

抗 HA、抗 His6、抗 SIRT1、抗 p27、抗 FOXO3、抗 FOXO4、抗アセチル化リジンおよび抗 α -tubulin である。免疫複合体は ECL Plus で検出した。

4. 脱アセチル化反応

pcDNA3、pcDNA3-FLAG-SIRT1 もしくは pcDNA3-FLAG-SIRT1-HY をトランスフェクションした 293T 細胞を抗 FLAG と Protein G 結合マグネットビーズを用いて免疫沈降し、その免疫沈降物を脱アセチル化反応に用いた。アセチル化 FOXO3a および FOXO4 は、Myc-FOXO3a-TM もしくは Myc-FOXO4-TM と HA-p300 を 293T 細胞に共発現させることによって調製した。アセチル化 FOXO3a もしくは FOXO4 を含む細胞溶解液を免疫沈降した SIRT1 と HDAC バッファー中で、NAD、trichostatin A、nicotinamide を存在化・非存在化において 30℃ で 2 時間反応させた。反応液から FOXO3a もしくは FOXO4 を免疫沈降し、抗アセチル化リジン抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。

5. ルシフェラーゼアッセイ

pGL-6xDBE もしくは pG45-817 リポータープラスミドと phRG-TK および FOXO4 と SIRT1 の発現ベクターを細胞に導入し、resveratrol および nicotinamide の存在化・非存在化で培養した後、溶解し Dual-Luciferase Reporter Assay System を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。トランスフェクションの効率は、phRG-TK に

由来する Renilla ルシフェラーゼ活性で補正した。

6. RNA 干渉

FOXO および SIRT1 に対する 2 塩基の overhang を含む 21-bp siRNA の配列は、それぞれ、5'-GGAUAAGGGCGACAGCAACTT-3' と 5'-CUUGUACGACGAAGACGACTT-3' である。GFP siRNA はコントロールとして用いた。siRNA の導入は Oligofectamine を用いた。

C. 研究結果

1. p300 による FOXO4 のアセチル化は転写活性を減少させる

試験管内で FOXO3 と FOXO1 は p300 によってアセチル化されることが報告されているが、その生理学的重要性は明らかにされていない。まず、FOXO3 と FOXO4 が細胞内で p300 によってアセチル化されるかどうかを検討した。293T 細胞に HA-p300 と FOXO3-TM および FOXO4-TM (3 箇所 の PKB によるリン酸化部位を Ala に置換したマウス FOXO3 および FOXO4 変異体で、恒常的に核内に局在し活性化されている) の発現ベクターを導入した。免疫沈降およびウエスタンブロット解析により FOXO3-TM および FOXO4-TM は p300 との共発現によってアセチル化されることが明らかになった (Fig. 1A, B)。FOXO4 は、Lys (K) 186、189 と 408 が転写共役因子 CBP によってアセチル化されると報告されてい

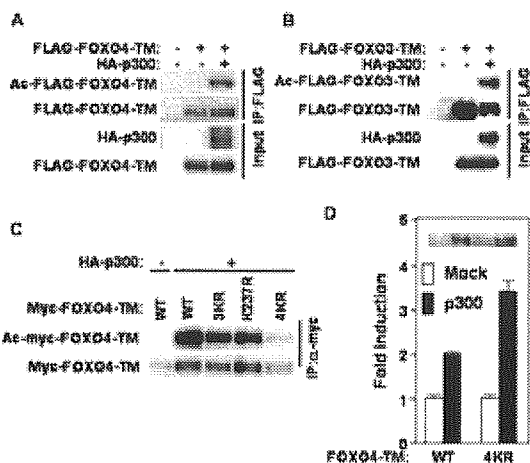


図1. FOXOのアセチル化と p300 による転写活性の抑制

たが、FOXO4-TM-3KR (K186、189 と 408 を Arg (R)に置換) はまだ p300 によってアセチル化された。そこで、FOXO4 のアセチル化部位を決定するために、K186、189 と 408 に加えて種々の Lys を Arg に置換した変異体を作成し、293T 細胞に p300 と共発現させた。種々の変異体のうち、FOXO4-TM-3KR の K237 置換体 (FOXO4-TM-4KR) のみが p300 によるアセチル化が著しく減少した。これらのことから FOXO4 は p300 によって、189、237 と 408 がアセチル化されることが示唆された (Fig. 1C)。

FOXO4 のアセチル化の機能を明らかにするために、pGL-6xDBE (FOXO DNA 結合配列を 6 個含む) ルシフェラーゼリポータープラスミドと FOXO4-TM もしくは FOXO4-TM-4KR を p300 の存在化・非存在化で Cos7 細胞に導入した。p300 の共発現は FOXO4-TM および FOXO4-TM-4KR の転写活性を増加させたが、p300 の FOXO4-TM-4KR に対する効果は、

FOXO4-TM と比較して著しかった (Fig. 1D)。即ち、p300 は転写共役因子として基本転写因子複合体をリクルートすることによって FOXO の転写活性化に関与するが、p300 による FOXO4 のアセチル化は転写活性に対して抑制的に作用する。

2. SIRT1 は FOXO4 と相互作用し脱アセチル化する

SIRT1 は NAD 依存的脱アセチル化酵素として作用することを考慮すると、SIRT1 は p300 による FOXO4 の転写活性の抑制に対して反対に作用する可能性が考えられる。この可能性を検討するために、FLAG-SIRT1 と Myc-FOXO4-TM を 293T 細胞に導入し、免疫沈降およびウエスタンブロット解析を行い、SIRT1 は FOXO4-TM と共免疫沈降することを明らかにした (Fig. 2A, B)。内在性の FOXO4 および FOXO3a と SIRT1 の生理学的な相互作用を確認するために、FOXO4 の核内蓄積を誘導する PI-3K の阻害剤 LY294002 で処理した Jurkat 細胞および核内に蓄積した FOXO3a をもった confluent HeLa 細胞の細胞溶解液を免疫沈降した結果、FOXO4 および FOXO3a と SIRT1 の相互作用が認められた (Fig. 2C, D)。これらの結果は、FOXO4 および FOXO3a は哺乳類の細胞において核内で SIRT1 と相互作用することを示している。次に、SIRT1 は FOXO4 を細胞内で脱アセチル化するかどうかを検討した。Myc-FOXO-TM、HA-p300、FLAG-SIRT1 および不活性型 FLAG-SIRT1-HY を種々の組み合わせで

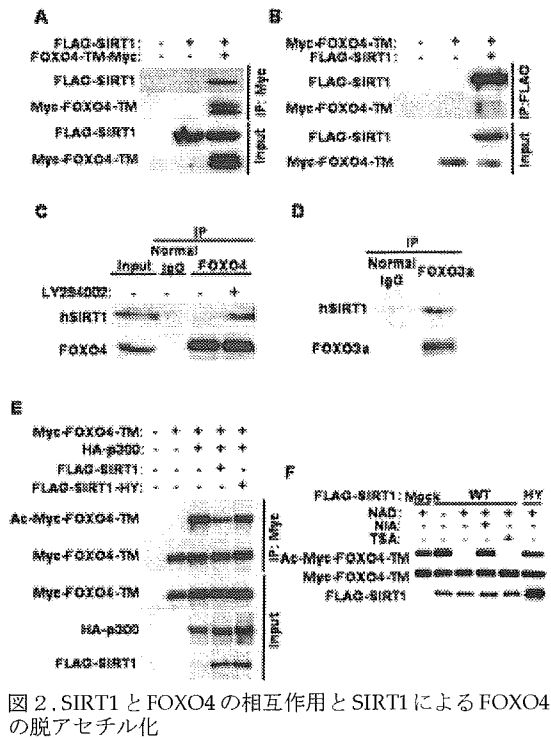


図 2. SIRT1 と FOXO4 の相互作用と SIRT1 による FOXO4 の脱アセチル化

293T 細胞に導入した。p300 を共発現する細胞で認められた FOXO4-TM のアセチル化は SIRT1 の共発現で減少したが、SIRT1-HY では減少しなかった (Fig. 2E)。p300 による FOXO3a のアセチル化も同様であった (data not shown)。さらに、SIRT1 が FOXO4 を直接脱アセチル化するかどうかを *in vitro* で検討した。HA-p300 を共発現した 293T 細胞由来のアセチル化 FOXO4-TM を 293T 細胞より免疫沈降した FLAG-SIRT1 および FLAG-SIRT1-HY と反応させた。免疫沈降した SIRT1 は NAD 依存的にアセチル化 FOXO4-TM を脱アセチル化したが、SIRT1-HY は脱アセチル化しなかった (Fig. 2F)。また、SIRT1 による FOXO4-TM の脱アセチル化は SIRT1 の特異的阻害剤である nicotinamide によって阻害されたが、一般的なヒストン脱アセチル化

酵素 (HDAC) の阻害剤 trichostatin A では影響を受けなかった。

3. SIRT1 は FOXO の転写活性を NAD 依存的に増大させる

SIRT1 による FOXO4 の脱アセチル化が p300 を介したアセチル化による FOXO4 の転写活性の抑制的制御に対して反対に作用するかどうかを検討した。pGL-6xDBE リポータープラスミドと FOXO4-TM を HCT116 細胞に導入し、SIRT1 の NAD 依存的脱アセチル化活性を増加させる植物ポリフェノールの一種である resveratrol の存在化・非存在化で培養した。FOXO4-TM の転写活性は濃度依存的に resveratrol によって増加し

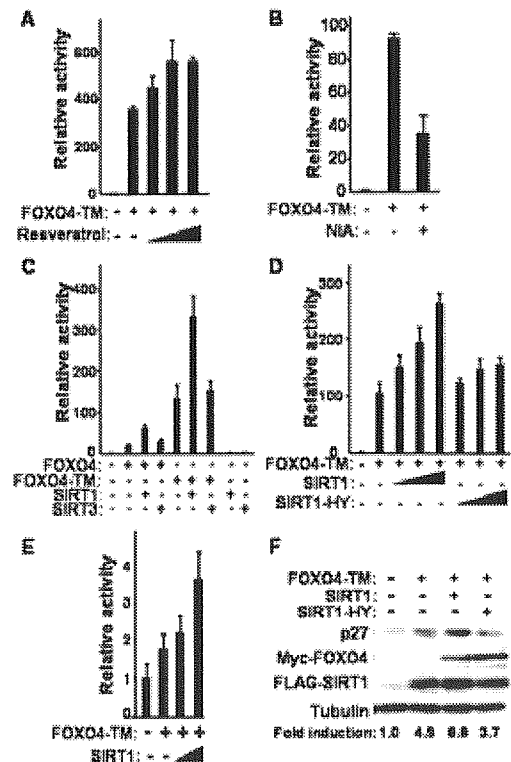


図 3. SIRT1 による脱アセチル化を介して FOXO4 の転写活性の増大

た (Fig. 3A)。一方、細胞を nicotinamide で処理すると FOXO4-TM の転写活性は抑

制された (Fig. 3B)。FOXO4 および FOXO4-TM の転写活性は、濃度依存的に SIRT1 の共発現によって増加したが、SIRT1-HY もしくはミトコンドリアに局在する Sir2 ファミリーの SIRT3 の共発現では影響を受けなかった (Fig. 3C, D)。また、SIRT1 による FOXO4-TM の転写活性の増加は、ヒト GADD45 プロモータによって制御されるルシフェラーゼリポータープラスミドにおいても認められた (Fig. 3E)。レトロウイルスによる FOXO4-TM の導入は p27 の蓄積を誘導するが、FOXO4-TM と SIRT1 を導入すると p27 の蓄積は増加したが、SIRT1-HY では認められなかった。これらの結果は、SIRT1 は FOXO4 の転写活性を NAD 依存的脱アセチル化活性を介して増加させていることを示している。

4. SIRT1 は酸化ストレスに応答した FOXO による GADD45 の発現誘導に必須である

私たちは FOXO が酸化ストレスに応答して GADD45 のプロモータを活性化することを見出してきた。FOXO は 14-3-3 と CRM1 によって媒介される核排出機構を誘導する PKB によるリン酸化によって通常血清培地では細胞質に局在している。それ故、FOXO は転写因子として遺伝子発現を活性化するためには核に蓄積する必要がある。レトロウイルスによって FOXO4 を導入した NIH-FOXO4 細胞を LY294002 で処理すると FOXO4 は核内に蓄積した。酸化ストレスに応答して、FOXO4 は迅速に核内に蓄積した (Fig. 4A)。酸化ストレスに

核内に蓄積した FOXO4 が SIRT1 と相互作用するかどうか検討してところ、FOXO4 と SIRT1 は酸化ストレスに

応答して核内で相互作用することが明らかになった (Fig. 4B)。内在性の SIRT1 活性を nicotinamide で阻害すると、LY294002 処理および H₂O₂ によってアセチル化 FOXO4 のレベルの上昇が認められた (Fig. 4C)。trichostatin A も FOXO4 のアセチル化を上昇させたが、nicotinamide と trichostatin A の両方の処理は、相乗的に FOXO4 のアセチル化を上昇させた。これらの結果は、FOXO4 のアセチル化・脱アセチル化は生理的な現象で、

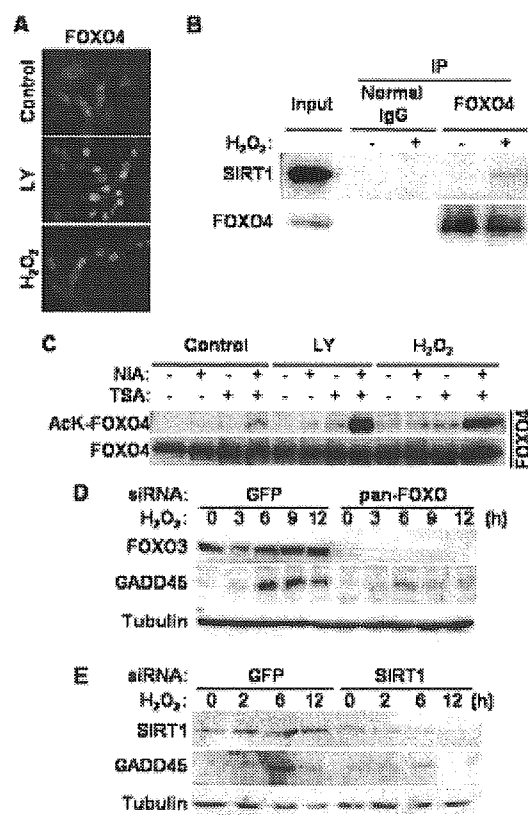


図4. 酸化ストレスに

応答した FOXO による GADD45 の発現における SIRT1 の機能

FOXO4 の脱アセチル化は SIRT

ファミリー

および HDAC によって制御されていることを示している。

酸化ストレスに応答した GADD45 の発現誘導において FOXO の寄与を検討するために、pan-FOXO に対する siRNA を Saos2 細胞に導入し、H₂O₂ 処理を行った。コントロールとして GFP siRNA を導入した細胞と比較して pan-FOXO siRNA を導入した細胞では FOXO3 の発現が著しく抑制されていた。コントロールの細胞においては、H₂O₂ に応答して GADD45 の発現誘導が認められたが、FOXO を欠損した細胞においては GADD45 の発現誘導が著しく抑制された。この結果は、Saos2 細胞において FOXO は酸化ストレスに応答した GADD45 の発現誘導に重要であることをしめしている (Fig. 4D)。酸化ストレスに応答した FOXO による GADD45 の発現誘導における内在性の SIRT1 の機能を明らかにするために、コントロールおよび SIRT1 の発現を siRNA で抑制した細胞を H₂O₂ 処理し、GADD45 の発現を検討した結果、SIRT1 の発現を抑制した細胞においては GADD45 の発現誘導が著しく減少した (Fig. 4E)。これらの結果は、SIRT1 は酸化ストレスに応答した FOXO による GADD45 の発現誘導に必須であることを示している。

D. 考察

本研究において、哺乳類の SIRT1 は物理的、機能的かつ生理学的に FOXO と相互作用することを明らかにした。さらに、SIRT1 は酸化ストレスに応答して NAD 依存的に

脱アセチル化を介して FOXO の転写活性を制御していることを明らかにした。Motta らは SIRT1 は FOXO 活性を抑制すると報告したが、Brunet らは脱アセチル化の効果はターゲット遺伝子特異的で、pro-apoptotic な遺伝子の発現は抑制し、細胞周期および酸化ストレス抵抗性を制御するような遺伝子の発現は増加させるということを提唱している。本研究は、Brunet らの仮説を支持している。

ヒストン脱アセチル化酵素はヒストンや転写因子を脱アセチル化することによって遺伝子発現を抑制すると考えられてきた。しかし、酵母のヒストン脱アセチル化酵素 Rpd3 が酸化ストレスに応答した遺伝子発現に少なくともヒストンや未同定のたんぱく質の脱アセチル化を介して作用していることが報告された。本研究において、FOXO4 のアセチル化は転写活性を抑制し、SIRT1 による FOXO4 の脱アセチル化はアセチル化による転写活性の抑制に対して反対の作用を示すことを明らかにした。即ち、酸化ストレスは FOXO ファミリーの核局在を促進し、FOXO と SIRT1 の相互作用を誘導することによって、FOXO の脱アセチル化を介して GADD45 の発現の活性化を行っていると考えられる。

カロリー制限 (CR) は、哺乳類を含む種々の生物において寿命延長効果が認められている。酵母において、SIR2 の NAD 依存的活性はこの効果に必須であることが示されている。即ち、CR は NAD もしくは nicotinamide の細胞内濃度を変化させるこ

とによって SIR2 の活性を制御している可能性を示唆している。実際、nicotinamide のデアミ化を行いその濃度を減少させることによって SIR2 の活性化を行う pyrazinamidase/nicotinamidase 1 (PNC1) の発現増加は、CR による酵母の寿命延長の必要十分条件となることが示されている。さらに、Drosophila において寿命延長を示す CR もしくは Rpd3 変異体において Sir2 の発現が 2 倍に上昇していることが示されている。最近、マウスにおいても CR によって SIRT1 の発現が増加していることが示された。CR した動物においてインスリンや IGF-1 のレベルは低下しているため、FOXO は核内に存在する割合が増加していると考えられる。これらの結果と本研究の結果から、FOXO ファミリーと SIRT1 は哺乳類における CR に応答した寿命延長において共同して作用していると示唆される。

E. 結論

SIRT1 は NAD 依存性脱アセチル化活性を介して FOXO ファミリーの転写活性を制御していることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Furukawa-Hibi Y, Kobayashi Y, Chen C, **Motoyama N**. FOXO Transcription Factors in Cell Cycle Regulation and the Response to Oxidative Stress. *Antioxid. Redox Signal.*, in press.

Motoyama N, Naka K. DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **14**: 11-16, 2004.

Asai S, Sato T, Tada T, Miyamoto T, Kimbara N, **Motoyama N**, Okada H, Okada N. Absence of Procarboxypeptidase R Induces Complement-Mediated Lethal Inflammation in Lipopolysaccharide-Primed Mice. *J. Immunol.* **173**: 4669-4674, 2004.

Furuyama T, Kitayama K, Shimoda Y, Ogawa M, Sone K, Yoshida-Araki K, Hisatsune H, Nishikawa S, Nakayama K, Nakayama K, Ikeda K, **Motoyama N**, Mori N. Abnormal angiogenesis in Foxo1 (FKHR)-deficient mice. *J. Biol. Chem.* **279**: 34741-34749, 2004.

Jack MT, Woo RA, **Motoyama N**, Takai H, Lee PWK. DNA-dependent protein kinase and Checkpoint kinase 2 synergistically activate a latent population of p53 upon DNA damage. *J. Biol. Chem.* **279**: 15269-15273, 2004.

Naka K, Tachibana A, Ikeda K, **Motoyama N**. Stress-Induced Premature Senescence in hTERT-Expressing Ataxia Telangiectasia Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **279**: 2030-2037,

2004.

2. 学会発表

Furukawa-Hibi Y, Kobayashi Y, Ikeda K, Motoyama N. Oxidative stress activates the forkhead transcription factor, FOXO family. 2004 Annual Congress of Korean Society of Gerontology and the 4th Korea-Japan Gerontologist Joint Meeting, Chuncheon, Korea, Jun 24-26, 2004.

Furukawa-Hibi Y, Yoshida-Araki K, Ikeda K, Motoyama N. Forkhead transcription factor Foxo4 blocks differentiation and induces atrophy of myotubes under the oxidative stress. Gordon Research Conferences on Biology of Aging, Aussois, France, September 12-17, 2004.

日比（古川）陽子、荒木（吉田）聖美、池田恭治、本山 昇. フォークヘッド型転写

因子 Foxo4 は筋分化阻害と筋萎縮誘導を行う。第 77 回日本生化学会大会、2004 年 10 月 15 日、横浜

日比（古川）陽子、家村俊一郎、夏目 徹、渡辺 研、本山 昇. 酸化ストレスは長寿関連遺伝子 Forkhead 型転写因子 FOXO family を活性化する、第 27 回日本分子生物学会年会、2004 年 12 月 10 日、神戸

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

早期老化症モデルマウス-ATM ノックアウトマウス-の骨粗鬆症病態に関する研究

分担研究者 渡辺 研

国立長寿医療センター・研究所

運動器疾患研究部・骨機能再建研究室長

研究要旨

早期老化症の一つとして考えられる毛細管性運動失調症 ataxia telangiectasia のモデルマウス、ATM ノックアウトマウスの骨解析を行った。同ノックアウトマウスでは成長障害が認められるものの、その体重差が顕著でない10週齢マウスにおいてすでに骨粗鬆症様病態を有していることを見いだした。この病態は主に骨形成系の異常が原因となっており、とりわけその幹細胞群の増殖能の低下が原因である組織再生不良に陥っていることを見いだした。

A. 研究目的

健康寿命延長をめざす中で、各老年病を克服することは命題のひとつである。老年病の中でも、高齢者のQOLを著しく損なう運動器疾患である骨折の一因として、骨粗鬆症が挙げられる。骨粗鬆症等に見られる加齢に伴う骨量現象は、ヒトに限らず各哺乳動物でも知られており、老化の度合いや早期老化症における重要なパラメータのひとつであり、最近になり病態解析も進みつつある。本分担研究課題では、早期老化症モデルマウスのひとつとして、ATM (ataxia telangiectasia mutated) ノックアウトマウスを用い、その骨解析を通して、老人性骨粗鬆症の病態解析の知見を得ることを目的とする。

B. 研究方法

ATM のヘテロ接合体(+/-)同士の交配より、野生型(WT)、ヘテロ型(He)、ノックアウト(KO)の産仔を得て、骨解析ならびに、主に10週齢マウス骨髄より細胞を調製し分化試験を行った。また、新生児の頭骸冠より骨芽細胞を調製し解析に用いた。骨芽細胞はALP陽性細胞として同定した。各分子の発現ならびに活性化については、抗ABL抗体、抗IGF1R抗体、抗リン酸化チロシン抗体、抗p53抗体などによるウエスタンブロッティング法により解析を行った。

(倫理面への配慮)

当該分担研究課題では、ヒトゲノム・遺伝子解析を対象としておらず、また、材料採

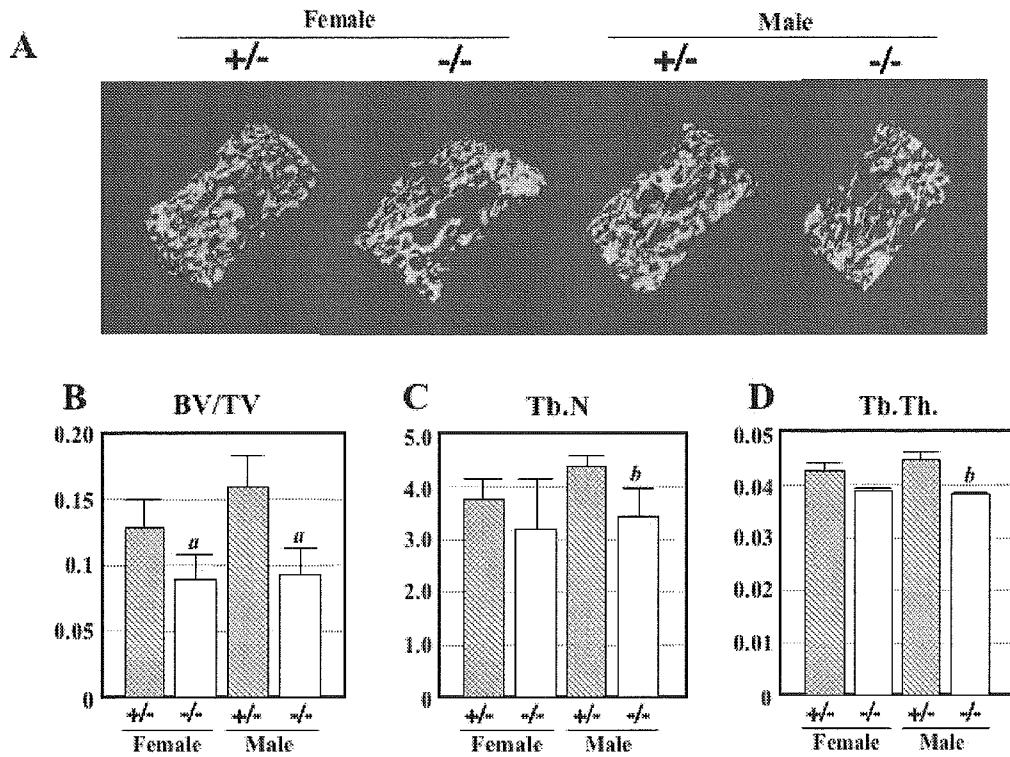


図1 ATMノックアウトマウスにおける骨量低下

取等に伴う動物実験は、国立長寿医療センター動物実験施設指針等に則り、ATMノックアウトマウス等、材料、モデルともに、動物愛護上の配慮をしたうえで行った。

C. 研究結果

ATMノックアウト(ATMKOマウス)では、成長障害が認められるが、体重差に有意差のない10週齢のマウスを用いて解析を行った。腰椎についてマイクロCT解析を行ったところ、三次元骨体積(BV/TV)が雌雄とも顕著にATMKO群で低下しているこ

とが明らかとなった(図1)。この傾向は体重差が有意となる14週齢ではより顕著となり、加齢に伴い骨量の減少が観察された。また、脛骨近位端を用いた骨形態計測では、骨形成速度(BFR/BS)ならびに骨芽細胞表面(Ob.S/BS)といった骨形成指標の顕著な低下が見

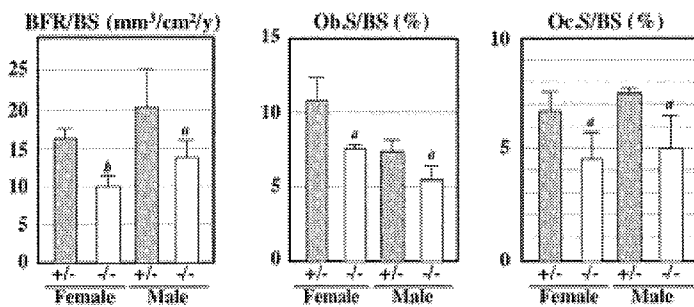


図2 骨形態計測

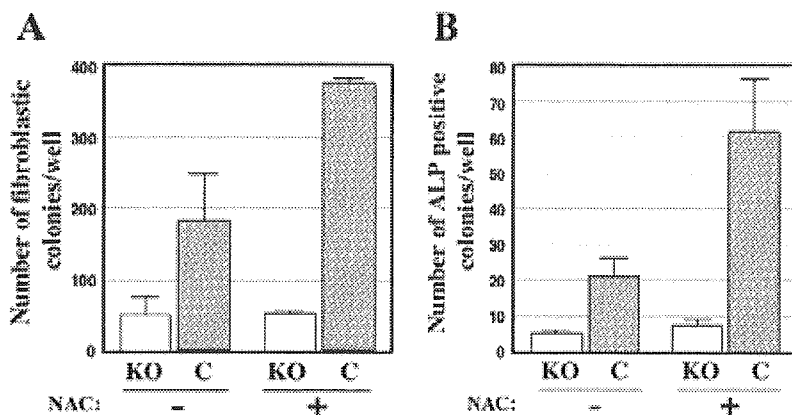


図3 コロニー形成法による骨髄間葉系細胞の解析

られた (図2)。また、骨吸収指標のひとつである破骨細胞面 (Oc.S/BS) においても低下が見られ、典型的な低代謝のパターンを示していた。このことが ATMKO マウスにおける低骨量の原因となっていることが示唆された。

次に、この骨形成の異常が cell

細胞コロニー形成能、脂肪細胞系分化細胞コロニー形成能のいずれも顕著に低下していることが明らかになった。また、これらのコロニー形成は、野生型では抗酸化剤である N-アセチルシステイン (NAC) の添加により増加したが、ATMKO 由来細胞では効果が見られなかった。それに対し、破骨

細胞分化能については、M-CSF 依存性増殖能ならびに RANKL 依存性破骨細胞形成能 (破骨細胞数や形態) は差が見られなかった (図4)。

そこで、この骨芽細胞系細胞の異常について、頭蓋間由来骨芽細胞を用い

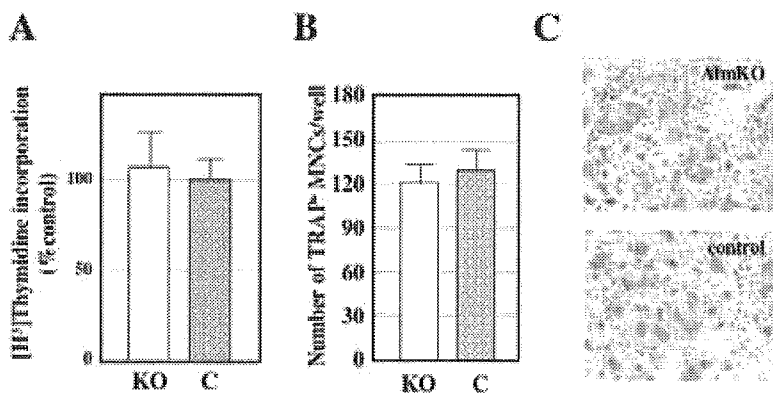


図4 破骨細胞形成能の解析

た骨芽細胞分化試験を行ったところ、野生型と ATMKO マウス間に差がなかったことから、分化障害の可能性は低いものと考えられた。

さらに、この障害の分子レベルでの解析を行うため、骨由来 RNA を用いてマイクロアレイ法による発現遺伝子プロファイリングを行ったが、病態に関連する顕著な遺伝子発現の差異は認められなかった。

そこで、ATM のシグナル関連分子について、骨髄細胞を用いて検討を行ったところ、MAP キナーゼ p38 の顕著な活性化が検出された。ただ、p53 レベルの差については有意な差が認められなかった(図5)。また、インスリン様成長因子受容体(IGF1R)の発現をウエスタンブロット法により調べたところ、ATMKO 由来細胞で顕著に低下していることが明らかとなった。一方、ATM 下流分子であり、そのノックアウトマウスが骨形成異常を示す Abl キナーゼについて発

現を検討したところ、野生型ならびに KO で同レベルの発現が検出され、差異が認められなかった。

D. 考察

本研究では、ATMKO マウスがヒト AT 症状にみられる加齢性疾患である神経変性、免疫異常、腫瘍形成と染色体不安定化に加え、これらの疾患が顕著になるより早い時期に骨粗鬆症様病態を呈していることを明らかにした。ヒトならびに野生型マウスの加齢個体(20月齢以上)の知見では、加齢に伴う骨形成能の低下が間葉系幹細胞数ならびに増殖能の低下に依るものと示唆されている。これは、ATMKO マウスでよく保存されており、本ノックアウトマウスが老人性骨粗鬆症のモデルとして有効である可能性を意味している。

同様の骨形成低下による骨粗鬆症様病態について、Sca1 ノックアウトマウスならび

に Abl ノックアウトマウス等が報告されている。Sca1 ノックアウトマウスでは間葉系細胞のみならず造血系細胞の幹細胞の低下がみられ、骨量減少は1年齢を過ぎたあたりから顕著となる。Onset の点で ATMKO マ

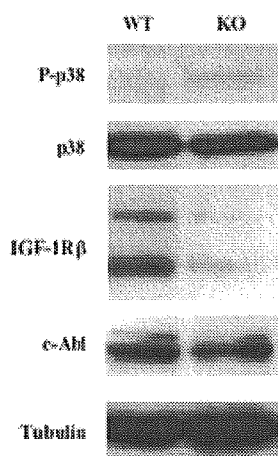


図5 発現解析

ウスとは異なる事や、Sca1 マウスについて他の老化様症状が報告されていないこと、また、ATMKO マウス骨での Sca1 発現が野生型と同等であることから、ATM と Sca1 には直接的な関与が無いように思われる。

また、ATM 下流分子として知られる Abl キナーゼのノックアウトマウスでは、むしろ骨芽細胞の分化異常が示されており、ATMKO とは異なる。また、Abl の発現にも差が認められないことから、Abl 経路とは異なる経路の異常がこの病態を引き起こしている可能性が考えられた。

インシュリン様成長因子 (insulin-like growth factors: IGFs) は、骨の発達や代謝において重要な役割を担っていることが知られている。また、AT 患者由来線維芽細胞ではその受容体の発現が低下しており、IGF 依存性の増殖が低下していることが報告されている。ATMKO マウス骨髄細胞でも同様に IGF1R の発現が顕著に低下しており、その増殖に影響を及ぼしていると考えられた。IGF 経路は酸化ストレスと密接な関係があり、また、マウス個体の寿命とも関連が知られている。ただ、本研究の結果からは直接的な関係について検討を加えることが出来なかったが、この受容体発現が酸化的ストレスを過剰に受けたことによる二次的なものか、また、受容体発現低下が、NAC による *in vitro* での増殖能賦活化への不応性の一因になっているかについて未だ不明である。これらの問題は寿命延長と関与していると考えられるため、更なる検討が必要と考えられる。

E. 結論

ATMKO マウスは老人性骨粗鬆症様骨病態を呈し、間葉系幹細胞の増殖能低下による組織再生不良がその原因と考えられた。

F. 研究発表

論文発表

Watanabe K and Hishiya A. Mouse models of senile osteoporosis. *Mol. Aspects Med.*, *in press.*

Sasaki A, Hinck L, **Watanabe K.** RumMAGE-D the members: Structure and Function of a New Adaptor Family of MAGE-D Proteins. *J. Recept. Signal. Transduct.*, *in press.*

Hishiya A and **Watanabe K.** Progeroid syndrome as a model for impaired bone formation in senile osteoporosis. *J. Bone Miner. Metab.* **22**: 399-403, 2004.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

1. 仲 一仁、本山 昇. DNA複製およびダメージチェックポイント. 中山敬一編. **キーワードで理解する細胞周期イラストマップ**. 羊土社、東京. 2005年. pp124-130.
2. Sawa H, Komagome R: The JC virus-like particle overlay assay. In Lieberman PM (ed) **Methods in Molecular Biology**. Humana Press, Totowa, NJ 2004;292:175-186.

雑誌

1. Furukawa-Hibi Y, Kobayashi Y, Chen C, Motoyama N. FOXO Transcription Factors in Cell Cycle Regulation and the Response to Oxidative Stress. *Antioxid. Redox Signal.*, in press.
2. Motoyama N, Naka K. DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **14**: 11-16; 2004.
3. Asai S, Sato T, Tada T, Miyamoto T, Kimbara N, Motoyama N, Okada H, Okada N. Absence of Procarboxypeptidase R Induces Complement-Mediated Lethal Inflammation in Lipopolysaccharide-Primed Mice. *J. Immunol.* **173**: 4669-4674, 2004.
4. Furuyama T, Kitayama K, Shimoda Y, Ogawa M, Sone K, Yoshida-Araki K, Hisatsune H, Nishikawa S, Nakayama K, Nakayama K, Ikeda K, Motoyama N, Mori N. Abnormal angiogenesis in Foxo1 (FKHR)-deficient mice. *J. Biol. Chem.* **279**: 34741-34749, 2004.
5. Jack MT, Woo RA, Motoyama N, Takai H, Lee PWK. DNA-dependent protein kinase and Checkpoint kinase 2 synergistically activate a latent population of p53 upon DNA damage. *J. Biol. Chem.* **279**: 15269-15273, 2004.
6. Naka K, Tachibana A, Ikeda K, Motoyama N. Stress-Induced Premature Senescence in hTERT-Expressing Ataxia Telangiectasia Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **279**: 2030-2037, 2004.

7. **Watanabe K** and Hishiya A. Mouse models of senile osteoporosis. *Mol. Aspects Med.*, in press.
8. Sasaki A, Hinck L, **Watanabe K**. RumMAGE-D the members: Structure and Function of a New Adaptor Family of MAGE-D Proteins. *J. Recept. Signal. Transduct.*, in press.
9. Hishiya A and **Watanabe K**. Progeroid syndrome as a model for impaired bone formation in senile osteoporosis. *J. Bone Miner. Metab.* **22**: 399-403, 2004.
10. Takahashi H, **Sawa H**, Hasegawa H, Nagashima K, Sata T, Kurata T: Topoisomerase I dissociates human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase from genomic RNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **313**: 1073-1078, 2004.
11. Ueno T, Tokunaga K, **Sawa H**, Maeda M, Chiba J, Kojima A, Hasegawa H, Shoya Y, Sata T, Kutrata T, Takahashi H: Nucleolin and the packaging signal, Ψ promote the budding of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1). *Microbiol. Immunol.* **48**: 111-118, 2004
12. Matsumoto K, Minamitani T, Orba Y, Sato M, **Sawa H**, Ariga H: Induction of matrix metalloproteinase-2 by tenascin-X deficiency is mediated through the c-Jun N-terminal kinase and protein tyrosine kinase phosphorylation pathway. *Exp. Cell. Res.* **297**: 404-414, 2004
13. Orba Y, **Sawa H**, Iwata H, Tanaka S, Nagashima K: Inhibition of virus production in JC virus-infected cells by postinfection RNA interference. *J. Virol.* **78**: 7270-7273, 2004.
14. Qu Q, **Sawa H**, Suzuki T, Semba S, Henmi C, Okada Y, Tsuda M, Tanaka S, Nagashima K: Nuclear entry mechanism of the human polyomavirus JC virus like particle: role of importins and the nuclear pore complex. *J. Biol. Chem.* **279**: 27735-27742, 2004.
15. Minamitani T, Ikuta T, Saito Y, Takebe G, Sato M, **Sawa H**, Nishimura T, Nakamura F, Takahashi K, Ariga H, Matsumoto K: Modulation of collagen fibrillogenesis by tenascin-X and type VI collagen. *Exp. Cell. Res.* **298**: 305-15, 2004

16. Chikai K, Ohnishi A, kato T, Ikeda J, Sawamura Y, Iwasaki Y, Itoh T, Sawa H, Nagashima K: Clinico-pathological features of polymyxoid astrocytoma of the optic pathway. *Acta. Neuropathol.* **108**: 109-114, 2004
17. Kamioka Y, Fukuhara S, Sawa H, Nagashima K, Masuda M, Matsuda M, Mochizuki N: A novel dynamin-associating molecule, formin-binding Protein 17, induces tubular membrane invaginations and participates in endocytosis. *J. Biol. Chem.* **279**: 40091-40099, 2004
18. Matsumoto K, Sato T, Oka S, Orba Y, Sawa H, Kabayama K, Inokuchi Ji, Ariga H: Triglyceride accumulation and altered composition of triglyceride-associated fatty acids in the skin of tenascin-X-deficient mice. *Genes Cells* **9**: 737-748, 2004
19. Jin M, Sawa H, Suzuki T, Shimizu K, Makino Y, Tanaka S, Nojima T, Fujioka Y, Asamoto M, Suko N, Nagashima K: Investigation of simian virus 40 large T antigen in 18 autopsied malignant mesothelioma patients in Japan. *J. Med. Virol.* **74**: 668-676, 2004
20. Tsuda M, Makino Y, Iwahara T, Nishihara H, Sawa H, Nagashima K, Hanafusa H, Tanaka S: Crk associates with ERM proteins and promotes cell motility toward hyaluronic acid. *J. Biol. Chem.* **279**: 46843-46850, 2004
21. Aizawa H, Ohtani F, Furuta Y, Sawa H, Fukuda S: Variable patterns of varicella-zoster virus reactivation in Ramsay Hunt syndrome. *J. Med. Virol.* **74**: 355-360, 2004
22. Furuta Y, Aizawa H, Ohtani F, Sawa H, Fukuda S: Varicella-zoster virus DNA level and facial paralysis in Ramsay Hunt syndrome. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **113**: 700-705, 2004
23. Nagashima T, Chuma T, Mano Y, Goto Y-i, Hayashi KY, Minami N, Nishino I, Nonaka I, Takahashi T, Sawa H, Aoki M, Nagashima K: Dysferlinopathy associated with rigid spine syndrome. *Neuropathology* **24**: 341-346, 2004

24. Hasegawa H, Ichinohe T, Strong P, Watanabe I, Ito S, Tamura S-i, Takahashi H, **Sawa H**, Chiba J, Kurata T, Sata T: Protection against influenza virus infection by intranasal administration of HA vaccine with chitin microparticles as an adjuvant. *J. Med. Virol.* 75: 130-136, 2005
25. Henmi C, **Sawa H**, Iwata H, Orba Y, Tanaka S, Nagashima K: Isolation of a monoclonal antibody recognizing a cell-surface molecule as a receptor for JC virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327: 242-251, 2005
26. Ichinohe T, Watanabe I, Ito S, Moriyama M, Tamura S, Takahashi H, **Sawa H**, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H: Synthetic double-stranded RNA [poly (I:C)] combined with mucosal vaccine protects against influenza virus infection. *J. Virol.* 79: 2910-2919, 2005
27. Khalili K, White MK, **Sawa H**, Nagashima K, Safak M: The agnoprotein of polyomaviruses: A multifunctional auxiliary protein. *J. Cell Physiol.* 2004 Nov 30; [Epub ahead of print]
28. **Sawa H**, Nagashima T, Nagashima K, Shinohara T, Chuma T, Mano Y, Tachi N, Hall WW. Clinicopathological and virological analyses of familial HTLV-I associated polyneuropathy. *J. Neurovirol.*, in press.
29. Ishida M, Tanaka S, Ohki M, **Ohta T**. BRM and BRG1 Negatively Regulate Transcriptional Activity of the Synovial Sarcoma Translocation Gene Product. *Genes Cells* 9: 419-428, 2004.
30. Sakiyama T, Kohno T, Mimaki S, **Ohta T**, Yanagitani N, Sobue T, Kunitoh H, Saito R, Shimizu K, Hiramata C, Kimura J, Maeno G, Hirose H, Eguchi T, Saito D, Misao O, Yokota J. Association of Amino Acid Substitution Polymorphisms in DNA Repair Genes, TP53, POLI, REV1 and LIG4, with Lung Cancer Risk. *Int. J. Cancer*, in press.
31. Chuma M, Sakamoto M, Yasuda J, Fujii G, Nakanishi K, Tsuchiya A, **Ohta T**, Asaka M, Hirohashi S. Overexpression of cortactin is involved in motility and metastasis of

- hepatocellular carcinoma. *J. Hepatology* 41: 629-636, 2004.
32. Shimada H, Shimizu K, Mimaki S, Sakiyama T, Mori M, Shimasaki N, Yokota J, Nakachi K, Ohta T, Ohki M. First case of aplastic anemia in a Japanese child with a homozygous missense mutation in the NBS1 gene (I171V) associated with genomic instability. *Human Genetics* 115: 372-376, 2004.
33. Fujiwara K, Ochiai M, Ohta T, Ohki M, Aburatani H, Nagao M, Sugimura T, Nakagama H. Global gene expression analysis of rat colon cancers induced by a food-borne carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Carcinogenesis* 25: 1495-1505, 2004.
34. Aihara H, Nakagawa T, Yasui K, Ohta T, Hirose S, Dhomae N, Takio K, Kaneko M, Takeshima Y, Muramatsu M, Ito T. Nucleosomal histone kinase-1 phosphorylates H2A Thr 119 during mitosis in the early *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* 18: 877-888, 2004.
35. Kobayashi A, Ohta T, Yamamoto M. Unique function of the Nrf2-Keap1 pathway in the inducible expression of antioxidant and detoxifying enzymes. *Methods Enzymology* 378: 273-2786, 2004.
36. Tanaka Y, Sasanuma M, Kawaguchi S, Ohta T, Yoda K, Kurumizaka H, Yokoyama S. Expression and purification of recombinant human histones. *Methods* 33: 3-11, 2004.
37. Goto J, Tezuka T, Nakazawa T, Tsukamoto N, Nakamura T, Ajima R, Yokoyama K, Ohta T, Ohki M, Yamamoto T. Altered gene expression in the adult brain of fyn-deficient mice. *Cell Mol Neurobiol.* 24: 49-59, 2004.
38. 仲 一仁、陳 晨、本山 昇. DNA ダメージチェックポイントとがん抑制メカニズム. *実験医学* 22: 1793-1799, 2004.

2. 平成 17 年度総括・分担研究報告書

総括研究報告書

健康寿命延長に関する戦略的研究

主任研究者

本山 昇

国立長寿医療センター・研究所・老年病研究部・早期老化症研究室・室長

研究要旨

国民の1/4が高齢者という超高齢化社会を世界に類を見ないスピードで迎えようとしており、今後も活力ある社会を保ち続けるためには高齢者が健康で生きがいをもって生活できるようにすることが大切である。しかしながら高齢化に伴い、がん・骨粗鬆症・動脈硬化等、種々の老年病を発症しそれが原因となり寝たきり等のQOLの低下を導いている。比較的若年期に種々の老年病を発症し老化症状を呈する早期老化症の原因遺伝子の同定により、ゲノムDNAの安定化機構の破綻が老化において重要な要因の一つであることが明らかになってきた。一方、興味深いことに酵母から哺乳類においてカロリー制限（CR）は、これらの老年病の発症を遅らせ健康寿命を延長することが明らかにされている。また、CRによって低下するIGF-Iによって負に制御されているフォークヘッド型転写因子FOXOが線虫の健康寿命の延長及び酸化ストレス抵抗性獲得に必須である。CR及び長寿命の生物の変異体に共通しているのが活性酸素（ROS）等に対して耐性を示すことである。ROSはゲノムDNA障害等を引き起こすことが知られており、早期老化症を示すマウスにおいてROS負荷によって、その症状が増強する可能性が示唆されている。今年度は、FOXOが酸化ストレスに応答して迅速に核内に蓄積することを見出した。この応答は、IGFシグナルに拮抗するものであり、FOXOの活性はIGFシグナルと酸化ストレス応答シグナルのバランスによって制御されていると考えられた。また、酸化ストレスに応答してFOXOはユビキチンリガーゼMurf1や新規ユビキチン結合因子ZNF216の転写を介して筋萎縮を促進することを明らかにした。すなわち、老人性筋肉萎縮症や廃用性筋萎縮症における酸化ストレスとFOXOの関連が示唆された。

分担研究者

澤 洋文

北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター 分子病態・診断部門・教授

大田 力

国立がんセンター・研究所・腫瘍ゲノム解析情報研究部・室長

渡辺 研

国立長寿医療センター・研究所・運動器疾患研究部・室長

A. 研究目的

世界に類を見ないスピードで国民の高齢化が進み超高齢化社会を迎えようとしている。このような社会において高齢者の QOL を保つことが重要であるが、高齢化に伴いがん・骨粗鬆症・動脈硬化・白内障など種々の老年病を発症し、それが原因となり寝たきり等の QOL の低下をもたらすことが多い。哺乳類（ヒトにおいてはまだ正確なデータは出ていないが）においてカロリー制限（CR）は唯一、これら老年病の発症を遅延し健康寿命を延長することが明らかにされている。一方、比較的若年期に種々の老年病を発症する早期老化症の原因遺伝子の同定が進んできて、それら原因遺伝子がゲノム構造の維持に重要な役割を果たす遺伝子産物であることが明らかにされてきたが、CR による健康寿命の延長とゲノム DNA の安定化機構の関連は明らかにされていない。線虫やマウスにおいてインスリンシグナルと寿命制御の関連が明らかにされつつあり、線虫におい

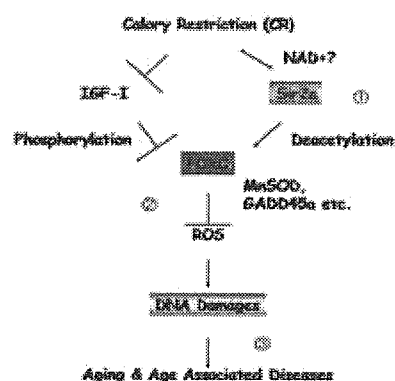


図1. カロリー制限による ROS・DNA ダメージを介して老化・老年病発症の制御メカニズム

ては、インスリンシグナルによって負に制御されているフォークヘッド型転写因子 FOXO が重要な機能を果たしていることが明らかにされている。また、ある種の生物においては、CR による健康寿命の延長には、NAD⁺依存性脱アセチル化酵素 Sir2 が必須であり、インスリンシグナルに作用している可能性が示唆されている。CR によって健康寿命が延長したマウスや遺伝的変異により長寿命の表現型を示す生物は、活性酸素（ROS）等のストレスに対して抵抗性を示すことが明らかになっている。ROS は DNA 障害を誘発することが知られており、これによりゲノムの安定性が