

図5 SMP30欠損マウス肝臓の病態：12ヶ月齢の野生型及びSMP30欠損マウスの肝臓を透過型電子顕微鏡により観察した。SMP30欠損マウス（右）は野生型マウス（左）に比べて脂肪滴の増加、ミトコンドリアの変性、ライソゾームの増加が著明である。

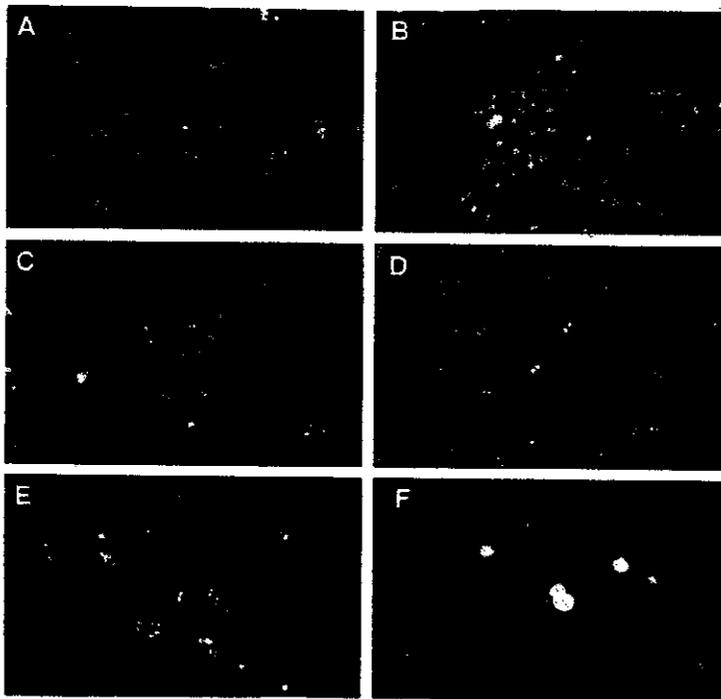


図6 SMP30欠損マウス肝細胞におけるアポトーシス感受性亢進：野生型（SMP30+/+；左側）とSMP30欠損（SMP30-/-；右側）の比較は未処置では差は無かった（A, B）。TNF α 20 ng + アクチノマイシンD 10 ngの投与では明らかにSMP30欠損マウスのアポトーシスが強く誘導された（C, D）。アクチノマイシンを100 ngにするとどちらもアポトーシスが強く誘導され差が消失している（E, F）。

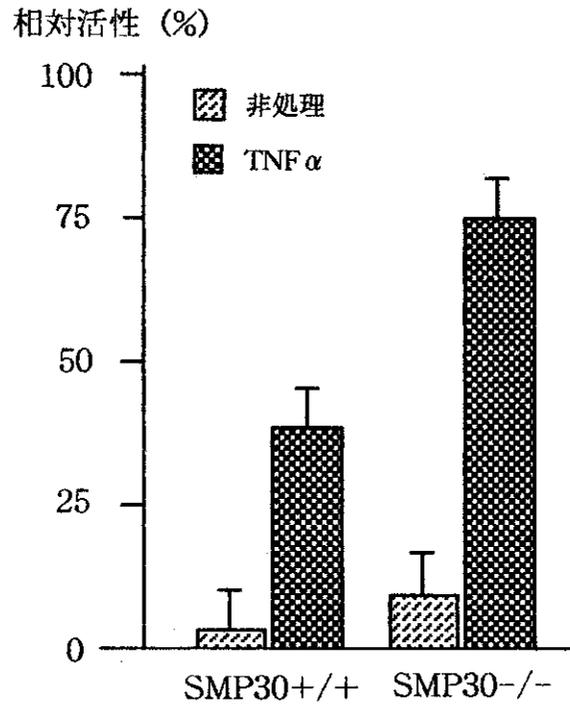


図7 TNF α 処理後のCaspase-8の活性：SMP30欠損マウスが有意に高値を示している。

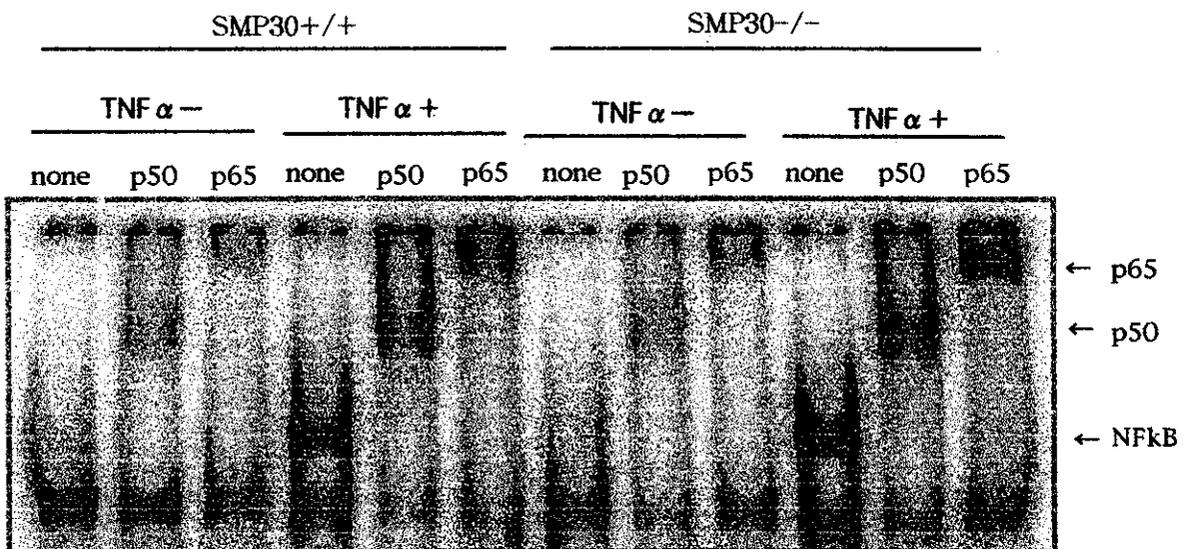


図8 TNF α 誘導性アポトーシスにおけるNFkB活性：いずれの群においても差が無いことを示している。

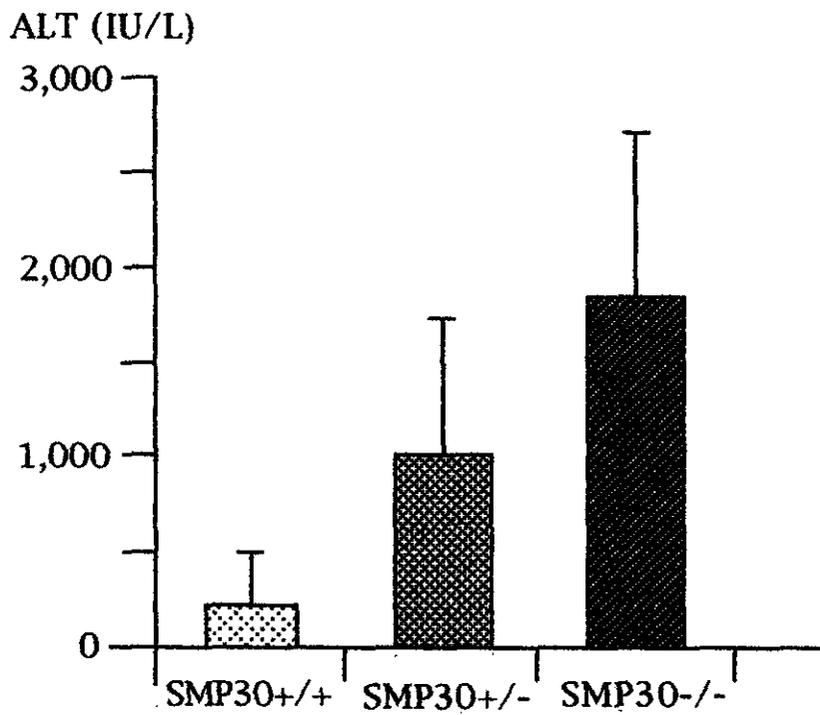


図9 抗Fas抗体 (Jo) 投与後の血清ALT量の比較：SMP30欠損マウスでは最も高値を示している。

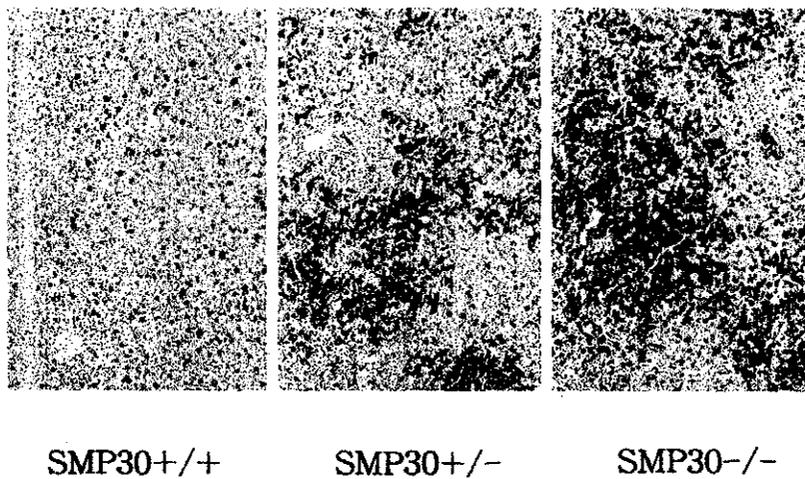


図10 抗Fas抗体による肝障害：SMP30-/-に強い出血が認められる。

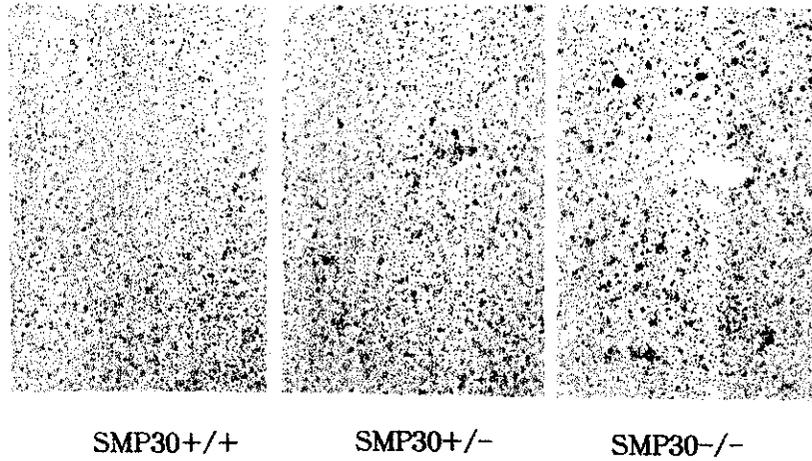


図11 抗Fas抗体処理によるアポトーシス誘導：TUNEL反応陽性細胞がSMP30^{-/-}に多数認められる。

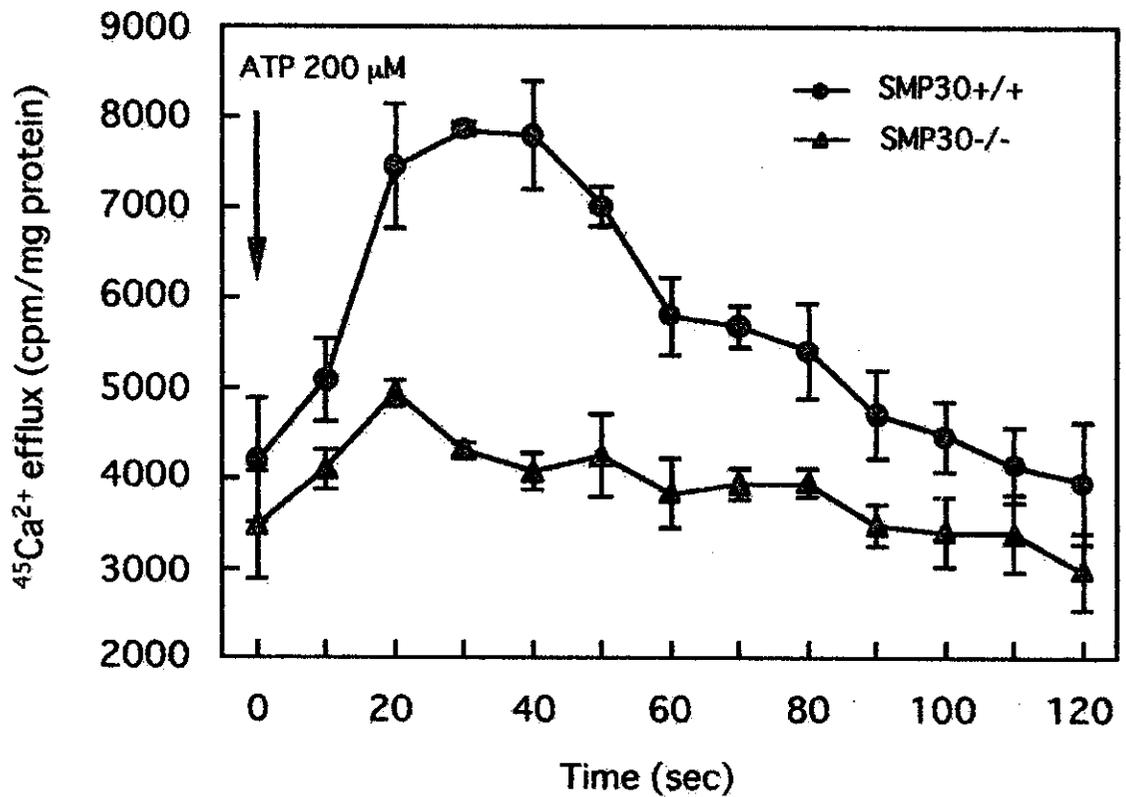


図12 SMP30欠損マウスにおける細胞膜カルシウムポンプ機能不全：ATP刺激に反応していない。

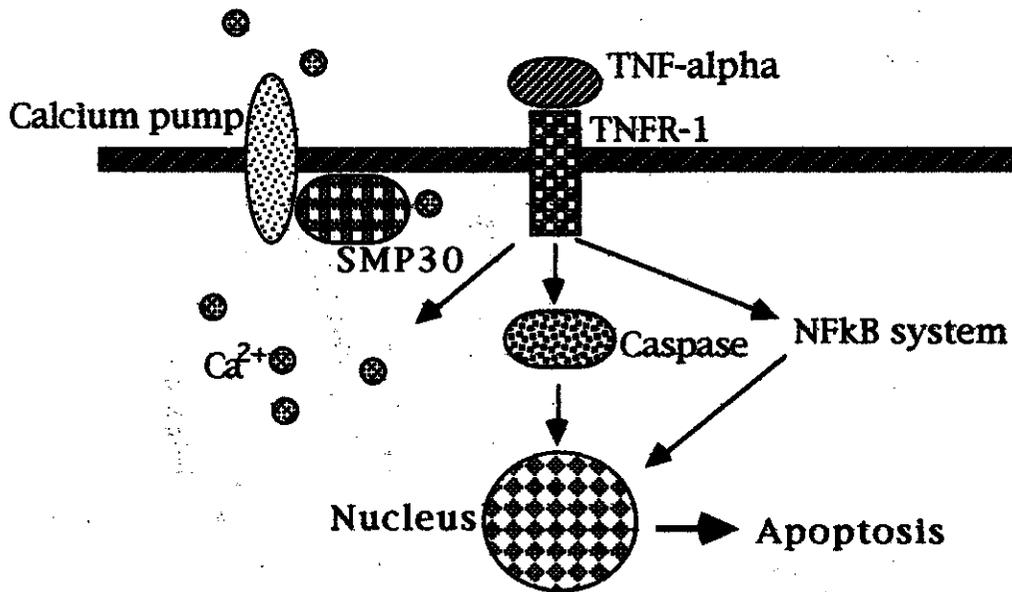


図13 アポトーシスにおけるSMP30の役割：細胞膜カルシウムポンプ活性を亢進することにより細胞内カルシウム濃度の恒常性を維持している。

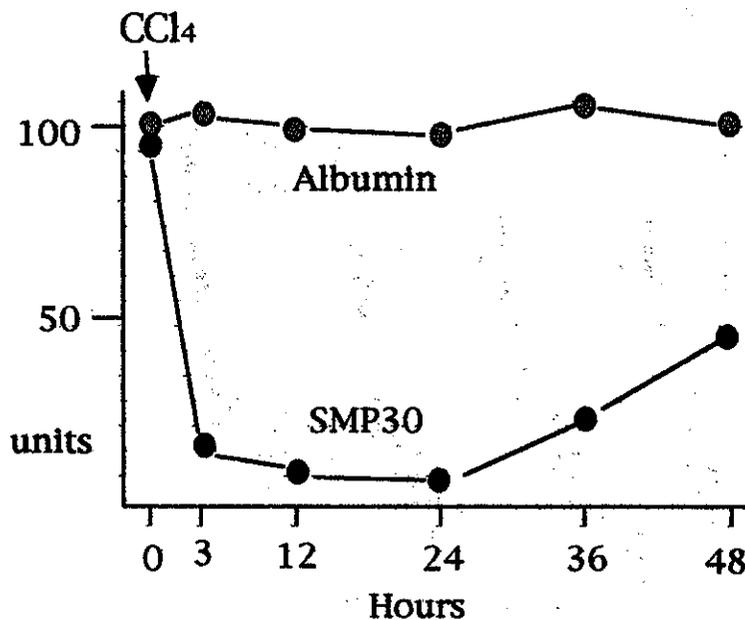


図14 四塩化炭素によるSMP30の発現抑制：マウスに四塩化炭素を経口投与した48時間以内はSMP30発現が抑制される。アルブミンの発現は抑制されない。

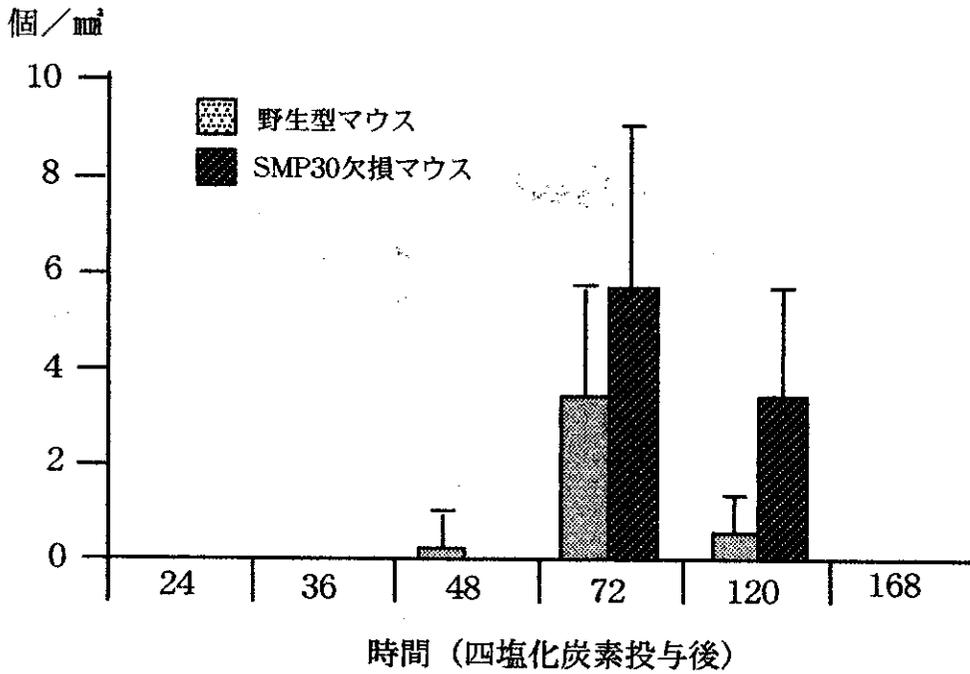


図15 四塩化炭素投与後の肝再生に伴う細胞分裂：H&E染色標本でmitosisの数を計測した。

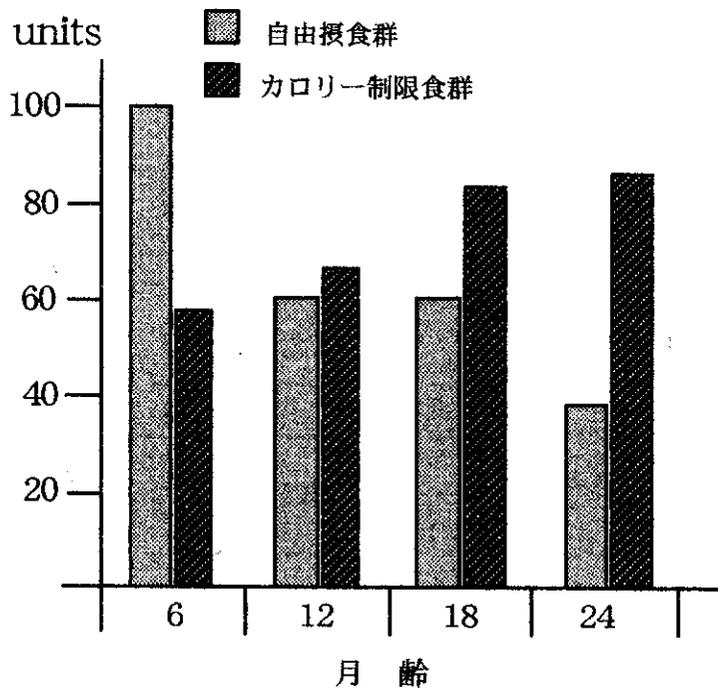


図16 カロリー制限食によるSMP30発現亢進：カロリー制限食により肝臓内のSMP30発現が亢進した。自由摂食群を100 unitsとして表す。Western blottingによる半定量法、SEを省略した。

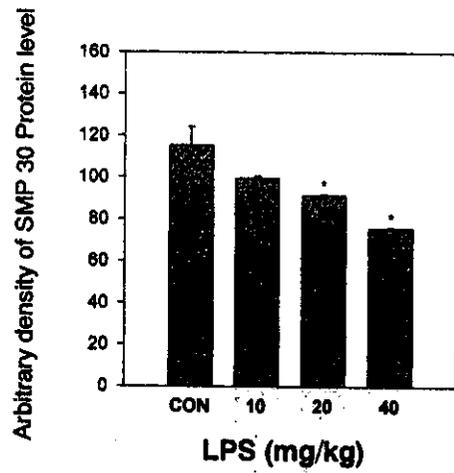


図17 LPS投与によるSMP30発現抑制：LPSを10, 20, 40 ng/kg BWで投与しSMP30の発現を観察した。

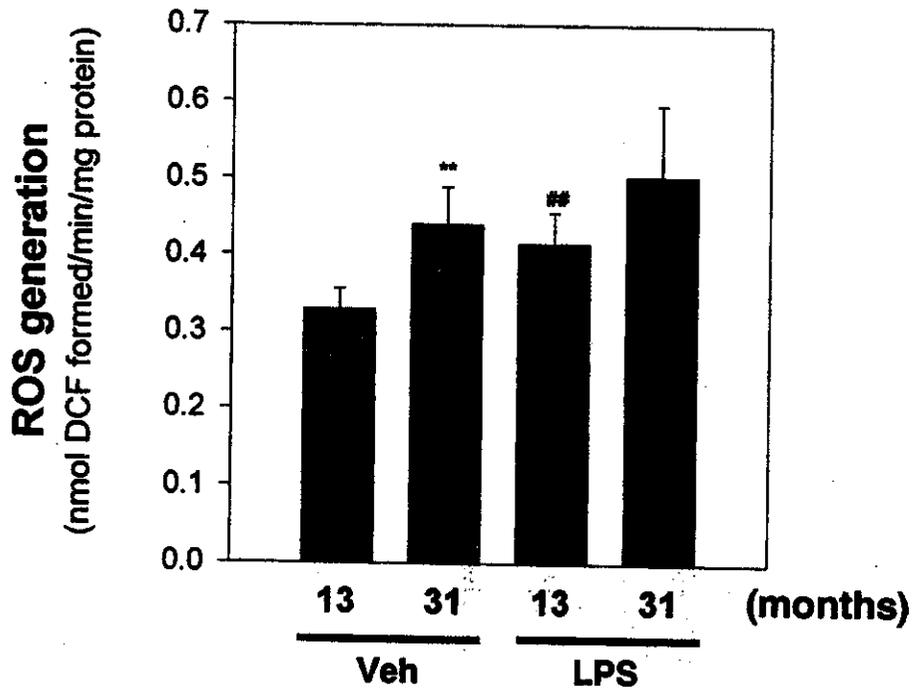


図18 LPS投与による活性酸素種 (ROS) の産生：加齢に伴いROSの産生は亢進する。

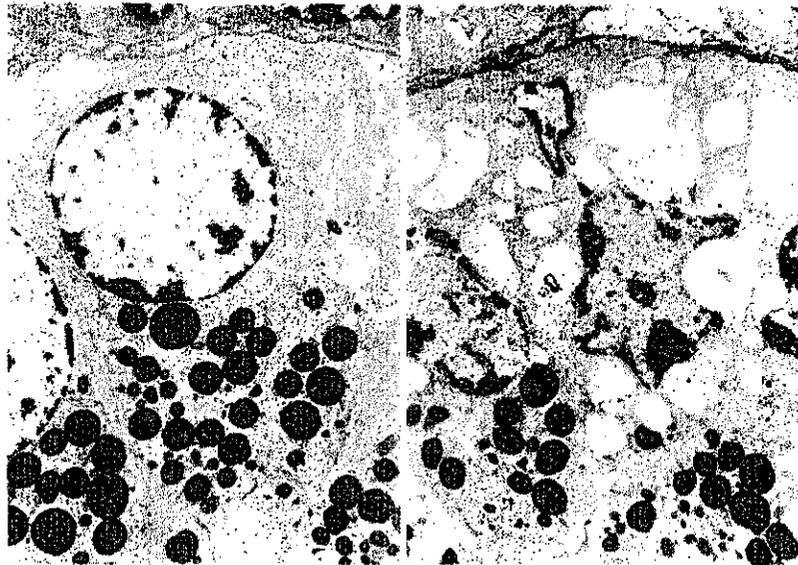


図19 12ヶ月例の顎下腺の形態変化：左が野生型マウス、右はSMP30欠損マウスでミトコンドリアの膨化が著明である。



図20 12ヶ月例の顎下腺におけるcytochrome oxidaseの発現：左が野生型マウス、右はSMP30欠損マウスで発現が著しく減少している。

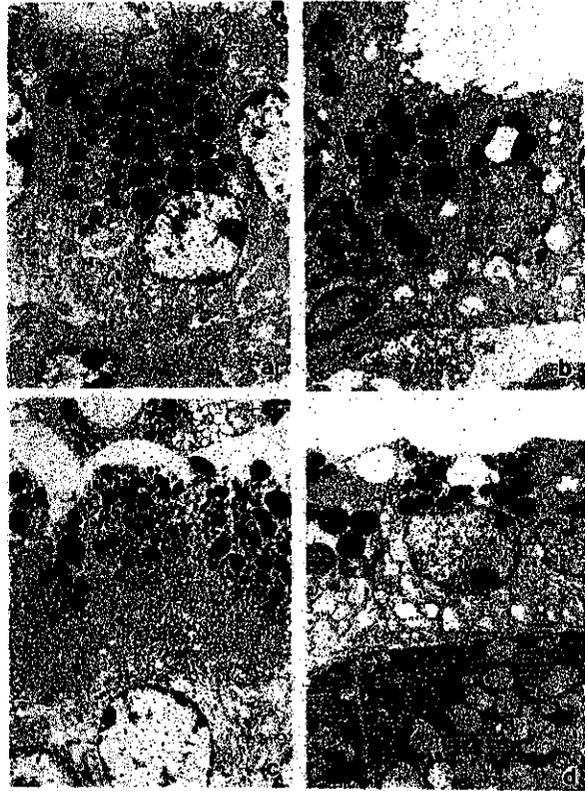


図21 α イソプロテレノール投与マウス顎下腺の変化： α イソプロテレノール投与により野生型では分泌顆粒の減少が誘導されるがSMP30欠損マウスでは変化が無い。
 a) 野生型マウス、無処置 b) SMP30欠損マウス、無処置 c) 野生型マウス、投与後 d) SMP30欠損マウス、投与後

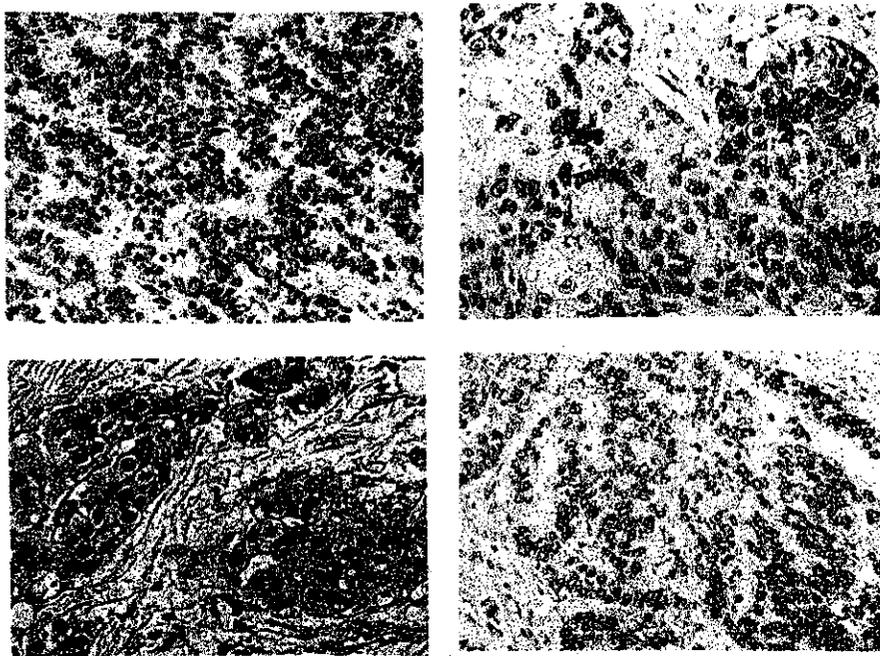


図22 腫瘍細胞におけるSMP30発現：肺小細胞癌（左上）、食道扁平上皮癌（右上）、乳癌（左下）、大腸癌（右下）

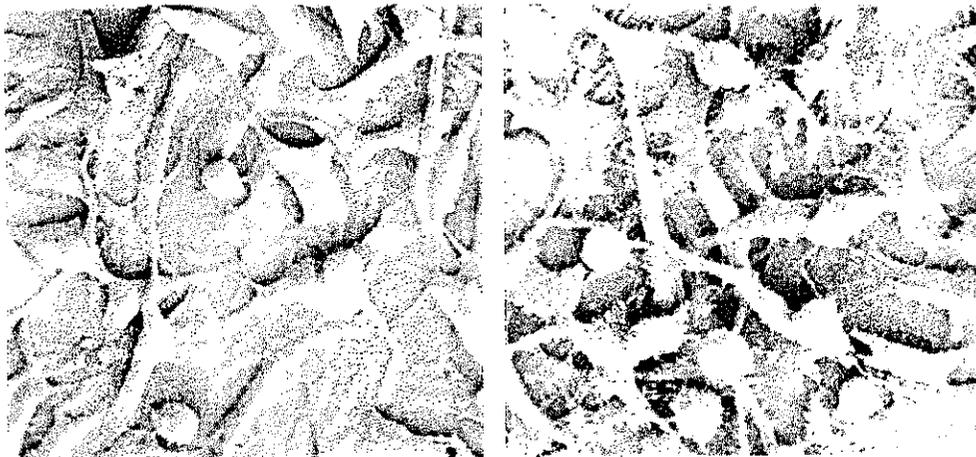


図23 HepG2細胞へのヒトSMP30 cDNA移入による細胞接着性の亢進：ヒト培養肝癌細胞 HepG2（左）にSMP30 cDNAを移入すると微絨毛が著明に増加した（右）。

BS-RP	VSTSNGLDWRERNLAMYIDTPTQELVRYSYDPOS GDVSNPEFVYRFQSD
SMP30	VDTSNGLDWSLDHKIFYYIDSLSYTVDAFDYDLOIGQISNRRIYVKMEKDE
SC-RP	VTLSNGLAWSLDNRYLYYIDSPTRKIFKFKEDLERGDISQREVLIDLKEYE

図24 SMP30アミノ酸配列中のRNA polymerase様配列：BS-RP, Bacillus subtilis RNA polymerase; SMP30, mouse SMP30; SC-RP, RNA polymerase subunit RPO26

核 細胞質



← SMP30

図25 リン酸化SMP30の証明：核および細胞質共にリン酸化を受けている。

ヒト **ISSIKFPCVLPENCRGGRSPVAVLWVSNLSLLEVDIPAKKVCRTPLSLSKCVORVLDAPVSSVALRQSCGYVALVGRKRCAL**
 ウシ **ISSIKFPCVLPENCRGGRSPVAVLWVSNLSLLEVDIPAKKVCRTPLSLSKCVORVLDAPVSSVALRQSCGYVALVGRKRCAL**
 ウサギ **ISSIKFPCVLPENCRGGRSPVAVLWVSNLSLLEVDIPAKKVCRTPLSLSKCVORVLDAPVSSVALRQSCGYVALVGRKRCAL**
 ラット **ISSIKFPCVLPENCRGGRSPVAVLWVSNLSLLEVDIPAKKVCRTPLSLSKCVORVLDAPVSSVALRQSCGYVALVGRKRCAL**
 マウス **ISSIKFPCVLPENCRGGRSPVAVLWVSNLSLLEVDIPAKKVCRTPLSLSKCVORVLDAPVSSVALRQSCGYVALVGRKRCAL**
 ニワトリ **ISSIKFPCVLPENCRGGRSPVAVLWVSNLSLLEVDIPAKKVCRTPLSLSKCVORVLDAPVSSVALRQSCGYVALVGRKRCAL**
 カエル **ISSIKFPCVLPENCRGGRSPVAVLWVSNLSLLEVDIPAKKVCRTPLSLSKCVORVLDAPVSSVALRQSCGYVALVGRKRCAL**

ヒト **NWKEQSAWVLAIVLNDKRNHLENECKVDPAGRYFAGTAPAVLREKCGAAYSLLEPDEHAKVYEDVDLSNGLDWSL**
 ウシ **NWKEQSAWVLAIVLNDKRNHLENECKVDPAGRYFAGTAPAVLREKCGAAYSLLEPDEHAKVYEDVDLSNGLDWSL**
 ウサギ **NWKEQSAWVLAIVLNDKRNHLENECKVDPAGRYFAGTAPAVLREKCGAAYSLLEPDEHAKVYEDVDLSNGLDWSL**
 ラット **NWKEQSAWVLAIVLNDKRNHLENECKVDPAGRYFAGTAPAVLREKCGAAYSLLEPDEHAKVYEDVDLSNGLDWSL**
 マウス **NWKEQSAWVLAIVLNDKRNHLENECKVDPAGRYFAGTAPAVLREKCGAAYSLLEPDEHAKVYEDVDLSNGLDWSL**
 ニワトリ **NWKEQSAWVLAIVLNDKRNHLENECKVDPAGRYFAGTAPAVLREKCGAAYSLLEPDEHAKVYEDVDLSNGLDWSL**
 カエル **NWKEQSAWVLAIVLNDKRNHLENECKVDPAGRYFAGTAPAVLREKCGAAYSLLEPDEHAKVYEDVDLSNGLDWSL**

ヒト **DHKRFVYVLDLSISYSVDAFDYDLDLQCGQISNRRSIVYKPKRPPQPLQACITLQKRLWVACVNGGRVIRLDEPGRKQIQVRI**
 ウシ **DHKRFVYVLDLSISYSVDAFDYDLDLQCGQISNRRSIVYKPKRPPQPLQACITLQKRLWVACVNGGRVIRLDEPGRKQIQVRI**
 ウサギ **DHKRFVYVLDLSISYSVDAFDYDLDLQCGQISNRRSIVYKPKRPPQPLQACITLQKRLWVACVNGGRVIRLDEPGRKQIQVRI**
 ラット **DHKRFVYVLDLSISYSVDAFDYDLDLQCGQISNRRSIVYKPKRPPQPLQACITLQKRLWVACVNGGRVIRLDEPGRKQIQVRI**
 マウス **DHKRFVYVLDLSISYSVDAFDYDLDLQCGQISNRRSIVYKPKRPPQPLQACITLQKRLWVACVNGGRVIRLDEPGRKQIQVRI**
 ニワトリ **DHKRFVYVLDLSISYSVDAFDYDLDLQCGQISNRRSIVYKPKRPPQPLQACITLQKRLWVACVNGGRVIRLDEPGRKQIQVRI**
 カエル **DHKRFVYVLDLSISYSVDAFDYDLDLQCGQISNRRSIVYKPKRPPQPLQACITLQKRLWVACVNGGRVIRLDEPGRKQIQVRI**

ヒト **PVDKFTSCTFCGGDYSERVYVTCARDGLNAGHGLRQFDAGNMFATIGLGVKGTAPYSYAG**
 ウシ **PVDKFTSCTFCGGDYSERVYVTCARDGLNAGHGLRQFDAGNMFATIGLGVKGTAPYSYAG**
 ウサギ **PVDKFTSCTFCGGDYSERVYVTCARDGLNAGHGLRQFDAGNMFATIGLGVKGTAPYSYAG**
 ラット **PVDKFTSCTFCGGDYSERVYVTCARDGLNAGHGLRQFDAGNMFATIGLGVKGTAPYSYAG**
 マウス **PVDKFTSCTFCGGDYSERVYVTCARDGLNAGHGLRQFDAGNMFATIGLGVKGTAPYSYAG**
 ニワトリ **PVDKFTSCTFCGGDYSERVYVTCARDGLNAGHGLRQFDAGNMFATIGLGVKGTAPYSYAG**
 カエル **PVDKFTSCTFCGGDYSERVYVTCARDGLNAGHGLRQFDAGNMFATIGLGVKGTAPYSYAG**

図26 高等動物種間におけるSMP30アミノ酸相同性：黒色部分がヒトSMP30アミノ酸と同一であることを示している。

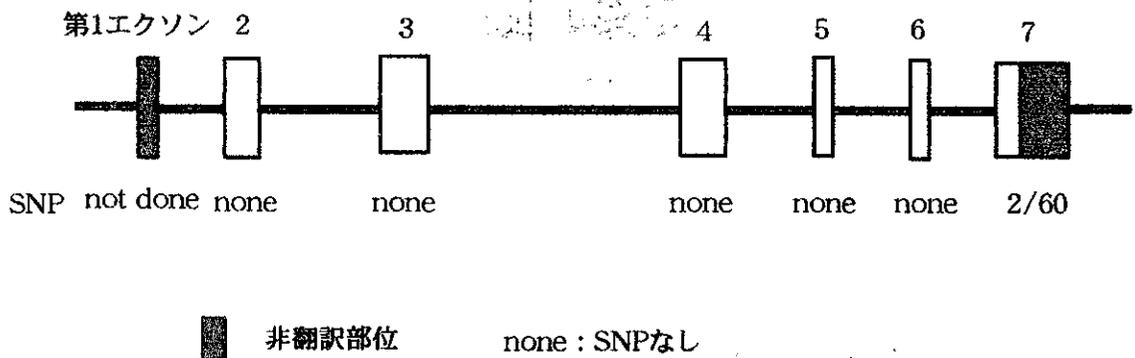


図27 ヒトSMP30遺伝子内におけるSNPの存在：第7エクソン中にSNPが存在した（60名中2名）。アミノ酸の変異は無かった。

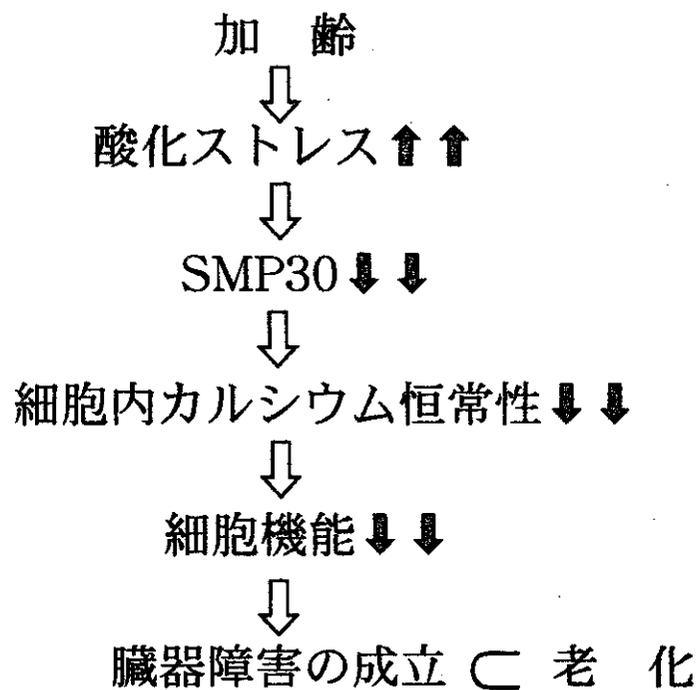


図28 SMP30減少と老化の概念図

平成13年度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

加齢臓器障害発症因子の分子解析と創薬の基礎的研究

分担研究者 後藤佐多良 東邦大学薬学部教授

【研究要旨】

臓器障害の指標としてタンパク質の酸化修飾（カルボニル化）に注目し、ラット(F344, ♂)の種々の組織タンパク質について加齢変化を調べた結果、老齢動物の腎臓において顕著な増加（若齢の50%以上）を認めた。老齢ラット（30ヶ月齢）では、若齢（10ヶ月齢）に比べて約10倍の尿タンパク質が検出された。また、尿中の血清アルブミンの酸化修飾の程度は、血漿中の値に比べて約2倍であった。これらの事実は、加齢に伴って発症する腎臓障害がタンパク質に対する酸化傷害によって惹起されている可能性を示唆している。

【研究目的】

生理的老化および種々の加齢関連疾患において、活性酸素による傷害の関与が示唆されている。たとえば、アルツハイマー病・パーキンソン病・脳梗塞などの神経変性疾患、動脈硬化、白内障、糖尿病合併症などいずれも活性酸素が関わっているとの報告がある。活性酸素の標的分子として膜脂質・核酸・タンパク質などがある。中でもタンパク質は、すべての生体機能に関わり、その異常は直接的に機能に影響する可能性があることから重要であると考えられる。

本研究では、加齢に伴って発症する多臓器障害の原因を分子レベルで解析し、その予防に役立つ方法を考案する。標的分子としてタンパク質に、また指標として酸化修飾に注目してその検出方法の確立および応用に関する研究を行う。

F344ラットは、加齢に伴って腎臓障害を起こすことが知られている。本年度は、老若F344を用いて尿タンパク質およびそのカルボニル化体の解析を行い、次年度以

降に、カルボニル化タンパク質の電気泳動解析、組織内分布について研究する。

さらに、これらの研究結果に基づいてSMP30ノックアウト動物における臓器障害について同様の指標に注目してタンパク質の酸化傷害の関与を検討する。

【研究方法】

タンパク質のアミノ酸側鎖は、活性酸素のヒドロキシラジカルとの直接反応によってカルボニル体に変化する。主たる酸化修飾アミノ酸残基は、リジン・アルギニン・プロリンとされている。カルボニル体は、古典的なカルボニル試薬である2,4-ジニトロフェニルヒドラチン(DNPH)との特異的反応で比色定量できる。

本年度は、まず老若動物の組織抽出液の除核上清中のタンパク質についてカルボニル体の測定を行った。すなわち、2M HClに溶解したDNPHと組織抽出液を混合し、15℃で1時間放置後、反応生成物を遠心沈殿し、未反応試薬を除去した。沈殿タン

パク質を十分洗浄後、8 M 尿素に溶解して 370 nm で比色定量した。一方、タンパク質定量を行い、タンパク質あたりのカルボニル量 (nmol/mg protein) として酸化修飾度を評価した。

また、尿量、尿タンパク質濃度、尿タンパク質総量、尿および血漿のカルボニル化アルブミン量を測定した。

【研究結果と考察】

脳・肺・肝臓・心臓・骨格筋のカルボニル化度は、いずれでも老若とも 2-3 nmol/mg protein で 7ヶ月齢と 25ヶ月齢の間で有意差は認められなかった (図 1)。それに対して腎臓では、若齢でも他の組織に比べて高い値 (約 4 nmol/mg protein) であり、老齢では、50%以上の増加を示した。一方、従来から加齢に伴って組織のカルボニル化タンパク質が増加すると報告されている。Stadtman らは、文献上のデータを整理して、ヒト・ラット・ハエ等の動物組織のカルボニル化タンパク質は、平均寿命の 1/2 程度のエイジで増加し始め、平均寿命を越えるエイジでは、2倍以上になると報告している (Stadtman, E.R. and Levine, R.L. Ann. NY Acad. Sci., 899: 191-208, 2000)。我々の動物飼育施設における F344 ラット (雄) の平均寿命は、約 29ヶ月であるので、もし文献値が正しければ、27ヶ月齢では若齢よりも高値を示してよいと思われるが、そうはならなかった。その原因は、不明である。

腎臓にカルボニル化タンパク質の増加が見られることと腎障害の発症の関連を調べるために、老若ラットの尿タンパク質を調べた。図 2 に示すように 10ヶ月齢と 30ヶ月齢の比較では、尿量において約 5 倍、

尿タンパク質濃度において約 50%増加していた。その結果、総タンパク質量では、約 10 倍 (若齢: 5.16 mg/day vs. 老齢: 55.74 mg/day) の増加が見られた。これらの事実は、平均寿命付近では、明らかな腎障害を発症していることを示唆している。腎障害とカルボニル化タンパク質の増加との関連が興味深い。

ゲル電気泳動による分離と抗血清アルブミン抗体による同定に基づいて尿タンパク質を調べた結果、全タンパク質の 90%以上が血清アルブミンであることがわかった。若齢では、この他に、分子量 (18 kDa) から $\alpha 2u$ グロブリンと思われるタンパク質が多く見られた。抗 DNPH 抗体による Western blot 法により血清アルブミンは、カルボニル化されていることが示された。そこで、血漿中のアルブミンと尿中のアルブミンでカルボニル化度に違いがあるかどうかについて両抗体を使って Western blot 法で調べた (図 3-a)。その結果、老若間に有意な違いは見られなかったが、老若動物とも尿中のアルブミンの方が約 2 倍高度にカルボニル化されていることがわかった (図 3-b)。この生理的あるいは病的意義は、明らかでないが、酸化傷害を受けた分子がより排泄されやすい、あるいは再吸収されにくいとしたら興味深いことである。

次年度以降は、老若ラットの腎臓組織のカルボニル化タンパク質について生化学的および免疫組織学的に調べ、臓器障害との関連を明らかにする予定である。

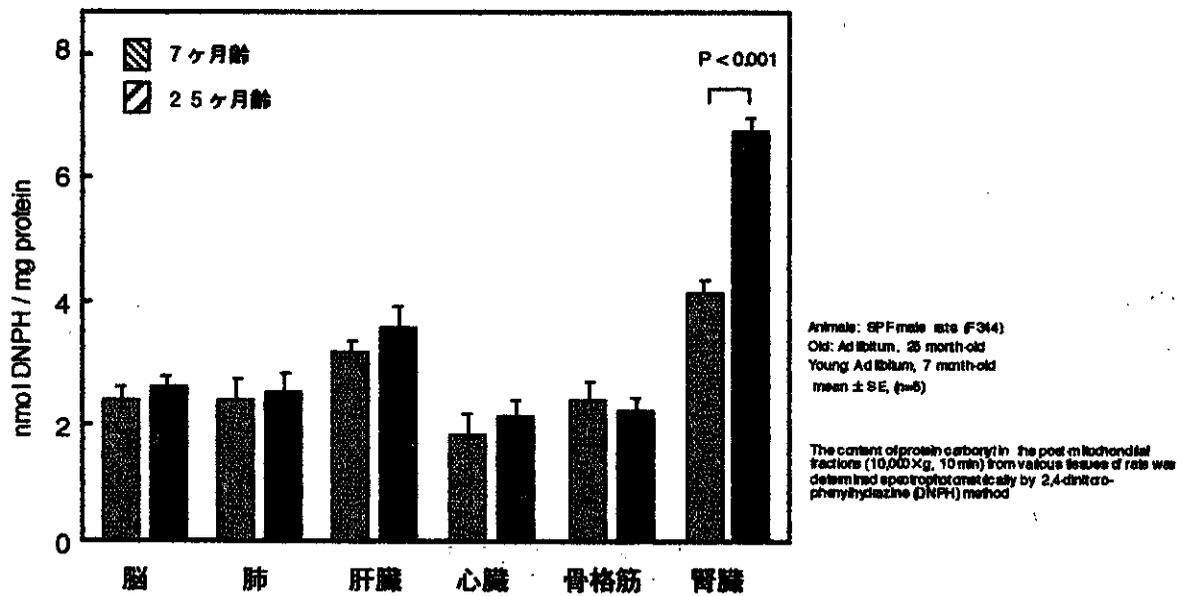


図1 老若ラット組織のカルボニル化タンパク質量

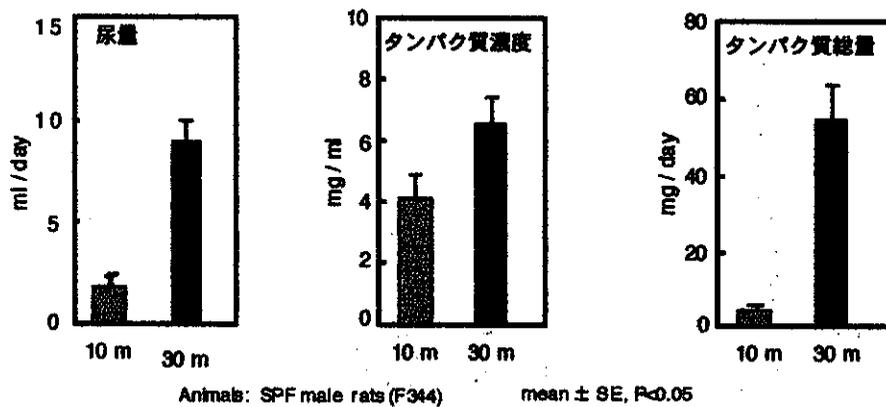


図2 老若ラットの尿量および尿タンパク質量

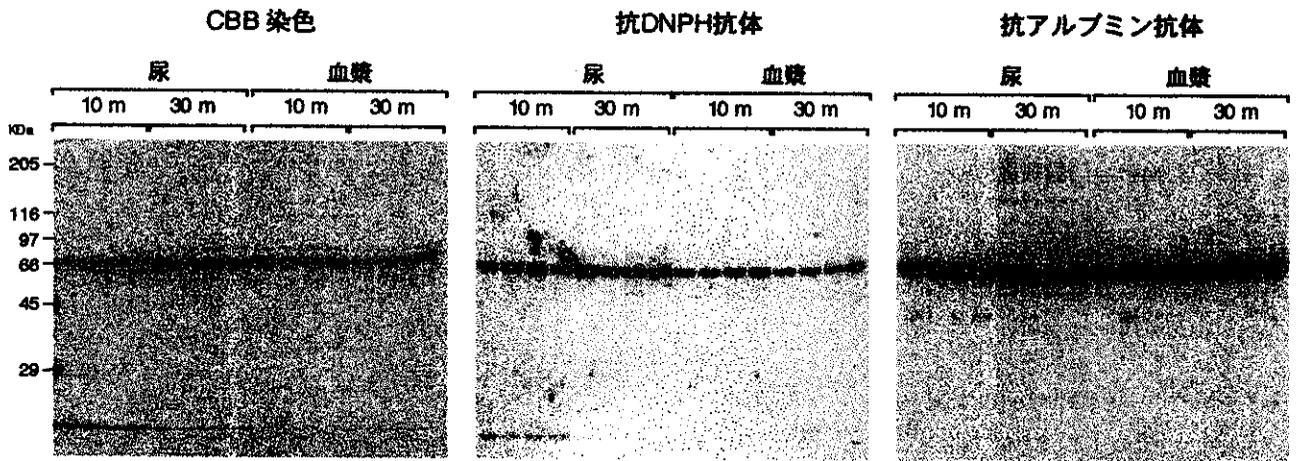


図 3-a 老若ラットの尿および血漿中タンパク質の抗DNP-H抗体および抗血清アルブミン抗体によるWestern blot解析

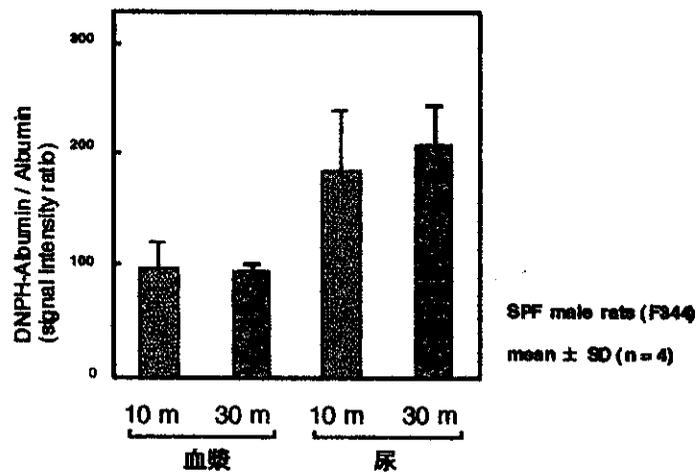


図 3-b 老若ラットの尿および血漿のカルボニル化アルブミン量

平成13年度厚生科学研究費補助金（長寿科学科学研究事業）
分担研究報告書

血管作動性分子と臓器障害

分担研究者 下澤達雄 東京大学医学部・臨床検査医学・助手

研究要旨 アンジオテンシン拮抗物質アドレノメデュリンは腎臓間質線維化に拮抗的に作用する分子であることが示唆された。アドレノメデュリンは細胞増殖抑制作用を持つことが明らかとなった。加齢に伴いアドレノメデュリンの発現が減少すると臓器障害が亢進する可能性が示唆された。

A. 研究目的

腎臓間質の線維化が腎機能障害に大きな役割を果たすことが近年明らかになってきており、糸球体の変化と同様に重要視されている。この間質の線維化は多くのサイトカインによって誘導されるTGF β の増加による細胞外基質の蓄積が原因と考えられている。最近、レニンアンジオテンシン系の働きが検討され、アンジオテンシンIIは間質細胞においてTGF β を誘導し、さらにCollagen type I, fibronectinなどの細胞外基質を蓄積させることが報告されている。

我々は内因性にアンジオテンシンの作用に拮抗する物質としてアドレノメデュリンに注目してきた。アドレノメデュリンは52個のアミノ酸からなるペプチドで、血管内皮、平滑筋をはじめ多くの臓器で産生されることが知られている。また、アドレノメデュリンは細胞内cAMPを増加させることで血管拡張作用を有することが知られているが、

最近の報告ではアンジオテンシン刺激下の血管平滑筋の遊走、増殖も抑制し、血管保護作用を有する可能性が考えられた。

そこで、今回我々はアンジオテンシンによる腎臓間質線維化に対しアドレノメデュリンが拮抗的に作用し、腎臓保護作用を有する可能性について検討した。

A. 研究方法

腎臓間質線維細胞NRK49Fを用いて、アンジオテンシンII刺激下の細胞増殖をチミジン取り込みで、細胞外気質の1型コラーゲン、フィブロネクチン、TGF β の発現をノザンプロットにて定量した。

また、アンジオテンシン刺激下の反応に対するアドレノメデュリンの作用を検討し、細胞内cAMPも同時に測定した。

アドレノメデュリンの受容体はCRLRにRAMP2, 3が結合することで特異性を持つことが知られているが、我々は用いた細胞でこれら受容体が存在するかをRT-PCRにて確認した。

B. 研究結果

1. アドレノメデュリン受容体の検討

RT-PCRによりNRK 49FにCRLRおよびRAMP2が存在することを確認した。

2. NRK49F細胞増殖におけるアドレノメデュリンの効果

10^{-6} から 10^{-9} Mのアドレノメデュリンは用量依存的に細胞増殖を抑制した(図1)。一方LDHに変化はなく、細胞障害は起こしていなかった。

3. アンジオテンシン刺激下の細胞増殖に及ぼす影響

10^{-6} MのアンジオテンシンIIは12時間で細胞のDNA合成を有意に増加させた(図2)。一方アンジオテンシン受容体拮抗薬のCV-11974はこの作用を抑制し、アンジオテンシンIIによる特異的な作用であることを確認した。

10^{-7} MのアンジオテンシンII刺激下で 10^{-6} Mのアドレノメデュリンを投与するとDNA合成は有意に抑制された(図3)。また、アドレノメデュリン受容体拮抗薬のCGRP8-37はこの作用を抑制した(図2)。

4. 細胞内cAMP濃度

図4に示すようにアドレノメデュリンにより細胞内cAMP濃度は上昇し、CGRP8-37により抑制された。

5. 細胞外基質発現に与える影響

図5に示すようにアンジオテンシンIIはTGF β 、フィブロネクチン、I型コラーゲンの発現を亢進した。この亢進はアドレノメデュリンあるいはCV11974により有意に抑制された。

C. 考察

加齢腎硬化症や末期腎不全においては間質の線維化が著明になることが知られており、この線維化のメカニズムが広く検討されている。間質の線維化は尿細管と線維芽細胞との相互作用により、線維芽細胞の増殖、単核球の浸潤と細胞外基質の増加によって発症するとされている。この機序に関わる分子としてアンジオテンシンII, エンドセリンといった血管作動物質、TGF β やPDGFといったサイトカインが挙げられている。アンジオテンシンIIはメサングウム細胞や尿細管上皮細胞においても細胞外基質を増加させることが知られているが、今回の検討でNRK49F細胞においても同様の結果が得られた。一方、今回の検討からアドレノメデュリンは単独でもアンジオテンシンIIとは反対の作用を有するうえにアンジオテンシンIIに拮抗することが明らかとなった。その機序としてアドレノメデュリンはTGF β の発現を抑制したことからアンジオテンシンIIの情報伝達に作用し、抑制的に働く可能性が考えられる。

NRK49F細胞はアドレノメデュリンを産生し、受容体も持つことから、内因性に線維化から臓器を保護するペプチドであると考えられる。このような臓器保護作用を加齢臓器に応用する可能性が示唆された。

D. 結論

血管拡張物質のアドレノメデュリンは腎臓間質線維化に拮抗的に作用する分子であることが示唆された。加齢に伴いアドレノメデュリンの発現が減少すると臓器障害が亢進する可能性が示唆された。

F. 研究発表（関連分のみ）

1. 論文発表

Eto Y, Shmosawa 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)

2. 学会発表

なし

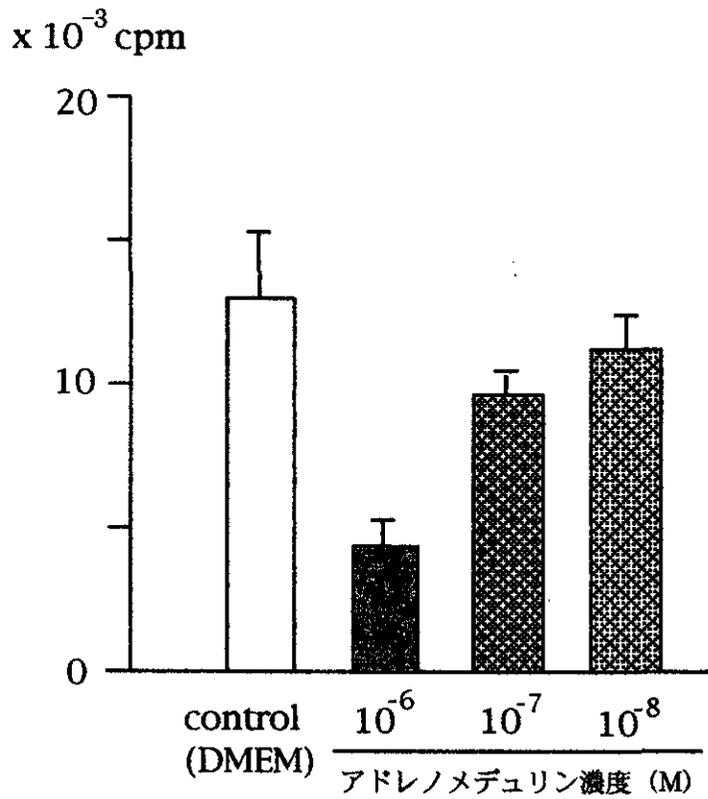


図1 アドレノメデュリンの細胞増殖抑制効果：対照と比較して濃度依存性に細胞増殖が抑制されている。

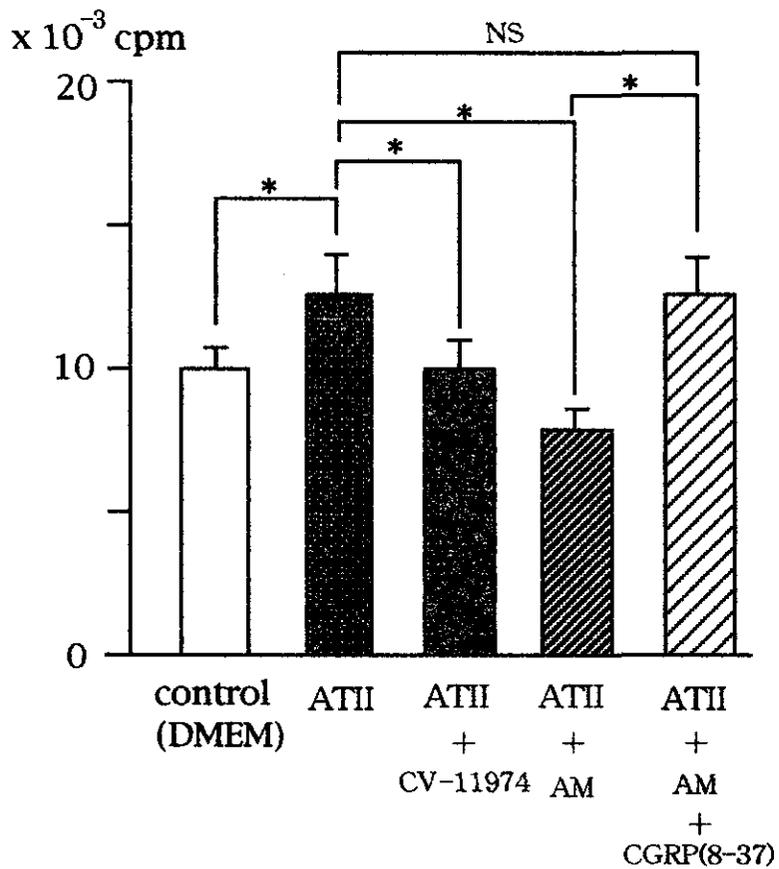


図2 アンジオテンシンII (ATII)による細胞増殖とアドレノメデュリンの効果：*有意差あり。