

## 【トピックス】日本基礎老化学会第33回大会奨励賞受賞者

### マウス老化アミロイドーシスにおける熱ストレス反応の役割；

#### HSF1ノックアウトマウスを用いた解析

銭 金澤<sup>1</sup>、弘瀬 雅教<sup>2</sup>、王 耀勇<sup>1</sup>、張 倍茹<sup>1</sup>、付 笑影<sup>1</sup>、澤下 仁子<sup>1</sup>、  
張 鵬亮<sup>1</sup>、友澤 寛<sup>3</sup>、森 政之<sup>1</sup>、中井 彰<sup>4</sup>、樋口 京一<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> 信州大学大学院医学系研究科加齢生物学分野、<sup>2</sup> 信州大学大学院医学系研究科分子薬理学講座、

<sup>3</sup> 信州大学ヒト環境科学研究支援センター動物実験部門、<sup>4</sup> 山口大学大学院医学系研究科医化学分野

#### 1. はじめに

マウス老化 (AApoAII) アミロイドーシスでは、apolipoprotein A-II (apoA-II) 由来アミロイド線維AApoAIIが全身性に沈着する[1,2]。C型apoA-II (*Apoa2<sup>c</sup>*) を持つSAMP1やR1.P1-*Apoa2<sup>c</sup>*系統は、AApoAIIアミロイドーシスのモデルマウスである[3,4,5]。タンパク質のミスフォールディングが原因である疾患の発症や治療には熱ショックタンパク質 (Heat shock proteins: Hsps) 等のシャペロン分子が関与すると考えられる[6,7,8]。熱ショック転写因子 (HSF1) は加齢により活性が減少し、Caloric RestrictionやSirt1が発現を促進する事が報告されており、老化と深く関与する事が知られている[9]。

#### 2. *Hsf1* 欠損マウスでのHspsの発現

HSF1は、高温、放射線、重金属や異常タンパク質の蓄積などのストレスによるHspの発現誘導を制御する主要な転写因子である。Hsps は分子シャペロンとして機能し、新生タンパク質の折畳み、変性タンパク質の再生および分解などを手助けし、ストレスなどによるダメージから生体を防護するように働く内因性の防御因子の1つであると考えられている。プリオン病などのタンパク質のミスフォールディングが原因である疾患において、Hspsが重要な役割を持つことが指摘されてきた[8]。さらに、活性型HSF1が異常なポリグルタミンによって蛋白質の凝集を抑制することが示唆された[10]。*Hsf1*欠損マウスでは種々のストレスによるHspsの誘導が見られないことが示されている[11,12]。

我々は、*Hsf1*ノックアウトマウス (*Hsf1<sup>-/-</sup>*) をR1.P1-*Apoa2<sup>c</sup>*マウスと戻し交配し、*Apoa2<sup>c</sup>*アリルを持つ*Hsf1<sup>-/-</sup>*マウスを作成した。R1.P1-*Apoa2<sup>c</sup>*マウスの肝臓より分取した1 μgのAApoAIIアミロイド線維を、2ヶ月齢の*Hsf1<sup>-/-</sup>*及び*Hsf1<sup>+/+</sup>* (Wild type) 雌マウスの尾静

脈に投与し、アミロイドーシスを誘発した。AApoAII線維投与2ヶ月後に、*Hsf1<sup>+/+</sup>*マウスではアミロイド沈着に伴い、心臓でのhsp27、hsp40、hsp70の発現が増加したが、*Hsf1<sup>-/-</sup>*マウスでは、増加しなかったが、(図1)。これらの実験結果より、*Hsf1<sup>-/-</sup>*マウスの心臓では、アミロイドが沈着しても、熱ショック蛋白質が誘発されないことが明らかになった。

#### 3. *Hsf1* 欠損マウスでのアミロイド沈着程度

AApoAIIアミロイド線維投与2ヶ月後に、*Hsf1<sup>-/-</sup>*マウスも*Hsf1<sup>+/+</sup>*マウスも全身にアミロイド線維が沈着したが、沈着程度は*Hsf1<sup>-/-</sup>*マウスの方が有意に高いことを示した。特に、*Hsf1<sup>-/-</sup>*マウスの心臓では、全てのマウスでアミロイドの沈着が観察され、沈着程度が高いことが明らかになった。同様に線維投与4ヶ月後の*Hsf1<sup>-/-</sup>*マウスの心臓でも、AApoAIIアミロイド線維沈着が多いことが示唆された (図2)。以上の結果から、*Hsf1<sup>-/-</sup>*マウスでは特に心臓でのAApoAIIアミロイド沈着が促進されていることが明らかになった。

#### 4. アミロイド沈着した*Hsf1* 欠損マウス心臓でのα-actinの発現量

α-actinは、筋原線維を構成する主要なタンパク質であり、筋収縮を起こさせることが知られている[13, 14]。線維投与4ヶ月後の*Hsf1<sup>+/+</sup>*マウスでは、アミロイド沈着に伴い心臓でのα-actin量が減少したが、*Hsf1<sup>-/-</sup>*マウスでは、アミロイド沈着の重篤化により、α-actin量がさらに、減少していた (図3)。この結果より*Hsf1<sup>-/-</sup>*マウスでは、重度のアミロイド沈着により、心筋収縮能の低下が示唆された。

#### 5. アミロイド沈着による心機能の解析

アミロイドーシス誘発4ヶ月後に、心エコーで心機能を観察した。その結果、*Hsf1<sup>-/-</sup>*マウスでは、重篤なアミロイド沈着により、心室中隔が*Hsf1<sup>+/+</sup>*マウスと比較して、有意に厚くなっていた (0.95 ± 0.08 vs. 0.75 ± 0.04 %, p < 0.01, 表1)。左室のFS%では、*Hsf1<sup>-/-</sup>*マウスの方が有意な低下も認められた(32.5 ± 2.8 vs. 47.5 ± 1.0 %, p < 0.001, 表1)。以上のことから*Hsf1<sup>-/-</sup>*マウスは重度なアミロイド沈着により左室の拡張不全が起

連絡先：樋口 京一

〒390-8621 松本市旭3-1-1

信州大学大学院医学系研究科加齢適応医科学系  
加齢生物学分野

Tel: 81-263-37-2691

Fax: 81-263-37-3428

e-mail: keiichih@shinshu-u.ac.jp

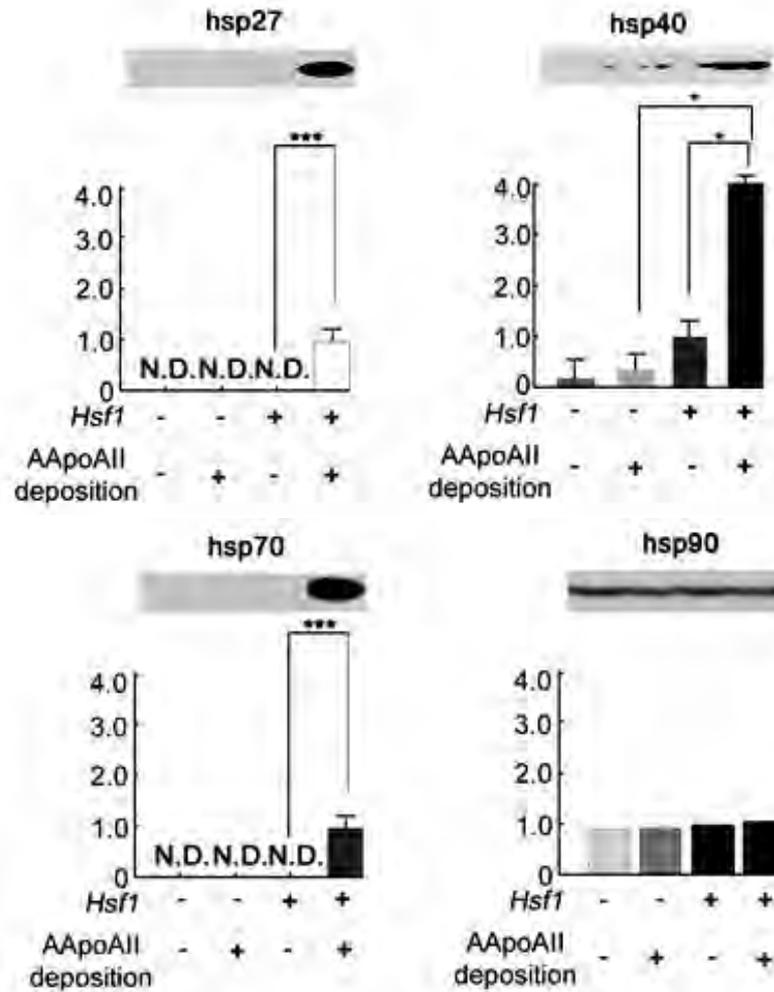


図1: *Hsf1* 欠損マウスでのHspsの発現。*Hsf1*<sup>-/-</sup>マウスでは、心臓でのアミロイド沈着に伴うhsp27、hsp40、hsp70の発現増加がおこらなかった。

こっていた (図4)。さらに、*Hsf1*<sup>-/-</sup>マウスでは、アミロイド線維が重度に沈着により、体重に対する心臓重量を有意に重く、心臓が肥大していた (表1)。

## 6. おわりに

本研究では、*Hsf1*<sup>-/-</sup>マウスでは心臓でのHspsの発現が抑制されている事を明らかにし、このマウスを用いて、1) 細胞外へのAApoAIIアミロイド沈着は心臓でのHSF1を活性化し、Hspsの発現が誘導されるが、*Hsf1*<sup>-/-</sup>マウスではこのような熱ストレス反応はほとんど起こらない。2) その結果として*Hsf1*<sup>-/-</sup>マウスでは、心臓でのアミロイド線維の沈着程度が有意に高い。3) 重度なアミロイド沈着により*Hsf1*<sup>-/-</sup>マウスでは心臓の心収縮機能の低下が認められる。

細胞外に沈着すると考えられているAApoAIIアミロイド沈着が、HSF1の発現と活性化を促進し、Hspsの増加を誘導する機構や、細胞内に存在すると考えられるHspsが細胞外のアミロイド沈着を抑制する機構は、まだ不明である。しかし同様な知見はトランスサイレチン(TTR)でも観察されている[15, 16]。アミロイド線維が従来考えられていた以上に能動的、流動的で、細胞内外での、ダ

イナミックな代謝の結果としてアミロイド沈着やその消失が起こっていることを示す結果であり、薬剤などによ

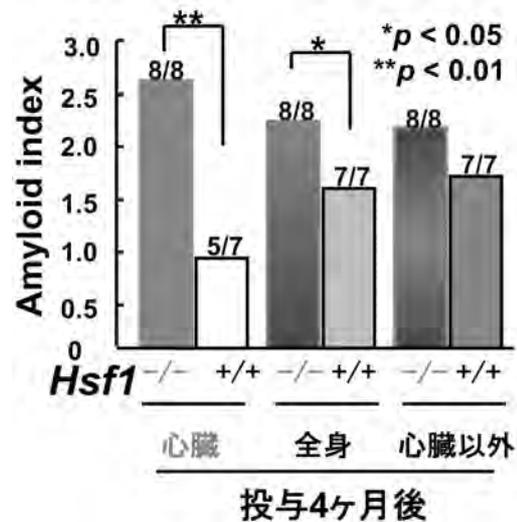


図2: *Hsf1* 欠損マウスでのアミロイド沈着程度。AApoAIIアミロイド線維投与2ヶ月及び4ヶ月後、*Hsf1*<sup>-/-</sup>、*Hsf1*<sup>+/+</sup>マウスでは全身にアミロイドが沈着した。しかし特に*Hsf1*<sup>-/-</sup>マウスの心臓で沈着程度が高かった ( $p < 0.01$ )。

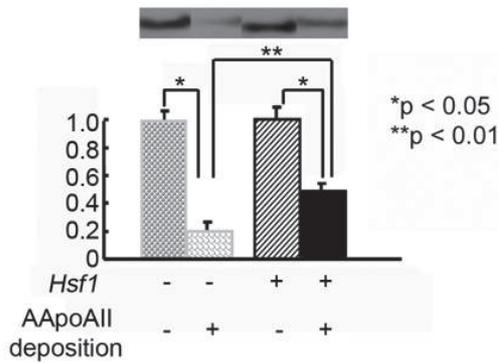


図3：アミロイド沈着した*Hsf1*欠損マウス心臓での *a*-actinの発現量。AApoAII線維投与4ヶ月後、*Hsf1*<sup>+/+</sup>、*Hsf1*<sup>-/-</sup>マウスでは心臓の *a*-actin の発現量が減少した。特に*Hsf1*<sup>-/-</sup>マウスでは、重篤なアミロイド沈着により、*a*-actinの発現量は*Hsf1*<sup>+/+</sup>マウスによりも有意に減少していた ( $p < 0.01$ )。

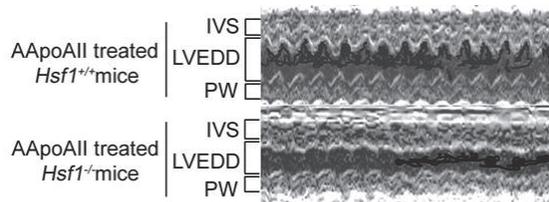


図4：アミロイド沈着による心機能の解析。AApoAII線維投与4ヶ月後に心エコーで心機能を解析した。*Hsf1*<sup>-/-</sup>マウスでは、*Hsf1*<sup>+/+</sup>マウスと比べ、心室中隔 (IVS)が有意に厚くなり、左室の拡張不全 (LVEDd) を示唆した。左室のFS%も低下していたことが認められた。

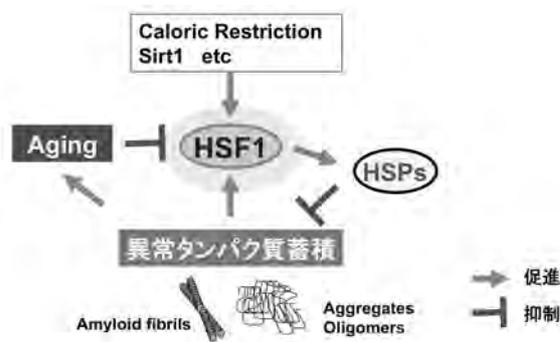


図5：HSF1を中心とした、「老化」、「Hsps」、「異常蛋白質沈着」の相互関係

るHSF1の発現促進がアミロイドーシス発症及び老化遅延に有効である。今後のアミロイドーシスの研究や治療法の開発におおきな示唆を与えると考えている。(図5)

### 謝辞

本研究は、「厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 アミロイドーシスに関する調査研究班」及び、文部科学省科学研究費「基盤B」により補助された。

### 引用文献

- Higuchi, K., Yonezu, T., Kogishi, K., et al. Purification and characterization of a senile amyloid-related antigenic substance (apoSAS<sub>SAM</sub>) from mouse serum. ApoSAS<sub>SAM</sub> is an apoA-II apolipoprotein of mouse high density lipoproteins. *J Biol Chem* 261:12834-12840, 1986.
- Yonezu, T., Higuchi, K., Tsunasawa, S., et al. High homology is present in the primary structures between murine senile amyloid protein (ASSAM) and human apolipoprotein A-II. *FEBS Lett.* 203:149-152, 1986.
- Higuchi K, Kitagawa K, Naiki H, et al. Polymorphism of apolipoprotein A-II (apoA-II) among inbred strains of mice. Relationship between the molecular type of apoA-II and mouse senile amyloidosis. *Biochem J* 279: 427-433, 1991.
- Kitagawa K, Wang J, Mastushita T, et al. Polymorphism of mouse apolipoprotein A-II: seven alleles found among 41 inbred strains of mice. *Amyloid* 10: 207-214, 2003.
- Higuchi K, Naiki H, Kitagawa K, et al. Apolipoprotein A-II gene and development of amyloidosis and senescence in a congenic strain of mice carrying amyloidogenic ApoA-II. *Lab Invest* 72: 75-82, 1995.
- Morimoto, R. I. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev* 12: 3788-3796, 1998.
- Pirkkala, L., Nykanen, P. and Sistonen, L. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J* 15: 1118-1131, 2001.
- Morimoto, R. I. Proteotoxic stress and induci-

	AApoAII	IVS (mm)	LVEDd (mm)	LVFS (%)
<i>Hsf1</i> <sup>-/-</sup> (n=8)	—	0.73 ± 0.05	2.8 ± 0.1	45 ± 2
<i>Hsf1</i> <sup>-/-</sup> (n=8)	+	0.95 ± 0.09 <sup>&amp;&amp;###</sup>	2.5 ± 0.1 <sup>&amp;&amp;###</sup>	32 ± 3 <sup>&amp;&amp;&amp;###</sup>
<i>Hsf1</i> <sup>+/+</sup> (n=8)	—	0.75 ± 0.02	3.4 ± 0.2	49 ± 1
<i>Hsf1</i> <sup>+/+</sup> (n=7)	+	0.75 ± 0.04	3.3 ± 0.1	47 ± 1

<sup>&</sup> $p < 0.05$ , <sup>&&</sup> $p < 0.01$ , <sup>&&&</sup> $p < 0.001$ , vs. AApoAIIを投与しなかった *Hsf1*<sup>-/-</sup>マウス  
<sup>###</sup> $p < 0.001$ , vs. AApoAIIを投与した *Hsf1*<sup>+/+</sup>マウス

表1：AApoAII線維投与4ヶ月後に、*Hsf1*<sup>-/-</sup>マウスでは、*Hsf1*<sup>+/+</sup>マウスと比べ、心臓重量 (体重比)が有意に重かった ( $p < 0.01$ )。

- ble chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. *Genes Dev* 22: 1427-1438, 2008.
9. Stuart K, Calderwood, Ayesha Murshid, Thomas Prince. The Shock of Aging: Molecular Chaperones and the Heat Shock Response in Longevity and Aging - A Mini-Review. *Gerontology* 55:550-558, 2009.
  10. Fujimoto M, Takaki E, Hayashi T, et al. Active HSF1 significantly suppresses poly glutamine aggregate formation in cellular and mouse models. *J Biol Chem* 280:34908-34916, 2005.
  11. McMillan DR, Xiao XZ, Shao L et al. Targeted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermo-tolerance and protection against heat inducible apoptosis. *J Biol Chem* 273: 7523-7528, 1998.
  12. Tanaka K, Tsutsumi S, Arai Y, et al. Genetic Evidence for a Protective Role of Heat Shock Factor 1 against Irritant-Induced Gastric Lesions. *Mol Pharmacol* 71: 985-993, 2007.
  13. Davis J, Cribbs DH, Cotman CW, et al. Pathogenic amyloid  $\beta$ -protein induces apoptosis in cultured human cerebrovascular smooth muscle cells. *Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest.* 6:157-164, 1999.
  14. Atencia R, Asumendi A, Garcia-Sanz M. Role of cytoskeleton in apoptosis. *Vitamins and Hormones* 58:267-297,2000
  15. Sofia Duque Santos, Rui Fernandes, Maria Joãõ Saraiva. The heat shock response modulates transthyretin deposition in the peripheral and autonomic nervous systems. *Neurobiol Aging* 31: 280-289, 2010.
  16. Teixeira PF, Cerca F, Santos SD, et al. Endoplasmic reticulum stress associated with extracellular aggregates. *J Biol Chem* 281: 21998-22003, 2006.