

- 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  
 $\epsilon$ 4-allele of apolipoprotein E  
Psychogeriatrics, June 2004, vol. 4,  
no. 2, pp. 24-32(9)

(2) 学会発表

丸井和美、井関栄三、赤津裕康、小阪  
憲司、加藤雅紀  
レビー小体型痴呆における黒質線条体  
路と黒質扁桃核路は異なる変性過程を  
示す？  
第45回日本神経病理学会 2004.5.26-  
28(群馬)

磯島大輔、赤津裕康、都甲崇、内門大  
丈、藤城弘樹、井関栄三、平安良雄、  
小阪憲司  
レビー小体型痴呆における\_管病変の  
検討  
第45回日本神経病理学会 2004.5.26-  
28(群馬)

都甲崇、磯島大輔、鈴木京子、内門大

丈、赤津裕康、井関栄三、小阪憲司、  
平安良雄  
Argyrophilic grain diseaseの臨床的  
特徴  
第45回日本神経病理学会 2004.5.26-  
28(群馬)

赤津裕康、磯島大輔、山本孝之、小阪  
憲司  
非特異的の老人斑を呈した混合型痴呆症  
例  
第45回日本神経病理学会 2004.5.26-  
28(群馬)

Akatsu H, Kamino K, Yamagata H,  
Isojima D, Kondo I, Yamamoto T,  
Kida T,  
Takeda M, Miki T, Kosaka K  
Apolipoprotein E 4 allele increases  
risk of dementia with Lewy bodies  
The 9th International Conference on  
Alzheimer's Disease and Related  
Disorders (2004.7.17-22)

Akatsu H, Yamagata H, Chen Y,  
Miki T, Kondo I, Kosaka K,  
Yamamoto T, Okada H  
Analysis of TAFI gene  
polymorphism in  
neuropathologically confirmed  
cerebral  
infarct patients  
国際補体ワークショップ

赤津裕康、山縣英久、川又純、紙野晃  
人、武田雅俊、山本孝之、三木哲郎、  
遠山育

夫、下浜俊、小阪憲司  
BDNF 遺伝子 (Val66Met) 多型と確  
定痴呆性疾患との関連  
第23回日本痴呆学会 2004.9.29(東京)

## <分担研究報告書>

### GDNF/RET系シグナルと神経変性疾患

分担研究者 高橋雅英（名古屋大学大学院医学系研究科病理、教授）

#### 研究要旨

神経栄養因子GDNFとそのレセプターであるRETチロシンキナーゼの神経発生、腎臓発生における役割について、遺伝子組み換えマウスを用いて解析を行った。GDNF/RET細胞内シグナル伝達に重要な役割を果たすことが明らかになっているRETのコドン1062のチロシンをフェニルアラニンに置換したノックインマウスを作製した結果、ホモのノックインマウスでは十二指腸から直腸にかけての腸管神経系の著しい形成異常と腎臓の低形成が観察され、チロシン1062からのシグナル伝達が腸管神経系、腎臓の発生に極めて重要な役割を果たしていることを証明した。またRETチロシンキナーゼの機能がプロテインキナーゼAによっても制御されることを明らかにした。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。

#### A. 研究目的

神経栄養因子 glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)はRETチロシンキナーゼを介して神経細胞の生存・分化に重要なシグナルを細胞内に伝達する。GDNFは特に中脳ドーパミン作動性ニューロンや脊髄運動ニューロンの生存を増強する活性がみられ、パーキンソン病や筋萎縮性側索硬化症の治療薬として期待されている。生体内においてGDNF/RET

系がこれらの神経細胞の生存・分化にどのような役割を果たしているかを明らかにすることができれば、GDNFを用いたパーキンソン病や筋萎縮性側索硬化症の治療法開発のための有用な情報を提供できるものと考えられる。われわれはこの数年の研究により、RETチロシンキナーゼからの細胞内シグナル伝達の機序を詳細に解析してきた。これらの情報を基礎に、生体内におけるそれぞれのシグナル伝達系の神経細胞の生存・分化

や神経系機能に果たす役割を解明することは、将来特定のシグナル伝達系の操作による神経細胞の生存や再生を促進する技術開発につながり、ほかの神経栄養因子による神経再生の研究にも多大な貢献ができるものとする。本研究の目的はRETチロシンキナーゼの活性化による神経細胞の生存・分化に重要な役割を果たすシグナル伝達ネットワークをin vitroおよびin vivoの系を用いて詳細に解析することにある。さらに細胞内シグナル伝達に重要な役割を果たすアミノ酸に変異を導入したノックインマウスを作製し、これらのシグナル伝達系が神経細胞の発生・分化・生存にどのような影響を及ぼすかを解析し、その生体内における生理的意義を明らかにする。

## B. 研究方法

### 1. RETシグナル伝達のプロテインキナーゼAによる制御

RETの細胞内ドメインに存在するプロテインキナーゼAのリン酸化部位であるセリン696をアラニンに置換した変異cDNAを作製し、神経系細胞株に発現させ、GDNF刺激によって誘導される下流のシグナルを解析した。また細胞増殖、細胞周期に及ぼす影響を検討した。

### 2. RETのチロシン1062に変異を導入したノックインマウスの作製

入したノックインマウスの作製

RETの細胞内シグナル伝達に重要な役割を果たすチロシン1062をフェニルアラニンに置換したノックインマウスを作製し、形態学的変化を解析した。

### 3. RETのシグナル伝達におけるアダプター蛋白Dok-4の役割

RETを発現している神経芽細胞腫細胞株にDok-4を過剰発現し、RAS/ERK系、PI3K/AKT系などの細胞内シグナル伝達と形態変化に及ぼす影響を検討した。

## C. 研究結果

1. RETチロシンキナーゼの機能がプロテインキナーゼAによっても制御されることを明らかにした。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。GDNFによりJNKが活性化されるとG2期からM期への移行に重要な役割を果たすWee1、cyclinBの発現が安定化し、それに伴ってCdc2のリン酸化を増強することを明らかにした。

にした。

2. チロシン1062をフェニルアラニンに置換したノックインマウス (Y1062Fマウス) を作製し、その表現型について解析した。Y1062FマウスではPI3キナーゼ/Akt系が強く障害され、Ras/Erk系が中等度に障害されていることが明らかになった。ホモのノックインマウスは生後4週以内にすべて死亡し、組織学的には腸管神経系の発生が著しく障害されていた。胎児マウスの組織学的な解析より、ホモのノックインマウスは腸管内における神経前駆細胞の増殖と遊走が障害されていることが判明した。また腎臓は体重比でワイルドマウスに比べ、2分の1に減少していた。これは胎児期における後腎組織内での尿管芽の分岐が障害されていることによるものであった。

2. RETを発現する神経芽細胞腫細胞株TGWにDok-4を過剰発現し、GDNF処理による細胞の形態変化、シグナル伝達系の活性化について解析した。Dok-4の発現はGDNF刺激による神経突起の伸張の増強、Erkの活性化の持続、Rap1の活性化を誘導した。

#### D. 考察

1. RETシグナル伝達のプロテインキナーゼAによる制御

RETの機能がプロテインキナーゼAによるリン酸化を介して制御されていることが明らかになったことにより、神経系細胞におけるRETとG蛋白共役型レセプターとのクロストークの可能性が示唆された。特に、腸管神経細胞において、RETとともにその発生に重要な役割を果たしていることが知られているエンドセリンレセプターとのクロストークについて解析を進めることが重要であると考えられる。

2. チロシン1062をフェニルアラニンに置換したノックインマウス (Y1062Fマウス) を作製

Y1062Fマウスの解析により、チロシン1062からの細胞内シグナル伝達が腸管神経系や腎臓の初期発生に極めて重要な役割を果たしていることが明らかになった。今後このマウスを、他の細胞内シグナル伝達因子のノックアウトマウスと交配させることにより、その表現系を解析し、個体レベルでそれぞれのシグナル伝達系がどのように関与しているのかを明らかにしていきたい。

3. RETのシグナル伝達におけるアダプター蛋白Dok-4の役割

今回の解析のよりDok-4がErk系のシグナル伝達に関与し、持続的なErkの活性化を誘導し、神経突起の伸張に重要な役割を果たしていることを明

らかにした。今後、Dok-4と Erkをつなぐ経路を詳細に解析することにより、Erkの活性化を誘導する未知の経路を明らかにできる可能性がある。

#### E. 結論

1. プロテインキナーゼAによるRETのリン酸化はRac1/JNK系の活性化に重要である。
2. RETのチロシン1062からのシグナル伝達は腸管神経系および腎臓の初期発生に重要な役割を果たしている。
3. アダプター蛋白Dok-4はRETの下流でErkの持続的活性化に機能している。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. 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.
2. 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.

3. Ichihara, M., Murakumo, Y., Takahashi, M.: RET and neuroendocrine tumors. *Cancer Lett.*, 204: 197-211, 2004.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.

8. 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.

分担研究報告書  
免疫系による老化制御  
分担研究者 丸山光生

(国立長寿医療センター研究所 実験動物、室長)

研究要旨：加齢に伴う身体の機能低下や老年病の発症メカニズムについて細胞老化をモデルとして解明し、その予防や治療法の開発に貢献することを目指す。細胞老化は正常細胞にストレスが蓄積することによって細胞増殖が不可逆的に停止する現象として知られており、アポトーシスと並ぶ癌抑制機構として機能することが示唆されている。本年度は特にストレス応答性細胞老化においてIL-1Ra、IL-1 $\beta$ 、TARSH遺伝子発現を調節する機構について解明した。その結果細胞老化における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可能性を考察した。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。

#### A. 研究目的

加齢に伴う身体の機能低下や老年病の発症メカニズムについて細胞老化をモデルとして解明し、その予防や治療法の開発に貢献することを目指す。細胞老化は正常細胞にストレスが蓄積することによって細胞増殖が不可逆的に停止する現象として知られており、アポトーシスと並ぶ癌抑制機構として機能することが示唆されている。具体的に本研究ではMEF(マウス胎児由来繊維芽細胞)の細胞老化において発現量が増加した炎症性サイトカインIL-1ファミリー分子、IL-1RaおよびIL-1 $\beta$ と機能未知分子Tarsh (Target of Nesh)に着目

し、細胞老化における機能や発現調節機構を解明することを通して、急速な社会の高齢化が進む我が国にとって高齢者が健康で生き甲斐を持って生活できる社会を構築することを目的としている。

#### B. 研究方法

MEF (マウス胚性繊維芽細胞) を用いたストレス応答性細胞老化においてIL-1Ra、IL-1 $\beta$ 、Tarsh遺伝子発現を調節する機構について解明する。IL-1ファミリー分子については細胞老化におけるストレス応答性MAPキナーゼp38の活性化との関連に注目してシグナル伝達系路の特定やp38の標的分子の解析

を行い、細胞ストレスに対するIL-1ファミリー分子の機能について明らかにする。具体的には遺伝子レベルでの発現変化についてはreal-timePCRあるいはNorthern Blotting法によりmRNAでの発現を解析し、翻訳後の機能蛋白質としての変化はWestern Blotting法、免疫沈降法など、抗体を用いた手法にてそれらの詳細を検討した。Tarshについては老化細胞における会合分子の同定や強制発現系における細胞増殖の解析を行う。(倫理面への配慮) 胚性幹細胞を含めマウス由来の細胞、試料あるいは個体を用いる時はいかなる実験も所属する国立長寿医療センター研究所の定める倫理規定、動物実験ガイドラインを厳守した上で計画、実行する。また、動物実験の実施に関しては「動物の保護及び管理に関する法律」(法律第105号)や総理府告示第6号、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」あるいはCIOMSの「動物を用いる生物医学研究のための国際指導原則」等に精通し、遵守した。

### C. 研究結果

#### 1) MEF細胞老化におけるIL-1ファミリー分子の経時的発現の解析

IL-1 $\alpha/\beta$ と拮抗してI型IL-1レセプター(IL-1R)に結合し、p38経路を含むIL-1シグナル伝達を抑制する分子であるIL-1Raに注目し。定量RT-PCR法を用いてMEF細胞老化におけるIL-1ファミリ

ー分子の発現について経時変化を解析したところ、IL-1Raは細胞老化初期に最も高い発現レベルを示し、IL-1 $\beta$ はIL-1Raに続く形でmRNA発現のピークを示した。この事実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が機能している可能性を示唆している。

#### 2) IL-1Ra遺伝子欠損マウス由来MEFsの解析

IL-1Ra遺伝子欠損マウス由来MEFsをin vitroで継代培養し、野生型と形態を比較したところ、野生型と比べて増殖能の低下とp38の活性化が早期に認められた。これらの結果から、細胞老化に伴うp38の活性化にIL-1シグナル伝達経路が関与し、IL-1RaはIL-1シグナルによる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のではないかと考えられる。

#### 3) 老化関連遺伝子としてのTARSH遺伝子の同定、構造解析

MEF細胞老化において老化特異的に高発現する遺伝子群をサブプレッションサブトラクティブハイブリダイゼーション法により探索した結果、これまでNESH遺伝子産物のSH3ドメインに結合する因子として知られていたTARSH遺伝子を同定した。IL-1シグナル伝達系とは異なり、現在結合する因子等は明らかではないが、MEFにおける継代培養10日後という比較的細胞老化初期に一過的な発現のピークを示すこと、ま

たC57Bl/6Jマウス個体由来正常マウス臓器においては肺に特異的な発現を呈し、肺組織での発現も生後8ヶ月をピークに持つことから個体老化においても何からの関連が示唆されている。

#### D. 考察

##### 1) ストレス応答性細胞老化におけるIL-1シグナル伝達経路の機能解析

MEF細胞を用いた細胞老化においてはp38の活性化を介するIL-1シグナル伝達経路と細胞老化の係わりについて検証ができた。これを基盤に今後は野生型、IL-1Ra<sup>-/-</sup>およびIL-1a/b<sup>-/-</sup>マウス由来MEFを継代培養し、細胞老化の表現型(細胞増殖能・形態・老化細胞マーカー)の比較を行う。また経時的に回収したタンパクやRNA試料を用いてp38の活性化、IL-1ファミリー遺伝子発現についてウエスタンブロットや定量PCRにて検討する。同様の解析を過酸化水素、ガンマ線処理による早期細胞老化誘導系でも行い、ストレス応答反応におけるこれらの遺伝子産物の役割を考察していく。

##### 2) ストレス応答におけるTarshの機能解析

MEFにさまざまな早期老化誘導刺激を加えTarshの発現量の変化を定量PCRで解析する。またTarshの発現をsiRNAで抑制し、細胞老化の表現型に及ぼす影響についても今後は検討していきたい。

##### 3) IL-1ファミリー分子/TARSHの細胞老化における発現調節機構の解明

これまでにMEF細胞老化を通してIL-

1Ra、IL-1b遺伝子、あるいはTARSH遺伝子の発現変化を定量PCRあるいはNorthern Blotting法を用いて解析を行ってきた。これらより得られた知見は少なくともmRNA、すなわち転写レベルでこれらの遺伝子が参加ストレスを含む外的要因によって制御されていることを彷彿とさせる。それゆえ、今後の検討課題として、プロモーター領域の構造、機能解析、あるいはメチル化等、修飾による転写調節、あるいは老化細胞由来の核抽出液を用いてIL-1Ra、IL-1、Tarshのプロモーター領域と結合する分子をゲルシフト法で同定するという分子生物学的手法でこれまでに同定した遺伝子群が、どのようなメカニズムでMEFをはじめとする細胞老化に係わっているのかを考察していく。

#### E. 結論

##### 1) MEF細胞老化におけるIL-1ファミリー分子の役割

IL-1Ra遺伝子はMEF細胞老化初期に最も高い発現レベルを示し、IL-1βはIL-1Raに続く形でmRNA発現のピークを示した。この事実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が機能することを彷彿とさせる。

##### 2) IL-1Ra遺伝子欠損マウス由来MEFsの解析

細胞老化に伴うp38の活性化にIL-1シグナル伝達経路が関与し、IL-1RaはIL-1シグナルによる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事が推定される。

### 3) 老化関連遺伝子としてのTARSH遺伝子の同定、構造解析

MEF細胞老化において老化特異的に高発現するTARSH遺伝子は継代培養10日後という比較的細胞老化初期に一過的な発現のピークを示すこと、C57Bl/6Jマウス個体においては肺特異的な発現を呈し、生後8ヶ月にピークを持つことから個体老化においても何からの影響を及ぼすことが判明した。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表 論文発表

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.

4. 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.

#### (2) 学会発表

1) Akihiko Nishikimi, Natsuko Uekawa, Ken-ichi Isobe, and Mitsuo Maruyama  
“Characterization of a spleen-specific CDM family protein SPH238”  
The 77th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society. *Yokohama*, (2004)

2) 上川奈都子、錦見昭彦、磯部健一、丸山光生：p38を介したMEF細胞老化におけるIL-1ファミリー分子の機能解析：第26回日本分子生物学会年会、神戸、(2004)

3) 村田 洋子、上川 奈都子、上出 利光、丸山光生：アポトーシス関連タンパク質DAP3の細胞老化における関

与：第26回日本分子生物学会年会、神戸、(2004)

4) 錦見昭彦、上川奈都子、磯部健一、  
丸山光生：リンパ球系特異的GTPase

活性化因子SPH238/Zizimin

2の機能解析と獲得免疫系における役割：第30回日本免疫学会年会、札幌、(2004)

## 分担研究報告書

### 生体ストレス応答と動脈硬化、糖尿病に関する研究

分担研究者 林 登志雄

名古屋大学大学院医学系研究科老年科学

#### 研究要旨：

寿命に性差があり、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 $\alpha$ は違う機序で老年病の重積、重篤化に関与していた。分子細胞生物学的には、糖尿病に合併する心血管病—動脈硬化症が、閉経後高齢女性において、特に強い危険因子となる臨床成績の機序を解明すべく、高血糖負荷培養血管内皮機能に対する女性ホルモンの影響を検討し、NO 合成酵素の基質 BH4 の生成律速酵素 GTPCH-I、更に活性酸素 NADPH oxidase の画分である p22phox の関与が示唆された。

#### A. 研究目的

1) 生体は老化促進ストレス刺激に対し、防御的に作用する機構を備えている。種々のラジカル消去酵素は異なった機構でストレスから生体を防御していると考えられる。我々は従来からの動脈硬化進展抑制物質としてのラジカル消去酵素：eNOS (内皮型一酸化窒素合成酵素)、その上流に位置する女性ホルモンを防御機構として考え、研究を進めた。

2) 人は代謝によって内部でラジカルが産生される。本研究はストレス刺激が生体にあたえる変化をシグナル伝達系、遺伝子発現系を中心に詳

細に検討し、それが老化をどのように引き起こすかを検索する。糖尿病に合併する心血管病—動脈硬化症が、閉経後高齢女性において、特に強い危険因子となる臨床成績の機序を解明すべく、高血糖負荷培養血管内皮機能に対する女性ホルモンの影響を検討し、NO 合成酵素の基質 BH4 の生成律速酵素 GTPCH-I、更に活性酸素 NADPH oxidase の画分である p22phox の関与が示唆された。

3) さらに臨床的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 $\alpha$

は違う機序で老年病の重積、重篤化の関与を検討した。

## B. 研究方法

1) ヒトテロメア長の律速決定因子である hTERT 活性を測定するとともに、SA (senescence associated)  $\beta$ -gal 特異染色を in 種々の PDL の HUVEC で施行した。さらにエストロゲンのこれら老化指標に対する効果を検討した。

2) 牛胎児大動脈由来内皮細胞を様々なグルコース濃度で 24-72 時間培養した後、BH4 (NOS のコファクター)、GTPCH-I (BH4 合成の律速酵素) 活性、NO<sub>x</sub> (NO<sub>2</sub><sup>-</sup> と NO<sub>3</sub><sup>-</sup> の和)、O<sub>2</sub><sup>-</sup>、eNOS の mRNA 及び蛋白、NADPH oxidase のような各種 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 産生酵素の構成蛋白量を測定した。

3) 75 歳以上の 647 名の高齢者を 4 グループにわけ 2 年間フォローした。Gp.I; 大学病院老年科病棟退院時, Gp.II; 老年科外来通院者 (ADL は自立), Gp.III; 療養型老人病院 (ADL は非自立、非寝たきり), Gp.IV; 在宅 (寝たきり) で、平均年齢、冠危険因子数に差はなかった。症状、一般所見、生化学検査、各種サイトカインについて検討した。

(倫理面への配慮)

基礎研究においては、文部科学省遺伝子研究指針を始め、名古屋大学の倫理規定にのっとり、倫理面に十分

に配慮して研究を行った。臨床研究にあたってはいずれの研究も、研究対象者に対してインフォームドコンセントを徹底し、協力者の利益が損なわれる事がないように十分に留意する。本研究は名古屋大学医学部附属病院をはじめ共同研究者が所属する施設の倫理委員会に申請、承認後に施行されている。被験者には同意を書面で頂き、いつでも取り消しが可能である事を明記し、認知機能障害のある方は対象外としている。プライバシーは匿名化を行い個人名が特定化されないよう細心の注意をはかっている。

## C. 研究結果

1) hTERT 活性は継代数 8 以下の HUVEC で測定できた。生理学的濃度の女性ホルモン (E2 は PDL が小さい時は hTERT 活性を上昇させた。この上昇は、E2 受容体拮抗薬 ICI 187780 あるいは、NOS 阻害剤、LNAME の共培養により阻害された。しかし、継代数 15 以下のより大きな PDL では hTERT 活性の上昇は 40% に減少した。SA beta-gal 染色も E2 処置により減少した。E2 受容体  $\alpha$  あるいは、eNOS の遺伝子導入により、hTERT の活性は上昇した。

2) E2 は高濃度の糖下でも BAEC の増殖を促した。高グルコース濃度下では、参加ストレスが上昇していた。E2 は GTPCH-I 活性の上昇により、BH

4を増加させ、eNOSを活性化した。E2はまた、高濃度グルコースで活性化されたNADPH oxidase活性を減少させた。スタチンやインスリンにも同様の効果は認められたがE2の作用よりは弱かった。ER $\alpha$ の遺伝子導入はGTPCH-1、更にはBH4の増加を通じてNO産生を増やした。Akt経路の活性化も示された。

3) Gp.I(退院群), Gp.II(外来群), Gp.III(病床群), Gp.IV(寝たきり群)の4群間で比較すると、BNP値はGp.III群で高地、ノルエピネフリン値はGp.IV群で高値であった。高齢者総合機能評価では、手段的ADLと認知機能がGp.III及びIV群で低下していた。二年目の調査では、生存者はcGMPが1年目に高値で、IL-6とTNF $\alpha$ が低値の傾向にあった。cGMPはBNP値に依存していた。..

#### D. 考察

血管内皮の老化は種々のストレス、特に動脈硬化性ストレスにも影響を与える。加齢は独立した冠危険因子だが、詳細な機序は不明であった。本研究により、内皮細胞老化が細胞機能に影響しhTERT活性及び、SA- $\beta$ galで検出された。17 $\beta$ エストラジオール(E2)はhTERTをup-regulateし、 $\beta$ galactosidaseを減少させた。これらは固有受容体及びNOに依存性

であった。高血糖は糖尿病を引き起こし、閉経後女性における糖尿病患者は、罹患率が同年の男性の三倍に及ぶ事から糖尿病発症における女性ホルモンの影響がこれまで示唆されていたが機序は不明であった。E2はGTPCH-1活性制御を介して、eNOS,NOの作用を調節する作用を持っている事が発見された。上記にその一端を認めるように、老化は生活習慣病や動脈硬化症と密接に関係している。高齢者は個人差が大きい事が特徴であり、また臨床的な加齢の影響の研究を難しくしている要因であると考えられる。この意味で、高齢者における老化度をバイオマーカー等の諸指標から類推できる事には大きな意義が有る。本年は一部のサイトカインにその指標となる可能性を見いだせたので、更に検討を進める予定である。

#### E. 結論

加齢と閉経は動脈硬化症の独立した危険因子である。女性ホルモンは細胞レベルで老化制御に働くとともに、糖尿病性心血管病変の初期過程である内皮機能障害に防御的に働く可能性が示唆された。臨床的に、老化度をしめすバイオマーカーの検討を、虚血性心血管病変をはじめとする老年病発症、死亡の観点から前向きに検討を始めた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(1) 論文発表

1 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)

2 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)

4. 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

3 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

5. 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

6. 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.

7. 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.

8. 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 I<sub>2</sub> production and nitric oxide synthase expression. *Cardiovasc Res*. 2004 ;62:194-201.

9. Hayashi T, Iguchi A, Ignarro LJ. Gene transfer of endothelial NO synthase (eNOS), but not eNOS plus inducible NOS regressed atherosclerosis in rabbits. *Cardiovascular Research* 2004 61 339-351

## (2) 学会発表

# 第33回 日本心脈管作動物質学会 2月1日 東京  
宮崎朝日、林 登志雄、井口昭久 アンギオテンシン受容体拮抗薬ロサルタンの糖尿病血管への作用

# 第68回 日本循環器学会学術集会 3月27—29日 東京

1) Hayashi T, Osawa M, Esaki T, Maeda K, Iguchi A. The high incidence of ischemic coronary lesion in elderly diabetics and the efficient prediction by

the exercise tolerance test.

2) Hayashi T, Osawa M, Kodama M, Iguchi A. Ceriprolol,  $\beta_1$  antagonist,  $\beta_2$  agonist retards progression of vascular lesions and restores endothelial dysfunction in Type II diabetic rats.

3) Kishimoto N, Sakuma I, Hayashi T, Kano H, Tsunekawa T, Osawa M, Kodama M, Chiba H, Nagai K, Nawate S, Sohma T, Iguchi A. Simvastatin prevents thrombotic occlusion of arterio-venous shunt in dialysis patients and improves endothelial function due to pleiotropic effects.

4) Osawa M, Hayashi T, Kodama M, Iguchi A. BNP level is diagnostic for heart failure in elderly, however IL-6, TNF  $\alpha$ , or NO is important

# The American Geriatrics Society 2004 Annual Scientific Meeting 5月17-21日 Las Vegas, NV, USA

Hayashi T, Oosawa M, Iguchi A. In geriatric nursing home, asymptomatic cardiac disorder were frequent-The importance of vascular endocrinological substances and implication for public care insurance-

# The 3<sup>rd</sup> International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide 5月2

4—28日 奈良

Symposium-13<sup>th</sup> NO フォーラム  
Hayashi T. The Investigation of NO and superoxide producing enzymes in endothelial cells and macrophages for various coronary risk factors.

一般演題

- 1) Fukatsu A, Hayashi T, Miyazaki A, Matsui-Hirai H, Packiasamy ARJ, Funami J, Iguchi A. The role of endothelial cells in the tolerance induced by nitric oxide donor such as glyceryl trinitrate, isosorbide dinitrate, and sodium nitroprusside.
- 2) Miyazaki A, Hayashi T, Matsui-Hirai H, Fukatsu A, Packiasamy ARJ, Funami J, Iguchi A. 17 $\beta$  estradiol improves the eNOS dysfunction in hyperglycemia-implication for atherosclerotic effect of estrogen.
- 3) Matsui-Hirai H, Hayashi T, Miyazaki A, Fukatsu A, Packiasamy ARJ, Funami J, Iguchi A. The effect of estrogen on telomerase activity in

# 第77回 日本内分泌学会学術集会  
6月19-21日 京都  
シンポジウム 一酸化窒素と心血管病  
林 登志雄 NOと動脈硬化—性ホルモンとスタチン製剤の pleiotropic

cultured endothelial cells.

# 第41回 日本老年医学会学術集会  
6月16-18日 東京  
ランチョンシンポ 林 登志雄 高齢者の脂質管理—高齢者におけるリスクの評価と新しい治療

一般演題

- 1) 児玉充央、林 登志雄、大澤雅子、野村秀樹、井口昭久 高齢者における総合機能評価と心機能との関係  
日 林 ランチョンセミナー
- 2) 大澤雅子、林 登志雄、児玉充央、野村秀樹、井口昭久 高齢者潜在性心不全及びバイオマーカーの生命予後との関係
- 3) 大西丈二、加納初世、野村秀樹、林 登志雄、遠藤英俊、井口昭久 介護老人保健施設利用者におけるうつの構造分析
- 4) 林 登志雄、大澤雅子、児玉充央、井口昭久 培養血管内皮細胞におけるテロメラーゼ活性の制御機構について

effect として、及び遺伝子治療と NOドナーの製剤としての抗動脈硬化作用

# 第36回 日本動脈硬化学会  
7月23-24日 福岡  
林 登志雄 児玉充央、高齢糖尿病

7月23-24日 福岡

林 登志雄 児玉充央、高齢糖尿病  
合併高脂血症患者における無症候性  
動脈硬化進展及びその予防に関する  
検討

# 第25回日本臨床薬理学会

9月17—18日 静岡

岸本憲明、佐久間一郎、林 登志雄、  
加納初世、恒川 卓、大澤雅子、児  
玉充央、千葉仁、井口昭久 血液透  
析患者への新派スタチン投与による  
血流依存性血管拡張の改善効果

# The 7<sup>th</sup> Asia/Oceania Regional

Congress of Gerontology 11月24-28

日 東京

Hayashi T, Osawa M, Kodama M, Iguchi  
A. Usefulness of exercise tolerance test  
in elderly for the prevention and  
management of ischemic coronary artery  
disease.