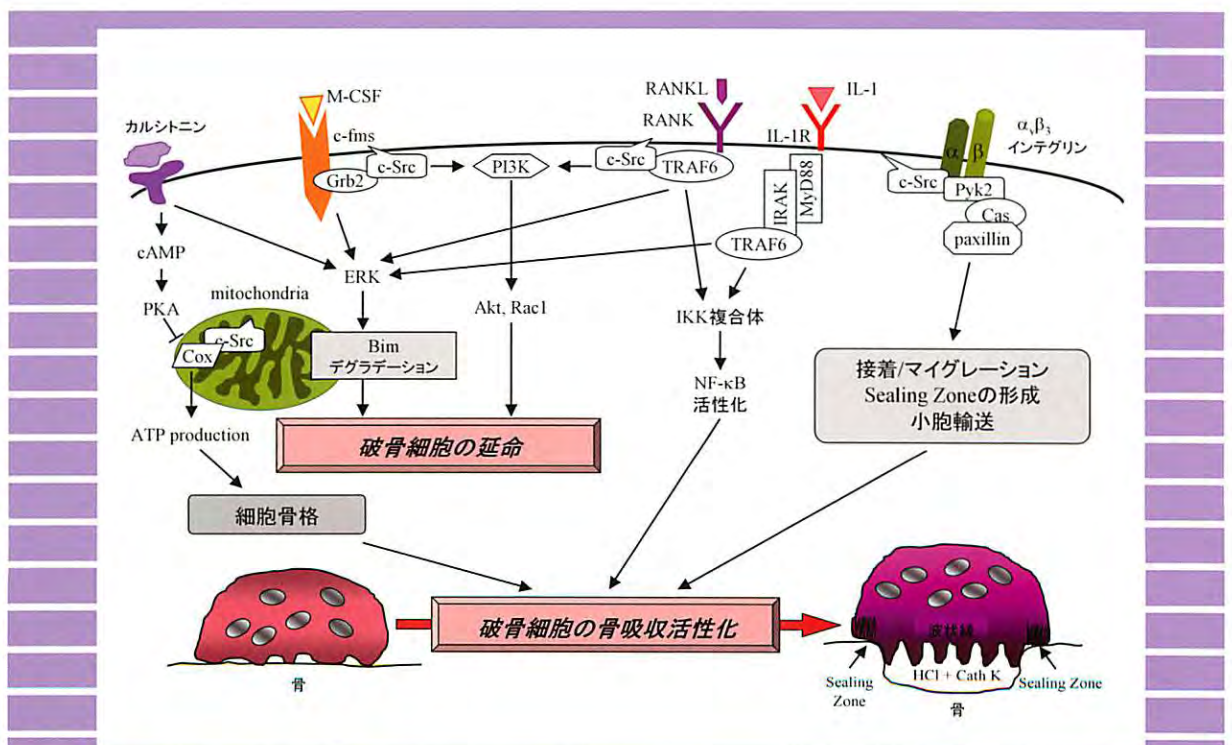


BIOMEDICAL GERONTOLOGY

基礎老化研究

- 総説 ■ アセチルコリンドーパミンバランス仮説の今日的展開
青崎敏彦、三浦正巳、増田正雄
- 総説 ■ 関節リウマチ骨破壊と破骨細胞の機能調節 宮崎 剛
- 総説 ■ 疾患プロテオミクス——質量分析計を用いた認知症の病態解析
渡邊 淳
- 随筆 ● 老化研究事始め——アンチエイジングの行方 三井洋司
- お知らせ ● 第31回日本基礎老化学会大会開催のご案内 樋口京一
- 附 ● 基礎老化学会サーキュラー 第77号



- 編集委員会委員長： 白澤卓二 順天堂大学大学院医学研究科 寄付講座加齢制御医学講座
〒113-8421 文京区本郷2-1-1
- 編集委員会幹事： 内田洋子 東京都老人総合研究所 老年病のゲノム解析チーム
〒173-0015 板橋区栄町3-5-2
- 編集委員会委員： 後藤佐多良 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
〒173-0015 板橋区栄町3-5-2
- 丸山和佳子 国立長寿医療センター 老年病研究部
〒474-8511 大府市森岡町源吾3-6-2
- 田中雅嗣 東京都老人総合研究所 健康長寿ゲノム探索チーム
〒173-0015 板橋区栄町3-5-2
- 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
〒173-0015 板橋区栄町3-5-2
- 堀田晴美 東京都老人総合研究所 老化ゲノム機能研究チーム
〒173-0015 板橋区栄町3-5-2
- 五味不二也 東京都老人総合研究所 老年病のゲノム解析チーム
〒173-0015 板橋区栄町3-5-2
-

- Editor-in-Chief: Takuji Shirasawa, Department of Ageing Control, Graduate School of Medicine, Juntendo University, 2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421, JAPAN
- Managing Editor: Yoko Uchida, Research Team for Geriatric Disorders, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, JAPAN
- Editors: Sataro Goto, Research Team for Molecular Biomarkers, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, JAPAN
- Wakako Maruyama, Department of Geriatric Research, National Center for Geriatrics and Gerontology, 36-2 Gengo, Morioka-cho, Obu City, Aichi 474-8511, JAPAN
- Masashi Tanaka, Research Team for Longevity and Health, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, JAPAN
- Toshifusa Toda, Research Team for Molecular Biomarkers, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, JAPAN
- Harumi Hotta, Research Team for Functional Genomics, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, JAPAN
- Fujiya Gomi, Research Team for Geriatric Disorders, 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)、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、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年経過した総説は公開される。
5. 総説、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)、CDディスクに記録したものとする。図・表および写真は、EPS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)あるいはAdobe Acrobatで作製したPDFファイル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。
専門用語: 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, 田久保海巻 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. トピックス 最近の話題性のある研究及び最近行った自身の研究の紹介。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。
 4. 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。
 5. 書評 最近出版された書籍の紹介。1,600字以内。
 6. 随筆 長さは刷り上がり2頁 (3,200字) 以内。
 7. その他
 8. 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: 白澤卓二 (sirasawa@sirasawa-alc.net)
または、編集幹事: 内田洋子 (bgo6yu@tmig.or.jp)

目 次

総説

アセチルコリンドーパミンバランス仮説の今日的展開

青崎敏彦、三浦正巳、増田正雄……………1-7

総説

関節リウマチ骨破壊と破骨細胞の機能調節 宮崎 剛……………9-14

総説

疾患プロテオミクス——質量分析計を用いた認知症の病態解析 渡邊 淳……………15-18

随筆

老化研究事始め——アンチエイジングの行方 三井洋司……………19-20

お知らせ

第31回日本基礎老化学会大会開催のご案内 樋口 京一……………21

附

基礎老化学会サーキュラー 第77号

CONTENTS

<REVIEW>

Acetylcholine-dopamine balance hypothesis: an update

Toshihiko Aosaki, Masami Miura, Masao Masuda……………1-7

<REVIEW>

The molecular mechanism of bone and joint destruction in rheumatoid arthritis

Tsuyoshi Miyazaki……………9-14

<REVIEW>

Proteomic analysis of the dementia with mass spectrometry

Atsushi Watanab……………15-18

表紙：成熟破骨細胞機能を制御するシグナル伝達経路

詳しい説明は、11ページ（総説）を参照

目 次

総論

1987年10月1日現在までの研究動向

1-7 藤田 隆三、三浦 隆三、藤田 隆三

総論

8-14 藤田 隆三、三浦 隆三、藤田 隆三

総論

15-21 藤田 隆三、三浦 隆三、藤田 隆三

総論

22-28 藤田 隆三、三浦 隆三、藤田 隆三

総論

29 藤田 隆三、三浦 隆三、藤田 隆三

総論

1987年10月1日現在までの研究動向

CONTENTS

<REVIEW>

Acetylcholine-depleting disease: an update

1-7 Yoshiko Aoki, Masami Masuda

<REVIEW>

The molecular mechanism of bone and joint destruction in rheumatoid arthritis

8-14 Toshiaki Miyazaki

<REVIEW>

Proteomic analysis of the dementia with mass spectrometry

15-21 Aislinn Waters

編集：藤田隆三、三浦隆三、藤田隆三

発行：1987年10月1日

【総 説】

アセチルコリン・ドーパミンバランス仮説の今日的展開

青崎敏彦*, 三浦正巳, 増田正雄

東京都老人総合研究所 老化ゲノム機能研究チーム

要約

線条体におけるアセチルコリンとドーパミンの活動のバランスの破綻はさまざまな神経精神症状を惹き起こす。生理的には行動発現に際して入ってくる視床及び皮質線条体投射からの入力刺激は線条体コリナージックニューロンにスパイク発射のpause responseを惹き起こし、その投射領域にアセチルコリンの供給の停止とドーパミン放出の飛躍的な増加を来す。これによって起こる線条体投射ニューロンのシナプスの可塑的变化は行動に関連した皮質・視床入力とのS/N比の増大を招来することになる。バランスの破綻はどちらの方向においてもシナプスの可塑性を阻害する。パーキンソン病では更にドーパミン枯渇がムスカリン受容体を介したアセチルコリン放出の自己抑制を阻害するためアセチルコリンの過剰な放出を惹き起こし、その結果ムスカリン受容体刺激に感受性の高い線条体間接路の投射ニューロンに樹状突起上のスパインの脱落を惹き起こす。

キーワード：アセチルコリン、ドーパミン、パーキンソン病、大脳基底核

1. はじめに

アセチルコリン・ドーパミンバランス仮説は医学部の学生なら一度は必ず講義で両者が乗ったシーソーの図を見たことがあるのではないだろうか。これはアセチルコリンとドーパミンが線条体においては互いに拮抗、協力関係にあって、そのバランスが崩れるとさまざまな神経精神症状が出るというものである。その仮説の発端はパーキンソン病で、その昔パーキンソン病の名付け親のJean Martin Charcotがパーキンソン病患者のよだれにAtropa belladonnaが効果あることに気づいたことから、以後ドーパミンの低下したパーキンソン病において最初に確立した治療法がこの抗コリン剤であった。最近の総説によるとドーパミンに比してアセチルコリンが相対的に過剰な病態にはパーキンソン病、一部のジストニア(瀬川病)、逆の病態としてはハンチントン病、進行性核上性麻痺、遅発性ジスキネジアなどがある(図1)[1]。両者がバランス関係にあることは臨床的には日々実感できる揺るぎない事実であるように見えるのだが、そのメカニズムについては未だによくわかったとは言えない。本稿ではまず線条体におけるアセチルコリンとドーパミンの生理について概括し、次にパーキンソン病

を例にこのバランスが崩れたときどのような事態が起こるのか最近の研究のいくつかを紹介したい。

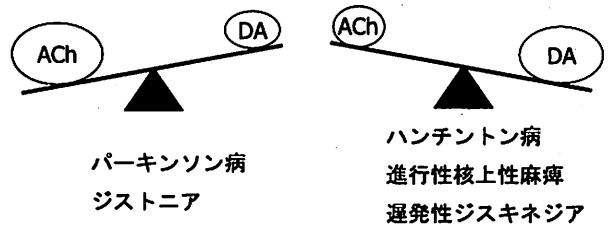


図1 アセチルコリン・ドーパミンバランス仮説と関係する神経疾患

2. アセチルコリンとドーパミンの解剖学的分布の特徴

中枢のコリナージックシステムにはアセチルコリンを放出する細胞がインターニューロンの場合と投射ニューロンの場合の二つに分類することができる。大脳皮質を含めた脳のほとんどの部位は後者で、ある場所に局在するコリナージックニューロンから投射を受けている。これに対し、線条体と側坐核および嗅結節の3つの核に限っては自前のコリナージックインターニューロンからアセチルコリンを受ける。中枢のドーパミンシステムの場合は線条体はDahlström & Fuxe (1964)の分類によるA8, A9, A10という場所のドーパミンニューロンから他の脳部位とは比較にならないほどの投射を濃密に受けていて、ドーパミン受容体も線条体にきわめて高濃度に分布している[2]。このような解剖学的な特徴はアセチルコリンとドーパミンが線条体において何か特別にユニークな仕事をしていることを暗示している。

連絡先：青崎敏彦

〒173-0015

東京都板橋区栄町35-2

東京都老人総合研究所 老化ゲノム機能研究チーム

TEL: 03-3964-3241 内線3081

FAX: 03-3579-4776

E-mail: aosaki@tmig.or.jp

3. 持続発火型ニューロンとドーパミンニューロンの学習応答

線条体のコリナージックインターニューロンはin vivoでは最初に持続発火型ニューロン (tonically active neuron, TAN) として電気生理学的に同定された[3, 4]。サルの線条体に金属電極を刺入して細胞外記録を取ると、このTANは行動とは一見無関係に持続的に発火を続けるニューロンで、もうひとつの行動の何らかの側面、例えば準備、期待、運動、感覚などのパラメータに応じて活動を増すphasically active neuron (PAN)と呼ばれるニューロン (線条体投射ニューロンと考えられる) とは際立った違いを示す[5]。我々はクリック音などの感覚的な手がかりが聞こえてすぐ舌を出せば、感覚刺激と同時に流れてくるジュースを報酬としてもらえるというような行動課題でサルをトレーニングした。すると、線条体のTANは初めのうちは持続的なランダムな発火を続けるだけであったが、次第に報酬だけでなく、その到来を予告する感覚的な手がかりに条件付け応答を示すようになっていった[6]。ここでもTANの活動と運動の何らかのパラメータとの相関は認められなかった。このTANの条件付け応答は初期の活動上昇 (initial activation)、それに引き続くスパイク発射の抑制 (pause) とその後の反跳興奮 (rebound activation) の3相からなる応答なのでTAN pause responseと名づけた。約1~2週間で学習が完成するとこの条件付け応答は線条体全体の6~8割のTANで見られるようになった。

面白いことに、ドーパミンニューロンも似たような学習課題で応答を示すようになる。Schultzらは光刺激が提示されたら即座に手を伸ばせば、りんご片を報酬としてもらえるという課題でサルをトレーニングし、ドーパミンニューロンの活動を記録した[7]。学習当初は感覚刺激と報酬の双方に一樣に反応したが、日を追うにつれて感覚刺激だけに反応するようになり、学習完成後身体が機械的に反応するようになるとその応答は消失した。TANと異なるのはその応答の様式でこの課題では常にドーパミンニューロンはスパイク発射が感覚刺激 (および報酬) の提示に対して一時的に増加した。

我々はTANのpause responseとドーパミンニューロンの学習応答はその潜時および応答を示す条件が極めてよく似ていたため、線条体のTANの条件付け応答にはドーパミンの放出が必要条件であると考えた。そこでドーパミンニューロンの選択的神経毒の1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) を用いてドーパミンニューロンの破壊がTANの条件付け応答にどのような影響を及ぼすか調べたところ、予想通りTAN pause responseは消失することがわかった[8]。つまりドーパミンはTAN pause responseを表現するための必要条件であった。実際、最近になってBergmanらはサルの脳から線条体TANとドーパミンニューロンとの同時記録を行い、条件付け完了後の両者の活動の相関を見たところ、条件付け刺激や報酬の提示に伴ってドーパミンニューロンの発火が増加すると、それに同期して

TAN はpause responseを起こしていることが確認された[9]。

4. TANとドーパミンニューロンの共通点と相違点

最近の総説[1]によるとサルの慢性実験から得られたTANとドーパミンニューロンの共通点は、(1) 両者とも報酬刺激に応答するが、中立的な刺激に対しても条件付けによって報酬と関連付けを行うと応答ようになる。(2) 得る報酬が思いがけないほど強く応答する。(3) 報酬的価値はなくてもその刺激が新奇で強ければ応答する。しかし、その刺激を繰り返すうちに順応して応答しなくなる (注意的側面)。(4) TANの場合は背側線条体、ドーパミンニューロンの場合は黒質全体でほぼ一樣に応答する、などである。

逆に、相違点としては(1) ドーパミンニューロンは侵害刺激にはあまり応答しないが、TANはどちらにも応答することがある。(2) TANは期待した報酬が来ないときにも応答するが、報酬に対する期待度との相関はない。これに対しドーパミンニューロンでは相関していて発火を増すが、逆にエラーに対しては発火を止める。

(3) TANの活動は運動や刺激の位置情報に影響されるが、ドーパミンニューロンは関係しない。(4) TAN応答はコンテキストに依存するが、ドーパミンニューロンはあまり影響を受けない、などが挙げられる。両者ともよく似てはいるものの、運ぶ情報はそれぞれに異なっている。

5. TAN pause responseの細胞メカニズム

では、このTAN pause responseはどのようなメカニズムで起こるのであろうか。TAN pause responseは前述のように最初の初期脱分極相、pauseの相、そして反跳興奮相の3つの相に分けることができる (図2)。サルの慢性実験によりTANはコリナージックインターニューロンであること[4]、この応答はドーパミンD2受容体および一部はD1クラス受容体に依存性であること[10]、更に視床入力によって起こること[11]が明らかにされた。その機序については概略以下のようなものである。

1) 初期脱分極相[4, 10, 12-14]

マウス線条体スライスを用いて白質を電気刺激し視床および大脳皮質からの入力線維をたたくとコリナージックインターニューロンに興奮性シナプス後電位 (excitatory postsynaptic potential, EPSP) とそれに重畳した抑制性シナプス後電位 (inhibitory postsynaptic potential, IPSP) が出る。後者はシナプスを二つ介したdisynaptic IPSPである。ここでTANの学習応答をin vitroで模倣するために、視床・皮質入力の高頻度刺激を行うと最初のEPSPに長期増強 (longterm potentiation, LTP) と後に続くIPSPにGABAの放出増加によるシナプス前性のLTPが出るということが明らかになった[12]。コリナージックインターニューロンにはドーパミンD5受容体とD2受容体があるが[15, 16]、この

EPSP のLTPはドーパミンD5受容体依存性でカルシウム透過型AMPA受容体および電位依存性カルシウムチャンネルを介するものである。以上の結果から、我々はTAN pause responseの初期脱分極相は視床・皮質からの高頻度入力によるEPSPのD5ドーパミン受容体依存性のLTPで、これがスパイク発射を誘発し、それに引き続いて起こる後過分極 (afterhyperpolarization, AHP) がpauseとなり、そのpauseの間にEPSPのLTPと同時に他の線条体GABAニューロンに起こったLTPがGABAの放出を増加させると考えた。しかし、最近ラットを使ったin vivo recordingにより必ずしもスパイク発射は必要ではなく、pauseを惹き起こすにはEPSPの増強つまりLTPだけで十分で、AHPの大きさと持続時間はそのEPSPの大きさに依存していることがわかった。更にラットのin vivo recordingでも黒質の高頻度刺激に皮質入力の高頻度刺激を同期させるとEPSPのLTPが起こること、このLTPはやはりドーパミン依存性であることが確認された[13]。

2) ポーズ相[17, 18]

PauseすなわちAHPは増強したEPSPによって開いた電位依存性カルシウムチャンネルの開口によるカルシウム流入によって、apamineに感受性、非感受性の2種類のカルシウム依存性のK⁺チャンネルが開くことによるもので、コリナージックインターニューロンの膜の特性に依存した現象である。そのAHPを終わらせるものは過分極によって開く陽イオンチャンネル、すなわちIh (hyperpolarization-activated channel, HCN) の開口である[17, 19-22]。最近このIhはドーパミンD2受容体の活性化によって阻害を受けることが報告された。これによりpauseの持続時間の延長が起こる[18]。

3) 反跳興奮相[23]

Pauseの後の反跳興奮相はAHPすなわちpauseによる過分極によって開いたIhを通して陽イオンが流入する結果電位依存性のNa⁺チャンネルがその閾値に達して開口することによるものである。ドーパミンはIhだけではなく、このNa⁺チャンネルにも作用してその閾値を上昇させるためスパイクの発火が遅れるらしい。これもやはりドーパミンD2受容体の活性化による[23]。つまり、ドーパミンはD2受容体の活性化によってIhとNa⁺チャンネルの両方を介してpauseを延長させるわけである。

要約すると、TANのpause responseの機序は高頻度の視床・皮質入力に黒質ドーパミンニューロンの高頻度発火が同期するとドーパミンD5受容体依存性のEPSPのLTPが起こる。これによって増大したEPSPの大きさに比例して電位依存性カルシウムチャンネルからCa²⁺が流入し、Ca²⁺依存性のK⁺チャンネルが開き、AHPすなわちpauseが始まる。このAHPの大きさはEPSPの大きさに依存するが、その長さはEPSPの大きさとIhと電位依存性Na⁺チャンネルの開口に依存する。IhもNa⁺チャンネルもD2受容体刺激で阻害を受けるのでpauseは更に延長するわけである。

6. TAN pause responseの生理的意義

では、この応答にどのような生理的意義があるのだろうか。

TANは持続的に自発発火するコリナージックニューロンなのでアセチルコリンを常時線条体全体に放出し続けている。ドーパミンニューロンの発火も持続的なのでドーパミンは常に線条体を漂っている。TAN pause responseは何か報酬を目的とした強化学習行動の際に生じるため、逆説的ではあるが行動の際に重要なのはむしろアセチルコリンの放出が停止しその受容体 (ニコチン受容体とムスカリン受容体) が活性化されない時ということになる。

1) ニコチン受容体不活化の影響

a) ドーパミン放出量の増加

現実にはニコチン受容体の不活化している状態ではドーパミンの放出量はドーパミンニューロンの発火頻度に依存する。低頻度であればあるほどドーパミンの放出量は少なく、逆に発火頻度が増加するとドーパミンの放出量は飛躍的に増大していく。それに対し、アセチルコリン存在下では発火頻度に関わらず常にほぼ一定のドーパミン量が定常的に放出されている[24-26]。ドーパミンニューロンの発火とTAN pause responseは時間的にも極めてよく逆相関するので(図2) [9]、この応答時にドーパミン放出量は飛躍的に増加することになる。

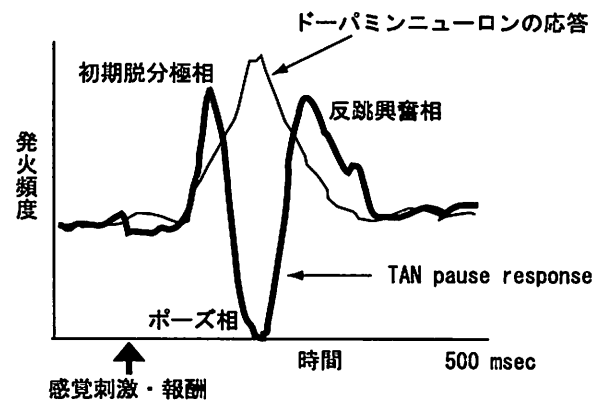


図2 TAN pause responseとドーパミンニューロンの学習応答の同期性

b) 投射ニューロンの脱抑制

更に我々はコリナージックニューロンの持続的な発火は周囲のGABAインターニューロンのニコチン受容体を活性化させ、脱分極を惹き起こすことによって直ちにGABAインターニューロンを発火させることを見出した。このためこのGABAインターニューロンが入力を与える周囲の多くの投射ニューロン群は常に抑制を受けることになる[27, 28]。

線条体はstriosomeとmatrixという発生学的にも投射様式も異なる二つのコンパートメントからなっている。Striosomeは発生学的に古い構造で、前頭皮質、島皮質、扁桃体などから入力を受け、直接黒質のドーパミンニューロンに投射する[29]。これに対し、matrixは新しい構造で感覚運動皮質や帯状回から入力を受け黒質網様

部、淡蒼球に投射する。コリナージックニューロンは両者の境界部に多く、双方のコンパートメントに張った樹状突起から情報を集め、軸策をmatrixに伸ばして線条体の制御に関わっている[27, 28, 30-33]。従って、TAN pause responseの際は投射ニューロンに対する抑制がmatrixにおいて一時外れることになる。このことは次に述べる投射ニューロンの可塑性にとって好都合である。

2) ムスカリン受容体不活化の影響

線条体のシナプス可塑性研究は1992年のCalabresiらの報告に始まる[34]。ラット線条体スライスを用いて皮質線条体路の高頻度刺激を行うと投射ニューロンにドーパミンD1およびD2受容体双方に依存して長期抑圧(long-term depression, LTD)が起こるといのである。更に彼らは同じスライス条件でも細胞外液に Mg^{2+} を入れてNMDA受容体の活性化を促進するとLTDがLTPに転ずることを見出した。ところが、可塑性がドーパミンD1およびD2受容体の双方に依存するという彼らの知見は、解剖学的事実と矛盾していた。解剖学的には線条体の投射ニューロンには直接黒質に投射する直接路の投射ニューロンと淡蒼球に投射する間接路の投射ニューロンの2種類があって、直接路はD1、間接路はD2受容体しか持たないのである。このドーパミン受容体に関する生理学的データと解剖学とのmismatchは最近ようやくSurmeierらの報告で回避できたかに見える。彼らによれば、コリナージックニューロンの持つD2受容体が活性化してアセチルコリンの放出が止まるために、投射ニューロン上のムスカリンM1受容体が不活化し、これによって Ca^{2+} イオンの流入が起こって結果的に投射ニューロンにLTDが起こるらしい[35]。もともと、当初からLTDはムスカリン受容体のブロッカーのscopolamine投与で増強することが知られていたし[36]、M2様ムスカリン受容体のブロッカーのmethoctramine投与でLTPも増強することが知られていた[37]。更に、最近Bracciらはコリナージックニューロンの発火により皮質線条体投射のEPSPが20%ほど小さくなること、逆にムスカリン受容体のブロッカーの投与で大きくなることを報告した[38]。以上の結果は、またしてもTAN pause responseが起こると周囲の投射ニューロンではシナプス可塑性の促進が見られることを示唆するものである。

3) S/N比を向上させる中心-周辺型構造か?

線条体の可塑性研究は未だに混沌としていると言わざるを得ないが、大雑把に言ってin vitroではLTD、in vivoではLTPが見られる傾向があるようだ。これは皮質入力やドーパミン入力の量がin vitroではどうしても少なくなるため、言い換えればドーパミンの放出量が少なめだとLTD、逆に十分に多いとLTPを生じやすいと解釈できる[39]。LTPがより生理的であるとする、TAN pause responseの生理的意義については次のように要約することができるだろう。

視床・皮質線条体投射の高頻度入力はその投射領域だ

けにTAN pause responseを起こす。その領域ではアセチルコリンの放出は止まり、ドーパミンの放出は数倍に増える。他の部位ではドーパミンニューロンの発火頻度が増加しているにも関わらず放出量に変化はないし、アセチルコリンの放出量にも変化はない。視床・皮質線条体投射領域の中のドーパミンの放出量に濃淡があるとすれば、中心部のドーパミンの量の多い場所ではLTPが、その領域内の辺縁の比較的濃度が低いところではLTDが起こるだろう。都合のいいことにTAN pause responseのときはその視床・皮質線条体投射領域だけ抑制入力も入らない。そうすると、視床・皮質線条体投射領域の中心部の投射ニューロンからの出力はS/N比が向上するため、より明確な情報が下位の脳部位に伝わるのではないだろうか[40]。アセチルコリンとドーパミンのバランスの破綻はこのような生理機能の全てを阻害することになるのである。

7. パーキンソン病モデルにおけるアセチルコリンとドーパミンのバランス

さて、もともとアセチルコリンとドーパミンとの間に存在する微妙なバランスが知られることとなったのはパーキンソン病患者においてであった。1960年代にlevodopaがドーパミンの補充療法として出現するまでは抗コリン剤がパーキンソン病の治療薬であったし、今日でもこれは病初期の治療に用いられている。当初はドーパミン枯渇の結果アセチルコリンが相対的に増加するのはドーパミンD2受容体が活性化されないせいだと考えられていたが、ドーパミンそのもの投与ではむしろD5受容体を介する脱分極が前景に立ってコリナージックニューロンの発火を増やすことが多い[15]。

1) アセチルコリンが相対的に増加するメカニズム

最近、ドーパミン枯渇によってD5受容体が不活化する結果、細胞内のRGS4 (regulator of G protein signaling 4)が増えることがアセチルコリン放出の増加の原因ではないかとする説が出た(図3)[41]。RGS4はGタンパクを脱リン酸化してGDPに戻す働きがあるため、コリナージックニューロンの細胞膜内にあるM4ムスカリン受容体はアセチルコリンに結合しても機能を発揮することが出来ない。M4受容体のautoinhibitionの機能が阻害されるのでアセチルコリンが出っ放しになるわけである。

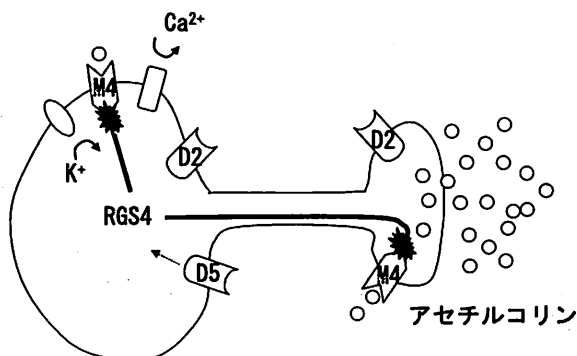


図3 ドーパミン枯渇によるアセチルコリン放出のメカニズム

2) 直接路と間接路の投射ニューロンの特徴

アセチルコリンが歯止めなく放出される結果、当然線条体の投射ニューロンの活動にさまざまな影響が起こる。線条体の投射ニューロンには大雑把に分けて直接路と間接路の2種類がある。直接路のニューロンはD1受容体とM1受容体を持ち、黒質網様部に直接投射する。これに対し、間接路のニューロンはD2受容体とM1受容体に加えてアデノシンA_{2A}受容体を選択的に持ち、淡蒼球に投射する[42]。両者とも内向き整流性K⁺チャネルのお陰で静止膜電位は-80~-90 mVと深く皮質の入力に応じた膜電位変動 (upstateとdownstate) を示すが、最近直接路よりも間接路のニューロンのほうがアセチルコリン存在下では興奮性が高いことが明らかになった[43]。これは間接路のニューロンの樹状突起上のspine headに内向き整流性K⁺チャネルのKir2.3サブユニットが多いため、このサブユニットはアセチルコリンによるM1受容体刺激で内向き整流性K⁺チャネルを閉じる傾向が強く、その結果ニューロンが脱分極しやすくなるからである[44]。

3) 間接路ニューロンのスパインの退縮

ドーパミンが枯渇するこのKir2.3サブユニットはさらに増えるらしい[43]。そのため、増加したアセチルコリンによりさらに間接路のニューロンは興奮しやすくなり、樹状突起上のspine headにある電位依存性Ca²⁺チャネルを通してより多くのCa²⁺イオンが流入する。ドーパミン枯渇の条件では間接路ニューロンにしかないアデノシンA_{2A}受容体が増えるので、RCS (regulator of calmodulin signaling)がリン酸化されてCa²⁺/Calmodulinの機能を落としcalcineurinを不活化する。Calcineurinはもともと電位依存性Ca²⁺チャネルを閉じてCa²⁺の流入を抑える働きがあるため、RCSのリン酸化はcalcineurinの不活化を通して電位依存性Ca²⁺チャネルを開きっぱなしにする。そのため、間接路ニューロンの樹状突起のspineには多くのCa²⁺イオンが流入する結果となり、それを補償するかのように間接路ニューロンの樹状突起のspineは直接路に比べて有意に減少するのであろう。

8. おわりに

大脳基底核は強化学習の座と考えられ、行動の取捨選択はその結果として得られる報酬の多寡で常に重みを書き換えられている。行動の選択において視床および皮質からの入力は行動に関連する線条体局所でアセチルコリンの放出を止め、ドーパミンを増大させる。その局所では抑制性入力は抑えられ、ドーパミン依存性のシナプスの可塑的变化が起こってその行動の強化が行われる。従って、アセチルコリンとドーパミンのバランスが崩れてしまうと、シナプスの可塑的变化が阻害され行動学習に基づく環境への適応的变化が阻害されることになる。更に、パーキンソン病においてはコリナージックニューロンを含めた線条体全体の発振と、それに伴う大量のアセチルコリンの放出、更にその放出のautoinhibitionの

機構の阻害のために、間接路の投射ニューロンにおいてアセチルコリン刺激によるCa²⁺増加を補償する機構が働き、スパインの退縮が起こる。その結果、間接路へ行く皮質からの運動指令がここで頓挫することになるのである。

引用文献

1. Pisani A, Bernardi G, Ding J, et al., Re-emergence of striatal cholinergic interneurons in movement disorders. *Trends Neurosci* 30(10):545-53, 2007.
2. Dahlstrom A and Fuxe K, Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* 20(7):398-9, 1964.
3. Kimura M, Rajkowski J and Evarts E, Tonicly discharging putamen neurons exhibit set-dependent responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(15):4998-5001, 1984.
4. Aosaki T, Kimura M and Graybiel AM, Temporal and spatial characteristics of tonically active neurons of the primate's striatum. *J Neurophysiol* 73(3):1234-52, 1995.
5. Kimura M, Aosaki T, Hu Y, et al., Activity of primate putamen neurons is selective to the mode of voluntary movement: visually guided, self-initiated or memory-guided. *Exp Brain Res* 89(3):473-7, 1992.
6. Aosaki T, Tsubokawa H, Ishida A, et al., Responses of tonically active neurons in the primate's striatum undergo systematic changes during behavioral sensorimotor conditioning. *J Neurosci* 14(6):3969-84, 1994.
7. Ljungberg T, Apicella P and Schultz W, Responses of monkey dopamine neurons during learning of behavioral reactions. *J Neurophysiol* 67(1):145-63, 1992.
8. Aosaki T, Graybiel AM and Kimura M, Effect of the nigrostriatal dopamine system on acquired neural responses in the striatum of behaving monkeys. *Science* 265(5170):412-5, 1994.
9. Morris G, Arkadir D, Nevet A, et al., Coincident but distinct messages of midbrain dopamine and striatal tonically active neurons. *Neuron* 43(1):133-43, 2004.
10. Watanabe K and Kimura M, Dopamine receptor-mediated mechanisms involved in the expression of learned activity of primate striatal neurons. *J Neurophysiol* 79(5):2568-80, 1998.
11. Lapper SR and Bolam JP, Input from the frontal cortex and the parafascicular nucleus

- to cholinergic interneurons in the dorsal striatum of the rat. *Neuroscience* 51(3):533-45, 1992.
12. Suzuki T, Miura M, Nishimura K, et al., Dopamine-dependent synaptic plasticity in the striatal cholinergic interneurons. *J Neurosci* 21(17):6492-501, 2001.
 13. Reynolds JN, Hyland BI and Wickens JR, Modulation of an afterhyperpolarization by the substantia nigra induces pauses in the tonic firing of striatal cholinergic interneurons. *J Neurosci* 24(44):9870-7, 2004.
 14. Matsumoto N, Minamimoto T, Graybiel AM, et al., Neurons in the thalamic CM-Pf complex supply striatal neurons with information about behaviorally significant sensory events. *J Neurophysiol* 85(2):960-76, 2001.
 15. Aosaki T, Kiuchi K and Kawaguchi Y, Dopamine D1-like receptor activation excites rat striatal large aspiny neurons in vitro. *J Neurosci* 18(14):5180-90, 1998.
 16. Yan Z and Surmeier DJ, D5 dopamine receptors enhance Zn²⁺-sensitive GABA(A) currents in striatal cholinergic interneurons through a PKA/PP1 cascade. *Neuron* 19(5):1115-26, 1997.
 17. Bennett BD, Callaway JC and Wilson CJ, Intrinsic membrane properties underlying spontaneous tonic firing in neostriatal cholinergic interneurons. *J Neurosci* 20(22):8493-503, 2000.
 18. Deng P, Zhang Y and Xu ZC, Involvement of I(h) in dopamine modulation of tonic firing in striatal cholinergic interneurons. *J Neurosci* 27(12):3148-56, 2007.
 19. Bennett BD and Wilson CJ, Spontaneous activity of neostriatal cholinergic interneurons in vitro. *J Neurosci* 19(13):5586-96, 1999.
 20. Bennett BD and Wilson CJ, Synaptic regulation of action potential timing in neostriatal cholinergic interneurons. *J Neurosci* 18(20):8539-49, 1998.
 21. Wilson CJ, The mechanism of intrinsic amplification of hyperpolarizations and spontaneous bursting in striatal cholinergic interneurons. *Neuron* 45(4):575-85, 2005.
 22. Wilson CJ and Goldberg JA, Origin of the slow afterhyperpolarization and slow rhythmic bursting in striatal cholinergic interneurons. *J Neurophysiol* 95(1):196-204, 2006.
 23. Maurice N, Mercer J, Chan CS, et al., D2 dopamine receptor-mediated modulation of voltage-dependent Na⁺ channels reduces autonomous activity in striatal cholinergic interneurons. *J Neurosci* 24(46):10289-301, 2004.
 24. Zhang H and Sulzer D, Frequency-dependent modulation of dopamine release by nicotine. *Nat Neurosci* 7(6):581-2, 2004.
 25. Rice ME and Cragg SJ, Nicotine amplifies reward-related dopamine signals in striatum. *Nat Neurosci* 7(6):583-4, 2004.
 26. Cragg SJ, Meaningful silences: how dopamine listens to the ACh pause. *Trends Neurosci* 29(3):125-31, 2006.
 27. Miura M, Saino-Saito S, Masuda M, et al., Modulation by mu-opioid receptors on the excitability of cholinergic interneuron in the striosome/matrix compartment of the striatum. *Soc Neurosci Abstr* 514.16/SS30, 2007.
 28. Miura M, Ishii K, Aosaki T, et al., Chronic nicotine treatment increases GABAergic input to striatal neurons. *Neuroreport* 17(5):537-40, 2006.
 29. Graybiel AM, Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 13(7):244-54, 1990.
 30. Graybiel AM, Aosaki T, Flaherty AW, et al., The basal ganglia and adaptive motor control. *Science* 265(5180):1826-31, 1994.
 31. Miura M, Saino-Saito S, Masuda M, et al., Compartment-specific modulation of GABAergic synaptic transmission by mu-opioid receptor in the mouse striatum with green fluorescent protein-expressing dopamine islands. *J Neurosci* 27(36):9721-8, 2007.
 32. Kawaguchi Y, Large aspiny cells in the matrix of the rat neostriatum in vitro: physiological identification, relation to the compartments and excitatory postsynaptic currents. *J Neurophysiol* 67(6):1669-82, 1992.
 33. Aosaki T and Kawaguchi Y, Actions of substance P on rat neostriatal neurons in vitro. *J Neurosci* 16(16):5141-53, 1996.
 34. Calabresi P, Maj R, Mercuri NB, et al., Coactivation of D1 and D2 dopamine receptors is required for long-term synaptic depression in the striatum. *Neurosci Lett* 142(1):95-9, 1992.
 35. Wang Z, Kai L, Day M, et al., Dopaminergic control of corticostriatal long-term synaptic depression in medium spiny neurons is mediated by cholinergic interneurons. *Neuron* 50(3):443-52, 2006.
 36. Calabresi P, Maj R, Pisani A, et al., Long-term synaptic depression in the striatum:

- physiological and pharmacological characterization. *J Neurosci* 12(11):4224-33, 1992.
37. Calabresi P, Centonze D, Gubellini P, et al., Blockade of M2-like muscarinic receptors enhances long-term potentiation at corticostriatal synapses. *Eur J Neurosci* 10(9):3020-3, 1998.
 38. Pakhotin P and Bracci E, Cholinergic interneurons control the excitatory input to the striatum. *J Neurosci* 27(2):391-400, 2007.
 39. Calabresi P, Picconi B, Tozzi A, et al., Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 30(5):211-9, 2007.
 40. Shin RM, Masuda M, Miura M, et al., Dopamine D4 receptor-induced postsynaptic inhibition of GABAergic currents in mouse globus pallidus neurons. *J Neurosci* 23(37):11662-72, 2003.
 41. Ding J, Guzman JN, Tkatch T, et al., RGS4-dependent attenuation of M4 autoreceptor function in striatal cholinergic interneurons following dopamine depletion. *Nat Neurosci* 9(6):832-42, 2006.
 42. Schwarzschild MA, Agnati L, Fuxe K, et al., Targeting adenosine A2A receptors in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 29(11):647-54, 2006.
 43. Shen W, Tian X, Day M, et al., Cholinergic modulation of Kir2 channels selectively elevates dendritic excitability in striatopallidal neurons. *Nat Neurosci* 10(11):1458-66, 2007.
 44. Suh BC and Hille B, Regulation of ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Curr Opin Neurobiol* 15(3):370-8, 2005.

Acetylcholine-dopamine balance hypothesis: an update

Toshihiko Aosaki, Masami Miura, Masao Masuda

Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology
 Research Team for Functional Genomics
 35-2, Sakae-cho, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, JAPAN

Abstract

The breakdown of the balance between acetylcholine and dopamine in the striatum causes a variety of neurological diseases. Physiologically, action commands popped up in the cerebral cortex trigger a conditional pause response in the firing of the tonically active cholinergic interneurons in the striatum through the thalamo- and corticostriatal pathways. The pause response is made possible by a concomitant increase of firing frequency of the dopaminergic neurons, which dramatically increases the release of dopamine only in the projection areas of the cholinergic interneurons when the release of acetylcholine stops during the pause response. This facilitates the synaptic efficacy of the striatal medium spiny projection neurons in the areas, which enables an execution of action commands with an improvement of signal-to-noise ratio. Deviation from the balance in either direction would hamper proper functioning of the cortico-basal ganglia-thalamocortical loop circuits. In Parkinson's disease dopamine depletion blocks autoinhibition of acetylcholine release through muscarinic autoreceptors, thereby leading to excessive acetylcholine release which eventually prunes spines of the indirect pathway projection neurons of the striatum and thus interrupts information transfer from motor command centers in the cerebral cortex.

Keywords: acetylcholine, dopamine, Parkinson's disease, basal ganglia

【総 説】

関節リウマチ骨破壊と破骨細胞の機能調節

宮崎 剛

東京都老人医療センター整形外科

要約

関節リウマチ(Rheumatoid arthritis: RA)は、自己免疫性の慢性炎症性疾患であり、増殖した滑膜が活発に骨軟骨へと侵入し、多発性の関節破壊をもたらす。RAによる骨関節破壊において、骨吸収を直接担う唯一の細胞と考えられている破骨細胞の重要性が明らかにされ、破骨細胞機能阻害効果を持つ薬剤のRA治療への応用が探索されている。逆に、破骨細胞内シグナル伝達経路の解明が炎症性骨関節破壊の病態のさらなる解明に多大な貢献をしている。本稿では、これまでに明らかにされているRA関節破壊に至るメカニズムおよび破骨細胞内シグナル伝達経路、さらに現在試みられている破骨細胞機能阻害薬を用いたRA治療の臨床応用の可能性について概説する。

キーワード：滑膜細胞、骨関節破壊、破骨細胞、T細胞、RANKL

はじめに

関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) は免疫異常を基礎とする全身性の炎症性疾患であるが、その標的臓器は主として関節であり、関節での炎症が慢性に経過した場合、軟骨・骨の吸収さらには線維化に至り、最終的には関節の屈曲、変形、高度の運動障害などが見られるようになる。非ステロイド系抗炎症薬 (non-steroidal anti-inflammatory drugs: NSAIDs)、ステロイド剤および疾患修飾性抗リウマチ薬 (disease modifying antirheumatic drugs: DMARDs) の進歩により、疼痛や炎症に関してはある程度までコントロールが可能になってきたが、現在でもRA治療における最大の課題が、骨軟骨破壊からくる疼痛と関節機能障害のコントロールであることに変わりはない。近年、骨破壊を予防できる可能性をもった生物製剤が日本でも使用されるようになってきており、これらの製剤がRA治療の選択肢の幅を広げている。ここでは、RA骨破壊における破骨細胞の重要性について述べ、関節の滑膜で始まった炎症が関節の破壊に至るメカニズムについて概説する。

RA滑膜細胞と破骨細胞分化

活動期のRA滑膜は腫瘍のように増殖し、周囲の組織を破壊していく。増殖は自然収束するため悪性化しているわけではないが、RA滑膜細胞は形態的変化や、異常な

増殖活性を示すため、しばしばtransformed phenotypeと形容される[1, 2]。増殖因子の細胞内伝達や炎症性因子の転写に関与するさまざまな前癌遺伝子の活性化が知られ、特にRas-MAPK系などのシグナル伝達分子やNF- κ B, AP-1等の転写因子の活性化が報告されている[3]。その結果、炎症性・骨吸収性サイトカイン (IL-1, IL-6, TNF- α)、増殖因子 (FGF-2, PDGF) 等の産生が亢進し、MMPやカテプシンなどの基質分解酵素の産生も誘導され、骨軟骨の基質分解が促進する。

RAにおける骨破壊の進展においては、軟骨で覆われていないbare areaから滑膜がもぐり込むように直接骨に侵入する病理像が観察されるのが特徴である。ここは毛細血管や未分化な間葉系細胞が存在し、血管も透過性が亢進しやすい有窓性の構造をとっている。特に、非荷重関節における侵食や急速に進行する破壊部では増殖した滑膜が骨と接しており、直接滑膜が骨を溶かしているかのような像が見られる。そして、増殖した滑膜 (パンヌス) が、骨内へと侵入していく最前線には多数の多核巨細胞が観察される[4]。ここで見られる酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (TRAP) 染色陽性の多核巨細胞が、骨吸収を直接担う唯一の細胞と考えられている破骨細胞である。臨床的には関節破壊、骨破壊という表現が一般的に使われているが、組織学的に見ると壊されるという状態ではなく、肉芽組織や破骨細胞によって吸収されていくという像である。実際に、RA患者の滑膜内や骨/滑膜境界部で観察される多核細胞が破骨細胞としての表現型を満たすことが示されており、破骨細胞がRAの骨破壊などの炎症性骨破壊においても重要な役割を果たしていると考えられる[5]。破骨細胞は、造血幹細胞を起源とするマクロファージ・単球系細胞より分化した単核の破骨細胞前駆細胞が融合して形成される。破骨細胞形成に必要なのは前駆細胞だけでなく、破骨細胞形成を誘導す

連絡先：〒173-0015

東京都板橋区栄町35番2号

東京都老人医療センター整形外科 医員

TEL: 03-3964-1141

E-mail: vr8t-myzk@asahi-net.or.jp

る微小環境が大切である。この微小環境は骨組織においては骨芽細胞によって整えられるが、その重要な要素は、単球・マクロファージ系の前駆細胞の分化を誘導する造血因子であるマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) と骨芽細胞・ストローマ細胞との接触刺激である。我々は、RA滑膜において、滑膜マクロファージが滑膜線維芽細胞の支持のもとで破骨細胞に分化することを報告している[6]。つまり、滑膜線維芽細胞は、破骨細胞形成に必要な微小環境を整えて破骨細胞形成を促進し、骨破壊に関与していると考えられる。

RA滑膜組織と破骨細胞分化因子RANKL

破骨細胞分化において、骨芽細胞・ストローマ細胞との接触が必須であることから、これらの細胞膜上に破骨細胞分化誘導因子が存在すると予想されていた。1997年、Amgen社と保田らのグループは独立して、破骨細胞分化抑制するタンパクとしてOPG/OCIF (Osteoprotegerin/Osteoclastogenesis inhibitory factor) をクローニングし、98年、OPGに結合するタンパクとして、破骨細胞分化誘導因子ODF/OPGL(Osteoclast differentiation factor/Osteoprotegerin ligand)が発見された[7, 8]。この分子は、すでにTリンパ球上に発現するdendritic cell活性化因子として報告されていた Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)と同一であった[9]。RANKLはTNFリガンドファミリーに属する膜貫通型タンパクであり、骨芽細胞などの破骨細胞形成支持細胞の表面上に発現しており、活性型ビタミンD₃、PGE₂、副甲状腺ホルモン、IL-6などの骨吸収因子によってその発現が亢進する。つまり、これらの骨吸収因子による刺激により、ストローマ細胞上にRANKLが発現され、細胞接触を介して破骨細胞前駆細胞へとシグナルが伝達された結果、破骨細胞へと分化することが明らかになった。

滑膜線維芽細胞に破骨細胞分化誘導能があることから、我々はRA滑膜および滑膜細胞においてもRANKLが発現していると考えてその検索を行った。実際、RA滑膜組織では、RANKLが多量に発現しており、RA滑膜線維芽細胞の破骨細胞分化誘導は、RANKLを介していることが明らかになった[10]。さらに、ヒトRAやコラーゲン関節炎マウスの滑膜組織においてRANKLが発現していることがいくつかのグループから報告された。GravelleseらはRA滑膜組織中のRANKLの発現をRT-PCRによって証明し[11]、またRamosらはマウスコラーゲン関節炎で骨を浸食する滑膜組織にRANKLが発現していることをin situ hybridizationで示した[12]。さらに、Kongらは、RANKLの抑制因子であるOPGがアジュバント関節炎の骨破壊を強く抑制し、関節炎性骨破壊が破骨細胞を標的とした治療によって防止できることを示した[13]。

破骨細胞分化を制御するシグナル伝達経路

RANKLが破骨細胞骨吸収を決定する中心的な因子で

あることから、その細胞内シグナル伝達は、分子メカニズムの解明と治療標的の同定という2つの異なる視点から解析が進んだ。RANKL受容体であるRANKに会合する因子が精力的に解析され、TNF receptor-associated factor (TRAF)ファミリーのアダプター分子の多くが結合することが明らかになった。その中でも最も重要な分子は、ノックアウトマウスが大理石骨病になるTRAF6と考えられる[14, 15]。さらにTRAF6はNF- κ B, JNK, p38, ERK, PI3K-Aktなど下流の分子を活性化する。さらに、その下流ではc-Fosを介したAP-1活性化とTRAF6を介したNF- κ B活性化によるNFATc1発現上昇が重要であり、これにより破骨細胞分化が誘導される。最近、高柳らのグループにより細胞内にITAM(immunoreceptor tyrosine-based activation motif)をもったFcR γ とDAP12を介したCa²⁺シグナルが補助シグナルとして重要であることを明らかにした[16]。遺伝子欠損マウスの解析からRANKをはじめ、TRAF6, c-Fos, NF- κ B(p50/p52), FcR γ /DAP12などが生体内における破骨細胞分化に重要な役割を果たすことがわかっている。一方、in vitroの解析からNFATc1の発現上昇が破骨細胞分化の必要十分条件であることが示唆されている[17] (図1)。

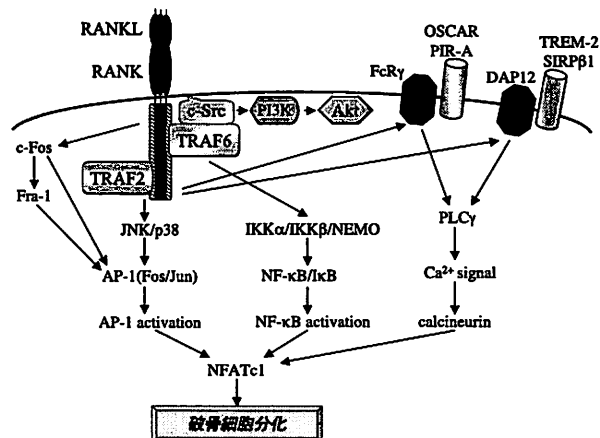


Fig. 1 破骨細胞分化におけるRANKLシグナル伝達経路

破骨細胞のアポトーシスを制御するシグナル伝達経路

骨粗鬆症治療におけるビスフォスフォネートの成功が、破骨細胞アポトーシスの分子メカニズムに対する注目を集めることとなった。破骨細胞の寿命はin vivo, in vitroでともに短く、骨芽細胞やIL-1, RANKL, およびM-CSFなどのサイトカインの非存在下に急速にアポトーシスを生じる。以前、我々は、ERKの活性化が破骨細胞の生存を著しく促進すると報告した[18]。逆に、ドミナントネガティブ型ras遺伝子を過剰発現し、ERKを阻害すると破骨細胞に急速なアポトーシスが生じた。RANKL, IL-1, およびM-CSFが破骨細胞においてERKを活性化することから、Ras-ERKシグナルが破骨細胞生存における重要な役割を果たしていることが示唆される。最近、我々は、Bcl-2ファミリーであるBimのubiquitylationが破骨細胞アポトーシスを制御している可能性を報告した[19]。M-CSFの存在下で、Bimは恒

常にユビキチン依存性に分解されているが、M-CSFの非存在下ではBimのユビキチン化が抑制され、Bimの発現レベルが急速に上昇する。さらに、Bim欠損破骨細胞はin vivo, in vitroともに生存が促進された。また、SugataniらはsiRNAでbimの遺伝子をノックダウンすると破骨細胞の生存が促進されたと報告した[20]。これらの結果は、破骨細胞生存において、ERKからBimの分解に至る経路が重要な役割を果たしていることを示唆する(図2)。

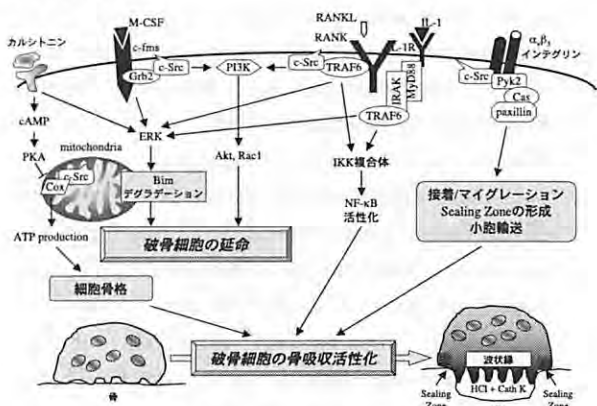


Fig. 2. 成熟破骨細胞機能を制御するシグナル伝達経路

成熟破骨細胞骨吸収を制御するシグナル伝達経路

TNF受容体ファミリーメンバーやIL-1受容体に直接的あるいは間接的結合するTRAFファミリーを構成する分子が下流ヘシグナルを伝えるが、そのファミリーの中でもTRAF6が破骨細胞分化のみならず、成熟破骨細胞の骨吸収を促進するRANKとIL-1Rからシグナル伝達においても中心的役割を果たしている。TRAF6ノックアウトマウスを用いた破骨細胞の解析より、TRAF6が破骨細胞骨吸収に必須であることが示された[21]。さらに、我々は、TRAF6の下流分子のひとつであるNF- κ Bに注目し、ドミナントネガティブ型IKK(I κ B kinase)過剰発現でNF- κ Bの活性化を抑制することにより骨吸収を低下させることに成功した。逆に、恒常的活性型IKKを導入することにより、NF- κ Bを活性化すると骨吸収が増加した[18]。興味深いことに、NF- κ Bの活性を調節しても破骨細胞の生存に大きな影響はなかった[18]。これらの結果より、TRAF6-IKK-NF- κ Bシグナル伝達経路が成熟破骨細胞の骨吸収機能において重要な役割を果たしている事が示唆された。

カルシトニン、成熟破骨細胞の骨吸収を抑制することで知られており、骨粗鬆症、Paget病、および悪性腫瘍の骨転移による高Ca血症の治療に使用されている。カルシトニンはcAMP-dependentキナーゼ (PKA)を介して、破骨細胞の細胞骨格を破壊し、骨吸収を抑制する一方、ERKを活性化させ、破骨細胞の延命を促進する[22]。さらに、我々は、ATP産生のために必須であるミトコンドリアの酸化リン酸化で重要な役割を果たすシトクロムc酸化酵素(cytochrome c oxidase: Cox)の活性が破骨細胞の形態学維持および骨吸収機能発現に必要であると報

告した[24]。また、Yangらは、cAMPがPKA RI α 調節サブユニットとCox subunit Vb (CoxVb)との相互作用を阻害することにより、Cox抑制することを報告している[23]。さらに、我々は、カルシトニンがCoxの活性を低下させ、Coxの活性を抑えるとアクチンリングが破壊され、骨吸収が低下することを示した[24]。これらの結果は、成熟破骨細胞に対するカルシトニンの骨吸収抑制効果がCoxの活性を低下させるために生じていることを示唆する。

$\alpha_v \beta_3$ インテグリンには、さまざまな細胞外マトリックスとの相互作用を細胞内シグナルへ変換する特性を持つ。 $\alpha_v \beta_3$ インテグリンを阻害すると破骨細胞の接着、運動、および骨吸収が抑制される。破骨細胞は、辺縁部にsealing zoneあるいはclear zoneと呼ばれるタイトな接着帯を形成し、酸や酵素をその内部に分泌し、骨を吸収する。骨に面した分泌の盛んな部分は細胞膜が複雑に入り組んでおり、波状縁 (ruffled border) と呼ばれる。この骨吸収の盛んな部分には、非受容体型チロシンキナーゼであるc-Srcが局在している。我々は、破骨細胞および $\alpha_v \beta_3$ インテグリン発現293細胞を用いて、インテグリン刺激後、細胞外基質接着部位においてFocal Adhesion Kinase (FAK)と高い相同性を持つProline-rich kinase 2 (Pyk2)の402番目のチロシンがリン酸化され、その部位にキナーゼ活性をもつc-Srcがリクルートされることが、骨吸収機能に必須であることを明らかにした[25]。さらに、c-Srcの下流のシグナル伝達の候補の1つとしてc-Cblが存在し、c-Srcによるc-Cblの731番目のチロシンのリン酸化が成熟破骨細胞の骨吸収機能制御に重要な役割をはたしていることが明らかにした[25]。破骨細胞による骨吸収とマクロファージによって引き起こされる炎症がRAの病態のひとつであるので、これらの結果より $\alpha_v \beta_3$ インテグリンやc-Srcをターゲットとした治療法の開発も非常に有用であると考えられる。

RA骨破壊の新しい治療戦略

RA骨破壊においてRANKL/RANKシグナルが大きな役割を果たすことがあきらかにされた現在、長期的に骨破壊を予防するためには、今後、炎症や疼痛をコントロールするだけではなく、破骨細胞の抑制を考慮にいたれた治療法の確立が望まれる。現在日米において開発が行われている抗RANKL製剤 (OPG製剤、抗RANKL抗体)は骨粗鬆症、関節リウマチなどの治療に極めて有望であり、その臨床応用は近い将来に実現すると思われる。さらに、RANKL/RNAKシグナル伝達阻害剤として、青木らは炎症性サイトカインであるTNF- α のペプチドアンタゴニストに着目し、このペプチドがTNF- α だけでなくRANKLのアンタゴニストとしても働くことを明らかにし、コラーゲン誘導関節炎モデルを用いて、炎症性骨破壊が抑制されることを示した[26]。今後の骨破壊を阻止する薬剤開発のプロトタイプとして期待される。自見らは、RANKやIL-1Rの下流で重要な働きを演じている

NF- κ Bに注目し、NEMOとIKK β の会合領域に細胞透過性配列を付加した阻害ペプチドを腹腔内投与することにより、コラーゲン誘導関節炎モデルマウスの発症の遅延と進行の抑制を報告した[27]。また、破骨細胞分化に必須であるc-FosはTNF- α を含む炎症性サイトカインおよび基質破壊に必要なMMPを制御する要に位置している。したがって、AP-1阻害剤のリウマチ治療薬としての有用性も期待され、その開発が待たれるところである。免疫抑制剤であるFK506やシクロスポリンAは、破骨細胞形成系におけるRANKLによるNFATc1のカルシウム依存性脱リン酸化酵素であるカルシニューリンを抑制し、破骨細胞分化を強力に抑制することが証明されている[17]。またマウス破骨細胞培養系におけるカスパーゼ3の活性を亢進し、アポトーシスを誘発することも報告されている[28]。FK506は放線菌Streptomyces tsukubaensisの代謝産物であり、NFATを活性化を抑制する薬剤で、当初は移植領域で開発が進められたが、その後RAをはじめとする自己免疫疾患での有効性が認識されるようになった薬剤であり[29]、わが国においても、今後、破骨細胞分化を直接抑制する可能性のあるDMARDsの一つとして期待されている。

最後に

RAでの骨吸収の最前線では、滑膜組織内での破骨細胞の分化が進んでいることがわかってきた。これはRA滑膜組織において、破骨細胞前駆細胞・破骨細胞形成支持細胞・誘導活性化因子がすべて揃っているために、非常に効率よく破骨細胞の形成・活性化をサポートしているものと思われる。RANKLの作用を増幅させるTNF- α を抑制する薬剤であるインフリキシマブ(抗TNF- α キメラ抗体)、エタネルセプト(可溶性TNF α 受容体とIgG-Fc融合タンパク)の使用が日本においても開始され、実際に関節破壊抑制効果が報告され始めている。また、NF- κ Bの強力なstimulatorであるIL-1の阻害受容体IL-1ra(受容体アンタゴニスト)も骨破壊抑制効果を期待できる。RAの骨破壊を予防するために、破骨細胞の形成・機能の制御が今後の新しい治療の中心となっていくと思われる。

参考文献

1. Muller-Ladner U, Gay RE, Gay S. Cellular pathways of joint destruction. *Curr Opin Rheumatol* 9:213-20, 1997
2. Firestein GS. Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? *Arthritis Rheum* 39:1781-90, 1996
3. Firestein GS, Manning AM. Signal transduction and transcription factors in rheumatic disease. *Arthritis Rheum* 42:609-21, 1999
4. Bromley M, Woolley DE. Chondroclasts and

- osteoclasts at subchondral sites of erosion in the rheumatoid joint. *Arthritis Rheum* 27:968-75, 1984
5. Gravallesse EM, Harada Y, Wang JT, et al. Identification of cell types responsible for bone resorption in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *Am J Pathol* 152:943-51, 1998
6. Takayanagi H, Oda H, Yamamoto S, et al. A new mechanism of bone destruction in rheumatoid arthritis: synovial fibroblasts induce osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 240:279-86, 1997
7. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3597-602, 1998
8. Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93:165-76, 1998
9. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 390:175-9, 1997
10. Takayanagi H, Iizuka H, Juji T, et al. Involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43:259-69, 2000
11. Gravallesse EM, Manning C, Tsay A, et al. Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis Rheum* 43:250-8, 2000
12. Romas E, Bakharevski O, Hards DK, et al. Expression of osteoclast differentiation factor at sites of bone erosion in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 43:821-6, 2000
13. Kong YY, Feige U, Sarosi I, et al. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 402:304-9, 1999
14. Firestein GS, Zvaifler NJ. How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis? *Arthritis Rheum* 33:768-73, 1990
15. Naito A, Azuma S, Tanaka S, et al. Severe osteopetrosis, defective interleukin-1 signalling and lymph node organogenesis in TRAF6-deficient mice. *Genes Cells* 4:353-62, 1999
16. Koga T, Inui M, Inoue K, et al. Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate

- with RANKL for bone homeostasis. *Nature* 428:758-63, 2004
17. Takayanagi H, Kim S, Koga T, et al. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell* 3:889-901, 2002
 18. Miyazaki T, Katagiri H, Kanegae Y, et al. Reciprocal role of ERK and NF-kappaB pathways in survival and activation of osteoclasts. *J Cell Biol* 148:333-42, 2000
 19. Akiyama T, Bouillet P, Miyazaki T, et al. Regulation of osteoclast apoptosis by ubiquitylation of proapoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim. *Embo J* 22:6653-64, 2003
 20. Sugatani T, Hruska KA. Akt1/Akt2 and mammalian target of rapamycin/Bim play critical roles in osteoclast differentiation and survival, respectively, whereas Akt is dispensable for cell survival in isolated osteoclast precursors. *J Biol Chem* 280:3583-9, 2005
 21. Kobayashi N, Kadono Y, Naito A, et al. Segregation of TRAF6-mediated signaling pathways clarifies its role in osteoclastogenesis. *Embo J* 20:1271-80, 2001
 22. Suzuki H, Nakamura I, Takahashi N, et al. Calcitonin-induced changes in the cytoskeleton are mediated by a signal pathway associated with protein kinase A in osteoclasts. *Endocrinology* 137:4685-90, 1996
 23. Yang WL, Iacono L, Tang WM, et al. Novel function of the regulatory subunit of protein kinase A: regulation of cytochrome c oxidase activity and cytochrome c release. *Biochemistry* 37:14175-80, 1998
 24. Miyazaki T, Neff L, Tanaka S, et al. Regulation of cytochrome c oxidase activity by c-Src in osteoclasts. *J Cell Biol* 160:709-18, 2003
 25. Miyazaki T, Sanjay A, Neff L, et al. Src kinase activity is essential for osteoclast function. *J Biol Chem* 279:17660-6, 2004
 26. Aoki K, Saito H, Itzstein C, et al. A TNF receptor loop peptide mimic blocks RANK ligand-induced signaling, bone resorption, and bone loss. *J Clin Invest* 116:1525-34, 2006
 27. Jimi E, Aoki K, Saito H, et al. Selective inhibition of NF-kappa B blocks osteoclastogenesis and prevents inflammatory bone destruction in vivo. *Nat Med* 10:617-24, 2004
 28. Igarashi K, Hirotsu H, Woo JT, et al. Cyclosporine A and FK506 induce osteoclast apoptosis in mouse bone marrow cell cultures. *Bone* 35:47-56, 2004
 29. Furst DE, Saag K, Fleischmann MR, et al. Efficacy of tacrolimus in rheumatoid arthritis patients who have been treated unsuccessfully with methotrexate: a six-month, double-blind, randomized, dose-ranging study. *Arthritis Rheum* 46:2020-8, 2002

The molecular mechanism of bone and joint destruction in rheumatoid arthritis

Tsuyoshi MIYAZAKI

Department of Orthopaedic Surgery, Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital, 35-2 Sakae-cho,
Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, Japan

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory disorder characterized by invasive synovial hyperplasia associated with localized and generalized bone loss. Proliferation of the synovial cells leads to pannus tissue that invades the bare area between cartilage and bone, finally resulting in progressive bone and joint destruction in the affected joints. There is accumulating evidence that osteoclasts, the primary cells responsible for bone resorption, are involved in bone and joint destruction in RA. Preventing joint destruction is one of the most challenging issues in treating patients with RA. The recent elucidation of the various intracellular signaling pathways in osteoclasts has brought a tremendous understanding of the pathophysiology of inflammatory bone loss, and has heightened expectation of a novel intervention. We here highlight the molecular mechanism of bone and joint destruction in RA and the role of intracellular signaling pathways in osteoclastogenesis and mature osteoclast function. We also describe the recent trials on inhibitor drug and anti-cytokine therapies of arthritic joint disease targeting osteoclasts.

Key words: bone resorption, osteoclasts, RANKL, synovium, T cells

【総 説】

疾患プロテオミクス - 質量分析計を用いた認知症の病態解析-

渡邊 淳

国立長寿医療センター研究所 血管性認知症研究部

要約

疾患の研究を行う上でヒト試料のタンパク質の解析は必要不可欠であり、各疾患の解析で得られる情報は病態の解明に重要な知見をもたらす。しかしながら、ヒト試料は貴重かつ量も限られるため、微量でタンパク質を解析、同定できるシステムが必要であり、現在これらを行う上で最も有効な方法の一つが質量分析を中心としたプロテオミクス研究である。本総説では、タンパク質の解析においてなくてはならない質量分析計について、その種類、分析までの処理、およびタンパク質の同定方法について解説するとともに、認知症の研究に質量分析がどのように用いられているかを概説する。

キーワード : proteomics, mass spectrometry, dementia, Alzheimer's disease

はじめに

プロテオミクスと呼ばれる領域がこれほど拡大するに至ったのは、質量分析の技術の向上とデータベースの整備によって、以前と比べてタンパク質の同定が行いやすくなったことによる。今やタンパク質の解析を伴う研究にとって質量分析はなくてはならない分析法である。これまで質量分析計といえば、とかく高価で扱いが困難な装置だと考えられていたが、安価で非常に扱いやすい質量分析装置も市販されている。もし、質量分析装置が使える環境であるのなら、ぜひ一度分析を試みてもらいたい。タンパク質の同定が敏速に行えることで研究がより進展するのは間違いない。もし装置がなく依頼を行う場合でも、どのようにして解析がなされているのかを知ることが有益である。本総説において、細かな方法については割愛させて頂いたが、質量分析でタンパク質を同定するまでの一連の流れと認知症などの疾患研究でどのように活用されているのかを簡単に紹介する。

1. 質量分析の種類

質量分析装置で解析を行う際、サンプルをイオン化しなければならない。質量分析におけるイオン化には電子イオン化、化学イオン化、大気圧イオン化、高速原子衝撃、マトリックス支援レーザー脱離イオン化などといったイオン化法が開発されている。また、イオン化された

サンプルを質量分離する分析計は、四重極型、飛行時間型、イオントラップ型、磁場型、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型などが開発されている。現在では様々なイオン化法が使い、質量分析計を連結させて用いることで分子の内部構造をより詳細に得られる装置も市販されている。タンパク質の解析では、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置 (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight / Mass Spectrometry ; MALDI-TOF/MS) および大気圧イオン化法のなかの電ロスプレーイオン化 (ElectroSpray Ionization; ESI)法を用いたESI-MSに、液体クロマトグラフィー (Liquid Chromatography; LC)をつないだ、LC-ESI-MSなどが一般的によく用いられている。

2. 質量分析までの処理

どのようなサンプルを対象にするかによって変わってくるが、疾患プロテオミクスの場合、疾患群と対照群の違いを見つけることが最も重要となる。大まかなアプローチの仕方については図1に示した。SDS電気泳動はほとんどの研究室で最も広く浸透し簡単に行える方法である。そこで、細胞分画等で得られたサンプルは電気泳動を行い、タンパク質を分離する。その後、CBBを用いたタンパク染色によってバンドのパターンに違いがないか比較する。タンパク量が少ない場合には、銀染色ならびにSypro Ruby等の蛍光色素を用い比較を行う。これによって疾患群と対照群の違いがないかを確認する。もし、バンドのパターンに違いが見られればゲルから目的のバンドを切り出し、還元アルキル化を行った後、トリプシン等のプロテアーゼを用い、ゲル内消化を行う。還元アルキル化については、ペプチドのヒット率が上が

連絡先 : 〒474-8511
愛知県大府市森岡町源吾36-3
TEL: 0562-44-5651 内線5043
FAX: 0562-46-8438
E-mail: watsushi@nils.go.jp

るので行うことをお勧めする。違いが見つからない場合は2次元電気泳動で分離を行うのも有効である。2次元電気泳動では多くのタンパク質を分離でき、その全体像が視覚的に捕らえられるという利点がある反面、高分子量のタンパク質や低分子量のペプチド、あるいは極端な等電点を持つタンパク質に関しては分離が困難という欠点もある。こういった場合には、ゲルろ過や逆相などの液体クロマトグラフィーを用い、タンパク質並びにペプチドを分離する方法もある。

血清からバイオマーカーを検索する場合、アルブミンやイムノグロブリンといった大量に存在するタンパク質を除くことで、目的のタンパク質を見つけやすくなる。最近ではアルブミン除去キットやアルブミン、イムノグロブリンG、イムノグロブリンA、トランスフェリン、ハプトグロビン、アンチトリプシンといった血液中に高濃度に含まれるタンパク質の抗体が固定されたアフィニティーカラムが市販されているので、それらを活用し除いたほうが、より微量なタンパク質を同定するために有効である。

認知症などでは脳内に特徴的な構造物の蓄積がみられ、これらを解析する場合、細胞分画によって精製し、解析するのが基本的な方法であるが、病理切片から目的の病変部をLaser Microdissectionを用いて、切り出し解析する方法もある。この方法を用い、アルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD) の凍結切片から特徴的な蓄積物である老人斑を切り出し、amyloid β ペプチドを含む数種のタンパク質が同定されたという報告がある[1]。また、ホルマリン固定された前立腺癌組織のパラフィン包埋切片からのバイオマーカーの同定も報告されている [2]。よって、貴重な剖検脳でホルマリン固定された試料しか残っていない場合でも、組織染色以外にプロテオーム解析が可能となり、疾患研究にとって大きな進展が期待される。例えばLaser Microdissectionのような装置がなくても病変部近傍とそれ以外の部位を切り取り、その違いを質量分析で解析することで目的のタンパク質の検索も可能となる。

塩および濃縮を行っておく方が、より良いスペクトルが得られる。しかしながら、十分なスペクトルが得られているにも関わらず、同定できないことがある。データベースにそのタンパク質がない場合はもちろんであるが、糖鎖など修飾が複数おこっている場合には同定が難しい。

LC-MSではペプチドの質量とフラグメントイオンの質量からタンパク質を同定する。MS/MSスペクトルのピークリストを検索に用い、ペプチド単位で同定することが可能である。微量なタンパク質を解析したい場合には、ナノ高速液体クロマトグラフィー (nano LC) に質量分析装置をつないで解析することで高感度な測定が可能となる。

検索には、それぞれの質量分析装置に付属のソフトあるいはMASCOT (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html)やProteinProspector(<http://prospector.ucsf.edu/prospector/4.27.1/mshome.htm>)など無料で利用できるサイトにアクセスしてタンパク質を同定することができる。



図1 タンパク質同定のためのステップ

3. タンパク質の同定

現在、プロテオーム解析でよく用いられているタンパク質同定方法には、酵素消化によって得られたペプチドの質量分析を行い、その親イオンの質量から同定するといったPeptide Mass Fingerprint (PMF)法とタンデム質量分析 (MS/MS) によってペプチドの質量と内部アミノ酸配列情報を含むフラグメントイオンの質量から同定する方法がある。

通常MALDI-TOF/MSで解析した場合、MS/MSに相当するPost source decay (PSD)で内部アミノ酸配列情報を得られることになっているが、LC-MSによる解析より同定しづらくPMF法でタンパク質を同定するのが主である。よって、MALDI-TOF/MSで同定しようとする場合、できる限りタンパク質を分離しておく方がよい。酵素消化物をアプライする際にはZip-Tip C18などで脱

4. 認知症研究への応用

認知症の分野において、プロテオミクスという言葉が出現する前から、プロテオーム解析の手法を用い、大きな成果を上げているのはADの研究である。ADは病理学的特徴として、老人斑と神経原線維変化の2大蓄積物があげられる。ADの初期の研究では、これら蓄積物のアミノ酸配列分析を中心としたプロテオーム解析が行われ、老人斑の主要構成成分が β amyloidタンパク質であり[3,4]、神経原線維変化の主要構成成分がタウタンパク質であると同定され[5,6]、AD研究の大きなブレイクスルーとなった。蓄積物の解析の結果および家族性ADの原因遺伝子がAPP (amyloid protein precursor)であることが判明し[7-9]、分子レベルの研究が大いに進展した。

ADだけではなく、神経変性疾患においては疾患特異的な構造物の蓄積がみられる。この構造物の主要構成成分を同定することは、その疾患の病態の解明の糸口となる。これらの構造物は種々の溶媒に溶けにくく、解析が困難であったが、この溶けないという性質を逆手にとって、精製し各種プロテアーゼや化学的処理によって断片化し、それらを直接解析していく、あるいは、精製した構造物を抗原として免疫し、その特異抗体を作り、抗体が認識するタンパク質を解析することで構成成分の同定がなされた。

質量分析は構成成分の同定以外にも、リン酸化などの翻訳後修飾部位の同定にも用いられている。神経原線維変化を構成するタウ (PHFタウ) は正常なタウにはみられないリン酸化がされていることが明らかになっていたが、その正確なリン酸化部位の同定に大きな役割を果たした[10,11]。また、PHFタウはユビキチン化されており、その部位の同定にも大きく貢献した[12]。これらの研究ではペプチドをLCで分離し、アミノ酸配列分析と質量分析を組み合わせ、詳細に解析を行っているが、この方法ではかなりのサンプル量を必要とする。現在では質量分析の技術の向上によって、より高感度でリン酸化部位の同定が行えるようになり、PHFタウの新たなリン酸化部位が同定されている[13]。

これらADの蓄積物の解析に用いられた手法は他の認知症の研究にも用いられている。レビー小体型認知症の患者脳に蓄積する α -シヌクレインは質量分析を用いた解析によって、Ser-129がリン酸化されており、この修飾が細胞内の蓄積ならびに繊維化に何らかの作用を及ぼしていることが報告された[14]。また、最近では前頭側頭型認知症に特徴的な蓄積物であるユビキチン陽性封入体を、抗体ないし質量分析を用いた解析で、TDP-43タンパク質が主要な構成成分であることが報告された[15,16]。このタンパク質がどのように前頭側頭型認知症の発症に関わるかについては明らかではないが、構成タンパク質が同定されたことで研究の進展が期待される。

質量分析は疾患のバイオマーカーの探索のツールとしても、よく用いられている。最近ではICAT (isotope-coded affinity tags) 試薬及びiTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantification) 試薬などの安定同位体を含む試薬を用いることによって、タンパク質の同定はもちろんであるが、これまでは困難であった量の比較も行えるようになった。これらの試薬をもちいて脳脊髄液からADなどの認知症に特異的なバイオマーカーを検索する研究もなされている[17,18]。

おわりに

本総説では、認知症の分野で質量分析を用いてなされた研究のほんの一部を紹介したに過ぎず、今や質量分析は認知症以外の様々な疾患の研究においても不可欠な分析法となっている。今後も質量分析を用いた解析はタンパク質同定の最も有効な手段であり、質量分析装置の改良およびデータベースの充実などによって、より高感度

で高精度の解析が可能となるだろう。また、グライコミクス、メタボロミクスなどの新たな研究分野においても質量分析は大きな役割を果たし、それらの解析の中心となるのは間違いない。

本総説がこれからタンパク質の同定を行いたい、あるいは質量分析を行いたいと考えている方にとって少しでも参考になれば幸いである。

引用文献

1. Liao L, Cheng D, Wang J, et al. Proteomic characterization of postmortem amyloid plaques isolated by laser capture microdissection. *J Biol Chem.* 279:37061-37068, 2004.
2. Hood BL, Darfler MM, Guiel TG, et al. Proteomic analysis of formalin-fixed prostate cancer tissue. *Mol Cell Proteomics.* 4:1741-1753, 2005.
3. Glenner GG and Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 120:885-890, 1984.
4. Masters CL, Simms G, Weinman NA, et al. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82:4245-4249, 1985
5. Kondo J, Honda T, Mori H, et al. The carboxyl third of tau is tightly bound to paired helical filaments. *Neuron* 1: 827-834, 1988.
6. Lee VMY, Balin BJ, Otvos L.Jr. et al. A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau. *Science* 251: 675-678, 1991.
7. Tanzi RE, St George-Hyslop PH, Haines JL, et al. The genetic defect in familial Alzheimer's disease is not tightly linked to the amyloid beta-protein gene. *Nature* 329:156-157, 1987.
8. St George-Hyslop PH, Tanzi RE, Polinsky RJ, et al. The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. *Science* 235: 885-890, 1987.

9. Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349:704-706, 1991.
10. Hasegawa M, Morishima-Kawashima M, Takio K, et al. Protein sequence and mass spectrometric analyses of tau in the Alzheimer's disease brain. *J. Biol. Chem.* 267, 17047-17054, 1992.
11. Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, et al. Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau. *J Biol Chem* 270, 823-829, 1995.
12. Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, et al. Ubiquitin is conjugated with amino-terminally processed tau in paired helical filaments. *Neuron* 10, 1151-1160, 1993.
13. Hanger DP, Byers HL, Wray S, et al. Novel phosphorylation sites in tau from Alzheimer brain support a role for casein kinase 1 in disease pathogenesis. *J Biol Chem.* 282:23645-23654, 2007.
14. Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, et al. alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol.* 4:160-164, 2002.
15. Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314: 130-133, 2006.
16. Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, et al. TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 351:602-611, 2006.
17. Zhang J, Goodlett DR, Quinn JF, et al. Quantitative proteomics of cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer disease. *J Alzheimers Dis.* 7:125-133, 2005.
18. Abdi F, Quinn JF, Jankovic J, et al. Detection of biomarkers with a multiplex quantitative proteomic platform in cerebrospinal fluid of patients with neurodegenerative disorders. *J Alzheimers Dis.* 9: 293-348, 2006.

Proteomic analysis of the dementia with mass spectrometry.

Atsushi Watanabe

Department of Vascular Dementia Research, National Institute for Longevity Sciences (NILS),
National Center for Geriatrics and Gerontology (NCGG)
36-3 Gengo, Morioka-cho, Obu-shi, Aichi 474-8511, Japan

The analysis of the protein of human sample is necessary and indispensable to research the disease. The information obtained by analyzing each disease brings an important finding to the clarification. However, the system that can analyze a very small amount protein is necessary because the human sample is valuable and limited. It is a proteomics research with the mass spectrometry for one of the most effective methods to do these now. In this review, it explains the type of mass spectrometry, the pretreatment to the analysis, and the method of identifying the protein about an indispensable mass spectrometer for the analysis of the protein. In addition, how the mass spectrometry is used for the research of dementia is outlined.

Key words: proteomics, mass spectrometry, dementia, Alzheimer's disease

【随 筆】

老化研究事始め—アンチエイジングの行方

三井洋司

徳島文理大学 香川薬学部

はじめに

エイジング自身は病気ではありません。疾病にかかり易くなる基盤が進行するにしても、また、再生能力や予備能力が減っていくにしても、生理的に異常な訳ではないのです。眠るように天寿の死を迎える人はいるのです。だから、アンチエイジングというのは老化の内因的、外因的原因に抗して、最大寿命を延長しようという思想と考えたらよいでしょう。その意味で、Anti-aging medicineというのが治療を目指すとしたら、生物学的な言葉の定義から言っても、矛盾する表現になります。だけど、現状はどうでしょう？

国内でも欧米でも、こうしたanti-aging medicineの学会は商業的に賑わっています。第4話のホルモン療法は医師の介在で、少しは歯止め（時には悪質）になりますが、容易に入手できるサプリメントはどうでしょう。老化を研究しているあなた、相談されて的確に対応できますか？ 一緒に考えましょう。

第5話：サプリメントにアンチエイジングのウソ

巷には、アンチエイジングをうたうサプリメントがあふれています。購入層の入り口は40歳前後の女性。若さを謳歌した後の焦りなのか、片っ端から、試そうとしているそうです。果たして、抗老化の効き目は有るのでしょうか？

ここでいうサプリメントとは、元々は欧米で普及してきたdietary supplementを略した和製英語ですが、病気を治療する医薬品と健康維持に必須な栄養素との間に位置する（どちらでもない）健康用食品です。

ただし、その中には、腎臓病とか糖尿病患者などに使う特定用途食品、厚生省が審査して効用をうたう事を認めた特定保健用食品（いわゆるトクホ）もあれば、12種のビタミンと5種のミネラルに相当し、上限量と下限量が明記される栄養機能食品、さらには健康補助食品あるいは単に健康食品（まだ定義付けはされていない）と通称されるサプリメントがあります。食品でなくとも、肌の美容等につかう、美白剤、保湿剤、紫外線防御剤、肌栄養剤、しみとり剤、毛染め液、育毛剤などが、見かけのアンチエイジング用として、もてはやされます。体全体の老化は止まらず、若返りもしませんが、それなりに快適な健康法でしょう。宣伝に踊らされない範囲でどうぞ。

しかし、特に問題となる健康用食品は、正式には効果を認可されていないのに、美辞麗句で誇大広告している

食材商品です。宣伝が良識から外れる事も有ります。例えば、「肌の老化は美容の大敵です。コラーゲンやヒアルロン酸の不足が起きています。コラーゲンとヒアルロン酸を摂取して、潤いを取り戻しましょう。そして老化研究の大家の顔写真が、その効果を保証する新聞広告」。この類いには、「DNAは高度な生命活動の設計図です。良質のDNAを摂取して健康増進！」と酵母DNAを宣伝している例もあります。食べたらブロックに消化され、違う物質に生合成されるのに、無視しています。しかもアンチエイジング効果さうたっています。健康被害の出るドリンク剤も良く出回ります。

老年医学の雑誌で取り上げられ、evidenceを伴うアンチエイジングのサプリメントとして解説されたものに、イチョウ葉エキス（EGb761）、コエンザイムQ₁₀、ソバポリフェノール（PMP）、L-カルニチン、DHA（ドコサヘキサエン酸）、大豆イソフラボン等があります。これらでさえも、高齢者に多い疾病の症状を改善した論文をあげているにすぎません。植物や、動物、鉱物由来で、古来伝承の食品には、健康への効果が、特定条件で何かしらあるでしょう。しかし、健康人の老化を遅延させる効果を示した例はありません。言い換えれば、私たちが適切な食事、運動等の生活習慣を維持すれば、サプリメントをとる必要がない。よけいに摂取しても抗老化を期待できない、という事です。まず、問題なのは、アンチエイジングの効果を実証するにあたって、寿命への効果とは言いませんが、現状ではその老化マーカーを把握できていないことです。

現在は、何よりもEBM（科学的証拠に基づいた効能）が厳しく求められている。それにも関わらず、医療施設、販売業者、摂取者ともに、アンチエイジングの意味や評価法に対して、鈍感であり、大きな問題となっています。

この世から疾病が消えても、加齢に伴う一定の脆弱化は進みます。老化を「疾病」の一部と誤解する医療者さえいます。「病的老化と生理的老化を峻別すべし」とは、92歳で1昨年なくなった老年病理学者、田内久名誉教授のきつい戒めだった事を忘れてはならないでしょう。

現時点では、サプリメントに、アンチエイジングの効用を謳うべきではないでしょう。

しかし、一部に、理論的根拠がでてきました。活性酸素による老化の機序への介入です。それは次回の第7話で詳細を論じましょう。

その前に、今回はもう一つのアンチエイジングと巷で言われる「CAM」に少し触れておきます。

第6話：相補・代替医療（CAM）のアンチエイジングに 疑義

日本でも、近代西洋医学以外の医療として、いわゆる
伝統医学が盛んです。

鍼、灸、指圧、温泉、マッサージ、瞑想、座禅、ヨー
ガ、気功など健康法として古くから取り入れられていま
す。加えて、比較的最近では、音楽療法、芸術療法、ペッ
ト療法、アロマセラピー、ハーブ、ユーモア療法等も積極
的に利用されるようになりました。そうした諸々の健康法を、
Complementary and Alternative Medicine(CAM)と
よんでいます。このCAMがアンチエイジング法として、
謳われるのはどうしてでしょう。誤解があるからです。

CAMは多くの場合、疾病の治療よりは疾病の予防効
果を期待していると思われます。健康度を高める目的な
ので、単純に、健康寿命を延ばす長寿法と考えられ、あ
たかも、アンチエイジングと同義に使っている学者が多
いのです。

偏りの食事、過食、運動不足、過剰ストレス、喫煙、
深酒といった生活習慣が悪い人に対しては、なるほどこ
れらCAMに予防医学的な効果が期待されます。

しかし、平均寿命や健康寿命は延ばしても、最高寿命
は延ばしません。つまり、これはAnti-disease効果は
あっても、Anti-aging効果は、ないのです。

もちろん、こうした健康法は、Self Medicationの一環
として、おすすめなのですが、老年医学の専門家も、そ
して基礎老化を学ぶあなたも、こんなことで、アンチエ
イジング効果などを謳ってほしくないのです。

さー、それでは、何が抗老化で、寿命延長なのかを、
次回に老化とか寿命の起源と進化について、もっと理解
を深めた後、考え直しましょう。

お楽しみに。

【お知らせ】

日本基礎老化学会第31回大会開催のご案内

樋口 京一

【日本基礎老化学会第31回大会】

大会会長 樋口 京一（信州大学・医学系研究科）
組織委員長 森 政之（信州大学・医学系研究科）
庶務委員 澤下 仁子（信州大学・医学系研究科）
上條千永子（信州大学・医学系研究科）

日時：2008年6月12日（木）、13日（金）
会場：長野県松本文化会館国際会議室（松本市）

大会事務局：〒390-8621 松本市旭3-1-1
信州大学大学院医学系研究科
加齢適応医科学系加齢生物学分野
日本基礎老化学会第31回大会組織委員会
Tel:0263-37-2693, Fax: 0263-37-3428
e-mail:jsbg2008@sch.md.shinshu-u.ac.jp

【特別講演、シンポジウム、パネルディスカッション】 （予定）

特別講演：能勢 博 『予防医療と健康スポーツ：「信州モデル」を核にした長寿健康学の創造』
シンポジウム：構造異常蛋白質と老化疾患
池田修一、後藤祐児、小松雅明、田平武
パネルディスカッション：基礎老化研究の未来（II）
石井直明、井上正康、倉地幸徳、下川 功、白澤卓二
ポスター発表、一般口演

【一般演題募集について】

演題登録・要旨は、例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/>)より所定のファイルをダウンロードし、記入後、E-メールにより大会事務局へ送信して下さい。演題申込と要旨提出の〆切りは2008年3月31日です。原則的に一般演題はすべてポスター発表とし、一部口頭発表をお願いいたします。お送りいただいた要旨は、大会事務局のプログラム委員会に於いて査読し、採択の可否、発表形式、発表日時等を決定いたします。

【参加費】

一般会員：8,000円
学生会員：5,000円
非会員：12,000円

【懇親会費】

一般会員：5,000円
学生会員：3,000円
会場：5 Horn
（松本市中央1-10-30 松本パルコ内1F）
TEL：0263-38-2140

【プログラム概要】

（敬称略）

前日：6月11日（水）
19:00 理事会

第1日目 6月12日（木）
10:00～10:05 開会の挨拶（大会長：樋口京一）
10:05～11:05 口頭発表（I）
11:15～12:15 特別講演
12:30～13:30 ランチョンセミナー
13:30～15:30 ポスター発表（I）
15:30～17:30 パネルディスカッション
18:30～20:30 懇親会

第2日目 6月13日（金）
9:30～10:30 口頭発表（II）
10:30～12:30 ポスター発表（II）
12:30～13:45 評議委員会・昼食
13:45～16:15 シンポジウム
16:15～16:55 総会
16:55～17:00 閉会の挨拶（学会長：丸山直記）

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32巻 第1号

平成20年(2008)1月25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

基礎老化学会サーキュラー 第77号

日本基礎老化学会 Japan Society for Biomedical Gerontology

2008年1月25日 発行

E-mail登録のお願い.....	1
会員移動.....	2

【E-mailについて】

学会事務局と会員の皆様との連絡を迅速に行うため、本学会ではE-mailを活用しています。メールにて会員の皆様に連絡等のご希望がございましたら、事務局宛にご連絡ください。また、メールアドレス登録のお済みでない、あるいは変更された会員の皆様は、アドレスを下記宛にE-mailでお送りください。なお、お持ちでない会員の皆様は事務局までご連絡ください。ご協力よろしくお願ひ申し上げます。

E-mailの運営方法について、ご意見・ご希望等がございましたら学会事務局までお知らせください。

【基礎老化学会ホームページについて】

日本基礎老化学会ホームページは随時更新しています。最新情報が満載です。是非ご覧ください。また、ホームページに掲載を希望する記事等がございましたら、事務局までご連絡ください。

<http://www.tmig.or.jp/jsbg>

入退会、住所変更、会費等についての手続きは、学会事務局へお願いします。また、お問い合わせ等も下記にご連絡ください。

〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2 東京都老人総合研究所内

E-mail : jsbg2006@tmig.or.jp Fax : 03-3579-4776

日本基礎老化学会事務局

庶務幹事 新海 正

【会員異動】

平成19年10月10日～平成20年1月4日

(入会者)

氏名	所属	〒	住所
青木 雅子	横浜国立大学保健管理センター	240-8501	横浜市保土ヶ谷区常盤台79-1

(所属変更)

氏名	所属	〒	住所
石井 勉	㈱ディックライフテック 西日本営業部	541-8525	大阪市中央区久太郎町3-5-19
白澤 卓二	順天堂大学大学院医学研究科 加齢制御医学講座	113-0033	文京区本郷3-3-10-201
重本 和宏	東京都老人総合研究所 老化ゲノムマーカー研究チーム	173-0015	板橋区栄町35-2

(退会者)

齋藤 康、中村理恵、中島光業

【日本基礎老化学会賛助会員】

三菱生命科学研究所研究調整部

明治乳業株式会社 研究本部

株式会社ファンケル中央研究所 フード研究グループ

東京大学総括プロジェクト機構 ジェロントロジー寄付研究部門

基礎老化学会サーキュラー 第77号

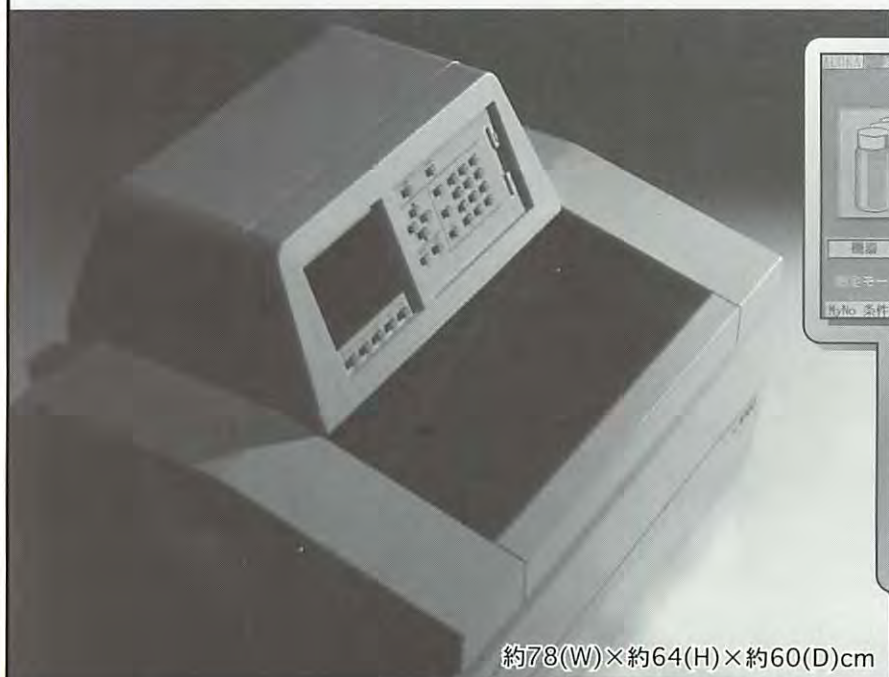
2008年1月25日 発行
日本基礎老化学会

編集委員 内田 洋子 (幹事)
事務局 〒173-0015
東京都板橋区栄町35-2
東京都老人総合研究所

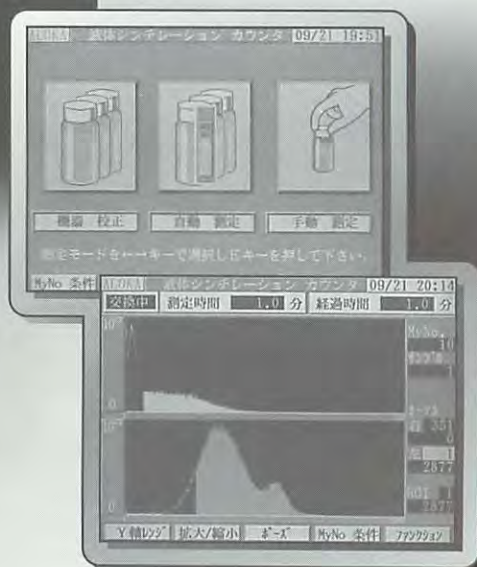
印刷所 三陽工業株式会社

コンパクトボディに 最新機能を凝縮

世界最小クラス、省エネルギータイプの液体シンチレーションシステムです。



約78(W)×約64(H)×約60(D)cm



液体シンチレーションシステム LSC-6000 SERIES

優れた高機能により研究者をサポートします。

- 4000chMCAおよび自動ゲイン切替機能により高分解能測定が可能です。(3H、14C領域において0.05keV/ch)
- コンスタントレシオ機能により、同レベルクエンチングのサンプルを迅速に測定します。
- 自動ウィンドウ設定機能によりバックグラウンドの影響を最小限に抑えます。
- 同一グループに異なる核種の混載が可能です。(オプション)



各種シンチレーションカクテル剤もご用意しております。
輸入元：柔和貿易株式会社
販売元：アロカ株式会社

アロカ株式会社

www.aloka.co.jp

〒181-8622 東京都三鷹市牟礼6丁目22番1号 計測システム営業部 (0422) 45-5131

横浜営業所 (045) 943-3431
旭川営業所 (0166) 35-1121
秋田営業所 (018) 865-5221
静岡営業所 (054) 238-0167
神戸営業所 (078) 652-0708
高松営業所 (087) 866-6012
熊本支店 (096) 370-5688

千葉営業所 (043) 266-2411
仙台支店 (022) 262-7181
郡山営業所 (024) 934-0023
金沢営業所 (076) 240-8033
広島支店 (082) 292-0019
松山営業所 (089) 969-6811
鹿児島営業所 (099) 252-7007

埼玉支店 (048) 623-2501
弘前営業所 (0172) 89-3456
大館営業所 (0240) 32-6581
敦賀営業所 (0770) 25-4551
岡山営業所 (086) 243-4981
高知営業所 (088) 882-5820

新潟営業所 (025) 241-8171
六ヶ所営業所 (0175) 71-0811
水戸支店 (029) 255-1811
大阪支店 (06) 4861-4888
松江営業所 (0852) 25-5649
福岡支店 (092) 633-3131

札幌支店 (011) 722-2205
盛岡営業所 (019) 654-8065
名古屋支店 (052) 805-2660
京都営業所 (075) 383-0030
松山支店 (089) 969-6811
長崎営業所 (095) 862-3601