

201008008A

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22年度 総括研究報告書

研究代表者 佐野元昭

平成23(2011)年5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 22 年度 総括研究報告書

研究代表者 佐野 元昭

平成 23 年 5 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	5
太田 成男	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	8
IV. 研究成果の刊行物・別刷	13

厚生労働科学研究費補助金（創業基盤推進研究事業）
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循環器内科 講師

研究要旨

最終年度では、ALDH2*2-TG の解析結果から得られたホルミシス効果の治験を実臨床に応用するための研究を行った。ALDH2*2-TG の心臓は虚血再灌流障害や圧負荷心不全刺激に対して抵抗性を示したことから、この TG の細胞内代謝と同様に心筋代謝を修飾させることによって慢性心不全患者の心機能低下、再入院、死亡を抑制できると考えた。まず、ALDH2*2-TG の心臓は糖の取り込みや解糖系が活性化され、ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化が低下しているがこの意義を検証した。グルコースがエネルギー産生の基質として使用されているだけでなく、ペントースリン酸回路を介した補酵素 NADPH の合成、核酸合成やアミノ酸合成、脂質合成にも転用されている現象を認めた。この結果、ストレス下の心筋細胞肥大、抗酸化ストレス応答の活性化を介した細胞死抑制効果を発揮している現象を明らかにしてきた。一方で、解糖系とミトコンドリアでの酸化的リン酸化の間には積極的にアンカップリングを起こして、ミトコンドリアでの活性酸素の産生を抑制していると結論づけた。糖尿病を合併した心不全患者へのインクレチン関連薬の投与が心機能や各種画像検査、バイオマーカーに与える効果を検討する臨床研究を企画し（慶應大学の倫理委員会にプロトコールを提出済み）開始予定である。

分担研究者 太田成男
日本医科大学大学院 教授

A. 研究目的

最終年度では、ALDH2*2-TG の解析結果から得られたホルミシス効果の治験を実臨床に応用するための研究を行った。心臓は、高血圧、心筋梗塞などのストレスが加わると、細胞内糖代謝を活性化させる。しかし、その病態生理学的意義は解明されていなかった。ALDH2*2-TG の心臓では、グルコースの取り込み、解糖系が活性化されている

が、我々は、グルコースがエネルギー産生の基質として使用されているだけでなく、ペントースリン酸回路を介した補酵素 NADPH の合成、核酸合成やアミノ酸合成、脂質合成にも転用されている現象を認めた。この結果、ストレス下の心筋細胞肥大、抗酸化ストレス応答の活性化を介した細胞死抑制効果を発揮している現象を明らかにしてきた。一方で、解糖系とミトコンドリアでの酸化的リン酸化の間には積極的にアンカップリングを起こして、ミトコンドリアでの活性酸素の産生を抑制していると仮説

をたてた。この仮説を検証するために、強制的に解糖系とミトコンドリアでの酸化的リン酸化のアンカップリング効率を上げたときに、ストレス下の心臓で何が起こるかを大動脈縮窄による心臓圧負荷モデルを用いて検証した。解糖系とミトコンドリアでの酸化的リン酸化のアンカップリング効率を上げると心機能がかえって低下することが証明できた。また、ALDH2*2-TGの心臓は圧負荷に抵抗性を示した。以上の結果から、心不全患者の心臓における糖の取り込みを亢進させる治療は、抗酸化ストレス、抗炎症、ミトコンドリア機能維持に働き、従来の心不全治療と並行して行えば、心不全患者の再入院や死亡を減らし、寿命を延長する効果が期待される。最近臨床での使用が可能となったインクレチン関連薬は、心筋糖代謝を活性化して心機能を改善する可能性が示唆される。そこで、現在糖尿病を合併した心不全患者へのインクレチン関連薬の投与が心機能や各種画像検査、バイオマーカーに与える効果を検討する臨床研究を企画し（慶應大学の倫理委員会にプロトコールを提出済み）開始予定である。

B. 研究方法

① ALDH2*2-TG および野生型マウスに大動脈狭窄による圧負荷をかけた。心エコー法を用いて心収縮機能を経時的に測定した。解糖系とミトコンドリアの酸化的リン酸化のカップリングを制御する Pyruvate dehydrogenase (PDH) のリン酸化レベルを経時的に観察した。② 野生型野生型マウスに大動脈狭窄による圧負荷をかけた。Vehicle 及び DCA (PDH kinase 阻害剤) 投与群に分けて、心エコー法を用いて心収縮

機能を経時的に測定した。

③ 慢性心不全患者に対して心筋糖代謝を活性化させる治療が心機能や運動耐用量、QOL に与える影響を評価する。

(倫理面の考慮)

現在糖尿病を合併した心不全患者へのインクレチン関連薬の投与が心機能や各種画像検査、バイオマーカーに与える効果を検討する臨床研究を企画し（慶應大学の倫理委員会にプロトコールを提出済み）開始予定である。

C. 研究結果

① ALDH2*2-TG マウスに圧負荷をかけても野生型と比べ心機能が維持された。PDH のリン酸化は圧負荷直後に増加、その後徐々に低下して、心不全期にはベースライン以下まで減少した。

② DCA の投与群において圧負荷後の心機能は有意に低下した。

D. 考察

心臓は、高血圧、心筋梗塞などのストレスが加わると、細胞内糖代謝を活性化させる。ALDH2*2-TG の心臓では、グルコースの取り込み、解糖系が活性化されているが、我々は、グルコースがエネルギー産生の基質として使用されているだけでなく、ペントースリン酸回路を介した補酵素 NADPH の合成、アミノ酸（グルタチオン）合成にも転用され、抗酸化ストレス応答の活性化を介した細胞死抑制効果発揮している現象を明らかにしてきた。一方で、解糖系とミトコンドリアでの酸化的リン酸化の間には積極的にアンカップリングを起こして、ミトコンドリアでの活性酸素の産生を抑制。して

いることを実証した。以上の結果から、心不全患者の心臓における糖の取り込みを亢進させる治療は、抗酸化ストレス、抗炎症、ミトコンドリア機能維持に働き、従来の心不全治療と並行して行えば、心不全患者の再入院や死亡を減らし、寿命を延長する効果が期待される。最近臨床での使用が可能となったインクレチン関連薬は、心筋糖代謝を活性化して心機能を改善する可能性が示唆される。そこで、現在糖尿病を合併した心不全患者へのインクレチン関連薬の投与が心機能や各種画像検査、バイオマーカーに与える効果を検討する臨床研究を企画し（慶應大学の倫理委員会にプロトコールを提出済み）開始予定である。

E. 結論

ストレス下の心臓では糖代謝を活性化させることによって心肥大を起こし、壁応力を減少させ代償している。また、GSHの合成やミトコンドリアとのアンカップリングをおこさせることによって細胞内を還元状態に維持し細胞死を抑制している。

以上の結果は、慢性心不全患者の心筋糖取り込みを活性化させることによって、心機能や運動耐用能を回復させ、予後を改善させる可能性が示唆される。以上の仮説をインクレチン関連薬を用いて検証する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hattori F, Chen H, Yamashita H, Tohyama S, Satoh Y, Yuasa S, Li W, Yamakawa H, Tanaka T, Onitsuka T, Shimoji K, Ohno Y, Egashira T, Kaneda R, Murata M, Hidaka K, Morisaki T, Sasaki E, Suzuki T, Sano M, Makino S, Oikawa S, Fukuda K. Nongenetic method for purifying stem cell-derived cardiomyocytes. *Nature Methods*. 7(1):61-6 (2010)

2. Takeda N, Manabe I, Uchino Y, Eguchi K, Matsumoto S, Shindo T, Sano M, Otsu K, Snider P, Conway S, Nagai R. Cardiac fibroblasts are essential for the adaptive response of the murine heart to pressure overload. *J Clin Invest*. 120(1):254-65 (2010)
3. Kanazawa H, Ieda M, Kimura K, Arai T, Kawaguchi-Manabe H, Matsuhashi T, Endo J, Kawakami T, Sano M, Kimura T, Monkawa T, Shimoda K, Hayashi M, Iwanami A, Okano H, Okada Y, Ishibashi-Ueda H, Ogawa S, Fukuda K. Heart failure causes cholinergic transdifferentiation of cardiac sympathetic nerves via gp130-mediated cytokines. *J Clin Invest*. 120(2): 408-421 (2010)
4. Zhang Y, Sano M, Shinmura K, Tamaki K, Katsumata Y, Matsuhashi T, Morizane S, Ito H, Hishiki T, Endo J, Zhou H, Yuasa S, Kaneda R, Suematsu M, Fukuda K. 4-Hydroxy-2-nonenal protects against cardiac ischemia-reperfusion injury via the Nrf2-dependent pathway. *J Mol Cell Cardiol*. 49(4):576-86 (2010)
5. Kimura K, Kanazawa H, Ieda M, Kawaguchi-Manabe H, Miyake Y, Yagi T, Arai T, Sano M, Fukuda K. Norepinephrine-induced nerve growth factor depletion causes cardiac sympathetic denervation in severe heart failure. *Auton Neurosci*. 156(1-2):27-35. (2010)
6. Sano M, Cardioprotection by hormetic response to aldehyde. *Circ J*. 74(9):1787-93 (2010)
7. Yuasa S, Onizuka T, Shimoji K, Ohno Y, Kageyama T, Yoon SH, Egashira T, Seki T, Hashimoto H, Nishiyama T, Kaneda R, Murata M, Hattori F, Makino S, Sano M, Ogawa S, Prall OW, Harvey RP, Fukuda K. Zac1 is an essential transcription factor for cardiac morphogenesis. *Circ Res*. 106(6): 1083-91(2010)
8. Kinouchi K, Ichihara A, Sano M, Sun-Wada GH, Wada Y, Kurauchi-Mito A, Bokuda K, Narita T, Oshima Y, Sakoda M, Tamai Y, Sato H, Fukuda K, Itoh H. The (pro)renin receptor/ATP6AP2 is essential for vacuolar H⁺-ATPase assembly in murine cardiomyocytes. *Circ Res*. 107(1):30-4. (2010)
9. Tamura Y, Matsumura K, Sano M, Tabata H, Kimura K, Ieda M, Arai T, Ohno Y,

- Kanazawa H, Yuasa S, Kaneda R, Makino S, Nakajima K, Okano H, and Fukuda K. Neural crest-derived stem cells migrate and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 31(3):582-9. (2010)
10. Yan X, Sano M, Lu L, Wang W, Zhang Q, Zhang R, Wang L, Chen Q, Fukuda K, Shen W. Plasma concentrations of osteopontin, but not thrombin-cleaved osteopontin, are associated with the presence and severity of nephropathy and coronary artery disease in patients with type 2 diabetes mellitus. (2010) *Cardiovasc Diabetol*. 9:70.
 11. Shimizu N, Yoshikawa N, Ito N, Maruyama T, Suzuki Y, Takeda S, Tagata Y, Nishitani S, Takehana K, Sano M, Fukuda K, Suematsu M, Morimoto C, Tanaka H. Crosstalk between glucocorticoid receptor and nutritional sensor mTOR in skeletal muscle. *Cell Metab*. 13(2):170-82.(2011)
 12. Shinmura K, Tamaki K, Sano M, Murata M, Yamakawa H, Ishida H, Fukuda K. Impact of Long-term Caloric Restriction on Cardiac Senescence: Caloric Restriction Ameliorates Cardiac Diastolic Dysfunction Associated with Aging. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 50(1):117-27. (2011)
 13. Li W, Yamashita H, Hattori F, Chen H, Tohyama S, Satoh Y, Sasaki E, Yuasa S, Makino S, Sano M, Fukuda K. Simple autogeneic feeder cell preparation for pluripotent stem cells. *Stem Cell Res*. 6(1):83-9. (2011)
 14. Hara M, Yuasa S, Shimoji K, Onizuka T, Hayashiji N, Ohno Y, Arai T, Hattori F, Kaneda R, Kimura K, Makino S, Sano M, Fukuda K. G-CSF influences mouse skeletal muscle development and regeneration by stimulating myoblast proliferation. *J Exp Med*. 208(4):715-27. (2011)
2. 学会発表
 1. 佐野元昭。ホルミシス効果による心筋抗酸化ストレス応答。第10回日本抗加齢医学会総会。(2010)。平成22年6月6日～10日国立京都国際会館。
 2. 佐野元昭。尾池雄一。炎症・免疫・線維化研究最前線。第1回 Molecular cardiovascular Conference II。平成22年9月3日～5日キロロ“ホテルピアノ”。小樽。
 3. 佐野元昭。レドックスバランスと細胞機能—遺伝子改変マウスを用いた解析—アルデヒドに対するホルミシス効果による心筋保護。分子生物学会。平成22年12月7日。神戸。
 4. 佐野元昭。第18回 William Ganz Symposium。ミトコンドリアホルメシスによる心筋保護とアンチエージング。2010年4月54日。秋田キャッスルホテル。
 5. 佐野元昭。ホルミシス効果による心筋保護。Cardio-Renal Metabolism and Senescence。2010年9月11日。香川。
 6. 佐野元昭。香川アルドステロンフォーラム。食塩感受性ラットの副腎における組織レニンアンジオテンシン系の活性化。2010年9月13日。香川。
 7. 佐野元昭。Meet the specialist AHA 2010 レニン・アンジオテンシン系のパラダイムシフト 2010年11月14日。シカゴ。アメリカ。
 8. 佐野元昭。State-of-the-Art of Cardiovascular Diseases 慢性心不全のニューパラダイム 2010年12月15日。熊本大学。熊本。
 9. 佐野元昭。第1回 FRONTIER 研究会。冠動脈疾患予防のための糖尿病治療戦略。2011年1月28日。帝国ホテル。東京。
 10. 佐野元昭。循環器疾患から見た糖尿病治療戦略。HbA1c 5点台の血糖コントロール。2011年1月31日ハイアットリージェンシー東京。
 11. 佐野元昭。レニン阻害剤への期待。2011年2月24日。埼玉ロイヤルパインズホテル
 12. 佐野元昭。第5回 Cardio-Diabetes 研究会。Why dose failing heart prefer to use glucose? 2011年3月5-6日。リーガロイヤルホテル東京。
 13. 佐野元昭。Meet The Expert。レニン・アンジオテンシン系のニューパラダイム 2011年3月24日。金沢エクセルホテル東急。
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
なし。
 2. 実用新案登録
なし。
 3. その他
なし。

厚生労働科学研究費補助金（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マウスを用いた疾病予防法の開発に関する研究

研究分担者 太田 成男 日本医科大学大学院教授

研究要旨 遺伝子組み換えにより作製した脳に酸化ストレスが亢進するマウス(DAL101)を用いて、認知症における酸化ストレスの役割と、その結果に基づく予防法の基礎研究をおこなった。DAL101は加齢に伴い認知機能が低下する認知症モデルマウスである。DAL101に新しい概念の抗酸化物質である水素(H₂)を水に溶解し、水素水を自由摂取により1年以上の長期投与した。その結果、酸化ストレスが低下し、加齢にともなう脳の海馬領域の変性が抑制され、記憶力の低下が抑制された。さらに、水素水の経口投与により平均寿命も長くなった。以上の結果より、新しい概念の抗酸化物質である水素は認知症を予防できる可能性があることが示唆された。

A. 研究目的

分担研究者らは、ミトコンドリアのアルデヒド脱水酵素2(ALDH2)の酵素活性欠損遺伝子(ALDH2*2)を導入し、酸化ストレスを亢進させたマウスを作製した。脳でALDH2*2を発現させたマウス(DAL101)では、脳において酸化ストレスの終末物質である4-ヒドロキシ-2-ノネナールが蓄積し、加齢にともない海馬領域の変性が認められ、記憶力の低下も伴っていた。また、タウたんぱく質のリン酸化が亢進し、APOE たんぱく質の欠損との組み合わせにより、認知機能の低下速度が加速されるなど、アルツハイマー型認知症と特徴を有していた (Ohsawa et al. (2008) Age-Dependent Neurodegeneration Accompanying Memory Loss in Transgenic Mice Defective in Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase 2 Activity. *J. Neurosci.* 28: 6239-6249)。

いっぽう、分担研究者らは、水素分子(H₂)に新しい概念の抗酸化作用があることを示した (Ohsawa et al (2007) Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat. Med.* 13:688-694)。また、水素を溶解した水（水素水）の自由摂取により身体的拘束ストレスを与えた場合に誘導される認知機能の低下を抑制することを示した (Nagata et al. (2009) Consumption of Molecular Hydrogen Prevents the Stress-Induced Impairments in Hippocampus-Dependent Learning Tasks during Chronic Physical Restraint in Mice. *Neuropsychopharmacology.* 34:501-508)。また、酸化ストレス低下による生活週間病の改善効果も示した (Kamimura et al.(2011)Molecular Hydrogen Improves Obesity and Diabetes by Inducing Hepatic FGF21 and Stimulating Energy Metabolism in db/db Mice.Obesity [Epub ahead of print])。

そこで、DAL101 マウスに生後1ヶ月から1年以上の長期にわたって水素水を自由摂取させ、酸化ストレス亢進による認知機能の低下、海馬領域の変性、寿命の短縮を抑制できるかどうかを調べた。

B. 研究方法

(1) 水素水の作製

水素水は、水素ガスを4気圧にて過飽和になるまで溶解してから大気圧に保ち飽和水素溶液を作製した。マウスへの経口投与は、水素が失われないようにするために、節水口にボールベアリングを装填した用具を用いた。水素水は毎日新鮮な水素水と交換し、対照水は、水素水から水素を脱気した水を用いた。水素濃度は水素電極によって測定した。

(2) 酸化ストレスの測定

脳の酸化ストレスは、酸化ストレスマーカーであるマロンジアルデヒド(MDA)を化学的方法により測定した。尿の酸化ストレスマーカーは、8-オキシグアニン(8-OHdG)を抗体法により測定した。

(3) 脳の変性

海馬領域を神経特異的な NeuN 抗体で染色し、神経数を数えた。さらに Iba1 抗体により、ミクログリアの活性化、GFP 抗体により、アストロサイトの活性化により、脳の損傷の程度を調べた。

(4) 記憶力の測定

新奇物質探索試験

マウスは本来、新奇物体と認識すると接近し、形を調べたり臭いをかぐなどの「探索行動」をとる。記憶している物体に対しては、「探索行動」をとらないので、探索頻度を測定することにより、記憶力を調べた。

受動回避試験

マウスは本来暗所を好む性質がある。暗室に進入した際に電気刺激を与えることにより、暗室への進入と痛みである恐怖を関連させて記憶させる。記憶力があれば暗室への進入が躊躇されるので、暗室へ進入するまでの時間を測定すると記憶力を測定した。

(5) 寿命の測定

上記の測定に用いなかったマウスの死亡するまでの期間を記録し、寿命を測定した。

C. 研究結果

水素水を生後1カ月から水素水 13-14 ヶ月、あるいは17-18 ヶ月自由摂取させた結果を調べた。

水素水の自由摂取により脳 MAD および尿 8-OH-G が有意に低下し、水素水の自由摂取により、全身の酸化ストレスが低下することが明らかになった。

水素水の投与によって、海馬領域の CA1 の神経細胞の低下が抑制され、抗 Iba1 抗体、および抗 GFAP 抗体に染色される細胞数が有意に低下したことより、脳の変性が水素水の自由摂取によって抑制されることが明確になった。

水素水を自由摂取した群では、新奇物質探索試験ならびに受動回避試験の結果より、有意に記憶力の低下が抑制されたので、加齢に伴う認知機能の低下を抑制された。

さらに、水素水を自由摂取した群では、平均寿命が有意に長くなった。

D. 考察

酸化ストレス亢進マウス(DAL マウス)を用いることによって、酸化ストレスに起因する病態の原因を調べることができる。酸化ストレスを亢進するだけで認知症モデルマウスが作製されたことから、酸化ストレスが認知症発症に重要な役割を果たしていることが明確になった。さらに、このようなモデルマウスに何らかの介入をすることによって、その病態の原因が明確になると同時に予防法に強い示唆を与える。

昨年、分担研究者らは、クロレラの長期投与が酸化ストレスを低下させ認知症を予防できることを示唆した。今年度は、水素水の長期投与によって、酸化ストレスを軽減し、加齢に伴う神経変性を抑制し、認知機能の低下を抑制することがわかった。さらに、水素水は寿命をも延長した。酸化ストレスによる寿命が短くなったマウスを水素水が延命することは画期的な発見であった。

このような介入試験から、酸化ストレスは認知症において重要な役割をはたしており、酸化ストレスの軽減によって予防、あるいは発症の遅延が可能であることを示した。

E. 結論

認知症発症には、酸化ストレスが大きく関与していることが明確になり、クロレラや水素水の長期投与によって、酸化ストレスを軽減し、加齢に伴う認知症を予防できることを強く示唆した。

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kamimura, N., Nishimaki, K., Ohsawa, I., Ohta, S.: Molecular Hydrogen Improves Obesity and Diabetes by Inducing Hepatic FGF21 and Stimulating Energy Metabolism in db/db Mice. *Obesity* (Silver Spring). 2011 Feb 3. [Epub ahead of print]
- 2) Amo, T., Sato, S., Saiki, S., Wolf, AM., Toyomizu, M., Gautier, CA., Shen, J., Ohta, S., Hattori, N.: Mitochondrial membrane potential decrease caused by loss of PINK1 is not due to proton leak, but to respiratory chain defects. *Neurobiol. Dis.* 2011 Jan;41(1):111-118.
- 3) Wolf, AM., 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.* 2010;21(5):381-389.
- 4) Oharazawa, H., Igarashi, T., Yokota, T., Fujii, H., Suzuki, H., Machide, M., Takahashi, H., Ohta, S., Ohsawa, I.: Protection of the retina by rapid diffusion of hydrogen: administration of hydrogen-loaded eye drops in retinal ischemia-reperfusion injury. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010; 51(1): 487-492.
- 5) Nakajima, S., Ohsawa, I., Ohta, S., Ohno, M., Mikami, T.: Regular voluntary exercise cures stress-induced impairment of cognitive function and cell proliferation accompanied by increases in cerebral IGF-1 and GST activity in mice. *Behav. Brain Res.* 2010;211(2):178-184.

2. 学会発表

- 1) Shigeo Ohta : Protection against mitochondrial oxidative stress. The First Asia-Pacific Symposium on Mitochondrial Medicine and Genetic Diagnosis Taipei 2010.6.13
- 2) Shigeo Ohta : Recent Progress towards hydrogen medicine. 2010 Traditional Chinese Medicine International Forum(Shanghai). Shanghai Univ. Chinese Trad. Med. 2010.11.4.
- 3) Shigeo Ohta: Molecular Hydrogen is a Novel Antioxidant to Efficiently Reduce Oxidative Stress With Potential for the improvement of Mitochondrial Diseases. 7th ASMRM (Asian symposium of Mitochondrial Research and Medicine) and 10th J-mit (Japanese Mitochondrial Research and Medicine) 2010.12.16-18. Special Lecture
- 4) Shigeo Ohta: 生命を紡ぐミトコンドリア. 7th ASMRM (Asian symposium of Mitochondrial Research and Medicine) and 10th J-mit (Japanese Mitochondrial Research and Medicine) 福岡. 2010.12.16-18.

5) Ikuroh Ohsawa, Kiyomi Nishimaki, Hiroe Murakoshi, Takashi Yokota, Shigeo Ohta : Consumption of hydrogen water prevents the age-dependent impairment in learning and memory tasks in AD model mice. ICAD Honolulu, Hawaii 2010, 6. 14.

6) 太田成男：水素水の抗酸化作用 第 63 回日本温泉学会 長野 2010.9.15

7) 太田成男：脳はグルコース以外も使える！第 10 回抗加齢医学の実際ザ・バトル講演 2010.9.20 東京

8) 太田成男：水素医学への展開と研究の現状. 分子状水素医学シンポジウム. 名古屋 2011.2.18~19.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

1) 特許名称：細胞死抑制活性強化タンパク質 FNK を用いた脱毛の防止

特許番号：4686780

特許登録日：平成 23 年 2 月 25 日

発明人：太田成男、上村尚美、麻生定光

出願番号：2005-071501

出願日：平成 17 年 3 月 14 日

2) 特許名称：血管障害性が関与する疾患の易罹患性の判定方法

特許番号：4586120

特許登録日：平成 22 年 9 月 17 日

発明人：太田成男、鈴木吉彦、下方浩史、安藤富士子、

出願番号：2004-265760

出願日：平成 16 年 9 月 13 日

3) 特許名称：ラット bcl-x 遺伝子の改変型 cDNA と改変型タンパク質

特許番号：4544715

特許登録日：平成 22 年 7 月 9 日

発明人：太田成男、麻生定光

出願番号：PCT:JP00/05502

出願日：平成 12 年 8 月 12 日

4) 発明の名称：癌に特異的に作用する細胞死融合遺伝子及びその遺伝子産物

特許番号：4524359 (USA：US7507805)

特許登録日：平成 22 年 6 月 11 日 (USA：平成 21 年 3 月 24 日)

発明人：太田成男、麻生定光

出願番号：PCT/JP/2004/003956

出願日：平成 16 年 3 月 23 日

5) 特許名称：抗癌剤の効果を判定するミトコンドリア DNA の体細胞変異の検出

特許番号：4496362

特許登録日：平成 22 年 4 月 23 日

発明人：太田成男、水谷聡、設楽雄二郎

出願番号：2003-392778

出願日：平成 15 年 11 月 21 日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

1) 太田成男：カラダのキモチ (TBS) 出演 2010.5.23

2) 太田成男：爆笑問題のニッポンの教養 (NHK) 出演 2011.1.18

3) 太田成男：私も一言！夕方ニュース／ここに注目「ミトコンドリアで老化を防ぐ」NHK ラジオ第一放送 2011.2.28.

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	Cardio Diabetic Diseaseの分子機序にせまるーサーチュインー	筒井裕之	Cardio Diabetic Frontier	メディカルレビュー社	東京	2010	151-157
佐野元昭	代謝の異常は心不全の原因か	Cardiovascular Frontier編集委員会	Cardiovascular Frontier	メディカルレビュー社	東京	2011	In press
太田成男	ここまでわかったミトコンドリア研究の新展開	太田 成男	別冊・医学のあゆみ	医歯薬出版	東京	2011	1-134

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
佐野元昭	心臓血管の発生、疾患に 関与する新しい注目すべき分子 筋組織修復促進因子としてのThymosin beta-4の可能性	循環器内科	67巻2号	147-149	2010
佐野元昭	ホルミシス応答による心筋保護	医学のあゆみ	235巻12、13号	1224-1227	2010
佐野元昭	話題の心筋症 ミトコンドリア異常と心筋病変	病理と臨床	29巻2号	159-164	2011
佐野元昭	心不全と腎臓病	Angiotensin Research	8巻2号	23-29	2011
佐野元昭	心エネルギー代謝と冠循環	冠動脈疾患(上)	In press		2011
佐野元昭	心臓大血管の発生と遺伝子異常	心臓	In press		2011
佐野元昭	筋代謝を考慮した慢性心不全に合併した糖尿病治療	Angiotensin Research	In press		2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
佐野元昭	State of the ART食塩感受性とアルドステロン-副腎における組織レニン・アンジオテンシン系活性化の意義	臨床高血圧	In press		2011
Hattori F, Chen H, Yamashita H, Tohyama S, Satoh Y, Yuasa S, Li W, Yamakawa H, Tanaka T, Onitsuka T, Shimoji K, Ohno Y, Egashira T, Kaneda R, Murata M, Hidaka K, Morisaki T, Sasaki E, Suzuki T, Sano M, Makino S, Oikawa S, Fukuda K.	Nongenetic method for purifying stem cell-derived cardiomyocytes	Nature Methods	7(1)	61-66	2010
Takeda N, Manabe I, Uchino Y, Eguchi K, Matsumoto S, Shindo T, Sano M, Otsu K, Snider P, Conway S, Nagai R.	Cardiac fibroblasts are essential for the adaptive response of the murine heart to pressure overload	J Clin Invest	120(1)	254-265	2010
Kanazawa H, Ieda M, Kimura K, Arai T, Kawaguchi-Manabe H, Matsushashi T, Endo J, Kawakami T, Sano M, Kimura T, Monokawa T, Shimoda K, Hayashi M, Iwanami A, Okano H, Okada Y, Ishibashi-Ueda H, Oikawa S, Fukuda K.	Heart failure causes cholinergic transdifferentiation of cardiac sympathetic nerve cells via gp130-mediated cytokines	J Clin Invest	120(2)	408-421	2010
Zhang Y, Sano M, Shinmura K, Tamaki K, Katsumata Y, Matsuhashi T, Morizane S, Ito H, Hishiki T, Endo J, Zhou H, Yuasa S, Kaneda R, Sueematsu M, Fukuda K.	4-Hydroxy-2-nonenal protects against cardiac ischemia-reperfusion injury via the Nrf2-dependent pathway	J Mol Cell Cardiol	49(4)	576-586	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kimura K, Kanazawa H, Ieda M, Kawaguchi-Manabe H, Miyake Y, Yagi T, Arai T, Sano M, Fukuda K.	Norepinephrine-induced nerve growth factor depletion causes cardiac sympathetic denervation in severe heart failure.	Auton Neurosc	156(1-2)	27-35	2010
Sano M	Cardioprotection by hormetic response to aldehyde	Circ J	74(9)	1787-1793	2010
Yuasa S, Onizuka T, Shimoji K, Ohno Y, Kageyama T, Yoon SH, Egashira T, Seki T, Hashimoto H, Nishiyama T, Kaneda R, Murata M, Hatatori F, Makino S, Sano M, Ogawa S, Prall OW, Harvey RP, Fukuda K.	Zac1 is an essential transcription factor for cardiac morphogenesis.	Circ Res	106(6)	1083-1091	2010
Kinouchi K, Ichihara A, Sano M, Sutor N-Wada GH, Wadani Y, Kurauchi-Mito A, Bokuda K, Nairita T, Oshima Y, Sakoda M, Tamai Y, Sato H, Fukuda K, Itoh H.	The (pro)renin receptor/ATP6AP2 is essential for vacuolar H ⁺ -ATPase assembly in murine cardiomyocytes.	Circ Res	107(1)	30-34	2010
Tamura Y, Matsuura K, Sano M, Tabata H, Kimura K, Ieda M, Arai T, Ohno Y, Kanazawa H, Yuasa S, Kaneda R, Makino S, Nakajima K, Okano H, and Fukuda K.	Neural crest-derived stem cells migrate and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction.	Arterioscler Thromb Vasc Bio	31(3)	582-589	2010
Yan X, Sano M, Liu L, Wang W, Zhang Q, Zhang R, Wang L, Chen Q, Fukuda K, Shen W.	Plasma concentrations of osteopontin, but not thrombin-cleaved osteopontin, are associated with the presence and severity of nephropathy and coronary artery disease in patients with type 2 diabetes mellitus.	Cardiovasc Diabetol	9:70	Online	2010

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, Ito. N, Maruyama T, Suzuki Y, Takeda S, Tagata Y, Nishitani S, Takehana K, Sano M, Fukuda K, Suematsu M, Morimoto C, Tanaka H.	Crosstalk between glucocorticoid receptor and nutritional sensor mTOR in skeletal muscle.	Cell Metab	13(2)	170-182	2011
Shinmura K, Tamaki K, Sano M, Murata M, Yamakawa H, Ishida H, Fukuda K.	Impact of Long-term Caloric Restriction on Cardiac Senescence: Caloric Restriction Ameliorates Cardiac Diastolic Dysfunction Associated with Aging.	Journal of Molecular and Cellular Cardiology	50(1)	117-127	2011
Li W, Yamashita H, Hattori F, Chen H, Tohyama S, Satoh Y, Sasaki E, Yuasa S, Maki no S, Sano M, Fukuda K.	Simple autogeneic feeder cell preparation for pluripotent stem cells.	Stem Cell Res	6(1)	83-89	2011
Hara M, Yuasa S, Shimoji K, Onizuka T, Hayashiji N, Ohno Y, Arai T, Hattori F, Kaneda R, Kimura K, Makino S, Sano M, Fukuda K.	G-CSF influences mouse skeletal muscle development and regeneration by stimulating myoblast proliferation.	J Exp Med	208(4)	715-727	2011
太田成男	水素水の抗酸化作用：水素水は体にいいか？	温泉科学(別冊)	60(3)	375-379	2010
Wolf AM, Asoh S, Hiranuma H, Ohnishi I, Iio K, Satoh A, Ishikura M, Ohta, S.	Astaxanthin protects mitochondrial redox state and functional integrity against oxidative stress	J. Nutr. Biochem	21(5)	381-389	2010
Amo T, Sato S, Saito S, Wolf AM, Toyomizu, M, Gauthier CA, Shen, J, Ohta, S., Hattori N.	Mitochondrial membrane potential decrease caused by loss of PINK1 is not due to proton leak, but to respiratory chain defects	Neurobiol Dis	41(1)	111-118	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kamimura N, Nishimaki K., Ohsawa I, Ohta S.	Molecular Hydrogen Improves Obesity and Diabetes by Inducing Hepatic FGF21 and Stimulating Energy Metabolism in db/db Mice	Obesity		in press	2011

9

サーチュイン

Sirtuin

佐野 元昭 *Motoaki Sano*

慶應義塾大学医学部循環器内科講師

はじめに

生物は地球上に誕生して以来、常に最適の環境下で生存しているのではなく、むしろほとんどの時期を栄養源枯渇といった過酷な環境で生き延びてきた。そのような過酷な環境下で生き抜くために、生物は多彩なストレス応答機構を獲得してきた。したがって、ストレス応答機構は臓器保護効果や寿命延長効果と密接に関わっている。高齢者ではストレス応答機構は減弱しており、また飽食の環境化ではストレス応答機構は抑制され、一方で慢性炎症プロセスの活性化から不可逆的臓器機能障害が進行すると考えられる。

極端なカロリー制限は、体力、免疫力の低下から生命の危険につながる。一方で、適度なカロリー制限はさまざまなストレスに対する耐性を引き出し、老化関連疾患(肥満, 2型糖尿病, 動脈硬化, 心不全, 神経変性疾患)の進行を遅延させる。カロリー制限による老化遅延効果はげっ歯類で発見されたが、酵母からサルまでその効果は種を越えて保存されていることが確認されてきた。老化遅延効果は、適度なカロリー制限というストレスが内因性のストレス応答機構を刺激して、生存に有利に働くように遺伝子発現様式や細胞内代謝を変化させた結果である。このように、過剰であれば生体に対して有害な作用を示すものが微量であれば逆に生体にとって好ましい反応を示す場合、この生理的刺激作用をホルミシスという。循環器の領域で周知の虚血プレコン

ディショニングもホルミシスの一種である。

飽食時代にカロリー制限を加えれば糖・脂質代謝が改善されることは自明であるが、カロリー制限は心血管系に対しても臓器保護的に働く。Shinmuraらは、カロリー制限を加えたWisterラットの心臓は、プレコンディショニング効果により虚血再灌流障害に対して耐性を示すことを報告した¹⁾。これまでの虚血プレコンディショニングは、一過性の虚血ストレスによって誘導される短期間有効な臓器保護効果であったが、カロリー制限によって獲得されるプレコンディショニング効果は生涯にわたって持続することが期待される。このような臓器保護効果の延長線上に、老化遅延効果や寿命延長効果が存在するものと考えられる。

ストレス応答機構そのものを直接活性化させることによって、あたかもカロリー制限を続けているかのような恩恵が受けられないだろうか(模倣的ホルミシス)。そのためには、カロリー制限の効果を仲介するストレス応答機構を明らかにする必要がある。

I サーチユインの発見

酵母でgene silencing factorとして発見されたsilent information regulator 2(Sir2)は、2000年にNAD⁺依存性脱アセチル化酵素として寿命制御に関係する分子であることが報告されて以来、脚光を浴びた²⁾。Sir2レベルはカロリー制限で増加し、Sir2欠損酵母ではカロリー制限による寿命延長効果がみられない。また、Sir2ホモログは線虫やショウジョウバエでも寿命制御に関与している。哺乳類では、SIRT1~7の7つのサーチユイン(Sirtuin)と呼ばれるSir2蛋白質ファミリーが存在している。SIRT6, 7は核蛋白, SIRT3, 4, 5はミトコンドリア蛋白, SIRT1, 2は核と細胞質に存在している。SIRT2の哺乳類のオースログはSIRT1で、ヒトでもカロリー制限によって骨格筋から末梢血中単球に至るさまざまな組織でSIRT1レベルの上昇が確認されている。哺乳類で、薬剤によるサーチユインの活性化やSIRT1の過剰発現が寿命を延長するという報告はないが、SIRT1の活性化化合物であるレスベラトロールの投与やSIRT1を全身に高発現させたマウスにおいて、カロリー制限に認められる生理学的変化を模倣する効果が得られることが確認された。現在、サーチユインは老化関連疾患の発症遅延や2型糖尿病・メタボリックシンドロームに対する治療標的分子として注目され、その臓器特異的な作用に関して検討が進められている。

II 心臓への作用

心筋に関しては、SIRT1, SIRT3のトランスジェニックマウスが作製され、抗老化効果、心肥大抑制効果が報告されている。心筋細胞におけるSIRT1, SIRT3の作用は、いずれもforkhead

box class O (FOXO) ファミリーの転写因子の脱アセチル化による活性化を伴うが、サーチェインによる心保護効果とFOXOの関与、サーチェインの発現量が心筋細胞エネルギー代謝に及ぼす影響、ストレス下でサーチェインが活性化される(あるいは発現量が増加する)機序などに関して、今後さらなる研究の成果が待たれる。

1 SIRT1

SIRT1ノックアウト(KO)マウスは、ほとんどが生後まもなく網膜や骨、心臓などの異常により死亡するため発生におけるSIRT1の重要性は確認できたが、成獣の心臓におけるSIRT1の作用はSIRT1 KOマウスからは解析できない。心臓において、SIRT1の発現は大動脈縮窄(transverse aortic constriction : TAC)による圧負荷やパラコートによる酸化ストレス刺激下で上昇する。Sadoshimaらの研究グループは、SIRT1発現量を野生型の2.5倍(軽度)、7.5倍(中等度)、12.5倍(高度)上昇させたSIRT1心臓特異的トランスジェニックマウスを作製した³⁾。その結果、生後18ヵ月齢のSIRT1トランスジェニックマウス(SIRT1発現量が軽度もしくは中等度)では、野生型マウスと比べて加齢に伴う組織学的変化(心肥大、間質線維化、心筋細胞死の増加)や心機能低下が抑制されていた。また、SIRT1トランスジェニックマウスでは、p15、p19、p53といった老化マーカー遺伝子の発現も野生型マウスの心臓と比べて低値であった。SIRT1トランスジェニックマウスは、パラコートによる急性酸化ストレス障害に対しても抵抗性を示した。この抗老化(抗酸化ストレス)作用は、SIRT1トランスジェニックマウスではFOXO1aの脱アセチル化による活性化を介してカタラーゼの発現が増加して抗酸化ストレス防御機構が高まっているためと考察している。一方、高度にSIRT1を心筋発現させたトランスジェニックマウスは、生後6ヵ月の時点で拡張型心筋症様の表現型を呈した。原因は不明だが、著者らは心筋細胞内アデノシン5'-三リン酸(adenosine 5'-triphosphate : ATP)含量が生後2~3ヵ月の心臓ですでに低下していたことか

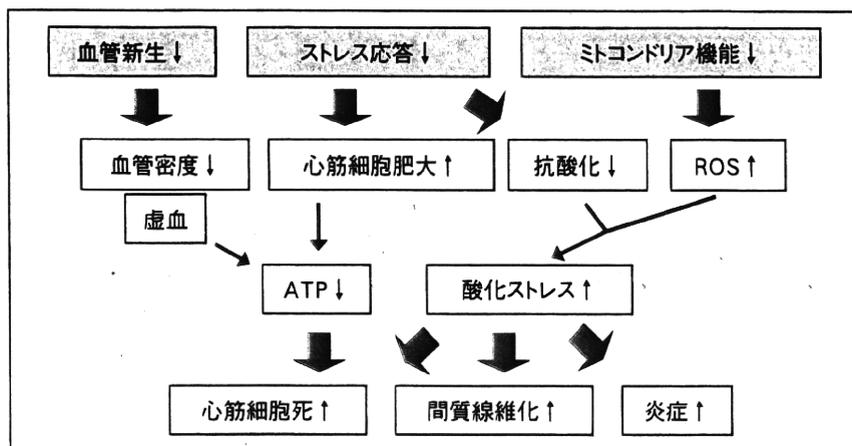


図1. 心筋老化の流れ

ROS : 活性酸素種

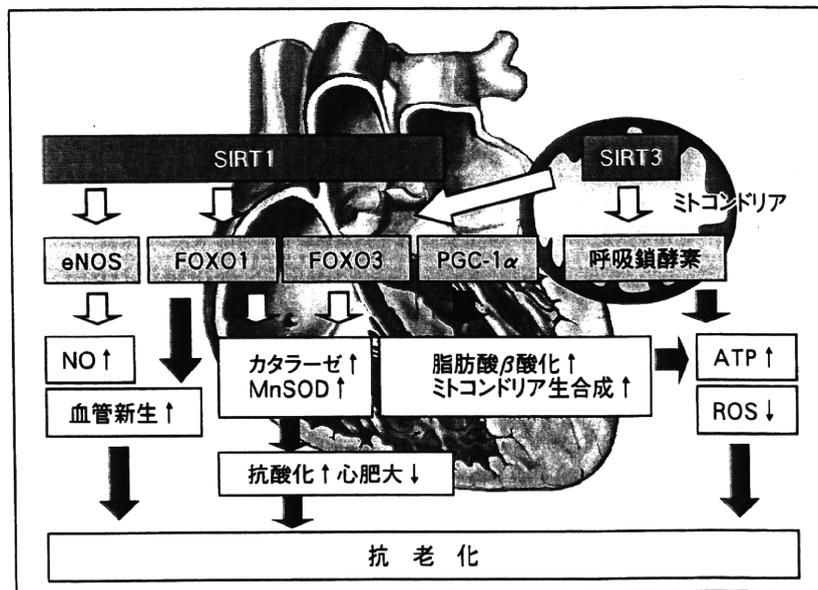


図2. サーチュインによる心筋抗老化作用

ら、SIRT1による NAD^+ 消費の結果、 NAD^+ が欠乏しエネルギー産生機能が障害されたことが一因であると推定している。以上の結果は、SIRT1の活性や発現量を適度に上昇させることが臓器保護や心臓の老化遅延に有効である可能性を示唆している(図1, 2)。

2 SIRT 3

7つのSIRTのなかで、SIRT3だけがヒトにおける寿命制御に関与していることが報告されている。SIRT3がミトコンドリア内のcomplex Iのサブユニットと結合して脱アセチル化していること、SIRT3 KOマウスではcomplex Iの活性化が低下し、ATP含量が低下していることが示された⁴⁾。ミトコンドリアのサーチュイン標的分子は何か、脱アセチル化の結果としてATP産生能力や副産物としての活性酸素の発生にどのような影響を与えるのか、今後の検討が待たれる。

SIRT3の発現は、肥大刺激などのストレス時に誘導される。SIRT3は、 NAD^+ 依存性にFOXO3aを脱アセチル化する。FOXO3aは、AKTによってリン酸化を受けると核から細胞質にエクスポートされるが、SIRT3による脱アセチル化反応を受けるとリン酸化依存性核外移行に抵抗性になり、FOXO3aは核にとどまって転写活性を発揮する。その結果、FOXO3a依存性抗酸化酵素(MnSOD, カタラーゼ)が誘導される。実際、心筋細胞にSIRT3を過剰発現させるとMnSOD, カタラーゼが誘導され、酸化ストレス障害性心筋細胞死に抵抗性を示すようになる。

SIRT3は、心肥大反応を抑制する方向に作用している。さまざまなストレス状況下において、

活性酸素種(reactive oxygen species ; ROS)は心肥大反応を引き起こす共通のセカンドメッセンジャーとして作用することが知られているが、ERKとPI3K/AKT経路の上流に位置する心肥大反応鍵分子であるレニン-アンジオテンシン系(renin-angiotensin system ; RAS)は、ROSによる酸化的修飾によって活性化されることが知られている。SIRT3 KOマウスは、野生型マウスと比べてベースラインから心筋細胞内のROSの量が2倍に増加しており、心肥大(心臓重量増加、心肥大マーカー遺伝子の発現亢進、間質線維化)を呈する。さらに、SIRT3 KOマウスはアンジオテンシンII持続注入などによって過剰な心肥大反応を呈した。反対に、SIRT3を過剰発現したトランスジェニックマウスは、心肥大に抵抗性を示した。Ahnらは、SIRT3はFOXO3a依存性の抗酸化酵素MnSOD、カタラーゼの発現を誘導し、心筋細胞内ROSの産生を抑制することによってRASの活性化、さらにはRASの下流にあるERK、PI3K/AKT経路の活性化を抑制し、心肥大反応を減弱するように働いていると結論している⁵⁾。

III 血管に対する作用

SIRT1は、内皮型NO合成酵素(endothelial nitric oxide synthase ; eNOS)を脱アセチル化して活性化し、NOの産生を増加させ血管内皮依存性の血管拡張反応を刺激している。カロリー制限によって、eNOSの脱アセチル化が観察される⁶⁾。また、血管内皮細胞において、SIRT1はFOXO1を脱アセチル化してその転写活性を抑制することにより血管新生を促進する方向に働く。血管内皮細胞特異的SIRT1 KOマウスでは、虚血下での血管新生が損なわれていることが示されている⁷⁾。動脈硬化病変では、血管内皮依存性血管拡張反応は低下している。また、老化に伴う組織血管密度の低下は臓器機能不全の原因となっている。SIRT1の活性化によって、糖、脂質代謝の改善効果による間接作用に加えて、血管内皮細胞に対する直接作用を介して血管老化の遅延効果や高血圧、動脈硬化に対する治療効果が期待される。

IV 糖・脂質代謝への作用

哺乳類SIRT1の機能と2型糖尿病、メタボリックシンドロームの治療標的分子としてのサーチュインへの期待に関しては、Sir2のNAD依存性脱アセチル活性の発見者の1人である今井らの日本語の総説がわかりやすい⁸⁾。膵臓のβ細胞特異的にSIRT1を過剰発現させたマウスでは、グルコース刺激によるインスリン分泌能が亢進し、30週間にわたる高脂肪食下でもβ細胞が機能不全に陥ることなく耐糖能が維持されることが示されている。高齢者ではミトコンドリア機能が低下し骨格筋内の脂肪蓄積とインスリン抵抗性を認めているが、SIRT1は骨格筋において転写コアクチベーターであるPPARγ coactivator 1α (PGC-1α)活性を刺激して脂肪酸β酸化とミトコンドリア生合成を促進し、インスリン抵抗性を改善させる方向に働く。また、脂肪組織において