

D. 健康危険情報

なし

E. 研究発表

(1) 論文発表

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.

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.

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.

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.

## 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り、実際のヒト死後脳サンプルおよび生体血液・髄液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、我々はヒト剖検脳サンプルおよび生体血液・髄液サンプルの解

析を中心にその遺伝的背景をも検索することに焦点を絞って研究を進めた。

#### 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)、FGF-1、ABCA2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；

生体より得られた血液・髄液サンプルを用いてCPRの遺伝子多型、ELISAを用いての血中濃度、脳血管障害との関連性を解析した。ま

た髄液・血液中のコレステロール、中性脂肪濃度を HPLC 法を用いて測定を行い、認知症、脳血管障害との関連性について検討した。

共同研究により、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。

### 3. 脈絡叢等、凍結脳発現蛋白解析

書面にて承諾を得た剖検脳より脈絡叢および脳実質凍結サンプルを用いて網羅的発現蛋白解析を共同研究にて行っている。

(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 の遺伝子多型を剖検脳サンプルにて脳梗塞と正常加齢者で解析を行ったが、突起すべき結果を得るには至らなかった。
- B) BDNF 遺伝子多型解析に関しては、これまでの報告でも統一した結果は出ていないが、剖検脳サンプルでの解析を行ったが AD, DLB とともに一定の傾向を見出すに

は至らなかった。

- C) 共同研究として FGF1 プロモータ多型がアルツハイマー病の危険因子になりうる事を報告した。
- D) 海外との共同研究では ABCA2 の遺伝子多型のタイプがアルツハイマー病発症のリスクになる可能性を提示した。

### 2. 発現遺伝子・蛋白解析;

生体より得られた血液・髄液サンプルを用いて CPR の遺伝子多型、ELISA を用いての血中濃度、脳血管障害との関連性を解析した。また髄液・血液中のコレステロール、中性脂肪濃度を HPLC 法を用いて測定を行い、認知症、脳血管障害との関連性について検討した。

共同研究により、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

### E)

### 2. 発現遺伝子・蛋白解析;

- A) 生体より得られた血液サンプルを用いて CPR の遺伝子多型、ELISA を用いての血中濃度、脳血管障害との関連性を解析し、その濃度と遺伝子型のパターンが正常加齢者とは異なる事を突き止めた。
- B) 髄液・血液中のコレステロール、中性脂肪濃度を HPLC 法を用いて測定を行い、認知症、脳血管障害との関連性について検討した。
- C) パーキンソン病の危険因子と目される DJ-1 定量を髄液を用いて解析しパーキン

ソン病での特異性を発見した。

- D) cDNA サブストラクション法にて海馬での発現遺伝子の差異を示すことができた。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。

### 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。

### D. 考察および結論

本プロジェクトにおいては、遺伝子多型解析、発現遺伝子解析を中心にアルツハイマー病、パーキンソン病に関連する危険因子を同定することができた。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### (1) 論文発表

- 1) Suemoto T, Okamura N, Shiomitsu T, Suzuki M, Shimadzu H, Akatsu H, Yamamoto T, Kudo Y, Sawada T  
In vivo labeling of amyloid with BF-108. *Neurosci Res.* 2004 Jan;48(1):65-74.
- 2) Okamura N, Suemoto T, Shimadzu H, Suzuki M, Shiomitsu T, Akatsu H, Yamamoto T, Staufenbiel M, Yanai K, Arai H, Sasaki H, Kudo Y, Sawada T  
Styrylbenzoxazole derivatives for in vivo imaging of amyloid plaques in the brain. *J Neurosci.* 2004 Mar 10;24(10):2535-41.
- 3) Heese K, Yamada T, Akatsu H, Yamamoto T, Kosaka K, Nagai Y, Sawada T.  
Characterizing the new transcription regulator protein p60TRP. *J Cell Biochem.* 2004 Apr 1;91(5):1030-42.
- 4) Akatsu H, Kamino K, Yamagata H, Isojima D, Kondo I, Yamamoto T, Kida T, Takeda M, Miki T and Kosaka K  
Increased incidence of dementia with Lewy bodies in patients carrying the e4-allele of apolipoprotein E. *Psychogeriatrics*, June 2004, vol. 4, no. 2, pp. 24-32(9)
- 5) Marui W, Iseki E, Kato M, Akatsu H, Kosaka K. Pathological entity of dementia with Lewy bodies and its differentiation from Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl).* 2004 Aug;108(2):121-8. Epub 2004 May 14.
- 6) Yamagata H, Chen Y, Akatsu H, Kamino K, Ito J, Yokoyama S, Yamamoto T, Kosaka K, Miki T, Kondo I. Promoter polymorphism in fibroblast growth factor 1 gene increases risk of definite Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Aug 20;321(2):320-3.
- 7) Okamura N, Suemoto T, Shiomitsu T, Suzuki M, Shimadzu H, Akatsu H, Yamamoto T, Arai H, Sasaki H, Yanai K, Staufenbiel M, Kudo Y, Sawada T.  
A novel imaging probe for in vivo detection of neuritic and diffuse amyloid plaques in the brain.

- J Mol Neurosci. 2004;24(2):247-56.
- 8) Heese K, Fujita M, Akatsu H, Yamamoto T, Kosaka K, Nagai Y, Sawada T. The Splicing Regulatory Protein p18SRP Is Down-Regulated in Alzheimer's Disease Brain. J Mol Neurosci. 2004;24(2):269-76.
- Akatsu H, Yamagata H, Chen Y, Miki T, Kamino K, Takeda M, Campbell W, Kondo I, Kosaka K, Yamamoto T, Okada H. TAFI polymorphisms at amino acids 147 and 325 are not risk factors for cerebral infarction. Br J Haematol. 2004 Nov;127(4):440-7.
- 9) Kanie J, Suzuki Y, Akatsu H, Kuzuya M, Iguchi A. Prevention of late complications by half-solid enteral nutrients in percutaneous endoscopic gastrostomy tube feeding. Gerontology. 2004 Nov-Dec;50(6):417-9.
- 10) 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.
- 11) 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
- 12) 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.
- 13) Okamura N, Suemoto T, Furumoto S, Suzuki M, Shimadzu H, Akatsu H, Yamamoto T, Fujiwara H, Nemoto M, Maruyama M, Arai H, Yanai K, Sawada T, Kudo Y. Quinoline and benzimidazole derivatives: candidate probes for in vivo imaging of tau pathology in Alzheimer's disease. BF Research Institute, Osaka 541-0045, Japan.
- 14) Fujishiro H, Umegaki H, Isojima D, Akatsu H, Iguchi A, Kosaka K. Depletion of cholinergic neurons in the nucleus of the medial septum and the vertical limb of the diagonal band in dementia with Lewy bodies. Acta Neuropathol (Berl). 2006 Feb;111(2):109-14. Epub 2006 Jan 19.
- 15) Kimura R, Kamino K, Yamamoto M, Kida T, Akatsu H, Uema T, Kobayashi T, Hattori H, Nuripa A, Nessa BN, Kazui H, Ikejiri Y, Tanaka T, Tanii H, Kudo T, Yoneda H, Yamagata H, Miki T, Takeda M.

- Albumin gene encoding free fatty acid and beta-amyloid transporter is genetically associated with Alzheimer disease. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2006 Apr;60 Suppl 1:S34-9.
- 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
- 16) Wollmer, M.A., Kapaki, E., Hersberger, M., Muntwyler, J., Brunner, F., Tsolaki, M., Akatsu, H., Kosaka, K., Michikawa, M., Molyva, D., Paraskevas, G.P., Lutjohann, D., von Eckardstein, A., Hock, C., Nitsch, R.M., Papassotiropoulos, A. Ethnicity-dependent genetic association of ABCA2 with sporadic Alzheimer's disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2006 Jul 5;141(5):534-6.
- 17) Heese K, Akatsu H. Alzheimer's disease--an interactive perspective. *Curr Alzheimer Res.* 2006 Apr;3(2):109-21.
- 18) Isojima D, Togo T, Kosaka K, Fujishiro H, Akatsu H, Katsuse O, Iritani S, Hirayasu Y Vascular complications in dementia with Lewy bodies: a postmortem study. *Neuropathology*, in press.
- 19) Mitsuda N, Yamagata HD, 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 Sci.* 2006 Apr 18;78(21):2444-8. Epub 2005 Nov 21.
- 20) Satoh K, Hata M, Takahara S, Tsuzaki H, Yokota H, Akatsu H, Yamamoto T, Kosaka K, Yamada T. A novel membrane protein, encoded by the gene covering KIAA0233, is transcriptionally induced in senile plaque-associated astrocytes. *Brain Res.* 2006 Jul 17; [Epub ahead of print]
- 21) Waragai M, Wei J, Fujita M, Nakai M, Ho GJ, Masliah E, Akatsu H, Yamada T, Hashimoto M. Increased level of DJ-1 in the cerebrospinal fluids of sporadic Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Jul 7;345(3):967-72. Epub 2006 May 11.
- (2) 学会発表
- 村信行、末元隆寛、鈴木雅子、塩満剛、島津浩、工藤幸司、澤田徹、谷内一彦、赤津裕康、山本孝之 脳アミロイドの生体画像化を目的とした新しいPETプローブの開発  
第77回日本薬理学会年会(2004.3.8-10)

- 2) 丸井和美、井関栄三、赤津裕康、小阪憲司、加藤雅紀  
レビー小体型痴呆における黒質線条体路と黒質扁桃核路は異なる変性過程をしめす？  
第45回日本神経病理学会(2004.5.26)  
Okada  
Analysis of TAFI gene polymorphism in neuropathologically confirmed cerebral infarct patients  
XX International Complement Workshop(2004.6.13-18)
- 3) 井関栄三、丸井和美、赤津裕康、小阪憲司、加藤雅紀  
レビー小体型痴呆におけるレビー病理変化の脳内進展様式は一律ではない？  
第45回日本神経病理学会(2004.5.26)  
8) 田口敬子、山縣英久、紙野晃人、田原康玄、赤津裕康、名倉潤、小原克彦、近藤郁子、三木哲郎  
アルツハイマー病の病因遺伝子探索のための候補遺伝子アプローチ  
日本老年医学会(2004.6.16-18)
- 4) 赤津裕康、磯島大輔、山本孝之、小阪憲司  
非特異的的老人斑を示した混合型痴呆症例  
第45回日本神経病理学会(2004.5.26-28)  
9) Hiroyasu Akatsu, Kouzin Kamino, Hidehisa Yamagata, Daisuke Isojima, Ikuko Kondo, Takayuki Yamamoto, Tomoyuki Kida, Masatoshi Takeda, Tetsuro Miki and Kenji Kosaka  
Apolipoprotein E4 allele increases risk of dementia with Lewy bodies  
9th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders(2004.6.17-22)
- 5) 磯島大輔、赤津裕康、都甲崇、内門大丈、藤城弘樹、井関栄三、平安良雄、小阪憲司  
レビー小体型痴呆における血管病変の検討  
第45回日本神経病理学会(2004.5.26-28)
- 6) 都甲崇、磯島大輔、鈴木京子、内門大丈、赤津裕康、井関栄三、小阪憲司、平安良雄  
Argyrophilic grain disease の臨床的特徴  
第45回日本神経病理学会(2004.5.26-28)  
10) 赤津裕康、山縣秀久、川又純、紙野晃人、武田雅俊、山本孝之、三木哲郎、遠山育夫、下浜俊、小阪憲司  
BDNF 遺伝子(Val66Met)多型と確定痴呆性疾患との関連  
第23回日本痴呆学会(2004.9.29-30)
- 7) Hiroyasu Akatsu, Hidehisa Yamagata, Yusen Chen, Tetsuro Miki, William Campbell, Ikuko Kondo, Kenji Kosaka, Takayuki Yamamoto, Hidechika  
11) 澤田徹、岡村信行、工藤幸司、谷内一彦、荒井哲行、赤津裕康、山本孝之



Development of novel PET tracer for in vivo detection of amyloid plaques  
7th International Conference AD/PD  
2005(2005.3.9-13)

1 2) 堀本佳彦、松本光弘、赤津裕康、小阪憲司、山本孝之、小島章弘、片田栄一、野倉一也、山本紘子、湯浅浩之、三竹重久  
Machado-joseph 病(MJD)における MRI 所見の経時的変化の検討  
第 111 回日本神経学会東海北陸地方会  
(2005.3.19)

1 3) 澤田徹、岡村信行、工藤幸司、谷内一彦、赤津裕康、山本孝之  
脳アミロイドを画像化する新しい PET プロブの開発  
第 78 回日本薬理学会年会(2005.3.22-24)

1 4) 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

<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、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。本年度の研究では新規細胞老化特異的発現亢進 TARSH 遺伝子に加え、細胞死関連遺伝子 DAP3 の細胞老化における生理的機能について解析した。その結果、1) 細胞老化に伴う p38 の活性化に IL-1 シグナル伝達経路が関与し、IL-1Ra は IL-1 シグナルによる p38 の活性化の抑制することで細胞老化に対して抑制的に機能する。2) 老化関連遺伝子として同定した TARSH 遺伝子が発癌抑制因子でもある可能性を示唆し、加齢に伴う生体機能低下と発癌抑制の双方に関与する機能分子であること。2) DAP3 の発現は分裂老化および酸化ストレスによる早期老化において減少すること、それらの減少が MEF 細胞においては分裂老化そのものを、また早期老化においてはミトコンドリアにおける活性酸素の産生を抑制する効果を有する老化関連分子であることが明らかになった。

研究目的=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。具体的に本研究では 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 $\beta$  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。

(倫理面への配慮)

本研究対象材料で現在、ヒト由来の試料は使う予定ではないが、止むなく使用する時は研究の主旨、目的、個人が特定されるような個人情報には十分配慮することを説明し、インフォームドコンセプトを得た上で遂行する。

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、実行する。遺伝子改変動物を用いる実験においても、2006年施行された「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」をはじめ、「動物の保護及び管理に関する法律」や「動物の愛護及び管理に関する法律」ならびに CIOMS の「動物を用いる生物医学研究のための国際指導原則」等に遵守する

研究方法=(1) 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 に関する研究：IL-1 ファミリー分子については細胞老化におけるストレス応答性 MAP キナーゼ p38 の活性化との関連に注目してシグナル伝達系路の特定や p38 の標的分子の解析を行い、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。具体的には遺伝子レベルでの発現変化については real-timePCR あるいは Northern Blotting 法により mRNA での発現を解析し、翻訳後の機能蛋白質としての変化は Western Blotting 法、免疫沈降法など、抗体を用いた手法にてそれらの詳細を検討した。また、ストレス応答性細胞老化において 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 $\alpha$  /  $\beta$  遺伝子欠失マウス由来の 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。(2) 機能未知分子 Tarsh (Target of Nesh)に関する研究：Tarsh

については老化細胞における会合分子の同定や強制発現系における細胞増殖の解析を行う。また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。、さらにストレス応答性細胞老化において、培養細胞株を用いた in vitro での Tarsh 遺伝子発現を調節する機構について解析する。生体における Tarsh 遺伝子の個体老化における役割については加齢マウス個体における臓器別 Tarsh 遺伝子の発現動態や特異性等の詳細を検討する。具体的には ShRNA システムを駆使した Tarsh 遺伝子発現抑制細胞における細胞増殖能、細胞周期チェックポイントを解析する。(3) 細胞死関連遺伝子 DAP3 の細胞老化における生理的機能に関する研究：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。さらに Tarsh 同様 ShRNA システムによる発現抑制系とレトロウイルスシステムによる過剰発現系を用いて DAP3 遺伝子の発現変化による MEF 細胞における分裂老化あるいは酸化ストレス時の早期老化の対する影響について探究する。

#### 結果と考察

##### (1) MEF 細胞老化における IL-1 ファミリー分子の経時的発現の解析

IL-1 $\alpha$  /  $\beta$  と拮抗して I 型 IL-1 レセプター (IL-1R) に結合し、p38 経路を含む IL-1 シグナル伝達を抑制する分子である IL-1Ra に注目し。定量 RT-PCR 法を用いて MEF 細胞老化における IL-1 ファミリー分子の発現について

経時変化を解析したところ、IL-1Ra は細胞老化初期に最も高い発現レベルを示し、IL-1 $\beta$  は IL-1Ra に続く形で mRNA 発現のピークを示した。この事実は細胞老化における IL-1 ファミリーが関与するシグナルの負の制御（予防）分子として IL-1Ra が機能している可能性を示唆している。

一方で、IL-1Ra 遺伝子欠損マウス由来 MEFs の解析については *in vitro* で継代培養し、野生型と形態を比較したところ、野生型と比べて増殖能の低下と p38 の活性化が早期に認められた。これらの結果から、細胞老化に伴う p38 の活性化に IL-1 シグナル伝達経路が関与し、IL-1Ra は IL-1 シグナルによる p38 の活性化の抑制することで細胞老化に対して抑制的に機能するのではないかと考えられる。IL-1 $\alpha$  /  $\beta$  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。これらの結果から、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。また細胞老化に伴う p38 の活性化を阻害すると IL-1 $\beta$  の発現が抑制されたので、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る。

以上のことから、MEF 細胞を用いた細胞老化においては p38 の活性化を介する IL-1 シグナル伝達経路と細胞老化の係わりについて検証ができた。これを基盤に今後は野生型、IL-1Ra $^{-/-}$ および IL-1a/b $^{-/-}$ マウス由来 MEF を

継代培養し、細胞老化の表現型(細胞増殖能・形態・老化細胞マーカー)の比較を行う。また経時的に回収したタンパクや RNA 試料を用いて p38 の活性化、IL-1 ファミリー遺伝子発現についてウエスタンブロットや定量 PCR にて検討する。同様の解析を過酸化水素、ガンマ線処理による早期細胞老化誘導系でも行い、ストレス応答反応におけるこれらの遺伝子産物の役割を考察していく。

## (2) 老化関連遺伝子としての TARSH 遺伝子の同定、構造解析

MEF 細胞老化において老化特異的に高発現する遺伝子群をサブプレッションサブトラクティブハイブリダイゼーション法により探索した結果、これまで NESH 遺伝子産物の SH3 ドメインに結合する因子として知られていた TARSH 遺伝子を同定した。IL-1 シグナル伝達系とは異なり、現在結合する因子等は明らかではないが、MEF における継代培養 10 日後という比較的細胞老化初期に一過的な発現のピークを示すこと、また C57Bl/6J マウス個体由来正常マウス臓器において TARSH の遺伝子発現をノザンブロット解析したところ、肺に特異的な高発現が認められた。また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ることも明らかになった。

さらにマウス個体における加齢変化における TARSH 遺伝子の発現を各組織で検討したところ、肺のように老化初期にピークを示すものや膀胱のように加齢に伴って亢進する組織

もあり、臓器による発現パターンの違いはあるものの個体老化においても機能する可能性を掴んだ。

一方、培養細胞を用いた *in vitro* における TARSH 分子の機能解析においては、shRNA システムを用いた TARSH 遺伝子発現を抑制制御した細胞における細胞増殖能、細胞周期チェックポイントを解析し、細胞老化における役割を解析した。その結果、RNAi で MEFs における TARSH の発現を抑制すると細胞増殖が著しく阻害され、多核化細胞やセントロソームの数が異常な細胞の割合（多核化細胞で約 5 倍、セントロソーム数が 3 倍以上になっている細胞の割合で 2 倍以上）が増加することが明らかになった。

以上、培養細胞株に用いた研究においては Tarsh 遺伝子の過剰発現細胞株を樹立し、ShRNA システムにおける抑制系と併せて、細胞周期調節因子の発現プロファイリングを進めるとともに相互作用する分子の同定を特異的抗体を作成して、今後は検討していきたい。また生体における生理的意義については条件付き遺伝子欠失マウスを作成し、腫瘍形成、免疫応答、個体老化を中心に解析の手を広げていきたい。

(2) 今後は、酸化ストレス刺激に対応する DAP3 の機能を制御する分子機構について、DAP3 の細胞死誘導のメカニズムとともに検証し、細胞老化（あるいは単なる老化）と細胞死、あるいは癌化という細胞の運命の決定機構について検証を進めていく。

(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、アポトーシス関連遺伝子として知られる DAP3 タンパクは、YMM/TERT 細胞株（ヒト皮膚由来繊維芽細胞）を  $H_2O_2$  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。これらの結果は 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。さらに、MEF 細胞の継代培養にみられる分裂老化においても蛋白レベルで減少することを見いだした。次に、酸化ストレス刺激に絡む DAP3 蛋白の早期老化への関与を検討するために、DAP3 遺伝子特異的な shRNA を用いて遺伝子を発現抑制させたところ、DAP3 の減少は酸化ストレスそのものに対しては抵抗性を示し、ミトコンドリア画分における活性酸素の産生を抑制させることが判明した。また、MEF 細胞における分裂老化において同様の DAP3 遺伝子の発現抑制を行なったところ、老化期そのものへの移行に変化が生じ、対照群に比べて増殖能が長期に持続することが判明した。

今後は、酸化ストレス刺激に対応する DAP3 の機能を制御する分子機構について、DAP3

の細胞死誘導のメカニズムとともに検証し、細胞老化（あるいは単なる老化）と細胞死、あるいは癌化という細胞の運命の決定機構について検証を進めていきたい。

結論=(1) MEF 細胞老化における IL-1 ファミリー分子の役割

IL-1Ra 遺伝子は MEF 細胞老化初期に最も高い発現レベルを示し、IL-1 $\beta$  は IL-1Ra に続く形で mRNA 発現のピークを示した。この事実は細胞老化における IL-1 ファミリーが関与するシグナルの負の制御（予防）分子として IL-1Ra が機能することを彷彿とさせる。加えて IL-1Ra 遺伝子欠損マウス由来 MEFs の解析より、細胞老化に伴う p38 の活性化に IL-1 シグナル伝達経路が関与し、IL-1Ra は IL-1 シグナルによる p38 の活性化の抑制することで細胞老化に対して抑制的に機能する事が推定される。

(2) 老化関連遺伝子としての TARSH 遺伝子の解析

MEF 細胞老化において老化特異的に高発現する TARSH 遺伝子は継代培養 10 日後という比較的細胞老化初期に一過的な発現のピークを示すこと、C57Bl/6J マウス個体においては肺特異的な発現を呈し、生後 8 ヶ月にピークを持つことから個体老化においても何からの影響を及ぼすことが判明した。老化関連遺伝子として同定した TARSH 遺伝子が発癌抑制因子でもある可能性が明らかになり、加齢に伴う生体機能低下と発癌抑制の双方に関与する機能分子であることが判明した。

(3) アポトーシス関連蛋白 DAP3 の細胞老化

における関与

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）する事を見いだした。その後の DAP3 遺伝子の発現抑制および過剰発現の系を用いた研究より DAP3 が酸化ストレス応答遺伝子、あるいは細胞における分裂老化において老化に対して、量のバランスで機能の変化しうる巧妙な制御因子であることを明らかにした。

研究成果の公表状況＝

<Publication>

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

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

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)

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)

Novobrantseva T, Xu S, Tan JE, Maruyama M, Schwers S, Pelanda R, Lam KP.: Stochastic Pairing of Immunoglobulin

Heavy and Light Chains Frequently Generates B Cell Antigen Receptors That Are Subject to Editing in Vivo., International Immunology 17, 343-350, (2005)

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)

Uekawa N, Nishikimi A, Isobe K, Iwakura Y, and Maruyama M.  
"Involvement of IL-1 family proteins in p38 linked cellular senescence of mouse embryonic fibroblasts." FEBS Lett. 2004 ;575, 30-34.

杉本昌隆、丸山光生  
細胞老化の分子機構と生体内における役割. 基礎老化研究, 30(3);5-10,2006

<学会発表>

若生武 浅井あづさ、上川奈都子、大田 聡、津田玲生、丸山光生：免疫老化における機能低下と新規 GEF, Zizimin2 の関係 日本分子生物学会 2006 フォーラム、2006 年 12 月 6 日、名古屋国際会議場

上川奈都子、寺内邦彦、杉本昌隆、島田順一 丸山光生：細胞老化関連遺伝子 TARSH/Abi3bp の機能解析 日本分子生物学会 2006 フォーラム、2006 年 12 月 8 日、名古屋国際会議場

上川奈都子、若生武、杉本昌隆、丸山光生  
細胞老化関連遺伝子 TARSH/Abi3bp の機能解析 第 29 回日本基礎老化学会大会. 長崎 2006.6.15

Wakoh T, Murata Y, Uekawa N, Sugimoto M, Miyazaki T and Maruyama M  
Characterization of apoptosis-related gene, DAP3 in cellular senescence The 29<sup>th</sup> Annual Meeting of The Japan Society for Biomedical Gerontology. Nagasaki. June 16. 2006

Takeshi Wakoh, Yoko Murata, Natsuko

Uekawa, Masataka Sugimoto, Tadaaki Miyazaki, and Mitsuo Maruyama  
Characterization of apoptosis-related gene, DAP3 in cellular senescence. The 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. Kyoto. June 21, 2006.

Takeshi Wakoh, Natsuko Uekawa, Charles J. Sherr, Mitsuo Maruyama, Masataka Sugimoto Role of HZF in adipocyte differentiation. 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. Kyoto. June 22, 2006.

Natsuko Uekawa, Kunihiko Terauchi, Takeshi Wakoh, Masataka Sugimoto and Mitsuo Maruyama  
Functional analysis of Abi3bp/TARSH, MEF Senescence related gene. The 6<sup>th</sup> Korea-Japan Gerontologist Joint Meeting, Chuncheon, Korea. June 22, 2006

Mitsuo Maruyama, Takeshi Wakoh, Yoko Murata, Natsuko Uekawa, Masataka Sugimoto and Tadaki Miyazaki  
Characterization of death associated Protein-3 in cellular senescence. The 6<sup>th</sup> Korea-Japan Gerontologist Joint Meeting, Chuncheon, Korea. June 22, 2006

Takeshi Wakoh, Masatoshi Takagi, Hiroyuki Kawagishi, Charles J. Sherr, Mitsuo Maruyama and Masataka Sugimoto Role of Hzf in adipocyte differentiation. The 11<sup>th</sup> Adiposcience Symposium. Osaka. 2006 年 8 月 19 日

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

Wakoh T Murata Y、Uekawa N、Harada H, Miyazaki T、Maruyama M  
"Characterization of

apoptosis-related genes, DAP3 and BIM in cellular senescence.” (Symposist) (English Oral) The 78th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society. Kobe, (Oct. 20, 2005),

特許の出願及び取得状況＝該当なし

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

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

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

Akihiko Nishikimi, Natsuko Uekawa, Ken-ichi Isobe, and Mitsuo Maruyama  
“Characterization of a spleen-specific CDM family protein SPH238” The 77th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society. Yokohama, (2004)

上川奈都子、錦見昭彦、磯部健一、丸山光生：p38 を介した MEF 細胞老化における IL-1 ファミリー分子の機能解析：第26回日本分子生物学会年会、神戸、(2004)

村田 洋子、上川 奈都子、上出 利光、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26回日本分子生物学会年会、神戸、(2004)

錦見昭彦、上川奈都子、磯部健一、丸山光生：リンパ球系特異的 GTPase 活性化因子 SPH238/Zizimin2 の機能解析と獲得免疫系における役割：第30回日本免疫学会年会、札幌、(2004)

#### <新聞・雑誌>

丸山光生

南日本新聞 2006年5月29日 朝刊

「長寿を拓く かがしま健康の深層」

「老化とは何か」



分担報告書  
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： 孤発性アルツハイマー病に焦点を当て、その発症係わると考えられている内的因子である小胞体（ER）ストレス、あるいは外的因子である低酸素ストレスや炎症性ストレスのネプリライシン（neprilysin）活性及びグリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）発現誘導に及ぼす影響を解析した。

Neprilysin に関しては、低酸素ストレスがその細胞膜表在活性に対して影響を及ぼすことを明らかにした。神経系のヒト培養細胞株である SH-SY5Y 細胞を用い、5% O<sub>2</sub> 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、約 70% に低下した。このことは、「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低酸素ストレスにより neprilysin 活性が低下して Aβ 分解が抑制され、結果としてアルツハイマー病と同様な神経変性を引き起こす可能性がある。本研究では、neprilysin 及びそのファミリーである neprilysin 2 の各種ストレス下での細胞内動態を可視化するための系を構築するとともに、neprilysin 活性に影響を及ぼす有機分子を探索することを目的として、独自に開発した蛍光微量測定法にさらに改良を加えた。

もう一つの研究対象である GDNF に関しては、この遺伝子の発現誘導に ER ストレス及び炎症性ストレスが関与していることを明らかにし、その誘導メカニズムを解析した。Thapsigargin (TG) を用いグリア系培養細胞株 C6 細胞にて発症させた ER ストレスでは、GDNF 遺伝子発現は二つの独立したリン酸化カスケードにより誘導されることを明らかにした。一つは MAP キナーゼカスケードで、Erk1/2 と JNK が関与すること、もう一つは Ca<sup>2+</sup> 非依存性 PKC で、主として PKCδ が関与することを明らかにした。一方、炎症誘引性因子の一つであるリポポリサッカライド（LPS）処理により、マクロファージ系培養細胞株 RAW264.7 では新規の GDNF mRNA が誘導されること、GDNF 遺伝子の発現誘導メカニズムは NF-κB 非依存性であることを見出した。いずれのストレスにおいても GDNF 遺伝子は刺激後 30 分で mRNA 発現量が上昇し始めることから、ニューロンの生存維持に重要な役割を果たしているものと考えられる。

#### A. 研究目的

孤発性アルツハイマー病ではアミロイド β（Aβ）の分解に係わる Neprilysin 活性の低下が Aβ の代謝バランスを損ない、そのオリゴマー化や凝集により、シナプス伝達効率の低下や神経変性を導くものと考えられている。また、オランダ型アルツハイマー病では Aβ 1-40 の脳血管への蓄積は血管障害を引き起こすことが知られており、その傷害に伴う低酸素ストレスが Aβ の代謝バランスにどのような影響を及ぼすか興味を持たれて

いる。一方、Aβ 凝集体はミクログリアを活性化し、周辺のニューロンに対し炎症性ストレスを引き起こすことが知られているが、最近、初代培養大脳皮質ニューロンに対し小胞体（ER）ストレスを直接引き起こすことが報告された。従って、これら各種ストレスが neprilysin の細胞内動態およびその酵素活性にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることを第一の研究目的とする。

グリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）は黒質ドーパミンニューロンの生存維持因子としてよく

知られているが、近年、海馬に入力しているマイネルト核のアセチルコリンニューロンの生存維持にも重要な役割を果たしていることが報告され、パーキンソン病に加えアルツハイマー病の治療に対しても注目を集めている。そこで、これらの神経疾患の内的病因である低酸素ストレス、ER ストレスおよび炎症ストレスによる GDNF 遺伝子の発現誘導について検討を加え、誘導するストレスについてそのメカニズムを解析することを第二の研究目的とする。

## B. 研究方法

### 1. 低酸素培養システムを用いた neprilysin 活性微量定量法の開発

5% CO<sub>2</sub> + 95% N<sub>2</sub> 混合ガスを用いて所定の時間、96 穴培養プレート培養システム内のトラップ中の O<sub>2</sub> の脱気を行い、次いで、低酸素ガス (1% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> + 94% N<sub>2</sub> 若しくは 5% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> + 90% N<sub>2</sub>) を一定速度で流し、96 穴細胞培養プレートの各ウェルに均一となるようフラッシュさせ、所定の時間 37°C にて培養した。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) の蛍光強度を測定した。カラムにはイナトシール 3 ODS カラム (4.6 mmφ × 250 mm)、移動層には 50% メタノールを用いた。生成した DAG 量は島津製作所の 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た。

### 2. Neprilysin と neprilysin 2 の細胞内動態を可視化するための系の構築

Neprilysin および neprilysin 2 (分泌型と非分泌型) の各々の cDNA を pFLAG-CMV-6 あるいは pcDNA-Myc-His 発現用ベクターに組み込んだコンストラクトを作製する。膠芽細胞腫 C6 細胞に一過性に発現させ、タグ付加の酵素活性への影響を分析するとともに、HEK293 細胞に導入して各酵素の細胞内動態を解析するための系を構築する。

### 3. Neprilysin 活性微量定量法の改良

脳の組織懸濁液や組織切片の酵素活性を測定するため、クロロフォルム・メタノールを用いた Bligh & Dyer 法を初年度に開発した neprilysin 活性微量定量法に組み込む。基質として DAGPNG を用いる系では、内部標準として DG (dansyl-Gly) を使用する。Bligh & Dyer 法にて除タンパク・除脂質後、生成物 DAG と DG を測定試料として回収できる系を確立する。固相にイナトシール 3 ODS カラムを、移動相にアセトニトリル系の溶媒を用いて分離条件を検討する。DAG 濃度は蛍光分光光度計 (励起波長 342 nm、蛍光波長 562 nm) により求める。Neprilysin 2 活性には Suc-Ala-Ala-Phe-amidomethyl-coumarin を用いる。

### 4. ER ストレスによる GDNF 遺伝子の発現誘導の解析

膠芽細胞腫 C6 細胞に小胞体 Ca<sup>2+</sup>ポンプの阻害剤 thapsigargin (TG) による GDNF および ER ストレス関連遺伝子の発現誘導を RT-PCR 法にて分析し、GDNF 遺伝子の 3 種類のオールタナティブプロモーターのいずれが主要な役割を果たしているか検討を加える。

NF-κB 阻害剤および各種プロテインキナーゼ阻害剤に関し、C6 細胞で TG 刺激にて誘導された各遺伝子の mRNA 発現量へ及ぼす影響について分析する。

Western blot 法を用い、TG 刺激による各種 MAP キナーゼ (ERK1/2, p38, JNK) の活性化パターンを分析するとともに、プロテインキナーゼ C (PKC) 経路との係わりについて、各種 PKC 阻害剤を用いて分析する。

### 5. LPS 刺激で誘導される GDNF 遺伝子の発現メカニズムの解析

LPS 刺激により RAW264.7 細胞で誘導される GDNF mRNA の種類を、各種プライマーペアを用

いて、RT-PCR 法により分析するとともに、NF- $\kappa$ B 阻害剤などの mRNA の発現量へ及ぼす影響について検討を加える。一方、LPS 刺激した RAW264.7 細胞より total RNA を調製し、SMART RACE cDNA amplification kit (Clontech)を用いて完全長 cDNA ライブラリーを作製し、新規 GDNF mRNA の構造を決定するために 5'-RACE を行う。

### C. 研究結果

#### 1. 低酸素培養システムを用いた neprilysin 活性微量定量法の開発

HPLC-蛍光計測法を用いるより、DAG の検出限界は 100 fmol であった。少量の培養細胞の膜表在 neprilysin 活性を測定することが可能となり、 $A\beta$  がニューロンの細胞外近傍で凝集することを考えると、より in vivo に近い微量測定系を開発することが出来た。SH-SY5Y 細胞を 5%  $O_2$  の条件下で 24 時間培養したところ、細胞膜表在の neprilysin 活性は有意に低下し、対照群の 70% となることを見出した。一方、1%  $O_2$  の条件下で 4 時間培養した場合には、neprilysin 活性の低下は見られなかった。以上のことから、脳内においても neprilysin 活性が軽微な低酸素ストレスにより低下する可能性が示唆された。

#### 2. Neprilysin と neprilysin 2 の細胞内動態を解析するための系の構築

マウス cDNA ライブラリーよりクローニングした neprilysin および neprilysin 2 (分泌型と非分泌型) 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た。C6 細胞に一過性に発現させ、各々の酵素活性を測定したところ、FLAG 付加はいずれの酵素活性にも影響を及ぼさなかったが、c-Myc 付加は全ての酵素で活性を低下させた。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。HEK293 細胞を用いて分泌型 neprilysin 2

の安定発現系を構築し、現在、各種ストレスに対する細胞内動態を解析している。

#### 3. 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 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  $\mu$ m 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  $\mu$ l あれば十分に測定が可能であった。硝子体中の  $A\beta$  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。

#### 4. ER ストレスによる GDNF 遺伝子の発現誘導の解析

C6 細胞を 0.5  $\mu$ M TG にて 1.5 時間処理し、GDNF 遺伝子の他、ER ストレスにより誘導される シクロオキシゲナーゼ 2 (COX2)、誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) および GRP78 遺伝子に関し、RT-PCR を行ったところ、GDNF と COX2 遺伝子は 1 時間目に iNOS と GRP78 遺伝子は 2 時間目に発現量が増加することが分かった。NF- $\kappa$ B 経路の阻害剤である Bay11-7082 は TG 刺激による GDNF mRNA の発現量には影響を及ぼさなかった。

GDNF 遺伝子の 3 つのオールタナティブプロモーターのいずれが、TG で誘導した ER ストレスにて活性化されるか、対応する mRNA を増幅させるためのプライマーペアを用いて、RT-PCR を行ったところ、プロモーター 3 が主として GDNF 遺伝子の発現に係わっていることを示唆する結果が得られた。一方、ルシフェラーゼレポーター分析系ではプロモーター3を含むイントロン2やその上流域には TG 処理により、特異的に活性化される領域はなかった。

GDNF mRNA は cPKC および nPKC の賦活剤である PMA により誘導されることが知られているので、各種 PKC 阻害剤、Gö6976 (cPKC 特異的阻害剤)、rottlerin (PKC $\delta$  特異的阻害剤)、Ro-31-8220 (汎 PKC 阻害剤) を用いて TG 誘導性 GDNF mRNA 発現に及ぼす影響を調べたところ、rottlerin あるいは Ro-31-8220 処理により有意に抑制されることが明らかとなった。従って、TG 処理による GDNF mRNA の発現誘導には Ca<sup>2+</sup> 非依存性 PKC が関与しているものと考えられる。

次に、各種 MAP キナーゼ阻害剤、U0126 (MEK 阻害剤)、SB202190 (p38MAPK 阻害剤)、SP600125 (JNK 阻害剤) を用いて、TG 誘導性 GDNF mRNA 発現に及ぼす影響を調べたところ、U0126 あるいは SP600125 処理により有意に抑制されることが明らかとなった。従って、TG 処理による GDNF mRNA の発現誘導には MEK-Erk1/2 および JNK リン酸化カスケードが関与しているものと考えられる。

最後に、PKC 経路と MAP キナーゼカスケードとの係わりについてウェスタンブロット法により解析したところ、TG 刺激により C6 細胞内では Erk1/2、p38MAPK、JNK のいずれも 5 分以内に一過性に活性化されることが分かった。一方、Erk1/2、JNK とも Ro-31-8220 のみによりそのリン酸化が抑制された。従って、3 種類の PKC ファミリーのうち、atypical PKC (aPKC) の MAP キナーゼカスケードへの関与が示唆された。

## 5. LPS 刺激で誘導される GDNF 遺伝子の発現メカニズムの解析

マクロファージ系の RAW264.7 細胞を 1  $\mu$ g/ml LPS にて 4 時間処理し、誘導される GDNF mRNA の種類について、各種プライマーペアを用い RT-PCR 法により分析した。既知のエキソン 4 内のセンスプライマーを用いた場合には GDNF mRNA は増幅されるものの、エキソン 3 内のセンスプライマーを用いたときには全く増幅されないことが分かった。

次に、LPS 刺激した RAW264.7 細胞より total RNA を調製し、完全長 cDNA ライブラリーを作製後、5'-RACE を行ったところ、既知のエキソン 4 の上流に隣接した 683 bp の 5' 非翻訳領域 (5'-UTR) の存在を確認することができた。この新規の GDNF (Ex4 GDNF) mRNA は多くの三量体 G タンパク質共役型受容体遺伝子と同様に単一エキソン遺伝子である可能性が示唆された。

上記 5'-UTR 内のセンスプライマーを用い、ミクログリア系の不死化細胞株 MG5 細胞や膠芽細胞腫 C6 細胞を 1  $\mu$ g/ml LPS で 36 時間処理した後、RT-PCR 法にて分析したところ、いずれの細胞でも Ex4 GDNF mRNA 発現の上昇を確認することができた。また、ラット初代培養マクロファージ、ミクログリア、アストロサイトにおいても同様に Ex4 GDNF mRNA は誘導された。

一方、Bay11-7082 は RAW264.7 細胞において LPS 刺激による iNOS mRNA の発現誘導を抑えたものの、Ex4 GDNF mRNA の発現量には影響を及ぼさなかったことから、新規 GDNF mRNA の遺伝子発現は NF- $\kappa$ B 非依存性であることが示唆された。

## D. 考察

我々が新規に開発した neprilysin 活性微量測定法を用い、5% O<sub>2</sub>、24 時間の低酸素処理条件下では膜表在酵素活性が有意に低下することを初めて明らかにした。この結果は、軽微な血管障害の周辺での低酸素ストレスによる neprilysin 活性低下が原因となり、A $\beta$  分解系の滞りが老人斑形成の原