

厚生労働科学研究費補助金
長寿科学総合 研究事業

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 (H16 - 長寿 - 一般 - 004)

平成 18 年度 総括研究報告書

主任研究者 磯部 健一

平成 19 年 (2007) 3 月

目次

| | |
|-------------------------|----|
| I. 総括研究報告書 | 1 |
| II. 分担研究報告書 | |
| ストレス応答制御による老化制御 | 7 |
| ストレス応答制御による神経変性疾患予防 | 11 |
| 生体ストレス応答と動脈硬化、糖尿病に関する研究 | 15 |
| 免疫制御による脳変性疾患の予防 | 21 |
| 免疫系による老化制御 | 27 |
| ストレス応答と生体反応 | 31 |
| 細菌産物による老化制御 | 37 |
| マクロファージによる老化制御 | 41 |
| GDNF/RET系シグナルと神経変性疾患 | 47 |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 51 |
| IV. 研究成果の刊行物、別冊 | 53 |

<総括研究報告書>34

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。本年度は最終年度であり、これまでの研究をさらに発展させるとともに、生体本来の防御能を利用した老化制御、予防への可能性を探った。老化に伴って生じる変異分子として A β 1-42 は脳の自然免疫系細胞であるミクログリアを活性化させることを明らかにしてきたが、今年度は炎症反応で発現が上昇することが知られているマトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)を非常に強く産生させることを発見した。また、ALS の変異 SOD1 に結合し、老化様封入体（レビー小体等）に含まれるユビキチンである dorfin と HSP70 に結合することでユビキチン化に関与する CHIP の働きを明らかにし、dorfin-CHIP 融合蛋白が変異 SOD1 のユビキチン-プロテアソーム系を介し、分解する生体防御系の働きをすることを明らかにした。一酸化窒素(NO) ラジカルの動脈硬化への影響はまだあまり解析されていない。ウサギ血管内皮細胞の老化が hTERT 活性及び、SA- β gal で検出されることを示し、この活性は 17 β エストラジオール (E2) によって低下すること、すなわち女性ホルモンは血管内皮細胞の老化を抑制することを示した。NO 阻害剤でブロックすることから血管内皮細胞の老化には NO が抑制的に働くことを示した。

祖父江元 (名古屋大学大学院医学研究科、教授)

林 登志雄 (名古屋大学医学部、附属病院講師)

赤津裕康 (福祉村病院長寿医学研究所)

丸山光生 (国立長寿医療センター)

木内 一壽 (岐阜大学工学部 生命工学科、教授)

長谷川忠男 (名古屋市立大学大学院医学研究科、教授)

長瀬文彦 (名古屋大学医学部、保健学科、教授)

高橋雅英 (名古屋大学大学院医学研究科、教授)

A. 研究目的

急速な高齢化に伴い、高齢者がいかに活動的な生活をおくれるかは差し迫った課題である。私達は老化のメカニズムの基礎的研究を通し、生体は老化を防御する仕組みをあらかじめ持っていることを明らかにして来た。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。本研究においては生体防御系を広く捉え、刺激に対する生体応答

が病気にいかに関与するか、さらにうまく生体応答、防御系を活性化させることで、病気の発症を押さえることを将来的な目的としている。

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) 生体防御系とアルツハイマー病

老化にともなって産生が上昇するペプチド

A β (特にA β 1-42はアルツハイマー病の中心的役割を担うことが報告されている。磯部はマウス初代培養ミクログリアとミクログリア株を使用し、マクロファージ系細胞のアルツハイマー病における役割を検討した。組織マクロファージは炎症反応で様々なマトリックスメタプロテアーゼ(MMPs)を産生することが知られている。A β 1-42はMMP3, MMP12, MMP13を強く産生すること、このシグナル伝達系はPI3/Aktを介することを示した。赤津はアルツハイマー病凍結脳を使用し、海馬での発現遺伝子の差異を示すことができ、また未知のスプライシング制御蛋白であるp18SRPがアルツハイマー病脳では発現低下が見られる点を発見した。

(2) 変異蛋白のユビキチン化と神経変性疾患

ポリグルタミン病、アルツハイマー病、ALS、パーキンソ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る。異常蛋白がユビキチン化し、プロテアゾームにより分解されることが異常蛋白の蓄積を防御する可能性を異常蛋白SOD1の蓄積するALSをモデルに異常SOD1に結合するdofinとCHIPの働きを調べた。その結果これらの融合蛋白は異常SOD1をユビキチン化し、プロテアゾームにより分解することを明らかにした。

(3) ストレスと動脈硬化 ; 酸化ストレス(ROS)がLDLを酸化し、スカベンジャー受容体を介し、マクロファージを活性化させ、自然免疫系が動脈硬化の病態形成に関与することは広く知られている。しかし、一酸化

窒素(NO)ラジカルの動脈硬化への影響はまだあまり解析されていない。林は高脂肪食により動脈硬化を発症させるウサギモデルでNOの動脈硬化病変への関与を検索した。ウサギ血管内皮細胞の老化がhTERT活性及び、SA- β galで検出されることを示し、この活性は17 β エストラジオール(E2)によって低下すること、すなわち女性ホルモンは血管内皮細胞の老化を抑制することを示した。NO阻害剤でブロックすることから血管内皮細胞の老化にはNOが抑制的に働くことを示した。

その他

この研究に関連する他の班員の成果は分担研究者の項を参照されたい。

D. 考察

生体防御系とアルツハイマー病

老化に伴って発現が上昇するA β に対して自然免疫系のミクログリアが反応し、MMPsを産生することは、A β によって損傷を受けた脳組織がMMPsにより分解され、ミクログリアあるいはマクロファージにより貪食されやすくなると考えられる。このことは、間接リウマチ等自己免疫疾患でMMPsが上昇するのは病態を形成すると同時にその後のマクロファージの貪食による壊された組織の掃除に役立つことに対応すると考えられる。

変異蛋白のユビキチン化と神経変性疾患

変異蛋白に対する細胞内の応答はHSPに代表される。HSPに結合するCHIPは変異蛋白をユビキチン化し、プロテアゾームにより分解することが、すでにパーキンソン病で知られているが我々はALSの変異SOD1でも見られる

こと、ユビキチン化蛋白Dorfinとの融合蛋白はより強く変異SOD1をユビキチン化し、分解することを示した。生体の防御能を利用した老化制御、老化予防に結びつくと考えられる。

ストレスと動脈硬化

活性酸素 (ROS) は動脈硬化を促進するストレスとして知られている。一方血管内皮細胞から放出されるNOは動脈硬化を抑制することを明らかにしてきた。今年度はこれを発展させ、血管の老化が女性ホルモンによって抑制されること、NO によって抑制されることを示した。

E. 結論

1) アルツハイマー病の病態形成にマクローファージ系細胞ミクログリアが関与することが想像されていた。Ab 刺激で、ミクログリアが MMPs を発現することを見いだした。

2) ALS の発症に関与する変異 SOD1 は Dorfin、CHIP あるいはその融合蛋白でユビキチン化され、プロテアゾームにより分解される。

3) 女性ホルモン、NO ラジカルは活性酸素とは逆に血管の老化抑制作用を持つ。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

この研究班では数多くの論文が発表されたが、ここでは代表的な論文のみ列挙する。

(1) 論文発表

1. Ito S, Kimura K, Haneda M, Ishida Y, Sawada M, Isobe KI. Induction of Matrix metalloproteinases (MMP3, MMP12 and MMP13) expression in the microglia by amyloid-b stimulation via the PI3K/Akt pathways Exp. Gerontology in press.
2. Ito S, Sawada M, Haneda M, Ishida Y, Isobe KI. Amyloid-beta peptides induce several chemokine mRNA expressions in the primary microglia and Ra2 cell line via the PI3K/Akt and/or ERK pathway. Neurosci Res. 2006 Nov;56(3):294-9.
3. Ishigaki S, Niwa JI, Yamada SI, Takahashi M, Ito T, Sone J, Doyu M, Urano F, Sobue G. Dorfin-CHIP chimeric proteins potently ubiquitylate and degrade familial ALS-related mutant sod1 proteins and reduce their cellular toxicity. Neurobiol Dis. In press.
4. Katsuno M, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Tokui K, Banno H, Suzuki K, Onoda Y, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Reversible disruption of dynactin 1-mediated retrograde axonal transport in polyglutamine-induced motor neuron degeneration. J Neurosci. 2006 Nov 22;26(47):12106-17.
5. Yamada S, Niwa J, Ishigaki S, Takahashi M, Ito T, Sone J, Doyu M, Sobue G. Archaeal proteasomes effectively degrade aggregation-prone proteins and reduce cellular toxicities in mammalian cells. J Biol Chem. 2006 Aug 18;281(33):23842-51.
6. Uchida, M., Enomoto, A., Fukuda, T., Kurokawa, K., Maeda, K., Kodama, Y., Asai,

- N., Hasegawa, T., Shimono, Y., Jijiwa, M., Ichihara, M., Murakumo, Y. and Takahashi, M. Dok-4 regulates GDNF-dependent neurite outgrowth through downstream activation of Rap1 and mitogen-activated protein kinase. *J. Cell Sci.* 119: 3067-3077 (2006).
7. Asai, N., Fukuda, T., Wu, Z., Enomoto, A., Pachnis, V., Takahashi, M. and Costantini, F. Targeted mutation of serine 697 in the Ret tyrosine kinase causes migration defect of enteric neural crest cells. *Development* 133: 4507-4516 (2006).
8. Heese K, Akatsu H. Alzheimer's disease--an interactive perspective. *Curr Alzheimer Res.* 2006 Apr;3(2):109-21.
9. Akatsu H, Yamagata H.D, Kawamata J, Kamino K, Takeda M, Yamamoto T, Miki T, Tooyama I, Shimohama S, Kosaka K. Variations in the BDNF Gene in Autopsy-Confirmed Alzheimer's Disease and Dementia with Lewy Bodies in Japan *Dement Geriatr Cogn Disord* 2006;22:216-222
10. Murata Y, Wakoh T, Uekawa N, Sugimoto M, Asai A, Miyazaki T, Maruyama M. Death-associated protein 3 regulates cellular senescence through oxidative stress response. *FEBS Lett.* 580: 6093-6099, 2006.
11. 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*, 78, 2444-2448, 2006.
12. Oh-hashii K, Kaneyama M, Hirata Y, Kiuchi K. ER calcium discharge stimulates GDNF gene expression through MAPK-dependent and -independent pathways in rat C6 glioblastoma cells. *Neurosci Lett.* 2006 Sep 11;405(1-2):100-5.
13. Hirata Y, Meguro T, Kiuchi K. Differential effect of nerve growth factor on dopaminergic neurotoxin-induced apoptosis. *J Neurochem.* 2006 Oct;99(2):416-25.
14. Hayashi T, Matsui-Hirai H, Miyazaki-Akita A, Fukatsu A, Funami J, Ding QF, Kamalanathan S, Hattori Y, Ignarro LJ, Iguchi A. Endothelial cellular senescence is inhibited by nitric oxide: implications in atherosclerosis associated with menopause and diabetes.
15. 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.* 2006;187:316-24.
16. Vassileva M, Torii K, Oshimoto M, Okamoto A, Agata N, Yamada K, Hasegawa T, Ohta M. Phylogenetic analysis of *Bacillus cereus* isolates from severe systemic infections using multilocus sequence typing scheme. *Microbiol Immunol.* 2006; 50:743-749.

<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（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 β 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に A β 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、今年度はマトリックスメタロプロテアーゼ産生とそのシグナル伝達系を詳細に検討した。その結果、A β 1-42 は MMP3, MMP12, MMP13 の発現を著しく増加させること、PI3/Akt 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 β 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*で神経細胞、ミクログリア、アストログリア細胞をマウスより分離培養した。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

A β 1-40(A β 40)、A β 1-42(A β 42)を培養細胞に加え、刺激後、各時間の細胞を取り出し、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。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

組織マクロファージは炎症反応で様々なマトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)を産生することが知られている。今年度はA β 刺激によるMMPs産生を網羅的に調べ、その結果上昇するものに関して詳細な検討を加えた。

(1) A β 4 2 刺激によりMMP3、MMP12、MMP13 のmRNAの発現

Ra2細胞をA β 4 2 刺激後、Array解析によりMMP1a からMMP24 まで、また、TIMP1 からTIMP4 までmRNAの発現を調べたところ、MMP2, MMP3, MMP8, MMP9, MMP12, MMP13, MMP20 の発現に変化が見られたため、Real Time PCR によって詳細に解析した。その結果、MMP3, MMP12, MMP13 の強い発現上昇が見られた。これらの発現を初代培養細胞をA β 4 2 刺激でして調べたところ、MMP3 発現はアストロサイトとニューロンでも上昇したが、MMP12, MMP13 はミクログリアのみで上昇した。

(2) A β 4 2 刺激によるMMP3、MMP12、MMP13 発現のシグナル伝達系

各種抑制剤でA β 4 2 刺激からMMP3、MMP12、MMP13の発現が抑制されるか否か検索した。その結果共通のシグナル伝達系カスケードにPI3K/Aktが関与することが判明した。Western blot でAktのリン酸化がA β 4 2 刺激で上昇すること

を確認した。

(3) MMP蛋白の発現

最後にMMPの発現を蛋白レベルで調べるため、MMP3, MMP12に対するwestern blottingを行った所、A β 4 2 刺激で上昇が見られた。

D. 考察

老化に伴い発現が上昇するA β 1-42はマトリックスプロテアーゼのうち、MMP3, MMP12, MMP13発現を強く誘導することが判明した。臨床的にはこれまでADでMMP1, MMP3, MMP9が上昇すること [Leake et al.,2000; Yoshiyama et al.2000,; Yoshiyama et al.,1998 ; Asahina et al.,2001; Lorenz et al.,2003]. フィンランドの仕事でMMP3*5A and APOE 4を持つとADのリスクが高まること [Saarela et al.,2004]、日本のADではMMP3, MMP9の家系との相関は見当たらないことが報告されている [Shibata et al.,2005]。

E. 結論

- 1) A β 1-42 はミクログリアのMMP3, MMP12, MMP13の発現を著しく増加させた。
- 2) P13/Aktの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

論文発表

Ito S, Kimura K, Haneda M, Ishida Y, Sawada

M , Isobe KI. Induction of Matrix metalloproteinases (MMP3, MMP12 and MMP13) expression in the microglia by amyloid- β stimulation via the PI3K/Akt pathways Exp. Gerontology in press.

Ito S, Sawada M, Haneda M, Ishida Y, Isobe KI. Amyloid-beta peptides induce several chemokine mRNA expressions in the primary microglia and Ra2 cell line via the PI3K/Akt and/or ERK pathway. Neurosci Res. 2006 Nov;56(3):294-9.

Kato M, Takeda K, Kawamoto Y, Tsuzuki T, Kato Y, Ohno T, Hossain K, Iftakhar-E-Khuda I, Ohgami N, Isobe K, Takahashi M, Nakashima I. Novel Hairless RET-Transgenic Mouse Line with Melanocytic Nevi and Anagen Hair Follicles. J Invest Dermatol. 2006;126(11):2547-50.

Nakai S, Matsunaga W, Isobe K, Shirokawa T. Age-dependent interactive changes in serotonergic and noradrenergic cortical axon terminals in F344 rats. Neurosci Res. 2006;54(3):220-229.

Nakai S, Matsunaga W, Ishida Y, Isobe K, Shirokawa T. Effects of BDNF infusion on the axon terminals of locus coeruleus neurons of aging rats. Neurosci Res. 2006;54(3):213-9.

Matsunaga W, Isobe K, Shirokawa T. Involvement of neurotrophic factors in aging of noradrenergic innervations in hippocampus and frontal cortex. Neurosci Res. 2006 54(4):313-8.

Takeda K, Kawamoto Y, Okuno Y, Kato M, Takahashi M, Suzuki H, Isobe K, Nakashima I. A PKC-mediated backup mechanism of the MXXCW motif-linked switch for initiating tyrosine kinase activities. FEBS Lett. 2006;6;580(3):839-43.

Isobe K, Ito S, Haneda M, Ishida Y. Cellular and systemic defense system against age-promoting stimuli. Nagoya J Med Sci. 2006;68(1-2):9-18.

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

(2) 学会発表

1. 伊藤佐知子、羽根田正隆、石田佳幸、磯部健一 A- β によるミクログリアからの matrix metalloproteinases(MMPs)の産生第29回日本基礎老化学会 2006. 6.16

2. ISHIDA Yoshiyuki, MIZUNO Daiki, ITO Sachiko, HANEDA Masataka, ISOBE Ken-ichi. The immunohistochemical study of B cell differentiation in the bone marrow with age. 第30回日本免疫学会総会2006.12.

<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、パーキンソン病、ALS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。本年度は異常蛋白がユビキチン化し、プロテアソームにより分解されることが異常蛋白の蓄積を防御する可能性を異常蛋白SOD1の蓄積するALSをモデルに異常SOD1に結合するdorfinとCHIPの働きを調べた。その結果これらの融合蛋白は異常SOD1をユビキチン化し、プロテアソームにより分解することを明らかにした。

A. 研究目的

ポリグルタミン病、アルツハイマー病、ALS、パーキンソ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。昨年までポリグルタミン病をモデルとして、老化に伴う異常蛋白の蓄積に対する生体応答を研究してきた。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。これまで、1) 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2) HSP90阻害剤17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin(17-AAG)はCAGリピート数を減少させることを示した。分子シャペロンには、構造が変異したターゲット蛋白をrefol

ding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。本年度はE3ユビキチンであるDorfinとCHIPの神経変性疾患に対する役割を検索した。

B. 研究方法

(1) 遺伝子細胞移入実験

HEK293あるいはNuero2A細胞にFlag-tag dorfin, Flag-tag CHIPを遺伝子移入し、24-48時間後に実験に使用した。

(2) 蛋白の安定性

³⁵Sでtagがついた遺伝子を移入した細胞をpulse labelし、導入遺伝子産物の安定性をその発現蛋白解析で検索した。(3)ユビキチン化の測定

HA-UBを変異SOD1、dorfin, CHIPとともに遺伝子移入し、HAに対する抗体でwestern

blotting し、ユビキチン化を測定した。

研究結果

(1) Dorfin は変異 SOD1 と結合する。

Dorfin の C 末は変異 SOD1 と結合することが知られている。免疫共沈法で Dorfin の hydrophobic な領域 333-454 が SOD1(G85R) と結合することが分かった。それで Dorfin と変異 SOD1 の

double transgenic マウスを作製し、SOD1 の分解を調べたがあまり変化は認められなかった。それで Flag-Dorfin を移入した細胞を ³⁵S でラベルし、Dorfin の自己分解能を調べたところ、Dorfin はそれ自身が分解されやすいことが判明した。

(2) Dorfin-CHIP 融合蛋白は自己分解しにくい。

HSP70 に結合する CHIP 蛋白の C 末は U-box を持ち E3 ユビキチン活性を持つ。それで Dorfin の hydrophobic な領域 333-454 と CHIP の U-box を結合させた遺伝子を細胞移入し、自己分解能を調べた所、分解される時間が大幅に延長した。

(3) Dorfin-CHIP 融合蛋白は変異 SOD1 をユビキチン化する。

免疫共沈法で Dorfin-CHIP 融合蛋白は変異 SOD1 に結合することがわかった。

次に Dorfin、CHIP 単独あるいは融合蛋白のユビキチン化を測定したところ Dorfin-CHIP 融合蛋白は変異 SOD1 を強くユビキチン化することがわかった。

D. 考察

変異 SOD1 をユビキチン化する蛋白はこれ

まで Dorfin が知られていた。一方 CHIP は HSP70 を介して変異 SOD1 に結合し、ユビキチン化することで変異 SOD1 を分解することが分かっている。今回はそれを確認し、よりユビキチン活性の強い融合蛋白を作製することに成功した。

Dorfin はレビー小体、ALS のレビー小体様の封入体に含まれており、Dorfin は変異蛋白をユビキチン化し、分解することで、生体防御に関与していると考えられる。

E. 結論

変異 SOD1 は ALS の原因として知られている。本研究は変異 SOD1 をユビキチン・プロテアソームシステムと連携して分解する Dorfin-CHIP とその融合蛋白を明らかにした。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

(1) 論文発表

(1) Ishigaki S, Niwa JI, Yamada SI, Takahashi M, Ito T, Sone J, Doyu M, Urano F, Sobue G.

Dorfin-CHIP chimeric proteins potently ubiquitylate and degrade familial ALS-related mutant sod1 proteins and reduce their cellular toxicity.

Neurobiol Dis. In press

(2) Katsuno M, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Tokui K, Banno H, Suzuki K, Onoda Y, Tanaka F, Doyu M, Sobue

G.Reversible disruption of dynactin 1-mediated retrograde axonal transport in polyglutamine-induced motor neuron degeneration. J Neurosci. 2006 Nov 22;26(47):12106-17.

(3) Yamada S, Niwa J, Ishigaki S, Takahashi M, Ito T, Sone J, Doyu M, Sobue G. Archaeal proteasomes effectively degrade aggregation-prone proteins and reduce cellular toxicities in mammalian cells. J Biol Chem. 2006 Aug 18;281(33):23842-51.

<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 α 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与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 α 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) β -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_x (NO₂-と NO₃-の和), O₂⁻, eNOS の mRNA 及び蛋白、NADPH oxidase のような各種 O₂⁻ 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 α 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、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。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。ERα 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 TNFα 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- 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。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ある。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

Hayashi T, Juliet PA, Miyazaki A, Ignarro LJ, Iguchi A. High glucose downregulates the number of caveolae in monocytes through oxidative stress from NADPH oxidase: Implications for atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Dec 8; [Epub ahead of print]

Hayashi T, Juliet PA, Miyazaki-Akita A, Funami J, Matsui-Hirai H, Fukatsu A, Iguchi A. beta1 antagonist and beta2 agonist, celiprolol, restores the impaired endothelial dependent and independent responses and decreased TNFalpha in rat with type II diabetes.

Life Sci. 2007 Jan 16;80(6):592-9.

Miyazaki-Akita A, Hayashi T, Ding QF, Shiraishi H, Nomura T, Hattori Y, Iguchi A. 17beta-estradiol antagonizes the down-regulation of endothelial nitric-oxide synthase and GTP cyclohydrolase I by high glucose: relevance to postmenopausal diabetic cardiovascular disease. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007 Feb;320(2):591-8.

Hayashi T, Matsui-Hirai H, Miyazaki-Akita A, Fukatsu A, Funami J, Ding QF,

Kamalanathan S, Hattori Y, Ignarro LJ, Iguchi A. Endothelial cellular senescence is inhibited by nitric oxide: implications in atherosclerosis associated with menopause and diabetes.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Nov 7;103(45):17018-23.

Osawa M, Hayashi T, Nomura H, Funami J, Miyazaki A, Ignarro LJ, Iguchi A. Nitric oxide (NO) is a new clinical biomarker of survival in the elderly patients and its efficacy might be nearly equal to albumin.

Nitric Oxide. 2007 Feb;16(1):157-63.

7: Hayashi T, Esaki T, Sumi D, Mukherjee T, Iguchi A, Chaudhuri G. Modulating role of estradiol on arginase II expression in hyperlipidemic rabbits as an atheroprotective mechanism.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Jul 5;103(27):10485-90.

9: 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. 2006 Aug;187(2):316-24.

(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, b1 antagonist, b2 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 α , or NO is important

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

Hayashi T, Osawa 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 3rd International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide 5月24-28日 奈良

Symposium-13th 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 β 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 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

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 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 7th Asia/Oceania Regional Congress
of Gerontology 11月24-28日 東京

Hayashi T, Osawa M, Koda17a M, Iguchi A.
Usefulness of exercise tolerance test in
elderly for the prevention and management
of ischemic coronary artery disease.

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り、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、パーキンソン病とこれらストレス因子と神経の老化を防御する方策を見い出す。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、特に多い認知症等、神経変性疾患も同様な仕組みが存在すると考えている。脳動脈硬化、アルツハイマー、パーキンソン病は遺伝的な背景の違いで老化に伴う病態進行が異なるとも考えられる。その観点より、我々の用いるヒト

サンプルの遺伝的背景を検索することに焦点を絞って研究を進めた。

特に2006年は補体C3a, C5aを不活性化するcarboxypeptidase R;CPRや脂質解析を精力的に行った。

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；