

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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 丸山 直記

平成15(2003)年3月

目 次

【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

【分担研究報告】

- 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・・・・・・・・ 4
丸山直記
- 内因性抗酸化物質の欠乏によるインスリン抵抗性糖尿病の発現モデル・・・・ 16
下澤達雄
- 加齢臓器障害発症因子の分子解析と創薬の基礎研究・・・・・・・・・・・・ 19
後藤佐多良

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・研究部長

研究要旨

高齢者疾患の背後にある生体機能の低下や障害の発症機序を解析した。この研究を独創的なものとするために 2 つのユニークな分子とその遺伝子破壊モデルマウスを用いて解析した。一つは高等動物において極めて高度に遺伝子配列が保存されており加齢に伴い減少する加齢指標蛋白質 SMP30 と血管作動性分子アドレノメデュリンである。この 2 つの分子は酸化ストレスと密接に結びついている分子であり、老化あるいは老年病の発症にとって重要な要因である。平成 14 年度は SMP30 が酸性フォスファターゼ活性を持つことを明らかにしたことが重要成果である。SMP30 の酸性フォスファターゼ活性は pH5.3 が最高の至適 pH であった。細胞内においてこのような pH 環境にある細胞内小器官としてはライソソームであり、SMP30 欠損動物において老化の指標として定着しているリポフスチン様分子が多数出現していることを最も合理的に説明するものである。他の重要な成果としては SMP30 欠損動物の寿命が短縮することを明らかにしたことである。この事実は本研究で開発・解析してきた SMP30 欠損マウスが老化のモデル動物として有用であることを示すものである。同時に各臓器における加齢障害を解析するために利用できることが明らかとなった。もう一つの研究対象である酸化ストレス拮抗分子として昨年度に血管性病変を抑制することを明らかにしたが、本年度はアドレノメデュリン欠乏個体が加齢に伴い肥満と糖尿病を発症する発見がなされた。発症する糖尿病はインスリン抵抗性であり酸化ストレス拮抗剤により改善された。この発見は新しい糖尿病の発症機序を明らかにしたものであり今後、糖尿病の診断や治療に重要な要素となる。したがって生活習慣病から老年病への移行の研究に重要な示唆を与える。

【研究組織】

分担研究者

丸山直記 東京都老人総合研究所・
研究部長

石神昭人 東京都老人総合研究所・
研究員

下澤達雄 東京大学医学部・臨床検査医学・助手

後藤佐多良 東邦大学薬学部・生化学・
教授

A. 研究目的

加齢に伴い複数の臓器に様々な障害が発生し高齢者の生活の質（QOL）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研究成果を得て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している。

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数あるが、殆どは既知の分子を中心に行われている。あるいは特定の限られた臓器にしか出現しない分子について行われていることも多く、多臓器障害の発症機序を解析するには ubiquitous に発現する分子あるいは血液循環する分子を対象とすることが望ましい。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解析している。一つは加齢のプロテオーム解析の過程で発見された加齢指標蛋白質 SMP30 である。毛一つの機能分子は血管作動性アドレノメデュリンである。

B. 研究方法

1. 加齢指標蛋白質 SMP30 欠損マウスを長期飼育して寿命への影響を解析した。
2. SMP30 の減少・欠損が呼吸器に与える影響を解析した。
3. SMP30 欠損動物の腎臓の形態学的観察を行った。12ヶ月齢の正常マウスと比較した。
4. SMP30 高感度測定系の開発を行った。
5. SMP30 の酵素活性を同定を行った。また既知の活性である DFP 分解能につい

てイオン要求性を検討した。

6. 精製ラット SMP30 を用いて高次構造解析のための結晶化条件を検討した。またリン酸化部位の決定をプロテオーム解析により行った。

7. アドレノメデュリン欠乏マウスの加齢病態を解析した。

8. 肝臓と腎臓における蛋白質のカルボニル化の加齢変化を解析した。特にアルブミンを指標蛋白質とした。

C. 結果

SMP30 欠損動物の寿命を正常動物と比較すると欠損動物の寿命が短縮していた。出生後の急激な死亡率上昇がみられないことから老化モデル動物として有用であることがわかった。

SMP30 欠損マウスの肺は肺胞径が増加していたが肺胞破壊係数には差が無かった。老人性肺のモデルとなりえる可能性が示唆された。

SMP30 欠損個体の腎臓糸球体は上皮細胞の足突起が融合していた。これは加齢に伴う腎硬化症を反映している。

尿細管上皮には多数のリポフスチンが沈着していた。これは SMP30 の減少が老化病態の重要な要因であることを示している。

欠損動物では肺胞径が正常に比較して拡大していることが明らかとなり老人肺のモデルとして有用である可能性が示唆された。肝臓では欠損動物に脂質の沈着が亢進し、中性脂肪、コレステロールおよびリン脂質のいずれもが増加していることが明らかとなった。

現在ウシ SMP30 に対するモノクローナ

ル抗体を作製している。これを用いて血中および尿中 SMP30 の高感度測定系を確立する。

神経毒（コリンエステラーゼ阻害物質）である DFP の分解はマグネシウム、マンガン等の 2 価の陽イオンが必要であるがカルシウムを必要としなかった。また pH5.3 の至適である酸性フォスファターゼ活性を有することを発見した。

ラット SMP30 を結晶化する条件を決定し放射光 (Spring8) を利用して解析している。SMP30 のリン酸化部位を決定した。臨床病理学的解析に利用するためのリン酸化 SMP30 特異的抗体の作製を開始した。

アドレノメデュリン欠乏マウスは加齢に伴い肥満となり糖尿病を発症することを発見した。その糖尿病はインスリン抵抗性であることがわかり酸化ストレスを軽減する医薬で改善されることを明らかにした。

加齢に伴い蛋白質のカルボニル化が増強していた。ミトコンドリア分画のカルボニル化を解析したところ野生型が SMP30 遺伝子破壊マウスに比較して酸化障害が強かった。

D. 考察および今後の課題

本課題は加齢に伴い出現する病態を分子レベルで解析するものであり特に遺伝子欠損動物の有効な利用がポイントである。

いずれの解析においても遺伝子破壊動物は正常の動物画が発症する病態が早期に出現していた。言い換えればこれらの分子は抗老化作用を有する分子である。この事実を基に近い将来に創薬としての応用が期待される。

本研究ではようやく欠損個体の病態が明

らかにされ始めており、今後はヒトにおいて同様の欠損個体の発見が期待される。そのような発見により老年病学に新しい疾患概念を提供し長寿医療に貢献する。このための簡便な診断法が望まれるが次年度中に開発を行いたい。

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

高等動物において極めて高度に遺伝子配列が保存されており加齢に伴い減少する加齢指標蛋白質 SMP30 の機能と多臓器障害との関連を解析した。平成 14 年度の研究成果としてもっとも注目すべきことがらは SMP30 が酸性フォスファターゼ活性を持つことを明らかにしたことである。酸性フォスファターゼ活性は pH5.3 が最高の至適 pH であった。細胞内においてこのような pH 環境にある細胞内小器官としてはライソソームがあげられる。この事実は SMP30 欠損動物において老化の指標として定着しているリポフスチン様分子が多数出現していることを最も合理的に説明するものである。他の重要な成果としては SMP30 欠損動物の寿命が短縮することを明らかにしたことである。この事実は本研究で開発・解析してきた SMP30 欠損マウスが老化のモデル動物として有用であることを示すものである。同時に各臓器における加齢障害を解析するために利用できることが明らかとなった。

分担研究者

石神昭人・東京都老人総合研究所・研究員

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。

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。この様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

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。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. 研究方法と研究結果

1. 加齢指標蛋白質 SMP30 欠損動物に出現する老化病態

① 老化モデル動物としての SMP30 欠損マウス

SMP30 欠損マウスの加齢に伴う生存率の変化を解析した。2年間で各グループ 50-80匹による生存率を求める予定である。現在まで雄の欠損型 (SMP30-KO) と野生型 (SMP30-WT) の生存率を比較した途中経過をまとめた結果からは SMP30 欠損型は短命であることが明らかとなった (図1)。

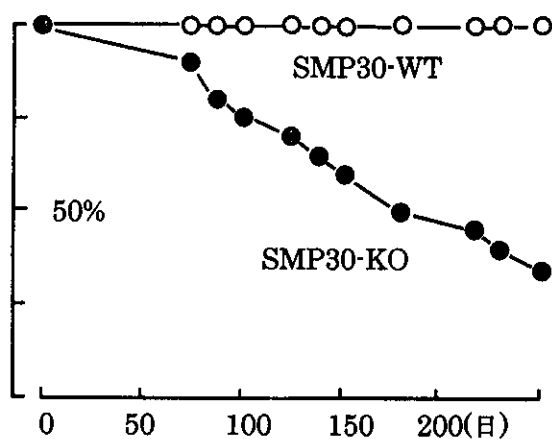


図1 生存率変化

SMP30 欠損型マウスは出生後、急激に死亡することが無いところから新しいタイプの老化モデル動物として利用できることが示唆された。死亡の原因は確定的ではないが感染症では無いことは明らかである。現在のところ著しいい瘦が認められ何らかの代謝異常あるいは消化管からの吸収障害が考えられている。特に小腸における吸収能の低下があると思われるところから小腸上皮の微絨毛の発達について超微形態学的

な解析を進めている。

②呼吸器病態

高齢者における呼吸器疾患として重要なものの一つに慢性閉塞性肺疾患 (COPD) がある。我々の樹立した SMP30 欠損マウスモデルにおける呼吸器の変化を解析した。本研究の対象となった SMP30 の発現は気道上皮細胞とクララ細胞に強く発現されていた。更に小気管周囲の肺胞マクロファージや形質細胞、そして平滑筋細胞にも SMP30 は発現していた。しかし肺胞中隔には発現は検出できなかった。加齢に伴う SMP30 の発現を解析した。肺における SMP30 の発現は極めて少なく、発現の定量化は real-time PCR 法を開発して行った。その結果、正常 (野生型) のマウスでは SMP30 の発現は mRNA レベルでは 12ヶ月齢がもっとも多くなっていた (図2)。これは他の臓器 (肝臓・腎臓) が通常6ヶ月齢で最高値を示すことと比べて呼吸器特異的な発現様式であった。肺組織における SMP30 分子の発現も 12ヶ月が最大であった。

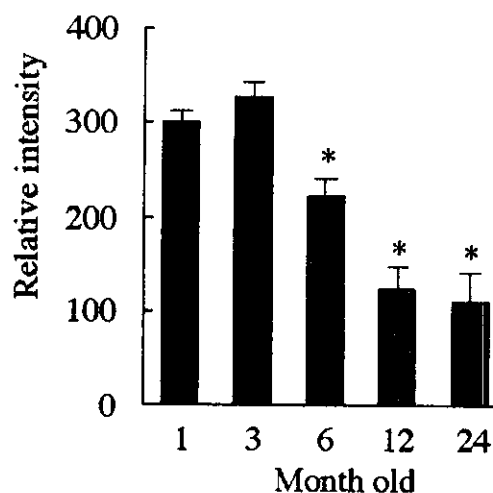


図2-1 腎臓 SMP30 発現変化

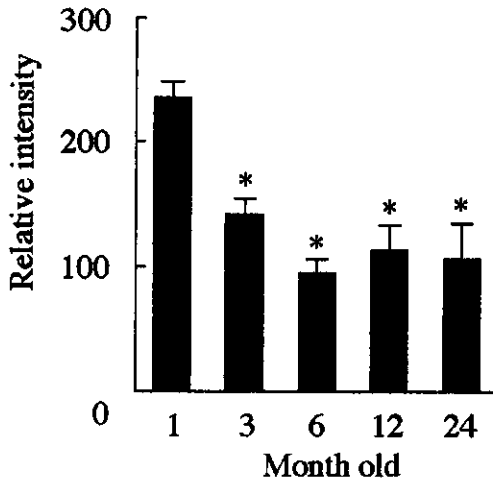


図 2-2 肝臓 SMP30 の発現変化

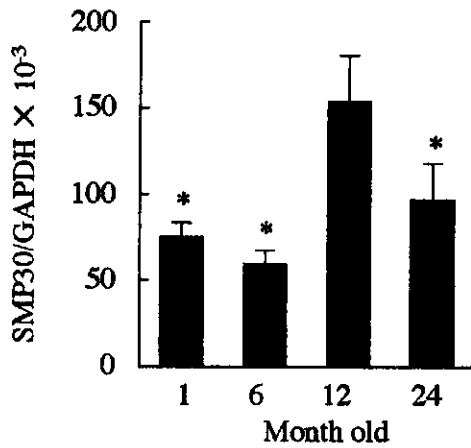


図 2-3 肺 SMP30 の発現変化

次に高齢者の肺臓では破壊を伴わない気腔の拡大による老人肺が出現する。また時に肺胞中隔が狭くなり断裂するものが多く、その結果、肺気腫を形成する。以上の老人性変化は呼吸器感染症の母地となるので、その発症機序の解明は重要である。我々は SMP30 欠損マウスを用いて肺胞径 (MLI) の定量化を行った。その結果 SMP30 欠損マウス肺 (■) は野生型マウス (□) より肺胞径が比較的若い時期に有意に拡大していることが明らかとなった (図 3-1)。

組織像も野生型(図 3-2)よりも欠損型(図 3-3) がやや肺胞腔が拡大している。これは老人肺に類似した所見である。

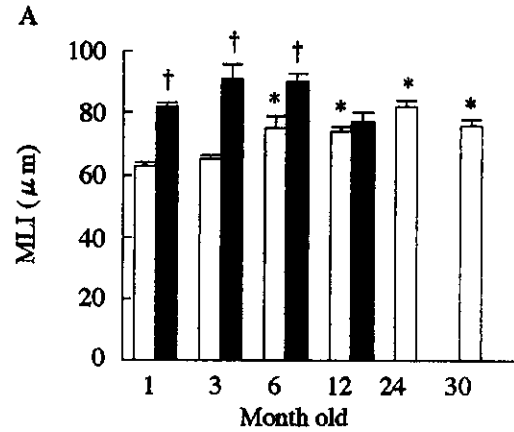


図 3-1 肺胞径 (MLI) の変化

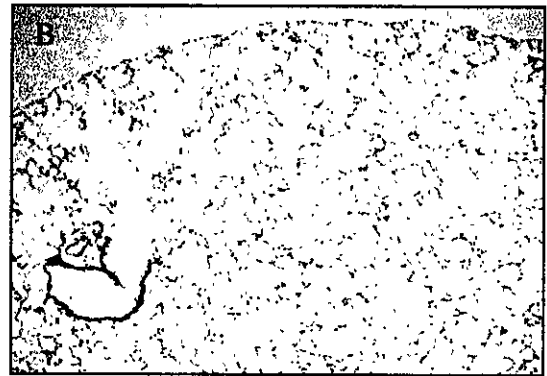


図 3-2 SMP30 野生型

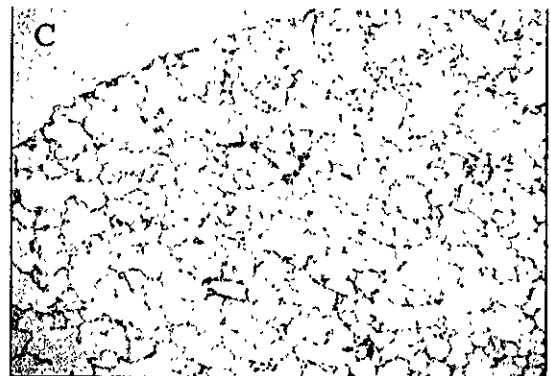


図 3-3 SMP30 欠損型

しかしながら肺胞破壊係数 (DI) では野生型と欠損型の有意の差が認められなかった (図4)。

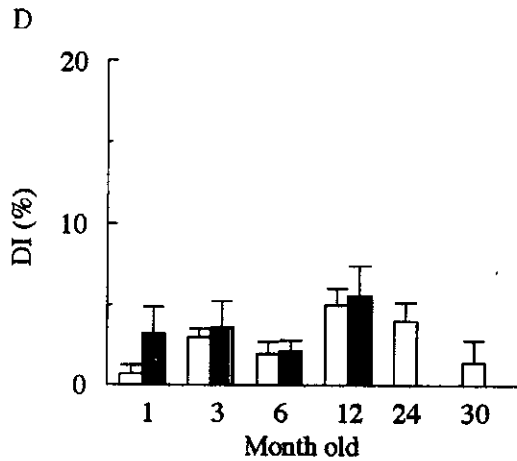


図4 肺胞破壊係数 (DI)

以上の結果は加齢と共に SMP30 が減少すると SMP30 欠損マウスと同様のレベルになるために肺胞径の増加が促進されることが示唆された。したがって SMP30 欠損マウスは加齢呼吸疾患のモデル動物として有用である可能性が示唆された。現在、喫煙による影響を解析している。

③腎病態

ヒトでは加齢に伴い腎硬化症が進行してくる。その中心的な病態は糸球体硬化症である。その結果、新規透析導入の原因疾患としては加齢に伴う腎硬化症が最も多く医療経済学的に重要な問題となっている。老齢の SMP30 欠損マウスの腎臓病変を野生型と比較検討した。その結果欠損マウスの腎尿細管には野生型 (図5-1) に比較して数多くのリポフスチン様の褐色顆粒が蓄積していた (図5-2, -3)。



図5-1 野生型尿細管

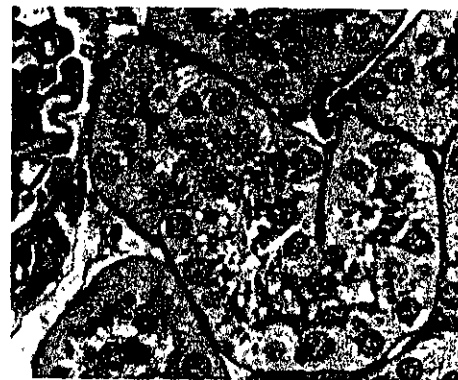


図5-2 SMP30欠損尿細管
(顆粒がリポフスチン様粒子)

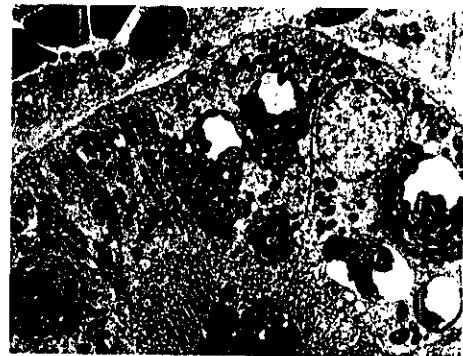


図5-2 SMP30欠損尿細管の
電子顕微鏡像 電子密度が高い構造物が
多数認められる。

リポフスチンは老化の形態学的特徴の代表的なものであることから、SMP30 欠損マウスは老化モデルとして有用であることを強く示唆している。

一方糸球体にも明らかな病変が認められた。12ヶ月齢の SMP30 欠損マウスの特徴としては糸球体上皮細胞の足突起の癒合が顕著であった (図6-1, 2)。

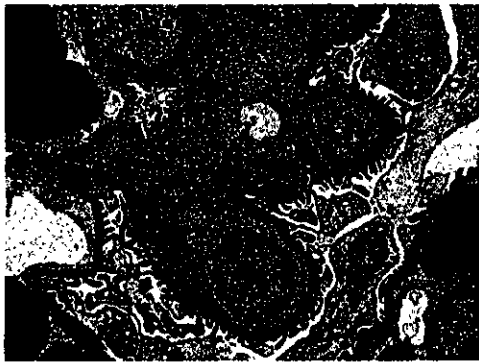


図 6-1 野生型腎糸球体 (12ヶ月齢)
足突起が明瞭である。

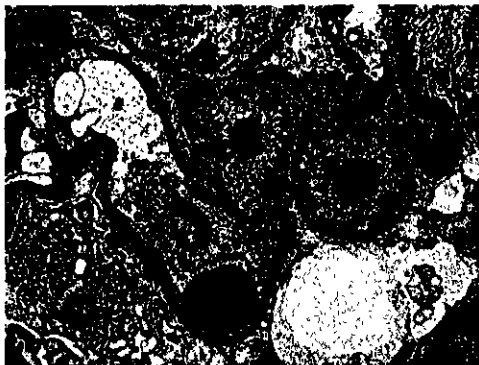


図 6-2 欠損型腎糸球体 (12ヶ月齢)
足突起が融合している。

この所見は蛋白尿の所見と対応するものである。現在は抗がん剤を含めた各種医薬が尿細管上皮細胞に及ぼす影響を観察し、SMP30 欠損マウスが生物学的検定法の一つとして用いる可能性を検討している。我々の仮説が証明されれば SMP30 欠損マウスは医薬品開発および薬害予防に有用であると考えられる。

④肝臓病態

SMP30 欠損マウス間における脂質代謝異常: SMP30 欠損マウス肝臓を観察すると野生型マウスと比較し、加齢に伴い脂質が増加していることを発見した (図7-1, 2)。観察を開始した3ヶ月齢ですでに増加していた。

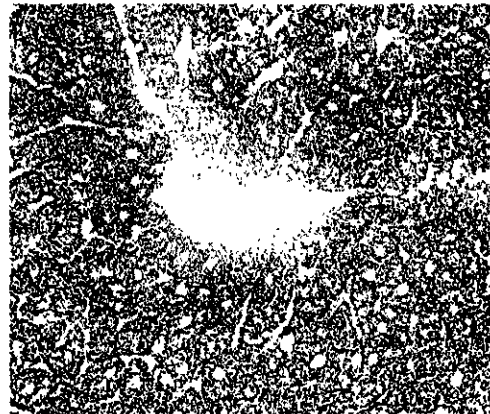


図 7-1 野生型肝臓 (12ヶ月齢)

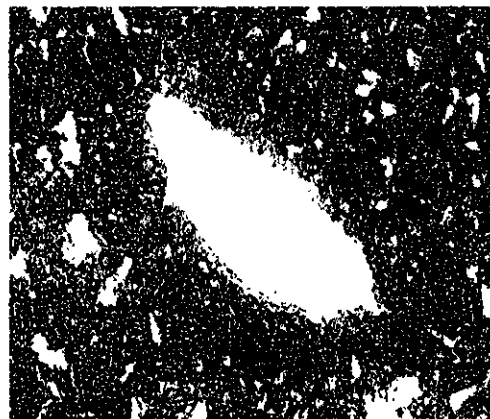


図 7-2 欠損型肝臓 (12ヶ月齢)
脂肪滴 (黒色顆粒) が顕著である。

その内容としては12ヶ月齢の肝臓では中性脂質、コレステロールおよびリン脂質が野生型マウスと比較して増加することが明らかとなった (図8)。中性脂肪は欠損マウスでは野生型と比較して約2倍であった。

薄層クロマトグラフィーによる脂質成分の解析を行ったところリン脂質が全般にわたり増加していた。特にカルジオリピンが増加していたが細胞内ではカルジオリピンはミトコンドリアの膜成分であるところからライソゾームの発達と関連していると考えられる。

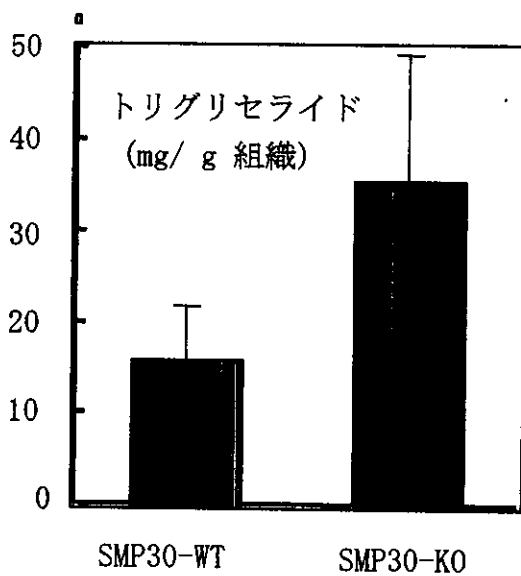


図 8-1 肝臓トリグリセライド量

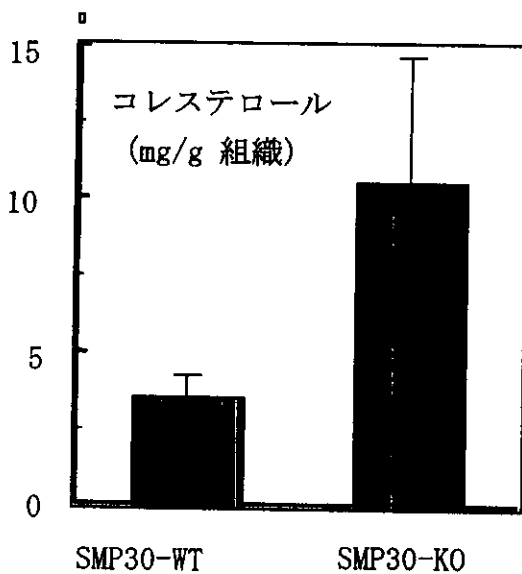
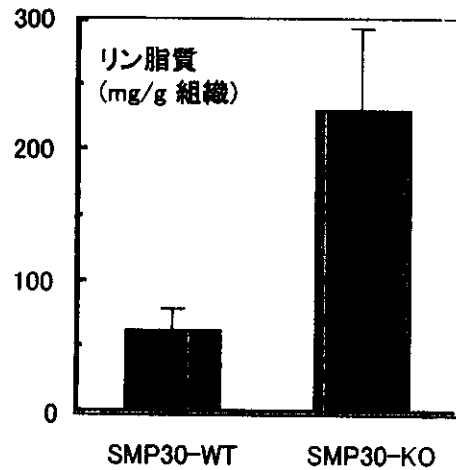


図 8-2 肝臓コレステロール量



* $p < 0.05$, SMP30-KO vs. SMP30-WT, $n=5$

Aromatase 欠損マウスにおける SMP30 の発現 : Aromatase 欠損マウスにおいては SMP30 の発現が亢進していることを見出した。Aromatase は androgen から estrogen への変換を行うが aromatase 欠損マウスでは脂肪沈着が顕著であることから脂肪代謝と SMP30 の関連がここでも示唆された。

2. 高齢者のための臨床応用に向けた取り組み

①臨床検査試薬の作製

製薬会社との共同研究により血中および尿中 SMP30 の微量高感度測定系を開発中である。測定系に使用するモノクローナル抗体を作製している。抗原としてヒト SMP30 を用いることについて病理解剖肝臓を検討したが発現量が少なく、また倫理面からも困難なため安定した量を確保するためにヒト SMP30 と極めて類似したアミノ酸配列を有する牛 SMP30 を用いている。SMP30 はアミノ酸配列が動物間で極めて類似しており、特にヒトと牛の SMP30 間

のアミノ酸配列の差はマウス SMP30 から見てヒトと牛に共通した差異は21箇所となりモノクローナル抗体の作製には有利である。測定系の確立後は SMP30 欠損症の同定を行う予定である。

②糖尿病性腎症における SMP30 の発現

糖尿病性腎症の患者について生検を施行した際に得られた病理標本を用いて SMP30 の発現様式を検討した。軽症腎炎組織では近位尿細管刷子縁でのみ陽性であった。糖尿病性腎症では刷子縁での発現は18%の症例で増強し、55%の症例で減弱していた。増強群では正常群より一日尿蛋白量、糸球体硬化度、細小動脈硬化度が軽く、低下群より間質線維化度が軽かった。細胞質での陽性例は約55%で陰性群に比較して間質線維化度が強く予後も不良であった。PCNA 陽性群は陰性群に比較して細胞質での SMP30 陽性例が少ない傾向があった。以上の結果は糖尿病性腎症において SMP30 の発現量や局在部位が腎症のパラメーターとなる可能性を示した。

③ヒト B 型肝炎ウイルスの X 遺伝子導入マウスに導入における SMP30 発現

ヒト B 型肝炎ウイルスの X 遺伝子を導入した肝臓における SMP30 の発現を解析したところ SMP30 の発現量の亢進を観察した。現在、SMP30 遺伝子の発現調節領域との関連を解析している。この発現増加が合目的であるかどうか最も興味ある項目である。

3. 基礎的研究

①SMP30 の酵素活性

Arylesterase 活性: SMP30 のアミノ酸配列における他の遺伝子産物との相同性を解析した結果、既に報告した RNA polymerase との相同性に加えて arylesterase との相同性があることを見出した。まず SMP30 が arylesterase 活性を有するかを検討したところ、全く活性が検出できなかった。

DFPase 活性: SMP30 は神経毒物のサリン、ソマン、タブンなどを分解する organophosphatase の活性を有することから類似の物質であるが毒性の低い DFP を用いて活性化の条件を検討した。その結果、至適 pH は約 7.2 の中性領域であり 2 価陽イオンが必要であった (図 9)。2 価陽イオンのうちでカルシウムは全く活性化に必要ではなかった。この結果は SMP30 は人工化学物質の暴露に対する抵抗性を有していることを示している。SMP30 の現象・欠損は臓器障害の要因となることを示唆している。

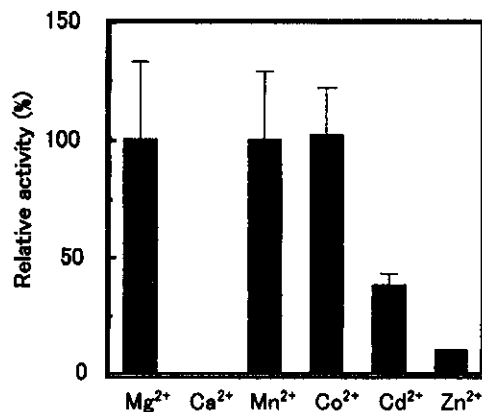
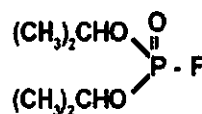


図 9 DFPase の 2 価陽イオン要求性

酸性フォスファターゼ活性：生体内物質を分解する可能性を網羅的に解析し SMP30 が至適 pH5.3 において酸性フォスファターゼとして活性を有することを発見した。このような至適 pH は細胞内では一般にライソソームで得られることから SMP30 がライソソーム酵素として働いていることを示唆している。現在、ライソソームにおける SMP30 の局在を免疫電顕により検討している。以上の事実は老化過程における細胞内物質分解系の障害が加齢臓器障害の原因であるとする仮説を裏付けるものである（投稿準備中）。

本研究の進行中にホタルの発光に関与する分子 LRE が発見され、それがホタルの SMP30 であることが明らかとなった。LRE はホタルの発光において必要とされるルンフェリンを再生する機能を持っている。そのため高等動物の SMP30 との酵素活性を比較したところ LRE は DFPase 活性を有するが高等動物の SMP30 は LRE 活性を持っていないことが明らかとなった。

②SMP30 の分子解析

SMP30 高次構造解析：産業技術総合研究所・千田俊哉博士との共同研究により将来的な創薬のための基礎的な解析として高次構造の解明を進めている。本年度は結晶化の基礎的条件の確定に集中し、結晶化条件確定し現在回折点データを収集している（図 10）。来年度中には高次構造の解明が終了する予定である。現在まで SMP30 は水溶液中で 2 量体となっているとの結果が得られている。高次構造解析の結果は将来的に SMP30 分子の機能的ドメインの解明と創薬の基礎的な情報となる。

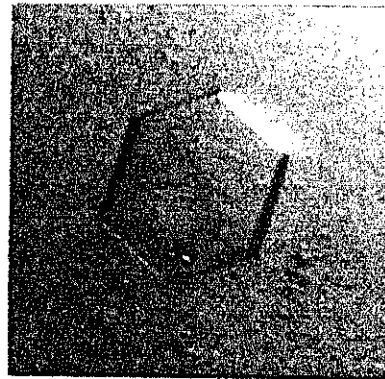


図 10 結晶化された SMP30

SMP30 リン酸化部位の同定：生体分子のリン酸化は分子の機能の多様性と密接に関連している。我々はプロテオーム解析により SMP30 のリン酸化部位を同定した（投稿準備中）。現在、このリン酸化部位に特異的に反応する抗体の作製を行っており、病態解析への応用を計画している。

③SMP30 の遺伝子解析

SMP30 の分子進化：実験動物としてのハムスターの SMP30 の cDNA のクローニングし塩基配列を決定しアミノ酸配列を解析し他の脊椎動物と比較した。その結果、他の動物種と比較してヒトの SMP30 のアミノ酸配列との間に極めて高度なアミノ酸配列の保存性があることが確認された。この結果は脊椎動物において SMP30 は極めて高度に保存された 299 個のアミノ酸から構成されていることを強化した結果である。この解析に基づいた SMP30 の分子進化の系統樹を作製した（図 11）。この結果は SMP30 の医学・生物学的意義の重要性をさらに示すものである。この結果から SMP30 を基にした資源バンクを構築し SMP30 が

有する様々な機能に由来する創薬の可能性を検討している。

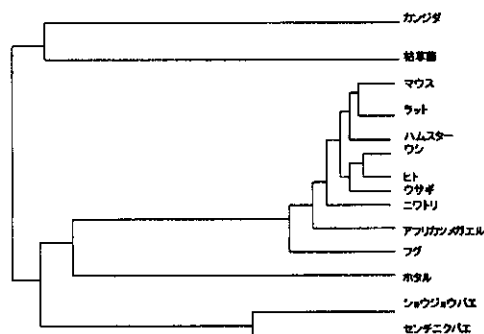


図 1 1 SMP30 の分子進化系統樹

C. 考察

今年度は加齢指標蛋白質である SMP30 が有する酵素活性について多くの知見が得られ、その減少が臓器障害へと発展してゆく機序が明確となった。これまでの解析で SMP30 は有機リン化合物を分解することが明らかとなり環境有害物質に生涯にわたり暴露されることが加齢臓器障害をもたらす可能性を提唱してきた。しかし有機リン化合物はあくまでも人工物であり、そのために下等動物も含めて殆ど全生物種が SMP30 遺伝子を有していることは極めて不自然である。したがって生体中に酵素の基質となる物質がいかなるものかが重要な課題であった。本年度の成果として SMP30 が酸性フォスファターゼであることを明らかにした。その至適 pH が 5.3 であることからこのような酸性条件は細胞内ではライソソームでのみ得られると考えられる。現在ライソソーム内における SMP30 の局在を検討しているが局在が認められるならば加齢に伴うリポフスチンの増加の機序が明らかとなる。実際に SMP30 欠損動物の腎

尿細管にはリポフスチン様の分子が野生型に比較して多数認められることは我々の仮説を支持するものである。臓器障害については昨年度の成果に加えて今年度も引き続き新しい知見が得られている。特に肝臓における脂質の沈着は重要な所見である。また高齢者における腎糸球体所見を反映した超微形態像が得られ、腎硬化症の発症にも SMP30 の発現減少が関与していることを示唆している。この結果は昨年度にカロリー制限食を与えた実験動物の SMP30 の発現が増加し、その寿命が延長した事実によく対応する結果である。

D. 結論

加齢に伴う多臓器障害は SMP30 の減少が重要な事柄である。SMP30 はライソソーム内で酸性フォスファターゼとして機能し、SMP30 減少による分解系の低下が細胞障害をもたらす老化として表現される。

E. 健康危険情報

特に該当する項目は無かった。

F. 研究発表 (関連論文のみを記す)

①誌上発表

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. 6:7-12, 2002

Okada M, Ogasawara H, Kaneko H, Hishikawa T, Sekigawa I, Hashimoto H,

- Maruyama N, Kaneko Y, Yamamoto N: Role of DNA methylation in transcription of human endogenous retrovirus in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 29:1678-1682, 2002
- Ishigami A, Fujita T, Handa S, Shirasawa T, Koseki H, Kitamura T, Enomoto N, Sato N, Shimosawa T, Sato N, Maruyama, N: Senescence marker protein-30 knockout mouse liver is highly susceptible to TNF- α and Fas-mediated apoptosis. *Amr J Pathol* 161:1273-1281, 2002
- 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 105:915-919, 2002
- Ishigami A, Ohsawa T, Asaga H, Akiyama K, Kuramoto M, Maruyama N: Human peptidyldeiminase Type II: Molecular cloning, gene organization and expression in human skin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 407:25-31, 2002
- Ishigami A, Asaga H, Ohsawa T, Akiyama K, Maruyama N: Protein deimination and peptidylarginine deiminase expression during cornification of rat epidermal keratinocytes. *Biomedical Research* 23:145-151, 2002
- Ishigami A, Handa S, Maruyama N, Supakar PC: Nuclear localization of senescence marker protein-30, SMP30, in cultured mouse hepatocytes and its similarity to RNA polymerase. *Biosci Biotech Biochem* 67:158-160, 2003
- Ishii K, Abe K, Tsubaki K, Yamamoto M, Ishigami A., Maruyama N, Akita M: Ultrastructural changes of submandibular gland granular duct cells in senescence marker protein-30 (SMP30) knockout mice. (投稿中)
- Mori T, Ishigami A, Seyama K, Onai R, Kubo S, Shimizu K, Maruyama N, Fukuchi Y: Senescence marker protein-30 knockout mouse as a novel murine model of senile lung.(投稿中)
- Maruyama N, Ishigami A: Critical role of Senescence Marker Protein-30 (SMP30) in age-associated diseases. In "Current Prospects of Aging Science" pp57-64, 2002
- 丸山直記、石神昭人、倉元雅史：加齢臓器障害の分子機序とその克服 生体の科学 53:425-431, 2002
- ②口頭発表
丸山直記：リアルタイム PCR による老化関連遺伝子 SMP30 の解析経験から

「遺伝子発現プロファイリング解析の現状と今後」東京分子医学研究所セミナー
2002.6.25 東京

丸山直記、石神昭人、倉元雅史：加齢指標蛋白質 SMP30 による個体老化制御
日本生化学会シンポジウム「老化研究最前線 分子から個体老化へ」第 75 回日本生化学会 京都市 2002.10.14-17

丸山直記：老化を測る SRL セミナー
2003.1.31

Shimosawa T, Matsui H, Maruyama N, Ando K, Fujita T: Adrenomedullin an endogenous antagonist against oxidative stress, Study with knock out mouse. 19th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, June 23-27, 2002 Prague, Czech Republic

Kasahara Y, Hamano A, Ishigami A, Maruyama N: Development of monoclonal antibody specific to Senescence Marker Protein (SMP30), and its application on immunoassay. The 18th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Kyoto 2002.10.20-25

Imasawa T, Nagano T, Utsunomiya Y, Kawamura T, Maruyama N, Mitarai T: Glomerular reconstitution by bone marrow-derived cells can regulate mesangial deposition of

immunoglobulins. American Society of Nephrology, 35th Annual Meeting, Philadelphia 2002.11.1-4.

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, 3.26-28)

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, 3.26-28)

下澤達雄、松井宏光、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, 3.26-28)

森 貴紀、小内玲子、石神昭人、久保幸穂、清水一枝、瀬山邦明、福地義之助、丸山直記：加齢指標蛋白質 SMP30 の肺における発現の検討 第 25 回日本基礎老化学会 つくば市 2002, 5.17-18

山座治義、村岡いずみ、千葉卓哉、土谷智史、遠山啓亮、黨 和夫、樋上賀一、石神昭人、丸山直記、下川 功：カロリー制限による加齢指標蛋白質 SMP30 の発現と局在の変化について 第 25 回日本基礎老化学会 つくば市 2002, 5.17-18

石神昭人、南波玲子、大沢多加子、半田節子、久保幸穂、倉元雅史、丸山直記：

SMP30 遺伝子欠損マウス肝臓における脂質成分異常の解析 第 25 回日本基礎老化学会 つくば市 2002, 5.17-18

町口敏彦、米本智美、木村記代、木村秀樹、鈴木 亨、石神昭人、丸山直記、吉田治義：NIDDM の尿細管障害における老化マーカー蛋白質 SMP30 の臨床病理学的意義 第 45 回日本腎臓学会学術総会 大阪市 2002, 5.23-25

叶澤孝一、松田昭彦、今澤俊之、永野忠相、吉川 賢、伊東佳子、清水納子、松村 治、御手洗哲也、丸山直記：各種糸球体疾患における VEGF 発現の解析 第 45 回日本腎臓学会学術総会 大阪市 2002, 5.23-25

丸山直記 北村庸雄 榎本信行 佐藤信紘：加齢指標蛋白質 SMP30 遺伝子破壊によるアポトーシス感受性亢進と臓器変化 第 38 回日本肝臓学会総会 大阪市 2002, 6.13-14

石井甲介、椿 恵樹、山本昌範、太田 康、丸山直記、田中嘉代子、穉田真澄：老化マーカー蛋白質 (SMP30) の顎下腺における局在とその機能的意義 第 34 回日本臨床電子顕微鏡学会総会 札幌市 (2002, 9.27-28)

倉元雅史、石神昭人、半田節子、久保幸穂、丸山直記：加齢指標蛋白質 SMP30 のアポトーシス抑制作用 第 75 回日本生化学会 京都市 2002.10.14-17

近藤嘉高、石神昭人、倉元雅史、馮 冬芸、下門顕太郎、丸山直記：加齢指標蛋白質 SMP30 が持つ有機リン分解酵素活性の新規同定 第 25 回日本分子生物学会 横浜市 2002.12.11-14

石神昭人、小内玲子、森 貴紀、瀬山邦明、清水一枝、福地義之助、久保幸穂、丸山直記：加齢指標蛋白質 SMP30 の肺における発現の加齢変化 第 25 回日本分子生物学会 横浜市 2002.12.11-14

馮 冬芸、石神昭人、半田節子、近藤嘉高、倉元雅史、町田武生、丸山直記：加齢指標蛋白質 SMP30 はカルモジュリン結合能を有する 第 25 回日本分子生物学会 横浜市 2002.12.11-14

重本和宏、久保幸穂、太田光熙、太田潔江、植田規史、阿部康人、松田正司、丸山直記：抗 MuSK 抗体陽性の重症筋無力症患者の検索 第 25 回日本分子生物学会 横浜市 2002.12.11-14

G. 知的財産権・出願登録状況
本年度は無い。

内因性抗酸化物質の欠乏によるインスリン抵抗性糖尿病の発現モデル

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 血管作動性分子アドレノメデュリンは細胞庇護作用を持ち、加齢に伴う臓器障害に関与している。本研究では加齢に伴いアドレノメデュリン欠乏マウスが加齢指標蛋白質に伴い肥満となり糖尿病を発症することを発見した。生活習慣病から老年病への移行における酸化ストレスの役割に関して示唆を与える重要な所見である。

A. 研究目的

加齢による酸化ストレスの蓄積は各種臓器障害、疾患の原因と考えられる。アドレノメデュリンは内因性の抗酸化作用を持つことが明らかとなっている。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、ノックアウトマウスを用いた検討から、抗酸化作用を有することが明らかとなった (Shimosawa T et al. Circulation, 2002)。

そこで、今回我々は加齢による酸化ストレス蓄積による各種病態の発症をアドレノメデュリンノックアウトマウスを用いて検討した。アドレノメデュリン完全欠損は胎児期に死亡することから研究には発現量が半分に減少したheterozygousマウスを用いた。

B. 研究方法

アドレノメデュリンノックアウトマウスの6ヶ月齢、12ヶ月齢を野生型と比較検討した。空腹時血糖および骨格筋でのインスリン刺激下の糖取り込み、IRS、

PI3K活性を既報の方法で検討した。

C. 研究結果

加齢アドレノメデュリン欠損マウスの空腹時血糖は有意に高く (120 ± 6 mg/dl vs. 91 ± 5 mg/dl, $n=12$; $P<0.02$)、酸化ストレスのマーカである尿中イソprostanoタン排泄量も増加していた (図1)。

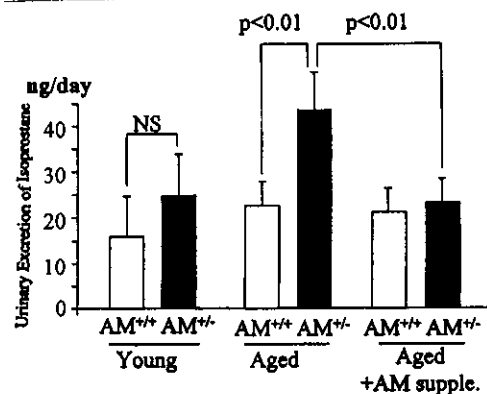


図1 尿中イソprostanoタン排泄量

また、若年マウスと比較して骨格筋でのインスリン刺激下の糖の取り込みの抑制 (図2) と IRS、PI3Kの活性も抑制が観察された (図3)。また加齢マウスにSOD様物質のTempolやアドレノメデュリンを長期投与するとインスリン抵抗性が改善された (図4)。

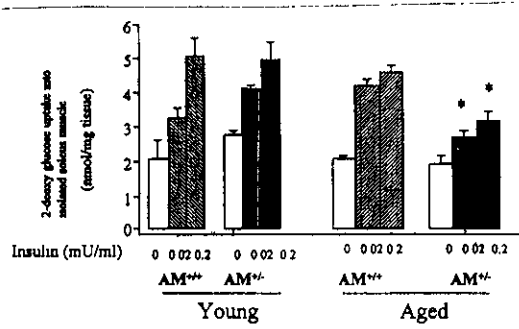


図2 インスリン刺激による糖の取り込み (骨格筋)

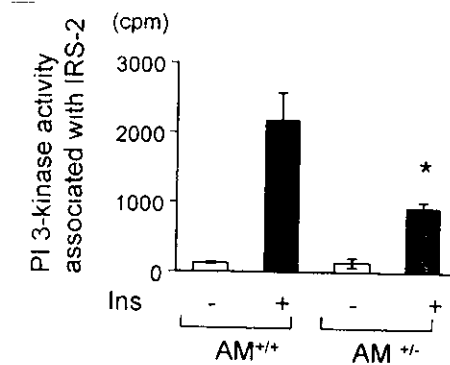


図3D 老齢マウスにおけるPI3K活性

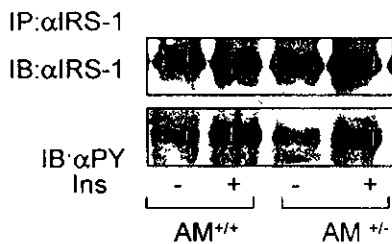


図3A 若齢マウスにおけるIRS活性

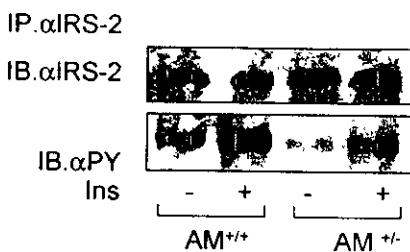


図3B 老齢マウスにおけるIRS活性低下

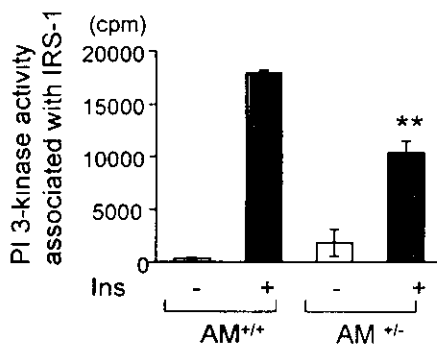


図3C 若齢マウスにおけるPI3K活性

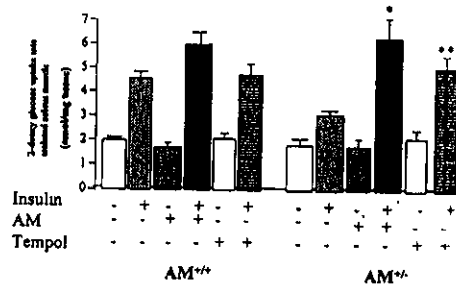


図4 各種抗酸化物質の投与によるインスリン抵抗性の改善

D. 考察

加齢による酸化ストレスの蓄積は各種臓器障害、疾患の原因と考えられる。今回我々のもちいたアドレノメデュリン欠損マウスは野生型に比して著明に酸化ストレスが蓄積するモデルである。本モデルでは耐糖能異常が加齢に伴い惹起され、抗酸化物質のTempolやアドレノメデュリンの投与により改善することができた。このことから、本モデルは加齢による臓器障害と酸化ストレスとの関連の研究に有用であると考えられる。

E. 結論

アドレノメデュリンの長期欠損は酸化ストレスの蓄積を介してインスリン抵抗性を発症させる。この知見は生活習慣病から老年病への移行を考えるうえで重要なものと考えられる。

F. 研究発表 (関連分のみ)

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. 6:7-12, 2002

Kanosawa K, Shimosawa T, Nagasawa R, Matsuda A, Kato H, Matsumura O, Mitarai T, Isoda K, Fujita T : Mature form of adrenomedullin is a useful marker to evaluate blood volume in hemodialysis patients. Am J Kidney Dis 40:794-801, 2002

Kawai J, Ando K, Shimosawa T, Harii K, Fujita T : Regional hemodynamic effects of adrenomedullin in Wistar rats: a comparison with calcitonin gene-related peptide. Hypertens Res 25:441-446, 2002

Shimosawa T, Shibagaki Y, Ishibashi K, Kitamura K, Kangawa K, Kato S, Ando K, Fujita T: Adrenomedullin, an endogenous peptide, counteracts cardiovascular damage. Circulation 105:106-111, 2002

Shimosawa T et al: Deficiency of adrenomedullin induces insulin resistance by increasing oxidative stress. Hypertension (印刷中)

G. 知的所有権の取得状況
なし