

果、胎生期における腸管神経前駆細胞の遊走能が低下しており、そのことが大腸遠位部における腸管神経系の欠損を引き起こしていた。胎児腸管を培養し、腸管神経前駆細胞の GDNF に対する遊走能を検討した結果、予想どおりノックインマウス由来の腸管神経前駆細胞の遊走能は著しく低下していた。さらにノックインマウス由来後根神経細胞を GDNF で刺激すると JNK のシグナルが特異的に障害されていた。以上の結果より、JNK シグナル伝達系が腸管神経前駆細胞の運動能を制御していることが明らかになった。一方、S697A マウスでは腎臓発生への影響は極めて軽微であった。

D. 考察

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

今回の解析のより Dok-4 が Rap1 の活性化を介して、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ヒト神経芽細胞腫細胞株およびラット海馬神経細胞を用いて明らかにした。さらに、Dok-4 のチロシン 187, 220, 270 が突起伸張に重要な役割を果たしていることを証明した。今後、Dok-4 がいかなる機序で Rap1 を活性化するかを明らかにすることが重要な課題である。1つの可能性としては Dok-4 のチロシン 187, 220, 270 に細胞内シグナル伝達蛋白、たとえば Rap1-GEF が結合することにより、Rap1 の活性化を誘導することが考えられる。あるいはこれらのチロシンが Dok-4 の

生理的な 3 次元立体構造に重要なものかもしれない。

2. マウス RET のセリン 697 のリン酸化の in vivo における役割

ノックインマウスを用いた解析により、RET のセリン 697 のリン酸化が in vivo にいても JNK の活性化に重要であり、胎生期における腸管神経前駆細胞の遊走能を制御していることを明らかにした。昨年度の研究により、セリン 697 はプロテインキナーゼ A(PKA)によるリン酸化部位であることを証明しており、神経系細胞における RET と PKA の活性を制御する 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 とともにヒルシュスプルング病の原因遺伝子であることが知られているエンドセリンレセプター B による PKA の活性の制御が、RET のセリン 697 のリン酸化レベルをコントロールすることにより、正常な腸管神経系の発生に寄与している可能性が示唆された。

E. 結論

1. アダプター蛋白 Dok-4 は RET の下流で Rap1 の活性化を介して、Erk の持続的活性化を誘導した。Dok-4 のチロシン 187, 220, 270 が神経突起の伸張に重要であった。

2. RET のプロテインキナーゼ A によるリン酸化部位セリン 697 をアラニンに置換したノックインマウスを作成した。RET のセリン 697 のリン酸

化は in vivo においても Rac1/JNK 系の活性化に重要であり、腸管神経前駆細胞の遊走能を制御していることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 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).
2. 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).
3. 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).
4. 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).

5. 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).

6. Shimono, K., Shimono, Y., Shimokata, K., Ishiguro, N., and Takahashi, M.
Microspherule protein 1, Mi-2 β , and RET finger protein associate in the nucleolus and up-regulate ribosomal gene transcription.
J. Biol. Chem. 280: 39436-39447 (2005).

G. 学会発表

1. 浅井直也、高橋雅英
PKA による Ret リン酸化部位の変異で生じる Hirschsprung 病類似の病態の解析
第 94 回日本病理学会総会 2005 年 4 月
2. 時々輪真由美、川井久美、村雲芳樹、

高橋雅英

RET チロシン 1062 を介するシグナルの欠如は精子形成に異常をきたす
第 94 回日本病理学会総会 2005 年
4 月

3. 内田真由美、黒川 景、高橋雅英

RET 受容体型チロシンキナーゼの細胞内シグナル伝達系におけるアダプタータンパク質 Dok-4 の役割
第 64 回日本癌学会学術総会 2005
年 9 月

分担研究報告書

免疫制御による脳変性疾患の予防

分担研究者 赤津裕康

(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って、実際のヒトサンプルを用いて動脈硬化、アルツハイマー病 (AD)、パーキンソン病(PD)、レビー小体病 (DLB) 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、AD、PD、DLB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、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；

A) AD、DLB においてプロテオーム解析を行った。

B) 臨床血液の TAFI 値定量と活性測定を行った。

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。

4. 脂質解析

剖検例および生前腰椎穿刺により得られた髄液を用いてコレステロール値測定を行った。

(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では採血サンプルを用いての遺伝子多型解析を行い ELISA 解析、活性測定、血管障害疾患との関連性を解析中である。
B) BDNF に関しては、AD, DLB ともに相関性は見出すことができなかったが国際雑誌に投稿中である。

2. 発現遺伝子・蛋白解析；

A) 脳実質でのプロテオーム解析において AD, DLB での解析を行い増加因子・減少因子を見出し同定中である。脈絡叢解析でも、AD 特異的に上昇している因子を見出し同定中である。
B) TAFI 値定量、活性測定においては500例の臨床サンプルを用いて解析を行い、日本人の多型比率と TAFI 値の相関、脳血管障害との関連性について解析中である。

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。

4. 脂質解析

髄液中のコレステロール値を測定し一定の傾向を見出す事ができた。

D. 考察および結論

今年度は TAFI 解析、髄液中コレステロール解析、プロテオーム解析において一定の成果を得る事ができた。

F. 健康危険情報

なし

G. 来年度の計画

- A) TAFI 遺伝子多型と血中濃度、活性測定、脳梗塞等との関連性の解析を引き続き行いそれなりの結果を得る。
- B) プロテオーム解析において増加・減少因子の同定を進めその病態との関連性を検討する。
- C) リン酸化酵素発現解析も病態との関連性を検討する。
- D) 髄液コレステロール値に関してもその診断的意義、病態との関連性を明らかにする。
- E) 新たに A β の搬出機構の解明、神経細胞死に関する検索も行っていく。

H. 研究発表

(1) 論文発表

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.

(2) 学会発表

赤津裕康、磯島大輔、桑野良三、山本孝之、小阪憲司

脳水腫と脳梗塞を併発し非特異的の老人斑を伴ったアルツハイマー病の1例

第46回日本神経病理学会総会学術研究会 2005.5.12-14

都甲崇、勝瀬大海、塩崎一昌、井関栄三、秋山治彦、土谷邦秋、磯島大輔、赤津裕康、鈴木京子、de Silva Rohan、Lees Andrew、小阪憲司、平安良男

4-repeat tauopathies における pretangles の検討

第46回日本神経病理学会総会学術研究会 2005.5.12-14

藤城弘樹、梅垣宏行、赤津裕康、磯島大輔、井口昭久、小阪憲司

レビー小体型痴呆における中隔核の免疫組織学的検討

第46回日本神経病理学会総会学術研究会 2005.5.12-14

堀本佳彦、松本光弘、赤津裕康、小阪憲司、山本孝之、小島章弘、吉田眞理、橋詰良夫

Machado-Joseph 病における MRI 所見と病理所見の対比

第46回日本神経病理学会総会学術研究会 2005.5.12-14

赤津裕康、岡田秀親、山本孝之、橋本歩美、岡崎三代、小山典久、横山信治
ゲルろ過 HPLC 法による亜急性硬化性全脳炎(SSPE)患者の脳室液蛋白室およびリボ蛋白解析

第9回日本神経ウイルス研究会 2005.6.9-11

赤津裕康、道川誠、山田達夫、岡田秀親、山本孝之、伊藤仁一、横山信二
アルツハイマー病を中心とした髄液中コレステロールの解析
第24回日本痴呆学会、2005.9.30-10.1

<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、実験動物管理室長→国立長寿医療センター研究所、老化機構研究部長）

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。本研究では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。

A. 研究目的

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 β と機能未知分子 Tarsh (Target of Nesh),さらにはアポトーシス関連遺伝子である DAP3 (Death Associated Protein 3) と細胞老化の関係に着目し、細胞老化における機能やそれらの機能を制御する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

ストレス応答性細胞老化においてIL-1Ra、IL-1 β 、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これまでのIL-1Raが関与する細胞老化におけるp38の活性化に加えて、IL-1 α/β 遺伝子欠損マウス由来のMEFについても増殖

能等を解析し、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。Tarshについては個体老化における発現動態や特異性等の詳細を検討し、細胞老化のみならず個体老化に何らかの影響を及ぼしている可能性を探る。さらにストレス暴露による細胞老化におけるDAP3の発現変化を解析し、DAP3の過剰発現による影響について探究する（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際は長寿医療センターの定める倫理規定、動物実験ガイドラインを厳守した上で計画、実行した。遺伝子改変動物を用いる実験においても「動物の保護及び管理に関する法律」やCIOMSの「動物を用いる生物医学研究のための国際指導原則」等に遵守した。

C. 研究結果

(1) IL-1 α/β 遺伝子欠損マウス由来MEFsの解析
IL-1 α/β 遺伝子欠損マウス由来MEFsを

in vitroで継代培養し、野生型MEFsと比較したところ、早期に増殖能の低下が見られたが、IL-1Ra、p38の活性化は認められなかった。また細胞老化に伴うp38の活性化を阻害するとIL-1βの発現が抑制された。

(2) 新規TARSH遺伝子のMEF細胞老化における発現解析

種々の継代回数を経た MEF における mTARSH 発現について定量 RT-PCR およびノザンブロット解析した結果、老化細胞期特異的に高いピークを示した。マウス個体における TARSH の遺伝子発現をノザンブロット解析したところ、肺特異的に高発現が認められた。さらにマウス加齢個体の肺における TARSH 遺伝子発現を定量 RT-PCR 法にて解析した結果、1 ヶ月、8 ヶ月齢に比べて 20 ヶ月齢では TARSH 遺伝子の発現が有意に低下していた。

(3) アポトーシス関連蛋白DAP3の細胞老化における関与

Stress-induced premature senescence (SIPS) において、DAP3 蛋白は、YMM/TERT 細胞株（ヒト皮膚由来繊維芽細胞）を H₂O₂ による酸化ストレス刺激後 12 時間以内に減少し、その減少は刺激後 4 日以上持続する事を見いだした。次に DAP3 はミトコンドリア移行シグナルをN末に有することから、刺激前後の DAP3 の細胞内局在を検討したところ、SIPS における DAP3 の減少はミトコンドリア画分に加えてわずかに存在する細胞質画分においても確認された。

D. 考察

(1) 細胞老化におけるIL-1シグナル伝達経路の機能解析

IL-1Raが老化初期に発現亢進するのはIL-1シグナルのネガティブフィードバックではなく、外界からのストレス等の刺激に直接応答している可能性が示唆された。

(2) 細胞におけるTarshの機能解析

MEFにレトロウイルスsiRNA発現ベクターを導入し、Tarshの発現量の変化を定量PCRで解析し、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) DAP3を一過性に過剰発現させたHela細胞を酸化ストレス刺激し、ストレス刺激後の発現低下の生理的意義（細胞周期の停止あるいは細胞死を防ぐ可能性との関連）を検証していく。

E. 結論

1) IL-1シグナル伝達経路がp38の活性化維持に関与しているのではないかと考えられた

2) TARSHが細胞老化のみならず個体老化に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられた。

3) DAP3が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機能（発現の減少）する事を意味している。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. 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 lymphocyte., FEBS Lett. 579, 1039-1046, (2005)
2. 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)

3. 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)
4. 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)
5. 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

(2) 学会発表

1. Maruyama M., Nishikimi A, Meller N, Uekawa N, Schwartz MA. "A novel lymphocyte-specific Cdc42 activator SPH 238 is identified as an X-linked Zizimin family, Zizimin2" The American Association of Immunologists meeting, San Diego, USA, 5 April. 2005
2. Wakoh T Murata Y, Uekawa N, Harada H, Miyazaki T, Maruyama M. "Characterization of apoptosis-related genes, DAP3 and BIM in cellular senescence." (Symposist) session/Aging science, a mirror reflecting the physiology and pathology (English Oral) The 78th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society. Kobe, (Oct. 20, 2005),
3. 浅井あづさ、上川奈都子、石川冬木、

丸山光生 : I型アレルギー反応における TERT の機能解析。第 28 回日本分子生物学会年会、2005 年 12 月 7-10 日、福岡

4. 村田洋子、上川奈都子、若生武、宮崎忠昭、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 28 回日本分子生物学会年会、2005 年 12 月 7-10 日、福岡
5. 上川奈都子、寺内邦彦、角田香澄、島田順一、丸山光生 : 機能未知分子 TARSH の MEF 細胞老化における発現とヒト肺癌との関連に関する研究。第 28 回日本分子生物学会年会、2005 年 12 月 7-10 日、福岡
6. 浅井あづさ、上川奈都子、若生武、丸山光生 : 加齢に伴う獲得免疫応答の低下における zizimin2 の機能解析。第 35 回日本免疫学会学術集会、2005 年 12 月 13-15 日、横浜
7. 上川奈都子、若生武、浅井あづさ、丸山光生 : ストレス応答性細胞老化における IL-1 ファミリー分子の機能解析。第 35 回日本免疫学会学術集会、2005 年 12 月 13-15 日、横浜

分担研究報告書
ストレス応答と生体反応
分担研究者 木内一壽
(岐阜大学工学部生命工学科、教授)

研究要旨：アミロイド β タンパク ($A\beta$) はアルツハイマー病の原因の一つと考えられており、その分解にはネプリライシン (neprilysin) が関与している。 $A\beta$ の蓄積には非常に長い期間がかかり、正常な脳では恒常的な $A\beta$ の分解が凝集を防いでいるものと思われる。いわゆる「まだら惚け」のような加齢に伴う認知症では、無自覚で軽微な梗塞が引き金となり、局所的に血流が低下した領域で hypoxia により 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と同様な神経変性を引き起こしている可能性が考えられる。昨年度は、神経系のヒト培養細胞株である SH-SY5Y の細胞表面上の neprilysin 酵素活性に及ぼす hypoxia の影響について解析を行い、5% O_2 で 24 時間、低酸素処理を施すと細胞表面の neprilysin 活性が対照群と比較して、70% に低下することを報告した。Thiorphan により阻害される neprilysin 様活性を有するペプチダーゼとしては neprilysin に加えて、neprilysin 2 (あるいは SEP) が知られている。上記の現象を解明することを目的とし、マウス neprilysin および neprilysin 2 cDNA をクローニングし、N-末端に Flag タグ、C-末端に c-Myc タグを付加できる発現ベクターに組み込み、安定発現細胞株の作製のための準備を進めた。また、HPLC-蛍光法を用いた neprilysin 簡易微量測定法をさらに改良し、脳組織のホモジェネートやスライス片を試料として、その酵素活性を測定する系を構築した。

A. 研究目的

慢性的な低酸素条件下での neprilysin 様活性を有するタンパク分子の細胞内の分布および細胞膜上での挙動を解析するため、neprilysin あるいは neprilysin 2 を安定して過剰発現している細胞株の作製を目的とすると共に、微量の脳組織や海馬スライス片を試料として酵素活性を測定できるよう、HPLC-蛍光測定法の改良を目的として研究を進めた。

B. 研究方法

1. Neprilysin と neprilysin 2 の発現ベクターの作製および一過性発現細胞での活性測定

Neprilysin および neprilysin 2 (分泌型と非分泌型) の各々の cDNA を pFLAG-

CMV-6 および pcDNA-Myc-His 発現用ベクターを用いて、各々の酵素の N 末端および末端にタグが付加されたタンパク質を発現させるためのコンストラクトを作製する。内在の酵素活性の低い C6 glioblastoma cells などの細胞株に導入し、Western blot で発現を確認し、その酵素活性を評価する。

2. Neprilysin 活性微量定量法の改良

各種プロテアーゼ阻害剤を含む試料調製用緩衝液にて海馬組織を懸濁し、硝子ホモゲナイザーにて試料を作製する。また、脳より海馬を取り出し組織チョッパーにて 220 μm 厚の組織片を作製する。人工基質として DAGPNG (dansyl-D-Ala-Gly-p-nitro-Phe-Gly) を用い、HPLC-蛍光

計測法にて生成物の DAG (dansyl-D-Ala-Gly) の蛍光強度を測定する。内部標準として DG (dansyl-Gly) を使用し、除タンパク・除脂質後、DAG と DG を測定試料として回収できる系を確立する。カラムにはイナトシール 3 ODS カラムを用い、移動相にはアセトニトリル系の溶媒を用いて分離能を検討する。生成した DAG の濃度は島津製作所の RF10AXL 蛍光分光光度計にて励起光 342 nm の条件で 562 nm の蛍光強度を測定することにより求める。Neprilysin 2 の酵素活性には人工基質として DAGPNG と Suc-Ala-Ala-Phe-amidomethylcoumarin とを用いて測定する。

C. 研究結果

1. Neprilysin と neprilysin 2 の発現ベクターの作製および一過性発現細胞での活性測定

マウス cDNA ライブラリーより、neprilysin および neprilysin 2 (分泌型と非分泌型の 2 種類) の cDNA をクローニングした。次いで、各々の cDNA の N 末端側に Flag、C 末端側に c-Myc タグを付加した発現ベクターを作製し、C6 glioblastoma cells にて一過性に発現させ酵素活性を測定したところ、Flag 付加は酵素活性に影響を及ぼさなかったが、c-Myc 付加は酵素活性を減少させることが明らかとなった。Western blot 法により、発現したタンパク質を確認することができた。一方、neprilysin 2 は DAGPNG を基質としないことから、慢性的低酸素状態での膜表在 neprilysin 様活性の減少には、少なくとも neprilysin 2 は関与していないことが示唆された。

2. Neprilysin 活性微量定量法

各種プロテアーゼ阻害剤を含む HEPES 緩衝液 (pH 7.4) を脳組織の 8 倍量用い

てホモジェネートを作製した。酵素反応後の溶液よりクロロフォルム・メタノールを用いた Bligh & Dyer 法にて三層に分離させると、水層に DAG と DG が同じ比率で大部分回収されることが分かった。海馬の場合、5 mg の組織片があれば、thiorphan 存在下、非存在下の条件で 2 回ずつ測定が可能であった。移動相には 0.05% トリフロロ酢酸を含む 40% アセトニトリルを用いると、HPLC のクロマトグラムとしては生成物 DAG の後に内部標準の DG が溶出されるが、用いた移動層では DG のピークと重なる未知の蛍光物質は存在しなかった。一回の測定は 20 分で終了するので測定時間を短縮することができた。一方、SD ラット (8 週齢) の海馬スライス (220 μm 厚) が 2 枚あれば neprilysin 活性の測定が可能であることが分かった。

病理検体として、糖尿病網膜症の硝子体中の neprilysin 活性を測定した。この試料の酵素活性は熱処理による除タンパクで HPLC に試料を注入できることが分かり、5 μl あれば十分に測定が可能であった。硝子体中の A β 量と neprilysin 様活性との間には負の相関関係があることを明らかにした。

D. 考察

我々が新規に開発した neprilysin 活性簡微量測定法をさらに改良し、ごく少量の脳組織のホモジェネートを試料として酵素活性を測定する系を確立した。感度の上では、培養細胞のホモジェネートを分画し、その中に含まれる neprilysin の酵素活性が測定可能である。また、海馬スライス片を用いた neprilysin 活性測定法が確立できたので、酵素活性に影響を及ぼす薬物の探索が可能となった。一方、タグを

付加した neprilysin および neprilysin 2 タンパク質の発現およびその酵素活性を確認することができた。細胞質側の N 末端側の挙動を Flag に対する抗体を、細胞マトリックス側の C 末端側の挙動を c-Myc に対する抗体を用いて蛍光標識することにより、慢性的低酸素状態における neprilysin および neprilysin 2 の細胞膜での挙動の分析が可能となった。さらに、その酵素活性の細胞内小器官における経時変化を測定し、慢性的低酸素状態における neprilysin の変動メカニズムについて解析していきたい。

E. 結論

本実験で作製した neprilysin および neprilysin2 の発現ベクターにより高発現安定株をクローニングすれば、慢性的低酸素状態における neprilysin および neprilysin 2 の細胞膜での挙動の分析が可能となることが分かった。改良した neprilysin 活性簡微量測定法は、neprilysin 活性に影響を及ぼす薬物のスクリーニングが可能ばかりでなく、本測定法を用いれば微量の病理検体を試料としてその酵素活性が測定できることを実証した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. 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.

2. Ito S, Sawada M, Haneda M, Fujii S, Oh-Hashi K, Kiuchi K, Takahashi M and Isobe K. Amyloid- β peptides induce cell proliferation and macrophage colony-stimulating factor expression via the PI3-kinase/Akt pathway in cultured Ra2 microglial cells. *FEBS Lett.* (2005) 579 (9), 1995-2000.

3. 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.

(2) 学会発表

大橋憲太郎、平田洋子、藤井 智、伊藤佐知子、磯部健一、木内一壽、cAMP による C6 glioma 細胞分化における新規 GRP78 結合タンパク質の役割、日本基礎老化学会第 28 回大会、6 月、東京

大橋憲太郎、平田洋子、兼山雅代、木内一壽、Calcium mobilization stimulates GDNF gene expression through MAP kinase pathways in rat C6 glioma cells、第 78 回日本生化学大会、10 月、神戸

平田洋子、伊東義真、大橋憲太郎、木内一壽、Erk activation contributes to the up-regulation of caspase-3 in manganese-induced apoptosis of PC12 cells、第 78 回日本生化学大会、10 月、神戸

鶴田忠実己、大橋憲太郎、上野義仁、北出幸夫、長田茂和、木内一壽、平田洋子、RNAi knockdown of caspase-activated DNase inhibits rotenone-induced DNA fragmentation in HeLa cells、第 78 回日本生化学大会、10

月、神戸

Hirata Y, Ito Y, Oh-hashii K, Nagatsu T and Kiuchi K, Erk activation contributes to the up-regulation of caspase-3 in manganese-induced apoptosis of PC12 cells, Society for Neuroscience, 35th Annual Meeting, Nov, Washington DC.

Tsuruta T, Oh-hashii K, Ueno Y, Kitade Y, Nagata S, Kiuchi K and Hirata Y, RNAi knockdown of caspase-activated DNase inhibits rotenone-induced DNA fragmentation in HeLa cells, Society for Neuroscience, 35th Annual Meeting, Nov, Washington DC.

分担研究者 林 登志雄
生体ストレス応答と動脈硬化、糖尿病に関する研究
名古屋大学大学院医学系研究科老年科学

研究要旨：

ストレスが細胞老化制御を介し動脈硬化発症進展に与える影響を検討した。糖尿病を念頭に加齢（閉経）についても検討した。

1) 老年病である動脈硬化進展病変での NO 保持療法—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。

Citrulline- Arginine cycle 活性化が重要で、抗酸化剤と相乗効果を示した。

2) 女性ホルモンの糖尿病合併心血管病抑制効果—高血糖負荷により低下した培養血管内皮機能を、女性ホルモンは NO 合成酵素の基質 BH4 の生成律速酵素 GTPCH-I に作用し改善した。作用はエストロゲン受容体導入により相乗的に増し、老化細胞に特に強かった。

3) 女性ホルモンは老化シグナル（telomerase 活性）を制御する—女性ホルモンと eNOS の作用を内皮細胞で検討し、2) の機序としても重要であった。

4) NO 代謝物は高齢者生命予後規定因子である—後期高齢者にて ROS を制御する NO 代謝物血中濃度が、アルブミンと並ぶ有用な clinical biomarker であった。

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た。

3) さらに従来生命予後指標としては albumin 等の栄養因子が重視されてきたが、代表的な老年病である動脈硬化症、糖尿病の病態に密接に関与

する内皮機能の関与を検討した。

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) β -gal 特異染色を種々の 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、NOx (NO_2^- と NO_3^- の和)、 O_2^- , eNOS の mRNA 及び蛋白、NADPH oxidase のような各種 O_2^- 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 3 年間フォローし自立度、認知機能、既往歴、一般所見、生化学検査、各種サイトカイン、内皮機能について検討した。

(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。SA beta-gal 染色も E2 処置により減少した。E2 受容体 α あるいは、eNOS の遺伝子導入により、hTERT 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、酸化ストレスが上昇していた。E2 は GTPCH-I 活性の上昇により、BH4 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。ER α 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) BNP 値は GpIII 群で高地、ノル

エピネフリン値は GpIV 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 α が低値の傾向にあった。cGMP は BNP 値に依存していた。..

. Mann-Whitney's U-test ではヘモグロビン、総蛋白、高感度 CRP、NO_x、IL-6、TNF α が有意に生存者と死者で異なっていた。多変量ロジスティック解析ではアルブミンと NO_x のみが有意で、NO_x は濃度依存性に生存率が変化した。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- β gal で検出された。17 β エストラジオール (E2) は hTERT を up-regulate し、 β 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こと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。

D. 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。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

(1) 論文発表

1: 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)

2: 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.

3: 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.

4: 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.

<分担研究報告書>

細菌産物による老化制御

分担研究者 長谷川忠男

(名古屋大学大学院医学系研究科分子病原細菌学助教授→
名古屋市立大学大学院医学研究科感染防御・制御学教授)

研究要旨：A 群レンサ球菌において ADP リボシル化活性を有する Nga 蛋白質は近年分離された株において発現、その機能ともに増強している株が存在する。その発現メカニズムの一つとして二成分制御系因子のひとつである CsrS のアミノ酸変異が関与することが明らかとなった。このことからヒトと細菌の間の相互に与えるストレスのネットワークが感染とそれに起因するストレスの蓄積、老化に与える可能性がある。

A. 研究目的

ヒトは様々なストレス刺激の積み重ねにより、細胞、個体レベルで不可逆的変化をきたし老化が進展すると考えられる。ストレス刺激として細菌などの微生物感染もそのひとつとして考えることができる。細菌感染における宿主の防御機構を考えた場合、免疫担当細胞より生ずるラジカルは細菌に対する強力な武器となるが、宿主そのものへの損傷を引き起こす可能性もある。ま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す。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存在する。この毒素は宿主の様々な蛋白質を ADP リボシル化し、その機能を阻害し、細胞レベル、ひいては個体レベルへのダメージを引き起こす。一方ヒトにおいてもポリ ADP リボシル化酵素ファミリーの存在が明らかにされ、ゲノムの安定性、転写レベルへの関与、生活習慣病とのかかわりが注目されてきている。以上のことを

総合的に考えると細菌から放出される ADP リボシル化酵素は、宿主への様々な損傷、その不可逆的な変化、老化の促進へと関連している可能性がある。昨年度の研究において A 群レンサ球菌における主たる ADP リボシル化酵素と考えられる Nga 蛋白質が近年発現、機能的に増強されている株の存在を示した。その発現変化のメカニズムを探求する目的で発現調節因子の遺伝学的解析を行った。さらに A 群レンサ球菌において酸化ストレスによって発現が増強するという特異な性質を有する毒素 SIC の機能的解析もあわせて行った。

B. 研究方法

分離時期、分泌蛋白質の二次元電気泳動プロファイルとパルスフィールドの結果に基づき A 群レンサ球菌 M1 臨床分離株を分類し、ゲノム株 SF370 と他 2 株 (グループ A)、1529 株と他 3 株 (グループ B)、GT01 株と他 5 株 (グループ C) の計 13 株につき解析した。SF370 株においてゲノムより推定される 13 種の二成分制御系遺伝子領域、主

要な制御因子をコードする *mga*, *rgg* 領域を PCR で増幅後、シーケンス解析を行った。ノックアウト株の作製は、まず遺伝子コード領域の大部分をスペクチノマイシン耐性カセットと置き換え、pFW12 ベクターに組み込んだ。次にこのベクターをエレクトロポレーション法で SF370 株、1529 株と GT01 株に導入し、相同組み換えを起こさせ、ノックアウト株を作製した。このノックアウト株を yeast extract を添加した brain heart infusion 液体培地で培養し、定常増殖期の培養上清蛋白質を二次元電気泳動法により分離し、各野生株とその発現プロファイルと比較した。次に酸化ストレスで発現が増強する毒素 SIC をコードする遺伝子のノックアウト株を作成し、種々の濃度のパラコート存在下で培養し、増殖を野生株と比較した。

C. 研究結果

シーケンス解析の結果、主要な発現制御因子、*Mga*, *Rgg* をコードする遺伝子に変異は見出されなかった。一方二成分制御系因子のひとつ *csrS-csrR* 領域について、グループ A の株においてはゲノム株 SF370 と比較して変異は認められなかったが、グループ B、C ともに *csrS* 遺伝子の同一部位に変異が見られ、これによるアミノ酸変異が確認された。また、グループ C の株ではさらに異なる場所に 1 ケ所以上の塩基の変異とそれに伴うアミノ酸変異が確認された。この 2 個以上のアミノ酸変異により *CsrS/CsrR* 系が破壊もしくは機能異常を示すためにグループ A、B とグループ C の株で培養上清蛋白質の発現パターンが大きく異なっていると考

えられた。*csrS* ノックアウト株を作製して行った二次元電気泳動法の結果は、SF370 株、1529 株においては野生型の発現プロファイルとは大きく異なり、*SpeB* の減少、*SIC* の増加というグループ C と類似した発現プロファイルとなった。GT01 株ノックアウトにおいても軽度ではあるが *SpeB* の減少と *SIC* の更なる増加が認められ、グループ A、B とグループ C の株の培養上清蛋白質の発現プロファイルの差異は *csrS* の塩基、アミノ酸変異とそれに伴う *CsrS* の機能変化が原因となっている可能性が示唆された。

次に酸化ストレスにより発現が大きく増強する毒素 *SIC* のノックアウト株を用いて、酸化ストレスとしてパラコート存在下で培養した実験では、ある濃度において野生株とノックアウト株の増殖に差が認められた。しかしその差は顕著ではなく *SIC* 以外の酸化ストレス応答機能が存在することが示された。

D. 考察

ADP リボシル化酵素活性を有する *Nga* 蛋白質の発現制御には二成分制御系因子が関連していることが示された。このことは A 群レンサ球菌において外界からなんらかのストレス刺激によって *Nga* 毒素蛋白質の発現が変化することを意味し、ヒトの細菌に与えるストレス、すなわち細菌に対する応答の差によって毒素蛋白質の発現が異なり、それがひいては逆にヒトに対する細菌からのストレスの変化につながると考えられる。したがって、細菌がどのようなヒトからのストレスを感知し、そのストレスが逆にヒトに与えるストレ

ス変動を生み出すというネットワークを明らかにしていくことが感染症とそれが起因するところの外的ストレスとその蓄積という概念の老化研究にとって重要である。

E. 結論

今後は二成分制御系がいかなるヒトの因子を感知するのか、また毒素蛋白質がいかなる宿主蛋白質へ関与するかを明らかにすることが重要である。すなわち毒素の培養細胞への直接添加、あるいは毒素蛋白質をコードする遺伝子を組み込んだ発現ベクターを培養細胞に遺伝子導入することにより、細胞にいかなる影響を及ぼすかを検討する。具体的には細胞からの活性酸素の産生の有無、程度、細胞の増殖の変化、死に至るか否か、死に至るとすればアポトーシスか否か、それに関連する遺伝子発現変動があるか否かを研究し、老化における外的ストレスとしての役割を検討する必要がある。

F. 健康危険情報 なし。

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. 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.

2. 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.

3. 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.

4. Kawamura-Sato K, Hiramata 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.

(2) 学会発表

1. 長谷川忠男、澤井潤、岡本陽、鳥居啓三、太田美智男

Streptococcus pyogenes の ADP リボシル化酵素活性を持つ毒素蛋白質の発現と機能に関する研究

第 78 回日本細菌学会総会 東京 平成 17 年 4 月

2. 岡本陽、長谷川忠男、澤井潤、鳥居啓三、太田美智男

翻訳後修飾酵素欠失変異株を用いた *Streptococcus pyogenes* におけるリポタンパク質輸送機構の解析

第 78 回日本細菌学会総会 東京 平成 17 年 4 月

3. 澤井潤、長谷川忠男、岡本陽、鳥居啓三、太田美智男

Streptococcus pyogenes の菌体外分泌毒