

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

「ALDH2 酵素活性欠損トランスジェニックマウスと APOE4 ノックアウトマウスの掛け合わせ
による認知障害の出現の加速化」に関する研究
(トランスジェニックマウスを用いたミトコンドリア酸化ストレスの抑制による
アルツハイマー病予防・治療法の開発分担研究)

分担研究者 大澤郁朗（日本医科大学老人病研究所講師）
主任研究者 太田成男（日本医科大学大学院医学研究科 教授）

研究要旨：ALDH2 酵素欠損（DAL101）マウスは加齢によって中枢の神経変性と空間認知障害が現れることを報告者らは明らかにした。そこで、アルツハイマー病と動脈硬化の危険因子である APOE のノックアウト・マウス（APOE-KO）と DAL101 を掛け合わせることによって、ALDH2 と APOE の相乗効果を調べた。DAL101/APOE-KO マウスでは、6ヶ月で空間認知・学習記憶障害が表れた。この時、APOE-KO と DAL101 単独では、空間認知・学習記憶能力の低下は認められなかった。この結果は、ALDH2 と APOE が脳の機能障害進行に相乗効果を示すことをモデル動物レベルで示している。

A. 研究目的

アポリポ蛋白質 E の4型(APOE4)の遺伝子多型はアルツハイマー病と動脈硬化の危険因子であることは確立されている。また、報告者らは、疫学レベルでの解析結果から ALDH2 の酵素欠損型遺伝子多型をもつ人は APOE4 と相乗的にアルツハイマー病の頻度が高くなり、発症年齢も早くなることを示した。ALDH2 酵素欠損マウス(DAL101 マウス)では、加齢に伴って神経変性と空間認知・学習記憶能力障害がでることを本年示した。そこで、DAL101 ホモマウスと APOE ノックアウトマウスを掛け合わせて、APOE 欠損と ALDH2 欠損の効果が相乗的に現れるかどうかを調べた。

B. 研究方法

APOE ノックアウトマウスはタコニック社より購入した。DAL101 ホモマウスと掛け合わせることによって、DAL101(+ / +)で APOE(- / -)となる DAL101/APOE-KO マウスを作製した。対象としては、APOE(- / -)マウス、DAL101 マウス、野生型マウスを用いた。

水迷路実験には、全て雌の6ヶ月齢のマウスを1群6匹以上を用いた。直径120cmの白濁させたプールに直径10cmのプラットフォームを水面下に置き、シュード・ランダムなスタート地点から60秒間プラットフォームを探索させた。プラットフォームまでたどり着いた時間と距離を計測した。これを30分の間隔を置いて一日4回、5日間試行した後、プラットフォームを取り除いて60秒間自由に泳がせるプローブテストを行った。

さらに翌日、プラットフォームを水面上に見えるように設置し、視覚障害や動機付けの低下などがいないかを検証した。

C. 研究成果

6ヶ月齢で DAL101/APOE-KO マウスでは学習曲線もプローブテストでも空間認知・学習記憶能力の低下が認められた。DAL101 と APOE ノックアウトマウスでは、いずれも障害は認められなかった。この結果は、ALDH2 欠損と APOE 欠損が相乗効果を発揮して、空間認知・学習記憶能力の低下をもたらしたものと考えられる。

D. 考察

APOE4 がアルツハイマー病の危険因子であることについては、この多型が他の多型と比較して、4-HNE などの酸化ストレス除去機能が低いことが指摘されている。従って、APOE のノックアウトマウスは APOE4 の多型を持つ人に近い表現形となる。実際、APOE のノックアウトマウスは、高脂質で動脈硬化症などのモデル動物でもある。これに酸化ストレスの蓄積が亢進している DAL101 を組み合わせた結果、空間認知・学習記憶能力の低下が促進されたことは、脂質代謝の低下と酸化ストレスの増大が神経変性を促進する可能性を強く示唆している。

今回の結果は、ALDH2 の酵素欠損型遺伝子多型をもつ人は APOE4 と相乗的にアルツハイマー病の頻度が高くなっていった疫学レベルの結果をモデル動物で再現したものであり、この動物を用いた治療法の開発は、人での加

齢に伴う神経変性疾患発症阻止、進行抑制にむけた有効な手段となる。

E. 結論

DAL101/APOE-KO マウスは、加齢に伴う神経変性と空間認知・記憶学習障害が早期に認められたことから、酸化ストレスの増大と脂質代謝の異常を病因の一つとした神経変性疾患のモデル動物として有用である。

F. 研究発表

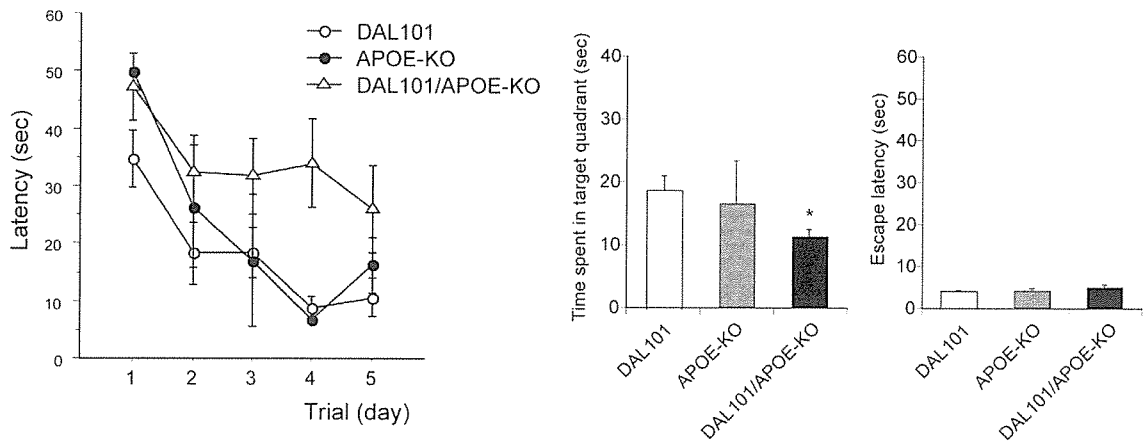
1. 論文発表

- Ohsawa, I., Ishikawa, M., Takahashi, K., Watanabe, M., Nishimaki, K., Yamagata, K., KeKatsura, K., Katayama, Y., Asoh, S. and Ohta, S.: Molecular hydrogen acts as a therapeutic antioxidant through the selective reduction of cytotoxic oxygen radicals. *Nat. Med.* 2007 in press.
- Arakawa M., Yasutake M., Asoh S., Miyamoto M., Takano T., Ohta S. Transduction of anti-cell death protein FNK protects isolated rat hearts from myocardial infarction induced by ischemia/reperfusion. 2007 in press.
- Ohta, S.: Contribution of somatic mutations in the mitochondrial genome to the development of cancer and tolerance against anticancer drugs. *Oncogene* 2006 Aug.; 25: (34) 4768-4776.
- Ohta, S., Ohsawa, I.: Dysfunction of mitochondria and oxidative stress in pathogenesis of Alzheimer's disease: On defects in the cytochrome *c* oxidase complex and aldehyde detoxification. *J. Alzheimer's Disease* 2006 Jul.; 9(2):155-166.
- Suzuki, Y., Ando, F., Ohsawa, I., Shimokata, H., Ohta, S.: Association of alcohol dehydrogenase 2*1 allele with liver damage and insulin concentration in the Japanese. *J. Hum. Genet.* 2006 Jan.; 51(1):31-37.
- Nakashima-Kamimura, N., Asoh, S., Ishibashi, Y., Mukai, Y., Shidara, Y., Oda, H., Munakata, K., Goto, Y., Ohta, S.: MIDAS/GPP34, a nuclear gene product, regulates total mitochondrial mass in response to mitochondrial dysfunction. *J. Cell Sci.* 2005 Nov.; 118(Pt22): 5357-5367.
- Miyasaka, K., Kawanami, T., Shimokata, H., Ohta, S., Funakoshi, A.: Inactive aldehyde dehydrogenase-2 increased the risk of pancreatic cancer among smokers in a Japanese male population. *Pancreas* 2005 Mar.; 30(2): 95-98.
- Suzuki, Y., Atsumi, Y., Matsuoka, K., Nishimaki, K., Ohta, S., Taniyama, M., Muramatsu, T.: Mitochondrial tRNA (Leu (UUR)) Mutation at Position 3243 Detected in Patients with Type 1 Diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2005 Jan.; 67(1): 92-94.
- Yasukawa, T., Kirino, Y., Ishii, N., Lehtinen, SK., Jacobs, HT., Makifuchi, T., Fukuhara, N., Ohta, S., Suzuki, T., and Watanabe, K.: Wobble modification deficiency in mutant tRNAs in patients with mitochondrial diseases. *FEBS Lett.* 2005 May; 579(13):2948-2952.
- Shidara, Y., Yamagata, K., Kanamori, T., Nakano, K., Kwong, JQ., Manfredi, G., Oda, H., Ohta, S.: Positive Contribution of Pathogenic Mutations in the Mitochondrial Genome to the Promotion of Cancer by Prevention from Apoptosis. *Cancer Res.* 2005 Mar.; 65(5): 1655-1663.
- 太田成男：アルツハイマー病におけるミトコンドリア機能低下、酸化ストレスの役割；特集アルツハイマー病研究の最前線—基礎と臨床 神経研究の進歩 2005；49(3)：357-366.
- 大澤郁朗・太田成男：アルツハイマー病の危険因子である酵素活性欠損型アルデヒド脱水素酵素 2 遺伝子—その分子メカニズムとモデル動物の開発—日本認知症学会誌 2005；19(3)(通巻 61)：284-295.

2. 学会発表

- Ohsawa, I., Nishimaki, K., Murakami, Y., Suzuki, Y., Ishikawa, M., Ohta, S: Neurodegeneration in mice expressing a dominant negative form of mitochondrial aldehyde dehydrogenase. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBBM Congress. Kyoto, 2006. 6.
- Ohsawa, I.: Role of Mitochondrial aldehyde dehydrogenase in the onset of Alzheimer's

- Disease. The 10th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders. Madrid Spain, 2006. 7.
3. 太田成男: ミトコンドリアから発せられる活性酸素の消去. 第 11 回酸素ダイナミクス研究会, 東京, 2006. 9.
 4. 太田成男: ミトコンドリアから広がる事業の可能性. 第 7 回川崎ライフサイエンスセミナー, 2006.6.
 5. 太田成男: ミトコンドリアはどこまで病気と健康に関与するか? 第 6 回日本ミトコンドリア学会年会, 2006.12.
 6. Ohsawa, I., Nishimaki, K., Murakami, Y., Suzuki, Y, Ishikawa, M., Ohta, S.: Brain degeneration and decline in spatial cognitive ability in ALDH2-deficient mice. 第 25 回日本認知症学会学術集会, 2006.10.
 7. Murakami, Y., Ohsawa, I., Kasahara, T., Ohta, S.: Detoxification of 4-hydroxy-2-nonenal by ABAD. 第 25 回日本認知症学会学術集会, 2006.10.
 8. 大澤郁朗, 石川正洋, 高橋久美子, 渡辺めぐみ¹, 西槇貴代美, 山縣久美, 桂研一郎¹, 麻生定光, 太田成男: ヒドロキシルラジカルの選択的消去による細胞死抑制. 第 6 回日本ミトコンドリア学会年会, 2006.12.
 9. 西槇貴代美, 大澤郁朗, 村上弥生, 石川正洋, 太田成男: アルデヒド脱水素酵素 2 欠損マウスの加齢に伴う認知能力低下と脳の変性. 第 6 回日本ミトコンドリア学会年会, 2006.12.
 10. 村上弥生, 大澤郁朗, 笠原 忠, 太田成男: ミトコンドリアに局在するアミロイドβ結合アルコール脱水素酵素のアルデヒド障害に対する細胞保護効果. 第 6 回日本ミトコンドリア学会年会, 2006.12.
 11. Ohta, S.: Studies on multiple functional mitochondria from Basic aspects towards Medical applications. FinMIT/J-Mit Joint Meeting, 2005.11.
 12. Ohsawa, I., Nishimaki, K., Murakami, Y., Suzuki, Y., Ishikawa, M., Ohta, S.: Deficiency in a mitochondrial aldehyde dehydrogenase promotes oxidative stress and the onset of Alzheimer's disease: Its molecular mechanisms and animal models. International Conference on Mitochondria and Life 2005, 2005.12.
 13. Nishimaki, K., Ohsawa, I., Suzuki, Y., Nukina, T., Kodaira, E., Yagihashi, S., Ohta, S.: Development of amyotrophy in mice overexpressing a dominant negative form of mitochondrial aldehyde dehydrogenase. International Conference on Mitochondria and Life 2005, 2005.12.
 14. Murakami, Y., Ohsawa, I., Ihara, Y., Yamaguchi, H., Kasahara, T., Ohta, S.: Somatic mutations in mitochondrial DNA of the brain from Alzheimer's disease patients. International Conference on Mitochondria and Life 2005, 2005.12.
 15. 太田成男: 多彩な機能をもつミトコンドリア. 第 23 回内分泌・代謝学セミナー. 2005. 8.
 16. 太田成男: アルツハイマー病の危険因子としての ALDH2 遺伝子多型、脳梗塞の危険因子としての ADH2 遺伝子多型 第 40 回日本アルコール・薬物医学会総会. 特別講演 2005. 9.
 17. 大澤郁朗, 太田成男: 水素分子(H₂)による酸化ストレス細胞死の抑制. 第 78 回日本生化学会大会, 2005. 10.
 18. 石井徳恵, 西槇貴代美, 大澤郁朗, 太田成男: トランスジェニック DAL マウスで惹起される酸化ストレスの飽和水素水飲用による抑制. 第 78 回日本生化学会大会, 2005. 10.
 19. 福田慶一, 麻生定光, 大澤郁朗, 山本保博, 太田成男: 水素ガスによる活性酸素フリーラジカルの除去—虚血再灌流傷害の軽減効果. 第 78 回日本生化学会大会, 2005. 10.
 20. 大澤郁朗, 西槇貴代美, 鈴木悠子, 太田成男: ミトコンドリア型アルデヒド脱水素酵素活性抑制トランスジェニックマウスにおける中枢神経系の加齢に伴う変性. 第 24 回日本痴呆学会, 2005. 9.
 21. 村上弥生, 大澤郁朗, 井原康夫, 山口晴保, 笠原 忠, 太田成男: アルツハイマー病患者脳におけるミトコンドリア DNA の体細胞変異解析. 第 24 回日本痴呆学会, 2005. 9.
- G. 知的財産の出願・登録状況
1. 特許出願
太田成男・大澤郁朗: 特願 2005-238572.
生体内の有害なフリーラジカル除去剤及びその吸引装置



DAL101/APOE-KO マウス（6ヶ月齢雌）は学習曲線（左図）でも、プローブテスト（中図）でも空間認知・記憶学習障害を示した。しかし、その運動機能には差がない（右図）。

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

「水素分子による酸化ストレスの軽減」に関する研究
（トランスジェニックマウスを用いたミトコンドリア酸化ストレスの抑制による
アルツハイマー病予防・治療法の開発の分担研究）

分担研究者 大澤郁朗（日本医科大学老人病研究所 講師）
主任研究者 太田成男（日本医科大学大学院医学研究科 教授）

研究要旨：酸化ストレスから生体を防御することはアルツハイマー病をはじめとする各疾患から身体を護ることは重要であることが認識されるようになった。いっぽう、活性酸素の中には重要な役割をもつ活性酸素もあることが明らかとなってきた。そこで、反応性が高く有害な活性酸素のみを選択的に除去する還元剤を探索することが重要となってきている。水素分子（水素ガス）が、有害な活性酸素のみを選択的に除去し、活性酸素から細胞を保護する効果があることを見いだした。

A. 研究目的

アルツハイマー病を予防するには酸化ストレスを軽減することが有効であると考えられ、酸化ストレスから防御する方法を確立することは国民の健康維持の観点から極めて重要である。酸化ストレスの元凶と考えられてきた活性酸素には、神経伝達物質、血管再生、血管拡張、生体防御反応など重要な役割を果たすことがわかってきた。そこで、有益な役割を果たす活性酸素は除去せず、生体に有害な活性酸素（ヒドロキシルラジカル、ペルオキシナイトライト、脂質ラジカル）のみを選択的に還元する還元剤が望まれている。ここでは、反応性が高く有害な活性酸素のみを還元する還元剤を探索した。そして、水素は、反応性が高く有害な活性酸素種のみを選択的に還元除去することを見いだした。

B. 研究方法

試験管内で各々の活性酸素種を別々に発生させ、それぞれに特異的な蛍光試薬でそれぞれの活性酸素種を測定した。水素溶存溶液内で同様の反応を行わせ、溶存するその還元力を調べた。

細胞内で活性酸素を発生させるために、ミトコンドリア呼吸鎖酵素阻害剤アンチマイシン A で強制的にスーパーオキシドを発生させ、ついでヒドロキシルラジカルに変換させた。一日後生存細胞の数を数えた。また、細胞内のヒドロキシルラジカルを蛍光試薬で選択的に染色し、共焦点顕微鏡で観察した。

さらに、酸化ストレス下での細胞死への防御効果を調べた。

水素が溶けた水を飲むと体内に吸収されるかどうかは、呼気の水素をガスクロマトで定量して判断した。

水素が溶けた水を飲んだ時の還元力は、DAL マウスを用いて効果を検定した。すなわち、DAL マウスでは過酸化脂質から生じた4-ヒドロキシル-2-ノネナル(4-HNE)の蓄積程度を測定した。

C. 研究成果

溶存水素は、試験管内実験でヒドロキシルラジカル、ペルオキシナイトライト、脂質ラジカルを還元した。一方、スーパーオキシド、過酸化水素、一酸化窒素は還元しなかった。また、生体内で酸化還元反応を司る補酵素であるNAD⁺やFADH、ヘム鉄は還元しなかった。

細胞内でヒドロキシルラジカルを大量に発生させると細胞は死滅したが、溶存水素は細胞死から細胞を保護した。ヒドロキシルラジカルを大量に発生させると核まで達したが、溶存水素が存在するとヒドロキシルラジカルは核には検出されず、水素は核をヒドロキシルラジカルから護ることが示された。また、水素存在下では、ヒドロキシルラジカルからミトコンドリアも保護した。

水素が溶けた水を飲むと10分程度で体内に速やかに吸収された。

水素を含む水をDAL マウスに2週間自然摂取

させると、4-HNE が水素を摂取したい DAL マウスに比べて有意に減少したので、酸化ストレスを減少させる効果があることが示唆された。

D. 考察

水素ガスは、反応性が高く有害な活性酸素を選択的に還元消去すること、細胞をこれらの活性酸素から防御することが判明した。多くの抗酸化ビタミンでは、疎水性物質は膜にとどまり、親水性物質は膜を通過できない。また、脳血液関門を通過できない抗酸化ビタミンも多い。水素は気体の性質をもつので、親水性、疎水性の領域いずれにも自由に到達できるはずである。実際、細胞内で核とミトコンドリアを防御し細胞を酸化ストレスから防御することがわかった。

また、水素は体内に速やかに吸収される。

E. 結論

水素は無害であることが証明されており、酸化ストレスを極めて有効に軽減することから、長期にわかって水素分子を体内に取り入れることは、アルツハイマー病の予防に寄与する可能性がある。以上の結果は Nature Medicine の 2007 年 5 月号に掲載される。

F. 研究発表

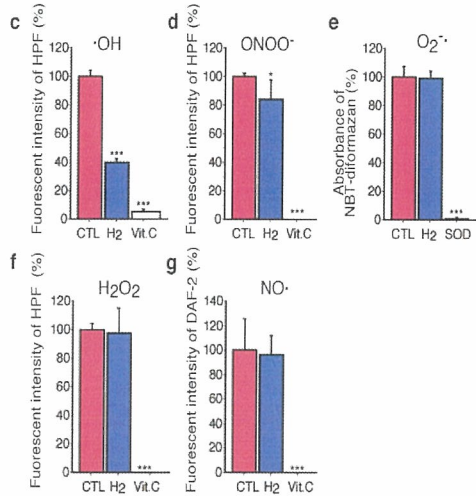
- Ohsawa, I., Ishikawa, M., Takahashi, K., Watanabe, M., Nishimaki, K., Yamagata, K., KeKatsura, K., Katayama, Y., Asoh, S. and Ohta, S.: Molecular hydrogen acts as a therapeutic antioxidant through the selective reduction of cytotoxic oxygen radicals. Nat. Med. 2007 in press.
- Arakawa M., Yasutake M., Asoh S., Miyamoto M., Takano T., Ohta S. Transduction of anti-cell death protein FNK protects isolated rat hearts from myocardial infarction induced by ischemia/reperfusion. 2007 in press.
- Ohta, S.: Contribution of somatic mutations in the mitochondrial genome to the development of cancer and tolerance against anticancer drugs. Oncogene 2006 Aug.; 25: (34) 4768-4776.
- Ohta, S., Ohsawa, I.: Dysfunction of mitochondria and oxidative stress in pathogenesis of Alzheimer's disease: On defects in the cytochrome c oxidase complex and aldehyde detoxification. J. Alzheimer's Disease 2006 Jul.; 9(2):155-166.
- Suzuki, Y., Ando, F., Ohsawa, I., Shimokata, H., Ohta, S.: Association of alcohol dehydrogenase 2*1 allele with liver damage and insulin concentration in the Japanese. J. Hum. Genet. 2006 Jan.;51(1):31-37.
- Nakashima-Kamimura, N., Asoh, S., Ishibashi, Y., Mukai, Y., Shidara, Y., Oda, H., Munakata, K., Goto, Y., Ohta, S.: MIDAS/GPP34, a nuclear gene product, regulates total mitochondrial mass in response to mitochondrial dysfunction. J. Cell Sci. 2005 Nov.; 118(Pt22): 5357-5367.
- Miyasaka, K., Kawanami, T., Shimokata, H., Ohta, S., Funakoshi, A.: Inactive aldehyde dehydrogenase-2 increased the risk of pancreatic cancer among smokers in a Japanese male population. Pancreas 2005 Mar.; 30(2): 95-98.
- Suzuki, Y., Atsumi, Y., Matsuoka, K., Nishimaki, K., Ohta, S., Taniyama, M., Muramatsu, T.: Mitochondrial tRNA (Leu (UUR)) Mutation at Position 3243 Detected in Patients with Type 1 Diabetes. Diabetes Res. Clin. Pract. 2005 Jan.; 67(1): 92-94.
- Yasukawa, T., Kirino, Y., Ishii, N., Lehtinen, SK., Jacobs, HT., Makifuchi, T., Fukuhara, N., Ohta, S., Suzuki, T., and Watanabe, K.: Wobble modification deficiency in mutant tRNAs in patients with mitochondrial diseases. FEBS Lett. 2005 May; 579(13):2948-2952.
- Shidara, Y., Yamagata, K., Kanamori, T., Nakano, K., Kwong, JQ., Manfredi, G., Oda, H., Ohta, S.: Positive Contribution of Pathogenic Mutations in the Mitochondrial Genome to the Promotion of Cancer by Prevention from Apoptosis. Cancer Res. 2005 Mar.; 65(5): 1655-1663.
- 太田成男：アルツハイマー病におけるミトコンドリア機能低下、酸化ストレスの役割；特集アルツハイマー病研究の最前線－基礎と臨床 神経研究の進歩 2005；49(3)：357-366.
- 大澤郁朗・太田成男：アルツハイマー病の危険因子である酵素活性欠損型アルデヒド脱水素酵素 2 遺伝子－その分子メカニズムとモデル動物の開発－日本認知症学会誌 2005；19(3)(通巻 61)：284-295.

1. 学会発表

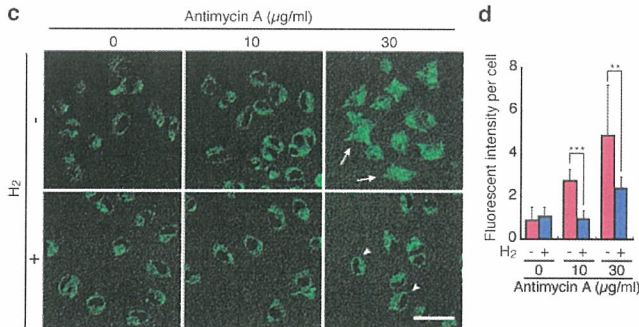
- Ohsawa, I., Nishimaki, K., Murakami, Y., Suzuki, Y., Ishikawa, M., Ohta, S: Neurodegeneration in

- mice expressing a dominant negative form of mitochondrial aldehyde dehydrogenase. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Kyoto, 2006. 6.
2. Ohsawa, I.: Role of Mitochondrial aldehyde dehydrogenase in the onset of Alzheimer's Disease. The 10th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders. Madrid Spain, 2006. 7.
 3. 太田成男: ミトコンドリアから発せられる活性酸素の消去. 第 11 回酸素ダイナミクス研究会, 東京. 2006. 9.
 4. 太田成男: ミトコンドリアから広がる事業の可能性. 第 7 回川崎ライフサイエンスセミナー, 2006.6.
 5. 太田成男: ミトコンドリアはどこまで病気と健康に関与するか? 第 6 回日本ミトコンドリア学会年会, 2006.12.
 6. Ohsawa, I., Nishimaki, K., Murakami, Y., Suzuki, Y, Ishikawa, M., Ohta, S.: Brain degeneration and decline in spatial cognitive ability in ALDH2-deficient mice. 第 25 回日本認知症学会学術集会, 2006.10.
 7. Murakami, Y., Ohsawa, I., Kasahara, T., Ohta, S. : Detoxification of 4-hydroxy-2-nonenal by ABAD. 第 25 回日本認知症学会学術集会, 2006.10.
 8. 大澤郁朗, 石川正洋, 高橋久美子, 渡辺めぐみ¹, 西槇貴代美, 山縣久美, 桂研一郎¹, 麻生定光, 太田成男: ヒドロキシルラジカルの選択的消去による細胞死抑制. 第 6 回日本ミトコンドリア学会年会, 2006.12.
 9. 西槇貴代美, 大澤郁朗, 村上弥生, 石川正洋, 太田成男: アルデヒド脱水素酵素 2 欠損マウスの加齢に伴う認知能力低下と脳の変性. 第 6 回日本ミトコンドリア学会年会, 2006.12.
 10. 村上弥生, 大澤郁朗, 笠原 忠, 太田成男: ミトコンドリアに局在するアミロイドβ結合アルコール脱水素酵素のアルデヒド障害に対する細胞保護効果. 第 6 回日本ミトコンドリア学会年会, 2006.12.
 11. Ohta, S. : Studies on multiple functional mitochondria from Basic aspects towards Medical applications. FinMIT/J-Mit Joint Meeting, 2005.11.
 12. Ohsawa, I., Nishimaki, K., Murakami, Y., Suzuki, Y., Ishikawa, M., Ohta, S.: Deficiency in a mitochondrial aldehyde dehydrogenase promotes oxidative stress and the onset of Alzheimer's disease: Its molecular mechanisms and animal models. International Conference on Mitochondria and Life 2005, 2005.12.
 13. Nishimaki, K., Ohsawa, I., Suzuki, Y., Nukina, T., Kodaira, E., Yagihashi, S., Ohta, S. Development of amyotrophy in mice overexpressing a dominant negative form of mitochondrial aldehyde dehydrogenase. International Conference on Mitochondria and Life 2005, 2005.12.
 14. Murakami, Y., Ohsawa, I., Ihara, Y., Yamaguchi, H., Kasahara, T., Ohta, S.: Somatic mutations in mitochondrial DNA of the brain from Alzheimer's disease patients. International Conference on Mitochondria and Life 2005, 2005.12.
 15. 太田成男: 多彩な機能をもつミトコンドリア. 第 23 回内分泌・代謝学セミナー. 2005. 8.
 16. 太田成男: アルツハイマー病の危険因子としての ALDH2 遺伝子多型、脳梗塞の危険因子としての ADH2 遺伝子多型 第 40 回日本アルコール・薬物医学会総会. 特別講演 2005. 9.
 17. 大澤郁朗, 太田成男: 水素分子(H₂)による酸化ストレス細胞死の抑制. 第 78 回日本生化学会大会, 2005. 10.
 18. 石井徳恵, 西槇貴代美, 大澤郁朗, 太田成男: トランスジェニック DAL マウスで惹起される酸化ストレスの飽和水素水飲用による抑制. 第 78 回日本生化学会大会, 2005. 10.
 19. 福田慶一, 麻生定光, 大澤郁朗, 山本保博, 太田成男: 水素ガスによる活性酸素フリーラジカルの除去—虚血再灌流傷害の軽減効果. 第 78 回日本生化学会大会, 2005. 10.
 20. 大澤郁朗, 西槇貴代美, 鈴木悠子, 太田成男: ミトコンドリア型アルデヒド脱水素酵素活性抑制トランスジェニックマウスにおける中枢神経系の加齢に伴う変性. 第 24 回日本痴呆学会, 2005. 9.
 21. 村上弥生, 大澤郁朗, 井原康夫, 山口晴保, 笠原 忠, 太田成男: アルツハイマー病患者脳におけるミトコンドリア DNA の体細胞変異解析. 第 24 回日本痴呆学会, 2005. 9. 論文発表 執筆中
- G. 知的財産の出願・登録状況
1. 特許出願

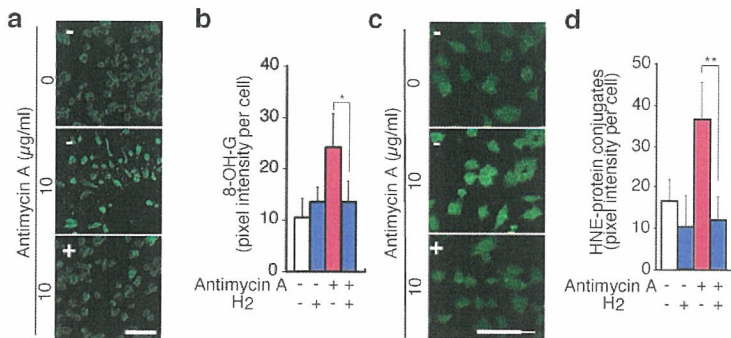
太田成男・大澤郁朗：特願 2005-238572. 生体内の有害なフリーラジカル除去剤及びその吸引装置



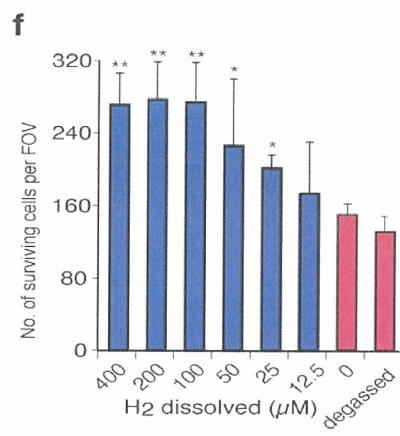
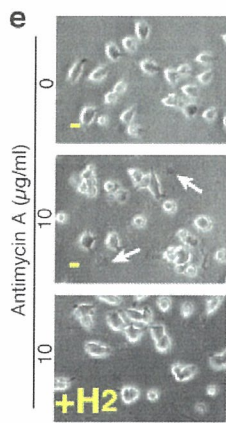
試験管内実験 (cell-free system) における水素の活性酸素の消去。各々の活性酸素を特異的に発生させ、水素と反応させた。残存する活性酸素を定量した。水素はヒドロキシルラジカルとペロオキシナイトライトを消去した。



細胞内のヒドロキシルラジカルの発生と水素による消去。細胞をミトコンドリアの呼吸阻害剤アンチマイシンで処理をし、ヒドロキシルラジカルを発生させ、HPF 蛍光により検出した。緑色の光がヒドロキシルラジカルと HPF が反応した蛍光。水素がヒドロキシルラジカルを消去している。



活性酸素により DNA と脂質の酸化を水素が抑制した。
8-OH-G は酸化 DNA (左図)
HNE は過酸化脂質由来アルデヒド (右図) を示す。



活性酸素による細胞死を水素が防御した。細胞をアンチマイシンで処理し活性酸素を発生させた。水素が存在すると細胞死を抑制した。

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

「酸化ストレスが原因の虚血・再灌流障害を軽減する水素ガス」に関する研究
（トランスジェニックマウスを用いたミトコンドリア酸化ストレスの抑制による
アルツハイマー病予防・治療法の開発の分担研究）

分担研究者 桂 研一郎（日本医科大学医学部 助教授）
主任研究者 太田 成男（日本医科大学大学院医学研究科 教授）

研究要旨：酸化ストレスを軽減させる方法として水素ガスを実験動物に吸引させた。虚血・再灌流によって活性酸素が急激に発生する。肝臓の動脈あるいは脳の中大動脈を梗塞させ、虚血状態を90分間保った後、再灌流させた。この間、水素ガスを吸引させると虚血・再灌流障害が著しく軽減された。以上の結果は、水素は酸化ストレスを軽減させるのに有効であることを示す。

A. 研究目的

アルツハイマー病を予防するには酸化ストレスを軽減することが有効であると考えられる。酸化ストレスから防御する方法を確立することは国民の健康維持の観点から極めて重要である。水素は、ヒドロキシルラジカル、ペルオキシナイトライトを消去することがわかったので、体内において、水素ガスがこれらの活性酸素を有効に消去し、酸化ストレス障害を軽減するかどうかを調べる。

B. 研究方法

体内での活性酸素の消去効果を明確にするために体内でヒドロキシルラジカルとペルオキシナイトライトを多量に発生させる。ここでは、虚血・再灌流によって活性酸素を発生させた。ラット脳の中大動脈にナイロン糸を挿入し、左脳のみを脳梗塞を生じさせ、90分後に再灌流させた。その間、水素ガスと空気と笑気ガスの混合ガスを吸引させた。24時間後にミトコンドリア活性を測定するTTC染色により生細胞と死細胞を区別して、梗塞巣体積を測定した。さらに1週間後の脳をH&E染色により脳梗塞巣の体積を測定した。

また、肝臓における虚血・再灌流の障害を水素ガスが軽減するかどうかを動脈を90分梗塞して再灌流させ活性酸素を発生させた。この間、水素と空気と笑気ガスを吸引させた。その直後、肝臓組織を固定しH&E染色と血液中の逸脱酵素活性を調べた。量して判断した。

C. 研究成果

脳梗塞モデルにおいて、水素を吸引させると脳梗塞巣は半分以下に軽減した。また、酸化ストレスマーカーである8-オキシグアニンの量も軽減されたので、水素が酸化ストレスを軽減して、脳梗塞巣を小さくしたことが示された。

この効果は従来の脳梗塞治療薬以上である。また、脳梗塞の体積が減少しただけでなく、行動の改善も見られた。

同様に、肝臓の虚血・再灌流においても、水素を吸引させると障害が著しく低下した。

D. 考察

水素ガスは、反応性が高いヒドロキシルラジカルとペルオキシナイトライトを還元し消去する。この活性酸素を消去し、細胞死を十分抑制した。以上の結果は、水素ガスは酸化ストレスを十分軽減させることを示している。しかも、一酸化窒素、スーパーオキシド、過酸化水素など時には生体に必要な活性酸素は還元しないので、水素の害はほとんどないと思われる。

さらに、水素は脳血液関門を通過して神経細胞を保護した。そのため、脳を酸化ストレスから護るには水素は理想的な還元剤であることが示唆された。

E. 結論

水素は無害であることが証明されており、酸化ストレスを極めて有効に軽減することから、長期にわかって水素分子を体内に取り入れるこ

とは、アルツハイマー病の予防に寄与する可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ohsawa, I., Ishikawa, M., Takahashi, K., Watanabe, M., Nishimaki, K., Yamagata, K., KeKatsura, K., Katayama, Y., Asoh, S. and Ohta, S.: Molecular hydrogen acts as a therapeutic antioxidant through the selective reduction of cytotoxic oxygen radicals. *Nat. Med.* 2007 in press.
2. Arakawa M., Yasutake M., Asoh S., Miyamoto M., Takano T., Ohta S. Transduction of anti-cell death protein FNK protects isolated rat hearts from myocardial infarction induced by ischemia/reperfusion. 2007 in press.
3. Ohta, S.: Contribution of somatic mutations in the mitochondrial genome to the development of cancer and tolerance against anticancer drugs. *Oncogene* 2006 Aug.; 25: (34) 4768-4776.
4. Ohta, S., Ohsawa, I.: Dysfunction of mitochondria and oxidative stress in pathogenesis of Alzheimer's disease: On defects in the cytochrome *c* oxidase complex and aldehyde detoxification. *J. Alzheimer's Disease* 2006 Jul.; 9(2):155-166.
5. Suzuki, Y., Ando, F., Ohsawa, I., Shimokata, H., Ohta, S.: Association of alcohol dehydrogenase 2*1 allele with liver damage and insulin concentration in the Japanese. *J. Hum. Genet.* 2006 Jan.; 51(1):31-37.
6. Nakashima-Kamimura, N., Asoh, S., Ishibashi, Y., Mukai, Y., Shidara, Y., Oda, H., Munakata, K., Goto, Y., Ohta, S.: MIDAS/GPP34, a nuclear gene product, regulates total mitochondrial mass in response to mitochondrial dysfunction. *J. Cell Sci.* 2005 Nov.; 118(Pt22): 5357-5367.
7. Miyasaka, K., Kawanami, T., Shimokata, H., Ohta, S., Funakoshi, A.: Inactive aldehyde dehydrogenase-2 increased the risk of pancreatic cancer among smokers in a Japanese male population. *Pancreas* 2005 Mar.; 30(2): 95-98.
8. Suzuki, Y., Atsumi, Y., Matsuoka, K., Nishimaki, K., Ohta, S., Taniyama, M., Muramatsu, T.: Mitochondrial tRNA (Leu (UUR)) Mutation at Position 3243 Detected in Patients with Type 1 Diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2005 Jan.;

67(1): 92-94.

9. Yasukawa, T., Kirino, Y., Ishii, N., Lehtinen, SK., Jacobs, HT., Makifuchi, T., Fukuhara, N., Ohta, S., Suzuki, T., and Watanabe, K.: Wobble modification deficiency in mutant tRNAs in patients with mitochondrial diseases. *FEBS Lett.* 2005 May; 579(13):2948-2952.
10. Shidara, Y., Yamagata, K., Kanamori, T., Nakano, K., Kwong, JQ., Manfredi, G., Oda, H., Ohta, S.: Positive Contribution of Pathogenic Mutations in the Mitochondrial Genome to the Promotion of Cancer by Prevention from Apoptosis. *Cancer Res.* 2005 Mar.; 65(5): 1655-1663.
11. 太田成男：アルツハイマー病におけるミトコンドリア機能低下、酸化ストレスの役割；特集アルツハイマー病研究の最前線—基礎と臨床 神経研究の進歩 2005；49(3)：357-366.
12. 大澤郁朗・太田成男：アルツハイマー病の危険因子である酵素活性欠損型アルデヒド脱水素酵素 2 遺伝子—その分子メカニズムとモデル動物の開発— 日本認知症学会誌 2005；19(3)(通巻 61)：284-295.

2. 学会発表

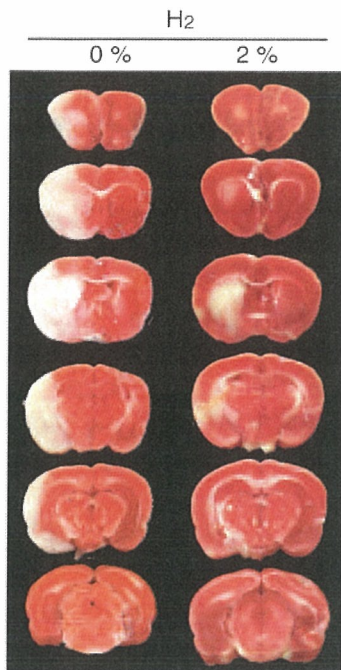
1. Ohsawa, I., Nishimaki, K., Murakami, Y., Suzuki, Y., Ishikawa, M., Ohta, S: Neurodegeneration in mice expressing a dominant negative form of mitochondrial aldehyde dehydrogenase. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Kyoto, 2006. 6.
2. Ohsawa, I.: Role of Mitochondrial aldehyde dehydrogenase in the onset of Alzheimer's Disease. The 10th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders. Madrid Spain, 2006. 7.
3. 太田成男：ミトコンドリアから発せられる活性酸素の消去. 第 11 回酸素ダイナミクス研究会, 東京. 2006. 9.
4. 太田成男：ミトコンドリアから広がる事業の可能性. 第 7 回川崎ライフサイエンスセミナー, 2006.6.
5. 太田成男：ミトコンドリアはどこまで病気と健康に関与するか？第 6 回日本ミトコンドリア学会年会, 2006.12.
6. Ohsawa, I., Nishimaki, K., Murakami, Y., Suzuki, Y., Ishikawa, M., Ohta, S.: Brain degeneration and

- decline in spatial cognitive ability in ALDH2-deficient mice. 第 25 回日本認知症学会学術集会, 2006.10.
7. Murakami, Y., Ohsawa, I., Kasahara, T., Ohta, S.: Detoxification of 4-hydroxy-2-nonenal by ABAD. 第 25 回日本認知症学会学術集会, 2006.10.
8. 大澤郁朗, 石川正洋, 高橋久美子, 渡辺めぐみ¹, 西槇貴代美, 山縣久美, 桂研一郎¹⁾, 麻生定光, 太田成男: ヒドロキシラジカルの選択的消去による細胞死抑制. 第 6 回日本ミトコンドリア学会年会, 2006.12.
9. 西槇貴代美, 大澤郁朗, 村上弥生, 石川正洋, 太田成男: アルデヒド脱水素酵素 2 欠損マウスの加齢に伴う認知能力低下と脳の変性. 第 6 回日本ミトコンドリア学会年会, 2006.12.
10. 村上弥生, 大澤郁朗, 笠原 忠, 太田成男: ミトコンドリアに局在するアミロイドβ結合アルコール脱水素酵素のアルデヒド障害に対する細胞保護効果. 第 6 回日本ミトコンドリア学会年会, 2006.12.
11. Ohta, S.: Studies on multiple functional mitochondria from Basic aspects towards Medical applications. FinMIT/J-Mit Joint Meeting, 2005.11.
12. Ohsawa, I., Nishimaki, K., Murakami, Y., Suzuki, Y., Ishikawa, M., Ohta, S.: Deficiency in a mitochondrial aldehyde dehydrogenase promotes oxidative stress and the onset of Alzheimer's disease: Its molecular mechanisms and animal models. International Conference on Mitochondria and Life 2005, 2005.12.
13. Nishimaki, K., Ohsawa, I., Suzuki, Y., Nukina, T., Kodaira, E., Yagihashi, S., Ohta, S. Development of amyotrophy in mice overexpressing a dominant negative form of mitochondrial aldehyde dehydrogenase. International Conference on Mitochondria and Life 2005, 2005.12.
14. Murakami, Y., Ohsawa, I., Ihara, Y., Yamaguchi, H., Kasahara, T., Ohta, S.: Somatic mutations in mitochondrial DNA of the brain from Alzheimer's disease patients. International Conference on Mitochondria and Life 2005, 2005.12.
15. 太田成男: 多彩な機能をもつミトコンドリア. 第 23 回内分泌・代謝学セミナー. 2005. 8.
16. 太田成男: アルツハイマー病の危険因子としての ALDH2 遺伝子多型、脳梗塞の危険因子としての ADH2 遺伝子多型 第 40 回日本アルコール・薬物医学会総会. 特別講演 2005. 9.
17. 大澤郁朗, 太田成男: 水素分子(H₂)による酸化ストレス細胞死の抑制. 第 78 回日本生化学会大会, 2005. 10.
18. 石井徳恵, 西槇貴代美, 大澤郁朗, 太田成男: トランスジェニック DAL マウスで惹起される酸化ストレスの飽和水素水飲用による抑制. 第 78 回日本生化学会大会, 2005. 10.
19. 福田慶一, 麻生定光, 大澤郁朗, 山本保博, 太田成男: 水素ガスによる活性酸素フリーラジカルの除去—虚血再灌流傷害の軽減効果. 第 78 回日本生化学会大会, 2005. 10.
20. 大澤郁朗, 西槇貴代美, 鈴木悠子, 太田成男: ミトコンドリア型アルデヒド脱水素酵素活性抑制トランスジェニックマウスにおける中枢神経系の加齢に伴う変性. 第 24 回日本痴呆学会, 2005. 9.

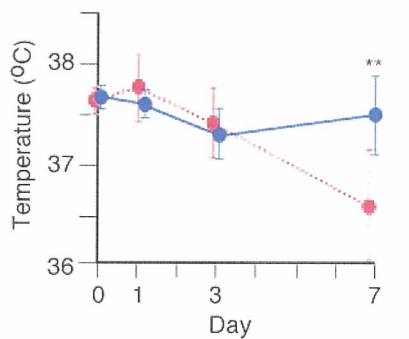
G. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許出願

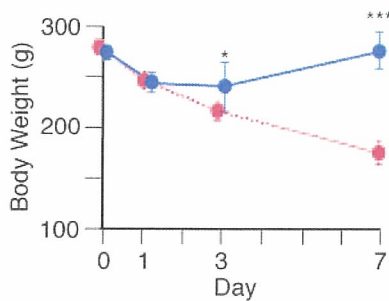
太田成男・大澤郁朗: 特願 2005-238572. 生体内の有害なフリーラジカル除去剤及びその吸引装置



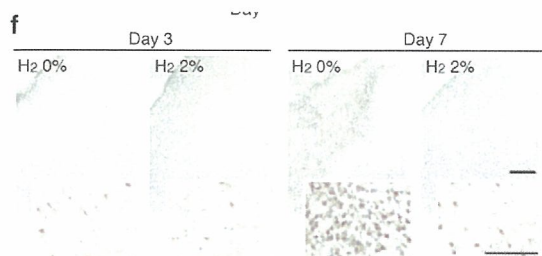
脳梗塞モデルラット脳の梗塞巣。左は水素ガスなし。右は脳梗塞・再灌流時に水素を2%吸引させた場合。TTC染色で生きた細胞を赤く染色した。白い部分が死細胞領域。



脳梗塞再灌流時に2%水素を吸引させたときとさせない時の体温の変化。水素を吸引させると体温の改善が著しい。



脳梗塞再灌流時に2%水素を吸引させたときとさせない時の体重の変化。水素を吸引させると体重の改善が著しい。



水素を吸引させた時とさせなかった時の3日後と7日後のミクログリアの集積。ミクログリアの集積が少ないことは炎症を抑制していることを示している。

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

「A β 結合アルコール脱水素酵素の酸化ストレス防御機構」に関する研究
(トランスジェニックマウスを用いたミトコンドリア酸化ストレスの抑制による
アルツハイマー病予防・治療法の開発の分担研究)

分担研究者 大澤郁朗（日本医科大学老人病研究所講師）
主任研究者 太田成男（日本医科大学大学院医学研究科 教授）

研究要旨： アルツハイマー病（AD）患者脳における神経細胞死誘導機構として、 β アミロイド（A β ）によるミトコンドリア機能障害が提唱されている。A β はA β 結合アルコール脱水素酵素（ABAD）と結合し、ミトコンドリアへ輸送されミトコンドリア機能の低下をもたらすことが報告されているが、その機構は不明である。ABADはアルデヒド代謝に関わる。一方、AD患者脳においては 4-hydroxy-2-nonenal（HNE）などの過酸化脂質から生じる毒性の高いアルデヒド類が蓄積する。そこで報告者は、ABADがこれらのアルデヒド類の代謝に関わり、その活性低下が神経細胞死を促進している可能性に着目した。そこで、呼吸鎖阻害剤によりミトコンドリアで活性酸素種を発生させてHNEの蓄積と細胞死を誘導したところ、ABAD過剰発現細胞では細胞死が抑制された。この細胞に直接HNEを作用させるとすみやかにHNEは分解され、その細胞死も抑制された。以上の結果から、ABADはHNEの解毒に中心的役割を担っているものと考えられる。

A. 研究目的

近年、ミトコンドリアとアルツハイマー病（AD）との関連が注目されている。AD患者脳において、ミトコンドリア機能低下がみられる。ミトコンドリアはエネルギー産生の中心を担うオルガネラであり、電子伝達系にて漏れ出した電子を酸素がトラップすることで、活性酸素（ROS）が発生する。ミトコンドリアの機能低下がおきているAD患者脳では、ROSの発生により産生される過酸化脂質の蓄積も報告されている。

また、ADの特徴的な病理所見には老人斑がある。老人斑の主成分はアミロイド β タンパク質（A β ）の沈着物であり、A β の神経細胞毒性がADの原因と考えられていた。培養細胞培地中へのA β の添加は神経細胞死を引き起こす。しかし、このときのA β は生理的濃度をはるかに超えている。また、患者脳において、神経細胞の脱落部分とA β の沈着部分に関連がない。こうした知見より、A β 単独の毒性による神経細胞死に疑問が呈され

ている。

ミトコンドリア機能低下はミトコンドリアに局在したA β が作用することにより引き起こされる報告がいくつかある。なかでもA β 結合アルコール脱水素酵素（ABAD）がA β と結合し、ミトコンドリアにて毒性をもたらすことが報告された。しかし、ABAD-A β 相互作用が毒性をもたらす作用機序は現在のところ解明されていない。ABADはミトコンドリアにおける脂肪酸からのエネルギー生産をおこなう β -酸化における酵素のひとつである。A β 結合によるABADの β -酸化能低下が報告させている。しかし、脳におけるエネルギー生産は脂肪酸による β -酸化よりもグルコースによる糖代謝に依存している。 β -酸化に関わる酵素群の脳におけるエネルギー生産への寄与が低いために、ABAD-A β 結合体が毒性をもたらすとは考えづらい。ABADの脳における β -酸化以外の役割がADの発症に関わる可能性について考えることにした。ここで、AD患者脳において過酸化脂質の代

謝産物である 4-ヒドロキシノネナール (4-HNE) が蓄積しているという報告について着目した。4-HNE は毒性の高いアルデヒドであり、タンパク質や核酸と結合して細胞内に蓄積がおこなわれる。4-HNE にたいする神経細胞の脆弱性は AD 発症リスクとなることが報告されている。私は、アルコール脱水素酵素である ABAD がアルデヒドである 4-HNE の代謝し解毒するという仮説をたて、これを立証することにした。ALDH2 酵素活性の欠損は、アルツハイマー病をはじめ糖尿病、腫瘍、高血圧、心筋梗塞の危険因子であることが報告されている。しかし、そのメカニズムの解明にはまだ多くの研究が必要である。この欠損は、アジア系人種に特徴的なものであり、国民の健康維持の為には日本においてこの研究を進めることが極めて重要である。我々は疫学調査と培養細胞を用いた実験から、ALDH2 が酸化ストレスに対する防御機構の一部であることを報告してきた。

本研究では ALDH2 酵素活性欠損マウスを作製し、この欠損が個体レベルで酸化ストレスに対する脆弱性を惹起するか検討した。ALDH2 のドミナント・ネガティブである ALDH2*2 を発現させた DAL (dominant-negative of ALDH2)マウスのうち、筋特異的に発現させたマウスについて、その発育過程での障害と酸化ストレス防御剤としてのビタミン E の効果について解析した。また、脳で ALDH2*2 を発現する DAL マウスを作製し、大脳皮質初代培養細胞をもちいて、酸化ストレスに対する脆弱性を調べた。

B. C. 研究方法と研究成果

ABAD の培養細胞における機能を解析した。ここで、ABAD はノックダウンさせることによる β -酸化の遮断は、細胞障害をひきおこし、細胞を観察するうえで弊害となる。よって、ABAD を過剰発現にすることで、 β -酸化以外の機能を解析した。ヒト子宮頸癌由来

HeLa 細胞に ABAD cDNA を遺伝子導入し、恒常的に ABAD を過剰発現させた。HeLa 細胞はミトコンドリアの密度が高く、その形態を観察しやすい。さらに β -酸化が他の細胞と比較し減少しているため、ABAD を過剰発現させることによって、その機能を解析しやすい。過剰発現させた ABAD は、内因性 ABAD と同様に、ミトコンドリアに局在していた。

ROS の発生剤である過酸化水素を処理すると、ABAD 過剰発現によりこの細胞死は減少していた。また、ミトコンドリア電子伝達系阻害薬であるアンチマイシン A により ROS を発生させた場合にも、ABAD 過剰発現により細胞死は抑制されていた。よって、ROS の発生機序によらず、ROS を介して誘導された細胞死に対して ABAD による抑制効果が確認できた。

ROS により脂質は過酸化され、その代謝産物である 4-HNE が蓄積する。アンチマイシン A による 4-HNE の蓄積を抗 4-HNE 抗体を用いて細胞免疫染色にて検出すると、細胞内における 4-HNE の蓄積は ABAD の過剰発現により抑制されていた。よって、ABAD は細胞内において発生した 4-HNE を分解している可能性を示唆していた。

次に、4-HNE 標品を細胞培養液に添加することによる 4-HNE の直接的な細胞死を ABAD が抑制するか検討したところ、予想通りに ABAD 過剰発現により細胞死は減少していた。そこで、4-HNE 添加後の細胞培養液を回収し、ジクロロメタンにて抽出した残留 4-HNE を TLC プレートにて展開し、検出した ($R_f=0.49$)。ABAD 過剰発現細胞培養液では残留 4-HNE の減少が促進されていた。これは、添加した 4-HNE の受動的核酸により細胞内に取り込まれ、代謝されたためである。細胞内において過剰に発現している ABAD により 4-HNE は 1, 4-ジヒドロキシノネンに代謝される。以上の結果から、ABAD による 4-HNE の代謝機能亢進が細胞を保護している

とわかった。

ここで、 $A\beta$ による ABAD の 4-HNE 代謝への影響を検討した。ABAD 過剰発現において、 $A\beta$ 前処理により細胞培養液に添加した 4-HNE の残留量は増加していた。また、ABAD による細胞保護効果も $A\beta$ 前処理によりキャンセルされた。つまり、 $A\beta$ が ABAD による 4-HNE 代謝を阻害し、その細胞保護効果を減弱させることを示している。

最後にヒト脳神経芽細胞種由来 SH-SY5Y 細胞において、遺伝子導入試薬 Lipofectamin2000®を用いて、一過性に遺伝子導入し、ABAD を過剰発現させた。大部分の ABAD は、ミトコンドリアに局在していた。細胞の由来によらず、ミトコンドリアに ABAD は局在していた。遺伝子導入の指標として蛍光タンパク質である Enhanced green fluorescent protein (GFP) を ABAD と共発現させ、EGFP 発現細胞を数えることで生細胞とした。この系においても HeLa 細胞と同様に 4-HNE 刺激による細胞死に対して ABAD 過剰発現細胞は抵抗性を示した。よって、神経細胞系においても ABAD は 4-HNE を代謝し、細胞を保護することが示された。

D. 考察

今回、ABAD が 4-HNE を代謝し、細胞を酸化ストレスより保護する役割を行っていることを見いだした。ABAD は脳においても神経細胞を酸化ストレスから保護しているものと考えられる。しかし、加齢による $A\beta$ の生成がこの ABAD の細胞保護効果を無効にするため、AD 病態における神経細胞死を引き起こされると結論づけられた (図)。

E. 結論

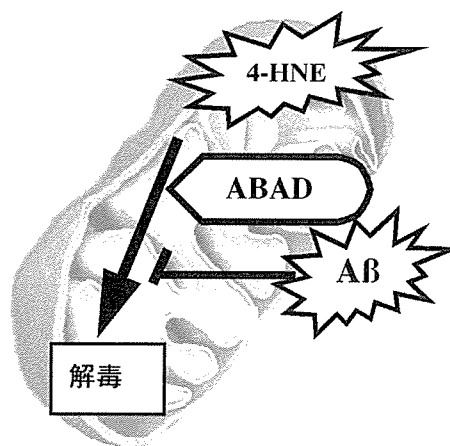
ABAD の細胞保護効果を維持する方法を見いだすことができれば、AD の発症を予防できる可能性があり、今後の疾患予防には重要な課題となる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Murakami Y, Ohsawa I, Kasahara T, Ohta S.

Cytoprotective role of mitochondrial amyloid beta peptide-binding alcohol dehydrogenase against a cytotoxic aldehyde. *Neurobiol. Aging Revised*



2. 学会発表

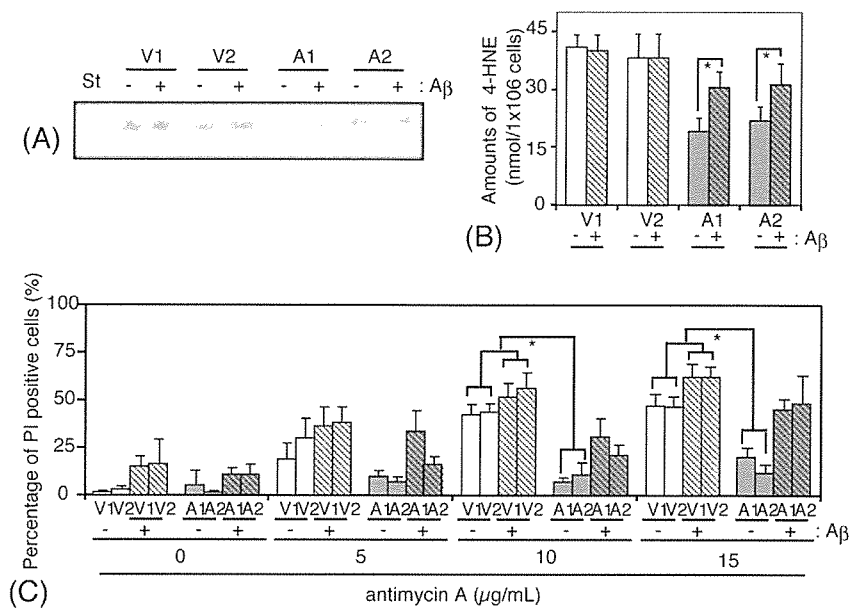
ミトコンドリアに局在するアミロイド β 結合アルコール脱水素酵素のアルデヒド障害に対する細胞保護効果 第6回日本ミトコンドリア学会年会 2006.12.横浜

Detoxification of 4-hydroxy-2-nonenal by ABAD 第25回日本認知症学会 2006.10.広島

Murakami, Y., Ohsawa, I., Ihara, Y., Yamaguchi, H., Kasahara, T.¹, Ohta, S.: Somatic mutations in mitochondrial DNA of the brain from Alzheimer's disease patients. International Conference on Mitochondria and Life 2005, 2005.12.

G. 知的財産の出願・登録状況

なし



ABAD activity for cytoprotection is inhibited by A β . (A) Representative patterns of TLC for quantifying 4-HNE. Transfectants were pretreated with 1 μ g/mL A β for 14 hr and exposed to external 4-HNE (250 μ M) for 30 min. External 4-HNE was extracted from the supernatant medium, spotted onto TLC and visualized as described in Materials and Methods. Lanes indicate control (V1 and V2) and ABAD transfectants (A1 and A2). A β + and - indicate with and without preincubation with aggregated A β . St indicates a spot of standard 4-HNE (12.5 nmol). (B) Intensities of spots with Rf = 0.4 quantified with NIH image to calculate the amounts of 4-HNE remaining in the supernatant. Lanes are shown as in (A). Data are shown as the mean \pm SD of four independent experiments. *p<0.05 in Student's t-test. (C) Percentage of dead cells of each transfectant after pretreatment with A β for 14 hr, followed by treatment with antimycin A for 24 hr. After treatment, cells were stained with PI (red) and/or Hoechst33342 (blue). Total (blue) and dead cells (pink) were enumerated under a fluorescent microscope. Lanes are shown as in (A). Data are the mean \pm SD of 4 independent experiments and *p<0.05 in Student's t-test.

財団法人 長寿科学振興財団
長寿科学総合研究推進事業
外国への日本人研究者派遣事業
研究報告書

「ミトコンドリアのシナプスへの輸送、及び、シナプスでの機能解析により、アルツハイマー病の発症とミトコンドリア量の関連性について解明する」に関する研究
(トランスジェニックマウスを用いたミトコンドリア酸化ストレスの抑制によるアルツハイマー病予防・治療法の開発の推進研究)

派遣研究者 上村尚美 (日本医科大学老人病研究所 助手)
主任研究者 太田成男 (日本医科大学大学院医学研究科 教授)

派遣先および研究指導者

国 名 : 米国 U.S.A.
所 在 地 : メリーランド州 ボルチモア市 Baltimore, MD
名 称 : 米国国立老化研究所 National Institute on Aging
職 名 : 室長 Chief
氏 名 : マーク P. マットソン Mark P. Mattson

派遣期間

平成18年 8月 1日 ~ 平成19年 1月26日 (179日間)

研究要旨：神経細胞においてシナプス形成には、樹状突起へのミトコンドリアの分布が必須であり、この分布は外界からの刺激に応じたミトコンドリアのダイナミクス（分裂と融合）を通じて行われる。本研究では、ミトコンドリアダイナミクス調節因子の変化とアミロイドベーター・ペプチドがミトコンドリアの分布に及ぼす影響を解析した。その結果、成熟した正常神経細胞では幼若神経細胞に比べ、ミトコンドリアダイナミクスが盛んであることが明らかとなった。従って、成熟した神経細胞では、ミトコンドリア間の物質交換によりミトコンドリアの機能を維持している可能性が示唆された。また、幼若神経細胞では、アミロイドベーター・ペプチドにより、神経突起へのミトコンドリアの分布が阻害されることがわかった。

A. 研究目的

ミトコンドリアの形状や数は細胞の種類によって様々であり、同じ細胞でも常に分裂と融合を繰り返しダイナミックに変化する。増殖が盛んな細胞ではもちろん、神経細胞のように増殖を終了した細胞においても、ミトコンドリアのダイナミクスは盛んに起こっている。

神経細胞においては、シナプス形成には樹状突起へのミトコンドリアの分布が必須であり、この分布は外界からの刺激に応じたミトコンドリアのダイナミクス（分裂と融合）を通じて行われる。また、アルツハイマー病（AD）やパー

キンソン病（PD）等の神経変性疾患においてミトコンドリアの形態異常が報告されている。また、*in vitro* の神経細胞の初代培養系において、アミロイドベーター・ペプチドによりミトコンドリアが断片化し、細胞死が起こることが報告されている。

神経細胞でミトコンドリアの分布が大きく変化するのは、神経細胞が神経幹細胞から分化し、成熟していく過程である。しかし、神経細胞を用いた解析のほとんどは成熟した神経細胞であり、成熟過程における解析はほとんどなされていない。

本研究では、神経細胞成熟過程におけるミトコンドリア分布変化と、ミトコンドリアダイナミクス調節因子の解析、及び、神経細胞成熟過程でアミロイドベーター・ペプチドがミトコンドリアに及ぼす影響を調べることを目的として研究を行った。

B. 研究方法

初代培養神経細胞を用いた *in vitro* の系において以下の解析を行った。

- 1) 神経細胞のミトコンドリアを染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察を行い、ミトコンドリアの形態や分布が神経細胞成熟過程でどのように変化していくかを調べた。
- 2) 神経成熟過程でミトコンドリアの融合と分裂に関する因子の量的な変化をウェスタンブロットングにより調べた。
- 3) 幼若神経細胞でのアミロイドベーター・ペプチドによるミトコンドリアの変化を共焦点レーザー顕微鏡による観察で調べた。

C. 研究成果

1) ミトコンドリアの形態と分布の変化

単離直後、つまり、*in vitro* で培養を開始した時点での神経細胞はまだ丸く、ミトコンドリアは核の隣に集まって局在していた。培養後1日で神経突起を伸ばし始め、ミトコンドリアも一部が神経突起に局在するようになった。培養が進むに従って神経突起も伸長していき、より多くのミトコンドリアが神経突起に局在するようになった。神経突起に局在するミトコンドリアの数は、細胞あたり、培養1日後で 15.2 個、3日後で 51.0 個、5日後で 87.0 個と増加した。7日後以降は、細胞同士の神経突起が複雑に絡み合うため細胞あたりのミトコンドリア数を数えることはできなかったが、より増加している様子が観察できた。一方、ミトコンドリアの平均の長さは1日後で 1.27 μm 、3日後で 1.32 μm 、5日後で 1.31 μm 、7日後で 1.31 μm 、10日後で 1.32 μm とほとんど変化しなかった。これらの結果より、神経細胞の成熟過程において神経突起に局在するミトコンドリアは増加するが、形態は変化しないことが明らかとなった。

2) ミトコンドリアの融合と分裂に関する因子の量的な変化

次に、ミトコンドリアダイナミクス（分裂と融

合）について調べた。ミトコンドリアの分裂因子として Drp1、Fis1、融合因子として OPA1、Mfn1、Mfn2 が知られている。これらの因子が神経細胞成熟過程でどのように変化するかをウェスタンブロットングで調べた。その結果、分裂因子の Drp1、融合因子の OPA1 の大きいアイソフォームが顕著に増加し、融合因子の Mfn2 がゆるやかに増加することがわかった。一方、ミトコンドリアに局在する酵素の一つであるシトクローム c オキシダーゼタンパク質は変化しないことがわかった。

3) 幼若神経細胞でのアミロイドベーター・ペプチドによるミトコンドリアの変化

これまでの報告から、アミロイドベーター・ペプチドは神経細胞の細胞死を引き起こすが、この過程で神経突起に局在するミトコンドリアが断片化することが知られている。これは成熟した神経細胞での報告であり、幼若な神経細胞でミトコンドリアがどのようになるか不明であった。そこで、幼若な神経細胞にアミロイドベーター・ペプチドを添加したところ、神経突起に局在するミトコンドリアの数は、コントロール細胞で27.7個に対し、2 μM アミロイドベーター・ペプチド添加細胞で 6.8 個と著しく減少していることがわかった。

D. 考察

本派遣研究の結果より、神経細胞成熟過程において神経突起の伸長と共に神経突起に分布するミトコンドリアの数も増加することがわかった。しかし、細胞の全タンパク量と比べ、ミトコンドリアに局在する酵素のタンパク量は変化しなかった。このことから、ミトコンドリアの増加は神経突起の伸長に比例した増加であることが示された。さらに、個々のミトコンドリアの形態は変化しないことがわかった。一方、ミトコンドリアの分裂因子、融合因子は共に著しく増加していることがわかった。ミトコンドリアの分裂と融合は、ミトコンドリアの形態や分布を調節している他に、ミトコンドリア内の物質をミトコンドリア間で交換することによりミトコンドリアの機能を維持する役割を持っている。成熟した神経細胞は、幼若神経細胞とミトコンドリアの形態は変わらないものの、分裂と融合を盛んに行い、ミトコンドリア間の物質交換によりミトコンドリアの機能を維持している

ことが示唆された。また、幼若神経細胞では、アミロイドベーター・ペプチドによりミトコンドリアの神経突起への局在が阻害されることがわかった。この局在の阻害とミトコンドリアの融合因子、分裂因子との関わりについては今後の課題である。

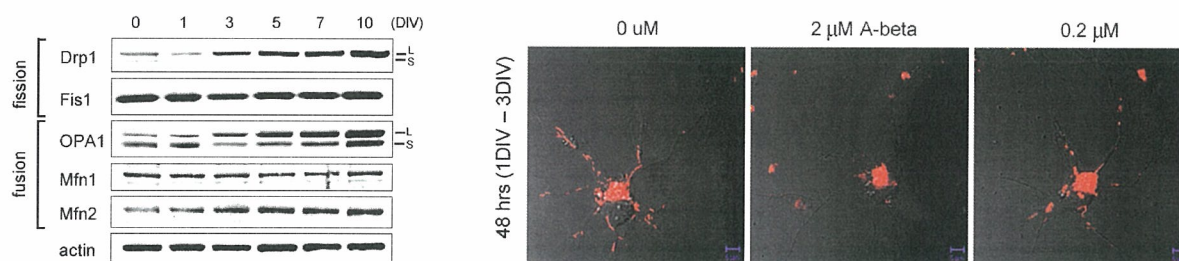
E. 結論

成熟した正常神経細胞では幼若神経細胞に比べ、ミトコンドリアダイナミクス（分裂と融合）が盛んであることが明らかとなった。従って、成熟した神経細胞では、ミトコンドリア間の物

質交換によりミトコンドリアの機能を維持している可能性が示唆された。また、幼若神経細胞では、アミロイドベーター・ペプチドによりミトコンドリアの神経突起への局在が阻害されることがわかった。

F. 研究発表

G. 知的財産の出願・登録状況



(左図) 神経細胞成熟過程におけるミトコンドリアの分裂因子、融合因子のタンパク質量の変化
ラット胎生18日の胎児脳の大脳皮質より単離した神経細胞を培養し、神経細胞成熟過程でのミトコンドリア分裂・融合因子の変化をウェスタンブロッティングにより調べた。ミトコンドリア分裂因子の Drp1 の大きいアイソフォームと、ミトコンドリア融合因子の OPA1 の大きいアイソフォームが神経細胞成熟過程で著しく増加していた。(DIV; days *in vitro*)

(右図) 幼若神経細胞でのアミロイドベーター・ペプチドによるミトコンドリアの変化
ラット胎生18日の胎児脳の海馬より単離した神経細胞を1日培養した後、アミロイドベーター・ペプチドを培地中に添加した。さらに48時間培養後、ミトコンドリアを染色した。幼若神経細胞では、アミロイドベーター・ペプチドの添加により、神経突起に局在するミトコンドリアの数が著しく減少した。