

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

(H17-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17年度 総括研究報告書

主任研究者 磯部健一

平成18(2006)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	9-11
ストレス応答制御による神経変性疾患予防	11-16
GDNF/RET系シグナルと神経変性疾患	17-21
免疫制御による脳変性疾患の予防	22-24
免疫系による老化制御	25-27
ストレス応答と生体反応	28-31
生体ストレス応答と動脈硬化、糖尿病に関する研究	32-34
細菌産物による老化制御	35-38
トリプトファン代謝によるT細胞応答の制御機構	39-42

## ＜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（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。本年度は実際の老年疾患において、こういった考え方で研究を進めた。その結果アルツハイマー病にはミクログリアが活性化されケモカイン、サイトカインを放出することで脳の局所的炎症を引き起こすこと、動脈硬化にマクロファージ系の関与が推測されているが、NOがその病態に大きく関与すること、CAG リPEAT病にシャペロンが関与し、その阻害剤が有効であること等を見いだした。

#### 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きた。一方人の老化によって発生する様々な疾患を考える時、老化によって現れる成分に対して生体防御系が反応して病気の形成に関与することが知られてきた。酸化LDLに対するマクロファージさらに獲得免疫系の関与はよく知られているが、アルツハイマー、ポリグルタミン病、パーキンソン病は異常蛋白、凝集体として蓄積したものに対する免疫反応が病態に関与する可能性がある。本

研究の進展につれ、生体応答が防御に働くものと、病態形成に働くものがあることが次第に明らかになってきた。

#### B. 研究方法

##### （1）動物モデルによる実験

人の老化、老化様疾患のモデルとして同じ哺乳類であり、遺伝的背景がしっかりと確立しているマウスを使用した。マウスには遺伝子を導入したり、特定の遺伝子をノックアウトして使用した。

##### （2）細胞培養による実験

マウス、あるいは人の細胞株をin vitroで培養して実験に供した。また、神経細胞、グリア細胞をマウスより分離培養した。免疫系細胞をマ

ウス骨髄、脾臓より分離し培養した。

(3)、細胞内シグナル伝達系、遺伝子発現制御

細胞抽出液のウェスタン解析で、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今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

磯部はミクログリアの培養系で、A $\beta$ 1-42の刺激後RNAを取り、Real Time PCRでマクロファージ系ケモカインを網羅的に検索した。その結果CCL2,CCL3,CCL4 ,CCL7に強い発現が見られた。この発現はA $\beta$ 25-35でも見られたが、A $\beta$ 1-40ではほとんど見られなかった。老化に伴い発現があらわれるA $\beta$ 1-42はマクロファージ系のケモカインを誘導し、さらにミクログリアを呼び寄せることで、それが放出するサイトカインによって神経

細胞の変性からアルツハイマー病の進行が予想された。木内は低酸素培養ではneprilysin活性が低下し、A $\beta$ の分解が抑制されてアルツハイマー病を促進すること、さらに、neprilysin 2が同様な機序で活性低下することを検索した。また、微量のneprilysinを測定する系を開発した。赤津、は実際のAD患者脳の網羅的プロテオーム解析を進行中である。最近、ADとトリプトファン代謝系特にIDOによるキヌレインの産生と神経細胞死が話題になってきている。長瀬はこの経路の基礎的研究をおこなった。

(2) 糖尿病、動脈硬化

林はNO合成酵素の基質L-arginineは初期動脈硬化病変を抑制するが、進行病変では十分作用しないこと、

Citrulline- Arginine cycle 活性化が重要で、抗酸化剤と相乗効果を示すことを明らかにした。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を発見した。

(3) CAGリピート病

ポリグルタミン病は責任遺伝子の

coding region内のCAGリピートの異常延長によって引き起こされる遺伝性神経変性疾患である。球脊髄性筋萎縮症（SBMA）は成人発症の下位運動ニューロン徴候を特徴とする神経変性疾患で、アンドロゲン受容体（AR）のポリグルタミン鎖の異常延長がみられる。祖父江は、97CAGリピートを有する全長のヒトARを発現するトランスジェニックマウス(Tg)を作成し、Hsp70の高発現によりマウスの運動機能が改善し、核内変異ARの蛋白複合体及びモノマーが減少することを示してきた。Hsp90阻害剤である17-AAGは熱ショック蛋白質の転写因子である Heat shock transcription factor(HSF-1)を活性化し、Hsp70やHsp40といった抗ストレス分子シャペロンを非特異的に増加させる薬理作用を持つ。SBMAモデルマウスへ生後5週齢より17-AAGを投与すると、治療群は非治療群に対して、有意に運動機能障害の改善を認めた。

#### （4）その他

ストレス刺激のうち感染ストレスは老化を誘起する。一方、生体はマクロファージによって貪食した細菌にファゴゾームの産生環境、酸化ストレスが変化を与える。A群レンサ球菌（GAS）をモデルに生体防御系が細菌の遺伝子の発現を制御するメカニ

ズムを長谷川は検索した。その結果二成分制御系がGASのNGA等の発現に影響をあたえ、生体防御系からのがれる可能性を示した。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。丸山はIL-1ファミリー遺伝子、新規TARSH遺伝子に加え、細胞死関連遺伝子DAP3の生理的機能について解析した。その結果、1) IL-1シグナル伝達経路がp38の活性化機構に関与している。2) TARSH遺伝子は細胞老化のみならず個体老化にも関与している。3) DAP3は酸化ストレス応答遺伝子としてミトコンドリア非特異的にSIPSに対して減少することが明らかになった。高橋は昨年までの研究により、RETチロシ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。すなわち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シグナル伝達系が特異的に障害されることを明らかにした。本年度はマウスセリン697（ヒトRETセリン696に相当する）をアラニンに置換したノックインマウスを作成し、その表現型を解析した。その結果、セリン697のリン酸化に

より活性化されるRac1/JNKシグナルは胎生期における腸管神経前駆細胞の遊走能に重要な役割を果たしており、それが障害されることにより、大腸遠位部における腸管神経系が欠損することを明らかにした。

#### D. 考察

今年度は初年度の成果を発展させ、ストレス刺激に対する生体応答系を細胞レベル、個体レベルで解析し、実際の老化関連疾患の病態形成にストレスに対する生体応答が大きく関与することを証明した。細胞レベルでのストレス防御系ではHSPを個体レベルの防御系ではマクロファージ系細胞を中心に研究を進めた。最終年度はこれらの研究を発展させ、老化、老化関連疾患の病態形成あるいは生体防御系に関連し、より深い理解と統一した理論に達するよう研究をすすめ、老化、老年病予防策を提示する予定である。

#### E. 結論

老化に伴い出現してくる生体異物は自然免疫系が認識し、アルツハイマー病ではミクログリアが、動脈硬化ではマクロファージが局所の炎症を起こす。それが病態形成の一躍を担っていると考えられた。特に、A-betaによるCCL2,3,4,7の発現は局所にミクログリアをさらに集族させる。動脈硬化では、Citrulline- Arginine cycle

活性化が病態形成に関与する。また、HSP90阻害剤はCAGリピート病を抑制することが判明した。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### (1) 論文発表

磯部健一、羽根田正隆、石田佳幸、伊藤佐知子. B細胞の分化；形質細胞への分化とストレス応答. *Annual Review免疫* 2006

磯部健一；老化と免疫反応から慢性疾患の病態生理にせまる仮説 *現代医学*53, 2005.43-49.

Tsuda M, Watanabe T, Seki T, Kimura T, Sawa H, Minami A, Akagi T, Isobe K, Nagashima K, Tanaka S. Induction of p21(WAF1/CIP1) by human synovial sarcoma-associated chimeric oncoprotein SYT-SSX1. *Oncogene*. 2005 2005 24(54):7984-90.

Ito S, Sawada M, Haneda M, Fujii S, Oh-Hashi K, Kiuchi K, Takahashi M, Isobe K. Amyloid-beta peptides induce cell proliferation and macrophage colony-stimulating factor expression via the PI3-kinase/Akt pathway in cultured Ra2 FEBS Lett. 579:1995-2000. 2005

Isobe K., Ito S, Haneda M, Ishida Y.

Cellular and systemic Defense system against

- Age-promoting stimuli. *Nagoya J. Med.* 2006;68, 9-18.
- Uekawa N, Isobe K, Schwartz MA, Maruyama M. microglial cells. Zizimin2: a novel, DOCK180-related Cdc42 guanine nucleotide exchange factor expressed predominantly in lymphocytes. Nishikimi A, Meller N, *FEBS Lett.* 579(5):1039-46. 2005.
- 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.
- 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.
- 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.
- Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Waza M, Sang C, Nakagomi Y, Kobayashi Y, Tanaka F, Doyu M, Inukai A, Yoshida M, Hashizume Y and 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.
- Waza M, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Sang C, Nakagomi Y, Kobayashi Y, Tanaka F, Doyu M, Inukai A, Yoshida M, Hashizume Y and Sobue G. 17-AAG, an Hsp90 inhibitor, ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron degeneration. *Nat Med* 11: 1088-1095, 2005.
- Katsuno M, Sang C, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Pharmacological induction of heat shock proteins alleviates polyglutamine-mediated motor neuron disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:16801-16806, 2005.
- Banno H, Adachi H, Katsuno M, Suzuki K, Atsuta N, Watanabe H, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Mutant androgen receptor accumulation in SBMA scrotal skin: A pathogenic marker. *Ann Neurol* in press.
- Zhang, J., Hashimoto, M., Kawai, K., Murakumo, Y., Sato, T., Ichihara, M., Nakamura, S. and Takahashi, M. CD109

- expression in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Pathol. Int.* 55: 165-169 (2005).
- Fukuda, T., Asai, N., Enomoto, A., and Takahashi, M. Activation of c-Jun amino-terminal kinase by GDNF induces G2/M cell cycle delay linked with actin reorganization. *Genes Cells* 10: 655-663 (2005).
- Matsuura, T., Shimono, Y., Kawai, K., Murakami, H., Urano, T., Niwa, Y., Goto, H., and Takahashi, M. PIAS proteins are involved in the SUMO-1 modification, intracellular translocation and transcriptional repressive activity of RET finger protein. *Exp. Cell Res.* 308: 65-77 (2005).
- Morinaga, T., Enomoto, A., Shimono, Y., Hirose, F., Fukuda, N., Dambara, A., Jijiwa, M., Kawai, K., Hashimoto, K., Ichihara, M., Asai, N., Murakumo, Y., Matsuo, S., and Takahashi, M. GDNF-inducible zinc finger protein 1 is a sequence-specific transcriptional repressor that binds to the HOXA10 gene regulatory region. *Nucleic Acids Res.* 33: 4191-4201 (2005).
- Enomoto, A., Murakami, H., Asai, N., Morone, N., Watanabe, T., Kawai, K., Murakumo, Y., Usukura, J., Kaibuchi, K., and Takahashi, M. Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE. *Developmental Cell* 9: 389-402 (2005).
- Shimono, K., Shimono, Y., Shimokata, K., Ishiguro, N., and Takahashi, M. Microspherule protein 1, Mi-2b, and RET finger protein associate in the nucleolus and up-regulate ribosomal gene transcription. *J. Biol. Chem.* 280: 39436-39447 (2005).
- Taguchi K, Yamagata H, Zhong W, Kamino K, Akatsu H, Hata R, Yamamoto T, Kosaka K, Takeda M, Kondo I, Miki T Identification of hippocampus-related candidate genes for Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 2005 Apr;57(4):585-8.
- Zhong W, Yamagata HD, Taguchi K, Akatsu H, Kamino K, Yamamoto T, Kosaka K, Takeda M, Kondo I, Miki T. Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase is a novel risk gene for Alzheimer disease. *J Neurol Sci.* 2005 Aug 15
- Satoh K, Hata M, Shimizu T, Yokota H, Akatsu H, Yamamoto T, Kosaka K, Yamada T. Lib, transcriptionally induced in senile plaque-associated astrocytes, promotes glial migration through extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Sep 23;335(2):631-6.
- Yamamoto R, Iseki E, Marui W, Togo T, Katsuse

- O, Kato M, Isojima D, Akatsu H, Kosaka K, Arai H  
 Non-uniformity in the regional pattern of Lewy pathology in brains of dementia with Lewy bodies.; *Neuropathology*. 2005; 25, 188-194.
- Novobrantseva T, Xu S, Tan JE, Maruyama M, Schwers S, Pelanda R, Lam KP.: Stochastic Pairing of Immuno—globulin Heavy and Light Chains Frequently Generates B Cell Antigen Receptors That Are Subject to Editing in Vivo., *International Immunology* 17, 343-350, (2005)
- 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, 1031-1038, (2005)
- Terauchi K, Shimada J, Uekawa N, Yaoi T, Maruyama M, Fushiki S. : "Cancer- associated loss of TARSH gene expression in human primary lung cancer.", *J Cancer Res Clin Oncol*, 4, 1-7, (2005)
- Mitsuda N., Yamagata H.D., Zhong W., Aoto M., Akatsu H., Uekawa N., Kamino K., Taguchi K., Yamamoto T., Maruyama M., Kosaka K., Takeda M., Kondo I., Miki T.: A novel alternative splice variant of nicastrin and its implication in Alzheimer disease" *Life Science*, in press
- Oh-Hashi K, Nagai T, Tanaka T, Yu H, Hirata Y and Kiuchi K. Determination of hypoxic effect on neprilysin activity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells using a novel HPLC method. *Biochem Biophys Res Commun.* (2005) 334 (2), 380-385.
- Yu H, Oh-Hashi K, Tanaka T, Sai A, Inoue M, Hirata Y and Kiuchi K. *Rehmannia glutinosa* induces glial cell line-derived neurotrophic factor gene expression in astroglial cells via cPKC and ERK1/2 pathways independently. *Pharmacol Res.* in press.
- Hayashi T, Matsui-Hirai H, Fukatsu A, Sumi D, Kano-Hayashi H, Rani P JA, Iguchi A. Selective iNOS inhibitor, ONO1714 successfully retards the development of high-cholesterol diet induced atherosclerosis by novel mechanism. *Atherosclerosis*. 2005 Nov 30; [Epub ahead of print] (in press)
- Hayashi T, Juliet PA, Matsui-Hirai H, Miyazaki A, Fukatsu A, Funami J, Iguchi A, Ignarro LJ. l-Citrulline and l-arginine supplementation retards the progression of high-cholesterol-diet-induced atherosclerosis in rabbits. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:13681-6.
- 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 Complications*. 2005;19:264-8.

Hayashi T, Juliet PA, 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 2 diabetes complicated by NO dysfunction. *Diabetes Obes Metab*. 2005;7:334-43.

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

Matsumoto M, Sakae K, Hashikawa S, Torii K, Hasegawa T, Horii T, Endo M, Okuno R, Murayama S, Hirasawa K, Suzuki R, Isobe J, Tanaka D, Katsukawa C, Tamaru A, Tomita M, Ogata K, Ikebe T, Watanabe H, The Working Group for Group A Streptococci in Japan, Ohta M. Close Correlation of Streptococcal DNase B (sdaB) Alleles with emm Genotypes in *Streptococcus pyogenes* *Microbiol Immunol*. 2005; 49: 925-929.

Kawamura-Sato K, Hasegawa T, Torii K, Ito H, Ohta M. Prevalence of a ParE Ile460-Val

substitution in clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates that were less susceptible to fluoroquinolones. *Curr Microbiol*. 2005; 51: 27-30.

Kawamura-Sato K, Hirama Y, Agata N, Ito H, Torii K, Takeno A, Hasegawa T, Shimomura Y, Ohta M. Quantitative analysis of cereulide, an emetic toxin of *Bacillus cereus*, by using rat liver mitochondria.

*Microbiol Immunol*. 2005; 49: 25-30.

## 〈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、ミクログリアが老化で産生されるA-betaによって強く活性化され、様々なマクロファージ系のサイトカイン、ケモカイン、マトリックスメタロプロテアーゼを産生することを報告してきたが、今年度はケモカイン産生とそのシグナル伝達系を詳細に検討した。その結果、Aβ1-42はマクロファージ系のケモカインCCL2,CCL3,CCL4,CCL7の発現を著しく増加させること、P13/Akt、Erkの両経路が関与することを見いだした。

#### A. 研究目的

老化促進ストレス刺激（ROSあるいは紫外線、感染等外的ストレス）が引き起こす生体応答ストレス応答、あるいは老化に伴い蓄積する異常蛋白等に対する細胞レベル（シグナル伝達系、遺伝子発現）の解析と、マクロファージ系に代表される個体レベルの生体応答を解析し、老化によって引き起こされる様々な老年病疾患（動脈硬化、アルツハイマー病、ポリグルタミン病等の神経変性疾患）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討する。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）ミクログリア分離培養

マウスの脳を取りだし、in vitroでミクログリアを培養した。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。経路の検索のためシグナル伝達系インヒビターを使用した。また、RNAを取り出し、RT-PCRを行った。またRNAを定量的に測定するためReal time PCR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

昨年度はマイクロアレイで網羅的に遺伝子発現を検索したが、今年度はそのうちケモカインに絞って詳細な検討を加えた。

#### (5) マクロファージ系ケモカインの発現

Ra2あるいは初代培養ミクログリアをA $\beta$ 1-42の刺激後RNAを取り、Real Time PCRでマクロファージ系ケモカインを網羅的に検索した。その結果CCL2,CCL3,CCL4 ,CCL7に強い発現が見られた。この発現はA $\beta$ 25-35でも見られたが、A $\beta$ 1-40ではほとんど見られなかった。

#### (6) CCL7とCCL2の発現シグナル。

シグナル伝達系の抑制物質によるWestern BlottingによってCCL7とCCL2 mRNA発現はP13K/Akt経路とErk経路の両経路を介することが判明した。CCL4発現は13K/Akt経路のみを介することが判明した。

### D. 考察

老化に伴い発現があらわれるA $\beta$ 1-42はマクロファージ系のケモカイン、特にCCL2,CCL3,CCL4 ,CCL7を強く発現することが判明した。このことから、老化に伴って、脳にマクロファージ系細胞特にミクログリアが増加することが予想される。

### E. 結論

1) A $\beta$ 1-42 はマクロファージ系のケモカインCCL2,CCL3,CCL4 ,CCL7の発現を著しく増加させた。

2) P13/Akt . Erkの両経路が関与することが判明した。

### F. 健康危険情報

なし。

### G. 研究発表

#### (2) 論文発表

磯部健一、羽根田正隆、石田佳幸、伊藤佐知子. B細胞の分化；形質細胞への分化とストレス応答. Annual Review免疫 2006

磯部健一；老化と免疫反応から慢性疾患の病態生理にせまる仮説 現代医学53, 2005.43-49.

Tsuda M, Watanabe T, Seki T, Kimura T, Sawa H, Minami A, Akagi T, Isobe K, Nagashima K, Tanaka S. Induction of p21 (WAF1/CIP1) by human synovial sarcoma-associated chimeric oncoprotein SYT-SSX1. Oncogene. 2005 24(54):7984-90.

Ito S, Sawada M, Haneda M, Fujii S, Oh-Hashi K, Kiuchi K, Takahashi M, Isobe K. Amyloid-beta peptides induce cell proliferation and macrophage colony-stimulating factor expression via the PI3-kinase/Akt pathway in cultured Ra2 FEBS Lett. 579:1995-2000. 2005

Isobe K., Ito S, Haneda M, Ishida Y. Cellular and systemic Defense system against Age-promoting stimuli. Nagoya J. Med. 2006;68, 9-18.

Uekawa N, Isobe K, Schwartz MA, Maruyama M. microglial cells. Zizimin2: a novel, DOCK180-related Cdc42 guanine nucleotide exchange factor expressed predominantly in lymphocytes. Nishikimi A, Meller N, FEBS Lett. 579(5):1039-46. 2005.

#### (2) 学会発表

磯部健一、羽根田正隆、木村賢哉、伊藤佐知子；アルツハイマー病A-betaがミクログリアを活性化させるメカニズム(第4報)第34回日本免疫学会 12月

14日横浜

羽根田正隆、石田佳幸、磯部健一  
生体内（免疫系、特に B リンパ球）で  
の GADD34 の機能

2005 . 12.13

石田佳幸、羽根田正隆、樋田大輔、磯  
部健一

免疫組織化学による免疫、血液系の発  
生,分化研究（第 1 報; B 細胞分化）

2005 . 12.13

## ＜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：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。このうち、ポリグルタミン病は責任遺伝子の coding region 内の CAG リピートの異常延長によって引き起こされる遺伝性神経変性疾患である。球脊髄性筋萎縮症（SBMA）は成人発症の下位運動ニューロン徴候を特徴とする神経変性疾患で、アンドロゲン受容体（AR）のポリグルタミン鎖の異常延長がみられる。我々は、97CAG リピートを有する全長のヒト AR を発現するトランスジェニックマウス(Tg)を作成し、Hsp70 の高発現によりマウスの運動機能が改善し、核内変異 AR の蛋白複合体及びモノマーが減少することを示した。本研究では、ポリグルタミン病を含む神経変性疾患に応用可能な治療を、トランスジェニックマウスや培養細胞を用いてスクリーニングし、その効果と安全性の確認を行い、臨床応用を行って老化促進ストレスの改善を目指す。

#### 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。このうち、ポリグルタミン病は責任遺伝子の coding region 内の CAG リピートの異常延長によって引き起こされる遺伝性神経変性疾患である。球脊髄性筋萎縮症（SBMA）は成人発症の下位運動ニューロン徴候を特徴とする神経変性疾患で、アンドロゲン受容体（AR）のポリグルタミン鎖の異常延長がみられる。我々は、SBMA を target として研究を進めてきており、Hsp70、Hsp40 などの分子シャペロンを SBMA 培養細胞モデルやトランスジェニックマウスモデルで高発現させることによって、病態発現の抑制が可能なことを明らかにした。分子シャペロンには、構造が変異したターゲット蛋白を

refolding したり、ユビキチン・プロテアソームシステムと連携して分解する作用が知られている。本研究では、SBMA をターゲットに、Hsp90、Hsp70、Hsp40 などの分子シャペロンの発現増進及び抑制やそれらの機能調節作用を持つ、臨床応用可能な低分子化合物による治療法開発を目指し、その効果と安全性の確認を行い、臨床応用を行って老化促進ストレスの改善を目指す。

#### B. 研究方法

##### (1) Hsp90 阻害剤の投与実験

SBMA の神経培養細胞モデルとマウスモデルに対して治療的介入実験を行う。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。このモデルに対し、Hsp90 阻害剤である

## 17-allylamino-17-

demethoxygeldanamycin(17-AAG)を様々な濃度で投与し、強制発現させたヒトの全長の AR (24CAG リピート及び 97CAG リピート) の発現量などを検討する。マウスモデルは、chicken  $\beta$ -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(SBMA マウス)を用いる。SBMA マウスは、表現形に性差があり、進行性の運動障害を来す。モデルマウスに対しては、溶剤として Dimethyl Sulfoxide(DMSO)を使用して 17-AAG を投与し、薬効の評価は体重変化、生存率、Rotarod 法(一定の速度で回転する棒の上に、落下せずにつかまっていた時間を測定)、Cage activity 測定法(24 時間のマウスの動作の回数の測定)を使用する。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(2.5,25 mg/kg), 薬剤吸収が確実な腹腔内注射法にて週に 3 回施行する。

### (2) GGA の投与実験

次に、消化性潰瘍の薬剤として使用されている熱ショック蛋白質誘導物質である Geranylgeranylacetone(GGA)にはマウスや細胞レベルで分子シャペロンである Hsp70 などの発現を増加させる作用が確認されている。この化合物の効果も SBMA 神経培養細胞とトランスジェニックマウスモデルを用いて検討する。異常延長したポリグルタミン鎖 (AR97Q) を含有する短縮型 AR 遺伝子を発現するアデノウイルス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。培養細胞モデルには、熱ショック蛋白質誘導物質を様々な濃度で投与し、モデルマウスに対しては、餌の中に化合物を複数の容量で混入して投与した。治療効果は Hsp90 阻害剤投与実験と同様に行った。効果の認められた容量において、免疫組織化学などの病理学的検索、ウエスタンブロットなどを用いたタンパク発現解析などにより凝集体形成抑制効果や HSP の発現誘導効果を検討した。

(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) Hsp90 阻害剤の投与実験

SBMA 培養細胞モデルへの 17-AAG 投与により双方のリピート数の AR の減少効果を認めたが、その減少効果はリピート数が異常伸長した AR97Q で強くみられた。また、17-AAG による減少効果は、プロテアゾーム阻害剤である MG132 併用により相殺された。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。さらに、SBMA モデルマウスへ生後 5 週齢より 17-AAG を投与すると、治療群は非治療群に対して、有意に運動機能障害の改善を認めた。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、AR-97Q の発現量は、脊髄、骨格筋の双方でモノマー及びスタッキングゲル内のタンパク複合体の双方で有意に減少した。AR-97Q の減少効果を AR-24Q と比較すると、

その減少効果は有意に AR-97Q において多く認められた。また、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。これは、17-AAG により変異 AR の分解が促進された結果と考えられた。

## (2) GGA の投与実験

SBMA 培養細胞モデルへの GGA 投与により 97CAG リピート数の AR の凝集体形成減少効果を認め、AR97Q で起こる細胞死も抑制された。GGA も Tg に投与すると、分子シャペロンの発現増加がみられ、5%及び 10%の濃度の投与量で運動機能障害の改善効果がみられた。2.5 あるいは 20%では治療効果を認めなかった。ウエスタンブロット法でも、脊髄、脳幹、骨格筋において、AR-97Q の発現量は、モノマー及びスタッキングゲル内のタンパク複合体の双方で有意に減少した。1C2 抗体を用いた病理学的検索でも、GGA 投与群で 1C2 陽性細胞が有意に減少した。

## D. 考察

SBMAはAR内のポリグルタミン鎖が伸長した病的タンパク質が、神経細胞内に異常蓄積する疾患である。分子シャペロンであるHsp90は他の分子シャペロン(Hsp70, Hop, p23, p50など)とともに、Hsp90依存性のクライアントタンパク質と複合体を形成し、そのクライアントタンパク質の安定化と機能発現に重要な役割を果たしている。ARも代表的なHsp90のクライアントタンパク質であり、その機能発現にはHsp90が必須である。Hsp90には特異的な機能阻害剤が存在し、クライアントタン

パク質の機能を失活、更にはそれらがユビキチン・プロテアゾーム系で分解されることが明らかにされている。Hsp90阻害剤の神経変性疾患への有効性は、他の研究グループからも報告されている。しかし、これまでの研究に用いられてきた薬剤は、最も古典的なHsp90阻害剤であるgeldanamycin(GA)である。GAは1970年に抗真菌薬として見出され、優れた抗腫瘍効果を持つことが知られていた。しかし、GAには生体内で容認できない肝臓毒性があることが判明し、より毒性の低い誘導体の検索が行われ、GAの側鎖の一部が置換された17-AAGが見出された。17-AAGは、GAにみられるような副作用が大幅に抑えられながら、GAとほぼ同等の薬理活性を持つ優れた誘導体である。また腫瘍細胞は正常細胞と比べて100倍以上もHsp90阻害剤に対する感受性を有することが示されており、17-AAGは腫瘍細胞に選択性が高く副作用の少ない優れた抗癌剤として、乳癌や前立腺などの固形癌、また白血病や骨髄腫などの血液癌への臨床応用が欧米で勧められ、PhaseIの治療が終了し、既にPhaseIIが進行中である。また動物モデルにて17-AAGは静脈内投与、腹腔内投与であれば、神経組織への移行性を有することも確認されている。一般に神経変性疾患の治療は長期間に及ぶため、治療薬の副作用は最小限に抑える必要があることは言うまでもなく、Hsp90阻害剤の臨床応用を考えるにはGAではなく17-AAGを用いた研究が必要である。これまでも抗癌剤を神経変性疾患動物モデルに応用する試みはあったが、いずれも薬剤自体の副作用が懸念される結果であり、臨床応用は難しいと思われていた。

これに対して我々が利用する17-AAGは、生体内での毒性が問題とならない投与量で十分な薬理効果を発揮すると考えられ、抗癌剤として開発された17-AAGが神経変性疾患の治療薬としても十分に応用可能であると思われる。今回、私たちは、病的蛋白質の発現量が抑制できれば優れた治療法になると考えられたため、クライアント蛋白質の発現量を減少させるというHsp90阻害剤の薬剤効果に注目した。さらに注目すべき点は、Hsp90阻害剤は、熱ショック蛋白質の転写因子であるHeat shock transcription factor(HSF-1)を活性化し、Hsp70やHsp40といった抗ストレス分子シャペロンを非特異的に増加させる薬理作用を持つ。こうした分子シャペロン増強効果は既にあらゆる神経変性疾患モデルで、その有効性が確認されており、Hsp90阻害剤の魅力の一つである。我々もHsp70高発現がSBMAマウスの表現型を改善させることを報告している。一方で我々が今回動物モデルにおいて明らかにしたことは、これまでの治療法と比較し、17-AAGの非特異的な分子シャペロン増強効果は決して強いものではないことである。つまり17-AAGの薬理効果が最大限に発揮されるためには、SBMAにおけるARのように病因タンパク質そのものがHsp90クライアントであることが重要と考えている。シャペロンの機能調整により、神経変性疾患の治療を行おうという試みは多数あるが、それらは主にHsp70を中心としたものであった。腫瘍関連疾患ではHsp90の機能調整による治療が注目されているが、神経疾患ではこうした試みは報告されていない。我々の17-AAGによる病因タンパク質そのものをター

ゲットとした分子標的治療は、他の研究グループにはない独創的なものである。

一方、消化性潰瘍の薬剤として使用されている非毒性の熱ショック蛋白質誘導物質であるGGAにも同様に分子シャペロンの発現を誘導する作用があり、十分な結果が得られるものと考えた。SBMAモデルマウスで治療効果が確認でき、この考え方をさらに広い範囲の神経変性疾患へ展開することが可能となってくると思われる。

#### E. 結論

17-AAGは悪性腫瘍疾患のみでなく神経変性疾患にも応用可能であると考えられる。Hsp90阻害剤の病的タンパク質をより選択的に分解する作用は、われわれがARにおいて示したと同様に他のターゲットタンパク質においても証明されている。こうした17-AAGの薬理作用は治療薬として魅力的なものであり、幅広い神経変性疾患に応用可能である。また、GGAの分子シャペロン増強作用も幅広い神経変性疾患に応用可能と考えられる。このような、分子シャペロンやユビキチン・プロテアソームシステムを活性化する方法は、ポリグルタミン病の枠を超えて、臨床医学に寄与することができる治療法と考えられる。

F. 健康危険情報  
なし。

#### G. 研究発表

##### (1) 論文発表

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.

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.

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.

Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Waza M, Sang C, Nakagomi Y, Kobayashi Y, Tanaka F, Doyu M, Inukai A, Yoshida M, Hashizume Y and 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.

Waza M, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Sang C, Nakagomi Y, Kobayashi Y, Tanaka F, Doyu M, Inukai A, Yoshida M, Hashizume Y and Sobue G. 17-AAG, an Hsp90 inhibitor, ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron degeneration. *Nat Med* 11: 1088-1095, 2005.

Katsuno M, Sang C, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Pharmacological induction of heat shock proteins alleviates polyglutamine-mediated motor neuron

disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:16801-16806, 2005.

Banno H, Adachi H, Katsuno M, Suzuki K, Atsuta N, Watanabe H, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Mutant androgen receptor accumulation in SBMA scrotal skin: A pathogenic marker. *Ann Neurol* in press.

学会発表

球脊髄性筋萎縮症の培養細胞モデルにおける Geranylgeranylacetone(GGA)の効果

第44回日本神経学会総会 東京 2004年5月

Hsp90 阻害剤はポリグルタミン鎖が異常延長した変異 AR の分解を促進する  
第45回日本神経学会総会 鹿児島  
2005年5月

## ＜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

Dok 蛋白ファミリーの Dok-4, 5, 6 が受容体型チロシンキナーゼの中で RET に比較的特異的に結合することが知られている。RET チロシンキナーゼによる神経突起の伸長における Dok-4 の役割について解析した結果、Dok-4 を神経芽細胞腫細胞 TGW や海馬の神経細胞に導入すると、著しい神経突起の伸長を誘導することを明らかにした。この現象は Dok-4 が Rap-1 の活性化を介して、Erk の持続的な活性化をひき起こすことによるものであった。Dok-4 のこの活性には Dok-4 に存在するコドン 187, 220 および 270 のチロシンが重要な役割を果たしていることを証明した。

昨年までの研究により、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。すなわち 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 シグナル伝達系が特異的に障害されることを明らかにした。本年度はマウスセリン 697（ヒト RET セリン 696 に相当する）をアラニンに置換したノックインマウスを作成し、その表現型を解析した。その結果、セリン 697 のリン酸化により活性化される Rac1/JNK シグナルは胎生期における腸管神経前駆細胞の遊走能に重要な役割を果たしており、それが障害されることにより、大腸遠位部における腸管神経系が欠損することを明らかにした。

治療法開発のための有用な情報を提供で

#### 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增强する活性がみられ、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

きるものとする。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 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。ラット海馬由来の初代培養神経細胞にも同様に Dok-4 を導入し、その効果を検討した。さらに、Dok-4 に存在するいくつかのチロシンをフェニルアラニンに置換した変異 Dok-4 を作成し、生理的活性におけるチロシン残基の重要性を検討した。

### 2. マウス RET のセリン 697 をアラニンに置換したノックインマウスの作成とその表現型の解析

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 697 を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。ノックインマウスの胎児の腸管を培養し、腸管神経前駆細胞の GDNF に対する遊走能を検討した。ノックインマウスの培養後根神経細胞を用いて、GDNF により活性化される細胞内シグナ

ル伝達系の解析を行った。

## C. 研究結果

1. 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 を TGW に発現させると、GDNF 刺激による神経突起の伸張を著しく増強した。この現象は Dok-4 を siRNA にてノックダウンするとキャンセルされた。GDNF による Dok-4 の活性化は Rap1 を活性化し、Erk の持続的な活性化を誘導することより神経突起の伸張を誘導することが示唆された。Dok-4 の発現による神経突起の伸張はラット海馬由来の初代培養神経細胞においても確認された。

さらに、GDNF により Dok-4 のチロシンリン酸化が誘導されることが知られているので、どのチロシン残基が Dok-4 の生理活性に重要であるかを解析した。いくつかのチロシンをフェニルアラニンに置換し、検討した結果、Dok-4, 5, 6 いずれにも保存されているチロシン 187, 220, 270 が突起伸張に重要な役割を果たしていることが判明した。

2. プロテインキナーゼAのリン酸化部位である RET の細胞内ドメインに存在するセリン 697 をアラニンに置換したノックインマウスを作成した (S697A マウス)。病理組織学的変化を解析した結果、大腸遠位部における腸管神経系の形成が著しく障害されていることが明らかになった。大腸近位部から小腸にかけては異常は認められなかった。ノックインマウスの腸管神経系の形成過程を解析した結