

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 16 ～ 18 年度 総合研究報告書

主任研究者 磯部 健一

平成 19 年 (2007) 3 月

## 目次

I. 総合研究報告書	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	17
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	29
ストレス応答と生体反応	37
細菌産物による老化制御	45
マクロファージによる老化制御	51
GDNF/RET系シグナルと神経変性疾患	55
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	63
IV. 研究成果の刊行物、別冊	65

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。ストレス応答に関する細胞の応答に関連する様々な成果が得られた。その中で、老化制御、老化予防に関連するものを中心にここではまとめ、より詳細な研究結果は分担研究者の成果にまとめて述べる。老化に伴って現れてくる変異成分は細胞レベルでストレス応答を引き起こす。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  $A\beta$  は 1) M-CSF を産生させ、ミクログリアをより分化増殖させること、2) 活性化されたミクログリアはマクロファージ系のケモカイン (CCL2, CCL3, CCL4, CCL7) を産生し、さらにミクログリアを呼び寄せること、3) マトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) を産生することを見いだした。このことは  $A\beta$  に反応するミクログリアが病態形成に関与すると同時に  $A\beta$  や死滅神経細胞を掃除していることを示唆する。ポリグルタミン病で CAG リピートが核内等に蓄積して発症するが、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。ポリグルタミン病モデルマウスに 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。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。NO を NOS 経路で産生させる L-アルギニンと L-シトルニンを単独であるいは抗酸化剤である VitC、E とともに投与すると、L-アルギニンと L-シトルニンを投与されたものは血管の動脈硬化病変が抑制され、L-アルギニンと L-シトルニンと抗酸化剤同時に投与されたものはさらに抑制を受けた。

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、老化を促進するストレス刺激によって老化が蓄積されること、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。本研究は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。すなわち老化を進行させるストレス刺激(放射線、紫外線、薬物)活性酸素は生体成分を酸化し、生体にストレス応答を誘起し、老化という負の傷を残す一方、生体は傷を修復している。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、凝集体が病態形成に関与していることが明らかになってきた。異常蛋白、凝集体として蓄積したものは細胞内のプロテアゾームで分解される一方で、分泌された凝集体(例えば A $\beta$ )はマクロファージ系の細胞(ミクログリア)を活性化し、広義の免疫反応がおきる。この場合免疫細胞は病態形成に働くと同時に、傷ついた脳組織や A $\beta$ を貪食し、生体防御に関与すると考えられる。このように細胞の持つ病態形成能と防御能を明らかにすることは老化、老年病の制御、予防に結びつくと考えられる。

#### 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たりして使用した。

##### (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. D 研究結果と考察

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 $\beta$  (特にA $\beta$ 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、A $\beta$ 1-42がこれらの細胞から M-CSFを産生させ、ミクログリアをより分化増殖させること、その経路はPI3-kinase/Akt/Nf $\kappa$ Bシグナル伝達系を介することを明らかにした (FEBES Lett 2005)。活性化されたミクログリアはマクロファージ系のケモカイン (CCL2,CCL3,CCL4,CCL7) を産生し、さらにミクログリアを呼び寄せることが明らかになった。これらケモカインの発現はPI3-kinase/Aktに加えErkシグナル伝達系を介することを明らかにした (Neurosci Res 2006)。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。A $\beta$ 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 (Exp Gerontology in press)。A $\beta$

(特に老化や遺伝的背景によって産生が上昇するA $\beta$ 1-42) はサイトカインを産生して局所の炎症性病変を形成する時、同時にMMPsを産生し、脳組織の細胞外成分を切断することで、老人斑等の形成に関与すると予想される。木内は微量のneprilysinを測定する系を開発し、低酸素培養ではneprilysin活性が低下し、Ab 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示した。赤津はアルツハイマー病凍結脳より得た遺伝子を用いてcDNAライブラリーを作成し、サブトラクション法にてアルツハイマー病脳と正常加齢脳との間での遺伝子発現解析を行った。その結果、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ことを発見した。グリア細胞は炎症を誘起し、病態形成に関与するばかりでなく、GDNFといった増殖因子を出すことで、神経細胞の生存に関与している。高橋はGDNF による神経細胞のシグナル伝達系を研究し、神経突起の伸長に関与する新しい分子Girdinを見いだした (Dev Cell 2005)。

2) CAGリピート病とストレス応答; 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。これは異常蛋白の核内蓄積によって説明される。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。これらは異常

蛋白の核内封入体として組織学的に観察されることを示した (Brain 2005) 。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 (Nat Med 2005; PNAS 2005, J. Mol Med 2006)。(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。NOをNOS経路で産生させるL-アルギニンとL-シトルニンを単独あるいは抗酸化剤であるVitC、Eとともに投与すると、L-アルギニンとL-シトルニンを投与されたものは血管の動脈硬化病変が抑制され、L-アルギニンとL-シトルニンと抗酸化剤同時に投与されたものはさらに抑制を受けた。スーパーオキシド産生もこれらの投与で抑制されたことから、NOは抗酸化作用を持つという結

論に達した (PNAS 2005)。さらにウサギ血管内皮細胞の老化がhTERT活性及び、SA- $\beta$ galにて検出されることを示し、この活性は17 $\beta$ 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 (PNAS 2006)。(4) その他;長瀬はミクログリアを含むマクロファージ系細胞が老化に伴い、indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)の発現が増加することに着目し、骨髄由来樹状細胞の刺激によるIDO産生とその産物キヌレニンを測定した。すると、活性化された樹状細胞はIDO 発現を上げ、キヌレニン産生を上昇させるが、同時に産生されるNO ラジカルがIDO 発現を上げることで、フィードバック機構が関与することが示唆された。IDO産物キヌレニンは活性化ミクログリアから産生され神経細胞死に関与することが示唆されているが、その産生がNOによって抑制されている可能性がある。

#### E. 結論

私たちはストレスに対する生体応答と老化、老年病を解析してきた。本研究は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つた。この研究を通して、ストレスに対する、細胞内の防御機構、自然免疫系細胞に属するマクロファージ、ミクログリアが病気の発症を防御するとともに、その働きの過程でアルツハイマーの老人班で代表

されるような病変をつくり出すことが明らかになってきた。特に以下の3点はこの研究目的に密接に関連した発見である。

1) アルツハイマー病の病態形成にマクロ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。A $\beta$  刺激で、ミクログリアがサイトカイン、ケモカイン、MMPs を発現することを見いだした。

2) CAG リピート病に Hsp70 や Hsp40 といった抗ストレス分子シャペロンが関与する。

3) NO ラジカルは活性酸素とは逆に動脈硬化抑制作用を持つ。

#### 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

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 microglial cells. *FEBS Lett.* 2005 Mar 28;579(9):1995-2000.

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.

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.

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.

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.

Enomoto A, Murakami H, Asai N, Morone N, Watanabe T, Kawai K, Murakumo Y, Usukura J, Kaibuchi K, Takahashi M. Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE. *Dev Cell.* 2005 Sep;9(3):389-402.

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.

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.



## <総合分担研究報告書>

### 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：

アルツハイマー病は A $\beta$ が針のような集合体を形成して神経細胞を傷害することで病態形成がなされる。一方、アルツハイマー病の老人斑には A $\beta$ の周りにミクログリアの集積が見られることが知られている。本分担研究としては老化に伴って発現が上昇し、アルツハイマー病を誘起するとされる A $\beta$ ペプチドに対する細胞レベルの応答を脳其自然免疫系細胞であるミクログリアで解析し、アルツハイマー病が免疫系、生体防御系といかにかかわり、その発症予防に生体防御系を活かす方策を検討した。その結果 1) A $\beta$ はミクログリアを活性化させ、M-CSF を分泌させる。M-CSF はミクログリアをよりマクロファージ様に分化増殖させる。2) A $\beta$ 1-42 はミクログリアからマクロファージ系ケモカインを産生させ、病変部にさらにミクログリアを集積させる。3) A $\beta$ 1-42 はミクログリアからマトリックスメタロプロテアーゼ MMP3, MMP12, MMP13 の発現を著しく増加させ、傷害組織の蛋白の分解を促進する。ことを明らかにした。アルツハイマー病は A $\beta$ 1-42 をより多く産生することが分かっている。また、正常老化に伴って、A $\beta$ 産生が上昇することも知られている。正常個体では A $\beta$ は脳の中で異物としてミクログリア細胞に認識され、排除されているものと考えられる。

#### A. 研究目的

アルツハイマー病はA $\beta$ が針のような集合体を形成して神経細胞を傷害することからはじまることがほぼ明らかになっている。アルツハイマー病の老人斑にはA $\beta$ の周りにミクログリアの集積が見られることが知られている。このことはミクログリアが結核菌等細菌感染においてマクロファージが細菌の周辺に集まり、貪食等でそれらを排除しようとする過程と類似している。すなわち、A $\beta$ はマクロファージ系細胞であるミクログリアをA $\beta$ や、A $\beta$ によって傷害された脳細胞の周囲に集め、貪食

や、分解酵素を分泌して掃除している可能性がある。本分担研究としては老化に伴って発現が上昇し、アルツハイマー病を誘起するとされるA $\beta$ ペプチドに対する細胞レベルの応答を脳其自然免疫系細胞であるミクログリアで解析し、アルツハイマー病が免疫系、生体防御系といかにかかわり、その発症予防に生体防御系を活かす方策を検討した。

#### 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、

マイクログリア、アストログリア細胞をマウスより分離培養した。また、マウスのマイクログリア株はRa2（沢田教授と共同研究）を使用した。

（2）A $\beta$ によるマイ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 $\beta$ 1-40(A $\beta$ 40).A $\beta$ 1-42(A $\beta$ 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。また、発現蛋白の解析はウェスタンブロット法で行った。

（3）A $\beta$ 刺激によりマイクログリアで発現する遺伝子の網羅的解析

Ra2細胞培養液にA $\beta$ ペプチドを加え、16時間後RNAを抽出し、発現遺伝子をmicroarray法で網羅的に検索した。

（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、A $\beta$ はマイクログリアを活性化させ、M-CSFを分泌させた。

A $\beta$ はマイクログリア細胞株Ra2を増殖させ、その増殖活性は抗M-CSF抗体によってブロックされたことからRa2から産生されるM-CSFによることが判明した。増殖の強さ、M-CSF産生はA $\beta$ 1-42が最も強かったがA $\beta$ 25-35もその活性を持った。M-CSF産生は初代培養アスト

ロサイトで恒常的に見られたが、初代培養マイクログリアではA $\beta$ 1-42刺激で産生量が増加した。神経細胞には見られなかった。種々のシグナル伝達系阻害剤を使用した実験からM-CSF産生はPI3/AktからNF $\kappa$ B経路を介することが判明した。

2、A $\beta$ はマイクログリアを活性化させ、マクロファージ系ケモカインCCL2,CCL3,CCL4,CCL7を発現させた。

Ra2あるいは初代培養マイクログリアを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Ab25-35でも見られたが、Ab1-40ではほとんど見られなかった。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PI3K/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PI3K/Akt経路のみを介することが判明した。

3、A $\beta$ はマイクログリアを活性化させ、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs) MMP3、MMP12、MMP13を産生した。

Ra2細胞をA $\beta$ 1-42刺激後、Array解析によりMMP1aからMMP24まで、また、TIMP1からTIMP4までmRNAの発現を調べると、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 $\beta$ 1-42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。種々のシグナル伝達系阻害剤を使用した実験から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。

4、A $\beta$ はミクログリアを活性化させ、マクロファージ系細胞が産生する様々なmRNAを産生した。

A $\beta$ によって刺激されたミクログリア細胞株Ra2はケモカイン、マトリックスメタロプロテアーゼを始めマクロファージ系細胞が産生する様々なRNAを産生した。

#### D. 考察

アルツハイマー病はA $\beta$ 1-42をより多く産生することが分かっている。また、正常老化に伴って、A $\beta$ 産生が上昇することも知られている。正常個体ではA $\beta$ は脳の中で異物としてミクログリア細胞に認識され、排除されているものと考えられる。本研究ではミクログリア細胞が直接A $\beta$ を貪食したり、傷害された神経細胞を貪食したりする実験は行っていないが、少なくともA $\beta$ が非常に強くミクログリアを活性化し、M-CSFを分泌することで、より分化したマクロファージ様細胞に変化することが示唆される。また、マクロファージ様細胞を引き寄せるケモカインを非常に強く発現させることはA $\beta$ が個体にとって非常に危険な異物であり、自然免疫系細胞を引き寄せ排除していると理解できよう。また、マトリックスメタロプロテアーゼは傷害された組織の蛋白を細かく分解し、ミクログリアに処理されやすい形にしていると考えられる。

#### E. 結論

- 1) A $\beta$ 1-42 はミクログリアからM-CSFを生じさせ、ミクログリアの機能細胞への分化、増殖を促す。
- 2) A $\beta$ 1-42 はミクログリアからマクロファージ系ケモカインを生じさせ、病変部にさらにミクログリアを集積させる。
- 3) A $\beta$ 1-42 はミクログリアからマトリックスメタロプロテアーゼMMP3. MMP12. MMP13の発現を著しく増加させ、傷害組織の蛋白の分解を促進する。
- 4) A $\beta$ 1-42 はミクログリアから様々な蛋白を生じさせるが、多くはPI3/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, 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 microglial cells. FEBS Lett. 2005 Mar 28;579(9):1995-2000.

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- $\beta$  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.

(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 2005.12.

伊藤佐知子、羽根田正隆、石田佳幸、磯部健一 A- $\beta$ 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.

## <総合分担研究報告書>

### 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 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。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。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。これは HSP90 を介したユビキチン-プロテアソーム系による分解によることを見いだした。

#### 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、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。これらに対して生体の細胞は反応し、異常蛋白を除去する防御反応を誘起する。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検索する。また、ALS の病態となる変異 SOD1 蛋白に結合し、ユビキチン・プロテアソームシステムを介して、変異蛋白を分解する CHIP、Dorfin の神経変性疾患に対する役割を検索した。

#### 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られる時間を測定)、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 の減少効果を認めしたが、その減少効果はリピート数が異常延長した 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。ウェ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。

## 3) Dorfin-CHIP 融合蛋白による変異 SOD1 のユビキチン化

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 <sup>35</sup>S 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。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。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

1) 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の治験が終了し、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。

2) 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

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.

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.

.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.

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

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：

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。本研究では高脂肪食により動脈硬化を発症させたウサギモデルで NO の動脈硬化病変への関与を検索した。さらに、血管内皮細胞培養の系で血管の老化と NO の関係を調べた。1.NO ラジカルは動脈硬化抑制作用を持つ。2.NO ラジカルは血管の老化を抑制する。3.女性ホルモンは NO 依存性に SA-β-gal 染色を減少させ、を上昇させテロメラーゼ活性を上昇させて、血管の老化を抑制する。4.高濃度の糖は血管の老化を促進させる。ことが判明した。

#### A. 研究目的

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。本研究では高脂肪食により動脈硬化を発症させたウサギモデルで NO の動脈硬化病変への関与を検索した。さらに、血管内皮細胞培養の系で血管の老化と NO の関係を調べた。血管の老化は閉経、糖尿病によって著しく進行する。そのため、エストロゲン、グルコース濃度の影響も同時に検索した。

#### B.研究方法

##### 1) ウサギ動脈硬化モデル

高脂肪食を 12 週間与え動脈硬化モデルを作製した (通常の餌に 0.5% コレステロールを添加)。

##### 2) 血管内皮細胞の培養

HVEC 細胞は Clonetics より得た。これらの細胞を low glucose MEM+1%FCS で培養し、様々な刺激を加えた。老化度の測定; 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。(NO<sub>2</sub>-)の測定は HOLC で細胞内 ROS 産生は H2DCFDA 試薬が細胞内で酸化により蛍光を発するのを利用し、FACS にて解析した。

(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

### C. 研究結果

#### 1. NO は動脈硬化を抑制する。

胸部大動脈の組織を見ると、血管内皮にプラークが見られた。NO を産生する NO 合成酵素の基質 L-arginine, L-citrullin を投与したグループではプラークがやや減少した。ただし、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。これらに抗酸化作用を持つ Vit C と Vit E を合わせて投与したグループではプラークが著しく減少した。

#### 2. NO は血管老化を押さえる。

SA- $\beta$ -gal 染色はひと血管内皮細胞の動脈硬化病巣に見られた。NO ドナーである DETA-NO を HVEC に加えると SA- $\beta$ -gal 活性が低下し、テロメラーゼ活性は増強した。また、eNOS を HVEC 遺伝子移入すると NO<sub>2</sub> が上昇し、SA- $\beta$ -gal 染色は弱まった。生理学的濃度の女性ホルモン (E2) はテロメラーゼ活性を上昇させた。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。女性ホルモンは NO 合成酵素の基質 BH<sub>4</sub> の生成律速酵素 GTPCH-I に作用し改善した。SA- $\beta$ -gal 染色も E2 処置により減少した。E2 受容体  $\alpha$  あるいは、eNOS の遺伝子導入によりテロメラーゼ活性は上昇した。高濃度の糖の存在下で培養すると、eNOS 産生は押さえられ、ROS 産生が上昇した。そして、 $\beta$ -gal 染色は増加し、テロメラーゼ活性は低下し、老

化を促進した。

### 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- $\beta$  gal で検出された。17 $\beta$  エストラジオール (E2) は hTERT を up-regulate し、 $\beta$  galactosidase を減少させた。これらは固有受容体及び NO に依存性であった。高血糖は糖尿病を引き起こし、閉経後女性における糖尿病患者は、罹患率が同年の男性の三倍に及ぶ事から糖尿病発症における女性ホルモンの影響がこれまで示唆されていたが機序は不明であった。E2 は GTPCH-1 活性制御を介して、eNOS, NO の作用を調節する作用を持っている事が発見された。上記にその一端を認めるように、老化は生活習慣病や動脈硬化症と密接に関係している。高齢者は個人差が大きい事が特徴であり、また臨床的な加齢の影響の研究を難しくしている要因であると考えられる。この意味で、高齢者における老化度をバイオマーカー等の諸指標から類推できる事には大きな意義がある。

### 結論

- 1.NO ラジカルは動脈硬化抑制作用を持つ。
- 2.NO ラジカルは血管の老化を抑制する。
- 3.女性ホルモンはNO依存性にSA- $\beta$ -gal染色を減少させ、を上昇させテロメラーゼ活性を上昇させて、血管の老化を抑制する。
- 4.高濃度の糖は血管の老化を促進させる。