sup>) マウスではまったく発現が認められなかった。SMP30 遺伝子に関してヘテロのマウス

(SMP30<sup>+/-</sup>) では半分の細胞だけが SMP30 を発現していた。このヘテロマウスで半分の細胞のみに SMP30 が発現している現象は SMP30 遺伝子が X 染色体に位置するための X 染色体不活性化によるものである。

#### ②腎嚢胞の出現

SMP30 遺伝子欠損マウスには図 3 に示す巨大な孤立性腎嚢胞が観察された。頻度は多くはない (約 1-2%) が図のような腎嚢胞が発症していたものは全て SMP30 欠損遺伝子を持つマウスであった。この事実は後述するように、SMP30 が細胞接着性を亢進する機能があることから細胞接着能の減少による可能性があると考えている。今後はより大きな集団での発症頻度を求め、いかなる接着分子が関与しているのかを検討したい。この現象を分子病理学的に解明することにより高齢者の剖検を行う際に必見される腎硬化症と貯留性嚢胞 (retention cysts) の発症予防に資する成果が期待できる。特に加齢に伴う腎硬化症による腎透析は新規透析導入の原因の第 1 位であることから医療経済学的にも重要な課題と思われる。

#### ③皮膚の変化

新生児の皮膚を観察したところ SMP30 欠損 (SMP30<sup>-/-</sup>) マウスでは野生型に比較して表皮が薄いことがわかった (図 4)。この分子機序は不明である。

#### ④肝臓における病態

SMP30 遺伝子欠損マウスの肝臓は 12 ヶ月齢では通常の光学顕微鏡的観察で、やや

脂肪沈着が目立つ程度であるが超微形態学的観察を行ったところ野生型と比較して脂肪滴の増加、ミトコンドリア変性、ライソソームの増加、リボソームの発達減少が認められた(図5)。この所見はSMP30分子が細胞底層的に働いている可能性を示唆している。

#### ⑤アポトーシス感受性亢進

野生型(SMP30+/+)マウスおよびSMP30欠損(SMP30<sup>-/-</sup>)マウスから得た初代培養肝細胞にTNF $\alpha$ とアクチノマイシンDを加えるとアポトーシスが誘導される。20 ngのTNF $\alpha$ と10 ngのアクチノマイシンDを加えるとSMP30欠損マウスは野生型に比べて明らかにアポトーシスが強く誘導された(図6)。図ではSMP30欠損(SMP30<sup>-/-</sup>)マウス肝細胞がannexin Vで強く染色されていることがわかった。アクチノマイシンDを100 ngに増加すると双方に強いアポトーシスが誘導されて野生型との差は消失した。この結果はSMP30欠損マウス肝細胞ではアポトーシスに対する閾値が低下することを示したものである。

アポトーシスの他のパラメーターであるcaspase-8を測定したところSMP30遺伝子欠損マウスにおいてはTNF $\alpha$ とアクチノマイシンDによるアポトーシスを誘導した場合にはcaspase-8の値が野生型に比べて有意に上昇することがわかった(図7)。

SMP30欠損マウスにおいてアポトーシスに対する閾値が低下する可能性の一つにSMP30がNF $\kappa$ Bの活性を強く活性化することが考えられた。NF $\kappa$ Bの活性化はアポトーシス誘導を抑制することが知られており、野生型では欠損マウスに比較して

SMP30により亢進されている可能性がある。この可能性を検証するためにアポトーシスを誘導した肝細胞から核蛋白を抽出しNF $\kappa$ BのDNA結合能を測定した。その結果、野生型と欠損型マウスとの間にはNF $\kappa$ BのDNA結合能には差がなかった(図8)。この結果は野生型とSMP30欠損マウスにおけるアポトーシス感受性の差はNF $\kappa$ Bによる抑制系の活性化の差によるものではないことが明らかとなった。

#### ⑥抗Fas抗体誘導性アポトーシス

TNF $\alpha$ 誘導性アポトーシスに対する感受性がin vitroの解析で明らかにされたのでin vivo実験においても解析を行った。非致死量の抗Fas抗体(Jo)をマウスに静注し肝臓における病変を観察した。肝障害の指標となるALTはSMP30欠損マウスで最も高値を示し野生型で最も低値であった(図9)。ヘテロのマウスでは中間の値を示した。このALTの値に組織像は関連した病理組織像を示していた(図10)。さらにアポトーシスの指標であるTUNEL反応陽性細胞も関連していた(図11)。

#### ⑦SMP30による細胞膜カルシウムポンプの活性化

我々は以前の研究においてSMP30がカルシウムポンプ活性を亢進することを証明している。アポトーシス誘導時には細胞内カルシウム濃度が上昇することが知られているところからSMP30欠損マウスでは細胞内カルシウムを外部に排出する機能が低下していることが考えられる。カルシウムポンプ活性へのSMP30の効果を検討した。ATPで細胞を刺激すると細胞内小器官であ

る小胞体からカルシウムイオンが排出され細胞内カルシウム濃度が上昇する。その後、細胞膜カルシウムポンプ ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) が活性化されて細胞外にカルシウムを排出する。図 12 に示すように SMP30 欠損マウスでは野生型に比べて殆ど細胞外へのカルシウム排出が認められなかった。この結果はアポトーシス誘導時に SMP30 がカルシウムポンプを活性化することにより細胞底膜的に機能することを示している (図 13)。

## 2. 酸化ストレスによる SMP30 発現抑制

### ①四塩化炭素による SMP30 発現抑制

実験動物に四塩化炭素を投与すると肝細胞の急激な壊死と再生を観察することができる。四塩化炭素を正常マウスに投与すると初期の 48 時間では細胞の壊死は顕著ではない。この時期の肝細胞における SMP30 とアルブミンの発現を Northern hybridization 法で半定量化して解析した。その結果、図 14 に示すように四塩化炭素投与後、アルブミンの発現は全く変化はなかったのに対して SMP30 は急激に減少し 12-24 時間後にはほとんど発現が認められなかった。四塩化炭素は急激な酸化ストレスを誘導する薬剤として知られていることから肝臓において SMP30 の発現は酸化ストレスの影響を受けやすいことが明らかとなった。四塩化炭素投与後、約 48 時間後から肝細胞は壊死、そして再生が開始する。その際、細胞分裂が多く認められる。細胞分裂の数は SMP30 欠損マウスにおいては野生型に比べて有意に多いことがわかった (図 15)。この現象は SMP30 が細胞増殖を抑制する機能を持っていることを示唆している。

②カロリー制限による SMP30 発現増加  
カロリー制限食を与えた実験群の肝臓では SMP30 発現量の加齢に伴う減少はなかった (図 16)。カロリー制限食を与えた場合の蛋白質発現量は一般に減少するが SMP30 のみが増加を示していることは重要な事実である。

### ③LPS による SMP30 発現抑制

細菌性 LPS を投与すると急性期蛋白質が誘導されることが知られている。LPS により SMP30 の発現は抑制されていた (図 17)。同時に活性酸素種 (ROS) も産生される。その際 LPS 投与により SMP30 の産生が減少することは酸化ストレスによるものと思われる。一方、加齢に伴い LPS に誘導される ROS が増加する (図 18)。

## 3. SMP30 欠損マウス顎下腺に出現するミトコンドリア障害

SMP30 欠損マウスの顎下腺の変化を観察したところ同じ個体の肝臓に比べて強いミトコンドリアの変性が高度であった (図 19)。また cytochrome oxidase で免疫組織染色を行ったところ SMP30 欠損マウスでは発現量が著しく低下していた (図 20)。粘液産生亢進作用を持つ  $\alpha$  イソプロテレノールを投与したところ野生型では分泌顆粒が減少するが SMP30 欠損マウスでは未投与時から減少しており変化がなかった (図 21)。

## 4. 臨床応用に向けての試み

①SMP30 欠損マウスを用いたモノクローナル抗体作製  
加齢指標蛋白質 SMP30 は高等動物種間

においてアミノ酸配列が極めて高度に保存されていることである。この高度な保存性は異種の動物を用いて抗体を作製する場合には作製可能となる抗原決定基が限定される。更に対象となる抗原決定基が高次構造において対象分子の内部に存在する場合は抗体が結合できないことも考えられる。このような制限を克服するために我々は SMP30 欠損マウスに精製した SMP30 を免疫してモノクローナル抗体を作製することを試みた。このように作製されたモノクローナル抗体は理論的には SMP30 の全ての抗原決定基に対して抗体が作製されると考えられる。我々は SMP30 欠損マウスに精製したマウス SMP30 を免疫してモノクローナル抗体の作製を試みた。しかし当初は抗体が全く産生されなかった。その原因として免疫に使用した SMP30 欠損マウスの由来が重要であることが考えられた。その際使用した SMP30 欠損マウスの母親マウスの遺伝子型は SMP30<sup>+/+</sup>で父親マウスの遺伝子型は SMP30Y<sup>-/-</sup>であった。この組み合わせによる交配では雄は SMP30Y<sup>+/+</sup>あるいは SMP30Y<sup>-/-</sup>が得られ、雌では SMP30<sup>+/+</sup>または SMP30<sup>+/+</sup>が得られる。われわれが使用したマウスは SMP30Y<sup>-/-</sup>であった。この場合にマウス SMP30 を免疫しても抗体が産生できない原因としては母親マウス由来の SMP30 分子が胎盤經由性に胎児を感作しているために SMP30 に対して免疫学的寛容可能性が成立していることが考えられた。そこで免疫用マウスを作製する際に両親ともに SMP30 欠損マウスを交配させた。このことにより SMP30 による胎内感作を避けることができるからである。両親共に SMP30 欠損マウスから得ら

れたマウスに本来は抗体を産生し得ないマウス SMP30 を免疫したところ高力価の抗体が得られた。得られた抗体は他の動物種にも反応することがわかった。十分な力価を示したマウスの脾臓細胞を用いて SMP30 に対するモノクローナル抗体を作製した。ELISA 法による抗体のスクリーニングにより現在までに 6 個のモノクローナル抗体が得られている。現在これらの抗体の特異性を検討し SMP30 の微量測定系の確立を試みている。

## ②腫瘍細胞における SMP30 の発現

臨床応用への試みとして癌組織の免疫組織学的解析を行った。現在は予備的な解析であるが家兎にラット SMP30 を免疫して得られた抗 SMP30 を用いた。肺小細胞癌、食道扁平上皮癌、乳癌、大腸癌の病理組織を抗 SMP30 抗体で染色したところいずれの腫瘍細胞にも SMP30 が同定された (図 22)。現在のところ特記すべき所見は認められないが腫瘍の分化度に SMP30 の発現が相関すると考えている。

## 5. 加齢指標蛋白質 SMP30 についての基礎的な解析

### ①SMP30 による細胞接着性の亢進

ヒト SMP30 cDNA を発現ベクターに組み込み、その後、培養ヒト肝癌細胞株 HepG2 に DNA 移入すると著しく細胞の接着性が亢進した。このような細胞を走査電子顕微鏡で観察したところ図 23 に示したように微絨毛が増加していた。この所見に対応してモエシン等の細胞接着因子も増加していた。

## ②アミノ酸配列中の RNAポリマーゼ配列

これまで SMP30 は特定の遺伝子ファミリーには属さないユニークな遺伝子と考えられていた。発見当初は 299 個のアミノ酸配列をデータベースに照会しても機能的なドメインを発見できなかった。特に SMP30 はカルシウム結合蛋白質としての性状を有していることから EF-hand などのカルシウム結合ドメインが存在すると予測されたが現在まで発見されていない。今回、改めて全アミノ酸配列をデータベースで検索したところ 299 個のアミノ酸の第 150 番から第 200 番までの 51 個のアミノ酸配列がイースト RNA polymerase のサブユニットの RPO26 と 66% の相同性があり、細菌の RNA polymerase とは 60% の高い相同性を持っていることが明らかになった (図 24)。現在 SMP30 が RNA polymerase の活性を有しているかどうかを検討している。

## ③SMP30 の細胞内局在とリン酸化

SMP30 の細胞内局在を観察したところ SMP30 は細胞質から核内へ移行することがわかった。SMP30 には明らかな核移行シグナルが存在しないことから移行の機序は不明である。同時に核成分と細胞質成分から抗 SMP30 抗体で免疫沈降で SMP30 を得てから Western blotting を行って抗リン酸化抗体を反応させたところ SMP30 がリン酸化されていることが明らかとなった (図 25)。現在、この SMP30 上のリン酸化部位の特定を行っている。またその細胞生理学的意義も不明である。

## ④SMP30 結晶化解析

SMP30 の機能を考察したり創薬を試み

るために SMP30 分子の高次構造を解明することは極めて重要な課題である。我々は SMP30 を高度に精製し結晶化し X 線回折法により SMP30 の高次構造を解明することを他の研究グループとともに開始した。現在、解析が順調に進行していることから平成 14 年度中に SMP30 の高次構造を解明したい。

## ⑤SMP30 分子の進化と相同性の保存

SMP30 は様々な動物種間におけるアミノ酸の保存性が高度である (図 26)。この事実は SMP30 が重要な機能を有することを示唆している。我々はヒト末梢血から得た genomic DNA を用いて SMP30 の SNP (single nucleotide polymorphism) を検討した。SMP30 は 7 つのエクソンから構成されているが第 1 エクソンにはアミノ酸翻訳領域は存在しないため第 2 エクソンから第 7 エクソンまでの SNP を解析した。60 人の SMP30 の SNP を解析したが 2 名に第 7 エクソンの DNA 変異が検出された (図 27)。その変異はいずれもアミノ酸の置換を生ずる変異ではなかった。したがって我々が解析した日本人集団では SMP30 のアミノ酸配列は高度に保存されていることが明らかとなった。

## C. 考察

本研究では我々が発見したカルシウム結合蛋白質である老化指標蛋白質 SMP30 が加齢に伴い減少する機序とその影響について解析したものである。

加齢に伴い生体は様々な内的・外的な障害を受けている。それらの障害に対して抵抗性が減弱している状態が老化と考えるこ

とができる。SMP30 欠損マウスにおいてカルシウムポンプの機能が不活性化されていることは細胞の障害に対する抵抗性の閾値が低下していることになる (図 12)。実際にアポトーシス誘導性は SMP30 欠損マウスにおいて亢進していることで加齢に伴う細胞障害性の亢進を説明することができる (図 6, 9)。

SMP30 はほぼ全身の細胞に発現されており動物種間を超えてアミノ酸配列が高度に保持されていることが特徴である (図 26)。高度なアミノ酸配列の保存性は対象とする蛋白質の生物学的な重要性を示していると考えるのが一般的である。このような観点からヒト、特に本研究では日本人集団であるが SNP 解析により、60 人のアミノ酸配列に全く差異が無かったことは SMP30 分子が重要な機能を持っていることを示すものである (図 27)。遺伝子多型と疾患の関連を考える場合にはイントロンや発現調節領域の SNP 解析が必要と考えられる。また他の動物種においても各々の動物種間でアミノ酸配列に変異が殆ど無いことが予想される結果である。以上の結果は SMP30 の機能の探索を更に推し進める重要性を示唆している。

SMP30 は加齢に伴い減少するがその重要な要因が酸化ストレスであることを示唆する結果を得た。急性の酸化ストレス物質である四塩化炭素は投与初期に肝臓において SMP30 の発現を急激に抑制する (図 14)。ところがアルブミンの発現量は変化しないことから SMP30 の減少が単なる細胞障害によるものではないことは明らかである。さらにラットを用いたカロリー制限食実験では SMP30 の加齢に伴う減少は認められ

なかった (図 16)。カロリー制限食の研究ではその効果が酸化ストレスの減少と関連付けて考えられるところから酸化ストレスの減少が結果的に SMP30 の発現を亢進させたと考えられた。カロリー制限により実験動物の寿命延長が得られるので SMP30 発現量は長寿の良い指標になる可能性が示唆された。一方、実験動物の解析では加齢に伴い酸化ストレスが増加することから加齢に伴う SMP30 発現減少を誘導する可能性が強く示唆された。また LPS 投与により活性酸素種 (ROS) が誘導され同時に SMP30 の発現も減少することは上記の解釈を支持するものである。ただこの場合、加齢に伴い LPS による ROS 誘導は減少するという結果があるために他の要因も考慮しなければならない。おそらく活性酸素の消去系も加齢に伴い低下していることが原因と考えられる。

加齢に伴い酸化ストレスは増加すると同時に LPS 誘導による酸化ストレス (ROS) も増加する。この現象には加齢に伴う ROS 消去系の不全も関与していると考えられる。本研究ではもう一つの要因があることが明らかとなった。肝臓の超微形態学的観察では SMP30 の究極の減少である SMP30 欠損マウスは様々な所見を示している。そのなかでもミトコンドリアの変性が野生型マウスよりも強いことが示されている (図 5)。この様なミトコンドリアの変性は顎下腺での所見はさらに強いものになっていた。ミトコンドリアが腫脹膨大している像が多数観察された (図 19)。また cytochrome oxidase の発現も低下していた。現在、我々は SMP30 欠損マウスにおけるミトコンドリアの変性は細胞内カルシウム恒常性の失

調によるものであろうと考えている。SMP30 欠損マウスでは細胞膜カルシウムポンプ (Ca<sup>2+</sup>-ATPase) が活性化されないことを本研究で示している (図 12)。この細胞膜カルシウムポンプは細胞質内からミトコンドリアへのカルシウム移行にも重要な役割を果たしている。すなわち細胞質内からのカルシウム移動が障害されているためにミトコンドリア障害が誘導され機能不全に陥ると考えることができる。この事実は加齢に伴う LPS 誘導性 ROS 産生低下を合理的に説明できる。

#### D. 結論

加齢に伴い酸化ストレスが増加した結果、老化指標蛋白質 SMP30 の発現が抑制される。SMP30 は細胞に対する種々の傷害に対して細胞庇護的に機能する。それゆえに加齢に伴う SMP30 の減少は細胞障害、そして臓器障害の背景となり高齢者疾患を誘導したり予後を低下させることとなる。また SMP30 はカルシウム結合蛋白質の性状を有しており、その減少は細胞機能の低下を誘導する。以上の結論を図 28 にまとめた。

#### E. 健康危険情報

特に該当する項目はなかった。

#### F. 研究発表 (関連課題のみ記す)

##### 1. 論文発表

Ishigami T, Fujita T, Simbula G, Columbano A, Kikuchi K, Ishigami A, Shimosawa T, Arakawa Y, Maruyama N. Regulatory effects of senescence marker protein 30 on the proliferation of hepatocytes. *Pathology Int* 51:491-497

(2001)

Ishigami A, Asaga H, Ohsawa T, Akiyama K, Maruyama N. Tissue specific expression of rat peptidylarginine deiminase type I, type II, type III and type IV. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 22:63-65 (2001)

Eto Y, Shimosawa T, Nitta K, Nihei H, Maruyama N. Interaction between adrenomedullin and angiotensin II in the DNA synthesis and extracellular matrix accumulation in cultured rat kidney interstitial cells. *Clin Exp Nephrol* (印刷中)

石井甲介、阿部弘一、椿 恵樹、山本昌範、穂田真澄、石神昭人、丸山直記 老化指標蛋白質 30 (SMP30) の顎下腺における局在とノックアウトマウスの電子顕微鏡的観察 日本耳鼻咽喉学会会報 (印刷中)

Ishigami A, Handa S, Maruyama N, Supakar P. Nuclear localization of senescence marker protein-30 (SMP30) in mouse hepatocytes and its homology to RNA polymerase. (投稿中)

Ishigami A, Fujita T, Shirasawa T, Koseki H, Kitamura T, Enomoto N, Sato N, Maruyama N. Loss of calcium pump activity leads to a high susceptibility to tumor necrosis factor- $\alpha$  in SMP30 knockout mice. (投稿中)



Jung KJ, Maruyama N, Ishigami A, Chung HY. Transcriptional regulation of senescence marker protein-30 by age and calorie restriction. (投稿中)

Jung KJ, Maruyama N, Ishigami A, Goto S, Chung HY. Down-regulation mechanism of senescence marker protein-30 by ROS during aging. (投稿中)

## 2. 学会発表

Shimosawa T, Maruyama N, Fujita T. Oxidative stress and vasculitis possible intrinsic antagonist for oxidative stress. The 2<sup>nd</sup> International Symposium on Vascular Aging and Angiogenesis. Pusan, Korea (2001)

Maruyama N. Pathophysiological significance of senescence marker protein-30. The 2<sup>nd</sup> International Symposium on Vascular Aging and Angiogenesis. Pusan, Korea (2001)

Maruyama N. Molecular aspects of age-associated organ injury. The Meeting of National Project on Aging. Beijing, China (2001)

Maruyama N, Ishigami A. Critical role of senescence marker protein-30 (SMP30) in age-associated diseases. Symposium in Yonsei-University. Seoul, Korea (2002)

Machiguchi T, Kimura H, Yonemoto S, Minakata T, Ishigami A, Maruyama N, Ysahida H. Altered expression of senescence marker protein 30 in kidney biopsy specimens from NIDDM. The 2001 ASN/ISN World Congress of Nephrology, San Francisco, USA (2001),

丸山直記 老化指標蛋白質 SMP30 と加齢病態発症機序 第 47 回日本病理学会秋期特別総会 東京都 (2001)

叶澤孝一、河野里佳、松田昭彦、永野忠相、吉川 賢、小川智也、松村 治、長澤龍司、御手洗哲也、磯田和雄、丸山直記 CAPD 患者の排液中の腹膜中皮細胞における細胞間接着の解析 第 4 4 回日本腎臓学会学術総会 東京都 (2001)

石井甲介、禰田真澄、丸山直記 老化マーカー蛋白質 (SMP30) の額下腺における局在とノックアウトマウスの電子顕微鏡的観察 第 102 回日本耳鼻咽喉科学会総会 福岡市 (2001)

松山秀二郎、北村庸雄、榎本信行、広瀬美江子、池嶋健一、山科俊平、今 一義、藤田敬子、丸山直記、佐藤信紘 新しい肝細胞死回避シグナルとしての Senescence Marker Protein 30 (SMP30) の役割 第 8 回肝細胞研究会 東京都 (2001)

丸山直記、久保幸穂、近藤郁子、重本和宏 MuSK レセプター型タイロシンキナーゼ細胞外ドメインの機能解析 第 44 回日本神経化学会 京都市 (2001)

下澤達雄、森泉栄子、王 大海、藤田敏郎、丸山直記 アドレノメデュリン欠乏は酸化ストレスに対する閾値が低下し臓器障害の要因となる 第 24 回日本基礎老化学会 大阪市 (2001)

半田節子、藤田敬子、石神昭人、大沢多加子、Supakar P、久保幸穂、下澤達雄、丸山直記 加齢指標蛋白質 SMP30 の発現と局在 第 24 回日本基礎老化学会 大阪市 (2001)

石神昭人、大沢多加子、浅賀宏昭、秋山 一、丸山直記 ヒト有棘細胞癌 (HSC-1) からのヒト II 型ペプチジルアルギニンデイミナーゼ cDNA クローン化とその遺伝子構造解析 第 24 回日本分子生物学会 横浜市 (2001)

丸山直記、藤田敬子、半田節子、久保幸穂、石神昭人 加齢指標蛋白質 SMP30 遺伝子欠損によるアポトーシス感受性への影響 第 24 回日本分子生物学会 横浜市 (2001)

石神昭人、藤田敬子、半田節子、久保幸穂、大沢多加子、白澤卓二、古関明彦、北村庸雄、榎本信行、下澤達雄、丸山直記 加齢指標蛋白質 SMP30 の遺伝子欠損マウス由来肝細胞は TNF- $\alpha$ /actinomycinD 誘導によるアポトーシスに高感受性である 第 24 回日本基礎老化学会 大阪市 (2001)

丸山直記、白澤卓二、古関明彦 SMP30 欠損マウスにおけるアポトーシス感受性亢進機序 第 31 回日本免疫学会総会 大阪市 (2001)

丸山直記、石神昭人 加齢指標蛋白質 SMP30 欠損マウスに出現する細胞障害 第 91 回日本病理学会総会 横浜市 (2002)

石神昭人、浅賀宏昭、丸山直記 脱イミノ化蛋白質は急性神経変性の有用なマーカーとなる 第 91 回日本病理学会総会 横浜市 (2002)

下澤達雄、松井光宏、藤田敏郎、丸山直記 酸化ストレスによる血管障害に対する内因性防御因子としてのアドレノメデュリン 第 91 回日本病理学会総会 横浜市 (2002)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

セネッセンスマーカープロテイン 30 欠損非ヒト動物、抗体およびその作製方法 (PCT/JP01/09243)

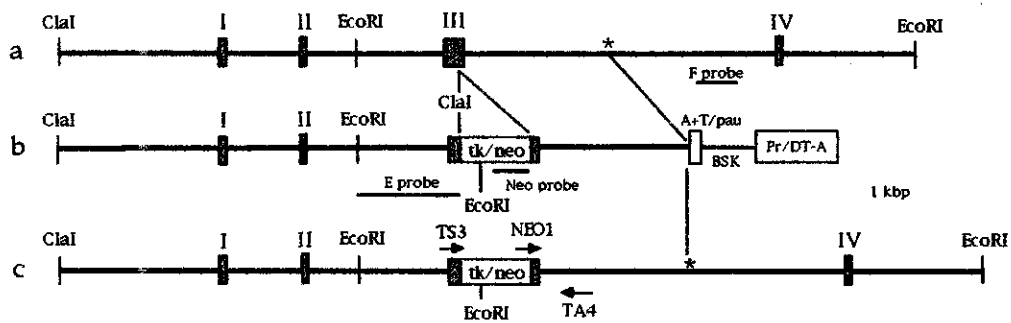


図1 SMP30欠損マウスの樹立：マウスSMP30遺伝子 (a) の第3エクソン内に neo遺伝子を用いたターゲティングベクター (b) を作製して相同組み換えを誘導しマウスSMP30遺伝子を破壊した (c)。

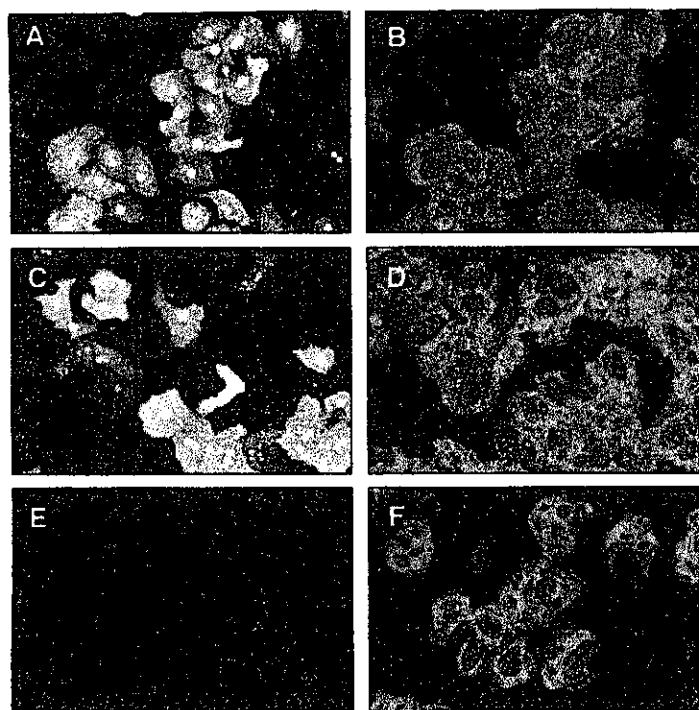


図2 肝細胞におけるSMP30の発現：図左はSMP30染色、右はアクチン染色、野生型は全ての細胞でSMP30が発現している (上段)。ヘテロ型 (SMP30+/-；中段) はSMP30陽性細胞と陰性細胞が混在しておりX染色体の不活性化を示している。SMP30欠損型 (SMP30-/-；下段) はSMP30が全く検出されない。



図3 SMP30欠損マウスに発症する孤立性腎のう胞

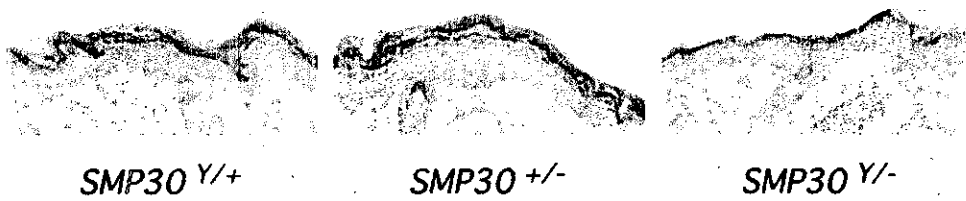


図4 SMP30欠損マウスにおける表皮発育不全：抗フィラグリン抗体による免疫染色（黒色部）