

200400261 A

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

(H16-長寿-004)

生体の持つストレス応答機能を利用した
老化制御、予防研究

平成16年度 総括研究報告書

主任研究者 磯部健一

平成17(2005)年3月

目次

I. 総括研究報告書	1-8
II. 分担研究報告書	
ストレス応答制御による老化制御	9-10
ストレス応答制御による神経変性疾患予防	11-16
老化による神経変性疾患の病態とその予防	
免疫制御による脳変性疾患の予防	17-21
GDNF/RET系シグナルと神経変性疾患	22-26
免疫系による老化制御	27-31
生体ストレス応答と動脈硬化、糖尿病に関する研究	32-38
免疫低下に伴う老化関連疾患と自然免疫力増強による克服	39-41
ストレス応答と生体反応	42-44
老化における外的ストレスとしての細菌産物に関する研究	45-50

＜総括研究報告書＞

生体の持つストレス応答機能を利用した老化制御、予防研究

磯部健一（国立長寿医療センター研究所、老化機構部長、一）名古屋大学大学院
医学系研究科分子細胞免疫、教授）

研究要旨： 老化促進ストレス刺激により生体の蛋白をはじめとする様々な変異分子に対し、生体が反応する仕組みを明らかにするため、この研究班を立ち上げた。特に変異蛋白によって発生するアルツハイマー、CAGリピート病に関して、前者はA-betaに対するミクログリアの反応として、後者はHSPの変性蛋白保護作用として新しい発見があった。

A. 研究目的

急速な高齢化に伴い、高齢者がいかに活動的な生活をおくれるかは差し迫った課題である。私達は老化のメカニズムの基礎的研究を通し、生体は老化を防御する仕組みをあらかじめ持っていることを明らかにして来た。本研究は生体が本来備えている老化防御機能を効果的に引き出すことにより、老化制御、老化予防策を明らかにすることにある。高齢者の疾患のうち動脈硬化は酸化ストレスにより変化したLDLがマクロファージに貪食され、泡沫細胞となったマクロファージの出すサイトカイン、あるいは免疫系に抗原提示され、T、B細胞が病変形成に関与することが明らかにされている。私達は高齢者の疾患のうち、特に多い痴呆疾患等、神経変性疾患も同様な仕組みが存在すると考えている。すなわち老化を進行させるストレス刺激（放射線、紫外線、薬物）活性酸素は生体成分を酸化、ADP-ribosyl化させることで、生体にストレス応答（ERストレス、p53を中心としたストレス）を誘起し、老化という負の傷を残す一方、生体は傷

を修復している。アルツハイマー、ポリグルタミン病、パーキンソン病は遺伝的な背景の違いで老化に伴う病態進行が異なると考えられる。異常蛋白、凝集体として蓄積したものは細胞内では核に存在するものも細胞膜に移動し、一方分泌された凝集体（例えばA-beta）はマクロファージ系の細胞に貪食され、広義の免疫反応がおきる。このように細胞の持つ防御能を明らかにし、それを引き出すことは老化、老年病の制御、予防に結びつくと考えられる。

B. 研究方法

- (1) ミクログリア、アストロサイト、神経細胞の分離培養
ラット、マウスの脳を取りだし、in vitroで機械的に分離し培養した。また、マウスのミクログリア株はRa2（沢田教授と共同研究）ヒト神経培養細胞(SHSY5Y)を使用した。普通の培養の他、低酸素刺激のため1% O₂ + 5% CO₂ + 94% N₂ を使用した。
- (2)、細胞内シグナル伝達系、遺伝子発現制御
細胞抽出液のウエスタン解析で、シグナル伝達系を検索した。また、RNAを

取り出し、RT-PCRを行った。また、網羅的解析のため、刺激前後のサンプルで、マイクロアレイを行った。

(倫理面への配慮)

動物実験はそれぞれの施設の実験動物委員会の倫理指針に従った。また、ひと材料は遺伝子組み換えひと倫理委員会を通してある。

C. 研究結果

以下、老化に伴い発症する疾患の解析を中心に初年度の成果を記載する。

(1) アルツハイマーの成因に迫る研究

磯部はAbeta42 は分離ミクログリア、Ra-2細胞株共に強く刺激し、PI3/Akt、Erk系シグナル伝達系、Erk系の活性化を引き起こし、また、CC12、CCL4、CCL7といったマクローファージ細胞に特徴的なケモカイン産生を誘導することを見出した。このことが、炎症によるアルツハイマーの病態形成に関与すると思われる。

木内は低酸素培養neprilysin活性が低下し、Aβ₁₋₄₂の分解が抑制されてアルツハイマー病と同様な神経変性を引き起こしている可能性を示した。

赤津、小阪はアルツハイマー遺伝子多型を調べ、APOEに関しては、従来の報告どうりアルツハイマー病 (AD)との相関性を見出すと

ともに、Dementia with Lewy body disease(DLB)においてもある程度の相関性を見出した。

(2) CAGリピート病

祖父江はアンドロゲン受容体 (AR) トランスジェニックマウスへのHsp90阻害剤の投与により濃度依存性に変異AR

蛋白が著減し、Hsp70やHsp40の発現も増加することを見出した。

(3) 糖尿病、動脈硬化

林はホルモン、免疫系と生活習慣病との関連を検索した。女性ホルモンに抗動脈硬化作用があるという事実より、老化シグナルに対する女性ホルモンの影響を検討した。老化促進ストレス刺激としての活性酸素、防御因子としてのNO、女性ホルモンが機能している事が示唆された。次に、代表的な老年病である動脈硬化症、糖尿病に関して、加齢の影響を臨床的に検討し、老化刺激ストレスの関与をサイトカイン等の検討から分析した。IL-6、TNF α は違う機序で老年病の重積、重篤化に関与していた。

以下ストレス刺激と老化に関するより基礎的研究を記載する。

GDNF/RETシグナル伝達系はパーキンソン病の基礎となるシグナル伝達系である。高橋はRETの細胞内ドメインに存在するセリン696がPKAによるリン酸化部位であることを証明し、セリン696をアラニンに置換すると、GDNF刺激によって活性化されるRac1/JNKシグナル伝達系が著しく障害されることを明らかにした。さらにRac1/JNKシグナル伝達系が神経系細胞の細胞周期、とくにG2期からM期への移行を制御していることを証明した。

細菌は宿主からの防御手段、感染進展の武器として種々の毒素蛋白質を放出し、宿主へのダメージを来たと考えられる。その細菌毒素の一つとして宿主細胞傷害性のADPリボシル化酵素活性を持つ毒素蛋白質が見出されてきて

いる。長谷川はA群レンサ球菌の強毒株が、NADase活性と高い相関を示すことを発見した。

丸山は細胞老化におけるIL-1ファミリーが関与するシグナルの負の制御（予防）分子としてIL-1Raが機能し、p38の活性化の抑制することで細胞老化に対して抑制的に機能すること、またTARSH遺伝子に関してはMEFにおいて細胞老化初期に一過的に高発現する老化関連遺伝子であることを明らかにした。

中島はNK細胞と老化の関係を知るため、Ly-49欠損マウスの作製を始めている。

D. 考察

初年度は分担研究者の各自得意な領域をストレス応答と老化、老年病の観点から進めてもらった。次年度以降は老化によって蓄積する変異蛋白に対する、生体応答の解析をより進め、お互いの研究協力からさらに深いレベルに研究を進展させたい。

E. 結論

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

(1) 論文発表

Haneda M, Xiao H, Hasegawa T, Kimura Y, Nakashima I, Isobe K. Regulation of mouse GADD34 gene transcription after DNA damaging agent methylmethane sulfonate. *Gene*. 2004 Jul 7;336(1):139-46.

Haneda M, Kojima E, Nishikimi A, Hasegawa T, Nakashima I, Isobe K.

Protein phosphatase 1, but not protein phosphatase 2A, dephosphorylates DNA-damaging stress-induced phospho-serine 15 of p53. *FEBS Lett*. 2004 Jun 4;567(2-3):171-4.

Ito, S. Sawada M., Haneda M, Fuji S., Ohhashi K., Kiuchi K., Takahashi M. and Isobe K. Amyloid- β Peptides Induce Cell Proliferation and Macrophage Colony-stimulating Factor Expression via PI3-kinase/Akt Pathway in Cultured Ra2 Microglial Cells *FEBS Lett*. In press

Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Waza M, Sang C, Nakagomi Y, Kobayashi Y, Tanaka F, Doyu M, Inukai A, Yoshida M, Hashizume Y, Sobue G. Widespread nuclear and cytoplasmic accumulation of mutant androgen receptor in SBMA patients. *Brain* 128: 659-670, 2005.

Jiang Y, Yamamoto M, Kobayashi Y, Yoshihara T, Liang Y, Terao S, Takeuchi H, Ishigaki S, Katsuno M, Adachi H, Niwa, J, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Gene expression profiles of spinal motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 57:236-251, 2005.

Ishigaki S, Hishikawa N, Niwa J, Iemura S, Natsume T, Hori S, Kakizuka A, Tanaka K, Sobue G. Physical and Functional Interaction between Dorsin and Valosin-

- containing Protein That Are Colocalized in Ubiquitylated Inclusions in Neurodegenerative Disorders. *J Biol Chem* 279:51376-51385, 2004.
- Katsuno M, Adachi H, Sobue G: Sweet relief for Huntington disease. *Nat Med* 10:123-124,2004.
- Katsuno M, Sobue G. Polyglutamine diminishes VEGF; passage to motor neuron death? *Neuron* 41:677-679, 2004.
- Katsuno M, Adachi H, Tanaka F, Sobue G: Spinal and bulbar muscular atrophy: ligand-dependent pathogenesis and therapeutic perspectives. *J Mol Med* 82: 298-307, 2004.
- Minamiyama M, Katsuno M, Adachi H, Waza M, Sang C, Kobayashi Y, Tanaka F, Doyu M, Inukai A, Sobue G. Sodium butyrate ameliorates phenotypic expression in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 13:1183-1192, 2004.
- Kato, M., Takdea, K., Kawamoto, Y., Tsuzuki, T., Hossain, K., Tamakoshi, A., Kunisada, T., Kobayashi, Y., Ogino, K., Suzuki, H., Takahashi, M., Nakahsima, I.: c-Kit-targeting immunotherapy for hereditary melanoma in a mouse model. *Cancer Res.*, 64: 801-806, 2004.
- Kawamoto, Y., Takeda, K., Okuno, Y., Yamakawa, Y., Ito, Y., Taguchi, R., Kato, M., Suzuki, H., Takahashi, M., Nakashima, I.: Identification of RET autophosphorylation sites by mass spectrometry. *J. Biol. Chem.*, 279: 14213-14224, 2004.
- Ichihara, M., Murakumo, Y., Takahashi, M.: RET and neuroendocrine tumors. *Cancer Lett.*, 204: 197-211, 2004.
- Hashimoto, T., Ichihara, M., Watanabe, T., Kawai, K., Koshikawa, K., Yuasa, N., Takahashi, T., Yatabe, Y., Murakumo, Y., Zhang, J.-m., Nimura, Y., Takahashi, M. Expression of CD109 in human cancer. *Oncogene*, 23: 3716-3720, 2004.
- Kodama, Y., Murakumo, Y., Ichihara, M., Kawai, K., Shimono, Y., Takahashi, M. Induction of CRMP-2 by GDNF and analysis of the CRMP-2 promoter region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 320:108-115, 2004.
- Jijiwa, M., Fukuda, T., Kawai, K., Nakamura, A., Kurokawa, K., Murakumo, Y., Ichihara, M., Takahashi, M.: A targeting mutation of tyrosine 1062 in Ret causes a marked decrease of enteric neurons and renal hypoplasia. *Mol. Cell. Biol.*, 24: 8026-8036, 2004.
- Maeda, K., Murakami, H., Yoshida, R., Ichihara, M., Abe, A., Hirai, M., Murohara, T., Takahashi, M.: Biochemical and

- biological responses induced by coupling of Gab1 to phosphatidylinositol 3-kinase in RET-expressing cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 323: 345-354, 2004.
- Jin, Y., Murakumo, Y., Ueno, K., Hashimoto, M., Watanabe, T., Shimoyama, Y., Ichihara, M., Takahashi, M.: Identification of a mouse cytoskeleton-associated protein, CKAP2, with microtubule-stabilizing properties. *Cancer Sci.*, 95: 815-821, 2004.
- Okamura N, Suemoto T, Shimadzu H, Suzuki M, Shiomitsu T, Akatsu H, Yamamoto T, Staufenbiel M, Yanai K, Arai H, Sasaki H, Kudo Y, Sawada T
Styrylbenzoxazole derivatives for in vivo imaging of amyloid plaques in the brain. *J Neurosci.* 2004 Mar 10;24(10):2535-41.
- Suemoto T, Okamura N, Shiomitsu T, Suzuki M, Shimadzu H, Akatsu H, Yamamoto T, Kudo Y, Sawada T In vivo labeling of amyloid with BF-108. *Neurosci Res.* 2004 Jan;48(1):65-74.
- Heese K, Yamada T, Akatsu H, Yamamoto T, Kosaka K, Nagai Y, Sawada T. Characterizing the new transcription regulator protein p60TRP. *J Cell Biochem.* 2004 Apr 1;91(5):1030-42.
- Marui W, Iseki E, Kato M, Akatsu H, Kosaka K.
Pathological entity of dementia with Lewy bodies and its differentiation from Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl).* 2004 Aug;108(2):121-8. Epub 2004 May 14.
- Yamagata H, Chen Y, Akatsu H, Kamino K, Ito J, Yokoyama S, Yamamoto T, Kosaka K, Miki T, Kondo I.
Promoter polymorphism in fibroblast growth factor 1 gene increases risk of definite Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Aug 20;321(2):320-3.
- Akatsu H, Kamino K, Yamagata H, Isojima D, Kondo I, Yamamoto T, Kida T, Takeda M, Miki T, Kosaka K
Increased incidence of dementia with Lewy bodies in the cases carrying the e4-allele of apolipoprotein E
Psychogeriatrics 2004 in press
- Okamura N, Suemoto T, Shiomitsu T, Suzuki M, Shimadzu H, Akatsu H, Yamamoto T, Arai H, Sasaki H, Yanai K, Staufenbiel M, Kudo Y, Sawada T.
A novel imaging probe for in vivo detection of neuritic and diffuse amyloid plaques in the brain. *J Mol Neurosci.* 2004;24(2):247-56.
- Heese K, Fujita M, Akatsu H, Yamamoto T, Kosaka K, Nagai Y, Sawada T.

The Splicing Regulatory Protein p18SRP Is Down-Regulated in Alzheimer's Disease Brain.

J Mol Neurosci. 2004;24(2):269-76.

Akatsu H, Yamagata H, Chen Y, Miki T, Kamino K, Takeda M, Campbell W, Kondo

I, Kosaka K, Yamamoto T, Okada H.

TAFI polymorphisms at amino acids 147 and 325 are not risk factors for cerebral infarction.

Br J Haematol. 2004 Nov;127(4):440-7.

Kanie J, Suzuki Y, Akatsu H, Kuzuya M, Iguchi A.

Prevention of late complications by half-solid enteral nutrients in percutaneous endoscopic gastrostomy tube feeding.

Gerontology. 2004 Nov-Dec;50(6):417-9.

Akatsu H, Kamino K, Yamagata H, Isojima D, Kondo I, Yamamoto T, Kida T, Takeda M, Miki T and Kosaka K

Increased incidence of dementia with Lewy bodies in patients carrying the ϵ 4-allele of apolipoprotein E

Psychogeriatrics, June 2004, vol. 4, no. 2, pp. 24-32(9)

Hayashi T, Nomura H, Esaki T, Hattori A, Kano-Hayashi H, Iguchi A, The treadmill exercise-tolerance test is useful for the prediction and prevention of ischemic coronary events in elderly diabetics

J Diabetes and its complication (in

press)

Hayashi T, Packiasamy AR, Kano-Hayashi H, Tsunekawa T, Dingqunfang D, Sumi D, Matsui-Hirai H, Fukatsu A, Iguchi A. NADPH Oxidase Inhibitor, Apocynin, restores the impaired endothelial dependent and independent responses and scavenges superoxide anion in Rats with Type II Diabetes Complicated by NO Dysfunction Diabetes, Obesity and Metabolism (in press)

Ding Qunfang, Toshio Hayashi*, Packiasamy AR Juliet, Asaka Miyazaki, Akiko Fukatsu, Hiroaki Shiraishi, Takahide Nomura, Akihisa Iguchi The effect of high glucose on NO and superoxide anion through endothelial GTPCH1 and NADPH oxidase Life Sciences, 2004. 75, 3185-3194

Nomura H, Hayashi H, Hayashi T., Endo H, Miura H, Satake S, Iguchi A "Bowel incontinence is related to improvement in basic activities of daily living (BADL) in residents of long-term care health facilities for the elderly in Japan". Geriatrics Gerontology International 4, (in press) 2004

Horiuchi H, Matsuzawa Y, Mabuchi H, Itakura H, Sasaki J, Yokoyama M, Ishikawa Y, Yokoyama S, Mori S, Ohru T, Akishita M, Hayashi T, Yamane K, Egusa G, Kita T. Strategy for treating elderly Japanese with

- hypercholesterolemia. *Geriatrics Gerontology International* 4, 151-157, 2004
- Hayashi T, Rani P JA, Fukatsu A, Matsui-Hirai H, Osawa M, Miyazaki A, Tsunekawa T, Kano-Hayashi H, Iguchi A, Sumi D, Ignarro LJ. A new HMG-CoA reductase inhibitor, pitavastatin remarkably retards the progression of high cholesterol induced atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis*. 2004;176:255-63.
- Juliet PA, Hayashi T, Daigo S, Matsui-Hirai H, Miyazaki A, Fukatsu A, Funami J, Iguchi A, Ignarro LJ.. Combined effect of testosterone and apocynin on nitric oxide and superoxide production in PMA-differentiated THP-1 cells. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1693:185-91.
- Takeuchi K, Watanabe H, Tran QK, Ozeki M, Sumi D, Hayashi T, Iguchi A, Ignarro LJ, Ohashi K, Hayashi H. Nitric oxide: inhibitory effects on endothelial cell calcium signaling, prostaglandin I₂ production and nitric oxide synthase expression. *Cardiovasc Res*. 2004 ;62:194-201.
- Uekawa N, Terauchi K, Nishikimi A, Shimada J, Maruyama M. Expression of TARSH gene in MEFs senescence and its potential implication in human lung cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*,329,1035-1038, 2005
- Nishikimi A, Meller N, Uekawa N, Isobe K, Schwartz MA, Maruyama M. Zizimin2: a novel, DOCK180-related Cdc42 guanine nucleotide exchange factor expressed predominantly in lymphocytes. *FEBS Lett*. 579(5):1039-1046,2005
- Novobrantseva T, Xu S, Tan JE, Maruyama M, Schwers S, Pelanda R, Lam KP. Stochastic pairing of Ig heavy and light chains frequently generates B cell antigen receptors that are subject to editing in vivo. *Int Immunol*. 2005, in press.
- Uekawa N, Nishikimi A, Isobe K, Iwakura Y, Maruyama M. Involvement of IL-1 family proteins in p38 linked cellular senescence of mouse embryonic fibroblasts. *FEBS Lett*. 575(1-3):30-34, 2004.
- Murata T., Morita N., Hikita K., Kiuchi K., Kiuchi K. and Kaneda N.: Recruitment of mRNA-destabilizing protein TIS11 to stress granules is mediated by its zinc finger domain. *Exp. Cell Res*. 303 (2), 287-299 (2005)
- Adachi K, Yimin Y, Satake K, Matsuyama Y, Ishiguro N, Sawada M, Hirata Y, Kiuchi K.: Localization of cyclooxygenase-2 induced following traumatic spinal cord

injury. *Neurosci Res.* 51 (1), 73-80 (2005).

Yu Y, Matsuyama Y, Yanase M, Ito S, Adachi K, Satake K, Ishiguro N, Kiuchi K.: Effects of hyperbaric oxygen on GDNF expression and apoptosis in spinal cord injury. *Neuroreport.* 15 (15), 2369-2373 (2004).

Nakashima S, Matsuyama Y, Yu Y, Kiuchi K, Ishiguro N.: Suppression of GDNF production by MPSS treatment following spinal cord injury in the rat. *Neuroreport.* 15 (15), 2337-2340 (2004).

Yu Y, Matsuyama Y, Nakashima S, Yanase M, Kiuchi K, Ishiguro N.: Effects of MPSS and a potent iNOS inhibitor on traumatic spinal cord injury. *Neuroreport.* 15 (13), 2103-2107 (2004).

Hirata Y, Furuta K, Miyazaki S, Suzuki M and Kiuchi K.: Anti-apoptotic and pro-apoptotic effect of NEPP11 on manganese-induced apoptosis and JNK pathway activation in PC12 cells. *Brain Res.* 1021 (2), 241-247 (2004).

Hashikawa, S., Iinuma, Y., Furushita, M.,

Ohkura, T., Nada, T., Torii, K., Hasegawa, T. and Ohta, M. Characterization of group C and G streptococci strains that caused streptococcal toxic shock syndrome (STSS). *J. Clin. Microbiol.* 42:186-192, 2004.

Nakamura, T., Hasegawa, T., Torii, K., Hasegawa, Y., Shimokata, K., and Ohta, M. Two-dimensional gel electrophoresis analysis of the abundance of virulent exoproteins of group A streptococcus caused by environmental changes. *Arch. Microbiol.* 181:74-81, 2004.

Hasegawa, T., Hashikawa, S., Nakamura, T., Torii, K. and Ohta, M. Factors determining prognosis in streptococcal toxic shock-like syndrome: Results of a nationwide investigation in Japan. *Microbes and Infection* 6:1073-1077, 2004.

Tanaka, M., Hasegawa, T., Okamoto, A., Torii, K. and Ohta, M. The effect of antibiotics on group A streptococcus exoprotein production analyzed by two-dimensional gel electrophoresis. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:88-96, 2005.

＜分担研究報告書＞

ストレス応答制御による老化制御

分担研究者 磯部健一（国立長寿医療センター研究所、老化機構部長、—）名古屋大学大学院医学系研究科分子細胞免疫、教授）

研究要旨： アルツハイマー病の病態形成あるいは生体防御にミクログリアが果たす役割が研究されてきた。現在、A-betaがミクログリア細胞のレセプターCD36に結合し、膜結合型チロシンキナーゼを活性化し、細胞にシグナルをおくることが判明している。私達は、ミクログリア細胞株を使用し、シグナル伝達系を検索すると同時にそのターゲット遺伝子発現をマイクロアレイで網羅的に解析した。その結果以下のことを見出した。

- 1) A-betaはミクログリアを活性化させ、MAPK系で特にERK1/2を強くリン酸化する。
- 2) A-betaはミクログリアを活性化させ、PI3キナーゼ/Aktを活性化する。
- 3) これらのターゲット遺伝子発現をマイクロアレイで網羅的に解析したところCCI2, CCL4, CCL7といったケモカインといったマクロファージ系細胞に特徴的な蛋白を発現してくることを見出した。

A. 研究目的

ストレス応答は細胞内で種々のストレス刺激に対し、生体がシグナル伝達系、遺伝子発現系を介して、反応する細胞内応答系と個体レベルで、主として、自然免疫系を介して反応する場合がある。私達はこれまで、老化促進ストレス刺激に対する前者の細胞応答系を詳細に解析してきた。本研究ではこれらを発展させ、具体的な疾患としてのアルツハイマーを想定し、A-betaという、老化によって蓄積するペプチドに対する、自然免疫系の細胞、すなわち、ミクログリアの応答を分子レベルで明らかにし、アルツハイマー病発症への関与を検討した。

B. 研究方法

- (1) ミクログリア、アストロサイト、神経細胞の分離培養

ラット、マウスの脳を取りだし、in vitroで機械的に分離し培養した。また、マウスのミクログリア株はRa2（沢田教授と共同研究）を使用した。

2、A-betaによるミクログリアの活性化とシグナル伝達系、遺伝子発現制御

(1) beta1-40(A-beta40), A-beta1-42(A-beta42), A-beta25-35を培養細胞に加え、刺激後、かく時間の細胞を取り出し、細胞抽出液のウエスタン解析で、シグナル伝達系を検索した。また、RNAを取り出し、RT-PCRを行った。また、網羅的解析のため、刺激前後のサンプルで、マイクロアレイを行った。

(倫理面への配慮)

実験中にはマウスに苦痛を与えぬよう十分に配慮した。

C. 研究結果

(1) PI3/Akt、Erk系シグナル伝達系、Erk系の活性化

Abeta42 は分離ミクログリア、Ra-2細胞株共に強く刺激し、PI-3キナーゼの活性化を介し、Aktの強いリン酸化を引き起こした。また、Erkの強いリン酸化を引き起こした。この活性は、A-beta には見られなく、A-beta25-35 にも認められた。

(2) ケモカインの誘導

Abeta42を16時間Ra-2に作用させ、RNAをマイクロアレイで調べたところ、CCl2, CCL4, CCL7といったマクロファージ細胞に特徴的なケモカインが強く発現してきた。

D. 考察

Abeta40はほとんどミクログリアを活性化できないのに対し、42は非常に強く活性化した。加齢にともなう異常蛋白が自然免疫系を活性化させる機序の1つのモデルとしてもアルツハイマーの成因を知るのにも、A-betaによるミクログリア活性化機構の解明は意義があると思われる。

E. 結論

1) A-betaはミクログリアを活性化させ、MAPK系で特にERK1/2を強くリン酸化する。

2) A-betaはミクログリアを活性化させ、PI3キナーゼ/Aktを活性化する。

3) これらのターゲット遺伝子発現をマイクロアレイで網羅的に解析したところCCl2, CCL4, CCL7といったケモカインといったマクロファージ系細胞に特徴的な蛋白を発現してくることを見出した。

F. 健康危険情報
なし。

G. 研究発表

(1) 論文発表

1、Haneda M, Xiao H, Hasegawa T, Kimura Y, Nakashima I, Isobe K. Regulation of mouse GADD34 gene transcription after DNA damaging agent methylmethane sulfonate. *Gene*. 2004 Jul 7;336(1):139-46.

2: Haneda M, Kojima E, Nishikimi A, Hasegawa T, Nakashima I, Isobe K. Protein phosphatase 1, but not protein phosphatase 2A, dephosphorylates DNA-damaging stress-induced phospho-serine 15 of p53.

FEBS Lett. 2004 Jun 4;567(2-3):171-4.

3、Ito, S. Sawada M., Haneda M, Fuji S., Oh-hashii K., Kiuchi K., Takahashi M. and Isobe K. Amyloid- β Peptides Induce Cell Proliferation and Macrophage Colony-stimulating Factor Expression via PI3-kinase/Akt Pathway in Cultured Ra2 Microglial Cells *FEBS Lett*. In press

(2) 学会発表

磯部健一、羽根田正隆、伊藤佐知子；アルツハイマー病とミクログリア（第3報）第34回日本免疫学会 1-3日12月札幌

B細胞、形質細胞分化におけるストレス応答遺伝子 GADD34 の機能～GADD34 knockout mouseを用いた解析
第34回日本免疫学会 1-3日12月札幌

＜分担研究報告書＞

ストレス応答制御による神経変性疾患予防

分担研究者 祖父江 元

(名古屋大学大学院医学系研究科神経内科、教授)

研究要旨：球脊髄性筋萎縮症（SBMA）は、アンドロゲン受容体（AR）遺伝子内のCAGリピートの異常延長により、運動ニューロンなどが特異的に変性死に陥る。AR遺伝子のCAGリピートが蛋白質に翻訳され、異常延長したポリグルタミン鎖になることで、変異ARが新たな毒性を獲得することが判明している。我々は、chicken β -actinプロモーターの調節下で異常延長したCAGリピートをもつヒトの全長のAR遺伝子を発現するトランスジェニックマウス（Tg）を作成し、種々の治療的介入実験を行った。抗癌剤として臨床試験されているHsp90阻害剤には、Hsp90のクライアント蛋白を不安定化させる作用とマウスや細胞レベルで分子シャペロンの発現を増加させる作用が確認されている。Hsp90阻害剤の投与により濃度依存性に変異AR蛋白が著減し、Hsp70やHsp40の発現も増加した。Tgの治療群は非治療群に対して、有意に運動機能障害の改善効果を認めた。また、シャペロン依存性ユビキチンリガーゼを高発現するトランスジェニックマウスを作成し、13系統を得て、Tgとのダブルトランスジェニックマウスを作成しつつあり、今後シャペロン依存性ユビキチンリガーゼ高発現の効果を検討する。消化性潰瘍の薬剤であるgeranylgeranylacetone(GGA)には、マウスや細胞レベルで分子シャペロンの発現を増加させる作用が確認されており、GGAもTgに投与すると、運動機能障害の改善効果がみられた。

A. 研究目的

ポリグルタミン病、アルツハイマー病、プリオン病などの神経変性疾患は、神経細胞内に変異した蛋白が蓄積して病態が形成され、高齢者のADL低下と関係する。変異蛋白は、ユビキチン・プロテアソーム系を介して分解され、この系を利用する治療法が考え出されてきている。球脊髄性筋萎縮症（SBMA）は、アンドロゲン受容体（AR）遺伝子内のCAGリピートの異常延長により、運動ニューロンなどが特異的に変性死に陥る。AR遺伝子のCAGリピートが蛋白質に翻訳され、異常延長したポリグルタミン鎖になるこ

とで、変異ARが新たな毒性を獲得することが判明している。SBMA では変異ARからなる核内封入体(NI)とびまん性核内集積が特徴的な病理所見であり、異常延長したポリグルタミン鎖を含有する異常蛋白が生体の防御機構を凌駕して神経細胞内で不溶性の封入体を形成したり、あるいは蓄積する過程で細胞毒性をもたらし、特定の神経細胞が変性し細胞死に至ると考えられている。また、ポリグルタミン鎖の延長した病因蛋白は折りたたみ異常を持ち（misfold蛋白）、つまり3次元構造が変化して病原性を発揮していることも想定されている。この病因蛋白質の蓄積による選択的な神経細胞変性死のメ

カニズム形成には、核内の転写因子が枯渇することやユビキチン・プロテアソームシステムやライソソームなどの蛋白質分解系の破綻など多くの機序が関与していることが報告されており、その分子病態については十分に明らかになっていない。治療法として最も有効と考えられる方法は、この病的蛋白質そのものの発現を選択的に抑制することであろう。ポリグルタミン病の病因蛋白質の中で、SBMAのARは数少ない、機能が判明しているものの一つである。近年我々の作成した97CAGリピートを有するヒト全長ARを発現するトランスジェニックマウス (Tg) は、進行性の運動障害と神経病理所見を呈し、これらの所見は、ヒトSBMAと同様に症状や変異ARの核内局在に著しい性差を認め、SBMAの病態にリガンドであるテストステロンが深く関与していることが判明した。本研究では、ポリグルタミン病の中でも運動ニューロン疾患であるSBMAを対象として、これまでの研究成果を基に病態を解明し治療法の開発を行った。

B. 研究方法

1、Chicken β -actinプロモーターの調節下で異常延長したCAGリピートをもつヒトの全長のAR遺伝子を発現するTgを作成した。

2、培養細胞モデルは、正常長(AR24Q)又は異常延長したポリグルタミン鎖(AR97Q)を含有するヒトアンドロゲン受容体(AR)遺伝子を発現ベクターに組み込み、ヒト神経培養細胞(SHSY5Y)に発現させたもので、発現48時間後に

細胞を回収してタンパク質を抽出し、ウエスタンブロットを行った。Hsp90阻害剤は、Dimethyl Sulfoxide(DMSO)に溶解し、18、90、180、360nMの濃度で投与した。コントロールとして、何も投与しないもの(C)とDMSOのみを投与したもの(DM)を用いた。Tgへの薬剤の1回投与量はこれまでの報告において、短期投与では毒性が問題にならないことが確認されている量とし(2.5、25mg/kg)、薬剤吸収が確実な腹腔内注射法にて週に3回施行した。コントロール群には溶剤であるDimethyl Sulfoxide(DMSO)を投与した。薬効の評価は体重変化、生存率、Rotarod法、Cage activity測定法(24時間のマウスの動作の回数の測定)をパラメーターとした。

3、SBMA培養細胞モデルは、正常長(AR24Q)又は異常延長したポリグルタミン鎖(AR97Q)を含有する短縮型AR遺伝子発現ベクターをヒト神経培養細胞(SHSY5Y)で一過性強制発現させた。この培養細胞モデルとTgでgeranylgeranylacetone(GGA)の有効性を検討した。

4、Tgとシャペロン依存性ユビキチンリガーゼ高発現マウスおよびそのlittermateとのダブルトランスジェニックマウスを作成した。

(倫理面への配慮)

実験中にはマウスに苦痛を与えぬよう十分に配慮した。

C. 研究結果

1、Tgの表現型

チキン β -アクチンプロモーター 調

節下に24CAGないし97CAGを有するヒトARをpCAGGSベクターにサブクローニングし、microinjectionにてTgを作成し、24繰り返しのマウス（AR-24Q）3系統と、97繰り返しのマウス（AR-97Q）5系統とを得た。AR-24Qのマウスはいずれも無症状であったが、AR-97Qの5系統の内3系統では進行性の運動障害が認められた。症状は雄のAR-97Qマウスにおいて重篤かつ急速に進行したが、雌では症状が認められないか、あっても雄より遥かに軽症であった。ウエスタンブロットでは、変異ARの高発現が認められ、変異ARモノマーに加え、ゲルの上部に留まる蛋白複合体と切断された変異AR断片も認めた。変異蛋白は脊髄、脳、心、筋および腓などに認められた。ゲル上部に留まる変異蛋白の発現は雄でより大量に認め、その殆どは核分画に存在していた。AR-24Qマウスでは異常な病理所見は認められなかったが、AR-97Qマウスにおいては、異常延長したポリグルタミンに対する特異的抗体（1C2）による免疫染色で、核のびまん性染色や核内封入体が脊髄、大脳、小脳、脳幹や後根神経節の神経細胞および心や筋、腓などの非神経組織に認められた。神経組織では運動ニューロンの核に最も著明な核のびまん性染色や核内封入体が認められた。核の染色は雄でより高頻度に認められ、症状やウエスタンブロットの性差に一致する結果が得られた。

2、Hsp90阻害剤による治療

SBMAには抗アンドロゲン療法が有望な治療法となりうる可能性があるが、

抗アンドロゲン療法は生殖能力低下の副作用が避けがたく、また、他のポリグルタミン病には応用できない等の問題がある。そこで、ARがHsp90のクライアントタンパク質であることに注目し、生体内でクライアントタンパク質の分解を促進させるHsp90阻害剤の有効性をSBMA培養細胞及びマウスモデルにて検討した。腫瘍関連タンパク質の多くが、Hsp90のクライアントタンパク質であるため、Hsp90阻害剤は抗癌剤として臨床応用が期待されている。一方、Hsp90阻害剤はHsp70やHsp40を非特異的に増加させる作用も有するため、神経細胞保護効果が期待できる。培養細胞モデルは、異常延長したポリグルタミン鎖（AR97Q）を含有するAR遺伝子発現ベクターをヒト神経培養細胞（SHSY5Y）で一過性強制発現させた。薬剤投与により濃度依存性にAR97Q蛋白が著減し、Hsp70やHsp40の発現も増加した。ポリグルタミンが延長した病的な変異ARも、Hsp90阻害剤に感受性を有することが明らかになった。Tgに対する薬剤投与は、生後5週齢より腹腔内投与にて行った。治療効果は、運動機能（Rotarod法、Cage activity測定法）、生存率、体重変化、病理的所見、変異ARの生化学的解析により比較検討した。治療群は非治療群に対して、有意に運動機能障害の改善効果を認めた。ウエスタンブロット法によりタンパク質の発現レベルを評価したところ、脊髄と骨格筋において培養細胞モデルの結果と同様に、AR97Qの減少とHsp70とHsp40の発現増加が認められた。抗ポリグルタミン抗体（1C2）を

用いた病理学的検索でも、1C2陽性細胞が有意に減少した。このように、Hsp90阻害剤は、変異ARの分解を促進し、治療群でも生殖能力が保たれ、その他にも明らかな副作用は認めず、SBMAや他のポリグルタミン病の治療薬として臨床応用可能な薬剤と考えられる。

3、Geranylgeranylacetoneによる治療

Geranylgeranylacetone(GGA)は、疾患モデルマウスや培養細胞を用いた実験で分子シャペロンの発現を増加させる作用が確認されている。培養細胞モデルは、異常延長したポリグルタミン鎖(AR97Q)を含有する短縮型AR遺伝子発現ベクターをヒト神経培養細胞(SHSY5Y)で一過性強制発現させた。薬剤投与により濃度依存性に細胞死とAR97Q蛋白からなる凝集体形成が抑制され、Hsp70やHsp40の発現も増加した。GGAもTgに投与すると、運動機能障害、生存率、体重変化の改善効果がみられた。ウエスタンブロット法によりタンパク質の発現レベルを評価したところ、脊髄と骨格筋において、AR97Qの核内蓄積減少とHsp70とHsp40などの発現増加が認められた。

4、シャペロン依存性ユビキチンリガーゼ高発現による治療

シャペロン依存性ユビキチンリガーゼ高発現マウスとAR-97Qマウスとを交配したdouble Tgを作成し、13系統を得て、Tgとのダブルトランスジェニックマウスを作成しつつあり、今後シャペロン依存性ユビキチンリガーゼ高発現の効果を検討する。

D. 考察

1、Hsp90阻害剤の効果

Hsp90阻害剤のポリグルタミン病培養細胞モデルとモデルマウスへの投与は、有意な治療効果を示した。モデルマウスへの長期連続投与に、明らかな副作用は確認されなかった。ポリグルタミン鎖が伸張した病的なARタンパク質の方が、Hsp90に対する依存性が高くなっていると考えられる。今回、ARが17-AAGの治療ターゲットとなることが明らかになったが、さらにその他のポリグルタミン病の病因蛋白質にもHsp90依存性が認められれば、Hsp90阻害剤投与が治療法になりうると思われる。Hsp90阻害剤投与は癌の治療法として臨床応用されつつあるが、神経変性疾患であるポリグルタミン病全般にも応用できる可能性のある有望な薬剤である。

2、GGAの効果

GGAは分子シャペロンを高発現させる効果を有し、ポリグルタミン病培養細胞モデルとモデルマウスの病態を改善させた。生体細胞内にはmisfold蛋白をubiquitin-proteasome系に受け渡す蛋白質の品質管理を行う蛋白も報告されている。特に、Hsp70は、変異ARをrefoldingすることで毒性を軽減するのみならず、ubiquitin-proteasome系を介した分解を促進することで、結果として核内に蓄積する変異ARの量を減少させ、病態を改善させるものと考えられた。

E. 結論

SBMAを始めとするポリグルタミン病では、変異蛋白がcleavageなどの修飾を受け核内に移行し、蓄積していくことで転写因子などとの蛋白相互作用を介して病態を形成するものと考えられている。変異蛋白の核内蓄積を抑制する我々の方法は病態に根ざした治療法であり、他のポリグルタミン病にも応用可能な方法と考えられる。ことに、Hsp90阻害剤やGGAはすでに癌や消化性潰瘍の治療薬として広く使用され、その安全性も確立されていることから、SBMAの治療法として有望と考えられる。ポリグルタミン病の治療法は、今後これらの様々な方法を組み合わせて行うことになると考えられる。

F. 健康危険情報
なし。

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Waza M, Sang C, Nakagomi Y, Kobayashi Y, Tanaka F, Doyu M, Inukai A, Yoshida M, Hashizume Y, Sobue G. Widespread nuclear and cytoplasmic accumulation of mutant androgen receptor in SBMA patients. *Brain* 128: 659-670, 2005.

2. Jiang Y, Yamamoto M, Kobayashi Y, Yoshihara T, Liang Y, Terao S, Takeuchi H, Ishigaki S, Katsuno M, Adachi H, Niwa, J, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Gene expression profiles of spinal motor neurons in

sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 57:236-251, 2005.

3. Ishigaki S, Hishikawa N, Niwa J, Iemura S, Natsume T, Hori S, Kakizuka A, Tanaka K, Sobue G. Physical and Functional Interaction between Dorsin and Valosin-containing Protein That Are Colocalized in Ubiquitylated Inclusions in Neurodegenerative Disorders. *J Biol Chem* 279:51376-51385, 2004.

4. Katsuno M, Adachi H, Sobue G: Sweet relief for Huntington disease. *Nat Med* 10:123-124, 2004.

5. Katsuno M, Sobue G. Polyglutamine diminishes VEGF; passage to motor neuron death? *Neuron* 41:677-679, 2004.

6. Katsuno M, Adachi H, Tanaka F, Sobue G: Spinal and bulbar muscular atrophy: ligand-dependent pathogenesis and therapeutic perspectives. *J Mol Med* 82: 298-307, 2004.

7. Minamiyama M, Katsuno M, Adachi H, Waza M, Sang C, Kobayashi Y, Tanaka F, Doyu M, Inukai A, Sobue G. Sodium butyrate ameliorates phenotypic expression in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 13:1183-1192, 2004.

(2) 学会発表

Minamiyama M, Katsuno M, Adachi H, Waza M, Sang C, Nakagomi Y, 足立弘明、勝野雅央、南山 誠、和座雅浩、桑 晨、小林 靖、道勇 学、祖父江元：SBMAの変異ARの核及び細胞質内集積の分布と病態発現。第44回日本神経学会総会 東京 2004年5月

平成16年度厚生労働省精神・神経疾患研究委託費「神経疾患の分子機構の解明と治療法開発に関する研究」班会議 祖父江 元、坂野晴彦、勝野雅央、足立弘明、南山 誠、和座雅浩、熱田直樹、渡邊宏久、田中章景、道勇学：球脊髄性筋萎縮症の治療開発—leuprorelinとgeranylgeranylacetoneについて—。東京、2004年12月

Kobayashi Y, Tanaka F, Doyu M, Inukai A, Sobue G. Sodium Butyrate Ameliorates Phenotypic Expression

分担研究報告書
老化による神経変性疾患の病態とその予防
免疫制御による脳変性疾患の予防

分担研究者 赤津裕康 小阪憲司
(医療法人さわらび会福祉村病院 長寿医学研究所副所長)

研究要旨：高等動物であるヒトの老化は代謝あるいは外的ストレス刺激（紫外線、放射線、感染等）によるラジカル産生等による組織構成成分の変化によるところが大きい。このような老化促進ストレスに対し、生体は細胞レベルで、シグナル伝達系、遺伝子発現制御を介し、反応する。生体反応系は老化を正負に調節する。細胞レベルではラジカル消去酵素、遺伝子修復系が老化防御に働く。また、異常蛋白の小胞体への蓄積はERストレスを誘起し、老化の防御とともに、老化に伴う疾患の病態形成に働く。我々は特に中枢性疾患に的を絞り、実際のヒトサンプルを用いて動脈硬化、ある津は今イー病、パーキンソン病とこれらストレス因子と神経の老化を防御する方策を見出す。これらにより、これら疾患の予防策を研究すると同時に老化そのものの制御策を検する。また、これらの研究を通じ健康長寿を達成する方策を研究する。

A. 研究目的

生体が本来備えている老化防御機能を効果的に引き出すことにより、老化制御、老化予防策を明らかにすることにある。高齢者の疾患のうち動脈硬化は酸化ストレスにより変化したLDLがマクロファージに貪食され、泡沫細胞となったマクロファージの出すサイトカイン、あるいは免疫系に抗原提示され、T、B細胞が病変形成に関与することが明らかにされている。私達は高齢者の疾患のうち、特に多い痴呆疾患等、神経変性疾患も同様な仕組みが存在すると考えている。脳動脈硬化、アルツハイマー、パーキンソン病は遺伝的な背景の違いで老化に伴う病態進行が異なるとも考えられる。その観点より、我々の

用いるヒトサンプルの遺伝的背景を検索することに焦点を絞って研究を進めた。また、神経細胞死に関連すると思われる因子の発現解析やリン酸化酵素の発現解析も開始した。

B. 研究方法

1、ブレインバンクサンプルの遺伝子解析
書面にて承諾を得た剖検サンプルを用いて遺伝子多型解析を行った。特に、Apolipoprotein E (APOE), carboxypeptidase R;CPR (別名 thrombin activatable fibrinolysis inhibitor;TAFI), brain derived neurotrophic factor(BDNF) の多型解析を fragment length PCR法を用

いて行った。

2、発現遺伝子・蛋白解析；

神経細胞死に関連すると思われる因子 (Death associated protein 3;DAP3等) の遺伝子発現、細胞周期に関する因子 (p53, p21 p27, bcl2等) の免疫染色、RT-PCRを行った。

3、リン酸化酵素発現解析

書面にて承諾を得た剖検サンプルを用いてリン酸化酵素の網羅的解析を共同研究にて行った。。

(倫理面への配慮)

本施設およびブレインバンクに関して、生命倫理面および個人情報管理面では考えうる最大限の努力を払っており、ヘルシンキ宣言の内容、遺伝学的検査に関するガイドライン(遺伝医学関連学会等10学会および研究会、平成15年8月)、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(文部科学省、厚生労働省、経済産業省、平成13年4月1日施行)および疫学研究に関する倫理指針(3省、平成14年7月1日施行)に完全に準拠するものと考えている。

C. 研究結果

1、遺伝子多型解析

A) CPR/TAFIと脳梗塞疾患との解析を行い、これに関しては相関性の無いことが明らかとなった。

B) APOEに関しては、従来の報告どうりアルツハイマー病 (AD)との相関性を見出すとともに、Dementia with Lewy body disease(DLB)においてもある程度の相関性を見出した。

C)BDNFに関しては、これまでの報告

でも統一した結果は出ていないが、AD、DLBともに相関性は見出されなかった。

2、発現遺伝子・蛋白解析；

現在解析中であり、まだまとまった結果を出すには至っていない。

3、リン酸化酵素発現解析

AD脳における発現解析は終了したが、その病態に対する意義に関しては検討中である。

D. 考察および結論

今年度の結果としては、目新しい成果を得てはいない。しかしブレインバンクサンプルに対して遺伝的バックグランド情報の整備を開始した事により、今後遺伝的背景のしっかりしたサンプルに基づいて、外的ストレス因子に対しての検索を進めていくことが可能になると考えている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(1) 論文発表

Okamura N, Suemoto T, Shimadzu H, Suzuki M, Shiomitsu T, Akatsu H, Yamamoto T, Staufienbiel M, Yanai K, Arai H, Sasaki H, Kudo Y, Sawada T Styrylbenzoxazole derivatives for in vivo imaging of amyloid plaques in the brain. *J Neurosci.* 2004 Mar 10;24(10):2535-41.

Suemoto T, Okamura N, Shiomitsu T, Suzuki M, Shimadzu H, Akatsu H, Yamamoto T, Kudo Y, Sawada T