

200811020A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

# 臓器特異的ストレス応答探索マウスを用いた 疾病予防法の開発

平成20年度 総括研究報告書

研究代表者 佐野元昭

平成21年3月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

臓器特異的ストレス応答探索マウスを用いた  
疾病予防法の開発

平成 20 年度 総括研究報告書

研究代表者 佐野 元昭

平成 21 年 3 月

## 目 次

I. 総括研究報告	
臓器特異的ストレス応答探索マウスを用いた 疾病予防法の開発に関する研究	1
佐野 元昭	
II. 分担研究報告	
臓器特異的ストレス応答探索マウスを用いた 疾病予防法の開発に関する研究	11
太田 成男	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	14
IV. 研究成果の刊行物・別刷	20

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
総括研究報告書

臓器特異的ストレス応答探索マウスを用いた疾病予防法の開発に関する研究

研究代表者 佐野元昭 慶應義塾大学医学部 再生医学教室講師

研究要旨

アルデヒドは活性酸素による生体膜多価不飽和脂肪酸の攻撃から始まる一連の脂質過酸化連鎖反応の結果生じる代謝産物である。アルデヒドは電子親和性が強く蛋白質や DNA と付加体を形成し細胞障害性に作用するため、心筋梗塞、脳卒中などの動脈硬化性心血管疾患、がん、アルツハイマー病などの認知症や老化などの酸化ストレス関連性疾患の成因と密接に関わっている。一方で、細胞はアルデヒドによる生体内高分子障害を感知しシグナル伝達機構を活性化させて抗酸化ストレス機構を誘導し恒常性を維持する能力を保持している。これを「ストレス応答ホルメシス」という。ストレス応答ホルメシスは、酸化ストレス関連性疾患に対する counter regulatory response であり、その分子メカニズムを解明し、ストレス応答ホルメシスを特異的に賦活化する方法を開発できれば、酸化ストレス関連性疾患の予防や治療に広く応用可能となる。我々は、内因性に生じるアルデヒドが慢性的に蓄積し、アルツハイマー病様の認知症、筋萎縮などの加齢症状を早期から発症するマウスを作製した (Journal of Neuroscience 2008, Nature Medicine revised)。本研究では、このアルデヒド蓄積モデルマウスの臓器特異的ストレス応答機構の分子機序を明らかにしていく。

分担研究者 太田成男  
日本医科大学大学院 教授

心筋梗塞の病態形成に深く関与する虚血・再灌流障害に対する抵抗力を賦与する潜在的ストレス応答機構の解明に成功した (Nature Medicine revised)。

A.目的

がん、心筋梗塞・脳卒中などの動脈硬化性心血管疾患、アルツハイマー病などの認知症は、生体内酸化促進物質、外来異物（前癌原物質）などの親電子性物質に対するストレス応答機転の破綻によって引き起こされる。我々は、親電子性物質であるアルデヒドの代謝障害モデル動物 aldehyde dehydrogenase (ALDH)2\*2 トランスジェニックマウスを作製し、心臓において、

(I) 肝臓での薬物代謝酵素誘導の分子メカニズム解明と化学発癌に対する抵抗性の検討

(II) 神経細胞における酸化ストレス適応機転の解明とその破綻の分子メカニズムの解明

(III) 血管におけるアルデヒドに対するストレス応答機構の解明と動脈硬化惹起性メタボリックストレスに対する忍容性の検討

## 必要性

ヒトの癌の7-8割は環境中の化学物質(前癌原物質)によっておきる。また、活性酸素やラジカルによる酸化ストレスは、血管内皮障害、神経・心筋細胞障害から動脈硬化性心血管疾患、認知症などの疾病発症と密接に関連している。しかし、これら親電子性物質に対する内因性のストレス応答を、臓器レベルで解明し、さらになん、動脈硬化性心血管疾患、認知症などの加齢性疾患の発症予防にどのように貢献できるのかを判断する適切な動物モデルは存在しなかった。

## 研究の学術的背景

我々は、親電子性物質アルデヒドの代謝過程に干渉することによって臓器特異的なストレス応答機構を観察できる疾患モデル動物 *aldehyde dehydrogenase (ALDH) 2\*2 transgenic* マウスを作成することに成功した。



図1. ALDH2\*2 TGマウスは老化の表現系を示す

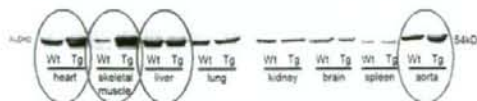
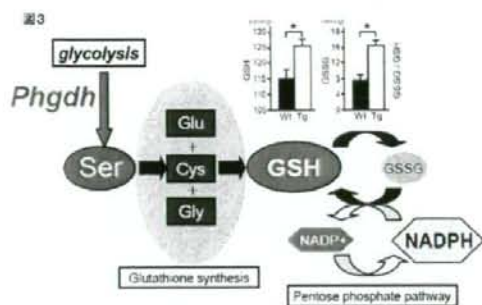


図2. 肝臓ではALDH2タンパク質発現量に有意な差はみられなかった

ALDH2 はミトコンドリアに局在しアルデヒドをカルボキシル化することにより解毒する抗酸化酵素である。最近、ALDH2を活性化する *small compound* が、心筋梗塞に対して心臓保護的に作

用することが報告された (Science 2008)。ALDH2の不活性型変異体 ALDH2\*2 は *dominant negative* として作用するが、我々は ALDH2\*2 を *chicken  $\alpha$ -actin* プロモーターを用いて全身の筋肉に過剰発現させたトランスジェニック (ALDH2\*2 TG) マウスを作成した。ALDH2\*2 は、骨格筋、心筋、血管平滑筋などの筋肉組織に強く発現していたが、肝臓など他の臓器では発現していなかった。ALDH2\*2 が発現している組織では 4-hydroxy- 2-nonenal (4-HNE) をはじめとする多彩なアルデヒドに対する ALDH 活性が抑制され、組織に 4-HNE 付加体の蓄積がみられ、筋肉の委縮、脂肪の減少、骨粗鬆症、脊柱後湾症など表現型を示した(図 1, 2)。



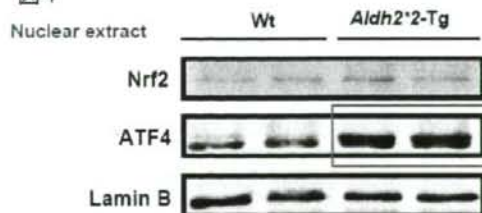
これまで ALDH2\*2 TG マウスの心臓におけるストレス応答機構を解明してきた。その結果、心臓では、還元型グルタチオン濃度を高く維持することによってアルデヒドに代償していることが分かった。還元型グルタチオン濃度の維持には、グルタチオンの前駆体となるアミノ酸の合成経路(特に、セリンの合成経路)の活性化と、ペントースリン酸回路の活性化が重要な役割を担っていた (図 3)。

セリンは、グリシンやシステインの合成に使用さ

れる。解糖系の中間代謝産物からセリンを合成する経路の律速段階酵素 3-phosphoglycerate dehydrogenase (Phgdh) は、ALDH2\*2 TG マウスの心臓にだけでなく、心筋梗塞（虚血再灌流障害）など酸化ストレス（アルデヒド）に暴露された心臓においてその発現が上昇していた。反対に、Phgdh を心臓特異的にノックアウトしたマウスは、虚血再灌流障害に対して脆弱性を示したことから、Phgdh 依存性のセリン合成経路の活性化は、心臓におけるアルデヒドに対するストレス応答に対して鍵を握る代謝経路であることが明らかになった (Nature Medicine revised)。

さらに、この代謝経路のリモデリングには、転写因子 activated transcription factor 4 (ATF4) が重要で、Nrf2 は関与していないことも明らかにした (図 4)。

図 4



当該分野における本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義

従来の酸化ストレスの研究は外から単一の過酸化脂質やアルデヒドを投与したり、doxorubicin や paraquat などの酸化ストレス惹起性薬物を投与するなどの急性の組織障害を観察する実験系に限られ、内因性のアルデヒドによる持続的な

組織障害に対する生体のストレス応答を検討できるいいモデルマウスが存在しなかった。ALDH2\*2 TG マウスは、アルデヒドの解毒過程に干渉することによって慢性的にアルデヒドが組織に蓄積していく世界ではじめてのモデルである。内因性、外因性異物代謝の中心的臓器である薬物肝臓でのストレス応答機構の解明は、全身レベルでのアルデヒドによる臓器障害を軽減し、加齢性疾患の発症を予防する新規治療法の開発につながると確信する。

## B. 研究の方法

全身組織（特に筋肉系）にアルデヒド蓄積した ALDH2\*2 TG マウスの肝臓でのストレス応答ホルメシス機構をトランスクリプトーム解析・メタボローム解析によって検討し、さらにその背景にある分子メカニズムの解明をめざす。

1. ALDH2\*2 TG マウスの肝臓における遺伝子発現と代謝産物の変化の網羅的解析
2. アルデヒドに対するストレス応答としての代謝経路の変化の背景にある分子機序の解明
  - 2-1. Nrf2 ノックアウトマウスの掛け合わせ
  - 2-2. アセトアミノフェンの用量反応（毒性）曲線の検討と代謝応答の比較検討
  - 2-3. ALDH2\*2 TG マウスの肝臓において観察される AMPK の活性化の意義の検討

平成 20 年度は、ALDH2\*2 TG マウスの肝臓を網羅的に解析した。包括的比較トランスクリプトーム・メタボローム解析の結果、ALDH2\*2 TG マウスの肝臓では外来異物に対する第 I 相、第 II 相の薬物代謝機構の強い誘導が観察された。現在、引き続き、アセトアミノフェン誘発性肝障害に対する用量反応〔毒性〕曲線の検討を行っている。また、ノックアウトマウスとの掛け合

わせにより **Nrf2** 経路の関与を検討中である。薬物代謝機構は化学発癌にも深く関与しており、今後、前癌原物質に対する感受性の検討をおこない発癌予防の分子基盤を解明していく予定である。

### C. 研究結果

#### ALDH2\*2 TG マウスの肝臓の組織学的変化、遺伝子発現と代謝産物の網羅的解析

ALDH2\*2 TG マウスの肝臓は組織学的に傍血管領域に局所的な単球の浸潤を認めたが、肝臓の小葉構造は保たれていた。また、血液中の GOT、GPT 濃度は野生型と比べて上昇を認めなかった。

#### トランスクリプトーム解析

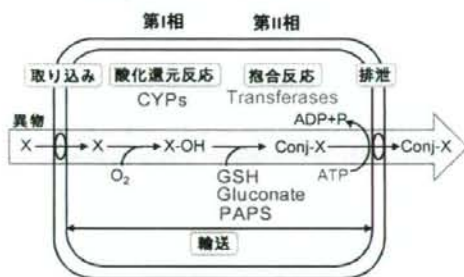


図5. 肝臓における異物代謝機構

遺伝子発現を DNA gene chip を用いて解析した。ALDH2\*2 TG マウスの肝臓では、cytochrome p450 monooxygenases (*Cyp2b9*, *Cyp2b13*, and *Cyp2b10*), flavin containing monooxygenases (*Fmo3* and *Fmo2*), sulfotransferases (*Sult3a1*, *Sult2a2*, and *Sult1d1*), glutathione S-transferase (*Gstt3*), ATP-binding cassettes transporters (*Abcd2*, *Abcc5*, *Abcg3*, *Abcc5*, *Abcg3*, and *Abcb1a*), organic anion transporter (*Sico6c1*),

metallothionein (*Mt2* and *Mt1*)の第 I 相反応 (Flavin-containing monooxygenase system, cytochrome P450)、第 II 相反応 (glutathione S-transferase)の発現が誘導されており異物代謝機構の活性化が示唆された (図 5)。硫酸抱合に使用される活性硫酸基 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) の合成酵素 sulfotransferase (*Papss2*) の発現も上昇していたが、glutathione 合成酵素 (*Gclm* and *Gclc*)、glucuronate (*Ugdh*) 合成酵素の発現に変化は見られなかった。これらの遺伝子発現に関しては Q-PCR 法で確認する。また、マクロファージにおける酸化 LDL の取り込みなどに関与している CD36 の遺伝子発現も上昇しており、この CD36 が肝臓における酸化脂質(および酸化脂質修飾タンパク質)の取り込みに関与している可能性が示唆された。大変興味深いことに PPAR gamma coactivator 1 (PGC-1)- $\alpha$  nuclear respiratory factor (NRF)-1, mitochondrial transcription factor A; TFAM) などミトコンドリア合成に関する転写制御因子群の上昇も観察された。また、*Lipg*, *Acss2*, *Cra*, *Hadhsc*, *Pdk1*, *Pdk4*, *Pparb*, *Hibadh* など脂肪酸 $\beta$ 酸化に関与する酵素群の発現上昇を認めた。

#### メタボローム解析

肝臓代謝産物をキャピラリー電気泳動質量分析計 (CE-MS) により測定した (図 6)。

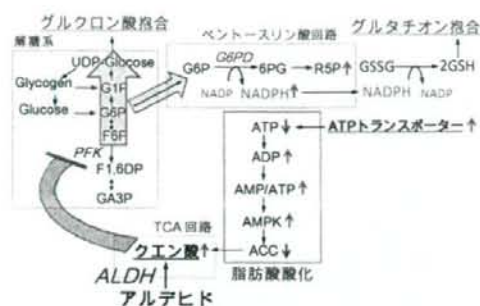


図6. ALDH2\*2 TGマウスの肝臓におけるアルデヒドに対する代謝変動

### (1) AMP/ATP 比の上昇

ALDH2\*2 TG マウスの肝臓で野生型の肝臓と比べて AMP/ATP 比の上昇を認めた。異物代謝の亢進によって ATP の消費が亢進していることが原因と考えられた。AMP-activated protein kinase (AMPK) および下流の acetyl-CoA carboxylase (ACC) のリン酸化が観察された(図 7)。

### (2) glucose biotransformation の変化

メタボローム解析の結果、glucose-6-P からペントースリン酸経路への代謝流速の変化が示唆された。解糖系の代謝産物動態から脂肪酸のβ酸化の活性化により上昇したクエン酸が、解糖系の律速酵素であるホスホフルクトキナーゼ (PFK) の活性を阻害し手いる可能性が示唆された。中心静脈周辺への glycogen 蓄積は減少しており、glucose-1-P 濃度の上昇とあわせて glycogen の分解は亢進していると考えられた。

想定された異物代謝リモデリングを確認するため、すべての炭素原子に <sup>13</sup>C-標識した glucose をマウスの腹腔内に投与し、経時的に肝臓をサンプリングして代謝を測定する“フラクソーム解析”を行う予定である。メタボローム解析の結果 UDP-glucuronate 濃度の上昇は認めなかったが、glucose-1-P から UDP-glucuronate の合成

経路への代謝流速が亢進しているか否かは大変興味深い。

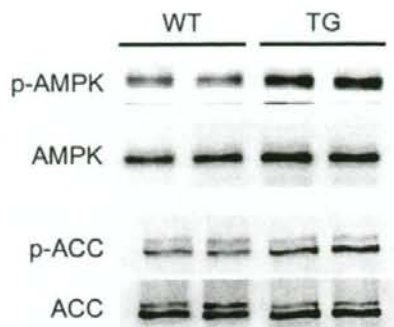


図7. ACC, AMPKのリン酸化

### ALDH2\*2 TG マウスと Nrf2 ノックアウトマウス

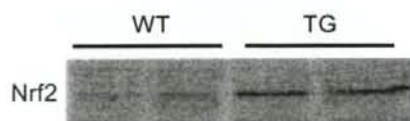


図8. 肝臓の核各分におけるNrf2タンパク質の発現量

の掛け合わせ

ALDH2\*2 TG マウスの肝臓で発現の上昇が認められた遺伝子の多くは、Nrf2 制御下にある遺伝子であった。肝臓の核タンパク質抽出液を用いて Nrf2 の抗体でウェスタンブロットを行った結果、ALDH2\*2 TG マウスの肝臓で Nrf2 タンパク質の発現量の上昇が確認された(図 8)。そこで、Nrf2 ノックアウトマウス (Motohashi H., Yamamoto M. 2004 Trends Mol Med)と ALDH2\*2 TG マウスを掛け合わせて、Nrf2 をノックアウトした ALDH2\*2 TG マウスを樹立した。これらのマウスを使って肝臓におけるアルデヒドに対する生



体防御機構の活性化がどこまでが Nrf2 経路によって説明可能か、トランスクリプトーム解析、メタボローム解析により現在検討中である。

### アセトアミノフェンの用量反応（毒性）曲線の検討と代謝応答の比較検討

アセトアミノフェンは、肝臓でグルクロン酸抱合、硫酸抱合によって代謝されるが、一部は cytochrome P450 系の酵素群によって毒性の強い代謝産物 NAPQI を生じる。NAPQI は、肝細胞壊死を引き起こす。NAPQI は、GSH 抱合によって処理される。

(Enomoto A. et al., Toxicological science 59, 169-177, 2001)。表 1 に示すように、野生型マウスと ALDH2\*2 TG マウス、Nrf2 をノックアウトした ALDH2\*2 TG マウスに 600, 900, 1200 mg/kg のアセトアミノフェンを腹腔内投与し、生存率、肝障害の程度、遺伝子発現変化、肝臓内 GSH 濃度の変化などを時間経過とともに観察中である。

表 1

APAP treatment	Gene expression (QPCR)	(hours)			
		0	2	6	24
	Ugt1a6	○	○	○	○
	Gslm	○	○	○	○
	Gsta1/2	○	○	○	○
	Slc7a11	○	○	○	○
	Hmox-1	○	○	○	○
	Nqo1	○	○	○	○
	metallothionein 2	○	○	○	○
	Sult3a1	○	○	○	○
	Papss2	○	○	○	○
	malic enzyme 2, NAD(+)-dependent, mitochondrial	○	○	○	○
	PGC-1	○	○	○	○
	Nrf1 (nuclear respiratory factor-1)	○	○	○	○
	PDK4	○	○	○	○
	alpha fetoprotein	○	○	○	○
生存率		○			○
組織	HE	○			○
	APAP-binding protein	○	○		
ALT(GPT) 血中濃度		○		○	○
GSH/GSSG		○	○	○	○
Nrf2-nuclear translocation (WB)		○	○	○	○

## AMPK の活性化の肝臓恒常性維持への関与の検討

ALDH2\*2 TG マウスの肝臓では、AMPK の活性化が確認された。AMPK の活性化は、脂肪酸 $\beta$ 酸化の活性化を介して異物代謝に必要なエネルギー源を供給したり、glucose 代謝の活性化にも関与している可能性が示唆される。dn-AMPK のアデノウイルスを尾静脈から注入して肝臓に発現させ、AMPK の活性化を遮断することによって代謝経路や遺伝子発現に及ぼす影響を検討中である。

## D. 考察

包括的比較トランスクリプトーム解析の結果、ALDH2\*2 TG マウスの肝臓では、薬物代謝の第 I 相 (Flavin-containing monooxygenase system、Cytochrome p450 system、metallothioneins)、第 II 相反応 (glutathione S-transferases)、異物を肝臓内に取り込むトランスポーター (ATP-binding cassettes) が誘導されていた。メタボローム解析では glucose から glucose-6-P  $\rightarrow$  glucose-1-P  $\rightarrow$  UDP-glucuronate にいたる代謝流速の増加が示唆されたが、定常状態では、UDP-glucuronate の増加は認められなかった。また、肝臓内 GSH 濃度も野生型と比べて変化を認めなかった。アセトアミノフェンを投与したときの代謝応答や遺伝子発現にどのような変化が認められるか、現在、詳細に検討中である。

薬物代謝酵素誘導の分子基盤として Nrf2 経路の活性化が考え、東北大学の山本雅之先生らが作られた Nrf2 ノックアウトマウス (Motohashi H, Yamamoto M. 2004 Trends Mol Med) と掛け合わせて、現在、詳細に検討中である (慶應大学：

末松誠・足立健研究グループとの共同研究)。

薬剤代謝に必要なエネルギーは、pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4、脂肪酸の取り込みに関与する因子 (CD36 antigen、very low density lipoprotein receptor) の遺伝子発現上昇から脂肪酸 $\beta$ 酸化によってまかなわれていると考えられる。脂肪酸 $\beta$ 酸化にかかわる酵素群の遺伝子発現は、転写コアクチベーター peroxisome proliferative activated receptor  $\gamma$  coactivator 1  $\alpha$  (PGC-1  $\alpha$ ) によって包括的に制御されているが (Handschin C, Spiegelman BM. 2006 Endocr Rev)、PGC-1  $\alpha$  の発現は TG マウスの肝臓において遺伝子発現レベルで 3 倍上昇していた。このような脂肪酸 $\beta$ 酸化の活性化にもかかわらず、TG マウスの肝臓内 ATP/AMP 比は低下しており AMP-activated protein kinase (AMPK) が活性化されていた。薬剤代謝の活性化とそれに伴う肝臓エネルギー代謝の変化が相補的に活性化されるメカニズムに関して検討を加えてゆく。

以上のような知見を踏まえた上で、前癌原物質に対する感受性の検討をおこない発癌予防の分子基盤を解明していく。

## E. 結論

今後の予定

【平成 21 年度】肝臓での薬物代謝酵素誘導の分子メカニズム解明と化学発癌に対する抵抗性の検討

【平成 22 年度】神経細胞における酸化ストレス適応機転の解明とその破綻の分子メカニズムの解明

ALDH2\*2 TG マウス神経組織では、加齢とともに

に神経細胞の変性が進行し、記憶力の低下から認知症様病様の病態を呈する（日本医大：太田成男研究グループとの共同研究）。この結果は、同じアルデヒドに対しても組織・細胞種ごとに異なる用量反応曲線が存在することを意味する。（Ohta S, Ohsawa I. 2006 J Alzheimer Dis）そこで、神経細胞を用いてアルデヒドによる刺激効果（ストレス応答機構の誘導）と抑制効果（細胞障害性機構）の閾値がどのように決まっているのかその分子メカニズムを解明する。神経細胞変性が出現する前段階で ALDH2\*2 TG マウス神経組織を網羅的トランスクリプトーム・メタボローム解析で明らかにするとともに培養神経細胞を 4-hydroxy-2-nonenal で刺激する系を使って詳細な検討を進めていく。

血管におけるアルデヒドに対するストレス応答機構の解明と動脈硬化惹起性メタボリックストレスに対する忍容性の検討

動脈硬化の形成において、脂質過酸化産物（ヒドロペルオキシド）の2次生成物であるアルデヒド、とくに 4-hydroxy-2-nonenal は、Michael 反応を介してタンパク質と付加体を形成し、その機能を傷害し、動脈硬化の進展に深く関与している。（Watson AD. 1997. JBC）ALDH2\*2 TG マウスの大血管を摘出して、病理組織学的な検討を行う。動脈硬化性変化が認められなければ、包括的比較トランスクリプトーム・メタボローム解析を行い、アルデヒドに対する血管壁特有のストレス応答機構を解明する。さらに、ApoE ノックアウトマウスと掛け合わせ、高脂肪食を負荷するなどのメタボリックストレスを加え血管の忍容性を観察する。すでに、ALDH2\*2 TG マウスの大血管において動脈硬化性変化が進行していた場合は、適応破綻を来していると考え、動脈硬化の進展の分子メカニズムを明らかにするとともに、より若年層の TG マウスの大血管から経時的に観察す

ることによって、適応機転およびその破綻の分子メカニズムを解明する。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Hayashida K, **Sano M**, Ohsawa I, Shinmura K, Tamaki K, Kimura K, Endo J, Katayama T, Kawamura A, Kohsaka S, Makino S, Ohta S, Ogawa S, Fukuda K. Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. **Biochem Biophys Res Commun.** 373(1):30-5. (2008)
2. Yoshikawa N, Shimizu N, **Sano M**, Ohnuma K, Iwata S, Hosono O, Fukuda K, Morimoto C, Tanaka H. Role of the hinge region of glucocorticoid receptor for HEXIM1-mediated transcriptional repression. **Biochem Biophys Res Commun.** 371(1):44-9. (2008)
3. Chen H, Hattori F, Murata M, Li W, Yuasa S, Onizuka T, Shimoji K, Ohno Y, Sasaki E, Kimura K, Hakuno D, **Sano M**, Makino S, Ogawa S, Fukuda K. Common marmoset embryonic stem cell can differentiate into cardiomyocytes. **Biochem Biophys Res Commun.** 369(3):801-6. (2008)
4. Shimizu N, Yoshikawa N, Wada T, Handa H, **Sano M**, Fukuda K, Suematsu M, Sawai T, Morimoto C, Tanaka H. Tissue- and

- context-dependent modulation of hormonal sensitivity of glucocorticoid-responsive genes by HEXIM1. *Mol Endocrinol.* (2008)
5. Sano M, Fukuda K. Mitochondrial biogenesis by hormesis. *Circ Res.* 103:1191-3 (2008)
  6. Tokudome S, Sano M, Shinmura K, Matsuhashi T, Morizane S, Moriyama H, Tamaki K, Hayashida K, Nakanishi H, Yoshikawa N, Shimizu N, Endo J, Katayama T, Murata M, Yuasa S, Kaneda R, Tomita K, Eguchi N, Urade Y, Asano K, Utsunomiya Y, Suzuki T, Taguchi R, Tanaka H, Fukuda K. Glucocorticoid protects heart from ischemia-reperfusion injury through activation of lipocalin-type prostaglandin D synthase-derived PGD2 biosynthesis. *J Clin Invest.* (2009)
  7. Yoshikawa N, Nagasaki M, Sano M, Tokudome S, Ueno K, Shimizu N, Imoto S, Miyano S, Suematsu M, Fukuda K, Morimoto C, Tanaka H. Ligand-based gene expression profiling reveals novel roles of glucocorticoid receptor in cardiac metabolism *Am J Physiol.* (2009)
  8. 佐野元昭、清水宣明、吉川賢忠、徳留さと  
り、田中廣壽、福田恵一. 新しい心不全治療  
の標的分子としての Cdk9 の役割とその活  
性制御機構. *細胞工学* 27, 35-39 (2008)  
秀潤社
  9. 佐野元昭. PGC-1 と心機能、心筋代謝.  
*Annual Review 循環器 2008* (2008)  
p16-22 中外医学社
  10. 佐野元昭. 老化とアルデヒド 呼吸と循環  
56 巻 7 号 733-736 (2008) 医学書院
  11. 佐野元昭. ミトコンドリアエネルギー代謝  
*Heart Review* Vol. 12 No. 7 (2008)  
p.776-781 Medical Review 社
  12. 佐野元昭. アンチエイジング医学の基礎と  
臨床 (改訂 2 版)「心臓とアンチエイジング」  
p.372-375 (2008) Medical Review 社
  13. 佐野元昭 菱木貴子 末松 誠 中西広樹  
田口 良. メタボローム. *Annual Review  
循環器 2009* (2009) p25-28 中外医学社
- ## 2. 学会発表
1. 佐野元昭. レドックス応答としての心筋代  
謝リモデリング 第 1 回 FANTASY (2008)  
東京
  2. 佐野元昭. 心筋酸化ストレスに対する新し  
い治療戦略、第 4 回病態代謝・血管医学セ  
ミナー (2008) 熊本
  3. 佐野元昭. 代謝リモデリングに基づく心  
筋酸化ストレス機構の解明 第 1 回 生活  
習慣病の転写・シグナルネットワーク研究  
会 (2008) 鎌倉

4. 佐野元昭. 抗酸化ストレス酵素としてのアルデヒド脱水素酵素の意義 第61回 日本酸化ストレス学会学術集会 (2008) 京都
  5. 佐野元昭. 新しい抗酸化治療法: 水素ガスの吸入による心筋虚血再灌流障害治療法 大阪大学レジデントセミナー (2008) 大阪
  6. 佐野元昭. セリン合成酵素はアルデヒドによって誘導される心筋抗酸化ストレス応答において重要な役目を果たす 第33回日本医用マススペクトル学会 (2008) 東京
  7. 佐野元昭. 細胞内低分子代謝産物(メタボローム)の定量情報から心臓病態生理を理解する新しい試み 神奈川心不全フォーラム (2008) 横浜
  8. 佐野元昭. メタボローム・トランスクリプトーム統合解析による組織特異的アルデヒドストレス応答機構の解明 第3回メタボロームシンポジウム (2008) 鶴岡
  9. 佐野元昭. アルデヒドに対する臓器特異的ストレス応答 第9回 Cardiovascular Regeneration (2008) 京都
  10. 佐野元昭. アルデヒド蓄積モデルマウスからみた加齢性疾患発症の分子機序の解明 第30回 心筋生検研究会 (2008) 三重
  11. 佐野元昭. 循環器疾患におけるミネラルコルチコイドとグルココルチコイド 山口大学二内科フォーラム (2009) 山口
  12. 佐野元昭. 心筋脂質代謝からアプローチする新たな心不全治療戦略—メタボローム解析に基づく心筋機能制御—第82回日本薬理学会シンポジウム (2009) 横浜
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. PGD2 による心筋虚血再灌流障害治療 (出願中)

厚生労働省科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
分担研究報告書

臓器特異的ストレス応答探索マウスを用いた疾病予防法の開発に関する研究  
分担研究者 太田成男 日本医科大学 大学院 教授

研究要旨

ミトコンドリア アルデヒド脱水素酵素 2 (ALDH2) 酵素欠損マウス(DAL マウス)を作製した。脳で主に ALDH2 酵素活性が低下した DAL101 マウスは、酸化ストレスに対し神経細胞が脆弱で、加齢にともなう、タウ蛋白質のリン酸化が顕著で神経変性と空間認知・学習記憶能力が低下した。さらに、アルツハイマー病と動脈硬化の危険因子である APOE 欠損と ALDH2 欠損が脳の機能障害進行に相乗効果を示した。以上の結果、DAL101 マウスは、酸化ストレスを軽減させ加齢に伴う認知症を予防する薬剤の評価に用いることが有効であることが示唆された。

A. 研究目的

アルツハイマー病患者脳では、酸化ストレスが亢進されていること、ミトコンドリアから発せられる活性酸素が酸化ストレスの主な発生源となっていることは、周知の事実となっている。ミトコンドリアとアルツハイマー病の関連について、多くの研究者から関心がもたれているのは、2006年の Journal of Alzheimer's Disease にミトコンドリア特集が組まれたことなどからも明らかである。

本研究の目的は、脳の酸化ストレスを軽減し、神経を保護することによって、アルツハイマー病の発症を遅延させること、すなわち予防すること、あるいは治療できるようにすることである。そのために、(A)アルツハイマー病を予防するに足る理想的な抗酸化物質を見いだすこと、(B)その抗酸化物質を評価できるモデル動物を作製することである。そのために、加齢に伴い認知障害を示すモデル動物を作製する。

B. 研究方法

酸化ストレス亢進マウスの作製とその評価

(1) ALDH2 はミトコンドリア内に存在する酵素であり、酸化ストレス防御機構として働いていることを私たちは以前示した。ラット ALDH2 遺伝子の一塩基置換により活性が消失する ALDH2\*2 遺伝子を作製し、マウスの受精卵に導入することにより、ALDH2 酵素活性欠損マウスを作製した。不活化型 ALDH2\*2 は活性型 ALDH2\*1 と結合し、不活化するので、不活化型遺伝子を導入することによって、不活化型マウスを作製した。ここでは、脳の ALDH2

の活性を失った系統(DAL110)を用いた。DAL は dominant negative ALDH2 の意である。

(2) 酸化ストレスの指標として、4-ヒドロキシ-2-ノネナール(4-HNE)を測定した。4-HNE は過酸化脂質より生成される有毒な物質でアルデヒド基をもち、ALDH2 が分解に寄与していることを私たちが以前明らかにしている。そのため、DAL マウス(ALDH2 不活化型マウス)では4-HNE が蓄積し、酸化ストレスの指標を明確にできる。

(3) DAL101 では脳の組化学的標本を作製し、加齢に伴う変化を評価した。アルツハイマー病の指標であるタウのリン酸化を調べた。

(4) DAL101 マウスと apoE(-/-)マウスを掛け合わせ、ALDH2 酵素欠損と apoE が同時に欠損した DAL(+/-)apoE(-/-)を作製した。

(5) DAL101 と DAL(+/-)apoE(-/-)を水迷路実験により、空間認知機能の評価した。

(6) さらに、WaterMaize により認知機能の評価した。

(倫理面への配慮)

動物では日本医科大学実験動物委員会の承認をえた。臨床試験は本研究にはふくまれない。

C. 研究結果

□ DAL101 マウスでは脳に、加齢依存的に酸化ストレスマーカーの 4-HNE が増加した。DAL02 マウスでは加齢に伴い骨格筋にミトコンドリアの蓄積と異常が観察された。これは、軽度認知機能障害(MCI)に見られる現象である。

□ DAL101 の初代神経培養細胞は、4-HNE への耐性が低

下していた。

□DAL101 では、加齢に伴って、海馬の神経変性とグリオースが見られた。

□DAL101 では、Tau 蛋白質のリン酸化が見られた。

□DAL101 では、水迷路試験で加齢に伴う空間認知機能が明らかに低下した。

□以上の現象は、apoE(-/-)と掛け合わせることで、表現型が生じるまでの時間が短縮された。

#### D. 考察

加齢に伴い神経変性が認められるモデルマウスは作製されていない。この DAL101 マウスは、加齢に伴い認知機能が低下するユニークなモデルマウスであり、アルツハイマー病に類似の症状を示す。

DAL101 では、ALDH2 の酵素欠損型遺伝子 ALDH2\*2 を導入しただけで、神経変性を示し、認知機能低下、Tau タンパク質のリン酸化などが生じた。この結果は、酸化ストレスが認知症を発症するために非常に大きな関与をしていることを示唆する。

#### E. 結論

ALDH2 欠損により酸化ストレスが亢進し、加齢に伴う認知機能が低下したことを示す。アルツハイマー病に類似の現象が生じているモデルマウスの作製に成功した。

#### F. 健康危険情報

本研究において、健康危険情報は無い。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Harita Y, Kurihara H, Kosako H, Tezuka T, Sekine T, Igarashi T, Ohsawa I, Ohta S, Hattori S. Phosphorylation of nephrin triggers Ca<sup>2+</sup> signaling by recruitment and activation of phospholipase C-gamma 1. *J. Biol. Chem.* 2009 In press
- (2) Fu Y, Ito M, Fujita Y, Ito M, Ichihara M, Masuda A, Suzuki Y, Maesawa S, Kajita Y, Hirayama M, Ohsawa I, Ohta S, Ohno K. Molecular hydrogen is protective against 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal degeneration in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2009 Feb 12 [Epub ahead of print]
- (3) Nakashima-Kamimura N, Mori T, Ohsawa I, Asoh S, and Ohta S. Molecular hydrogen alleviates nephrotoxicity induced by an anti-cancer drug cisplatin without compromising anti-tumor activity in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009 Jan 16. [Epub ahead of print]
- (4) Wolf AM, Sadamitsu Asoh S, Hiranuma H, Ohsawa I, Iio K, Satou A, Ishikura M, Ohta S.: Astaxanthin protects mitochondrial redox state and functional integrity against

oxidative stress. *J. Nutr. Biochem.* 2009 In press.

(5) Nagata K, Nakashima-Kamimura N, Mikami T, Ohsawa I, Ohta S.: Consumption of Molecular Hydrogen Prevents the Stress-Induced Impairments in Hippocampus-Dependent Learning Tasks during Chronic Physical Restraint in Mice. *Neuropsychopharmacology.* 2009;34: 501-508.

(6) Murakami Y, Ohsawa I, Kasahara T, Ohta S.: Cytoprotective role of mitochondrial amyloid beta peptide-binding alcohol dehydrogenase against a cytotoxic aldehyde. *Neurobiol Aging.* 2009;30: 325-329.

(7) Cai J, Kang Z, Liu WW, Luo X, Qiang S, Zhang JH, Ohta S, Sun X, Xu W, Tao H, Li R.: Hydrogen therapy reduces apoptosis in neonatal hypoxia-ischemia rat model. *Neurosci Lett.* 2008;441(2):167-72.

(8) Ohsawa I, Nishimaki K, Yamagata K, Ishikawa M, Ohta S.: Consumption of hydrogen water prevents atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008;26: 1195-1198.

(9) Nakachi N, Asoh S, Watanabe N, Mori T, Matsushita T, Takai S. and Ohta S.: Transduction of Anti-Cell Death Protein FNK Suppresses Graft Degeneration after Autologous Cylindrical Osteochondral Transplantation. *J. Histochem. Cytochem.* 2008; 27: 197-206.

(10) Watanabe M, Katsura KI, Ohsawa I, Mizukoshi, G, Takahashi K, Asoh S, Ohta S, Katayama Y.: Involvement of mitoK(ATP) channel in protective mechanisms of cerebral ischemic tolerance. *Brain Res.* 2008; 31: 199-207.

(11) Nishino N, Tamori Y, Tateya S, Kawaguchi T, Shibakusa T, Mizunoya W, Inoue K, Kitazawa R, Kitazawa S, Matsuki Y, Hiramatsu R, Masubuchi S, Omachi A, Kimura K, Saito M, Amo T, Ohta S, Yamaguchi T, Osumi T, Cheng J, Fujimoto T, Nakao H, Nakano K, Aiba A, Okamura H, Fushiki T, Kasuga M.: FSP27 contributes to efficient energy storage in murine white adipocytes by promoting the formation of unilocular lipid droplets. *J Clin Invest.* 2008;118:2808-2821.

(12) Ohsawa I, Nishimaki K, Murakami Y, Suzuki Y, Ishikawa M, Ohta S.: Age-Dependent Neurodegeneration Accompanying Memory Loss in Transgenic Mice Defective in Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase 2 Activity. *J. Neurosci.* 2008; 28: 6239-6249.

(13) Hayashida K, Sano M, Ohsawa I, Shinmura K, Tamaki K, Kimura K, Endo J, Katayama T, Kawamura A, Kohsaka S, Makino S, Ohta S, Ogawa S, Fukuda K.: Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;373:30-35.

(14) Katsura K, Takahashi K, Asoh S, Watanabe M, Sakurazawa M, Ohsawa I, Mori T, Igarashi H, Ohkubo S, Katayama Y, Ohta S.: Combination therapy with transductive anti-death FNK protein and FK506 ameliorates brain damage with focal transient ischemia in rat. *J. Neurochem.* 2008;106: 258-270.

(15) Ohta Y, Kamiya T, Nagai M, Nagata, T, Morimoto N, Miyazaki K, Murakami T, Kurata, T, Takehisa Y, Ikeda Y, Asoh S, Ohta S, Abe K.: Therapeutic benefits of intrathecal protein therapy in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci. Res.* 2008; 86: 3028-3037.

(16) Kogiku M, Ohsawa I, Matsumoto K, Sugisaki Y, Takahashi H, Teramoto A, Ohta S.: Prevention of Chemotherapy-Induced Alopecia by anti-death FNK protein. *J. Clin. Neurosci* 2008;15(11):1198-1203.

- (17) Asoh, S., Ohta, S.: PTD-mediated delivery of anti-cell death proteins/peptides and therapeutic enzymes. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2008;60: 499-516.
- (18) Nakashima-Kamimura N, Nishimaki K, Mori T, Asoh S, Ohta, S.: Prevention of chemotherapy-Induced alopecia by anti-death FNK protein. *Life Sci.* 2008;82: 218-225.

## 2. 学会発表

- (1) Ohsawa I., Nagata K., Takahashi K., Ishikawa, M., Mikami T., Ohta S.: Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant in the brain ischemia and restores learning- and memory-deficits declined by physical restraint stress Alzheimer's Association International Conference on Alzheimer's Disease 2008(ICAD2008) USA Chicago. 2008.7.26-31.
- (2) Wolf Alexander Martin, Ohta S.: Mild uncoupling reduces oxidative stress in intact cells The 15th European Bioenergetics Conference 2008 (ebec2008). Ireland Dublin. 2008.7.19-24
- (3) Ohta S.: Hydrogen acts as a therapeutic and preventive antioxidant Euromit 7 / The seventh European Meeting on Mitochondrial Pathology Sweden Stockholm. 2008.6.11-14.
- (4) Kamimura N., Ohta S: Three-dimensional analysis of mitochondrial structure in a HeLa cell by Ultra-High Voltage Electron Microscope. Euromit 7 / The seventh European Meeting on Mitochondrial Pathology Sweden Stockholm 2008.6.11-14.
- (5) Aso S., Ohta S.: Potential Protein Transduction Therapy Using an Artificial Anti-Cell Death Protein, PTD-FNK. BIT's 1st Annual Protein and Peptide Conference. 2008.4.22-24. China Shenzhen.



## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
佐野元昭	PGC-1 と心機能、 心筋代謝	山口徹他	Annual Review w 循環器2008	中外医学 社	東京	2008	16-22
佐野元昭	心臓とアンチエー ジング	日本抗加齢 医学会専門 医・指導士 認定委員会	アンチエイジ ング医学の基 礎と臨床 (改 訂2版)	Medical Review社	東京	2008	372-375
佐野元昭 菱木貴子 末松誠 中西広樹 田口良	メタボローム	山口徹他	Annual Review w 循環器2009	中外医学 社	東京	2009	25-28

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hayashida K, Sano M, Ohsawa I, Shimura K, Tamaki K, Kimura K, Endo J, Katayama T, Kawamura A, Kohsaka S, Makino S, Ohtsuka S, Ogawa S, Fukuda K.	Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury.	Biochemical Biophysical Research Communications	373(1)	30-35	2008
Yoshikawa N, Shimizu N, Sano M, Ohnuma K, Iwata S, Hosono O, Fukuda K, Morimoto C, Tanaka H.	Role of the hinge region of glucocorticoid receptor for HEXIM1-mediated transcriptional repression	Biochemical Biophysical Research Communications	371(1)	44-49	2008
Chen H, Hattori F, Murata M, Li W, Yoneda S, Onizuka T, Shimoji K, Ohno Y, Sasaki E, Kimura K, Hakuno D, Sano M, Makino S, Ogawa S, Fukuda K.	Common marmoset embryonic stem cell can differentiate into cardiomyocytes.	Biochemical Biophysical Research Communications	369(3)	801-806	2008

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shimizu N, Yoshikawa N, Wada T, Handa H, Sano M, Fukuda K, Suematsu M, Sawai T, Morimoto C, Tanaka H	Tissue- and context-dependent modulation of hormonal sensitivity of glucocorticoid-responsive genes by HEXIM1.	Molecular Endocrinology	22(12)	2609-2623	2008
Sano M, Fukuda K.	Mitochondrial biogenesis by hormesis.	Circulation Research.	103	1191-1193	2008
Tokudome S, Sano M, Shinmura K, Matsuhashi T, Morizane S, Moriyama H, Tamaki K, Hayashida K, Nakanishi H, Yoshikawa N, Shimizu N, Endo J, Katayama T, Murata M, Yuasa S, Kaneda R, Tomita K, Eguchi N, Urade Y, Asano K, Utsunomiya Y, Suzuki T, Taguchi R, Tanaka H, Fukuda K	Glucocorticoid protects heart from ischemia-reperfusion injury through activation of lipocalin-type prostaglandin synthase-derived PGD2 biosynthesis	Journal of clinical investigation		In press	2009
Yoshikawa N, Nagasaki M, Sano M, Tokudome S, Ueno K, Shimizu N, Imoto S, Miyano S, Suematsu M, Fukuda K, Morimoto C, Tanaka H	Ligand-based gene expression profiling reveals novel roles of glucocorticoid receptor in cardiac metabolism	American Journal of Physiological		In press	2009
佐野元昭、清水宣明、吉川賢忠、徳留さと、田中廣壽、福田恵一	新しい心不全治療の標的分子としてのCdk9の役割とその活性制御機構	細胞工学	27	35-39	2008
佐野元昭	老化とアルデヒド	呼吸と循環	56巻7号	733-736	2008
佐野元昭	ミトコンドリアエネルギー代謝	Heart Review	Vol. 12 No. 7	776-781	2008

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Harita Y, Kurihara H, Kosako H, Tezuka T, Sekine T, Igarashi T, Ohsawa I, Ohta S, Hattori S.	Phosphorylation of nephrin triggers Ca <sup>2+</sup> signaling by recruitment and activation of phospholipase C-gamma 1.	J. Biol. Chem.	284(13)	8951-8962	2009
Fu Y, Ito M, Fujita Y, Ito M, Ichihara M, Masuda A, Maesawa S, Kajita Y, Hirayama M, Ohsawa I, Ohta S, Ohno K.	Molecular hydrogen is protective against 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal degeneration in a rat model of Parkinson's disease.	Neuroscience Letters	In press		2009
Nakashima-Kamimura N, Mori T, Ohsawa I, Asoh S, and Ohta S.	Molecular hydrogen alleviates nephrotoxicity induced by an anti-cancer drug cisplatin without compromising	Cancer Chemother Pharmacol	In press		2009
Wolf AM, Sadamitsu Asoh S, Hiranuma H, Ohsawa I, Iio K, Satou A, Ishikura M, Ohta S.	Astaxanthin protects mitochondrial redox state and functional integrity against oxidative stress.	J. Nutr. Biochem.	In press		2009
Nakachi N, Asoh S, Watanabe N, Mori T, Matsushita T, Takai S, Ohta S.	Transduction of Anti-Cell Death Protein FNK Suppresses Graft Degeneration After Autologous Cylindrical Osteochondral Transplantation.	J Histochemistry & Cytochemistry	57(3)	197-206	2009
Nagata K, Nakashima-Kamimura N, Mikami T, Ohsawa I, Ohta S.	Consumption of molecular hydrogen prevents the stress.	Neuropsychopharmacology	34(2)	501-508	2009

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Murakami Y, Ohsawa I, Kasahara T, Ohta S.	Cytoprotective role of mitochondrial amyloid beta peptide-binding alcohol dehydrogenase against a cytotoxic aldehyde.	Neurobiol Aging.	30(2)	325-329	2009
Watanabe M, Katsura KI, Ohsawa I, Mizukoshi G, Takahashi K, Asoh S, Ohta S, Katayama Y.	Involvement of mitoK(ATP) channel in protective mechanisms of cerebral ischemic tolerance.	Brain Res	1238	199-207	2008
Ohsawa I, Nishimaki K, Yamagata K, Ishikawa M, Ohta S.	Consumption of hydrogen water prevents atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice.	Biochem Biophys Res Commun	377(4)	1195-1198	2008
Kogiku, M, Ohsawa I, Matsumoto K, Sugisaki Y, Takahashi, H, Teramoto A, Ohta S.	Prognosis of glioma patients by combined immunostaining for Ki-67 and epidermal growth factor receptor.	J. Clin. Neurosci.	15(11)	1198-1203	2008
Nishino N, Tamori Y, Tateya S, Kawaguchi T, Shibakusa T, Mizunoya W, Inoue K, Kitazawa R, Kitazawa S, Matsuki Y, Hiramatsu R, Masubuchi S, Omachi A, Kimura K, Saito M, Amo T, Ohta S, Yamaguchi T, Osumi T, Cheng J, Fujimoto T, Nakao H, Nakao K, Aiba A, Okamura H, Fushiki T, Kasuga M.	FSP27 contributes to efficient energy storage in murine white adipocytes by promoting the formation of unilocular lipid droplets.	J Clin Invest.	118(8)	2808-2821	2008