

日本基礎老化学会
第21回 シンポジウム講演要旨集

23

基礎老化研究

NO.2

BIOMEDICAL

1999

GERONTOLOGY

日本基礎老化学会

Japan Society for Biomedical Gerontology

介入：老化・老年病の予防を目指して
(第21回日本基礎老化学会シンポジウム)

目 次

1. 我々にはどこ迄わかり我々には何がわからないか
木谷健一 85
2. 活性酸素による生命維持機構と崩壊のシナリオ
井上正康 88
3. 酸化ストレス制御と食品
大澤俊彦 92
4. 抗老化薬開発への手掛かりを和漢薬に求めて
横澤隆子 95
5. propargylamine類によるドパミン神経細胞のアポトーシスの防御
丸山和佳子
直井 信 97
6. 動脈硬化における血管壁細胞およびマクロファージの役割とその遺伝子発現解析
和田洋一郎
児玉龍彦 100

Introduction of the Symposium

"Free radical theory of aging and age-associated disorders. Harman"

我々にはどこ迄わかり我々には何がわからないか

国立療養所中部病院長寿医療研究センター
木谷 健一

実験老年学の最終命題は老化の生物学的機序を明らかにし、種によって異なる寿命の科学的説明を見出すことにあるとされる。研究者によっては老化の機序が明らかになってこそはじめて、老化予防・遅延の方法論が探求し得ると考える人も少なくないように見える。特に基礎老化学会の会員の演題をみると、少なくともアプローチ的には上記の方向にある人が多いと思われる。私はこの方向が誤っているというつもりは毛頭ないが、次の2つの理由で、第2のアプローチ、即ち介入 "intervention" の試みから、老化・老年病の機序を求める道にも力を注ぐ必要があると考えている。第一の理由は、少なくとも老年病（加齢関連疾患、特に癌・動脈硬化など）の病因におけるいわゆる reactive oxygen species (ROS) の役割は、最近かなりはっきりしてきており、このような知見に基づいた antioxidant strategies が、少なくとも動物実験のレベルでは現実のものとなりつつあることである⁽¹⁻³⁾。最近では、加齢に伴う脳機能の変化を高い抗酸化能をもつ食物（ほうれんそう、ブルーベリーなど）が予防効果を持つことが報告されている⁽⁴⁾。このような研究結果がもし人に応用しうるなら、平均寿命或いは健康寿命

(health span) の延長という、今日、社会が実験老年学に期待する最も切実な求めに対する解答となるであろう。又第2に、例えそれが実験動物レベルでの観察でも、各疾患の病態とROSのかかわりをより明らかにする上に大きな役目を果たすと考えられる。

このような、いわゆる老年病に対する抗酸化療法の進歩に比べ、aging そのものとフリーラジカルの関連は、50年前の状態⁽⁵⁾と余りかわらないのではないかと私は考える。唯一の違いは、50年前では一般の人々はもちろん Harman 以外にその説に耳をかたむける研究者が皆無であったのに比べ、今では一般の人々も活性酸素・フリーラジカルなる語を知る人が少なくなく、マスコミによってもしきりに口にされている。又いわゆる実験老年学者の中で、フリーラジカルを無視してその論をたてる人は極めて少ないと思われる。それでいて動物の寿命とフリーラジカルの関係には、明らかになったことは余りにも少ない^(6,7)。いうなれば、フリーラジカル（或いはROS）という語が呪文の如くばっこしているだけで、その実態は、50年前と余りちがいないというのが筆者の印象といえる。

このことは、試験管内で実験的に示される ROS と抗酸化物質の反応に比し、我々が動物実験において行った個々の観察の解釈を行う場合、酸化・抗酸化の現象はきわめてあいまいとなり、動物の個体・細胞そして subcellular, さらに分子レベルの反応を動的に理解することが極めて困難であることによろう。特に反応時間というディメンションをとり入れ実験し議論することが、

極めて大切でありながらいかに困難かということにつきよう。また酸化損傷の場合、比較的明らかな各種の疾病の場合、損傷の場を標的とした抗酸化療法が可能なのに比べ、加齢そのものに対する酸化損傷はその場が明らかでないことが、議論を益々曖昧にする。私は必ずしも納得していないが、かりにたとえばDNA損傷 (deletion, mutation) を加齢の分子レベルでの原因としたとしても、体内のどの組織、どの細胞の損傷が加齢の原因となっているかは殆ど議論にすらなっていない。都老研の第2代所長となられた今堀和友先生は、御着任直後に"加齢のペースメーカー"という大難題のプロジェクト研究を始められた。我々所員一同は、そのテーマの意義すら理解しかねる大難題でそのプロジェクトチームからの報告はその解答の片鱗さえも認められなかったが、私は国内外を問わず、今尚このような議論が極めて少ないと感じている。加齢の生物学的機序にヒエラルキーが存在し、その頂点にペースメーカーがあるとする事すらむしろ仮説の段階と思われる。今回のシンポジウムでは、このような問題意識をもちながらの討論を期待したいが、前述の理由で本日の講演者の多くには疾病とその対策を論じて頂くこととなった。時間が許せば、私自身のプロバジラミン類 (特にデプレニルの実験動物寿命延長作用とその機序仮説) を紹介し^{18, 19)}、前述のペースメーカー論への足がかりとしたい。

このような未解決の困難な問題に対し、真正面から対決している井上教授にはまず、

ROS・抗酸化物質について我々が何を知っており何を知らないかについて豊富な御経験から講演頂く。次いで大澤教授・横澤助教授には、それぞれ食物内抗酸化物の効果とその作用機序、和漢薬のもつ種々の薬効のうち特に抗酸化作用のあるいくつかの薬物についての御自身の御経験を中心に解説頂く。丸山室長は少し話題を変え、パーキンソン病の病因論 (特に内因性毒素のcandidateについての博士の自説とパーキンソン病治療薬、或いは神経細胞抗アポトーシス薬としてのプロバジラミンの作用機序) について話をする。最後に和田博士からは、最新の分子遺伝学の技法を巧みに用いた新しい動脈硬化治療薬の開発にかかわるお話を伺うこととした。このように全く異なったバックグラウンドと研究アプローチを行っている研究者が一堂に会し共通の問題として老化・老年病とその対策を討論して頂くことにより、我々にbrain stormingを起こすことを本プログラムのねらいとしている。

参考文献

- 1) Hori M, Gotoh K, Kitakaze M et al. (1991) Role of oxygen-derived free-radicals in myocardial edema and ischemia in coronary microvascular embolization. *Circulation*, 84 : 828-840
- 2) Yokozawa T, Liu Z W, Dong E et al. (1998) A study of ginsenoside - Rd in a renal ischemia-reperfusion model. *Nephron*, 78 : 201-206
- 3) Kim J-M, Araki S, Kim D-J et al. (1998) Chemopreventive effects of carotenoids and curcumins on mouse colon carcinogenesis after 1,

2-dimethylhydrazine treatment. *Carcinogenesis*, 19 : 81-85

4) Joseph J A, Shukitt-Hale B, Denisova N A et al. (1988) Long term dietary strawberry, spinach or vitamin E supplementation retards the onset of age-related neuronal signal-transduction and cognitive behavioral deficits. *J Neurosci*, 33 : 8047-8055

5) Harman D (1956) Aging: a theory based and radiation chemistry. *J Gerontol*, 12 : 257-263

6) Harman D (1994) Free-Radical Theory of Aging; Increasing the functional life span. *Ann N Y Acad Sci*, 717 : 1-15

7) Meydani M, Lipman R D, Han S N et al. (1998) The effect of long-term dietary supplementation with antioxidants. *Ann N Y Acad Sci*, 854 : 352-360

8) Kitani K, Kanai K, Ivy G O et al. (1996) Assessing the effects of deprenyl on longevity and antioxidant defenses in different animal model. *Ann N Y Acad Sci*, 786 : 391 - 409

9) Kitani K, Miyasaka K, Kanai S et al. (1998) Upregulation of antioxidant enzyme activities by deprenyl : Implications for life span extension. *Ann N Y Acad Sci*, 854 : 290-306

活性酸素による生命維持機構 と崩壊のシナリオ

井上正康

大阪市立大学医学部生化学

はじめに

高等動物は多彩な生命現象を維持するために多量のATPを必要とし、その合成に莫大な量の酸素を消費している。ちなみに、ヒト成人では普通の生活を維持するために毎日最低500 Lの酸素を消費している(2×10^{20} 分子/日)。酸素分子は水に溶けにくい為、この量を溶かすには約100トンもの体液を必要とする。5 Lの血液しか持たないヒトは、ヘモグロビンへの濃縮と速やかな循環速度で積分することによりこの莫大な量を確保している。エネルギー産生に必要な酸素の量は臓器とそれを構成する細胞によって著しく異なるのみならず、個体の状態（摂食、運動、休息、体位、精神活動、睡眠など）によっても大きく変化する。これは、生物の動的状態に対応して時々刻々と変化する代謝の量と質を部位特異的に調節し、臓器相関のもとに生命機構を統合制御することが生存の基本条件になっているためである。血液循環単位から見ると、この循環系は、脳（司令塔）、心肺系（光合成系への窓）、

消化器系（食物連鎖系）、腎循環系（海への窓）、および骨格筋系（餌取り・闘争反応系）からなるシステムに大別される。個体を統合制御する中枢神経系は特にエネルギー要求性が高く、虚血や低酸素状態に陥った際には他臓器の血流を犠牲にしても自己の酸素供給を確保するように循環を制御する。多細胞生物の生命線である心血管は酸素運搬を最重要機能とし、その動態は酸素代謝により制御されている。

ヒトや動物がエネルギー産生の為に摂取する酸素量は莫大であるが、その数%は平時でも不完全還元されてスーパーオキシド(O_2^-)をはじめとする活性酸素(H_2O_2 , $\cdot OH$, $HClO$ など)やNOなどに変換されている。これらの分子種は一般に反応性が高く、ヘム蛋白、生体チオール、あるいはDNAなど、様々な生体成分と反応して生理機能を発現すると同時に、病理作用を発揮する。体内で発生する活性酸素がすべて有害作用を発揮すると仮定すると、一生の間に約 10^9 Kjouleの破壊的エネルギーが生体分子に作用することになる。ちなみに、放射線がDNAをヒットして偶発的に癌発生を倍化する線量（偶発癌倍化線量）は約0.2 Gy/日 ($10^{11} HO^\cdot$ /日)であり、これは健康人の体内で発生する活性酸素の 10^7 倍もの量に匹敵する。

これらの分子種の寿命が極めて短

いため、その生体内機能の解析が困難であった。演者は、病巣指向性の長時間作動型SODや血管内皮細胞指向性SOD (ヘパリン親和性HB-SOD) などを開発し、個体レベルで組織細胞局所における分子論的解析を行ってきた。本シンポジウムでは、相互にクロストークする活性酸素種のスーパーシステムが、脳や全身組織のエネルギー代謝、血液循環動態、情報伝達系、および体内の共生微生物群を統合制御する様相を紹介し、生命維持と崩壊のシナリオを考察する。

1、循環エネルギー代謝制御

狭心症の特効薬ニトログリセリンの作用本体である一酸化窒素はガス状ラジカルであり、細胞膜を簡単に通り抜け、動脈組織では平滑筋細胞内のグアニル酸シクラーゼを直接活性化して循環動態を制御する。この循環制御機能に加え、NOは神経伝達、血小板凝集能阻止、殺菌、あるいは制がん作用など、極めて多彩な作用を示す。その際、NOはヘム蛋白質やSH酵素群などと反応して様々な代謝系を制御するのみならず、スーパーオキシドをはじめとする活性酸素、生体チオール、アスコルビン酸なども相互作用しながら生理機能と病理活性を発揮する。したがって、NOの生理機能や病理機能を知るには、上記生体成分との相互作用を動的に理解することが不可欠である。

血管内皮細胞のヘパリン硫酸にターゲティングするHB-SODを用いて解析した結果、各種の高血圧病態が抵抗性血管局所におけるスーパーオキシドとNOのバランスが前者優性となり、NOの血管弛緩効果が低下することに起因することから、「高血圧は活性酸素病である」との概念を提唱してきた。一方、エンドトキシン病態などでは、NOの過剰産生により低血圧ショックが誘起されることも知られている。

大気下の実験から、NOの寿命は極めて短い(5-8秒)と考えられてきたが、体内の生理的低酸素分圧下ではその生物作用が著しく長く、特に虚血下ではさらに長時間強く作用し続ける。これは、NOが分子状酸素と $6 \times 10^6 \text{M}^2 \text{s}^{-1}$ の反応定数で反応して不活性化されることに起因する。事実、各種の酸素分圧下でNOによる動脈リングの弛緩反応を解析した結果、NOのEDRF作用は局所の酸素分圧に大きく左右され、低酸素環境下では極めて大きくなることが確認された。この際、血管壁グアニル酸シクラーゼによるcGMP産生量も酸素分圧の低下に伴い著しく増加する。この様に、NO産生の基質である分子状酸素はNOとスーパーオキシドとの相互作用を介して血管の収縮弛緩強度を制御する分子機構を構築している。古くより、虚血部位の血管が拡張する合目的現象が知られているが、その

背景にも活性酸素のクロストークによる制御機構が存在する。事実、脳虚血再循環病態時の抵抗性血管の弛緩反応は、内因性スーパーオキシドにより減弱し、SODのターゲッティングにより増強する。

抵抗性血管における酸素分圧とNOとの関係は、エネルギー代謝に必要な酸素の動員量を酸素分子自身が規定していることを意味する。NOと標的分子であるguanylate cyclaseのヘムとは極めて親和性が高いので、他のヘム蛋白とも類似の反応が起こる可能性が高い。事実、NOは各種組織のミトコンドリアや細胞の電子伝達系に作用して呼吸を可逆的に抑制する。また、本阻害反応は生理的低酸素分圧下では著しい。解析の結果、ミトコンドリアの電子伝達系終末に位置するcytochrome c oxidaseがNOの高感受性標的分子であることが判明した。NOは上流の抵抗性血管では酸素動員を増強させる正のエネルギー制御因子として、下流の組織ミトコンドリアではATP合成を抑制する負の因子として特定の部位におけるエネルギー代謝を精密かつ迅速に自動制御している。

2 NOとアポトーシス

ミトコンドリアの電子伝達系は微量のNOによって阻害されるが、この際にミトコンドリア膜は脱分

極し、カルシウムイオンが細胞質に放出される。この際、PKCをはじめとするCa⁺⁺依存性酵素系が制御されうる。これらの所見は、生体内の生理的酸素分圧下ではNOがエネルギー代謝や細胞内シグナル伝達系を制御するシステムが存在することを示唆する。このシグナル伝達反応は、アポトーシスの部位特異的発現機構を介して、ガン細胞増殖制御や個体発生における形態形成などにも関与している。例えば、癌性腹膜炎ではiNOSを強発現したマクロファージが多数浸潤し、アルギニン依存性に産生されたNOによりガン細胞のミトコンドリア代謝が強く抑制され、癌細胞はアポトーシスに陥いる。

このようなNOのアポトーシス誘導能は個体発生における制御機構としても重要である。例えば、オタマジャクシがカエルに変態する際の尻尾消失は、コラゲナーゼの活性化や尾部筋肉細胞のアポトーシスに起因する。これは、尾部におけるNO合成酵素(iNOS)の特異的発現によりNO産生が増加し、カタラーゼが不活化されて過酸化水素の局所濃度が増加する結果、カスパーゼ群が活性化されて核DNAがフラグメンテーションを起こすことによる。本反応は、オタマジャクシの変態ホルモンであるチロキシンにより劇的に加速される。

哺乳類の胎生期における様々な組織の形態形成にもiNOSの遺伝子発現を引き金とするアポトーシスのカスケード反応が関与する。

3 NOと感染防御機構

好中球やマクロファージの産生するスーパーオキシド、過酸化水素、次亜塩素酸などは殺菌システムとして重要である。また、NOも重要な殺菌作用を有するが、その詳細は不明である。ミトコンドリアは好氣的微生物が有核細胞に共生したことを考えると、NOにより誘起されるミトコンドリアの反応は好氣的微生物でも観察される可能性が高い。事実、ミトコンドリアと同様に、低酸素環境下では微量のNOが大腸菌の呼吸とエネルギー代謝を可逆的に阻害し、細菌の増殖速度を強く抑制する。

食物や唾液中の亜硝酸は胃液酸性下で化学的にNOに変換されるため、胃液中には胃酸と共に高濃度のNOが存在する。食物には常に微生物が共存しており、上部消化管における殺菌防御反応は動物の最重要機能の1つである。したがって、胃液内では強酸とNOによって大半の細菌が死滅する。さらに、大腸は偏性嫌気性菌が大多数をしめる超低酸素濃度区画となっているため、好気性菌の大半は排除される。このように、胃の低pHや上下消化

管における低酸素・NO系は餌取り反応と感染防御システムを共役させる生命維持機構である。しかし、これらのシステムは消化器の癌の一因にも成りうる。本シンポジウムでは、動物の生死を左右する活性酸素の代謝特性から生活習慣病や老化の問題を考察する。

酸化ストレス制御と食品

大澤俊彦

名古屋大学大学院生命農学研究科

T. Osawa

Nagoya University Graduate School of
Bio-agricultural Sciences, Nagoya 464-
8601, Japan

生命を維持し生物として活動するために必要な「活性酸素」は、エネルギーを獲得するためだけでなく、体内に進入してきた病原菌やウイルスを殺す白血球やマクロファージに必須であり、また、ホルモン合成にも重要な役割を果たしているが、一方では、過剰に生成した反応性の高い「活性酸素」は、コントロールを失ってわれわれの体の生体成分に損傷を与え、最終的には遺伝子レベルに至る酸化傷害が問題となる。このような背景で、最近注目を集めているのが、「酸化ストレス」の高感度で簡便な評価法の開発であり、特に著者らが注目したのは、攻撃の対象である脂質、タンパク質、核酸の酸化修飾物をエピトープとする免疫化学的な検出法の確立である。今までに、脂質過酸化初期反応生成物である脂質ヒドロキペルオキシド(Kato et al., 1999)や生体内脂質過酸化反応終期生成物としてよく知られているマロンジアルデヒド(Uchida et al., 1997)や4-ヒドロキシノネナール(Toyokuni et al., 1995)、アクロレイン(Uchida et al., 1998)などのアルデヒド類に特異的なモノクローナル抗体やポリクローナル抗体の作製にも成功している。また、

マクロファージや好中球による酸化障害のマーカーであるニトロチロシンやジチロシン、さらに最近では、糖尿病合併症のバイオマーカーとしてグリオキザールやメチルグリオキザールに特異的な抗体(Oya et al., 1999)や8-ヒドロキシデオキシグアノシンのようなDNAの酸化傷害に特異的なモノクローナル抗体の作製に成功し(Toyokuni et al., 1997)、現在、これらの抗体を用いて簡便かつ微量で定量できるELISA法を構築し、抗酸化成分の機能性を試験管レベルから培養細胞、個体レベルからヒトを対象とした臨床レベルで適用することを目的に研究を進めてきた(Ahmed et al., 1998)。特に、チロシンの2量体であるジチロシンは、老人や合併症の患者のコラーゲンやレンズクリスタリン中に存在が明らかにされているたんぱく質の酸化修飾バイオマーカーであるが、最近、きわめて特異性の高いポリクローナル抗体を得ることができ、この抗体を用いた免疫組織化学により、68歳の男性の脳のリポフスチン顆粒が陽性に染色されることが明らかとなった(Kato et al., 1998)。

このように、老化に関連したさまざまな疾病の原因である「酸化ストレス」を予防しうる食品素材として私たちが特に着目したのが、子孫を絶やさず次世代に生命を残す植物種子である。有色の米種子やいんげん豆種子の種子表面に存在する抗酸化性色素はアントシアニンと呼ばれるポリフェノールの一種であり、紫トウモロコシや紫キャベツ、また、プルーンなどわたしたちの身の回りの多くの植物性食品に含まれていることが知られている。しかも、酸化的傷害に対する防御能の高い野生種の色の有色

タイプに多く含まれ、栽培種として我々が日常食べている食品素材には含量が多くない。有色の野生種から長い間の交配・品種改良を進めた結果、自身の抗酸化的な防御機構は低下したと推定されるので、もう一度野生種の持つ機能性に目を向ける必要があるのではないかと考えている(Tsuda et al., 1999)。

一方、同じ豆類の一つであるカカオ豆のポリフェノール色素は発酵中に生成し、アルコール性胃粘膜障害の抑制効果をはじめビタミンE欠乏時の酸化ストレスに対する防御作用、遺伝毒性防御効果や変異原性抑制効果、皮膚がんに対する予防効果など、興味ある結果を得ることができ、ポリフェノールの化学的解析と生理機能に関する研究を進めている(Sanbongi et al., 1998)。

このようなフェノール性抗酸化成分は、ゴマやターメリックをはじめ多種多様なハーブや香辛料に多く含まれている。特に、脂溶性抗酸化物質のセサミノール強力な抗酸化性を有し、ヒトの LDL の酸化傷害を高脂血症治療薬であるプロブコールに較べてはるかに強力な酸化抑制効果が見出された。しかも、ゴマ種子中にセサミノール配糖体として大量に存在しているが、抗酸化前駆物質として摂取されたのち、腸内細菌の持つβ-グルコシダーゼの作用で生成したセサミノールが腸管から吸収され、最終的には血液を経て各種臓器中に至り、生体膜などの酸化的傷害を防御すると考えられている。実際の応用開発の可能性についてはスタートしたばかりであるが、最近、ウサギに1%のコレステロールを投与した動脈硬化モデル動物にゴマ脱脂粕を投与して、セサミノール配糖体が動脈硬化の予防に効

果的であることを明らかにしている(Kang et al., 1999)。ゴマ種子にセサモリンと同程度の含量でセサミンが含まれているが、セサミンについては京都大学、九州大学のグループがセサミン自身には抗酸化性はないが摂取後に抗酸化性代謝物に変換されることが見出され、われわれのグループもセサモリン自身は抗酸化性を持たないがやはり強力な生体内抗酸化物質として期待されることを最近明らかにしている(Kang et al., 1998)。最近、セサミノール配糖体は、自然発症の動脈硬化動物モデル(WHHL Rabbits)でも動脈硬化に対する予防効果が明らかにされている(Kang et al., 1999)。現在、酸化ストレス予防食品としての応用を検討中であるが、ゴマという伝統的な健康食品素材のため安全性は問題ないと考えられ、今後の応用開発の研究の進展が期待されている。

一方、われわれはインド料理に不可欠で日本でもなじみの深い香辛料、ターメリックの黄色色素、クルクミンにも注目している。クルクミンについては、特にアメリカで注目を集め、皮膚がんや大腸がんの抑制効果などが報告されているポリフェノールの一種である。われわれの研究グループは、このクルクミンの機能性発現に抗酸化性が大きく関与しているという仮説のもとに研究を進め、抗酸化性発現機構について興味ある結果をえることができた。すなわち、クルクミンを摂取するとまず腸上皮細胞で還元され、強力な抗酸化性を持つテトラヒドロクルクミンに変換されたのちに脂質ラジカルを捕捉するという興味ある機構が明らかとなった。さらに、最近では、国立がんセンターとの共同研究の結果、テトラヒ

ドロクルクミンがクルクミンより強い大腸がん抑制効果をもつという興味ある結果を見出している(Kim et al., 1998)。また、最近では、レモン中の抗酸化成分「エリオシトリン」が糖尿病モデルラットにおける活性酸素の傷害を抑制することも明らかにすることができた(Miyake et al., 1998)。このように、さまざまな植物性食品素材に酸化ストレス予防因子が含まれ、これらの成分の持つ機能性の研究はスタートしたばかりである。食品というわれわれ人間にとって長いつきあいのある素材であるので、長い食履歴が安全性を証明しているということになるだろうが、最終的にはヒトを対象とした介入試験でその効能とともに安全性を証明する必要があるものと考えられている。

栄養学を背景としたビタミンやミネラルの研究は多く見られるが、非栄養素に属するポリフェノールなどの食品成分の生体内で機能性に関する研究は余り行われていなかった。食品という複合系であるために、摂取後の生体内動向に関する分子レベルの研究は始まったばかりであり、この分野の今後の研究の発展が大いに期待されている。今後、臨床的にも応用しうる抗酸化食品の分子設計を行うにあたって、あくまで「食品」という概念の範囲で機能性の持つ重要性を科学的に証明し、毎日の食生活のなかで日常起こりうる酸化的な傷害からわれわれの体を保護し、酸化ストレスが原因であると考えられている疾病、例えば、がんをはじめ動脈硬化や糖尿病の合併症、虚血性心疾患やパーキンソン病やアルツハイマー症などを抗酸化成分を中心とした「食品因子」で予防できるようになることを期待したい。

文献

- Ahmed, N.U. et al., (1998) Br. J. Dermat., 140, 226-231.
Miyake, Y. et al., (1998) Lipids, 33, 689-695.
Kan, M. -H. et al., (1998) J.Nutr., 128, 1018-1022.
Kang, M. -H. et al., (1999) J. Nutr., in press.
Kang, M. -H. et al., (1999) Life Sci., in press.
Kato, Y. et al., (1998) FEBS Letters, 439, 231-234.
Kato, Y. et al., (1999) J. Biol. Chem., 274, 20406-20414.
Kim, J.-M. et al., (1998) Carcinogenesis, 19, 81-85.
Oya, T., (1999) J. Biol. Chem., 274, 18492-18502.
Sanbongi, C. et al., (1998) J. Agric. Food Chem., 46, 454-457.
Toyokuni, S. et al., (1995) FEBS Lett. 359, 189-191.
Toyokuni, S. et al., (1997) Laboratory Investigation, 76, 365-374.
Tsuda, T. et al., (1999) FEBS Letters, 449, 179-182.
Uchida, K. et al., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 4882-4887.

抗老化薬開発への手掛かりを和漢薬に求めて

横澤隆子

富山医科薬科大学和漢薬研究所

近年、わが国も急速に高齢化社会を迎え、老化に対する科学的関心も高まり、DNA、遺伝子、染色体、細胞レベルからさらに器官、個体レベルに至るまで、各分野で活発に研究が行われている。

一方、和漢薬は中国本草学の原典『神農本草経』(後漢)に上薬、中薬、下薬として分類されている。上薬は「無毒、命を養い、軽身、益気、不老延年に資する薬」とされており、薬用人参はその代表的な薬物といわれてきた。

人参の薬効として「味甘く微寒、五臓を補い、精神を安んじ、魂魄を定め、動悸を止め、邪気を除き、目を明らかにし、心を開き智を益するを主る。久しく服すれば身を軽くし、年を延ばす」と記されている。さらに西暦500年頃編纂されたといわれている『校訂神農本草経』では効能がさらに追加され、「微温、無毒、腸胃の冷に中り、心腹鼓痛し、胸脇逆満し、霍乱吐逆するを療し、中(中焦の略、消化機能)を調え、渴を消し血脈を通じ、堅積を破り、人をして忘れざらしむ」と記されている。

現代中医学では虚証に用いられ、気虚、益気(補気)に有効とされ、その症状として元気不足、機能低下、抵抗力の衰弱、疲れやすい、無力感、息切れ、声に力が

ない、汗かき、食欲不振などに有効とされ、陽虚の状態で現代科学的には同化作用の衰弱、エネルギー代謝の低下ならびに末梢循環不全などの用語を用いて効能が説明されている。

演者らはこれまで薬用人参水性エキス、部分精製物ならびに総サポニンおよび精製サポニンを用い、ラット肝のRNAならびに蛋白合成促進作用を見だし、さらに糖、脂質代謝に対する作用を明らかにし、生体の基本構成成分である核酸、蛋白質、糖質、脂質における代謝促進作用を報告してきた¹⁻⁷⁾。これら研究成果はいずれも数時間～数週間の実験で得られたもので、しかも比較的若いラットを用いての研究が中心であるが、薬用人参の古典の記載の「延年」に対する科学的研究を紅参粉末を用いて検討し、老化ラットの生存率を高める結果が得られた。本シンポジウムではこれらについて述べるとともに、他の和漢薬の老化に及ぼす影響について言及したい。

参考文献(著書のみ列記)

- 1) 大浦彦吉, 横澤隆子: 人参サポニンの代謝作用. "薬用人参-その研究と進歩-", 大浦彦吉, 熊谷 朗, 柴田承二, 高木敬次郎編, 共立出版, 東京, 1983, p.90-121.
- 2) 大浦彦吉, 横澤隆子: 糖尿病モデル動物と人参サポニン. "薬用人参'85-その基礎, 臨床医学研究-", 熊谷 朗, 大浦彦吉, 奥田拓道編, 共立出版, 東京, 1985, p.118-133.
- 3) 横澤隆子, 大浦彦吉: 高脂血症モデル

と人参サポニン."薬用人参'85 -その基礎, 臨床医学研究-", 熊谷 朗, 大浦彦吉, 奥田拓道編, 共立出版, 東京, 1985, p.134-147.

- 4) 横澤隆子, 大浦彦吉: 人参サポニン Rb₂のストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットに対する蛋白質合成促進作用ならびにN-バランスの改善作用. "薬用人参'89 -その基礎, 臨床研究の進歩-", 山村雄一, 熊谷 朗監修, 大浦彦吉, 奥田拓道, 森沢成司, 山本昌弘編, 共立出版, 東京, 1989, p.71-86.
- 5) 大浦彦吉, 横澤隆子: in vivoにおける生化学的薬理作用 -生体成分ならびに代謝を指標とした研究法-. "医薬品の開発 第2巻, 薬理活性物質II", 柴田承二監修, 原田正敏編, 広川書店, 東京, 1989, p.369-403.
- 6) 大浦彦吉, 横澤隆子: 代謝調節剤としての薬用人参の作用 -肝を中心にして-. "薬用人参'95 -臨床効果からモデル動物による検証まで-", 熊谷 朗編, 共立出版, 東京, 1994, p.74-87.
- 7) 横澤隆子: 生化学的アプローチ. "改訂第3版 生薬学概論", 難波恒雄, 津田喜典編, 南江堂, 東京, 1998, p.194-201.

propargylamine 類によるドパミン神経細胞のアポトーシスの防御

丸山和佳子¹⁾、直井信²⁾

1)国立中部病院長寿医療研究センター

2)応用生化学研究所

W. Maruyama¹⁾, M. Naoi²⁾

1)Laboratory of Biochemistry and Metabolism, Department of Basic Gerontology, National Institute for Longevity Sciences, 2)Department of Brain Sciences, Institute of Applied Biochemistry

目的；パーキンソン病、アルツハイマー病などの神経変性疾患は加齢に従いその罹患率が増加する。これらの疾患は寝たきりや痴呆の原因となり、高齢者の quality of life を低下させる要因となっている。一方神経変性疾患では特定の神経が選択的に細胞死に陥るが、これはアポトーシスを介するものであることを示唆する報告がなされている。アポトーシスを引き起こす trigger としてはラジカルによる酸化ストレスや脳に内在する神経毒の関与がいわれているが、それを制御する因子については明らかとなっていない。神経変性疾患におけるアポトーシスを抑止する薬剤の開発を目的として研究を行った。
方法；ヒト神経芽細胞腫である SH-SY5Y 細胞をヒト脳内在性神経毒であ

る N-methyl(R)salsolinol あるいは NO とスーパーオキシドを同時に発生させ強力なラジカルである peroxyntirite を生成させる SIN-1 で処理することによりアポトーシスを誘導した。酸化ストレスの細胞死への関与を明らかにするため、superoxide dismutase、catalase といった抗酸化酵素や種々の antioxidant の影響を検討した。さらに selegiline およびその類似化合物についても抗アポトーシス作用を検討した。アポトーシス抑制効果を定量的に検討するために single cell gel electrophoresis assay を用いた。さらに抗アポトーシス作用の機序を明らかにするため、蛍光色素 JC-1 を用いたミトコンドリア膜電位の変化の検討、Hechst33342 を用いた細胞核の凝縮と断裂の観察を行った。

結果；N-methyl(R)salsolinol および SIN-1 は濃度依存的に SH-SY5Y 細胞にアポトーシスを惹起した。抗酸化酵素および antioxidant を用いた実験の結果より、N-methyl(R)salsolinol の毒性には hydroxyl radical が、SIN-1 の毒性には peroxyntirite が関与していると考えられた。selegiline 誘導体の一部は N-methyl(R)salsolinol あるいは SIN-1 によるアポトーシスを抑止し、その活性は B 型モノアミン酸化酵素阻害活性とは相関が認められなかった。さらに構造活性相関を検討したところ、

propargylamine 基が抗アポトーシス活性に必須であった。propargylamine 類は神経毒あるいはラジカルによるミトコンドリア膜電位の低下を抑止し、アポトーシスによる細胞核の断裂を防止した。

考察 ; N-methyl(R)salsolinol は黒質線条体ドパミン神経細胞に選択的な神経毒であり、ラットにパーキンソン病様症状を惹起する。最近、脳脊髄液中の N-methyl(R)salsolinol 濃度がパーキンソン病患者で増加していること、さらに N-methyl(R)salsolinol 合成の律速酵素である neutral (R)salsolinol N-methyltransferase 活性がパーキンソン病患者で増加していることが報告された。パーキンソン病患者脳内で合成、蓄積された N-methyl(R)salsolinol は長期間の後にドパミン神経細胞にアポトーシスを惹起し、パーキンソン病の原因となっている可能性がある。従って N-methyl(R)salsolinol によるアポトーシスを抑止する薬剤は、パーキンソン病の進行防止あるいは予防に有用である可能性があると考えられる。一方 peroxynitrite は NO とスーパーオキシドの縮合反応により生成され、NO による神経傷害はこのラジカルの生成によるものが大きいとされている。近年アルツハイマー病、パーキンソン病などの神経変性部位で peroxynitrite とチロシンの反応生成物である nitrotyrosine

が認められるとの報告が相次いでいる。また、老人脳神経細胞でリポフスチンにも nitrotyrosine が存在した。このことは脳神経細胞が持続的に peroxynitrite による傷害に曝されていること、神経変性疾患においてはその傷害が増加していることを示す証拠であると考えられる。

selegiline および構造の類似した propargylamine 類は N-methyl(R)salsolinol あるいは peroxynitrite によるアポトーシスを抑止することが証明された。selegiline は B 型モノアミン酸化酵素阻害剤として開発されたが(3)、実験動物に対する寿命延長作用 (1,3)、神経毒や血清除去刺激に対する神経保護作用 (2,4,5,6,8)をもつことが報告されている。また、パーキンソン患者に対する進行抑制効果については大規模な研究が行われたが、結論はでていない(7)。selegiline の作用を不明確にしている原因の一つは、selegiline が生体内で生物学的作用をもつ amphetamine と methamphetamine に代謝されることである。今回の我々の研究で、selegiline に構造の類似する propargylamine 類にも同様な抗アポトーシス作用が存在することがわかった。これら propargylamine 類は将来の神経保護薬として有用である可能性がある。

参考文献

1. Carrillo M.-C., Kanai S., Nokubo M.,

- Ivy G. O., Sato Y. and Kitani K. (1992)
Exp. Neurol. 116, 286-294
2. Finnegan K. T., Skratt J. J., Irwin I., DeLanney L. E. and Langston J. W. (1990) *Eur. J. Pharmacol.* 184, 119-126
 3. Knoll J. (1992) *J. Am. Geriatr. Soc.* 40, 839-847
 4. Maruyama W., Naoi M., Kasamatsu T., Hashizume Y., Takahashi T., Kohda K. and Dostert P. (1997) *J. Neurochem.* 69, 322-329
 5. Maruyama W., Strolin Benedetti M., Takahashi T. Naoi M. (1997) *Neurosci. Lett.* 232, 147-150
 6. Maruyama W., Takahashi T. and Naoi M. (1998) *J. Neurochem.* 70, 2510-2515
 7. Parkinson Study Group (1993) *New Eng. J. Med.* 328, 176-183
 8. Wadia J.S., Chlmers-Redman R.M.E., Ju W.J.H., Carlie G.W., Phillips J.L., Fraser A.D., Tatton W.G. (1998) *J. Neurosci.* 1, 932-947

動脈硬化における血管壁細胞およびマクロファージの役割とその遺伝子発現解析

和田洋一郎, 児玉龍彦

東京大学先端科学技術研究センター
分子生物医学部門

1. はじめに

動脈硬化の発症機序について、LDLが血管壁に移行したのちに受ける変性の過程、生成した変性脂質が内皮細胞や平滑筋、マクロファージなどの血管壁細胞に対して及ぼす作用、そして最終的に泡沫細胞が形成されるまでの細胞生物学的現象に関しては不明の点が多い。

とりわけ、ウサギ動脈硬化モデルに対して著明な効果を示すプロブコールについては、LDLの酸化抵抗性を増す作用がその抗動脈硬化作用を必ずしも十分に説明しないことが明らかになり、その真の作用点の同定が治療薬開発の端緒になると考えられている。

そのため、我々は初期病変の発症機序を、体外で経時的にしかも容易に観察することができる血管壁モデルを作成するため、ウサギ大動脈内皮細胞と平滑筋の混合培養を行った。さらにこの培養系にヒト末梢血由来単球を添加して、培養を継続したところ、*in vitro*で泡沫細胞を形成を観察した。

また、血管壁でのM ϕ 形成においてはGM-CSFが重要であることが知られており、単球細胞からM ϕ が分化する際に動員される遺伝子を明らかにするため、ヒト末梢血由来の単球細胞と、同時に回収された単球にGM-CSFを添加して一週間培養して得られたM ϕ の遺伝子発現をGene Chip (Affymetrix社)によって検討した。

2. 方法

<ウサギ大動脈血管壁初代培養細胞とヒト末梢血由来単球細胞による混合培養系>

我々はコラゲナーゼ処理によってウサギ大動脈から内皮細胞と平滑筋細胞を分離し、初代培養する方法を

新規に開発した。この内皮細胞をコラーゲンマトリックスの上に播種したものをMethod I, あらかじめ播種した平滑筋が作るマトリックスの上に播種する培養系をMethod IIとした。ヒト末梢血より単離した単球細胞を、上記血管壁モデルに添加して混合培養を行った。

<混合培養系の観察>

(1) 凍結切片作製による単球潜り込みの確認。

単球を添加する直前にMCP-1にてチャンバーを4時間刺激した系では、固定したフィルターをまず凍結切片とし、抗CD68抗体、M ϕ 特異的抗体であるAM-3K, 抗スカベンジャー受容体抗体による染色を行った。

(2) 共焦点レーザー顕微鏡による迅速かつ直接的単球潜り込みの観察。

あらかじめ内皮細胞はRhodaminにて赤に、単球はFITCにて緑色に着色した後に混合培養を行い、固定後にレーザー共焦点顕微鏡にて観察した。

(3) 電子顕微鏡による内皮下潜り込み、マトリクス内定着、泡沫化の観察。

混合培養の終了した検体は1.5%グルタルアルデヒドにて固定したのち、走査型および透過型電子顕微鏡にて観察した。

(4) 共焦点レーザー顕微鏡による定量的測定。

上記混合培養系樹立の主目的の一つは大量かつ迅速な薬剤スクリーニング系への応用である。このため、共焦点顕微鏡とコンピュータ制御ステージを組み合わせた定量システムを開発した。

<網羅的遺伝子発現の検討>

Gene Chipは表面加工したガラス上に約5800個の遺伝子とhybridizeする25merのヌクレオチドが固定されている。検体細胞のRNAが結合することによって得られる輝度信号に基づいて、それぞれの遺伝子の発現量を検討した。

3. 結果

血管壁モデル系凍結切片の免疫組織学的検討によって、内皮細胞間にtight junctionの構成蛋白である α

catenin, VE-Cadherinが存在していることを確認し、少なくとも培養後2週間は維持されていた。また、Myosin Heavy chain isoformに対する抗体によってMethod IIにおける平滑筋の表現型を検討したところ、SM1, SMemb が陽性であり、分泌型であることが確認された。この平滑筋が産生するマトリックスの組成は主にI型とIV型のコラーゲンであり、Proteoglycanの一種でLDL粒子との結合が知られているSyndecanも産生されていた。

ヒト単球を添加した培養系では、MCP-1存在下での内皮細胞下への単球細胞の遊走の微細な形態の変化が確認された。

内皮細胞と単球細胞を発光波長の異なる蛍光色素で染色し、レーザー共焦点顕微鏡により直接切片の垂直断面を観察し、潜り込んだ単球の数を測定したところ、この培養系におけるケモカインの効果を定量的に確認し得た。

内皮細胞下に遊走した単球は、添加後三日目にはマクロファージの分化マーカーを発現していた。マトリックス内に酸化LDLをあらかじめ混入してから、内皮細胞と単球を添加したところ、内皮下のマクロファージ細胞質内に空泡形成が認められ、単球添加後四日目には、内皮下単球系細胞の細胞質内にlipid dropletが蓄積した。さらに、一週間培養を継続したところ、核の大きさは変わらないものの細胞質容積がおよそ100倍に増大し、細胞質内にSudan III染色によって陽性に染色される多数の空泡と一部コレステロール結晶様の構造を伴う、泡沫細胞が形成されていることが確認された(図1)。

ヒト末梢血由来の単球細胞と、同時に回収された単球にGM-CSFを添加して一週間培養して得られたM ϕ の遺伝子発現をGene Chip (Affymetrix社)によって検討した。対象となった遺伝子は全長が確認されている既知の遺伝子約5800個である。

単球と比較して著しく発現が増強した遺伝子とその倍率の順にリストアップしたところ、5倍以上に増加した遺伝子が170、5分の1に減少した遺伝子が107個

検出された。

4. 考察

今回我々はウサギ及びヒト細胞の混合培養を行い、泡沫細胞を形成した。この培養系において2週間経過した後も、内皮細胞にはtight junctionの構成蛋白が発現していることから、機能的な内皮細胞層が形成されていることが確認されものの、平滑筋は分泌型であることが分かったが、この点で正常血管と異なり、今後表現型のコントロールが必要と考えられた。

酸化LDLをMethod Iのコラーゲンマトリックス内にあらかじめ添加することによって泡沫細胞を形成した。しかし、今回硫酸銅酸化LDLを使用していたこと、より生理的な泡沫細胞形成は高濃度native LDLが契機となっていると考えられることから、今後native LDLによる泡沫細胞形成を検討する必要がある。また、今回、Method IIにおいて、平滑筋はSyndecanを産生しているがこれはin vitroでLDL粒子と結合することが明らかになったので平滑筋を添加した混合培養系が有用であることが示唆された。



図1. 泡沫細胞の電顕像

EC: 内皮細胞, M: マクロファージ, *:細胞外マトリックス. scale bar: 2 μ m. 1500倍。

マクロファージで増加した遺伝子を単球の動員過程毎に分類した(図2)。図中カッコ内の数値は何倍に増加したかを示すfold changeの値である。病変形成には血管腔内から内皮細胞下への移動

(transmigration)が重要であるが、実際Mφの運動に直接関与したり、内皮細胞の透過性を亢進させ、内皮下マトリックスを分解する遺伝子の増加が認められた。また、コレステロール代謝に関わる遺伝子の増加も図示した通り明らかであった。

単球細胞にGM-CSFを用いて分化させたマクロファージでは特記すべきはコレステロール代謝に関与する遺伝子がapo Eを初めとして図に示すように顕著に増加していることである。この意義については今後の検討を待たねばならないが、Mφが脂質代謝を盛んに行っている細胞であることが伺い知れる所見であり、今後の泡沫細胞形成過程での遺伝子発現解析と併せて、動脈硬化の進展に重要な遺伝子、治療薬の対象となりうる遺伝子の解析を行いたいと考えている。

混合培養系においてin vitroで形成された泡沫細胞は、マトリックスから回収することにより、生理活性測定をおこなったり、直ちにmRNAを生成してGene chipを用いて遺伝子発現様式を検討することが可能である。

従来血管壁内に認められるマクロファージ、泡沫細胞を記述する際には、表面抗原や、細胞内抗原の特異的抗体による検出や、エステラーゼ等の酵素活性、および脂質染色が主に用いられている。これに加えて、われわれはこの泡沫細胞の性質を遺伝子発現様式によって表現することができると考えている。

また、既知の抗酸化剤を添加した際の遺伝子発現の変化を検討することにより、その薬剤の作用部位に関する手掛かりを得ることができるので、プロブコールの抗動脈硬化作用を明らかにしたいと考えている。

参考文献

1. Pedro R. Moneno, Erling Falk, Igor F. Palacios, John B. Newell, Valentin Fuster, John T. Fallon. Macrophage

infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. *Circulation*. 1994;90:775-778.

2. Michael J. Davis, Peter D. Richardson, Neville Woolf, David R. Katz, Jessica Mann. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br. Heart J.* 1993;69:377-381.

3. Jeffery M. Isner, Marianne Kearney, Scott Bortman, Jonathan Passeri. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation*. 1995;91:2703-2711.

4. Allard C. van der Wal, Anton E. Becker, Chris M. van der Loos, Pranab K. Das. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation*. 1994;89:36-44.

5. Zorina S. Galis, Galiana K. Sukhova, Roger Kranzhofer, Stephen Clark, and Peter Libby. Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. vol 92, 402-406, 1995.

6. Zorina S. Galis, Galiana K. Sukhova, Michael W. Lark and Peter Libby. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* vol 94, 2493-2503, 1994.

7. Prediman K. Shah, Erling Falk, Juan J. Badimon, Antonio Fernandez-

Ortiz,Alessandria Mailhac,Gerardo Villareal-Levy,John T.Fallon,Jan Regnstorom,Valentin Fuster.Human monocyte-derived macrophages induce collagen brdakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques.potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture.Circulation.1995;92:1565-1569.

8. Serial Analysis of Gene Expression in Human Monocytes and Macrophages Blood 1999 94: 837-844 Shin-ichi Hashimoto, Takuji Suzuki, Hong-Yan Dong, Nobuyuki Yamazaki, and Kouji Matsushima.
 9. Iyer VR. Eisen MB. Ross DT. Schuler G. Moore T. Lee JCF. Trent JM. Staudt LM. Hudson J Jr. Boguski MS. Lashkari D. Shalon D. BotsteinD. Brown PO. The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum . Science. 283(5398):83-7, 1999.

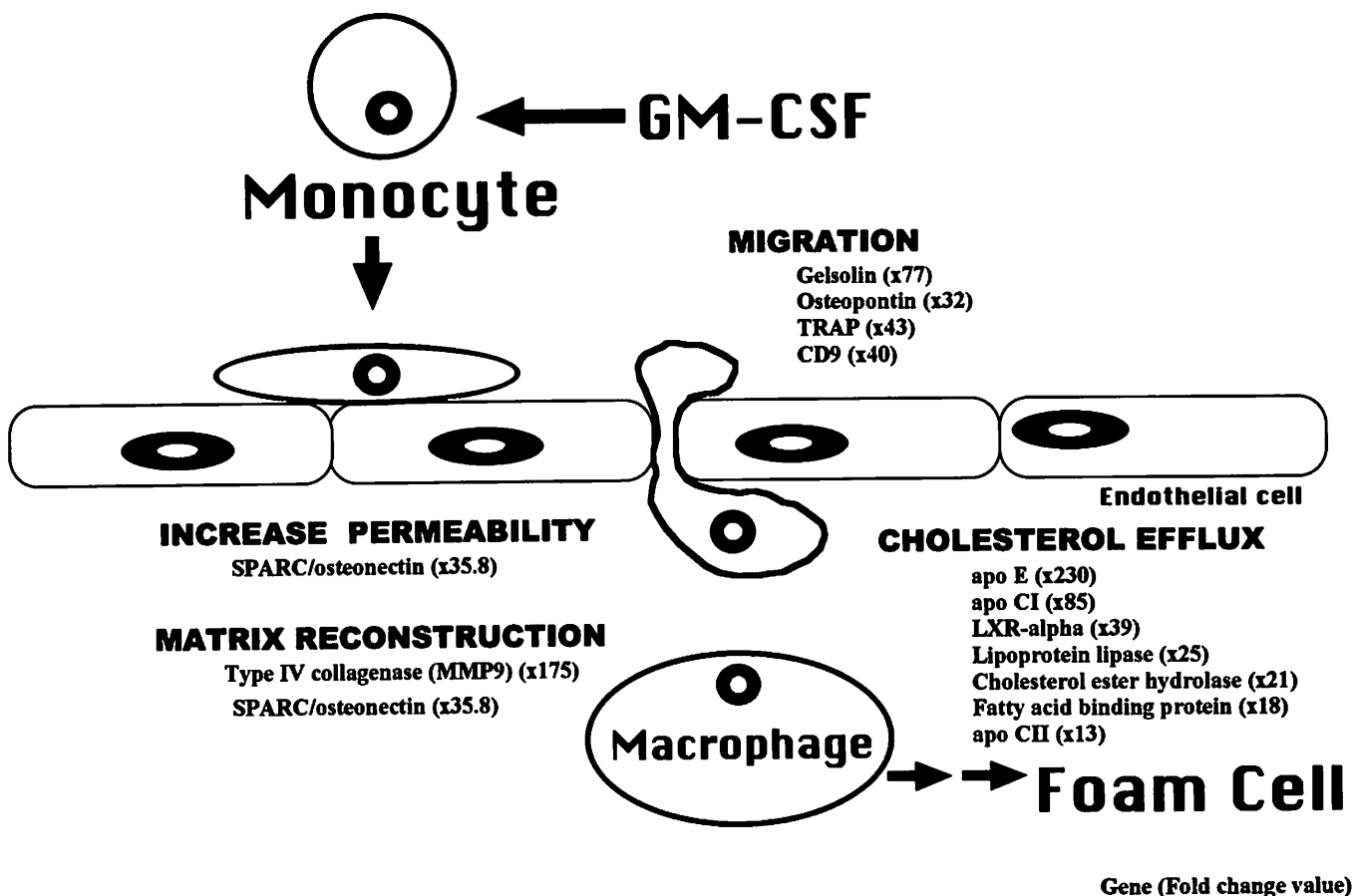


図2. Mφで誘導される主要な遺伝子群.