

20030225

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15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 丸山 直記

平成16年(2004)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

丸山 直記・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1

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

丸山 直記、石神 昭人・・・・・・・・・・・・・・・・・・4

2. モデル動物における加齢臓器障害の病態解析

下澤 達雄・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・16

3. 加齢臓器障害の定性と定量化に関する基礎的研究

石神 昭人・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・20

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・加齢臓器障害研究グループ・研究部長

研究要旨

老年病の背後にある生体機能の低下や臓器障害の発症機序を解析した。

【研究組織】

分担研究者

丸山 直記 東京都老人総合研究所・加齢臓器障害研究グループ・研究部長

下澤 達雄 東京大学医学部・臨床検査医学・助手

石神 昭人 東京都老人総合研究所・加齢臓器障害研究グループ・研究員

研究要旨

老年病の背後にある生体機能の低下や臓器障害の発症機序を分子レベルで解析した。この研究を独創的なものとするために遺伝子破壊モデルマウスを用いた。老化抑制分子 SMP30 の減少・欠損は「普通の老化」が促進されることを明らかにした。また高次構造解析に成功し、臨床検査試薬の開発と併せて臨床応用への道筋を明らかにした。血管作動性分子アドレノメデュリン欠乏は糖尿病発症に重要な要因であることを明らかにし、老年病に於ける生活習慣病の関わりを考える成果となった。細胞を構成する蛋白分子の「老化」を反映する脱イミノ化がアルツハイマー病の重症度の推定に用いることを明らかにした。

A. 研究目的

加齢に伴い全身の臓器に様々な障害が発生し、臓器機能の低下が生じ高齢者の生活の質（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・蛋白質レベルで解析し、予防法の開発に資する研究成果を得て実際の高齢者医療に外挿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、ほとん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。従って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に解析することが望ましいと考えられる。本年度は3つの生体分子が加齢に伴い分子、細胞、組織、臓器にいかなる影響を与えているのかを解析した。その3項目は1) 老化抑制分子である SMP30、2) 血管作動性分子アドレノメデュリン、3) peptidylarginine deiminase (PAD) により翻訳後修飾を受けた脱イミノ化蛋白質である。

B. 研究方法

①老化抑制分子 SMP30 については欠損動物の長期飼育による臓器障害を病理形態学的に観察した。また喫煙および薬剤障害に対する感受性について解析した。SMP30 分子に関しては酵素活性の検討と高次構造解析を産業技術総合研究所千田俊哉研究員との共同研究で行った。初代肝細胞培養法により SMP30 が有する抗酸化機能について解析した。研究成果の臨床応用を進めるために臨床検査試薬の開発を開始した。高感度の SMP30 測定系に用いるためのモノクローナル抗体を作製した。

②血管作動性分子アドレノメデュリン欠乏病態の解析は加齢、低酸素刺激、大腿動脈周囲カフ装着モデルを用いて、それぞれインスリン抵抗性、肺高血圧、動脈炎に対するアドレノメデュリンの治療効果を検討した。

③翻訳後修飾が PAD によりなされた分子の同定をアルツハイマー病脳において行った。抗脱イミノ化蛋白質抗体による免疫染色と質量分析機による脱イミノ化蛋白質の同定を行った。

C. 結果

①老化抑制分子 SMP30 の解析

欠損マウスは外的な傷害に対して障害の閾値が低下することを明らかにした。喫煙では気管支上皮にアポトーシスが顕著に認められた。また抗ガン剤のシスプラチン投与では尿細管上皮の核変性が野生型（正常）マウスに比較し顕著となった。

欠損マウスでは野生型に比較して早期に典型的な老化の形態学的な指標となる「リポフスチン」と「老化関連 β -galactosidase」が出現することがわかった。この事実は我々が

考えるところの「普通の老化」の出現が促進される唯一のモデル動物であることが明らかとなった。本モデルマウスの応用が有用であるとする基礎的な成果である。

肝臓における SMP30 分子の発現は中心静脈周囲に強く発現していた。初代肝細胞培養で解析したところ発現が充分な細胞と全く発現していないものとの 2 群に分けられたところから SMP30 の発現様式から老化型と若齢型に分類でき、中間型が極めて少ないことがわかった。これは老化への移行様式を考える際に重要な現象である。

SMP30 の酵素活性はアミノ酸配列の一部に相同性を示す paraoxonase 1 とは基質特性が異なることを明らかにした。

SMP30 の結晶化による高次構造解析に成功した。

臨床検査医学への応用に資するための検査試薬に用いるためのモノクローナル抗体を現在まで 5 クローン樹立した。その後もクローンの数の増加と特異性の検定を行っている。

②血管作動性分子アドレノメデュリンによる病態の解析

アドレノメデュリンは血管作動性分子であり下澤等がその欠乏モデルマウスを開発した。その結果、酸化ストレスに対する抵抗性の低下に起因して心血管系疾患ばかりではなく糖尿病も出現することが明らかとなった。これらの結果を基にしてアドレノメデュリンの酸化ストレスに対する抵抗性について解析を行った結果、抗酸化を介した生活習慣病および老年病の治療薬の可能性を明らかにした。

③脱イミノ化蛋白質を中心とした解析

脱イミノ化酵素 PAD はペプチド内の arginine 残基を citrullin 残基に転換する酵

素であるが、その酵素により様々な蛋白質が脱イミノ化を受けて傷害された組織に検出される。本研究においてアルツハイマー病患者脳、海馬領域を非アルツハイマー病患者脳と比較すると脱イミノ化蛋白質が顕著に増加していることを明らかにした。この事実は他の臓器障害にも応用が可能であり臓器障害の定性化と定量化法開発に貢献する新しいアプローチであることが明らかとなった。

D. 考察および今後の課題

本課題で解析対象となった分子に関してはいずれも臨床応用の開発を開始することができた。今後はこのこれらの臨床検査試薬等の応用面での研究開発が最も重要となる。

E. 結論

老化抑制分子 SMP30 は老年病態に重要な因子であることを確定した。血管作動性分子アドレノメデュリンは糖尿病を含めた生活習慣病を抑制する分子であることを明らかにした。脱イミノ化蛋白質の同定は老年病態の定性化・定量化に応用できることを明らかにした。

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・加齢臓器障害研究グループ・研究部長
分担研究者 石神 昭人 東京都老人総合研究所・加齢臓器障害研究グループ・研究員

研究要旨

アミノ酸配列が高等動物において極めて高度に保存されている生体分子 SMP30 の加齢に伴う減少がどのような老化病態と関連するのかを解析した。平成15年度では代表的な老化の病理形態学的指標であるリポフスチンと老化関連 β -galactosidase が SMP30 欠損マウスにおいて早期に出現することを明らかにした。この事実は遺伝子操作により「普通の老化」が促進されるモデル系が作製されたことを示している。また SMP30 の有する酵素活性の解析が進行し paraoxonase とは類似しているが同一ではないことを証明し、さらに真の生体内基質の同定に近づいたことが重要な事柄である。また SMP30 欠損マウスは高齢者の薬剤障害克服への応用が展望された。臨床応用にもっとも重要である SMP30 の高感度測定系の確立については、必須であるほとんど全ての動物種に反応するモノクローナル抗体を得ることが樹立され、高感度測定系の作製は最終行程に至っている。今後はこれらのモデル動物系や SMP30 測定系のヒトにおける利用が今後の重要な課題となった。また創薬への基礎資料となる高次構造解析は米国研究グループとの競合において主任研究者は優位になり現在、学術報告の準備をしている段階である。

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や臓器機能の低下、言い換えれば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。この個体差はまさに老化の特徴である。個体差の出現には多くの外的・内的因子が関与していることが容易に想像できる。従って加齢病態を多因子性疾患として扱うことが必要である。本研究課題は加

齢病態発症に関与する数多くある候補因子のなかから、最も重要な因子を同定し、その性状を基礎的に解析するものである。その研究成果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研究課題である。本課題に独創性を持たせるために主任研究者が発見した老化抑制分子 SMP30 を中心に解析を行った。SMP30 は老化研究の過程で主任研究者により発見された老化指標蛋白質と命名された分子量約3万で299個のアミノ酸から構成される分子である。そのアミノ酸配列は高等動物間

で高度に保存されており、また下等動物にも存在している。この事実は SMP30 が生物にとって重要な役割を持っていることを示唆している。以上のような背景から我々は加齢に伴う SMP30 の減少あるいは欠損がどのような老化病態を発症させるのかを解析し、老年病への応用を検討した。

B. 研究方法

①SMP30 ノックアウトマスの形態学的観察

12ヶ月齢の SMP30 欠損マウスと野生型マウスの肝臓及び腎臓をヘマトキシリン・エオジン染色法を用いて光学顕微鏡で観察した。老化関連 β -galactosidase の活性化は pH6 で行った。また発色後ヘマトキシリンで共染色を行った。

②初代肝細胞培養法

定法に従いコラーゲナーゼ処理し初代培養をおこなった。SMP30 およびアルブミンの免疫染色はいずれもポリクローナル抗体および 2 次抗体を用いた。

③Paraoxinase 基質特異性の検出

酵素試料として精製ラット SMP30 を用いた。SMP30 が有する paraoxinase 1 との共通基質特異性の検出は 2 価陽イオンであるカドミウム存在下においてなされた。

④抗酸化作用測定

SMP30-KO マウスと野生型マウスの肝臓における活性酸素種(ROS)、過酸化脂質、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、還元型グルタチオン(GSH)の定量を行った。ROS の産生は蛍光基質である DCFDA (Molecular Probe 社) から DCF への酸化により測定した。過酸化脂質は、チオバルビツール酸 (TBA) 法により定量した。スーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、還元型グルタチオン(GSH)は、それぞれ SOD Assay Kit-WST (同仁化学研究所)、Total Glutathione Quantification Kit (同

仁化学研究所) を用いて定量した。

⑤モデル動物に於ける傷害誘導

喫煙: 柴田科学社製タバコ煙発生装置 SG200 を使用し、Kentucky 大学タバコ 1R1 を用いて 1%タバコ煙を調製し、1日1回30分、週5日間、4週間継続して喫煙させた。その後、肺を摘出し病理標本を作製し観察した。またアポトーシスは TUNEL 法により検討した。

抗ガン剤: cisplatin を SMP30 欠損型および野生型マウスに腹腔内投与した。投与後1週間後に腎臓を摘出し病理標本を観察した。

⑥SMP30 結晶化解析

精製ラット SMP30 を用いて 10 mM-Tris/HCl (pH8.0) で透析し CdCl_2 との共結晶化を行った。共結晶化で得られた結晶を用いて X 線回折強度データ測定を行った。

⑦抗 SMP30 モノクローナル抗体作製

ウシ SMP30 を精製し SMP30 欠損マウスにアジュバントを用いて免疫を行った。マウス血清における抗体価とモノクローナル抗体のスクリーニングはウシ SMP30 を抗原として ELISA 法により行った。また樹立したモノクローナル抗体の特異性は精製ラット SMP30 および SMP30 欠損マウスおよび野生型マウスの比較検討を Western blotting 法により行った。

C. 結果

①「普通の老化」モデルの確立

従来の老化研究で遺伝子破壊法により確立された老化モデル動物とされるものは寿命が延長したり、極端な老化病態を発現するものだけであった。いわゆる「普通の老化」が促進するモデル動物は存在しなかった。ここで言う「普通の老化」モデルとは個々の研究者によりとらえ方が異なると思われるが本報告者は特定の疾患に罹患しない実験動物で幾つかの老化の特徴を備えているものとして幅広く定義

した。このような「普通の老化」が促進されるモデル動物の確立は極めて重要であり、幅広い応用法が考えられる。我々は「普通の老化」の形態学的標識としてのリポフスチンと Senescence associated- β -galactosidase (SA- β -gal) が SMP30 遺伝子欠損マウスに早期に出現するのかを検討した。12ヶ月齢の野生型マウスと SMP30 欠損マウスの全身臓器の形態学的観察を行った結果、欠損マウスの腎臓近位尿細管上皮には多数のリポフスチンが沈着していた。電子顕微鏡の観察ではリポフスチンに対応して、細胞内小器官であるライソソームが極度に膨加し電子密度の高度な物質が存在していた。 β -galactosidase は本来ライソソーム内の酵素で pH4 で活性化されるが正常の細胞にも多量に存在している。しかし加齢に伴い SA- β -gal も出現してくる。これは pH4 で活性化する通常の β -galactosidase 遺伝子から alternative splicing で産生される β -galactosidase であり pH 6 領域で強い活性を示す。この SA- β -gal はリポフスチンとともに「普通の老化」にとって典型的な形態学的指標となっている。我々の解析では老化腎尿細管では SA- β -gal がまず陽性になり、その後リポフスチン沈着が明らかとなった (図 1)。

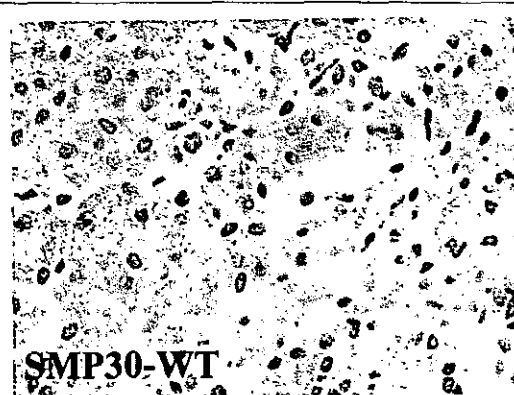
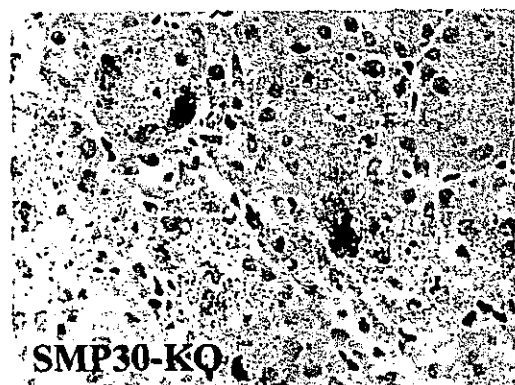


図 1. SMP30 欠損によるリポフスチンと SA- β -gal の早期出現. SMP30-KO ではリポフスチンを中心に SA- β -gal が認められる。野生型 (SMP30-WT) ではいずれも検出されない。

我々が観察した病態は高等動物に於いて「普通の老化」が進行した際に認められる形態学的な現象を明瞭に表現していた。遺伝子操作により初めて「普通の老化」が早期に出現するモデルマウスが樹立されたことを証明している。本モデルマウスは今後、多くの老化・老年病研究者に応用されることが期待される。

Brunk 等は加齢に伴うリポフスチン沈着の増加を説明するために Mitochondria-lysosomal axis theory を提唱した。この説において彼らはミトコンドリアとライソソームを中心にした加齢に伴う細胞小器官の機能低下により種々の老化病態が出現することを説明している。これは我々が観察した結果も説明できるものである。Postmitotic cell では加齢に伴い機能不全に陥ったミトコンドリアが分裂 (fission) できずに蓄積・膨化していることが観察される。その結果ライソソームの機能不全も誘導される。電子顕微鏡による観察では高度に電子密度が高い物質がライソソーム内に認められる。そしてライソソーム酵素に由来する SA- β -gal が明瞭に検出される。このような過程は細胞レベルの老化を明解に説明し、臓器・個体レベルの老化の成立も良く説明するものである (図 2)。

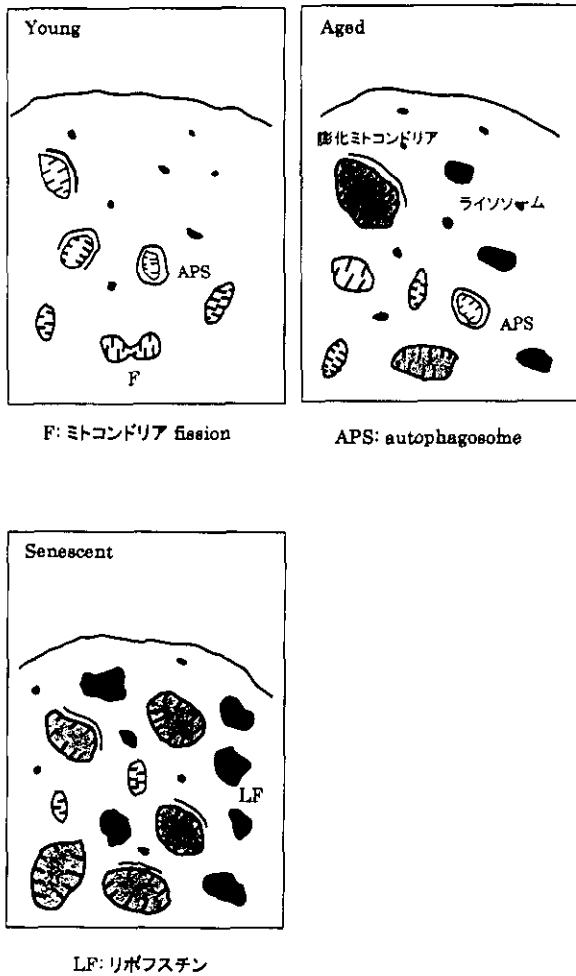


図2. SMP30欠損による細胞機能不全の模式図。

若齢ではミトコンドリア fission や autophagosome は充分機能している (Young)。加齢に伴いこれらの機能が低下する (Aged)。最終的にライソソームには分解しきれない生体物質が蓄積しリポフスチンが生成される (Senescent)。

②デジタル老化説の提唱

従来、臓器の老化は各々の臓器内ではほぼ均一に進行すると推定されていた。この様な推定は例えば臓器の SMP30 が加齢に伴い減少するのは個々の細胞において SMP30 の発現がゆっくり減少するためと考えられた。しかし高齢モデル動物の肝臓を抗 SMP30 抗体で染色すると陽性細胞は中心静脈周囲に限局していた。その周辺の肝細胞には SMP30 の発現が極めて乏しかった (図3)。

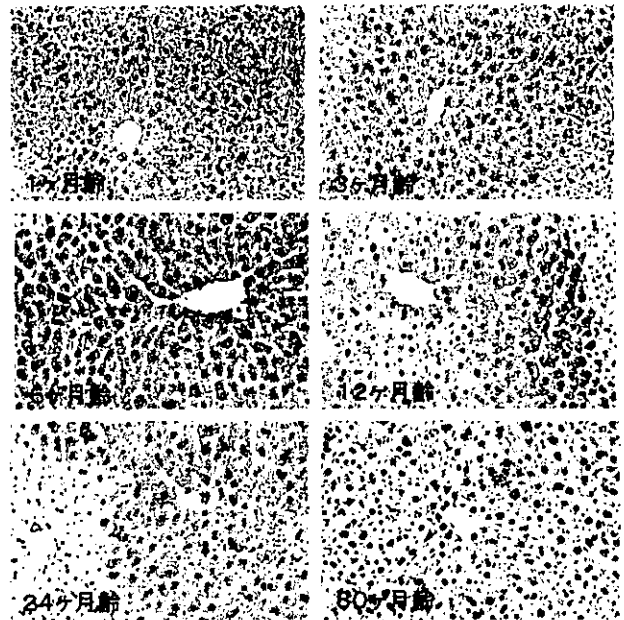


図3. 肝臓に於ける SMP30 発現の加齢変化。加齢に伴い SMP30 が発現している領域が少なくなってくる。中心静脈周囲に発現が限局している。

このような所見は高齢者の臓器に過重な負荷がかかった場合には重篤な臓器障害が発症する可能性を示唆している。我々の研究成果から SMP30 が欠損した細胞・臓器ではアポトーシスに対する感受性が著しく亢進することが明らかとなっている (Ishigami, Amer J Pathol 161:1273, 2002)。すなわち加齢に伴い傷害を受けやすい細胞が増加することを意味している。SMP30 の発現が中心静脈周辺に強いことから血流支配が SMP30 の発現に影響を与えている可能性が考えられた。そこで各年齢のマウスから肝細胞を採取して初代肝細胞培養系で SMP30 の発現を観察した。この方法を用いることにより血流支配の差を除去できるからである。初代培養細胞を確立し抗 SMP30 抗体と抗アルブミン抗体で免疫染色を行った。アルブミンは年齢にかかわらず、全ての細胞に発現していた。一方、SMP30 陽性の細胞は加齢と共に減少していた (図4)。発現の程度については中間的なものは極めて少なく「all or nothing」の様式であった。この事実は臓器内

では個々の細胞で老化状態に移行することを意味している。従って SMP30 の発現が抑制・消失した細胞は内的・外的な傷害に極めて弱く、高齢者における臓器障害の亢進を説明できる。我々は以上の事実から個々の細胞がある時点で非老化細胞から老化細胞へ転換し、細胞機能や内的・外的傷害への抵抗性が低下するというデジタル老化説を提唱するにいたった。今後はこの仮説を検証することが高齢者の臓器障害や臓器機能低下を考える際に重要であると考えている。

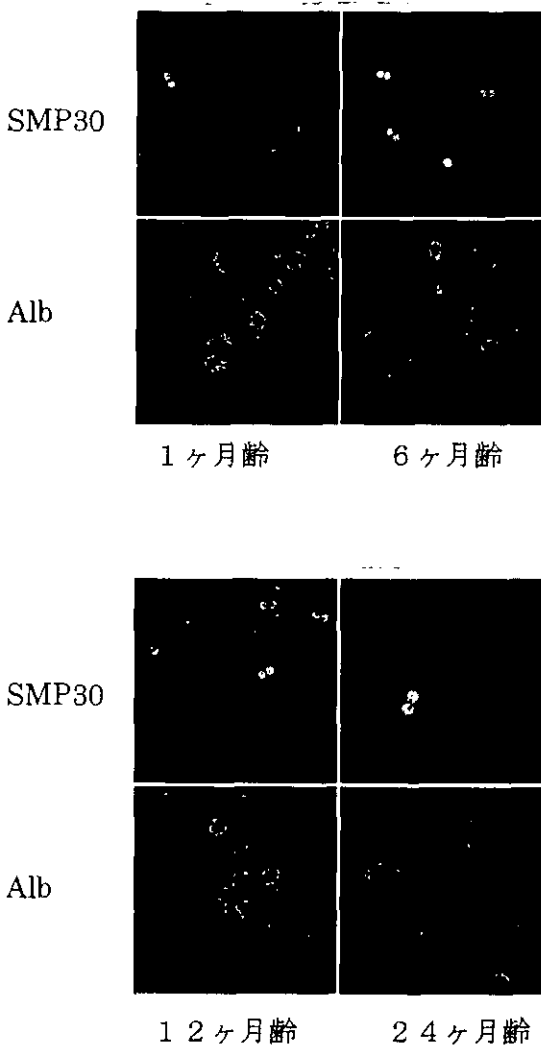


図4. 加齢に伴う SMP30 発現の変化. マウス初代肝細胞培養における SMP30 とアルブミンの発現を観察した。アルブミンは生涯にわたりほとんど全ての肝細胞で発現しているが SMP30 陽性細胞は加齢に伴い減少している。

③SMP30 の酵素活性

SMP30 は広範な動物種において、そのアミノ酸配列が高度に保存されている。我々の発見の後に米国の研究グループからサリン・ソマン・タブンなどの合成神経毒を分解する肝臓内の酵素が SMP30 であることが報告された。これは SMP30 が酵素作用を持つことが最初に明らかにされた研究である。サリン等は有機リン化合物であり、通常的生活では農薬、殺虫剤などに有機リン物質が含まれている。我々は DFP を用いて有機リン化合物を加水分解する条件を解析した。その結果、2 価陽イオンが必要であることを昨年度の報告書に記載した。

SMP30 は paraoxonase 1 とアミノ酸配列が部分的に類似した部分があることから同一の基質特異性があるのかを検討した。その結果、paraoxonase 1 とは基質特異性が異なることが明らかとなった (表 1)。

基質	活性 (nmoles/min/mg of protein)
DFP	998
Phenyl acetate	527
Paraaxon	活性なし
Dihydrocoumarin	活性なし
γ -Nonalactone	活性なし
δ -Dodecanolactone	活性なし

表 1. SMP30 が有する PON1 基質特異性。

しかし SMP30 と paraoxonase 1 は基質特異性が類似しており paraoxonase 1 の機能から SMP30 の機能の推定が可能である。

Paraoxonase 1 が血管病変に関連することから主任研究者等は現在、食餌により SMP30 欠損モデル動物に動脈硬化性病変が出現する可能性について検討している。

最近、日本の他の研究グループがホタルの発光に関与する酵素 LRE を解析した結果、

SMP30 と同一であることを発見した。我々はラットとホタル由来の SMP30 を用いて酵素活性を比較検討した。その結果、2種類の SMP30 はともに DFPase 活性を示したが、LRE 活性はラットには存在しなかった。この結果は有機リンを加水分解する酵素活性がより基本的な活性であることを示唆している。現在、SMP30 の生体内基質を探索しているが glucose 分解系に関連する酵素活性を見いだした。この酵素活性が SMP30 本来の活性であると思われるところから解析を進めている。またこの酵素活性欠損と老年病態の関連を解明する予定である。

④SMP30 が有する抗酸化作用の発見

SMP30 は加齢に伴い、その発現が減少してくる。発現減少の原因としてはこれまでの解析では加齢に伴う酸化ストレスの増加が主因と考えられている。本年度の研究プロジェクトで我々は SMP30 が持つ抗酸化ストレス機能を解析した。解析にはヒト SMP30 cDNA を移入したヒト肝癌細胞 HepG2 を用いた (図5)。

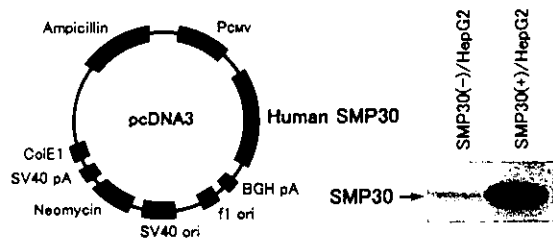


図5. 肝細胞培養株 HepG2 へのヒト SMP30 cDNA の移入、発現ベクターにヒト SMP30 cDNA を組み込み HepG2 細胞に移入して SMP30 を過剰発現させた (図右)。

その結果図6に示すように SMP30 cDNA を導入した HepG2 細胞では活性酸素 ROS の産生が減少した (左上)。また酸化生成物である過酸化脂質の量も少なかった (右上)。さらに還元型 GSH は活性酸素種により誘導される消去系酵素であるため、その量は SMP30 cDNA を導入した HepG2 細胞では減少していた (左下)。

このように SMP30 自身も抗酸化作用を持つと考えられる結果が得られた。従って多様な手段により臓器内の SMP30 量を増加する試みにより臓器の機能低下が抑制され、臓器障害を軽減できる可能性が示唆された。実際に我々は実験動物モデルの加齢実験においてエネルギー制限を与えると SMP30 の発現が亢進し寿命が延長することを観察している。この結果は食餌エネルギー制限により酸化ストレスが減少する効果と考えられる。そして SMP30 発現量は老化の定量的な指標として用いることが強く示唆された。

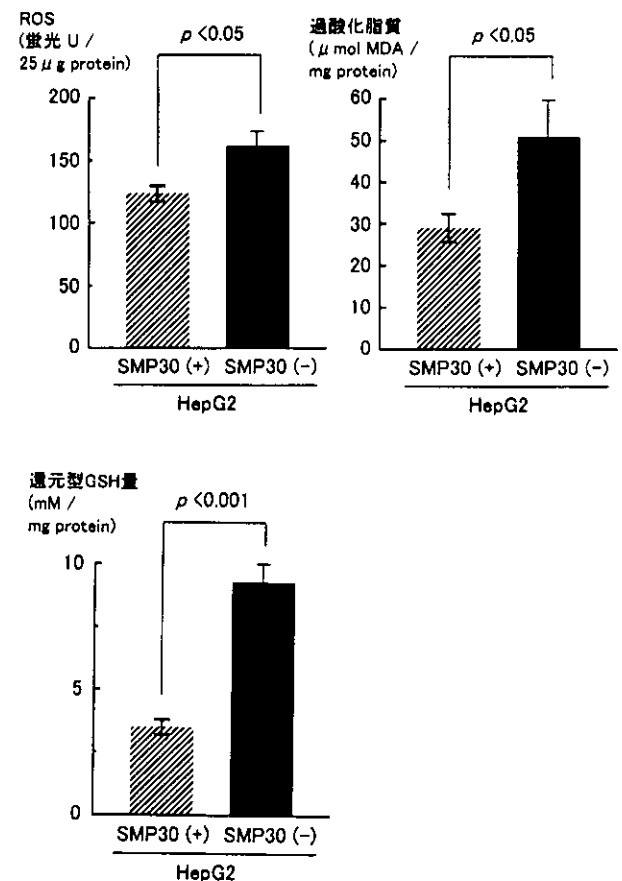


図6. HepG2 に移入したヒト SMP30 cDNA の抗酸化作用. ROS 産生 (左上)、過酸化脂質 (右)、還元型 GSH (左下)。

⑤SMP30 減少・欠損に起因する傷害に対する脆弱性。

これまでの研究により SMP30 が減少、あるいは欠損した個体の臓器は外的な傷害に対し

て極めて脆弱である。本プロジェクトでの解析を基に高齢者の薬剤障害予防の基礎資料に応用が可能であると考えた。

喫煙は COPD（慢性閉塞性呼吸器障害）の重要な要因である。我々は SMP30 欠損モデルマウスに喫煙させ、呼吸器の病理組織を観察した。SMP30 は正常組織では気管支上皮に強く発現している。喫煙した SMP30 欠損マウスでは野生型マウスに比較してアポトーシスが著明に誘導されることが明らかとなった（図 7）。また喫煙群で気腔の拡大が疑われたが、現時点では統計学的に有意な数値を算出可能な個体数を検討していない。この結果は高齢者では呼吸器に於いても SMP30 が減少するために、喫煙を含めた外的な傷害に対して脆弱性が亢進するために COPD（慢性閉塞性呼吸器障害）の要因となることが示唆された。他方、抗ガン剤の影響も検討した。抗ガン剤である cisplatin と、その異性体である transplatin を投与して比較検討した。Cisplatin は腎尿細管に核変性が著明に出現するが SMP30 欠損マウスでは野生型に比較して核変性が高度になることが明らかとなった（図 8）。以上の結果は加齢に伴う SMP30 の減少が高齢者における COPD の出現や薬剤障害性の出現に関与することを強く示唆している。

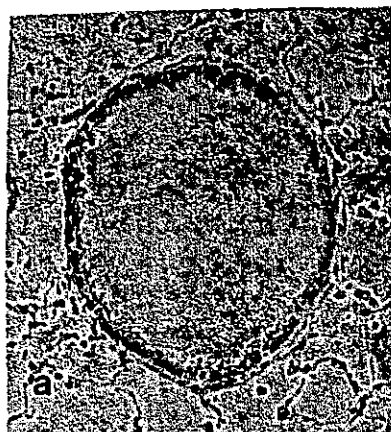


図 7. SMP30 欠損マウスに於ける外的細胞傷害に対する抵抗性の減弱。喫煙マウスに於ける気管支上皮のアポトーシス誘導性が強いが野生型では極めて軽微であった。

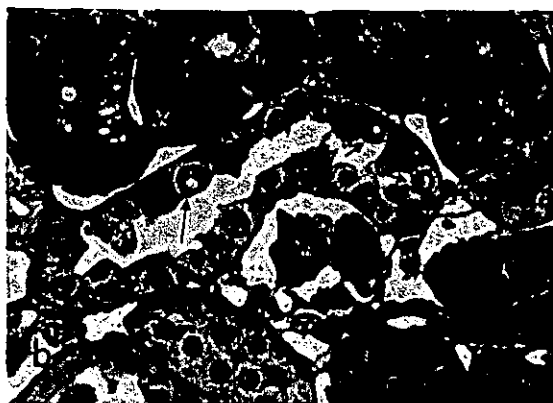


図 8. シスプラチンによる腎障害

抗ガン剤のシスプラチン投与による尿細管上皮の核変性（→）が野生型に比較して多く認められる。

⑥高次構造解析

老化抑制分子 SMP30 は種々の機能を有している。この機能がどのような構造に基づくのかを解析し、さらに創薬へとつなげるために SMP30 分子の高次構造を解析している。ラットの肝臓から SMP30 を精製し結晶化を行い X 線により解析を進めている。現在までに安定した、高い分解能が得られる結晶がカドミニウムを共存させることにより得られた（図 9）。この結果従来の X 線回折強度データ測定では 3.5 Å 分解能程度までのデータがほとんどあったが、CdCl₂ との共存下で得られた結晶では、最大で 2.4 Å の回折を生じ、安定的に 3 Å 分解能以上のデータが収集できた（図 10）。現在、多数の結晶について解析データを収集して最終的な構造推定のためのデータ処理を行っている。



図 9. カドミニウム共存下形成された SMP30 結晶。

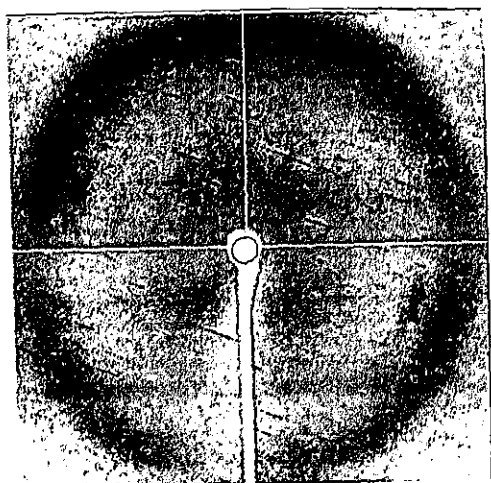


図10. カドミニウム共存下で得られた SMP30 結晶から得られた回折結果.

SMP30 は神経毒であるサリンを含む有機リン化合物を分解することが知られている。米国では米陸軍が化学テロに対応するために高次構造を研究機関と解析している。米国の研究グループは組み替え SMP30 蛋白を用いて解析している。現時点では我々の解析が先行しており第1報の論文作成の段階に至っている。今後も詳細な解析が必要となっている。以上の研究成果は将来的な医薬品の開発や細胞内の分子制御の解析に大きく貢献する。

⑦臨床検査試薬の開発

本プロジェクトにおける研究成果から老化抑制分子 SMP30 は加齢に伴い出現する種々の病態に影響を与える重要な分子であることが明らかとなった。この結果をもとに臨床応用を目指した検査試薬の開発を開始した。その開発のためにモノクローナル抗体の樹立が必須である。しかし SMP30 は動物種間で極めて高度に保存されていることから検査試薬開発に有用なモノクローナル抗体が樹立される確立は極めて低いと考えられた。そこで我々は SMP30 欠損マウスに精製した SMP30 を免疫して作製するという着想を得た。当初は剖検材料から得られるヒト SMP30 を免疫原として考えたが、後日、倫理的な問題が生じることを懸

念してヒト SMP30 と最もアミノ酸配列が近いウシ SMP30 を用いることにした。ウシ肝臓から高度に精製して免疫用の抗原とした。

抗体作製の初期には SMP30 欠損マウスにウシ SMP30 を免疫しても高い力価は得られなかった。その原因を考察したところ我々が抗体作製に用いた SMP30 欠損マウスの由来が父親は Y⁺ 遺伝子型である欠損マウスと母親が +/+ であるヘテロ接合体マウスから得られたマウスであった。そのため SMP30 が完全欠損ではないヘテロ接合体母親マウスの胎内において経胎盤的に SMP30 が新生マウスに移行した結果、SMP30 に対して免疫学的寛容が成立したために抗体作製が充分ではなかったと考えられた。そこで我々は両親共に SMP30 欠損マウスである SMP30 欠損マウスを得てモノクローナル抗体作製の免疫に用いた。その結果、マウスを含めた幅広い動物種の SMP30 に反応するモノクローナル抗体を1月末の時点で5クローン樹立した。現在、その抗体特異性を検討しており、臨床検査試薬として応用が可能な段階に至っている。

D. 考察および今後の課題

本課題では老化抑制分子 SMP30 が加齢に伴い減少することにより老化病態が促進することを明らかにした。今後はヒトへの応用が最も重要な課題となる。そのための準備的な研究が開始された。一つは臓器、血中、尿中の SMP30 を定量化する検査試薬の開発である。この測定法の開発により老化の進行程度を定量化できる可能性が考えられる。特に主任研究者が勤務する東京都老人総合研究所におけるフィールドワークへの応用が具体化し、高齢者の健康疫学への利用が可能となる。我々が開発しているモノクローナル抗体を用いた定量化法は他の多くの動物種にも対応できるところから様々な応用法が期待できる。健康食品開発への応用もその一つである。

また老化抑制分子 SMP30 の欠損症の同定も

重要な課題である。想定される欠損個体は種々の基礎疾患の予後が著しく悪いことが想像される。また高齢者の薬剤障害発症機序の説明に貢献すると考えている。創薬を目指した SMP30 の高次構造解明は最終的な解析に至っており、今後は SMP30 の機能に対応する高次構造の解明が創薬へと移行する際に重要である。

SMP30 欠損マウス自体の応用法も考えられている。このマウスは種々の薬剤に対し高感受性であるために新薬開発に際しての薬剤障害のスクリーニングに利用が可能である。

本研究では老年病とは異なり「老化」の成立に重要な貢献をしたと考えている。従来の遺伝子操作を利用した「老化」モデル動物開発では急激な老化病変を発症したり、また寿命が延長するものが大部分であった。我々は特定の疾患を発症しない短寿命のモデル動物を開発した。このモデル動物は通常の病理学的解析により検出できるリポフスチンと老化関連 β -galactosidase が早期に出現する。この2つの形態学的老化指標は SMP30 欠損マウスが我々が考える「普通の老化」モデルであることを強く示唆している。このモデル系により大部分の高齢者の老化がある程度説明できると考えている。また細胞レベルでの老化への移行は高齢者に於ける臓器障害を考える上で極めて重要な現象である。今後はこのような老化型細胞へ移行をもたらす分子機序を解析することにより臓器障害の予防や臓器予備能の回復への貢献が可能である。

E. 結論

本年度は老化抑制分子 SMP30 が加齢に伴い減少することにより老化病態が生ずることをモデル動物を用いて証明した。特に SMP30 欠損モデルマウスには老化の形態学的指標であるリポフスチンと Senescence associated- β -galactosidase が出現することは本モデル動物において、いわゆる「普通の老化」が早期に出

現することを示唆している。SMP30 の酵素活性については生体内の自然基質の同定が進行した。また SMP30 欠損マウスは薬剤障害を始めとした老化病態が誘導されやすいことを示した。従ってこのモデルマウスを薬剤障害の検出系に応用できる可能性が示唆された。創薬や分子機能の解明に貢献する SMP30 の高次構造はほぼ第1段階の解析が終了した。現在、得られたデータを分析し、分子モデルの構築を行う予定である。臨床検査試薬の開発も現在、ほぼ最終過程に達し、特異性の検討を行っている。本研究を遂行するにあたり新しい老化進行の概念を提唱することができた。

F. 研究発表（課題関連のみを記す）

①誌上発表

石神昭人、丸山直記：SMP30 ノックアウトマウス —新しい老化モデルマウスとしての可能性—・基礎老化研究 27:35-40, 2003

Ishigami A, Kondo Y, Nanba R, Ohsawa T, Handa S, Kubo S, Akita M, Maruyama N : Senescence marker protein-30 deficiency in mice causes an accumulation of neutral lipids and phospholipids in the liver and shortens the life span. *Biochem Biophys Res Commun* 315:575-580, 2004

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. *Pathology International* 54:167-173, 2004

Maruyama N, Ishigami A, Kuramoto M, Handa S, Kubo S, Imasawa T, Seyama K, Shimosawa T, Kasahara Y. : SMP30 knockout (SMP30-KO) mouse as an ageing model *Ann New Acad Sci* (印刷中)

Feng D, Kondo Y, Ishigami A, Kuramoto M, Machida T, Maruyama N. : Senescence Marker Protein-30 (SMP30) as a novel anti-ageing molecule. *Ann New Acad Sci* (印刷中)

今澤俊之、御手洗哲也、丸山直記：抗老化に向けた組織再生能活性化。基礎老化研究 (印刷中)

②学会・シンポジウム

丸山直記：加齢指標蛋白質 SMP30 の酵素活性と臓器障害。第 92 回日本病理学会総会、福岡市 2003.4.23-25

今澤俊之、永野忠相、佐藤雅勇、小澤孝宏、倉元雅史、石神昭人、御手洗哲也、丸山直記：糸球体ポーマン囊における脱イミノ化反応が虚脱糸球体処理に関与する可能性。第 46 回日本腎臓学会学術総会 東京 2003.5.22-24

Ishigami, A., Handa, S., Maruyama, N. : SMP30 has antioxidant properties protecting cells from oxidative stress. 第 26 回日本基礎老化学会 名古屋市 2003.6.18-20

Kondo, Y., Ishigami, A., Kuramoto, M., Feng, D., Shimokado, K., Maruyama, N. : SMP30 has a novel phosphotyrosyl protein phosphatase. 第 26 回日本基礎老化学会 名古屋市 2003.6.18-20

Feng, D., Ishigami, A., Toda, T., Kuramoto, M., Machida, T., Maruyama, N. : Identification of SMP30 phosphorylation sites by proteomic analysis. 第 26 回日本基礎老化学会 名古屋市 2003.6.18-20

Sasaki, K., Kitamura, M., Bannai, S., Maruyama, N., Makino, N. : Attenuated antioxidant ability in endothelial cells through

glycosylation. 第 26 回日本基礎老化学会 名古屋市 2003.6.18-20

Ohsawa, T., Ishigami, A., Hiratsuka, M., Toda, T., Asaga, H., Akiyama, K., Maruyama, N., Kimura, N. : Deiminated proteins in the brain of Alzheimer's diseases. 第 26 回日本基礎老化学会 名古屋市 2003.6.18-20

Shimosawa, T., Ogiwara, T., Asano, T., Matsui, H., Ando, K., Maruyama, N., Fujita, T. : Adrenomedullin deficiency leads to insulin resistance in aged mice. 第 26 回日本基礎老化学会 名古屋市 2003.6.18-20

Maruyama, N. : Molecular background of age-associated organ disorders. UK-Japan Conference: Horizons in Ageing and Health – New Targets for Therapies, New Castle, UK, 2003.7.14-16

Maruyama, N. : Aspects on anti-aging. 第 25 回日本基礎老化学会シンポジウム 東京 2003.11.22

Ishigami, A., Ohsawa, T., Hiratsuka, M., Murayama, S., Maruyama, N. : Proteome analysis of deiminated proteins in Alzheimer's disease. The 7th Asia/Oceania Regional Congress of Gerontology Tokyo 2003.11.24-28

Feng D, Ishigami A, Toda T, Kuramoto M, Machida T, Maruyama N. : SMP30 and phosphorylation sites. The 7th Asia/Oceania Regional Congress of Gerontology Tokyo 2003.11.24-28

今澤俊之、宇都宮保典、永野忠相、丸山直記、御手洗哲也：糸球体疾患治療戦略としての骨髄由来

細胞による糸球体再生・修復. 第24回日本炎症・再生医学会 京都市 2003.11.26-27

Feng D, Kondo Y, Ishigami A, Kuramoto M, Machida T, Maruyama N. : Senescence marker protein-30 (SMP30) as a novel anti-aging molecule. The International Association of Biomedical Gerontology 10th Congress. Cambridge, UK, 2003.9.19-23

Maruyama N, Ishigami A, Kuramoto M, Handa S, Kubo S, Kasahara Y. : SMP30 knockout (SMP30-KO) mouse as an ageing model
The International Association of Biomedical Gerontology 10th Congress. Cambridge, UK, 2003.9.19-23

Kondo Y, Ishigami, A, Kuramoto M,

Shimokado K, Maruyama N. : Identification of DFPase activity in Senescence Marker Protein-30.第76回日本生化学会大会横浜 2003.10.15-18

Feng D, Ishigami A, Toda T, Kuramoto M, Machida T, Maruyama N. : Insights into the structure of SMP30. 日本生化学会大会 横浜 2003.10.15-18

Ishigami A, Ohsawa T, Hiratsuka M, Murayama S, Maruyama N. : Histochemical and biochemical analysis of deiminated proteins in Alzheimer's disease. 日本生化学会大会 横浜 2003.10.15-18

モデル動物における加齢臓器障害の病態解析

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

高血圧や糖尿病などの生活習慣病は中年期に発症するが高齢期には慢性化し高齢者のQOLを著しく低下させる。その克服は重要な課題である。アドレノメデュリンは血管作動性分子であり下澤等がその欠乏モデルマウスを開発した。その結果、酸化ストレスに対する抵抗性の低下に起因して心血管系疾患ばかりではなく糖尿病も出現することが明らかとなった。これらの結果を基にしてアドレノメデュリンの酸化ストレスに対する抵抗性について解析を行った結果、抗酸化を介した生活習慣病および老年病の治療薬の可能性を明らかにした。

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)。昨年の研究から、アドレノメデュリンノックアウトマウスは加齢とともに酸化ストレスが蓄積し、インスリン抵抗性が発症することが明らかになった (Shimosawa T et al. Hypertension, 2003)。

そこで、今回我々はアドレノメデュリンが抗酸化作用を介して治療薬として応用可能で

あるか検討した。

B. 研究方法

加齢、低酸素刺激、大腿動脈周囲カフ装着モデルを用いて、それぞれインスリン抵抗性、肺高血圧、動脈炎に対するアドレノメデュリンの治療効果を検討した。

C. 結果

51週齢マウスにアドレノメデュリンあるいは抗酸化剤のTEMPOLを1ヶ月持続投与し、酸化ストレスならびにインスリン抵抗性を評価した。酸化ストレスのマーカーであるイソプロスタノール排泄量はアドレノメデュリン投与により有意に抑制され(図1)、インスリン抵抗性も改善した(図2)。

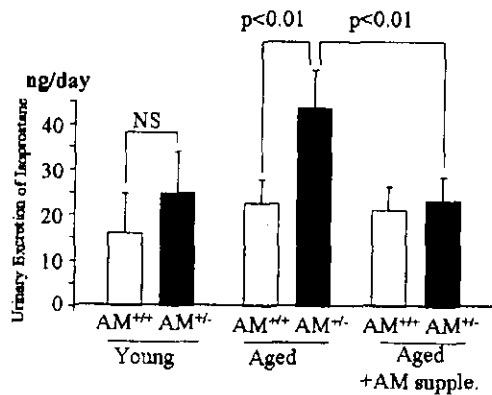


図1. 加齢マウスにおけるアドレノメデュリン投与の効果と酸化ストレスの軽減.

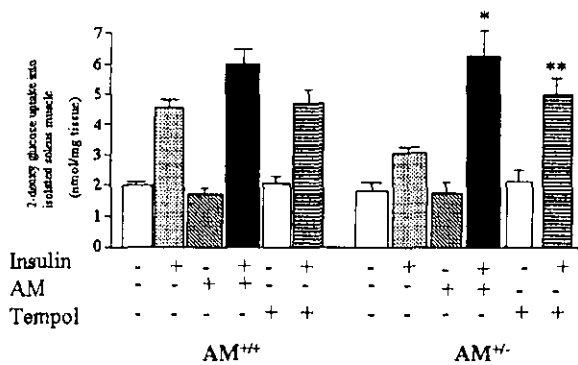


図2. アドレノメデュリン投与によるインスリン抵抗性の改善.

低酸素刺激1週間でアドレノメデュリンノックアウトマウスでは肺血管リモデリングが著明に認められるが(図3)、アドレノメデュリンあるいはTEMPOL投与により有意に抑制された(図4)。

大腿動脈周囲にシリコンカフを装着し、動脈炎による血管障害を評価したところ、やはり、アドレノメデュリンノックアウトマウスでは著明な血管病変が認められたが、アデノウイルスベクターを用いたアドレノメデュリンの局所投与にて酸化ストレスの軽減と病変の改善が認められた(図5, 6)。

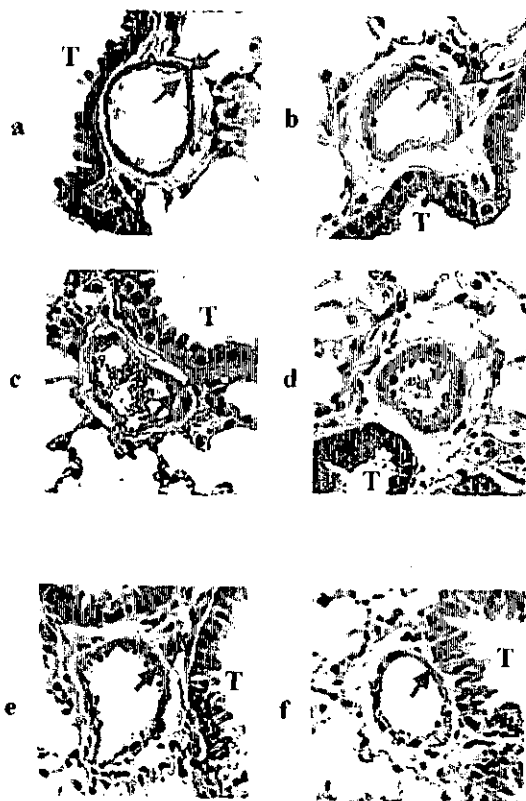


図3. 低酸素刺激による肺動脈リモデリング a, c; 野生型 b, d, e, f; アドレノメデュリンノックアウトマウス a, b; コントロール c, d, e, f; 低酸素 e; AM 治療 f; TEMPOL 治療

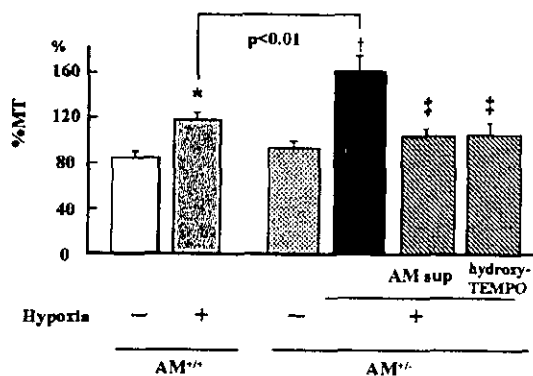


図4. 低酸素刺激による肺動脈リモデリングとアドレノメデュリンによる治療効果

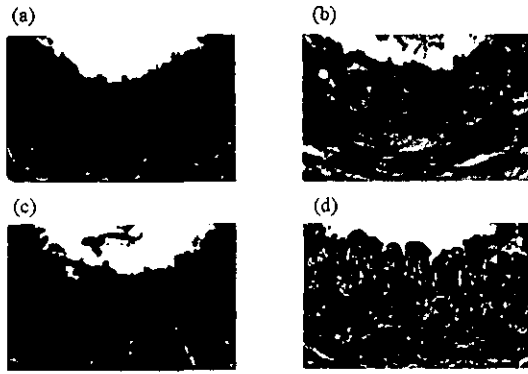


図5. 大動脈カフモデルにおける血管病変とアドレノメデュリンの治療効果. a; sham operation、b; カフ装着、c; AM 投与、d; LacZ-Adenovirus 投与

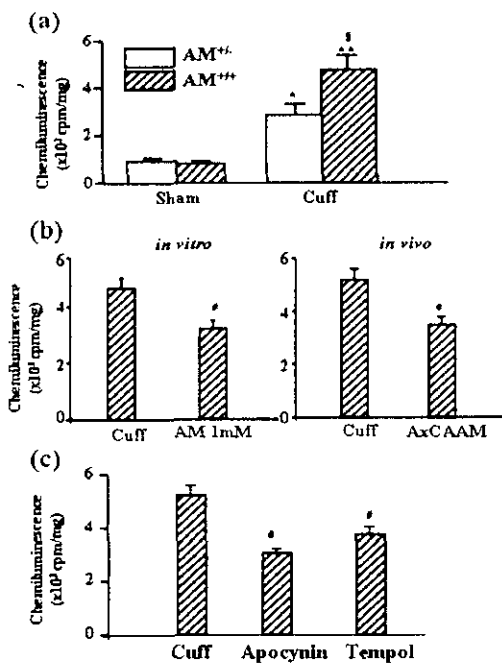


図6. 大腿動脈カフモデルにおける酸化ストレスの産生. 酸化ストレスは化学発光により計測した. A; カフ装着による酸化ストレス産生 b; アドレノメデュリン局所投与による酸化ストレスの減弱 c; NADPH oxidase 阻害剤 apocynin, SOD 様物質 TEMPOL の作用

D. 考察および今後の課題

加齢、低酸素、物理的刺激による酸化ストレスは各種病態を生じるが、アドレノメデュリンは内因性抗酸化物質としてこれらの病態を治療する上で有用である可能性が示唆される。実際肺高血圧症においてはヒトでの臨床応用が試みられている(Nagaya N et al. Circulation, 2004)。特に加齢による酸化ストレスの蓄積に対してアドレノメデュリンが拮抗的に作用し、インスリン抵抗性を改善したことは、今後、老化による各種病態発症の新たな治療方法となる可能性が示唆された。

E. 結論

アドレノメデュリンは内因性抗酸化物質として治療的に用いられる可能性がある。

F. 研究発表

① 論文発表

Matsui H, Shimosawa T, Itakura K, Xing G, Ando K, Fujita T. Adrenomedullin can protect against pulmonary vascular remodeling induced by hypoxia. Circulation. (印刷中)

Kawai J, Ando K, Tojo A, Shimosawa T, Takahashi K, Onozato M, Yamasaki M, Ogita T, Nakaoka T, Fujita T. Endogenous adrenomedullin protects against vascular response to injury mice. Circulation 109:1147-1153, 2004

下沢達雄他: 血管作動物質の新たな展開 血管 26:79-85, 2003

下沢達雄: 日本人の食塩摂取量の問題点 Progress in Medicine 23:2852-2856, 2003

下沢達雄他：血管拡張物質 Heart View
7:226-229, 2003

下沢達雄：アドレノメデュリン ホルモンと
臨床 51:731-738, 2003

② 学会発表

Shimosawa T. : Role of adrenomedullin in
cardiovascular diseases. American Heart
Association Asia Pacific Scientific Forum
2003.6.8-10, Honolulu, Hawaii, USA

松井宏光、下澤達雄他：AMの活性酸素の制
御による臓器保護作用—マウスの低酸素刺
激—肺血管障害モデルでの検討. 日本内分泌
学会 横浜市 2003.5.9-11

下沢達雄他：Adrenomedullin deficiency
leads to insulin resistance in aged mice.
日本基礎老化学会 名古屋市
2003.6.18-20

下沢達雄他：生活習慣病における臓器障害と
酸化ストレスの関連、モデルマウスを用いた
検討. 日本SHR学会 東京都 2003.6.27-28

下沢達雄他：アドレノメデュリン局所投与に
よる血管障害抑制の可能性. 日本遺伝子診療
学会 大阪市 2003.7.24-25

下澤達雄他：内因性抗酸化物質としてのアド
レノメデュリン. シンポジウム「血管作動性
ペプチド研究の最前線」 日本高血圧学会
宮崎市 2003.10.30-11.1

下澤達雄他 アドレノメデュリン(AM). シ
ンポジウム「心血管疾患における
血管作動性物

Xing Guangqun、下澤達雄他：酸化ストレ
スによる耐糖能異常アドレノメデュリン欠
損マウスによる解析. 日本内分泌学会 横浜
市 2003.5.9-11

藤田恵、下澤達雄他：脳内アドレノメデュリ
ンは食塩感受性高血圧を抑制する. 日本内分
泌学会 横浜市 2003.5.9-11

質研究の新たな展開」日本心血管内分泌学会
2003.11.21-22

G.知的所有権の取得状況
なし