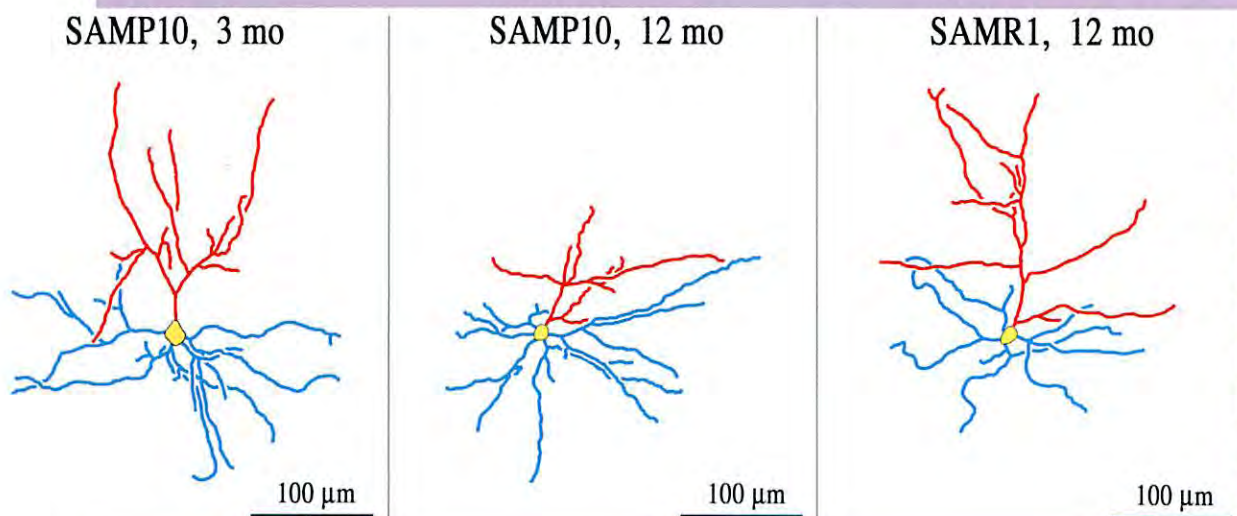


# BIOMEDICAL GERONTOLOGY

## 基礎老化研究

### 第27回日本基礎老化学会シンポジウム (プログラム・発表抄録)

- 総説**
- アルツハイマー病の治療-A $\beta$ ワクチン療法 原 英夫、田平 武
  - シナプス分子と精神・神経疾患 鈴木龍雄
- 研究報告**
- SAMマウスにおける脳の老化・変性パターンとユビキチン・プロテアソーム系の関与 島田厚良、河村則子、慶野裕美、佐藤 衛、千葉陽一、齊藤優子、細川昌則
  - 細胞老化および形質転換におけるミトコンドリアから発生する活性酸素の影響—線虫から哺乳類へ— 石井恭正、安田佳代、赤塚明、樋野興夫、Philip S. Hartman、石井直明
- トピックス**
- 老化のプロテオミクス—プロテオーム解析の切り口から見えてくるもの— 戸田年総
- 学会報告**
- 第18回国際老化学会参加記 (リオデジャネイロ、ブラジル、2005年6月26日~30日) 下川 功
  - 11th Congress of the International Association of Biomedical Gerontology (IABG) 参加記 日比陽子
- 人物紹介**
- 名誉会員、Byung-Pal Yu先生のプロフィール 下川 功
- 施設紹介**
- 信州大学・大学院・医学研究科加齢適応医科学系専攻 (独立専攻) の紹介 谷口俊一郎
- お知らせ**
- 第29回日本基礎老化学会開催のご案内



- 編集委員会委員長： 樋口京一 信州大学大学院医学研究科加齢適応医科学系 加齢生物学分野  
〒390-8621 松本市旭3-1-1
- 編集委員会幹事： 白澤卓二 東京都老人総合研究所 老化バイオマーカー研究チーム  
〒173-0015 板橋区栄町35-2
- 編集委員会委員： 磯部健一 名古屋大学医学部大学院医学系研究科分子総合医学専攻 微生物・免疫学講座  
〒466-8550 名古屋市昭和区鶴舞町65
- 三井洋司 徳島文理大学 香川薬学部  
〒769-2193 香川県さぬき市志度1314-1
- 下川 功 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 医療科学専攻 病体解析制御学  
〒305-8566 長崎市坂本1-12-4
- 戸田年総 東京都老人総合研究所 老化バイオマーカー研究チーム  
〒173-0015 板橋区栄町35-2
- 神田健郎 東京都老人総合研究所  
〒173-0015 板橋区栄町35-2
- 中島光業 東京都老人総合研究所 老化バイオマーカー研究チーム  
〒173-0015 板橋区栄町35-2
- 

## Official Journal of The Japan Society for Biomedical Gerontology

- Editor-in-Chief: Keiichi Higuchi, Department of Aging Biology, Institute on Aging and Adaptation, Shinshu University Graduate School of Medicine, 3-1-1 Asahi, Matsumoto, 390-8621, JAPAN
- Managing Editor: Takuji Shirasawa, Molecular Gerontology Research Team, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, JAPAN
- Editors: Ken-ichi Isobe, Program In Integrated Molecular Medicine, Graduate School of Medicine, The Nagoya University Faculty of Medicine, 65 Tsurumai-cho, showa-ku, Nagoya, Aichi, 466-8550, JAPAN
- Youji Mitsui, Faculty of Pharmaceutical Sciences at Kagawa Campus Tokushima Bunri University, 1314-1 Shido, Sanuki city, Kagawa 769-2193, JAPAN
- Isao Shimokawa, Department of Pathology & Gerontology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, 1-12-4 Sakamoto, Nagasaki City 305-8566, JAPAN
- Toshifusa Toda, Proteome Research Unit, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, JAPAN
- Kenro Kanda, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, JAPAN
- Mitsunari Nakajima, Biosignal Research, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, JAPAN

## この雑誌について（投稿される方へ）

「基礎老化研究」(Biomedical Gerontology)は、日本基礎老化学会の会誌で、年4回:2月、5月、8月、11月発行される。内容は、本学会員から投稿された、または、本学会員及び編集委員会より依頼を受けた者からの巻頭言、総説(老化理論を含む)、研究報告、トピックス、学会報告、随筆、書評、その他で構成される。但し、2号には年次大会のプログラムと発表抄録が、4号には基礎老化学会シンポジウムの抄録も掲載される。本誌は会員に無料で配布されるほか、希望に応じて頒価(現在は2,000円)で販売される。

1. 依頼・投稿による総説を含み全ての原稿の採用については、編集委員会で決定する。総説及び研究報告については、編集委員または編集委員会で依頼した審査委員(評議委員)による査読を行う。
2. 著者による校正は、総説、研究報告、トピックスについてのみ1回行う。その際の追加、変更は出来ない。
3. 本誌に掲載された記事の著作権は、日本基礎老化学会に帰属する。但し、自分の著作を使用する場合には、本学会に断り無く自由に使用できる。
4. 目次、総説と研究報告の要旨、およびトピックスはインターネットのホームページに掲載される。発行後2年経過した総説、研究報告は公開される。
5. 総説、研究報告、トピックスの著者には、別刷り30部を無料で進呈する。30部以上希望の場合は有料(実費)となるので、投稿・原稿提出時にその旨連絡すること。
6. 原稿の執筆に際しては、本誌の執筆要領に従うこと。

## 執筆要領

原稿は全てワードプロセッサを使用する(原稿はコンピュータファイルとハードコピーで提出する)。1)第1頁には、原稿の表題、著者名、所属機関、所在地を和文、英文で、また、電話番号、FAX番号、E-mailアドレス記載する。

著者が複数の場合は、連絡先の著者を明記する。2)第2頁にも初めに、表題、氏名を書き、その後に本文を書く。3)本文に節を設ける場合、1.)、2.)、3.)、・・・を付けて節を示す。以下の項目は1)、2)、3)・・・、a)、b)、c)・・・とする。原稿のハードコピーはA4用紙を用い、横書きにプリントする。また、イタリック体、ギリシャ文字、記号が正しく出力されていることに注意する。同時に提出するコンピュータファイルは、テキストファイルまたはMSワードファイルで(欧語・数字は半角を用いる)、フロッピーディスク、MOディスク、CDディスクに記録したものとす。図・表および写真は、PICT形式またはJPEG形式に圧縮したもの(使用ソフトを明記する)およびプリントアウトしたものを提出する。雑誌への印刷は白黒またはグレースケールで行う。カラー希望の場合は著者の負担とする。図表の挿入部位はプリントアウトしたものの欄外に示す。尚、本誌1ページは約1,600字に相当する。図の大きさを考慮して、全体の長さを調節すること。原稿(コンピュータファイル)はE-mailに添付して送付することができる。コンピュータファイルについては、印刷所あるいは編集委員会で対応できない場合は、著者に協力を求めることがある。

1. 巻頭言(展望) 刷り上がり1頁に収まるようにする。本文の長さは1,500字以内(タイトルと氏名を除く)。
2. 総説 一つのテーマについて、専門的知識に基づき、関連する多くの研究論文を総括、解説、評価した、所謂ミニレビュー。和文。
  - 1) 本文の長さ: 図、表も含めて刷り上がりで6ページ(9,600字)程度を基本とする。
  - 2) 題名: 40字以内とし、内容を的確に表したもので、且つ、読者の興味を引くよう工夫する。
  - 3) 要約およびキーワード: 要約およびキーワード(5個以内の英語)を必ず付す。要約は日本語(400字以内)、およびその英訳(200 words以内)とする。
  - 4) 用語: 本文中の用語はなるべく日本語にする。但し、欧語の方が一般的なもの、解りやすい場合は欧語でよい。外国の人名は原語、地名はカタカナで表記する。

専門術語: それぞれの専門分野の用語集に従う。動植物の学名、遺伝子名などでイタリック体で印刷されるべきものについては、原稿に下線をつけるなどして区別する。

略語: 初出箇所フルタームの後に括弧で括った略語を記入する。可能なら日本語を入れる。

文体: 「である」調とする。

数字・単位: 数字はアラビア数字とし、単位は国際単位系を用いる。
  - 5) 引用・参考文献: 引用文献は論文中に引用した順に番号をつけて表示する。本文中では該当する位置に [ ] で括って表示する。1つの事柄に複数の論文を引用する場合には [1,5,7] または [2-6] のように記述する。著者名を引用する場合で3名以上の連名の時は、それ以下を“ら”を用いて省略する。末尾文献リストは引用した順とし、記載は以下の通りとする。未発表論文、私信は末尾文献リストには加えず、本文中の該当する位置に [ ] で括って表示する。

1. Sun J and Tower J. FLP recombinase-mediated induction of Cu/Zn-superoxide dismutase transgene expression can extend the life span of adult *Drosophila melanogaster* flies. *Mol Cell Biol* 19:216-228, 1999.
2. Roth GS, Ingram DK and Cutler RG. Primate models for dietary restriction research. In: *Biological Effects of Dietary Restriction*, edited by Fishbein L. Berlin: Wiley, 1991, p. 193-204.
3. 仲村賢一, 下村・泉山七生貴, 田久保海蒼 ヒト組織の加齢に伴うテロメア短縮. *基礎老化研究* 24:72-76, 2000.

6) 図、表、写真:そのまま印刷できるものに限る(手書きのもの受け付けない)。文献から引用する場合は、引用を明記すると共に、引用の許可が必要な場合には、著者の責任で許可を取っておくこと(許可証のコピーを原稿と共に提出すること)。白黒またはグレースケールが原則。

7) 図、写真にはタイトルと説明文を付ける。

3. 研究報告 現在進行中または最近行った自身の研究の紹介。長さその他は総説に準じる。
4. トピックス 最近の話題性のある研究(または雑誌記事)の紹介。長さは刷り上がり4頁以内(1,600 - 6,400字)。その他は総説に準じる。但し、要旨は不要である。
5. 学会報告、海外便り 国内外の学術集会の紹介記事。長さは1,600字以内。留学などで滞在しているまたは過去に滞在していた研究室、訪問した研究施設の見聞の紹介記事。
6. 書評 最近出版された書籍の紹介。1,600字以内。
7. 随筆 長さは刷り上がり2頁(3,200字)以内。
8. その他
9. 原稿の送付およびその他の問い合わせは、下記宛に。(e-mailの使用が望ましい。) 編集委員会委員長: 樋口京一 (khiguchi@sch.md.shinshu-u.ac.jp) または、編集幹事: 白澤卓二 (sirasawa@tmig.or.jp)

## 目 次

第27回日本基礎老化学会シンポジウム	
プログラム	1
抄録	2-4
総説	
アルツハイマー病の治療-A $\beta$ ワクチン療法	
原 英夫、田平 武	5-9
総説	
シナプス分子と精神・神経疾患	
鈴木龍雄	11-15
研究報告	
SAMマウスにおける脳の老化・変性パターンとユビキチン・プロテアソーム系の関与	
島田厚良、河村則子、慶野裕美、佐藤 衛、千葉陽一、齊藤優子、細川昌則	17-21
研究報告	
細胞老化および形質転換におけるミトコンドリアから発生する活性酸素の影響—線虫から哺乳類へ—	
石井恭正、安田佳代、赤塚明、樋野興夫、Philip S. Hartman、石井直明	23-28
トピックス	
老化のプロテオミクス—プロテオーム解析の切り口から見えてくるもの—	
戸田年総	29-31
学会報告	
第18回国際老化学会参加記（リオデジャネイロ、ブラジル、2005年6月26日～30日）	
下川 功	33
学会報告	
11th Congress of the International Association of Biomedical Gerontology (IABG) 参加記	
日比陽子	35
人物紹介	
名誉会員、Byung-Pal Yu先生のプロフィール	
下川 功	37
施設紹介	
信州大学・大学院・医学研究科加齢適応医科学系専攻（独立専攻）の紹介	
谷口俊一郎	39-40
お知らせ	
第29回日本基礎老化学会開催のご案内	41

---

## CONTENTS

<REVIEW>	
Vaccine therapy for Alzheimer' s disease	
Hideo Hara and Takeshi Tabira	5-9
<REVIEW>	
Implications of synaptic proteins for neuronal disorders	
Tatsuo Suzuki	11-15
<PROGRESS REPORT>	
Pattern of brain aging and neurodegeneration in SAM mice and involvement of the ubiquitin-proteasome system	
Atsuyoshi Shimada, Noriko Kawamura, Hiromi Keino, Mamoru Satoh, Yoichi Chiba, Yuko Saitoh and Masanori Hosokawa	17-21
<PROGRESS REPORT>	
Influence of superoxide anion overproduced from mitochondria on cellular senescence and transformation —to mammalian cells from C. elegans—	
Takamasa Ishii, Kayo Yasuda, Akira Akatsuka, Okio Hino, Philip S. Hartman and Naoaki Ishii	23-28

表紙：ゴルジ標本描画像で見る帯状皮質錐体細胞の加齢変化。詳しい説明は17-21ページを参照。

# 第27回日本基礎老化学会シンポジウム

## 「老化ゲノムと老化バイオマーカー」

日 時：平成17年11月12日（土）午後1時-午後5時

会 場：東京都老人総合研究所・養育院記念講堂

[http://www.tmig.or.jp/J\\_TMIG/about/map.html](http://www.tmig.or.jp/J_TMIG/about/map.html)

### プログラム

#### 第1部 老化ゲノムの展望（座長：白澤卓二）

13:00-13:30

1. 老年病SNPデータベース：病理解剖とゲノムをつなげる

東京都老人医療センター 剖検病理 沢辺元司

13:30-14:00

2. 老人性疾患と遺伝子多型

東京医科歯科大学 難治疾患研究所 分子疫学 村松正明

14:00-14:30

3. ミトコンドリアと老化ゲノム

東京都老人総合研究所 健康長寿ゲノム探索 田中雅嗣

14:30-14:50

休憩

#### 第2部 老化バイオマーカーの展望（座長：丸山直記）

14:50-15:20

4. 臓器酸化ストレスと老化バイオマーカー

東京都老人総合研究所 老化ゲノムバイオマーカー 白澤卓二

15:20-15:50

5. 加齢黄斑変性症とフリーラディカル

慶應義塾大学医学部 眼科学 坪田一男

15:50-16:20

6. プロテオミクスの展開

東京農工大学農学部 分子生命化学 高橋信弘

16:20-17:00

7. 総合討論（演者全員）

18時～

懇親会



## 発表抄録

### 老年病SNPデータベース：病理解剖とゲノムをつなげる

沢辺元司

東京都老人医療センター 剖検病理

老年病では複数の遺伝的素因と生活習慣の相互作用により発症するものが多い。このため遺伝子多型と疾患の関係を明らかにすることが老年病の効果的な予防法・治療方法の確立に有用である。そこで我々は東京都老人医療センター病理解剖例を対象として老年病と遺伝子多型の関連を明らかにすることを目的として「老年病 SNP データベース (JG-SNP)」を作成した<sup>1</sup>。このデータベースはインターネット上で一般の方、研究者を対象に公開されており、老年医学において遺伝子多型研究を紹介する場としている<sup>2</sup>。

データベースの対象はセンターの病理解剖データベース "ANATOMY" に既に登録されている 1,650 剖検症例を対象とした。男女比は 1:1.2 で平均年齢は 80 歳であった。これらの症例について認知症 (痴呆)、動脈硬化、骨粗鬆症、悪性腫瘍などの疾患関連遺伝子の遺伝子多型について順次解析を進めデータベースに登録している。

JG-SNP は以下の項目よりなる：臨床診断 (痴呆、虚血性心疾患など老年病 26 疾患)、臨床検査結果、嗜好、臨床的痴呆評価、血圧、病理所見 (812 項目)、臓器重量、肺気腫度、動脈硬化度、および 20 以上の疾患関連遺伝子多型データである。また患者情報の漏洩防止には最大限の配慮を行っており、個々の遺伝子研究及びデータベースのインターネット公開については倫理委員会の承認を得ている。

遺伝子多型データベースは dbSNP、JSNP をはじめとして複数のデータベースがインターネット公開されているが、疾患との関係で公開されているものはなく、また病理解剖例という極めて多彩な臨床情報を包含したデータベースはこれまでに報告がない。現在、このデータベースを活用し、動脈硬化症をはじめとして老年病の解明につとめている。

参考文献：

1. Sawabe M, et al. Developments of geriatric autopsy database and Internet-based database of Japanese single nucleotide polymorphisms for geriatric research (JG-SNP). *Mech Ageing Dev.* 2004;125(8):547-52.
2. JG-SNPのURL: <http://www.tmgm.metro.tokyo.jp/jg-snp/japanese/top.html>



### 老人性疾患と遺伝子多型

村松正明

東京医科歯科大学 難治疾患研究所 分子疫学

高齢化社会の本格的な到来を迎えて、老人性疾患への医療、保健対策が重要な課題となって来ている。多くの老人性疾患や一般の老化現象も遺伝子と環境因子の両者によって規定されていると考えられるが、エビデンスに基づく効果的な予防法はまだ見出されていない。有効な老化のバイオマーカーとなる遺伝子あるいはタンパク質が見出されれば、臨床へのフィードバックが可能になることが期待される。

老化は血管から起こると言われているように、動脈硬化は老化に必発の現象であり、多くの老人性疾患の原因ともなっている。私達は、老人性変化の典型である動脈硬化を研究対象とし、動脈硬化の程度に影響を与える遺伝子を臨床データの関連の中で明らかにしていくゲノム研究を東京都老人医療センターおよび東京都老人総合研究所との共同で行っている。

これまでに千例以上の患者剖検例において遺伝子多型を解析し、炎症性サイトカイン等の遺伝子多型が動脈硬化レベルに与える影響を解析した。興味深い事に、動脈の種類によって遺伝子の影響が異なる事を示唆するデータを得ている。また解析中に一般集団に 0.3% の割合で見られる、新たな TNF $\alpha$  遺伝子の変異を見出した。この変異の頻度は 1% 未満なので、定義上、いわゆる polymorphism (多型) ではなく、最近 paucipolymorphism と呼ばれる範疇に入る変異である。この変異を持つ患者の病理・臨床診断には脳・心血管疾患が高頻度に認められ、動脈硬化の危険因子の一つであると考えられた。これまで老人性疾患を含む日常的な疾患 (コモンディジーズ) の発症原因として唱えられている common disease common variant 説の例外、common disease rare variant にむしろ合致するものであると考えられた。これらの点も合わせて議論していきたい。

## ミトコンドリアと老化ゲノム

田中雅嗣

東京都老人総合研究所

健康長寿ゲノム探索研究チーム

ミトコンドリアは、細胞内のエネルギー産生の場合であると同時に、糖質・アミノ酸・脂質代謝の要としての役割を果たしている。ミトコンドリアは、ことに呼吸鎖における電子伝達が阻害された場合に、活性酸素種の主要な発生源となるので、加齢においてミトコンドリアゲノム自身が酸化損傷の標的となる。ミトコンドリアは、骨格筋や脂肪組織などの末梢組織におけるエネルギー代謝ばかりでなく、膵島β細胞におけるインスリンの分泌にも深く関わっている。これまでに分子レベルで明らかにされてきた糖尿病の病因のうちで最も頻度の高いのが、ミトコンドリア DNA (mtDNA) 変異である。

最近注目されているメタボリックシンドローム (metabolic syndrome = 代謝症候群) は、肥満・高血圧・高中性脂肪血症・高血糖・高コレステロール血症などの危険因子が重なった状態である。メタボリックシンドロームの人は、糖尿病を発症するリスクは通常の7~9倍、心筋梗塞や脳卒中を発症するリスクは約3倍にもなるといわれている。Yale大学のLiftonらのグループは低マグネシウム血症を伴うメタボリック症候群の大家系を分析し、ミトコンドリアの4291T>C変異を見いだした(Wilson et al. Science 306: 1190-1194, 2004)。このホモプラズミック変異によってtRNA-Ileのアンチコドンの5'側の近傍にU→Cの塩基置換が生じ、ミトコンドリアでの蛋白合成が低下していると推定される。ミトコンドリアゲノム変異が高齢者に見られる一連の代謝的異常(肥満・高血圧・高コレステロール血症)の原因となっていることが示されたことは注目すべき事実である。

一方、Wislofらは11世代にわたる交配と選択によって、運動能力が高いラットと運動能力が低いラットを作成した。運動能力が低い系統のラットは、心筋梗塞の危険因子であるメタボリック症候群を呈した(Wislof et al. Science 307: 418-420, 2005)。すなわち、16-24週齢において高血圧、内皮細胞の機能異常、耐糖能異常、高インスリン血症、インスリン抵抗性、内臓脂肪の増加、血中の中性脂肪ならびに遊離脂肪酸の上昇を示した。運動能力が低い系統のラットは、5週齢でもすでに血糖・血中中性脂肪が高値を示していたので、高インスリン血症が肥満に先行すると考えられた。運動能力が低いラットの骨格筋におけるPPAR $\gamma$ 、PGC-1 $\alpha$ 、ミトコンドリア酵素蛋白質の量は、運動能力が高いラットの筋と比較して顕著に低値であった。ミトコンドリアの酸化的リン酸化系の制御の異常が病態の中心にあり、その結果、全身の好氣的代謝能力の低下のみならず、心血管系や代謝性の異常がもたらされたと考えられる。

我々は、ミトコンドリアゲノムの塩基配列の多様性が肥満や糖尿病の発症に影響を与えていると考え、この仮説を検証するために、百寿者、パーキンソン病患者、アルツハイマー病患者、血管病変の高度な糖尿病患者、一般の糖尿病患者、若年肥満者、若年非肥満者、計672例のmtDNAの全塩基配列を決定した(Tanaka et al. Genome Res 14: 1832, 2004)。日本人ミトコンドリアゲノム多型に関するデータベースを構築した(<http://www.giib.or.jp/mtsnpl/>)。さらに海外の1267個体のヒトミトコンドリアDNA(mtDNA)全塩基配列データを取り込み、合計1939人の多型データを検索可能にした。このデータベースに基づいてミトコンドリアゲノム多型の網羅的解析システムを構築した。

本講演では、これまでに明らかになったミトコンドリアゲノム多型と疾患との関連について紹介すると共に、長寿あるいは肥満・糖尿病に関連する多型を探索するための大規模関連解析について解説する。

## 臓器酸化ストレスと老化バイオマーカー

白澤卓二

東京都老人総合研究所

老化ゲノムバイオマーカー研究チーム

### 要旨

細胞内で発生する活性酸素のうち、構成的に発生する活性酸素はミトコンドリアで発生する活性酸素種、スーパーオキシド( $O_2^-$ )である。 $O_2^-$ はミトコンドリア内膜で発生するが、酸化的リン酸化に伴い消費された酸素の約数%発生すると報告されている。発生した $O_2^-$ は、速やかに解毒酵素であるスーパーオキシドディスムターゼ(MnSOD)によって、過酸化水素( $H_2O_2$ )に変換される。 $H_2O_2$ はさらに、ミトコンドリアではグルタチオンペルオキシダーゼ、細胞質ではカタラーゼにより水と酸素に分解され無毒化される。

一方、SODには細胞内局在と金属配位性により3種類のSODが存在する。細胞質に局在するCu/ZnSOD、ミトコン



ドリアに局在する MnSOD、細胞外に局在する EcSOD である。これらの SOD の最も重要な役割はそれぞれの細胞内コンパートメントで発生した  $O_2^-$  を  $H_2O_2$  に変換することである。SOD の生物学的な役割はそれぞれの酵素の欠損マウスの症状から推察することが可能である。Cu/ZnSOD 欠損マウスと EcSOD 欠損マウスは老化の表現形質に乏しく、ほとんど正常の発生、成長、老化を示す。このことから、細胞質や細胞外で発生する活性酸素種は寿命や老化にあまり影響を与えない可能性を示唆している。一方、MnSOD 欠損マウスは発生直後から、代謝性アシドーシス、拡張性心筋症、進行性神経変性症などの多彩な表現形質を示し、数週で死亡する。このことから、ミトコンドリアで発生するスーパーオキシドラジカルの消去が、生存に必須であることが解った。しかし、このモデルでは、ネズミが早期に死亡してしまうためにミトコンドリアの活性酸素が寿命や老化のプロセスに重要な役割を果たしていることを実証できなかった。

そこで、我々は Cre-loxp システムを用いて、組織特異的な MnSOD 欠損マウスの作製に取り組んでいる。これまでに、心臓特異的 MnSOD 欠損マウス、肝臓特異的 MnSOD 欠損マウス、膵臓  $\beta$  細胞特異的 MnSOD 欠損マウス、脳特異的 MnSOD 欠損マウスなど、26 種類の組織特異的欠損マウスの作製に成功している。本シンポジウムでは、肝臓特異的 MnSOD 欠損マウスが予想に反して肝機能低下の表現形質が認められなかったこと、心臓特異的 MnSOD 欠損マウスで拡張性心筋症を発症したことを報告する。また、予備的な結果では、脳特異的 MnSOD 欠損マウスは進行性の神経変性症で死亡すること、膵臓  $\beta$  細胞特異的 MnSOD 欠損マウスでは耐糖能に異常を認めたことを併せて紹介する。

## 加齢黄斑変性の原因と新しい治療

坪田一男

慶應義塾大学医学部眼科

加齢黄斑変性（以下、ARMD）は、高齢者の失明原因の主因であり、（米国では首位）進行した場合、最終的に網脈絡膜萎縮となり現時点で有効な治療がない。典型的な臨床像は、黄斑部にドルーゼンと呼ばれる酸化タンパクを大量にふくむ沈着物が発生し、その後脈絡膜新生血管が発生する。本疾患の成因についてはこれまで原因不明とされていたが、いくつかの疫学調査、臨床試験、病理検査から本疾患の成立に酸化ストレスが関与していることが明らかになってきている。したがって酸化ストレスを除去する目的の治療法が現在開発されている。米国の多施設、前向き、プラセボをとった無作為臨床試験によりビタミン剤と銅、亜鉛の内服で ARMD の進行が抑えられることが示された。現在眼科用のサプリメントが世界で 20 種以上、販売されている。またわれわれはレシチン化 SOD の製剤化に成功した LTT バイオファーマ社と共同で、本疾患に対しての臨床試験を開始を予定している。本講演では、加齢黄斑変性への酸化ストレスの関与を裏付けるエビデンスと、これを制御しようとするあたらしい治療法を解説する。

## プロテオミクスの展開

高橋信弘

東京農工大農学部

ゲノム解析による蛋白質・遺伝子配列のデータベースの整備にも負うが、プロテオミクスは、蛋白質の種類と量を高感度・迅速かつ網羅的に同定するための蛋白質分離と質量分析技術の進歩に依存した技術志向型の研究分野である。1995 年に細胞・組織・個体が発現する蛋白質全体をプロテオームと定義したことから始まったこの分野は、ほぼ 10 年の歴史を刻み、少なくとも 6 つの国際学会から専門誌が発行されるまでに成長してきた。中でも米国生化学会が発行する Molecular Cellular Proteomics は創刊 2 年目にして Impact factor が 9.6 に至るなど、どの専門誌も軒並み高レベルとなり、プロテオミクス分野がゲノム科学の主要分野の一つとしてその地位を確立したように見える。本シンポジウムの主題の一つである老化マーカーの特定という観点から見た場合、プロテオミクス解析技術はプロテオームを構成する蛋白質の種類と量の変化を大規模にプロファイルすることから、まさにそのような目的のための最適な解析技術の一つであると言える。本シンポジウムでは、まず、プロテオームの変動を大規模に解析する最近の手法の代表的な幾つかを紹介する。ただ、現段階では、最も進歩した手法でも単独の手法でプロテオームを構成する蛋白質の全てを検出し網羅することはできない。そこで、生理的变化や病態の変化に伴って変動する蛋白質をより限定的かつ高感度に検出するために、特定の性質や機能に絞った蛋白質群として解析する手法についても紹介する。そして、最後に、老化マーカーとは直接結びつかないが、それぞれの具体的例として、アトピー性皮膚炎モデルマウスにおいて皮膚炎発症に伴い変動する蛋白質のプロファイル解析から自己抗原を見いだした例と、プロテオミクスによる細胞機能解析から癌化に関与している蛋白質を予測し、その mRNA が DNA チップ解析により多くの癌組織・癌化細胞で顕著に上昇していることを見いだした例についても触れたい。

【総 説】

アルツハイマー病の治療-A $\beta$ ワクチン療法

原 英夫<sup>1)</sup>、田平 武<sup>2)</sup>

国立長寿医療センター研究所

1) 血管性痴呆研究部室長 2) 所長

要約

アルツハイマー病の発症機序として、アミロイドカスケード仮説に加え新たにシナプスA $\beta$ 仮説が提唱されている。アルツハイマー病に対するワクチン療法は、能動免疫、受動免疫および粘膜免疫を用いたワクチンの3種類が報告されており、それぞれの方法と作用機序について解説した。さらに最近のトピックスを紹介し、今後のワクチン療法の展望を概説した。

Key words: アミロイドベータ、抗体、ワクチン、ミクログリア。

はじめに

アルツハイマー病の病理学的所見として、神経細胞の萎縮・脱落、アミロイド $\beta$  (amyloid- $\beta$ , A $\beta$ ) 蛋白の凝集・沈着による老人斑の形成、異常タウ蛋白からなる神経原繊維変化 (neurofibrillary tangles: NFT) の3つが大きな特徴である。アミロイドベータ蛋白は、21番染色体上にあるアミロイド前駆蛋白 (APP) から、 $\beta$  および  $\gamma$  セクレターゼにより切断されてできた 40~42(43) 個のアミノ酸からなる蛋白である。老人斑は、細胞外に蓄積された集合体で、アミロイドベータ蛋白 (A $\beta$  40,42) を核に周囲を取り囲むようにミクログリア、繊維型アストログリア、異栄養神経突起で構成されている。アルツハイマー病の病態仮説として、現在ではアミロイドカスケード仮説が有力である。すなわち細胞外に分泌された A $\beta$  ペプチドが不溶化し凝集・蓄積することがアルツハイマー病の病態の本質であるという仮説である<sup>1)</sup>。Selkoe 等のグループの Walsh は、A $\beta$  oligomer が海馬の LTP を抑制しているという報告をしており<sup>2)</sup>、さらに最近では、シナプス A $\beta$  仮説が新しく提唱された<sup>3)</sup>。シナプス (前) で APP から A $\beta$  42 が産生され、シナプス後膜の  $\alpha$ -7nicotinic receptor に結合し、calcineurin や STEP46 などの蛋白を介して NMDA receptor の endocytosis を促進し、シナプスでの NMDA receptor 数が減少するため、グルタミン酸を介する神経伝達が障害されるという説も報告されている<sup>4)</sup>。

1 アルツハイマー病に対する A $\beta$  ワクチン療法

本来ワクチンの意義は、生体にとって外来異物であるウイルスや細菌等に対し、有毒株の死菌又は弱毒株を接種し、抗体産生を誘導し免疫学的予防を意味するが、アルツハイマー病の A $\beta$  ワクチン療法は、アミロイドカスケード仮説を基盤とし、脳のアミロイド $\beta$  蛋白を免疫学

的手法 (主として抗体) により除去しようとする治療法であり、新しい治療ストラテジーの1つとしてアルツハイマー病のみならず他の神経変性疾患へも応用されようとしており注目されている。

アルツハイマー病の免疫療法 (A $\beta$  ワクチン療法) には、A $\beta$  ペプチドをアジュバントと共に免疫する能動免疫 (active immunization) と A $\beta$  に対する抗体を直接投与する受動免疫 (passive immunization)、および粘膜免疫の特性を用いた免疫療法の3つに大きく分けられる。その他の治療法のまとめを Table 1 に示す。

Table 1 アルツハイマー病の治療法

- I. アミロイドカスケード仮説に基づく A $\beta$  産生・凝集抑制、A $\beta$  の除去。
  - 1) APP から A $\beta$  の産生阻害
    - a. セクレターゼ阻害剤
    - b. 非ステロイド性消炎鎮痛剤
    - c. スタチン, ACAT inhibitor
  - 2) A $\beta$  モノマーの分解; A $\beta$  分解酵素 (インスリン分解酵素, ネプリライシン)
  - 3) A $\beta$  ワクチン療法 (Immunotherapeutic approach)
    - a. 合成 A $\beta$  ペプチドをアジュバントと共に筋肉注射 (active immunization)。
    - b. 抗 A $\beta$  抗体の投与。(passive immunization)
    - c. 粘膜免疫を用いた治療法。  
経口ワクチン: AAV  
経鼻ワクチン: センダイウイルスベクター
  - 4) 抗 chaperone 療法; apoE と A $\beta$  fibrils の結合阻害し A $\beta$  fibrils の形成抑制
  - 5) ミクログリア活性化による A $\beta$  の貪食・除去の可能性
- II. 神経伝達物質の改善  
AChE 阻害剤, NMDA 受容体拮抗剤
- III. 生活習慣の改善;  
ビタミン, 魚油, カテキン, 糖尿病, カロリー制限, 環境改善。

連絡先: 〒474-8511 愛知県大府市森岡町源吾36-3

Tel: 0562-46-2311 Fax: 0562-46-8438

E-mail: hhara@nils.go.jp

## 2 ワクチンの作用機序

ワクチンによるβアミロイド除去の機序として、現在3つの説がある<sup>9)</sup>。第一の説は、Aβペプチドを投与しAβに対する抗体を体内で産生させ、老人斑の中の凝集したAβに抗体が結合し、Fcレセプターを介してミクログリアが貪食することにより、老人斑が除去され、分泌されたAβにも抗体が結合してミクログリアが貪食し、Aβの神経細胞への毒性を抑え、痴呆の改善などの治療に結びつくと考えられている。第二の説は、Aβペプチドを投与しAβに対して産生された抗体は、AβのN末のアミノ酸を主として認識・結合し、凝集・不溶化したAβを可溶化し、アミロイド沈着を減少させるという説である。第三の説は、Aβに対する抗体は、血液脳関門を越えず、末梢血・末梢組織においてAβを減少させることにより、脳組織から髄液を経由してAβを末梢血中に引き出すというPeripheral sink仮説である<sup>9)</sup>。

## 3 T細胞とワクチン

B細胞での抗体の産生・誘導にはTh2型CD4<sup>+</sup>T細胞の働きが必要である。T細胞レセプターが認識する部位(T cell epitope)は、Aβペプチドの後半部位が主である。後述の欧米でのAN1792臨床試験で問題となった髄膜脳炎を惹起するT細胞は、Th1型CD4<sup>+</sup>T細胞が主因である。Monsonogo等は<sup>7)</sup>、一部の健康高齢者やアルツハイマー病患者血中においてAβタンパクに反応するT細胞が増加していることを報告している。Aβ反応性T細胞は、主としてAβペプチドの16～33番アミノ酸を認識しており(HLA-DR拘束性において)、特に22、23番アミノ酸のAla置換によりT細胞の増殖が著明に減少するので、この部位がT細胞の反応に重要であると考えられている。さらにAβペプチドの28～42番アミノ酸に反応するT細胞もあり、このT細胞は、Aβ1-40ペプチドに反応しないことから、AβペプチドのC末の41～42アミノ酸がT細胞の認識に重要である。これらAβ反応性T細胞が分泌するサイトカインは、IL-5、IL-13(33%)、IFN-γ(4.5%)、IL-10(3%)、IL-12(0.77%)と、

Th0、Th1、Th2サイトカインが混在していた。

## 4 ワクチンの種類

### 1) 能動免疫(active immunization)

アルツハイマー病に対するワクチン療法は、Elan社のSchenkら<sup>9)</sup>が、前凝集Aβ42ペプチドをアジュバントと共にPDAPP-トランスジェニックマウス(PDGFプロモーター+変異型APP遺伝子)に筋肉投与し、脳アミロイド沈着が減少したという報告が最初である。

Elan社およびWyeth社によるアルツハイマー病患者への臨床試験(AN-1792)が開始された。AN1792は、合成Aβ42ペプチドをアジュバント(QS21)とともに筋肉注射するもので、投与された患者の血清中にAβに対する抗体も確認された<sup>9)</sup>。この抗体は、主としてAβペプチドのN末の3番～10番アミノ酸を認識し結合している(B cell epitope)。一方この血清抗体は、ニューロンやグリア細胞を染色せず、アミロイド前駆タンパク(APP)や細胞内Aβとは反応しなかった。詳細は、前回の総説(基礎老化研究27:23, 2003)を参照されたい。

2001年に始まったAN1792 phase II trialで、6%(300名中18名)の患者に髄膜脳炎の副作用が起こり<sup>9)</sup>、2名の死亡例も報告され<sup>10)</sup>、試験は2002年1月に中止された。脳炎の所見としては、髄膜、髄膜血管周囲および大脳皮質へのT細胞の浸潤が認められた。患者血清中の抗Aβ抗体は、ニューロンやグリア細胞とは反応しなかったことより、抗体による脳の炎症が起きたとは考えにくい。Elan社によるAN1792ワクチンも後述する鼻粘膜に投与するワクチンもアジュバントを必要とする。アジュバントは、強い免疫活性化作用があり、Tリンパ球などの組織障害性細胞性免疫も惹起する。このため、一部の患者ではAβまたはAPPに反応するTh1型CD4<sup>+</sup>T細胞が脳に浸潤し、多発性硬化症の様なアレルギー性実験的脳脊髄炎様の髄膜脳炎を引き起こしたのではないかと推察される。

Phase I臨床試験では髄膜脳炎の副作用は1名のみであり、Elanグループの説明では、AβペプチドとQS-21

Table 2 能動・受動免疫に用いられる抗体の特性

	Aβ認識部位	老人斑除去	可溶性	Aβの除去	ccognitive functionの改善	FcR依存性	Peripheral sink
Active immunization	Aβ N-term	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(++)
Passive immunization							
抗体(1)	Aβ N-term	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(++)
抗体(2)	Aβ mid domain	(±)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(++)
Aβ oligomer Ab	Aβ dimer ~ oligomer	(±)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(++)
F(ab') <sub>2</sub> , ScFV	Aβ N-term or mid domain	(±)	(+++)	(+++)	(+++)	(-)	(++++)

の複合物の沈殿を防ぐため Polysorbate-80 を使用しており、これが A $\beta$  ペプチドの免疫原性を高め組織障害性 T 細胞の反応を引き起こしたのではないかと考察している。

Orgogozo らの AN1792(QS-21)-201 Study Team は最終報告を行い、AN1792 ワクチン投与 300 名中 59 名に抗体陽性であり、抗体陽性群では各種高次脳機能試験のうち neuropsychological test battery (NTB) でのみ改善の有意差があったとしている<sup>10)</sup>。

AN1792 ワクチンにより、血清中に抗 A $\beta$  抗体ができ、大脳皮質の老人斑は消失し、neuropsychological test battery の改善もあり、ワクチンの効果は認められた。しかし神経原繊維変化やアミロイドアンギオパチーが残存したことは、このワクチン療法の今後の課題となる。

### 2) 受動免疫 (passive transfer)

Bard らは<sup>10)</sup>、A $\beta$  に対するモノクローナル抗体 (10D5, 3D6) を PDAPP マウスの腹腔に週 2 回、6 ヶ月間投与した (Passive transfer)。脳アミロイド斑は 80% 以上減少したと報告している。また彼らは PDAPP マウス脳の未固定凍結切片上にミクログリア細胞と抗 A $\beta$  モノクローナル抗体を同時に加えたところ (ex vivo assay)、アミロイド斑が消失した。その機序としてミクログリア細胞の Fc-receptor mediated phagocytosis によるアミロイド除去が考えられた。

その後、多くの研究所・大学から A $\beta$  に対するモノクローナル抗体を直接投与する passive transfer の有効性が報告されており、欧米では治験が行われている。passive transfer に用いられるモノクローナル抗体の A $\beta$  認識部位は、じつに様々である (Table2)。第一に老人斑では凝集 A $\beta$  の N 末が飛び出しており、N 末の 3 番 10 番アミノ酸を認識し結合する抗体は老人斑を除去する効果が大きい。第二に A $\beta$  の中間部位を認識する抗体は、老人斑には結合できないが、可溶性 A $\beta$  の凝集・沈着を抑制する効果がある。F(ab)<sub>2</sub> や single chain variable region fragment (scFv) は Fc portion を持たないため、ミクログリアの貪食を介さずに peripheral sink により A $\beta$  を除去していると考えられる。上記のいずれの抗体も可溶性 A $\beta$  の除去には有効である。さらにシナプス仮説に基づいた A $\beta$  oligomer に対する抗体を開発し、海馬シナプスでの Long-term potentiation (LTP) を改善する試みも行われている。

抗体の passive transfer の問題点として、投与したモノクローナル抗 A $\beta$  抗体に対する抗体 (抗イデオタイプ抗体) が、体内で容易に産生されやすいことである。そのため複数回の投与が困難となる可能性がある。ヒト型化抗体も開発されているが、関節リウマチ疾患においては、頻回の投与によりヒト型化抗体に対する抗体産生も報告され問題となっている。

### 3) 粘膜免疫を用いたワクチン療法の開発

Weiner ら<sup>10)</sup>は、A $\beta$  ペプチドをアジュバントとともにスプレーにてマウスの鼻粘膜に投与し、抗体産生が誘導され、PDAPP mice の脳内の老人斑が減少した事を報告している。この方法で投与されたマウスの脳には、単核

球 (リンパ球) が浸潤しており、IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  を分泌していた。

我々は、副作用の少ないワクチン療法として、アデノ随伴ウイルスベクターを用いたアルツハイマー病に対する経口内服治療法の開発を行った<sup>10)</sup>。腸管粘膜免疫系は、Th2 type T 細胞が誘導されやすい点に着目した。アデノ随伴ウイルスベクターに A $\beta$  cDNA を組み込み、このリコンビナントアデノ随伴ウイルスを経口投与し、腸管上皮細胞に感染させる。そして A $\beta$  抗原を腸管細胞に発現させ、腸管粘膜免疫系に抗原提示し、A $\beta$  に対する抗体産生を誘導するのが目的である。アルツハイマー病の動物モデルである APP-トランスジェニックマウス (Tg2576) にウイルス粒子を 1 回のみ経口投与した。12 ~ 13 ヶ月齢の APP-トランスジェニックマウス脳組織を免疫染色で詳細に検索した結果、治療したマウス脳において明らかにアミロイド沈着・老人斑形成がコントロールに比べ減少していた。脳および腎臓を含め、諸臓器に T 細胞の浸潤や炎症所見は認められなかった。

さらに我々は、センダイウイルスベクターを用いた経鼻ワクチンを開発し、24 ~ 25 ヶ月齢というかなり高齢の APP-トランスジェニックマウス (Tg2576) に投与したところ、著明な効果が得られた。

### 5 最近のトピックス

Weiner らは<sup>10)</sup>、ミクログリアを活性化することにより脳 A $\beta$  量を減少できたと報告している。彼らは、AN1792 の副作用の髄膜脳炎が多発性硬化症の疾患モデルである実験的アレルギー性脳脊髄炎 (experimental allergic encephalomyelitis; EAE) に類似している事に着目し、APP トランスジェニックマウスは EAE を発症しやすいかどうか検索した。APP トランスジェニックマウスに MOG ペプチドと complete Freund's adjuvant (CFA) で免疫したところ EAE を発症した。さらに A $\beta$  蓄積まで減少している事に気づいた。そこで B 細胞欠損マウスに APP トランスジェニックマウスを掛け合わせたマウスに同様に EAE を誘導したところ、やはり脳 A $\beta$  蓄積が減少していた。同部位ではミクログリアの活性化と増殖が認められた事より、脳 A $\beta$  の減少は抗体や T 細胞によるものでなく、活性化ミクログリアが A $\beta$  を貪食した結果と考えられた。この結果は、Akiyama 等<sup>16)</sup> が 79 歳の男性の脳虚血を起こした皮質領域で A $\beta$  蓄積が局所的に減少しており、そこでは非特異的に活性化したミクログリアが貪食していると報告した所見と類似している。そこで Weiner らは、EAE を起こさずに脳 A $\beta$  量を減少させる方法を考案し、多発性硬化症の治療に既に用いられている Copolymer I (glatiramer acetate) と proteosome-based adjuvant, IVX-908 を経鼻投与したところ、脳の炎症を起こさずミクログリアを活性化し、脳 A $\beta$  量を減少することができた。脳組織には軽度であるが T 細胞の浸潤は認められている。アジュバントの IVX-908 単独経鼻投与でもある程度効果が認められ、これは IVX-908 の LPS 作用によると考察している。

この様に抗体を用いずに、ミクログリアを単独に活性

化させることにより、脳A $\beta$ 量を減少させようとする試みであり、今後の動向が注目される。問題点は、軽度ながらもT細胞の脳浸潤とインターフェロンの産生が認められる事と、非特異的なミクログリアの活性化と増殖および放出される炎症性サイトカインが長期的にニューロン・グリアにどのような影響を与えるかが今後の課題となるだろう。

パーキンソン病やLewy小体型痴呆などの変性疾患では、神経細胞内のLewy小体の出現を特徴とする。Lewy小体は、家族性パーキンソン病の原因遺伝子として発見された $\alpha$ -シヌクレイン( $\alpha$ -synuclein)蛋白がリン酸化、ユビキチン化され、細胞内に沈着し蓄積した神経細胞内封入体である。

Lewy小体型痴呆のモデルマウスとして、PDGFプロモーター下にヒト $\alpha$ -シヌクレインを発現するトランスジェニックマウス(h $\alpha$ -Syn Tg mice)が作製された。このマウスの神経細胞内には $\alpha$ -シヌクレインが蓄積し、細胞内封入体が形成され神経細胞の変性が起こる。

Elan社のSchenk等は<sup>17)</sup>、リコンビナント $\alpha$ -シヌクレインをアジュバントCFAと伴にh $\alpha$ -Syn Tgマウスに免疫したところ、 $\alpha$ -シヌクレインに対する抗体が誘導され、神経細胞体やシナプスに異常凝集した $\alpha$ -シヌクレインが減少したと報告している。一般には抗体は細胞内に入る事ができず、細胞内のウイルスや異常蛋白の除去には効果がないと考えられていたため、このデータは驚きを持って迎えられた。Schenk等は、抗体が細胞内の $\alpha$ -シヌクレインを除去する機序として、第一に神経細胞膜上の $\alpha$ -シヌクレインに抗体が結合し、その複合体がendocytosisによって細胞内に取り込まれLysosome系で分解されるという仮説と、第二に神経細胞膜上のThy1.1レセプターやLRPを介して抗体が取り込まれ、細胞内の $\alpha$ -シヌクレインと結合した後、Lysosome系で分解されるという仮説を提唱している。いずれにせよ各施設において追試の実験が行われており、その報告が待たれる。もし抗体が細胞内の異常蓄積蛋白に対しても除去する事が可能であれば、アルツハイマー病の神経原線維変化(異常タウ蛋白)に対しても抗体投与が有効な治療法となる。さらにポリグルタミン病などその他の広範囲な変性疾患においても免疫療法という治療法が適応される可能性が開けてくる。

#### まとめ

ワクチン療法が、アルツハイマー病のみならずパーキンソン病にも応用される可能性が広がり、今後は副作用の少ないより安全なワクチンの開発が期待される。

#### 引用文献

1. Hardy, J. and Selkoe, D.J.: The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297: 353-356, 2002.
2. Walsh, DM., Klyubin, I., Fadeeva, JV., et al.: Naturally secreted oligomers of amyloid  $\beta$ ? protein potently inhibited hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*. 416:535-539, 2002.
3. Tanzi, RE.: The synaptic A $\beta$  hypothesis of Alzheimer disease. *Nat. Neurosci.* 8:977-979, 2005.
4. Snyder, EM., Nong Yi., Almeida, CG., et al.: Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid- $\beta$ . *Nat. Neurosci.* 8:1051-1058, 2005.
5. Hock, C., Konietzko, U., Papassotiropoulos, A. et al.: Generation of antibodies specific for  $\beta$ -amyloid by vaccination of patients with Alzheimer disease. *Nat. Med.* 8: 1270-1275, 2002.
6. DeMattos, RB., Bales, KR., Cummins, DJ., et al.: Peripheral anti-A $\beta$  antibody alters CNS and plasma A $\beta$  clearance and decreases brain A $\beta$  burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 8850-8855, 2001.
7. Monsonego, A., Zota, V., Karni, A. et al.: Increased T cell reactivity to amyloid  $\beta$  protein in older humans and patients with Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.* 112:415-422, 2003.
8. Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., et al.: Immunization with amyloid- $\beta$  attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400:173-177, 1999.
9. Orgogozo, J.-M., Gilman, S., Dartigues, J.-F., et al.: Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after A $\beta$ 42 immunization. *Neurology* 61: 46-54, 2003.
10. Nicoll, JAR., Wilkinson, D., Holmes, C., et al.: Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid- $\beta$  peptide: a case report. *Nat. Med.* 9: 448-452, 2003.
11. Gliman, S., Koller M, Black RS et al.: Clinical effects of A $\beta$  immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology* 64: 1553-1562, 2005.
12. Bard, F., Cannon, C., Barbour, R., et al.: Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat. Med.* 6: 916-919, 2000.
13. Weiner, HL, Cynthia, A., Lemere, Ms. et al.: Nasal administration of amyloid- $\beta$  peptide decreases cerebral amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 48: 567-579, 2000.
14. Hara, H, Monsonego, A, Yuasa, K, et al: Development of a safe oral A $\beta$  vaccine using recombinant adeno-associated virus vector for Alzheimer's disease. *J Alz. Dis.* 5:483-488, 2004.

15. Frenkel D, Maron R, Burt DS, et al.: Nasal vaccination with a proteosome-based adjuvant and glatiramer acetate clears  $\beta$ -amyloid in a mouse model of Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.* 115:2423-2433, 2005.
16. Akiyama, H., and McGeer, PL: Specificity of mechanisms for plaque removal after immunotherapy for Alzheimer disease. *Nat. Med.* 10:117-118, 2005. ; author reply 10:118-119, 2005.
17. Masliah, E., Rockenstein, E., Adame, A, et al.: Effects of  $\alpha$ -synuclein immunization in a mouse model of Parkinson's disease. *Neuron* 46: 857-868, 2005.

## Vaccine therapy for Alzheimer' s disease

Hideo Hara, Takeshi Tabira

National Institute for Longevity Sciences(NCGG)

### Summary

The amyloid cascade hypothesis and the new synaptic  $A\beta$  hypothesis are proposed as the mechanisms of Alzheimer pathology. The methods of  $A\beta$  vaccine (active, passive immunization and mucosal immunotherapy) and the immunological mechanisms of  $A\beta$  clearance are discussed. Furthermore, recent identified data ( $A\beta$  phagocytosis by activated microglia and intracellular  $\alpha$ -synuclein clearance by antibodies) are presented.

Key words: amyloid-  $\beta$  , antibody, vaccine, microglia.



【総 説】

シナプス分子と精神・神経疾患

鈴木 龍 雄

信州大学大学院医学研究科・加齢適応医科学系独立専攻・分子細胞学部門・神経可塑性学分野

要約

高次の脳機能が発揮されるためには、多数の分子の関与が必須である。たとえば、シナプス部では千のオーダーの分子がシナプス可塑性の発現に関わっている。これらの分子の一つでも機能を停止すると、脳の高次機能に異常が生ずる可能性がある。つまり精神活動に異常が生じたり、脳・神経系の病気になったりする。多数あるシナプスに存在するタンパク質種の中で同定されているものは半数にも満たないと見積もられてもいる。シナプス伝達の制御や可塑性、また、シナプス機能に起因する脳や精神の疾患の理解する上で、これら未知の分子を発見し、機能を明らかにすることが大きな役割を果たすと考えられる。著者らは数年前から、新規のシナプス後部タンパク質およびそれらをコードする遺伝子を発見・同定するプロジェクトを行っている。本総説では、最近までの著者らのプロジェクトの成果を紹介したい。

Key words: シナプス可塑性、PSD、NIDD、BAALC、CaMKII

略語説明：CaMKII、Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II; Dem, a molecule whose mRNA is localizing in the dendrite; PSD, postsynaptic density.

1. はじめに

高次の脳機能が発揮されるためには、多数の分子の関与が必須である。シナプス部には、シナプスの機能（神経シグナルの伝達とその制御）を発揮するための多数の分子群が機能的に配備されていると考えられる。神経伝達物質からの情報を受容体が受け取ったあと、シナプス後部では様々な分子間の反応が引き起こされて情報が処理される。その反応の主要な場の一つがシナプス後肥厚部（postsynaptic density, PSD）である。PSDはシナプス膜直下にある特殊な細胞骨格系で、電子顕微鏡で見ると、その分子密度の高さを反映してか、真っ黒く染

まってしまう内部の微細構造は判別しにくい（図1）。また、PSDは細胞骨格の特殊なものであるが、短時間でも変化を起こすダイナミックな構造体である。シナプス伝達に関わる情報処理反応は入力部位周辺ばかりでなく、場合によっては核にまで伝達され、遺伝子発現の変化をも引き起こし、そのフィードバックも受ける。タンパク質代謝の面では、シナプスの多くは細胞体中心部からは遠く離れた部位にあるが、細胞体の核周囲で見られるのと同様なタンパク質代謝のすべての仕組みが備わっていると考えられる（図2）。ある一群のmRNA種は樹状突起の先端近くまで輸送され、かつ特定の状況下のシナプス部位にトラップされる仕組みがあると考えられている。しかもそのようなmRNA種は少なく見積もっても



図1 PSD (矢印)の電子顕微鏡像



図2 シナプス後部でのタンパク質の合成 (Local protein synthesis) と分解

連絡先：〒390-8621 長野県松本市旭3-1-1  
Tel: 0263-37-2683 Fax: 0263-37-2725  
E-mail: suzukit@sch.md.shinshu-u.ac.jp

数百種にのぼる (Eberwine et al., 2002)。mRNA はそこで合成され (local protein synthesis)、シナプス後部の各所に細胞内輸送される。つまりタンパク質の各種輸送の仕組みも備わっている。さらに、不要となったタンパク質を分解する仕組み、たとえばユビキチン・プロテアソーム系なども備わっている。そしてこれらの仕組みがシナプスからの入力刺激によって巧妙に制御されていると考えられている。それらの仕組みに関与する分子の数は軽く千を超えるであろう。それらの多数の分子の働きによって正常なシナプス機能が発揮される。逆に、それらの分子の異常により、シナプス機能の破綻がもたらされる。その症状としては、精神機能の低下や異常、神経系の病気などとなって現れるはずである。

最近では、特定の精神・神経機能の異常や疾患とシナプスの情報伝達分子や構築分子などの異常と結びつくケースがますます増えている。たとえば、最もよく研究されていて、記憶の形成に深く関わっていることが知られているシナプスタンパク質の一つ、カルシウムカルモジュリンキナーゼ II (CaMKII) であるが、顕著な精神遅滞や痙攣を引き起こす Angelman mental retardation 症候群において異常が指摘された (Weeber et al., 2003)。また、FMRP タンパク質の異常はシナプス後部における local protein synthesis 系の異常を引き起こし、dendrite 形成不全 (つまりシナプス形成不全) をもたらし、欧米では最も頻度の高いとされる先天性の精神遅滞を引き起こす脆弱 X 症候群 (Fragile X mental retardation syndrome) の原因となっている (Nimchinsky et al., 2001)。先天的な spine 形成の異常は一般的に精神遅滞を引き起こす。このような例は、FMRP タンパク質の他では、oligophrenin-1 (Govek et al., 2004)、p21-activated kinase (PAK3) (Boda et al., 2004) で知られている。また、統合失調症において、細胞骨格関連タンパク質で神経突起形成に関与するとされる Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) が発症脆弱性に関与するという報告がある (Millar et al., 2000)。シナプスタンパク質等の脱リン酸化反応を司る calcineurin の関与も報告されている (Miyakawa et al., 2003)。さらにその異常がハンチントン病発症に関与する Huntingtin やその一連の関連遺伝子もシナプス近傍で小胞輸送に関わっている (Okano et al., 2001)。また、ユビキチン・プロテアソーム経路の分子で ubiquitin ligase である parkin の異常が常染色体劣性若年性パーキンソン病の原因となっている (Shimura et al., 2000)。一般にこの経路に属する分子の異常が、脳内に異常沈着物を残す神経変成疾患の発症に大きく関わっていると提唱されている (Alves-Rodrigues et al., 1998; Chung et al., 2001)。前述したようにこの経路はシナプス後部にも備わっているため、シナプス近傍のこの経路の異常が、初期の神経症状の発現に関わっているかも知れない。

## 2. シナプス後部タンパク質の探索プロジェクト

シナプス伝達の情報処理の主要な場である PSD を構

成する分子種数は数百から千のオーダーに及ぶと見積もられる。精製された PSD 画分中に存在する分子種のうち、同定されているものは半数にも満たない。未知の PSD 関連分子が存在する可能性は高い。脳の高次機能の発現メカニズムを知る上で、シナプス後部におけるシグナル伝達系の制御、そこでのタンパク質のダイナミクスを明らかにすることは非常に重要である。その為には、まだ完全には全体が把握されていない PSD タンパク質群について、新規の PSD 分子を発見・同定し、それらの機能を明らかにすることが一つの有効な方法である。また、これら未知の分子の発見から派生して、新たな生理機能の発見、疾患との関連などが導かれる可能性も高い。以下に新規の PSD タンパク質の発見・同定に関わる著者らの取り組み (Dem\* プロジェクト) を紹介する。著者らの最近の総説 (鈴木, 2004) も参照していただきたい。

(\*注: Dem, a molecule whose mRNA is localizing in the dendrite)

未同定のシナプス後部タンパク質を明らかにするために、著者らは、シナプス後部の local protein synthesis 系に着目した網羅的方法 (Tian et al., 1999) を着想した。つまりシナプス後部に局在する mRNA 種を網羅的に同定すれば、シナプス後部タンパク質種を、かなり網羅的に同定できるはずであると考えた (図3)。方法の詳細は最近の著者の総説 (鈴木, 2004) に記した。

この探索プロジェクトによって今までに完全長 cDNA が得られた分子を図4にまとめた。synUSP (synaptic ubiquitin-specific protease)、LRP4 (LDL receptor-related protein4, 旧名 synaptic LRP)、synArfGEF (synaptic GEF for Arf)、TANC (TPR-, ankyrin repeat- and coiled-coil-containing protein) 分子 (Tian et al., 2003; Inaba et al., 2004; Suzuki et al., 2005) の基本情報及び予想される精神・神経疾患との関わりについてはすでに鈴木氏の総説 (2004) に記したので、本総説では新規タンパク質 NIDD (nNOS-interacting DHHC-containing protein with dendritic mRNA) と、脳組織に発現している分子については全く解析の報告がない BAALC1-6-8 についてのみ概略を紹介する。

## 3. 新規分子NIDDの機能に関する考察

NIDD (Saito et al., 2004) は5つの膜貫通領域と

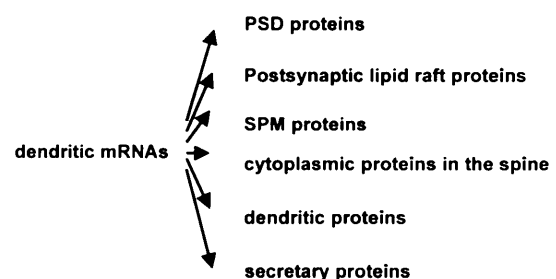


図3 シナプス後部に局在するmRNAは様々なシナプス後部タンパク質に翻訳される

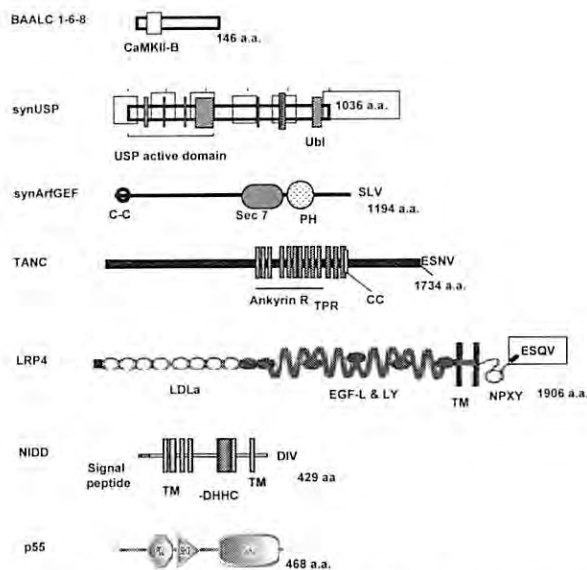


図4 著者らの研究で明らかになったシナプス後部タンパク質

分子構造で表した。CaMKII-B, CaMKII-binding domain, 分子名については本文を参照。

zinc-finger DHHC ドメインを有する 392 アミノ酸からなる新規分子である (図 5)。また、カルボキシル末端には PDZ domain 結合モチーフ (-EDIV) があり、このモチーフを介して nNOS と特異的に結合する。Cos7 発現系においては、nNOS はほとんどが soluble 画分に分布するが、membrane 画分に分布する NIDD を共発現させると、NIDD の発現量に比例して、nNOS が membrane 画分に移行する様になる。また、nNOS の NO 産生活性は NIDD を共発現させることにより有意に増加する。eNOS では NIDD の共発現により酵素活性の増加は見られないので、NIDD の効果は nNOS に特異的なものである。一般に nNOS は細胞質から membrane に移行することによって酵素として活性状態になると考えられている。今までに、nNOS は PSD-95 に結合することにより membrane 移行と活性制御がなされることが明らかに

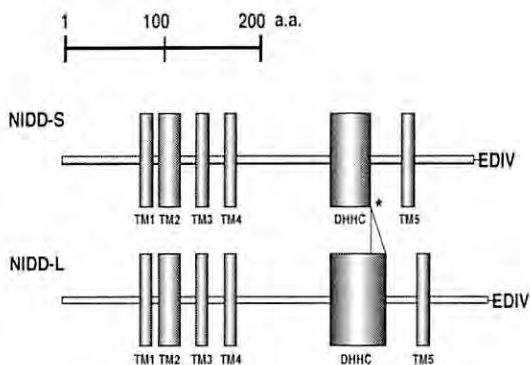


図5 Niddの分子構造

Long-form と short-shorm がある。5つの膜貫通領域 (TM), 1個の DHHC ドメイン, 及び C 末端に nNOS 結合配列を有する (Saito et al., 2004)。

なっていたが、著者らの研究の結果、その他にも、NIDD を介した nNOS 活性調節の仕組みがあることが明らかになった。

NIDD についてもう一つ言及すべき点は、zinc-finger DHHC ドメインである。一般にこのドメインを有するタンパク質は palmitoyl transferase (Putlina et al., 1999) であると推定されている。系統的な命名法によると NIDD は DHHC11 である。タンパク質の palmitoyl 化はタンパク質の膜移行に関与し、可逆的な反応なので、膜移行が palmitoylation-depalmitoylation によって制御されていると考えられている。最近では、この仕組みによって種々のレセプターや scaffold タンパク質の細胞内局在やタンパク質間相互作用が変化することにより、シナプス可塑性の発現が巧妙にコントロールされているのではないかと提唱されている (el-Husseini and Bredt, 2002)。さらに、遺伝子解析から、DHHC family の一つである zDHHC8 が統合失調症の発症のしやすさに関与しているのではないかとされている (Nature genetics, 2004) こと、NIDD が palmitoyl transferase の一つである可能性、palmitoylation-depalmitoylation のシナプス可塑性発現への関与などは、NIDD の生理機能の重要性を示唆しているのかも知れない。

#### 4. 脳・白血病特異的分子 BAALC1-6-8 タンパク質の性状

BAALC (Brain and acute leukemia, cytoplasmic) は造血系の前駆細胞、急性白血病細胞および脳にのみ発現することが知られている特異なタンパク質である (Tanner et al., 1998; Wang et al., 2004)。急性白血病では特に悪性タイプの白血病で発現が見られ、悪性度の指標とされる。脳での BAALC タンパク質についての研究報告は以前には全くなされていなかった。構造上にも特徴的なドメインやモチーフは知られていなかった。BAALC 遺伝子は 8 個の splice variant が存在している。脳では BAALC1-6-8 と BAALC1-8 (それぞれ exon 1, 6, 8 ないし 1, 8 の組み合わせから成る) が発現している。BAALC1-6-8 は 146 個のアミノ酸から成る低分子である。著者らが見つけた重要な特徴は、N 末 35 残基が CaMKII の  $\alpha$  サブユニットの regulatory region に結合すること、N 末端の miristoyl 化と palmitoyl 化により lipid raft 画分へ移行することである。CaMKII も lipid raft 画分に回収されるので、BAALC1-6-8 と CaMKII  $\alpha$  subunit の結合は、*in vivo* でも起こっている可能性が十分ある。BAALC1-6-8 mRNA はラット脳では海馬、嗅球、新皮質に高レベルで発現しており、中脳、小脳、脳幹部での発現は低い (図 6)。この分子はシナプトソームやシナプス膜、PSD 画分に存在し、また生後、synaptogenesis と平行して増加する。これらの点から、シナプス機能への関与が十分考えられるが、その生理機能については全くわかっていない。CaMKII  $\alpha$  subunit に対する役割についても全くわかっていない。これらの点は、今後の検討課題である。

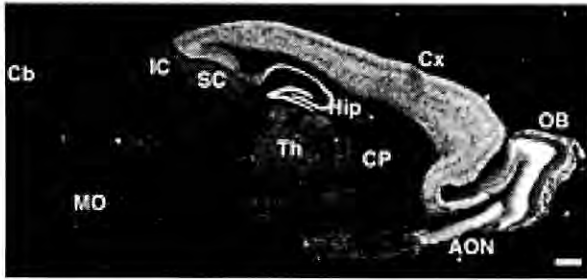


図 6 BAALC1-6-8の *in situ* hybridization (Wang et al., 2005)

adult rat を用いた。scale bar, 1mm. AON, anterior olfactory nucleus; Cb, cerebellar cortex; CC, corpus callosum; Cx, cerebral cortex; Hip, hippocampus; IC, inferior colliculus; MO, medulla oblongata; OB, olfactory bulb; Th, thalamus; SC, superior colliculus.

## 5. おわりに

以上、著者らが最近まで8年以上をかけて行ってきた新規シナプス後部分子探索プロジェクト (Dem プロジェクト) の経緯とその進展をまとめてみた。現在までにいくつかの新規シナプス後部タンパク質およびそれらをコードする完全長遺伝子について明らかにすることができた。また、これまでに発見した分子の中で特に精神・神経系の病態との関連で重要と考えられる分子については、ノックアウトマウスを作成するなどして、研究を継続している。新規のシナプスタンパク質の発見・同定の仕事は、ノックアウト動物を使った解析や、分子と様々な生理現象や病態への関わり、遺伝子と病気との関わりなどを解明する為の研究を行う上でなくてはならない、最初の第一歩の研究である。その先駆的役割は大きい。

## 文 献

Alves-Rodrigues A., Gregori L., Figueiredo-Pereira ME. (1998) Ubiquitin, cellular inclusions and their role in neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 21, 516-520.

Boda B., Alberi S., Nikonenko I., Node-Langlois R., Jourdain P., Moosmayer M., Parisi-Jourdain L., and Muller D. (2004) The Mental Retardation Protein PAK3 Contributes to Synapse Formation and Plasticity in Hippocampus. *J. Neurosci.* 24: 10816-10825.

Chung KK., Dawson VL., Dawson TM. (2001) The role of the ubiquitin-proteasomal pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* 24, S7-14.

Eberwine J, Belt B, Kacharina JE, Miyashiro K. (2002) Analysis of subcellularly localized mRNAs using *in situ* hybridization, mRNA amplification, and expression profiling. *Neurochem Res.* 27, 1065-1077.

el-Husseini Ael-D., Brecht DS. (2002) Protein palmitoylation: a regulator of neuronal development and function. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 791-

802.

Govek EE, Newey SE, Akerman CJ, Cross JR, Van der Veken L, Van Aelst L. (2004) The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine morphogenesis. *Nat Neurosci.* 7, 364-372.

Inaba Y., Tian Q-B., Okano A., Zhang J-P., Sakagami H., Miyazawa S, Li W., Komiyama A., Inokuchi K., Kondo H., and Suzuki T. (2004) Brain-specific potential guanine nucleotide exchange factor for Arf, synArfGEF(Po), is localized to postsynaptic density. *J. Neurochem* 89: 1347-1357.

Kim, E., Sheng, M. (2004) PDZ domain proteins of synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 771-781.

Millar JK., Wilson-Annan JC., Anderson S., Christie S., Taylor MS., Semple CA., Devon RS., Clair DM., Muir WJ., Blackwood DH., Porteous DJ. (2000) Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia. *Hum Mol Genet.* 9, 1415-1423.

Miyakawa T., Leiter LM., Gerber DJ., Gainetdinov RR., Sotnikova TD., Zeng H., Caron MG., Tonegawa S. (2003) Conditional calcineurin knockout mice exhibit multiple abnormal behaviors related to schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 8987-8992.

Mukai J., Liu H., Burt RA., Swor DE., Lai WS., Karayiorgou M., Gogos JA. (2004) Evidence that the gene encoding ZDHHC8 contributes to the risk of schizophrenia. *Nat Genet.* 36, 725-731.

Nimchinsky EA, Oberlander AM, Svoboda K. Related (2001) Abnormal development of dendritic spines in FMR1 knock-out mice. *J Neurosci.* 21, 5139-5146.

Okano A., Usuda N., Furihata K., Nakayama K., Tian Q-B., Okamoto T. and Suzuki T. (2003) Huntingtin-interacting protein-1-related protein of rat (rHIP1R) is localized in the postsynaptic regions. *Brain Res.* 967: 210-225.

Putilina T, Wong P, Gentleman S. (1999) The DHHC domain: a new highly conserved cysteine-rich motif. *Mol Cell Biochem.* 195, 219-226.

Saitoh F., Tian Q-B, Okano A., Sakagami H, Kondo H. and Suzuki T. (2004) NIDD, a novel DHHC-containing protein, targets neuronal nitric oxide synthase (nNOS) to the membrane through a PDZ-dependent interaction and regulates nNOS activity. *J. Biol. Chem* 279: 29461-29468.

Shimura H., Hattori N., Kubo S., Mizuno Y., Asakawa S., Minoshima S., Shimizu N., Iwai K.,

- Chiba T., Tanaka K., Suzuki T. (2000) Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet.* 25, 302-305.
- Tanner, S.M., Austin, J.L., Leone G., Rush, L.J., Plass, C., Heinonen. K., Mrozek, K., Sill, H., Knuutila, S., Kolitz, J.E., Archer, K.J., Caligiuri, M.A., Bloomfield, C.D., and de La Chapelle, A. (2001) BAALC, the human member of a novel mammalian neuroectoderm gene lineage, is implicated in hematopoiesis and acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 98. 13901-13906.
- Tian, Q-B., Nakayama, K., Okano, A., Suzuki, T., 1999. Identification of mRNAs localizing in the postsynaptic region. *Mol. Brain Res.* 72, 147-157.
- Tian QB, Okano A, Nakayama K, Miyazawa S, Endo S., and Suzuki T (2003) A novel ubiquitin-specific protease, synUSP, is localized at the post-synaptic density and post-synaptic lipid raft. *J. Neurochem.* 87: 665-675.
- Wang X., Tian Q-B., Okano A., Sakagami H., Kondo H., Endo S. and Suzuki T. (2005) BAALC 1-6-8 protein is targeted to postsynaptic lipid rafts by its N-terminal miristoylation and palmitoylation, and interacts with a, but not b, subunit of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Neurochem.* 92, 647-659
- Weeber EJ, Jiang YH, Elgersma Y, Varga AW, Carrasquillo Y, Brown SE, Christian JM, Mirnikjoo B, Silva A, Beaudet AL, Sweatt JD. (2003) Derangements of hippocampal calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in a mouse model for Angelman mental retardation syndrome. *J Neurosci.* 23, 2634-2644.
- 鈴木龍雄 (2004) 新規 PSD タンパク質の同定と脳疾患への関与を探る。日本神経精神薬理学雑誌 24: 205-210.

#### 謝辞

本研究の進展は信州大学大学院医学研究科、加齢適応医科学系独立専攻、分子細胞学部門、神経可塑性学分野のスタッフ及び大学院生の研究成果のたまものである。また、本研究は文部科学省科学研究費、豊田理化学研究所、上原記念生命科学財団、内藤記念科学振興財団、信州大学学長裁量経費の援助をえて行われた。あらためて深謝する。

## Implications of synaptic proteins for neuronal disorders

Tatsuo Suzuki

Department of Neuroplasticity

Institute on Aging and Adaptation

Shinshu University Graduate School of Medicine



【研究報告】

SAMマウスにおける脳の老化・変性パターンとユビキチン・プロテアソーム系の関与

島田厚良、河村則子、慶野裕美、佐藤 衛、千葉陽一、齊藤優子、細川昌則  
愛知県心身障害者コロニー 発達障害研究所 病理学部

1. はじめに

老化促進モデルマウスの1系統であるSAMP10系は、加齢にともない、学習・記憶障害を呈し、大脳皮質や辺縁系に萎縮が見られることから、脳の老化・変性の自然発症モデル動物と考えられる。これまでに、SAMP10マウスの加齢に伴う脳萎縮は、前頭部大脳皮質・嗅球・前嗅核・嗅内野に最も顕著であること、前頭部以外の大脳皮質・側坐核・中隔・扁桃体・梨状皮質・線条体にも萎縮が生じること、萎縮の著明な前頭部皮質では加齢に伴ってニューロンが減少し、残存ニューロンでは細胞体面積が減少することを明らかにしてきた[1,2]。これに対し、正常老化コントロールとして用いているSAMR1マウスでは、寿命末期まで学習・記憶能は比較的保たれ、頭頂皮質の比較的軽度な萎縮を除いて、ほとんどの脳領域で加齢による萎縮は生じないこと、また、ニューロンの脱落や細胞体萎縮はおこらないことがわかっている[1,2]。しかしながら、古典的組織染色法を用いた病理学的検索によっては、SAMP10における神経細胞の変性像をとらえることは難しく、ヒトの老化脳やアルツハイマー病で見られる老人斑や神経原線維変化といった特徴的な像が得られなかった。そこで、我々はTUNEL法、ゴルジ法などの特殊染色法を用いた詳細な形態学的検討から、SAMP10におけるニューロンの細胞レベルでの変性パターンを明らかにした。さらに、現在進行中の研究からは、その変性メカニズムの一端として、ユビキチン・プロテアソーム系が関与する可能性を示唆するデータが出つつあるので、その経過をあわせて報告したい。

2. 加齢にともなうニューロン核内DNA傷害

神経変性疾患では、核の形態上はアポトーシスを呈さないニューロンにもDNA断片化が亢進していることが示されている[3]。そこで、SAMP10におけるニューロンの変性にDNA断片化が関与している可能性を形態学的に検討した[4]。

方法：3、7、14ヵ月齢のSAMP10と、3、14、20ヵ月齢のSAMR1を、10%ホルマリンにて灌流固定し、パラフィン切片上で、TUNEL法をDAB発色にて行った。分布の多かった領域については、コンピューター画像解析装置を用いて、TUNEL陽性ニューロンを計数し、領域内の全ニューロン数に対する百分率を指標として、核内DNA傷害の加齢変化を評価した。

結果：①SAMP10では、嗅結節・帯状皮質・島皮質・側坐核・中隔・扁桃体・梨状皮質・視床下部・歯状回を始めとする領域で、加齢に伴い、核内TUNEL陽性ニューロンが増加した。各領域で、14ヵ月齢のSAMP10のTUNEL陽性率は最も高く、14ヵ月齢以降のSAMR1や、3ヵ月齢のSAMP10に比して、統計的に有意であった(図1)。②SAMR1ではTUNEL陽性率の増加は有意ではなかった。③これらのTUNEL陽性細胞では、核はやや萎縮しているものの、形態はほぼ正常に保たれており、アポトーシスは起こしていなかった。

結論：①SAMP10では、嗅脳系・大脳辺縁系の特定の部位において、加齢とともにニューロン核内DNA断片化が亢進する。②このDNA断片化はアポトーシスに関連して起こるものではないが、一種の変性像と解釈する。

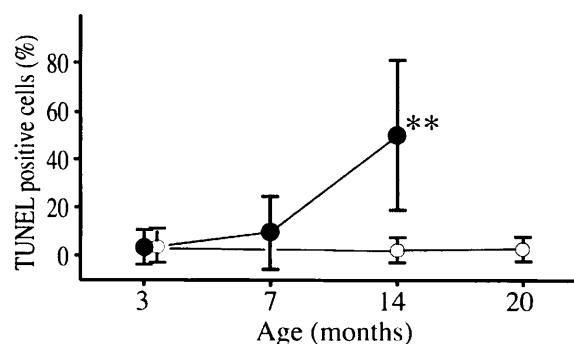


図1 帯状皮質におけるニューロンのTUNEL陽性率の加齢変化

●はSAMP10、○はSAMR1を示す。\*\*p<0.01

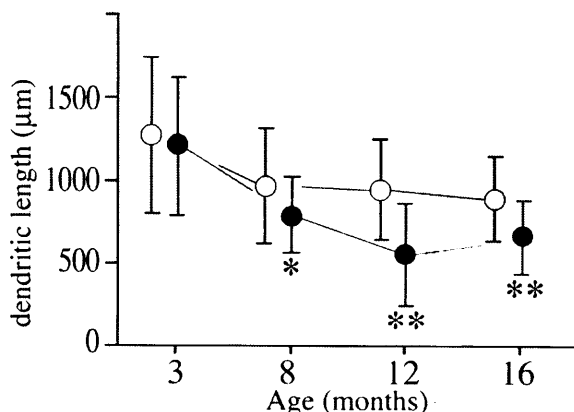


図2 帯状皮質錐体細胞の先端側樹状突起全長の加齢変化

●はSAMP10、○はSAMR1を示す。\*p<0.05, \*\*p<0.01

連絡先：〒480-0392 愛知県春日井市神屋町713-8

Tel: 0568-88-0811 Fax: 0568-88-0829

E-mail: ats7@inst-hsc.jp



### 3. 加齢に伴うニューロン樹状突起の退縮

萎縮とユビキチン化封入体形成が著明な帯状皮質における錐体細胞の樹状突起を含めた全体像が加齢に伴っていかなる形態変化を来すかを検討した [5]。

方法：3、8、12、16ヵ月齢の SAMP10 と、対応する月齢の SAMR1 の脳を 10% ホルマリンにて浸漬固定し、硝酸銀の系列を経てゴルジ染色した後、100  $\mu$ m 厚の切片とした。帯状皮質第 2 層の中で良好に染色された錐体細胞を無作為抽出し、カメラ・ルシダで描画し、樹状突起の複雑性に関する 7 つのパラメータを計測した。次いで先端側樹状突起のあらかじめ定めたセグメントを対象に、スパイン密度を計測した。

結果：① SAMP10 では、先端側樹状突起全長は、8、12、16ヵ月齢で、それぞれ、3ヵ月齢時の 65%、45%、57% と短縮した (図 2)。② SAMP10 では、セグメント総数と細胞体終端間距離も加齢に伴って減少した。③ SAMP10 では、樹状突起の退行性変化はすべて先端側に限られており、基底側樹状突起では加齢変化を認めなかった。④ SAMP10 では、セグメント平均長・樹状突起終端総数・枝分かれ次元最高値・幹突起数の加齢変化は有意ではなかった。⑤ SAMR1 では、12ヵ月齢に至るまで、いずれのパラメータについても有意の加齢変化を認めなかった。⑥ SAMP10 のスパイン密度は、8、12、16ヵ月齢で、それぞれ 3ヵ月齢時の 74%、58%、58% にまで低下した。一方、SAMR1 では 3ヵ月齢から 16ヵ月齢に至るまでスパイン密度に有意の加齢変化を認めなかった。

結論：① SAMP10 では、錐体細胞の老化は 8ヵ月齢までに先端側樹状突起の遠位端のわずかな消失もしくは短縮に始まり、セグメント単位の脱落を来しながらも、全体的な複雑性は比較的保ったまま細胞体へ向けて徐々に退縮する (図 3)。② SAMP10 では、基底側樹状突起は加齢によって有意の形態変化を示さない。③ SAMP10 では、樹状突起の退縮に加えて、スパイン密度

が加齢と伴に減少することによって、シナプスの場が大きく失われる。④ SAMR1 では、錐体細胞樹状突起の形態およびスパイン密度は 16ヵ月齢までよく保たれる。

### 4. 加齢にともなうシナプスの減少

SAMP10 の大脳皮質におけるニューロンの脱落と樹状突起退縮に対応して、ニューロピルにおけるシナプス量の加齢変化を知るため、シナプス関連タンパク質 (シナプス前終末のマーカであるシナプトフィジンとシナプス後構造のマーカである PSD95) を定量評価した [6]。

方法：3、7、12、16ヵ月齢の SAMP10 と、対応する月齢の SAMR1 の脳を 8 部位に分けた。SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、シナプトフィジンまたは PSD95 に対する抗体を用いてウェスタンブロットした。画像解析装置を用いて各バンドを平均濃度と面積に基づいて定量した。

結果：① SAMP10 では、大脳皮質前半部におけるシナプトフィジンの量は、12ヵ月齢で 3ヵ月齢時の 48%、16ヵ月齢では 69% であった (図 4)。② SAMP10 の 12ヵ月齢での大脳皮質前半部における PSD95 の量は、3ヵ月齢時の 45% であった。③ SAMP10 におけるシナプトフィジン・PSD95 量の加齢変化は、大脳皮質前半部以外では、統計的に有意でなかった。④ SAMR1 では、シナプトフィジン、PSD95 ともに、何れの部位においても量的加齢変化は認められなかった。

結論：① SAMP10 では、最も萎縮の著しい大脳前頭部皮質において、部位選択的にシナプス量が加齢に伴って 50% 以上減少する。② SAMR1 では 17ヵ月齢まではシナプス量の加齢変化は認められない。

### 5. 大脳辺縁系に好発するユビキチン化封入体

アルツハイマー病、パーキンソン病、レビー小体型痴呆を始めとする神経変性疾患では、加齢に伴ってユビキ

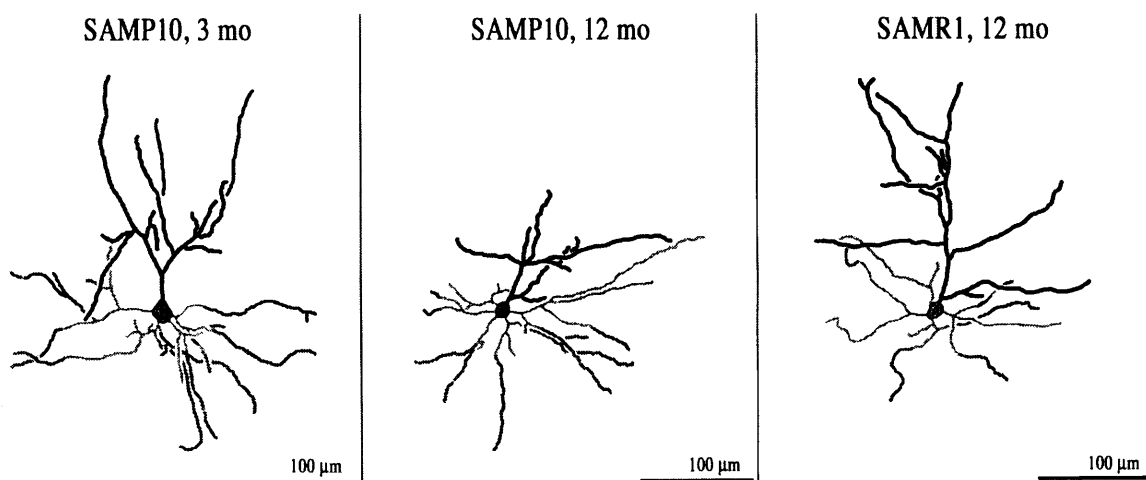


図 3 ゴルジ標本描画像で見る帯状皮質錐体細胞の加齢変化

3ヵ月齢の SAMP10 と、12ヵ月齢の SAMP10 および SAMR1 のそれぞれから、樹状突起に関するパラメータが平均値に近い“代表的ニューロン”を選び、並べたところ。太い黒線は先端側樹状突起、灰色線は基底側樹状突起、細い黒線で囲んだ中心部の膨らみは細胞体を表す。SAMP10 では先端側樹状突起の退縮が著しい。

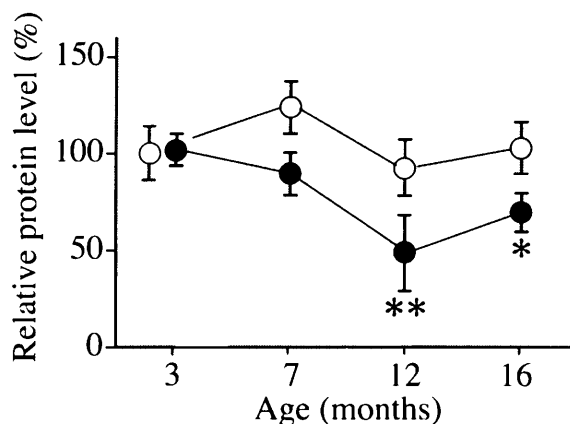


図4 大脳皮質前半部におけるシナプトフィジン量の加齢変化  
●はSAMP10、○はSAMR1を示す。\* $p<0.05$ 、\*\* $p<0.01$

チン化された異常タンパク質から成る封入体がニューロン内に形成される[7,8]。そこで、現在、SAMP10の脳内にユビキチン化病変が見られるか否かを検討しているところである。

方法：各月齢のSAMP10とSAMR1の脳パラフィン切片を作製して、各種古典的染色、および、ユビキチン、リン酸化ニューロフィラメント、リン酸化タウ、A $\beta$ 、 $\alpha$ -シヌクレインなどに対する免疫組織化学的染色を行う。ユビキチン免疫染色標本を用いて、嗅内野の一定領域内に出現する陽性ニューロンの百分率を評価する。嗅内野標本にて免疫電子顕微鏡的観察を行う。

経過：①老齢SAMP10では、細胞質内にユビキチン化された封入体を有するニューロンが多数見られる。②封入体とリン酸化ニューロフィラメント、リン酸化タウ、A $\beta$ 、 $\alpha$ -シヌクレインとの関連は認められない。③SAMP10における封入体含有ニューロンの率は、3、12、17ヵ月齢で、それぞれ、0.5、18.2、33.9%と著明に増加する。一方、SAMR1にも同様の封入体は見られるが、その出現頻度や加齢による増加は緩やかである。④ユビキチン化封入体は、扁桃核、視床下部、海馬、嗅内野、帯状皮質などに頻繁に見られるが、新皮質や線条体ではまれである。この分布パターンはSAMP10とSAMR1に共通して見られる。⑤電子顕微鏡的には、ユビキチン陽性像は、互いに融合して巨大化したリポフスチン顆粒に集積している。

このように、マウスの大脳辺縁系・関連領域では、加齢とともにニューロン内にユビキチン化された異常タンパク質が蓄積して、リポフスチンと関連しながら封入体を形成するようである。SAMP10では、より早期からより多くのユビキチン化封入体が形成され、それらが加齢に伴って急速かつ著明に増加する。一方、辺縁系以外の領域では、ユビキチン化封入体形成は少ないと思われる。

## 6. 加齢ともなうプロテアソーム活性の変化

ユビキチン・プロテアソーム系は細胞内タンパク質分解機構の中核をなし、その障害は種々の神経変性疾患における異常タンパク質凝集に関わる[9,10]。SAMP10の大脳辺縁系を主体に出現するユビキチン化封入体の形成

機構に迫るべく、現在、脳組織が有するプロテアソーム活性の加齢変化を生化学的に検討しているところである。

方法：各月齢のSAMP10とSAMR1から調整した大脳辺縁系・関連組織と大脳辺縁系非関連組織のホモジネートを、それぞれ、蛍光物質アミノメチルクマリン(AMC)にアミノ酸を付加したプロテアソーム特異的人工基質とともにインキュベートし、組織のプロテアソーム活性によって遊離するAMC量を蛍光分光光度計で測定する。

経過：①大脳辺縁系・関連組織においては、SAMP10の3、7、17ヵ月齢における遊離AMC量は、181、105、48と、急速かつ著明に低下するのに対し、SAMR1では加齢に伴って緩やかに低下する。②大脳辺縁系非関連組織では、いずれの系統においても加齢に伴う遊離AMC量の変化は顕著ではない。

このように、マウスでは、大脳辺縁系・関連領域選択的に、加齢によってプロテアソーム活性が低下するようである。とりわけ、SAMP10では、辺縁系・関連領域におけるプロテアソーム活性が加齢に伴ってSAMR1より急速かつ著明に低下する。一方、辺縁系以外の領域では、老齢期までプロテアソーム活性は保たれる。

## 7. 考察

マウス脳に出現するユビキチン化封入体は、特定のタンパク質の蓄積を認めないことから、おそらくは雑多なタンパク質から成ると考える。しかし、その脳内分布は極めて特徴的で、系統差は少ないことから、マウス脳に普遍的な加齢変性パターンを反映する良い指標になり得ると思われる。とりわけ、分布が大脳辺縁系および関連領域に集中している点は重要で、ヒトの神経変性疾患における病変分布[11]と照らしあわせても類似点があり、興味深い。

この封入体の成因について、加齢とともに、マウスの大脳辺縁系・関連領域選択的に、プロテアソーム活性が低下することを重視したい。そのため、ユビキチン化の後に分解されない異常タンパク質がニューロン内に蓄積して封入体を形成すると考える。とりわけ、SAMP10では、辺縁系・関連領域におけるプロテアソーム活性が加齢に伴ってSAMR1より急速かつ著明に低下するため、これらの領域に、より早期からより多くのユビキチン化封入体が形成される。一方、辺縁系以外の領域では、老齢期までプロテアソーム活性は保たれるため、こうした領域にユビキチン化封入体は少ない。

促進老化を示すSAMP系統の脳組織などに、酸化的ストレスによる傷害の蓄積が報告されている[12,13,14]ことから、封入体の形成には異常タンパク質の過剰産生が関与している可能性もある。また、封入体はリポフスチンと密接に関連することから、酸化的ストレスによる脂質過酸化の関与も考えられる。脂質過酸化物はプロテアソームを阻害することが知られているので[15]、封入体の成長につれて、プロテアソーム活性がより低下して、さらなる異常タンパク質の蓄積を助長するといった悪循環に陥るのであろう。

ニューロンにはアポトーシスは生じていないことから、封入体の形成は直ちに細胞死を招くものではないと考える。しかし、封入体が形成される脳領域のニューロンで、樹状突起が退縮していることから、封入体によって細胞体で代謝障害が起こる結果、遠位部突起の維持が不可能となり、先端から徐々に退縮してゆくのであろう。同時にスパインも失われるため、シナプスの場が著しく奪われ、神経伝達機能は低下する。大脳辺縁系が機能的におかされることの反映として、ある種の学習課題に見られた行動上の異常があげられる [16]。例えば、T 迷路を用いた条件回避学習課題を行わせると、老齢 SAMP10 はしばしば著明な「すくみ行動」を示し、学習が阻害される [17,18]。このような情動行動の異常は SAMP10 の特徴のひとつであり、その背景に今回報告したような大脳辺縁系を中心とする組織・細胞レベルでの変化があると解釈する。

一般に、神経変性疾患は、特定の神経細胞が変性・脱落する進行性疾患であるが、疾患ごとの変性部位選択性に関わるメカニズムはよくわかっていない。現在進行中の SAMP10 を用いた研究をさらに進め、特定の部位が選択的に変性する過程を、プロテアソーム系などに着目しながら明らかにしたい。我々は、このマウスから得られる知見に基づいて、ヒトの神経変性疾患のメカニズム解明の一助となるコンセプトを提言できればと考えている。

#### 8. 文献

1. Shimada A, Ohta A, Akiguchi I and Takeda T. Inbred SAM-P/10 as a mouse model of spontaneous, inherited brain atrophy. *J Neuropathol Exp Neurol* 51:440-450, 1992.
2. Shimada A. Age-dependent cerebral atrophy and cognitive dysfunction in SAMP10 mice. *Neurobiol Aging* 20:125-136, 1999.
3. Stadelmann C, Bruck W, Bancher C, Jellinger K and Lassmann H. Alzheimer disease: DNA fragmentation indicates increased neuronal vulnerability, but not apoptosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:456-464, 1998.
4. Shimada A, Keino H, Satoh M, Kishikawa M, Seriu N and Hosokawa M. Age-related progressive neuronal DNA damage associated with cerebral degeneration in a mouse model of accelerated senescence. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 57:B415-421, 2002.
5. Shimada A, Tsuzuki M, Keino H, Satoh M, Chiba Y, Saitoh Y and Hosokawa M. Apical vulnerability to dendritic retraction in prefrontal neurones of ageing SAMP10 mouse: a model of cerebral degeneration. *Neuropathol and Appl Neurobiol* (in press)
6. Shimada A, Keino H, Satoh M, Kishikawa M and Hosokawa M. Age-related loss of synapses in the frontal cortex of SAMP10 mouse: A model of cerebral degeneration. *Synapse* 48:198-204, 2003.
7. Chung KK, Dawson VL and Dawson TM. The role of the ubiquitin-proteasomal pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 24:S7-14, 2001.
8. Ciechanover A and Brundin P. The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron* 40:427-446, 2003.
9. Ross CA and Pickart CM. The ubiquitin-proteasome pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases. *Trends Cell Biol* 14:703-711, 2004.
10. Hernandez F, Diaz-Hernandez M, Avila J and Lucas JJ. Testing the ubiquitin-proteasome hypothesis of neurodegeneration in vivo. *Trends Neurosci* 27:66-69, 2004.
11. Hof PR, Giannakopoulos P, Vickers JC, Bouras C and Morrison JH. The morphologic and neurochemical basis of dementia: aging, hierarchical patterns of lesion distribution and vulnerable neuronal phenotype. *Rev Neurosci* 6:97-124, 1995.
12. Park JW, Choi CH, Kim MS and Chung MH. Oxidative status in senescence-accelerated mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 51:B337-345, 1996.
13. Poon HF, Castegna A, Farr SA, Thongboonkerd V, Lynn BC, Banks WA, Morley JE, Klein JB and Butterfield DA. Quantitative proteomics analysis of specific protein expression and oxidative modification in aged senescence-accelerated-prone 8 mice brain. *Neuroscience* 126:915-926, 2004.
14. Butterfield DA, Howard BJ, Yatin S, Allen KL and Carney JM. Free radical oxidation of brain proteins in accelerated senescence and its modulation by N-tert-butyl- $\alpha$ -phenylnitron. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:674-678, 1997.
15. Hyun DH, Lee MH, Halliwell B and Jenner P. Proteasomal dysfunction induced by 4-hydroxy-2,3-trans-nonenal, an end-product of lipid peroxidation: a mechanism contributing to neurodegeneration? *J Neurochem* 83:360-370, 2002.
16. Miyamoto M. Characteristics of age-related behavioral changes in senescence-accelerated mouse SAMP8 and SAMP10. *Exp Gerontol* 32:139-148, 1997.
17. Shimada A, Ohta A, Akiguchi I and Takeda T. Age-related deterioration in conditional avoidance task in the SAM-P/10 mouse, an

- animal model of spontaneous brain atrophy. *Brain Res* 608:266-272, 1993.
18. Shimada A, Hosokawa M, Ohta A, Akiguchi I and Takeda T. Localization of atrophy-prone areas in the aging mouse brain: Comparison between the brain atrophy model SAM-P/10 and the normal control SAM-R/1. *Neuroscience* 59:859-869, 1994.

Pattern of brain aging and neurodegeneration in SAM mice and involvement of  
the ubiquitin-proteasome system

Atsuyoshi Shimada, Noriko Kawamura, Hiromi Keino, Mamoru Satoh, Yoichi Chiba,

Yuko Saitoh and Masanori Hosokawa

Department of Pathology, Institute for Developmental Research, Aichi Human Service Center

## 【研究報告】

### 細胞老化および形質転換におけるミトコンドリアから発生する活性酸素の影響

#### —線虫から哺乳類へ—

石井恭正<sup>1)</sup>、安田佳代<sup>1)</sup>、赤塚明<sup>2)</sup>、樋野興夫<sup>3)</sup>、Philip S. Hartman<sup>4)</sup>、石井直明<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 東海大学・医学部・基礎医学系・分子生命科学、<sup>2)</sup> 東海大学・医学部・教育・研究支援センター、<sup>3)</sup> 順天堂大学・医学部・病理学 (II)、<sup>4)</sup> Department of Biology, Texas Christian University

#### 要約

正常細胞における細胞内酸化ストレスは、その大部分がミトコンドリアから発生する活性酸素に起因する。この活性酸素は、ミトコンドリア電子伝達系から漏出した電子が近傍の酸素と反応することで生じる。我々の研究室で単離された線虫*C. elegans*の*mev-1*変異体は、ミトコンドリア電子伝達系複合体IIのチトクロームb大サブユニット (CYT-1) にアミノ酸点変異が生じ、ミトコンドリアから過剰の活性酸素を発生することが明らかにされた。そこで、我々はこれらの現象を哺乳動物において検証するために、*cyt-1*遺伝子の相同遺伝子であるマウス*SDHC*遺伝子に*mev-1*変異体と同様のアミノ酸点変異 (SDHC V69E) を生じる変異遺伝子を構築し、これを導入したマウスNIH3T3細胞株 (SDHC E69) を樹立した。このSDHC E69細胞株は、ミトコンドリアから過剰の活性酸素を発生することで、細胞増殖能が低下し、過剰なアポトーシスを誘導することが確認された。さらに、生存を続ける細胞では高頻度に良性腫瘍の特性を示す癌細胞へと形質転換することが明らかにされた。以上の結果から、電子伝達系複合体IIからの電子漏出が起因となり過剰発生した活性酸素は、細胞老化の原因となる細胞増殖能の低下や老年性疾患や早老の原因となる過剰なアポトーシスを誘導し、さらには発癌を導く細胞の形質転換にも深く関与していることを明らかにした。

キーワード：superoxide anion, mitochondria, oxidative stress, aging, tumor

#### 1. はじめに

活性酸素種 (ROS) による生体への酸化ストレス障害は、その発生源により生体外および生体内酸化ストレスに大別される。さらに、生体内酸化ストレスは細胞外および細胞内酸化ストレスに分類され、細胞内酸化ストレスの大部分は、ミトコンドリアから産生される活性酸素に起因すると考えられている。この活性酸素発生は、ミトコンドリア内膜に存在する電子伝達系複合体から漏出した電子が近傍の酸素と反応することによって生じると考えられている [1, 2]。

細胞外酸化ストレスは免疫機能の恒常性維持機構などを担い、細胞内酸化ストレスは神経細胞などの細胞分化・増殖やアポトーシスを誘導に関与し、さまざまな生体の恒常性維持機構を担っていることが報告されている [3-5]。その一方で、過度の酸化ストレスは細胞内構成成分に障害を生じ、神経変性疾患や癌などのさまざまな疾患発症や老化の原因になると報告されてきた [6, 7]。しかし、哺乳動物においてミトコンドリアから過剰に発生した活

性酸素が細胞障害を引き起こし、疾患や老化の原因となる過剰なアポトーシスの誘導や発癌に至る細胞の形質転換を誘導することを直接証明した報告はない。なぜなら、より正常な生体環境に近い条件で、ミトコンドリアから過剰な活性酸素を発生させる手段が存在しなかったことが理由に挙げられる。これまでの酸化ストレス障害の研究は、電子伝達系阻害剤を用いたもの、生体外より ROS を直接暴露するもの、生体内 ROS を強制発生するための薬剤を用いたもの、あるいは抗酸化剤を用いたものなど間接的な手法によって進めざるを得なかった。電子伝達系阻害剤を用いた研究からは、生体を致死とし生細胞内や生体機能上での活性酸素の影響を明らかにすることは不可能であり、そのほとんどの研究成果は生化学的な分野に限られていた。また、これらの全ての手法において作り出される酸化ストレスは、生体内での通常の酸化ストレスに比べ、はるかに過剰となり、ゆっくりとした生体の変化を詳細に捉えることが不可能であった。

その中、我々は *C. elegans* を用いた研究から、遺伝学的にミトコンドリア電子伝達系に異常を生じ、ミトコンドリアから過剰な活性酸素を発生する *mev-1* 変異体を取得し、より自然な生体環境に近い条件での酸化ストレスが生体へ及ぼす影響を解析することに成功した [8, 9]。

連絡先：〒259-1143 神奈川県伊勢原市下糟屋143

Tel: 0463-93-1121 ex.2650

Fax: 0463-94-8884

E-mail: lamfd001@is.icc.u-tokai.ac.jp

## 2. *C. elegans*の酸素高感受性短寿命 $mev-1$ 変異体

$mev-1$  変異体はメチルピオロゲン (パラコート) 感受性の短寿命突然変異株として単離され、これが酸素濃度依存的に早期老化症状を呈することから、酸素高感受性短寿命の老化モデル動物として確立された [10-12]。この変異体の原因遺伝子は電子伝達系複合体 II の  $cyt-1$  であり、その遺伝子産物 CYT-1 はアミノ酸点変異 (G71E) を生じていた [8]。その結果、コハク酸-シトクローム  $c$  酸化還元酵素活性の低下が生じ、代謝性乳酸アシドーシスを伴うエネルギー代謝異常が確認された。また、酸素高感受性の原因が、大気中酸素に由来するミトコンドリア活性酸素発生の上昇によるものであることが確認された。これらの異常から、この変異体はミトコンドリア構造や機能異常を伴う過剰なアポトーシスを誘導することで短寿命となることも明らかにされた [9, 13]。以上の結果から、 $mev-1$  変異体はミトコンドリアから過剰な活性酸素を発生する早老化モデル動物として、さらにはミトコンドリア病をはじめとしたミトコンドリア機能不全に起因する様々な疾患モデル動物として有用となること示された。

## 3. SDHCにV69Eアミノ酸点変異を有したSDHC E69細胞株の樹立

*C. elegans*,  $mev-1$  変異体の原因遺伝子であった CYT-1 のアミノ酸配列 (DDBJ database accession numbers L26545-1 for *C. elegans*) の相同検索の結果、マウス SDHC のアミノ酸配列 (DDBJ database accession numbers AK032458-1 for *Mus musculus*) を取得し、コハク酸-ユビキノン酸化還元酵素活性領域、ユビキノンやヘム結合領域などの特性領域において約 80% の相同性があることを確認した。 $mev-1$  変異体においてアミノ酸点変異 (G71E) が生じた部位は塩基性アミノ酸に富むユビキノン結合領域内に存在し、酸化還元酵素蛋白質の活性中心領域で求核性アミノ酸として働くセリン残基や、ユビキノンとの結合に必須のヒスチジン残基に隣接していた。その結果、これらに隣接した部位での中性アミノ酸から酸性アミノ酸への置換は、酸化還元反応に重要である求核性アミノ酸の機能阻害や、複合体 II とユビキノンとの親和性の低下を引き起こすものと示唆された。そこで、マウス SDHC アミノ酸において、*C. elegans*,  $mev-1$  変異体のアミノ酸点変異部位と同様の部位に位置する中性アミノ酸を酸性アミノ酸へ (V69E) と置換したアミノ酸 (SDHC V69E) を発現する外来遺伝子 (変異型 SDHC 遺伝子:SDHC T206,207A) を構築した [14]。この変異型 SDHC 遺伝子を導入した NIH3T3 細胞の中から、野生型と変異型の SDHC 遺伝子の発現量が 1:1 の構成的な発現となるものを SDHC E69 細胞株として樹立した [14]。

## 4. SDHC E69細胞株のエネルギー代謝および活性酸素発生量の変化

### 1) ミトコンドリア電子伝達系複合体酵素活性とATP存在量の変化

ミトコンドリア電子伝達系複合体活性の変化を解析するため、複合体 I - III (NADH-シトクローム  $c$  酸化還元酵素) 活性および複合体 II - III (コハク酸-シトクローム  $c$  酸化還元酵素) 活性の測定をおこなった。その結果、NADH-シトクローム  $c$  酸化還元酵素活性に NIH3T3 細胞野生株と SDHC E69 細胞株の間で変化は確認されなかった。一方、コハク酸-シトクローム  $c$  酸化還元酵素活性では、SDHC E69 細胞株において野生株のものと比較し約 30% にまで減少していた [14]。以上の結果は、*C. elegans*,  $mev-1$  変異体の解析結果と同様の結果となった。また、ATP の細胞内存在量においても *C. elegans*,  $mev-1$  変異体の解析結果と同様に野生株と SDHC E69 細胞株の間で変化は観察されなかった [14]。したがって、SDHC V69E を発現する変異型 SDHC 遺伝子 (SDHC T206,207A) を導入した SDHC E69 細胞株は *C. elegans*,  $mev-1$  変異体同様にミトコンドリアから過剰に発生する活性酸素の生体への影響を解析できる細胞株になると示唆された。

### 2) 活性酸素発生量の変化

ミトコンドリアから発生する活性酸素量を *In vitro* および *In vivo* において測定した。その結果、野生株で電子伝達系複合体 II の基質、コハク酸を加えた際には活性酸素産生量の変化は確認されず、複合体 III 特異的な電子伝達阻害剤 (QNO) を加えることにより活性酸素産生量が増加した (図 1)。したがって、コハク酸を基質としたコハク酸脱水素酵素 (SDH) 活性により発生した電子が複合体 II から複合体 III へと伝達され、コハク酸-シトクローム  $c$  酸化還元酵素活性が正常であることが確認された。一方、SDHC E69 細胞株ではコハク酸を加えることで活性酸素発生量が増加した (図 1)。この結果から、SDH 活性により発生した電子は複合体 II - III 間から漏出し、ミトコンドリア内の近傍の酸素と反応していることが示唆された。また、複合体 I の基質である NADH を

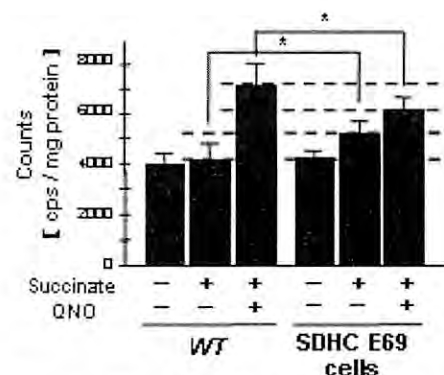


図 1 *in vitro*測定系におけるミトコンドリアからの活性酸素発生量の変化 (論文14より改変)

活性酸素特異的の化学発光試薬 (MPEC) をもちい、ミトコンドリア画分タンパク質に複合体 II の基質コハク酸 (succinate) および複合体 III 特異的の電子伝達阻害剤 (QNO) を添加した際に発生した活性酸素量を測定した。WT: 野生株, SDHC E69 cells: SDHC E69 細胞株。\*:  $p < 0.05$



加えた際、野生株および SDHC E69 細胞株のミトコンドリアからの活性酸素産生は確認されなかった。さらに、ユビキノン (CoQ<sub>10</sub>) を過剰添加した培地で培養した細胞株の活性酸素発生量を測定した結果、コハク酸添加時に生じた SDHC E69 細胞株の過剰な活性酸素の発生が抑制された [14]。この結果は、ミトコンドリアから発生する活性酸素が、電子伝達系から漏出した電子が原因となって生じていることを裏付ける結果となった。すなわち、SDHC E69 細胞株では SDHC V69E タンパク質をサブユニットとした複合体 II とユビキノンとの親和性が低下し、電子伝達系からの電子漏出が活性酸素過剰発生の原因となっていることが確認された。また、*In vivo* での測定結果から、SDHC E69 細胞株において継代培養期間に応じてミトコンドリア内の活性酸素蓄積量が増加していることが確認された [14]。

### 5. 細胞内構成成分への酸化ストレス障害

SDHC E69 細胞株において蓄積が確認された活性酸素による細胞内構成成分への酸化ストレス障害を確認するために、DNPH 抗体をもちいたカルボニル化蛋白質量の測定をおこなった。その結果、野生株と比べ、SDHC E69 細胞株においてミトコンドリア内の活性酸素蓄積量に応じたカルボニル化蛋白質の蓄積が認められた [14]。また、DNA への酸化ストレス障害の指標である 8-OHdG の蓄積量を、FITC 標識された 8-OHdG 抗体を用いた直接蛍光抗体法により測定した結果、SDHC E69 細胞株において野生株と比べ約 2 倍の増加が確認された [14]。8-OHdG は DNA に突然変異を生じさせることから、6-チオグアニン (6-TG) 耐性試験による染色体 DNA 上の変異誘発の有無の確認を行った [6-TG は hypoxanthine phosphoribosyl transferase (hprt) により代謝され細胞内毒素として細胞を致死に陥れる]。その結果、3ヶ月間培養の SDHC E69 細胞株は野生型や 1ヶ月間培養の SDHC E69 細胞株と比べ約 2 倍の耐性を示し、高頻度に DNA 上に変異が生じていることが確認された [14]。さらに、2% 生存下の 6-TG 濃度の培地中において、3ヶ月間培養の SDHC E69 細胞株のみが多くのコロニーを形成した [14]。この結果は、hprt 遺伝子を含む染色体 DNA 上で高頻度に継続的な変異誘発が生じていることを裏付けている。

### 6. 細胞形態および細胞増殖能の変化

野生株は 3ヶ月間の培養を継続しても、方錐状を維持した線維芽細胞様および単層培養形態を維持していた。一方、樹立後 1ヶ月間培養を継続した SDHC E69 細胞株では接着阻止現象の消失やアポトーシス小体様の多くの小顆粒が確認された (図 2 A)。また、コロニー形成時にはその中央部に細胞死によるものと示唆される空間が生じていた [14]。興味深いことに、樹立後凍結保存した SDHC E69 細胞株では、再度培養を開始した約 2 週以降から同様の表現型が確認された。この結果は、これらの表現型が細胞内に蓄積された活性酸素に起因していることを示唆する結果である。さらに、3ヶ月間培養後の

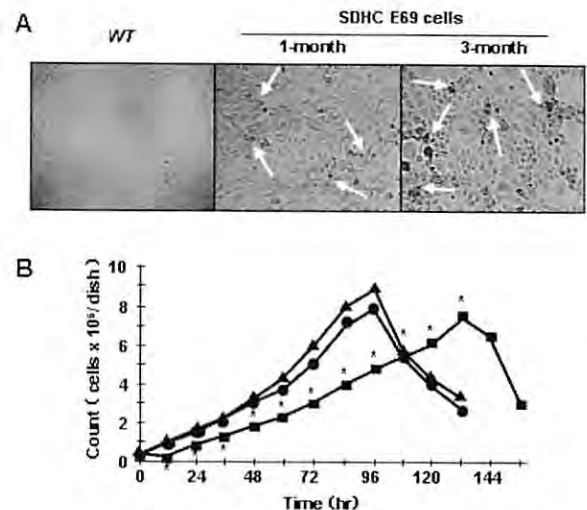


図 2 細胞形態および細胞増殖能の変化 (論文14より改変)

A. 3ヶ月間の継代培養をおこなった野生株 NIH3T3 細胞、1ヶ月間および3ヶ月間の継代培養をおこなった SDHC E69 細胞株での形態観察をおこなった。WT: 野生株、SDHC E69 cells: SDHC E69 細胞株、白矢印: アポトーシス様小顆粒。(original magnification: 100X) B. 形態観察同様の細胞株での細胞増殖能の測定をおこなった。野生株 NIH3T3 細胞 (●)、1ヶ月間継代培養をおこなった SDHC E69 細胞株 (■)、3ヶ月間継代培養をおこなった SDHC E69 細胞株 (▲)。\* p<0.01

SDHC E69 細胞株では接着阻止現象の消失やアポトーシス小体様の多くの小顆粒出現に加え、細胞形態が方錐状から平滑状の円状形態へと変化し、重層培養形態が確認された (図 2 A)。

1ヶ月間培養の SDHC E69 細胞株では、細胞増殖速度を示す倍加時間が野生株のものに比べ 1.5 から 2 倍に延長していた (図 2 B)。一方、興味深いことに 3ヶ月間培養をおこなった SDHC E69 細胞株の倍加時間は野生株のものと同様にまで回復しており (図 2 B)、細胞の形態変化に伴う細胞増殖能の有意な変化が観察された。以上の解析結果から、SDHC E69 細胞株はアポトーシスを誘導し、さらに、3ヶ月間培養の SDHC E69 細胞株では形質転換が生じたものと示唆された。

### 7. SDHC E69細胞株におけるアポトーシス誘導

電子顕微鏡によるミトコンドリア構造の観察から、SDHC E69 細胞株において、クリステの消失や膨潤化、膨大化が確認された [14]。膨大化は、おそらく野生型 SDHC や変異型 SDHC V69E を含んだミトコンドリアが正常な機能を維持するために増殖や融合を繰り返した結果であると示唆された。さらに、JC-1 化学蛍光試薬による解析から、SDHC E69 細胞株においてミトコンドリア膜電位およびミトコンドリア膜脂質量の低下が確認された [14]。ミトコンドリアの膨潤化や膜電位の低下はアポトーシスを誘導する前初期の表現型として知られている [15]。そこで、アポトーシス誘導の指標となるカスパー 3 の活性を測定した結果、SDHC E69 細胞株において野生株と比較し 1.6 倍から 1.8 倍の上昇が認められた [14]。また同時に、DNA 断片化も亢進していた

[14]。以上の結果から、SDHC E69 細胞株のアポトーシス小体様の顆粒出現は、ミトコンドリアの形態異常および膜電位低下により誘導されたアポトーシスによるものと結論付けられた。

## 8. 造腫瘍性細胞への形質転換

形質転換による造腫瘍性の確認をおこなうため、ヌードマウスへの皮下移植実験をおこなった。その結果、1ヶ月間の培養をおこなったSDHC E69 細胞株は野生株と比べ早期に消失することが確認された[14]。この結果は、1ヶ月間培養のSDHC E69 細胞株がアポトーシスを誘導していたことを裏付ける結果であり、移植後隣接した組織細胞の貪食を受けたことを示唆している。一方、3ヶ月間の培養をおこない形質転換を生じたと示唆されたSDHC E69 細胞株では造腫瘍性が確認された[14]。形質転換後の細胞では足場非依存的な増殖が可能になることが知られている。そこで、軟寒天培養法により足場費依存性増殖の確認と1ヶ月の培養の間に生じる形質転換効率を測定した。その結果、3ヶ月間培養のSDHC E69 細胞株で足場費依存性の増殖が確認された[14]。また、1ヶ月間培養のSDHC E69 細胞株の形質転換効率は $5 \times 10^{-4}$  cells、3ヶ月間培養のもので $5 \times 10^{-3}$  cellsであった[14]。野生株のNIH3T3細胞株の形質転換効率は $1 \times 10^{-6}$  cellsであると報告されていることから、SDHC E69 細胞株の形質転換効率は、継代培養ごとに蓄積する活性酸素量に伴い、野生株に比べ約100から1000倍へと増加することが確認された[14]。

さらに、ヌードマウス皮下において造腫瘍性を示した組織の観察をおこなった。その結果、野生株の中で自然突然変異によって形質転換した細胞は移植定着後肥大化することが確認された。しかし、ミトコンドリアからの酸化ストレスにより形質転換した3ヶ月間培養のSDHC E69 細胞株は移植定着後の肥大化は確認されず、良性腫瘍の表現型が確認された。この結果は、複合体IIのSDHCやSDHD遺伝子の変異が家族性の傍神経節腫(パラガングリオーマ)などの腫瘍形成の原因になるといった報告[16]を支持する結果となった。

## 9. まとめ

今回、我々はミトコンドリア電子伝達系複合体IIのSDHCサブユニットにアミノ酸点変異(SDHC V69E)を挿入することで、SDHCサブユニットとユビキノンの親和性の低下、および求核性を示すセリン残基の機能障害が生じ、電子伝達系から電子を漏出するSDHC E69細胞株を樹立することに成功した。この細胞株では漏出した電子が近傍の酸素と反応することにより活性酸素を過剰発生することを明らかにした。この結果は、SDHC V69Eアミノ酸点変異を有するモデル動物は、生体内環境に、より近い状態で細胞内酸化ストレスを負荷することを遺伝になることを証明した。今回の細胞株の表現型解析の結果は、ミトコンドリアから生じる過剰な活性酸素による細胞内酸化ストレスは細胞増殖能の低下を招き、その後、正常細胞株と比べ高頻度に形質転換を

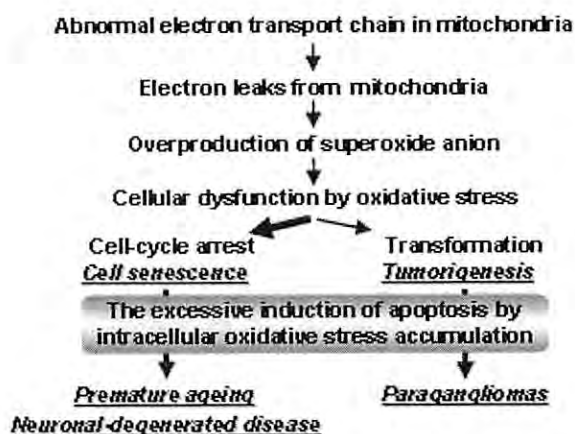


図3 SDHC E69細胞株における過剰なアポトーシス誘導と形質転換の経緯

生じ、強度の酸化ストレス下においても細胞増殖能は正常細胞にまで回復することを明らかにした(図3)。これは、形質転換後の細胞においてミトコンドリアから生じる活性酸素が細胞増殖能を活性化するシグナル伝達系、あるいは酸化ストレスに耐性能力を示すシグナル伝達系が活性化されていることを示唆するものである。今後、正常細胞と形質転換細胞とを明確に区別し、活性酸素により活性化されるシグナル伝達経路の詳細な解析がおこなわれ、それぞれの細胞におけるミトコンドリアからの酸化ストレスの影響が明らかにされることが期待される。また、今回もちいた細胞株での過剰なアポトーシスの誘導は活性酸素の蓄積量とともに増加していることが確認され、興味深いことに、形質転換後の細胞株においてアポトーシス誘導がより強く誘起されることが明らかになった。癌細胞はアポトーシス誘導が抑制されているといった認識が強いが、今回の細胞株では正常細胞以上にアポトーシス誘導の増強が確認された。これにより、形質転換後の細胞は、良性腫瘍の形質を維持しているものと示唆されたが、今後のシグナル伝達系の解析およびミトコンドリアからの活性酸素発生にともなう形質転換のメカニズムがより詳細に解析されることで、この表現型の特性をより明確に捉えることが期待される。ミトコンドリアから過剰発生した活性酸素によるアポトーシス誘導の増強は、細胞周期が停滞した正常細胞において細胞数の低下を著しく促進させ、形質転換後の細胞株においては細胞増殖能を抑圧しているものと考えられた(図3)。これらの結果を生体において考察すると、ミトコンドリアからの過剰な活性酸素発生は大部分の細胞において細胞周期の停滞あるいは細胞増殖能の停滞を引き起こし、細胞老化すなわち個体の老化を導くものと考えられ、一部の細胞で形質転換を生じるものと考えられた(図3)。さらに、これらの表現型を生じるなかで、細胞内に蓄積された酸化ストレスは過剰なアポトーシス誘導を実行し細胞数の低下を導き、その影響は正常な組織器官においては急激な臓器萎縮を引き起こし様々な疾患の原因となり、癌組織においては細胞増殖の抑制に効果を示し、その癌組織に良性腫瘍の特性を保持させているものと考え

られた (図3)。

また、*C. elegans*, *mev-1* 変異体では早老や神経変性疾患などの老人性疾患の原因となるエネルギー代謝異常や過剰なアポトーシス誘導が確認されていたが、今回哺乳動物細胞の SDHC E69 細胞株をもちいた解析結果からは *C. elegans*, *mev-1* 変異体同様の表現型に加え、新たに発癌の経緯が確認された。このように、ミトコンドリアから過剰に生じる活性酸素の影響が *C. elegans* と哺乳動物細胞で異なった理由は、*C. elegans* の生活環を理解することで考察できる。*C. elegans* は雌雄同体で孵化直後、558 個の体細胞からなり、幼虫期とよばれる細胞分裂による成長期間を経て成虫になると 959 個の決められた細胞数からなる。さらに、成虫では生殖幹細胞のみが細胞分裂することが知られている。このことから、*C. elegans* では細胞分裂を繰り返し無限増殖するといった形態転換の現象は表現型として生じないものと考えられた。

最後に、今回の研究成果から、SDHC V69E 変異を適用した哺乳動物におけるモデル動物が、個体老化を導く細胞老化の原因となる細胞周期の停滞、神経変性疾患などの老人性疾患の原因となる過剰なアポトーシス誘導や発癌過程におけるミトコンドリア酸化ストレスの関与を明らかにするためのモデル動物となることが明らかにされた。

#### References

1. Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci.* 25:502-8, 2000.
2. Yankovskaya V, Horsefield R, Tornroth S, et al. Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science* 299:700-4, 2003.
3. Tohyama Y, Takano T and Yamamura H. B cell responses to oxidative stress. *Curr Pharm Des.* 10:835-9, 2004.
4. Hongpaisan J, Winters CA and Andrews SB. Strong calcium entry activates mitochondrial superoxide generation, upregulating kinase signaling in hippocampal neurons. *J Neurosci.* 24:10878-87, 2004.
5. Jacobson MD. Reactive oxygen species and programmed cell death. *Trends Biochem Sci* 21:83-6, 1996.
6. Robberecht W. Oxidative stress in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol.* 247 Suppl 1:11-6, 2000.
7. Kovacic P, Jacintho JD. Mechanisms of carcinogenesis: focus on oxidative stress and electron transfer. *Curr Med Chem* 8:773-96, 2001
8. Ishii N, Fujii M, Hartman PS, et al. A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and aging in nematodes. *Nature* 394:694-7, 1998.
9. Senoo-Matsuda N, Yasuda K, Tsuda M, et al. A defect in the cytochrome b large subunit in complex II causes both superoxide anion overproduction and abnormal energy metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 276:41553-8, 2001.
10. Ishii N, Takahashi K, Tomita S, et al. A methyl viologen-sensitive mutant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mutat Res* 237:165-71, 1990.
11. Honda S, Ishii N, Suzuki K, et al. Oxygen-dependent perturbation of life span and aging rate in the nematode. *J Gerontol* 48:B57-61, 1993.
12. Hosokawa H, Ishii N, Ishida H, et al. Rapid accumulation of fluorescent material with aging in an oxygen-sensitive mutant *mev-1* of *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev* 74:161-70, 1994.
13. Senoo-Matsuda N, Hartman PS, Akatsuka A, et al. A complex II defect affects mitochondrial structure, leading to *ced-3* and *ced-4*-dependent apoptosis and aging. *J Biol Chem* 278:22031-6, 2003.
14. Ishii T, Yasuda K, Akatsuka A, et al. A mutation in the SDHC gene of Complex II increases oxidative stress, resulting in apoptosis and tumorigenesis. *Cancer Res* 65:203-9, 2005.
15. Mignotte B and Vayssiere JL. Mitochondria and apoptosis. *Eur J Biochem* 252:1-15, 1998.
16. Niemann S and Muller U. Mutations in *SDHC* cause autosomal dominant paraganglioma, type 3. *Nature genet* 26:268-70, 2000.

Influence of superoxide anion overproduced from mitochondria on cellular senescence and transformation —to mammalian cells from *C. elegans*—

Takamasa Ishii<sup>1)</sup>, Kayo Yasuda<sup>1)</sup>, Akira Akatsuka<sup>2)</sup>, Okio Hino<sup>3)</sup>, Philip S. Hartman<sup>4)</sup> and Naoaki Ishii<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Molecular Life Science, Tokai University School of Medicine, Bohseidai, Isehara, Kanagawa 259-1193, Japan

<sup>2)</sup> Teaching and research support center, Tokai University School of Medicine, Bohseidai, Isehara, Kanagawa 259-1193, Japan

<sup>3)</sup> Department of Pathology, Juntendo University School of Medicine, 2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421, Japan

<sup>4)</sup> Department of Biology, Texas Christian University, Fort Worth, Texas 76129, U.S.A.

Summary

Major endogenous reactive oxygen species (ROS) are generated from electron leakage during cellular respiration. Excessive ROS production from mitochondria can lead to apoptosis and tumorigenesis. One approach to study this problem involves the use of chemicals that either generate ROS themselves or act to uncouple the electron transport chain such that ROS are generated endogenously. While providing much valuable information, this approach suffers from the fact that these chemicals often result in acute toxicity as opposed to the more chronic, low-level ROS generation that characterizes all aerobic organisms. The *mev-1* mutant of the nematode *Caenorhabditis elegans* is mutated in the SDHC subunit of complex II and produces excessive superoxide anion in its mitochondria. This mutant has proven extremely useful for the study of endogenous oxidative stress and its effects on lifespan, apoptosis and mutagenesis. We have recently generated a transgenic mouse cell line (SDHC E69 cells) with a mutation that mimics *mev-1*. As in *C. elegans*, excess ROS were generated, which led to supernumerary apoptosis and hypermutability. Interestingly, the cells that escaped from apoptosis resulted in frequent tumors when injected into the epithelium of mice. It has been reported that mutations in the *SDHC* or *SDHD* gene of mitochondrial complex II cause some non-chromaffin and hereditary paragangliomas (PGLs) in humans. Therefore, further analysis of SDHC E69 cells may help clarify the molecular mechanism of the tumorigenesis such as PGLs.

Key words: superoxide anion, mitochondria, oxidative stress, aging, tumor

## 【トピックス】

### 老化のプロテオミクス

#### —プロテオーム解析の切り口から見えてくるもの—

戸田年総

東京都老人総合研究所 老化ゲノムバイオマーカー研究チーム

はじめに

近年さまざまな生命科学研究において、genomics や transcriptomics, proteomics, glycomics, metabolomics などのいわゆる『-omics』研究が盛んに行われているが、『-omics』研究は基礎老化研究においても有効なアプローチになり得るのであろうか。特に老化のプロテオーム解析について、その切り口から見えてくるものを考えてみたい。

#### 1. ヒトゲノムプロジェクトの終了と『-omics』時代の到来

ヒトゲノム計画の成果により、ヒトの生命は2万~2万5千の遺伝子によってコードされていることが明らかとなった[1]。この中から、分化細胞においては約10%ほどの遺伝子がタンパク質に転写翻訳され、細胞の形態形成や生命維持、および分化機能の発現に寄与していると推定されている。プロテオーム[2]は、このように実際に発現しているタンパク質の集合体として「ひとまとめ」にしたものであり、プロテオームこそが細胞の形態や機能を直接支配している物質的実体である。プロテオミクスは、このようなプロテオームを網羅的に研究することによって生命の仕組みを明らかにしようというアプローチであるが、その後この動きはRNAや糖鎖、代謝物にまで及び、様々な-omics研究が行われるようになった。

#### 2. 基礎老化研究におけるプロテオミクス

プロテオーム研究がスタートしたのは1995年であるが、老化研究で利用されるようになるのは2000年頃からである。2000年に発表された老化のプロテオーム解析に関する論文はわずか8件であったが、その年、我々は老化研究におけるプロテオーム解析の重要性を主張し[3]、マウスの脳の老化に伴うタンパク質の発現変化をプロテオーム解析して、Electrophoresisに発表した[4]。その後、老化のプロテオーム解析に関する論文数は年々増え続け、本年9月末の時点で老化と関連が深い酸化ストレスに関する論文を含めると597件が報告されている。

老化の原因について様々な作業仮説が提唱されてきたが、細胞が好氣的エネルギー代謝を行っている以上必ず発生する酸化ストレスが老化を促進し、老化に伴う様々な細胞傷害の根本的な原因の一つとなっていることは、もはや否定のできない事実である。しかし、酸化ストレスがもたらす機能攪乱の分子メカニズムについては、あまりよくわかっていない。直接の影響としては脂質の過

酸化やDNAのダメージ、タンパク質の酸化的修飾の3つが考えられるが、近年のプロテオミクスの技術的進歩によって、タンパク質の酸化的修飾の関与が次第に明らかになってきている。

#### 3. 老化のプロテオミクスで見えてくるもの

二次元電気泳動法に基づいたディファレンシャルプロテオミクスには、タンパク質の発現変化のみならず、翻訳後修飾などの構造変化も捉えることもできるという利点がある[5]。実際我々が行ったマウス海馬の加齢変化に関するプロテオーム解析[6]でも、Calmidulin (CaM)、Ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 (UCH-L1)、およびnm23-M1 (NDPK  $\beta$ )の発現レベルが老齢マウスで低下する傾向が認められたが、さらに質量分析による詳細な構造解析を行った結果、C末端側のCa<sup>2+</sup>結合ドメインに位置する2箇所のメチオニンが選択的に酸化されること、および高齢マウスでは酸化型が増加していることがわかった。その後Anbanandam博士らの研究によって[7,8]、酸化型のCaMは細胞膜上のCa(2+)-ATPase (PMCA)や種々の標的タンパク質に結合し、細胞の代謝を抑制することが報告され、CaM酸化の生理的意義が次第に明らかになってきている。さらに我々は、CaM本来の機能であるカルシウムシグナリングにも酸化の影響が及ぶのではないかと考え、タンパク質相互作用解析装置AnaLight Bio200を用いて解析を行った結果、酸化CaMはCa<sup>2+</sup>親和性が低いことが明らかとなった(投稿準備中)。この結果は、酸化ストレスはCaMの酸化を介してCaM kinase IIの下流の細胞内シグナル伝達にも影響を及ぼすことを示しており、大変興味深い。

プロテオミクスが酸化ストレス応答のメカニズムの解明に大きな貢献を果たした、もう一つの重要な研究は、抗酸化酵素Peroxiredoxin (Prx)に関するものである。今後の老化制御研究において重要な標的タンパク質の一つになるものと思われるので少し詳しく紹介する。

Prxは、哺乳動物では少なくとも6種類のアイソフォームとして発現されていることがわかっている(図1)、そのうちPrx I, II, III および IV (2-Cys型Prx)は活性に直接関わる2つのCysを持っている。Prx V (atypical 2-Cys型Trx)も活性に関与する2つのCysを有しているが、上記4種との配列相同性が低い。これに対しPrx VI (1-Cys型Prx)はN末端側のCysのみが活性に関わっており反応のメカニズムが若干異なると考えられている。





- sional electrophoresis profiles of tissue proteins during the course of aging. *Electrophoresis*. 21:1853-1871, 2000.
5. Godovac-Zimmermann J, Soskic V, Poznanovic S, et al. Functional proteomics of signal transduction by membrane receptors. *Electrophoresis*. 20:952-961. 1999.
  6. Toda T, Morimasa T, Kobayashi S, et al., Proteomic approach to determination of the significance of protein oxidation in the ageing of mouse hippocampus. *Applied Genomics and Proteomics* 2: 43-50, 2003.
  7. Bartlett RK, Bieber Urbauer RJ, et al. Oxidation of Met144 and Met145 in calmodulin blocks calmodulin dependent activation of the plasma membrane Ca-ATPase. *Biochemistry* 42:3231-3238, 2003.
  8. Anbanandam A, Bieber Urbauer RJ, et al. Mediating molecular recognition by methionine oxidation: conformational switching by oxidation of methionine in the carboxyl-terminal domain of calmodulin. *Biochemistry* 44:9486-9496, 2005.
  9. Kim K, Rhee SG, Stadtman ER. Nonenzymatic cleavage of proteins by reactive oxygen species generated by dithiothreitol and iron. *J Biol Chem*. 260:15394-15397, 1985.
  10. Kim K, Kim IH, Lee KY, et al. The isolation and purification of a specific "protector" protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O<sub>2</sub> mixed-function oxidation system. *J Biol Chem*. 263:4704-11, 1988.
  11. Rabilloud T, Heller M, Gasnier F, et al. Proteomics analysis of cellular response to oxidative stress. Evidence for in vivo overoxidation of peroxiredoxins at their active site. *J Biol Chem*. 277:19396-19401, 2002.
  12. Yang KS, Kang SW, Woo HA, et al. Inactivation of human peroxiredoxin I during catalysis as the result of the oxidation of the catalytic site cysteine to cysteine-sulfinic acid. *J Biol Chem*. 277:38029-38036. 2002.
  13. Biteau B, Labarre J and Toledano MB. ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature*. 425:980-984, 2003.
  14. Chang TS, Jeong W, Woo HA, et al. Characterization of mammalian sulfiredoxin and its reactivation of hyperoxidized peroxiredoxin through reduction of cysteine sulfinic acid in the active site to cysteine. *J Biol Chem*. 279:50994-51001, 2004.

## 【学会報告】

### 第18回国際老化学会参加記（リオデジャネイロ、ブラジル、2005年6月26日～30日）

下川 功

長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科（病理学／老化学）

リオデジャネイロに行くことを話すと、だれもが気をつけるようにと言う。アメリカ人でさえ、友人がトラブルにあったことを伝えてきた。

成田からアトランタ、サンパウロ経由でリオデジャネイロへ向かった。乗り換えのサンパウロの空港では緊張していた。自宅を出てから39時間後にリオデジャネイロ・ガレオン国際空港へ到着した。空港には、Emilio Jeckel-Neto 先生<sup>1)</sup>の大学院生である Lucas 君が迎えに来てくれていた。この後、リオデジャネイロ、ポルトアレグレ滞在中は、Lucas 君に大変お世話になった。おかげで、トラブルにあうことはなかったし、フェイジョアダ、シュハスコといったブラジル料理を堪能できた。

確かに、貧富の差は大きい。空港からホテルへ向かう途中には、世界最大のスラム街がある。その他にも、市内に“アブナソーナ”地域が点在している。昼間、車が信号で止まると、物売りがやってくるし、子供が物乞いにもくる。ホテルの前の海辺でも、カメラや財布は持ってでないように言われた。しかし、危険なことや場所をわかまえていれば、ブラジルは楽しいと思う。人々は様々なことにこだわりがなく、友好的である。

今回の学会では、私が参加するシンポジウムの日時について、事前に連絡はなかった。5月も中旬になり、さすがに飛行機などの予約が必要なので、学会の責任者のひとりである E. Moriguchi 先生へ e-mail を送った。すぐに返事をいただき、その日程をシンポジウムのオーガナイザーである McCarter 先生へ転送した。McCarter 先生から“You are the first to have this information”という返事がきた。

学会場で手に入れた全体のスケジュールはなんだか見難いし、抄録集は結局間に合わなかった。ある基礎老化学系のセッションでは、スピーカーがだれもこないのが自然にキャンセルになった。しかし、これまで行われた学会と比較して決して劣るとは思っていない。会場では、大学院生を含む多くの参加者が熱心に聞いている様子を感じられた。特に、老年社会学、老年医学の分野は活発であった。

森口幸雄先生<sup>2)</sup>とお会いした。先生は、老年医学の分野でご活躍であるが、私自身は全く面識がなかった。お父様が熊本のご出身であったこと、2年に一度墓参に天草を訪れる、その際、長崎に立ちよられることなどをうかがった。学会場では、南米の研究者が先生にご挨拶されるのを見うけた。20カ国ほどに100人以上の“お弟子

さん”がいるとのことであった。先生は南アメリカの老年医学の発展に尽くされている真の国際人であることを感じた。

基礎老化分野の発表では、アルゼンチンの Goya 先生の IGF-1 の遺伝子治療による脳機能の改善に関する研究（後藤佐多良先生が企画されたシンポジウム “Intervention of aging and age-related diseases” における発表）、視床下部、下垂体における遺伝子発現解析、ヒトに対するカロリー制限の試みなどいくつかの興味深い発表があった。

私が参加したカロリー制限に関するシンポジウムでは、テキサス大の Jim Nelson が CRH-KO マウスを用いてカロリー制限のメカニズムに関するかなり強力なデータを発表していた。また、同じくテキサス大の Walter Ward は得意の蛋白質のターンオーバーに関する現在の状況を示した。予定されていたもう一人の演者、スペインの G Barja は来なかった（ミトコンドリアの酸化ストレスについて聞いたかったのだが・・・）。

今回、基礎老化学会から参加したのは、後藤先生と私だけであったように思う。日本からは遠いし、費用もかかった。基礎老化学系の発表も少なかった。しかし、コルコバード（あのキリストの像が建っている有名な所）の山頂から眺めるリオデジャネイロの町と海辺、Lucas 君、森口先生、Roger McCarter, Jim Nelson, Walter Ward 先生たちとお会いできたこと、学会後、Emilio Jeckel-Neto 先生のお招きでポルトアレグレを訪問したことなど思い出深い学会となった。

次回は2009年、フランス、パリで開催予定です。

#### 脚注

1) 愛知医科大学の佐藤秩子先生のもとで博士課程を修了した後、故郷のポルトアレグレへもどり、現在、Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS) の Bioscience 学部長として活躍中である。ブラジルでは唯一、大学院の基礎老化学研究コースで学生を指導している。

2) PUCRS の老年医学研究所長として、現在も老年医学の講義や診療を行っておられる。ブラジルへ永住されて40年ほどになる。お嬢様のクリスティーナさんは Jeckel-Neto 先生の奥様である。つまり、森口先生は Jackel-Neto 先生のお義父様。

## 【学会報告】

### 11<sup>th</sup> Congress of the International Association of Biomedical Gerontology (IABG)参加記

日比陽子

国立長寿医療センター・老年病研究部

8月13日～8月16日の会期で11<sup>th</sup> Congress of the International Association of Biomedical Gerontology (IABG)が行われたのはデンマーク第2の都市オーフスである。コペンハーゲン空港で小さなプロペラ機に乗り換え、眼下にどこまでも続く広大な穀倉地帯を眺めること30分程でオーフス空港に到着した。飛行機を降りると雨天で風もあり肌寒かった。酷暑の名古屋からやって来たため大した防寒具を持っていなかった私は不安を覚えたのだが、この後は幸い好天に恵まれ大変爽やかで過ごしやすい日々であった。オーフスは港を持つ静かで美しい街である。会場であるUniversity of Aarhusは市街地から徒歩で30分程の所にある緑豊かな大学で、講堂の前には水鳥が集う池が有り市民の憩いの場となっていた。

Brian F.C. Clark (University of Aarhus, Denmark)の挨拶で幕を開けたCongressは、Lecture 31題(うち数題は発表中止)とPosterの中から選ばれた17題が口頭発表され、Posterは75題であった。内容は多種多様であったが、その中から、酸化ストレスと老化の関わり、それに対するDNAの修復機構および傷付いた組織の再生に関わる報告を紹介しようと思う。

フリーラジカルによる老化の研究の大家であるDenham Harman (University of Nebraska Medical Center, USA)は、非常な高齢であるにも関わらずお元気で講演をこなされ、自ら長寿を体現されていると感動を覚えた。また、Keshav Singh (Roswell Park Cancer Institute, USA)はミトコンドリアの異常から核DNAの不安定化が起こり老化や癌化に進むことについて述べた。一方、Li Li Ji (University of Wisconsin, USA)はエクセサイズによって発生する酸化ストレスが骨格筋に酸化的ダメージに対する抵抗性を獲得させる機構について講演し、Anthony W. Linnane (Centre for Molecular Biology & Medicine, Australia)がシグナル伝達物質としてスーパーオキシドラジカルが転写や酵素活性を制御し健康的な細胞老化に必要なことを述べるなど、酸化ストレスはただ悪役であるわけではなく細胞機能の活性化や維持に必要なのだとい

う考えが示された。

DNAの修復に関しては、Vilhelm A Bohr (NIH, USA)がDNA修復におけるWRNの機能について、Ian D. Hickson (University of Oxford, UK)はhelicaseであるBLMの機能部位の解析について述べた。またHans E. Krokan (Norwegian University of Science and Technology, Norway)は免疫細胞におけるUNGの役割について報告した。

組織修復に関わる幹細胞(stem cell)関係の演題も数題あった。Moustapha Kassem (University Hospital of Odense, Denmark)は胎児と大人のstem cellの差異について、またGuenter Lepperdinger (Austrian Academy of Sciences, Austria)は老化によるmesenchymal stem cell周辺の環境の変化について報告した。今後、老化による組織機能低下の遅延や、失われた組織機能の復活を行うための具体的な治療技術として再生医療は現実的で重要なものである。

食事はバイキング形式で、魚介にサラダやチーズなど美味しい料理を食べながら、同じテーブルについた人々と交流するのも楽しみである。思いがけずお互いの研究内容が近かったり、興味のある内容について詳しい人だったりとお会いを楽しんだ。最後の夜はデンマーク最高峰(海拔四百数十メートルであるが)の山上にある、海に見えるVarna Palaceでのディナーであった。

本学会の内容は分子から個体、社会的な領域まで幅広く、分子生物学系の学会に参加することが多い私にとって、自分の研究がどこに位置しているのか大きな視点で考える刺激となった。私が研究してきた転写因子FOXOは酸化ストレスによって活性化され、細胞のストレス抵抗性の獲得やDNA修復および組織の分化抑制に関与することから、外来のストレスに対抗して生体が自らを守るという部分に役割を持つ因子であると考えている。このように、様々な分野の研究が「老化」のテーマのもとに集まり討論を行うことは、それぞれの研究がどのような位置関係に在るのかをとらえ直し、何が求められてなにを目指すべきなのか見つめる良い機会であると思う。

## 【人物紹介】

### 名誉会員、Byung-Pal Yu先生のプロフィール

下川 功

長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科（病理学／老化学）

6月17日、学会総会においてByung-Pal Yu先生（テキサス大学サンアントニオ校ヘルスサイエンスセンター名誉教授）が名誉会員に推薦され、Yu先生はそれをお受けになられた。総会では、本学会会員ばかりではなく、Sang Chul Park先生を含む韓国老化学会の方々も同席され、なごやかな雰囲気の中で後藤先生より名誉会員記の授与が行われた。外国人名誉会員としては、D. Harman先生に続きお二人目である。

Yu先生は1960年、Central Missouri State University Warrenburg校をご卒業後、1965年、University of Illinois Urbana校にて博士課程を修了された。その後、Pennsylvania女子医科大学の助手、講師、Pennsylvania医科大学助教授を経て、1973年テキサス大学サンアントニオ校へ移られた。

テキサス大学では、E. J. Masoro, H. A. Bertrand先生らとともに老化、特にカロリー制限の効果やそのメカニズムに関する研究を始め、1980年、90年代の米国老化研究をリードされた。カロリー制限による細胞膜脂質の変化、酸化ストレスとその防御機構について研究を行ない、1992年には、当時、注目を集めていた酸化ストレスとグリケーション／メイラード反応による細胞傷害機構を統一的な概念にまとめた“フリーラジカルとメイラード反応による協調的な老化誘導”仮説を発表された（Kristal, B. S. & Yu, B. P., J Gerontol: Biol Sci 1992）。

一方、F344ラットの生理学的、病理学的特徴を広範囲に観察し、老化研究モデルとして確立された。この研究には、世界的に数少ない、科学的な意味における老化研究モデルに対するcriticismがあった。

1992年からテキサス大老化研究グループのディレクターとして、カロリー制限による抗老化機構について、エネルギー代謝、運動、神経内分泌、レドックス制御などの研究を統括された。1998年には、その国際的な研

究業績に対して、Ho-Am Prize（韓国のノーベル賞とも言われている権威のある賞）が授与された。

Yu先生の最も大きなご功績の一つは、1980年代から東アジアの若手研究者をポスドクとしてテキサス大学に招き、東アジアの基礎老化研究者の育成に尽くされたことである。テキサス大学引退後も、韓国プサン大学薬学部の老化研究グループを中心に、日本や米国の研究グループとの交流を保ち、国際学会、シンポジウムにおける講演活動を通して、基礎老化研究の発展に尽くされている。

Yu先生はあまり過去のことをお話にならない。しかし、学童期、思春期を第二次世界大戦、朝鮮戦争の時期に過ごされたことを考えると、私達の想像を超える経験があったのだらうと思う。何かの折、「当時は研究を志しても、韓国には何もなく、米国へ渡るしかなかった」とおっしゃられたことがある。

1988年から90年まで、Yu先生のもとで研究していた時のことである。テクニシヤンの補助など人手のことで悩んでいると、研究グループの友人が「You should ask Dr Yu, he is fair」と言ったことを覚えている。研究内容が妥当であれば、何とかしてくれると言う意味であった。当時、サンアントニオの老化研究グループの中では、Masoro先生はアメリカ人に特有のジョークをとばし、表面的にきついことは言わなかった。Yu先生は逆に、ストレートに意見を述べておられた。時には、非常に陰しく感じることもあったが、“fair”という言葉が表すように、後でよく考えると何事にも理不尽なことはなかった。先の件では、（勇気をふるって？）Yu先生に事情を説明すると、あっさりと私の願い事を聞いてくださった。

Yu先生には、今後も国籍を越えてアジアの基礎老化研究の発展に尽くしていただきたい。私は、Yu先生のもとで基礎老化研究を志したこと、現在もご指導いただいていることを誇りに思っている。

【施設紹介】

信州大学・大学院・医学研究科 加齢適応医科学系専攻（独立専攻）の紹介

谷口俊一郎

信州大学 大学院医学研究科 加齢適応医科学系専攻 分子細胞学部門 分子腫瘍学分野

高齢化社会にあつて、疾病予防と健康づくりはますます重要となつてきている。このような時代の要請の中、時代に相応しい予防医学を教育研究目標とした加齢適応医科学系博士課程（独立専攻）が、前身医学部附属加齢適応研究センターの進化的改組によつて、平成15年度4月から信州大学大学院医学研究科（博士課程）に開設された。

本独立専攻は、信州大学教育学部や国立長寿医療研究センターなどからも、これら学問領域で最先端をゆく研究者の参画をえて、個性的かつ統合的な教育・研究組織が構成され、ポストゲノムシーケンス時代に相応しい予防医学の新領域を開拓するとともに、その実践を目指し活動を行っている。

私たちは加齢適応医科学について「生命の本質の一つは環境への適応能力であり、その能力を遺伝子（ゲノム）レベルから個体、社会レベルまで総合的に解析し、高齢者の疾病予防、健康づくりを目指す、学問領域である。」と定義した。また、この定義に基づき「ポストゲノムシーケンス時代において、ヒトの遺伝子情報をもとにして「何が健康によいのか」を明らかにし、積極的に身体を健康へ適応させていく処方の開発と応用を目指す」という理念を掲げて活動している。

この専攻は独立専攻であるから、全国で唯一であり、国内におけるその領域に対して責任を持って教育・研究を行う使命を担っている。なぜ、そのような加齢適応医

科学専攻が信州大学に設置されることとなつたのであろうか。その一般的そして特殊な理由は

①我が国の超高齢化社会を迎えたにもかかわらず、従来の医学教育や医学研究のほとんどは治療医学に関するもので、予防医学に関するものは非常に少なく、実験医学の関与は乏しい状況を是正する必要があつたこと；

②ゲノム医科学、分子生物学、スポーツ医学の進歩は、テーラーメイド型の予防医学を可能にしつつあること。その状況を鑑み、ポストゲノムシーケンス時代に相応しい学際的純粋学問を基礎とし、かつ、その成果を現場で実践して、その効果を研究内容にフィードバックするという、新しいタイプの予防医学分野を我が国で構築する必要があつたこと；

③長寿県としての長野県に在する信州大学医学部やこの専攻の前身である医学部附属加齢適応研究センターにおいて、上記の問題点に込える実績が蓄積されつつあつたこと。特に、スポーツ医学を中心とする、産官学の連携による健康増進事業としての松本市熟年体育大学の活動は、従来の治療医学の教育的実践の場が、病院であつたことに対応して、予防医学の教育的実践の場あるいは研究のフィードバックの場を提供するものとして、極めて大きな評価を受けたこと；

などである。このような新しい予防医学は進化途上であるため、一般専攻としてよりはむしろ、特化した独立専

表1：加齢適応医科学系専攻の組織構成と教育研究内容の概要

分子細胞学部門	教授名	教育・研究内容
・加齢生物学分野	樋口京一 京都大院卒（昭和59年）	加齢に伴う生命機能の変化とその分子機構についての教育・研究。
・神経可塑性学分野	鈴木龍雄 名市大学院卒（昭和58年）	シナプスの分子構築と脳の高次機能発現の基礎であるシナプス可塑性の分子機構についての教育・研究。
・分子腫瘍学分野	谷口俊一郎 九州大院卒（昭和55年）	癌形質発現の分子機構、診断・治療への応用についての教育・研究。
個体機能学部門		
・加齢病態制御学分野	橋爪潔志 信州大学卒（昭和48年）	加齢に伴って生じる諸疾患の病態解析と制御についての臨床学的教育・研究。
・代謝制御学分野	青山俊文 大阪大学院卒（昭和58年）	加齢に伴う肥満、糖尿病や動脈硬化などの分子病態解析と臨床応用についての教育・研究。
・スポーツ医科学分野	能勢 博 京都府立医科大学卒（昭和54年）	健康促進のため運動生理学やゲノム情報に基づいた個人々の運動処方箋作成を目指した教育・研究。
健康促進学部門		
・健康教育心理学分野（教育学部による協力分野）	守 一雄 筑波大院卒（昭和57年）	"からだ"と"こころ"の健康を促進する教育的、心理学的的方法についての教育・研究。
・老化制御学分野（長寿医療研究センターとの連携分野）	柳澤勝彦 新潟大卒（昭和55年） 池田恭治 東京大院卒（平成元年）	老化のジェネティックス、エピジェネティックス、特に脳疾患、骨代謝疾患に関する分子病態と治療についての教育・研究。

攻の組織形態で人材育成と研究活動がなされるべきと考えられた訳である。

教育目標は高齢化社会の予防医学に対応できる俯瞰的視野を持った教育・研究者や高度医療技術者のみならず、厚生行政や健康産業に携わる専門家を育成することであり、H17年度から、スポーツ医科学分野を中心に健康増進コーディネータ要請コース（修士課程）が開設されたことは付記すべきことである。

上記8分野に合計9名の教授が配属されているが、驚くべきことに全ての出身大学がそれぞれ異なり、一つとして重なっていないのである。このことは、私たちの教育・研究組織が一地域に閉ざされてものではないことを、象徴し物語っていると思う。

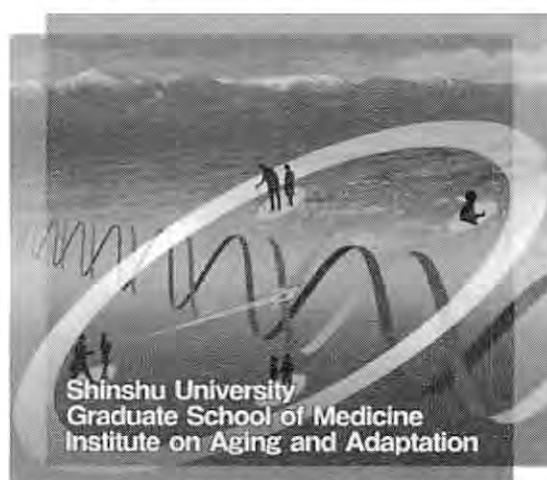
表に示したように、私達の基幹分野には、加齢生物学、神経可塑性学、分子腫瘍学、加齢病態制御学、代謝制御学、スポーツ医科学、また協力・連携分野として健康教育心理学（教育学部による協力分野）、老化制御学（長寿医療研究センターとの連携分野）があり、それぞれユニークな研究が進展している。特筆すべきこととして、基幹分野の大半そして信州大病院がスポーツ医科学分野の主催する健康増進事業に対し、協力・連携体制をとっていることである。具体的には、運動処方個別化、運動処方の効果判定のためにそれぞれの得意のフィールドの視点からジェネティックあるいはエピジェネティック研究を企画・推進し、一方先端予防センターが病院内に設置される予定である。医学部出身者のみならず、若いエネルギーに満ちた多様で多数の大学院生が信州の豊かな自然環境を満喫しつつ、それぞれのユニークな基礎研究

や予防医学の新規プロジェクトに参画し次世代の教育・研究を担うべく奮闘されんことを願っている。

私達のホームページ (<http://www.md.shinshu-u.ac.jp/karei/index.html>) の表紙 (図) は ポストゲノムシークエンス時代に相応しい、加齢適応医科学の教育・研究を自然に恵まれたアルプスの地で展開することをイメージしたものである。現在、私達の任務を遂行すべく奮闘努力しているが、皆様のご鞭撻とさらなるご支援、特に学生さんや若い方々を送り込んで頂くようお願い申し上げる次第である。

図：加齢適応医科学系専攻のホームページ表紙

**未来の健康社会を築く生命科学**  
～分子と環境のクロストーク～



## 【お知らせ】

### 第29回日本基礎老化学会開催のご案内

以下の要領で、来年の日本基礎老化学会大会をおこないますので、会員の皆様には、万事お繰り合わせの上、ご参加  
いただくようお願い申し上げます。

#### 【第29回日本基礎老化学会大会】

大会会長 下川 功（長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科）

事務局長 樋上賀一（長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科）

プログラム委員長 千葉 卓哉（長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科）

日時：2006年6月15日（木）、16日（金）

会場：長崎大学医学部ポンベ会館、長崎大学医学部記念講堂

大会事務局 〒852-8523 長崎市坂本1-12-4

長崎大学医学部病理学第一

第29回日本基礎老化学会大会事務局

Tel: 095-849-7051 Fax: 095-849-7052

1. 一般口演、ポスター発表
2. パネルディスカッション：基礎老化研究の未来
3. シンポジウム I：「ほ乳類におけるフォークヘッド型転写因子と sir2 ホモログに関する最近の話題」
4. シンポジウム II：「Calorie restriction: the current status」

#### 【一般演題募集について】

演題登録・抄録は昨年と同様に日本基礎老化学会のホームページ (<http://www.tmig.or.jp/jsbg/>) よりファイルをダウンロードして頂き、記入後、メールにより大会事務局 (XXX@YYY: アドレス未定) まで送信して頂きます。お送り頂いた抄録は、大会事務局のプログラム委員会におきまして審査させていただきます。一般口演 20 題、ポスター 40 題の採択を予定しております。演題募集は 2006 年 1 月 16 日より 3 月 31 日です。詳細が決まり次第、学会ホームページに掲載いたします。

#### 【参加費】

一般会員：8000 円

学生会員：5000 円

非会員：12000 円

懇親会費：2000 円（会場：旧香港上海銀行長崎支店記念館）



## 複写される方へ

本誌に掲載された著作物を複写されたい方は、日本複写権センターと包括複写許諾契約を締結されている企業の従業員以外は、著作権者から複写権等の委託を受けている次の団体から許諾を受けて下さい。尚、著作物の転載・翻訳のような複写以外許諾は、直接本会へご連絡下さい。

107-0052 東京都赤坂 9-6-41 乃木坂ビル 9F 学術著作権協会  
TEL: 03-3475-5618; FAX: 03-3475-5619; E-mail: kammori@msh.biglobe.ne.jp

## Notice about photocopying (In the USA)

In order to photocopy any work from this publication, you or your organization must obtain permission from the following organization which has been delegated for copyright for clearance by the copyright owner of this publication.

Copyright Clearance Center, Inc.  
222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923 USA  
TEL: 978-750-8400; FAX: 978-750-4744; www.copyright.com

## 基礎老化研究 第29巻 第4号

平成17年(2005)11月1日

発行者 日本基礎老化学会  
〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2  
東京都老人総合研究所内  
電話 03-3964-3241

編集 編集委員会

印刷所 三陽工業株式会社