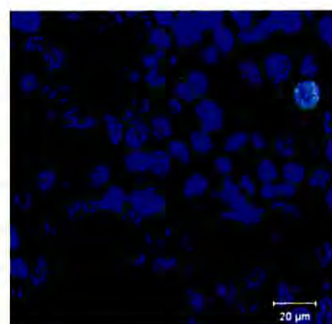
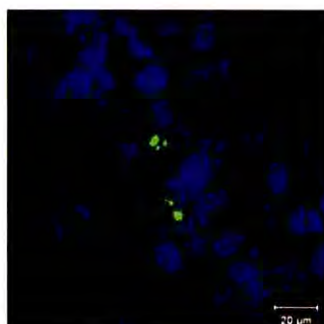
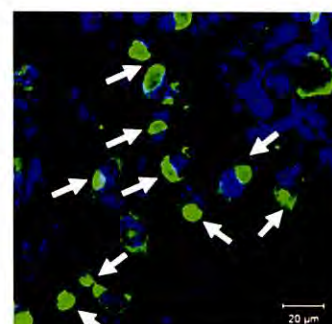


BIOMEDICAL GERONTOLOGY

基礎老化研究

- 総説 ■ **サーチュインと老化**
來生(道下) 江利子
- 総説 ■ **細胞内異常タンパク質凝集体の細胞間伝播:神経変性疾患の病態進行に関する新たなメカニズム**
野中 隆、長谷川 成人
- トピックス ■ **ミトコンドリア酸化ストレス発生 *mev-1* モデルの解析**
石井 恭正
- トピックス ■ **エボジアミンは肥満とインスリン抵抗性を改善する**
山下 均、王 挺、楠堂 達也、竹内 環、李 勇学、喬 善楼、紺谷 靖英、森 望
- トピックス ■ **食にまつわる老化関連疾患—疾患に学ぶ抗老化食—**
白井 厚治
- 対談 ● **細胞老化に意義はあるか** 三井 洋司、後藤 佐多良
- 学会報告 ● **2012 Spring conference of the Korean Society for Gerontology and the 11th Korea-Japan Gerontologist Joint meetingに参加して** 堀田 晴美
- 学会報告 ● **2012 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Molecular Genetics of Agingを終えて** 松田 剛典、丸山 光生
- 学会報告 ● **「老化、代謝、神経生物学」日韓合同会議 (AACL 2012(Seoul))**
大山 恭司
- 研究室紹介 ● **東京都健康長寿医療センター研究所 老化機構研究チーム 老化バイオマーカー研究グループ** 伊藤 雅史
- 書評 ● **「健康に老いる～老化とアンチエイジングの科学」** 後藤佐多良著 丸山 直記
- お知らせ ● **第36回日本基礎老化学会大会のご案内** 森 望
- 附 ● **基礎老化学会サーキュラー 第95号**

pcDNA3- α syn (WT)Seed α SWT + Seed α S

- 編集委員会委員長: 重本 和宏 東京都健康長寿医療センター研究所 老年病研究チーム
〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2
- 編集委員会幹事: 清水 孝彦 千葉大学大学院医学研究院 先進加齢医学講座
〒260-8670 千葉市中央区亥鼻1-8-1
- 編集委員会委員: 内田 さえ 東京都健康長寿医療センター研究所 老化制御研究チーム
〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2
- 大澤 郁朗 東京都健康長寿医療センター研究所 老化制御研究チーム
〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2
- 近藤 嘉高 東京都健康長寿医療センター研究所 老化制御研究チーム
〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2
- 島田 厚良 愛知県心身障害者コロニー 発達障害研究所 病理学部
〒480-0392 愛知県春日井市神屋町713-8
- 樋上 賀一 東京理科大学薬学部生命創薬科学科
〒278-8510 千葉県野田市山崎2641
-

- Editor-in Chief: Kazuhiro Shigemoto, Research Team for Geriatric Medicine,
Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku,
Tokyo 173-0015, JAPAN
- Managing Editor: Takahiko Shimizu, Department of Advanced Aging Medicine,
Chiba University Graduate School of Medicine, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku,
Chiba 260-8670, JAPAN
- Editors: Sae Uchida, Research Team for Functional Biogerontology,
Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku,
Tokyo 173-0015, JAPAN
- Ikuroh Ohsawa, Research Team for Functional Biogerontology,
Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku,
Tokyo 173-0015, JAPAN
- Yoshitaka Kondo, Research Team for Functional Biogerontology,
Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku,
Tokyo 173-0015, JAPAN
- Atsuyoshi Shimada, Institute for Developmental Research, Aichi Human
Service Center, 713-8 Kamiya-cho, Kasugai, Aichi 480-0392, JAPAN
- Yoshikazu Higami, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of
Science, 2641 Yamazaki, Noda, Chiba 278-8510, JAPAN

Change The Bio-Imaging

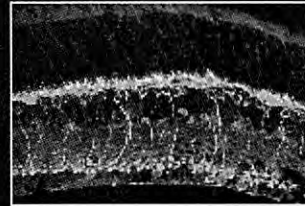
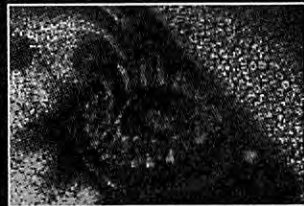
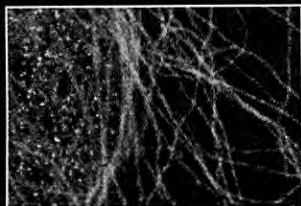
NEW

Leica TCS SP8

ライカ スペクトラル共焦点レーザー顕微鏡システム

最先端の、その先へ。限界に挑み続けてきたライカが、またバイオイメージングの歴史を塗りかえる。画像のクオリティ、レスポンス、操作性。全てを極限まで研ぎ澄ました、未体験のマイクロスコープ。研究者の飽くなき探究心に、ライカ史上・最高の性能が応えます。

- HyD 超高感度ハイブリッドディテクター
- Lucid Vision Optics 最新のコーティング技術を導入
- LIAchroicビームスプリッター 抜群のコントラスト
- 新グラフィカルインターフェース+コントロールパネル さらに快適な操作性
- 固体レーザー群/ガスレーザー群 豊富なラインナップ
- 広視野・高解像スキャン 視野数22、8192²画素
- 新型ポイント高速スキャナ ポイントスキャナの最高速を更新
- 新設計CS2対物レンズ群



Leica
MICROSYSTEMS

ライカ マイクロシステムズ 株式会社

本社 〒108-0072 東京都港区白金1-27-6白金高輪ステーションビル6F Tel.03-5421-2813 Fax.03-5421-2891
大阪 Tel.06-6374-9771 / 名古屋 Tel.052-222-3939 / 福岡 Tel.092-282-9771

≫URL <http://www.leica-microsystems.co.jp> ≫E-mail: lmc@leica-microsystems.co.jp



私たちの遅れが、
研究の遅れになってはいけない。

今、さまざまな場所で、さまざまな生命科学に関する研究が行われています。それは、現代の医学では治せない病の研究だったり、人のカラダの仕組みを解明する研究だったりします。私たちは、そんな研究の素となる、抗体、タンパク質、有機・無機化合物、各種測定キットなど数多くの研究用試薬を国内外へ提供。発展し続けるライフサイエンス分野の最新研究動向を的確に把握し、さまざまなニーズに応えた戦略を展開しています。私たちが動向を把握していないことで、ある研究が進まない。そんなことがないように、研究者の方々の信頼を得ながら、これからも研究用試薬をお届けしていきます。

研究を、研究したい。

岩井化学薬品株式会社

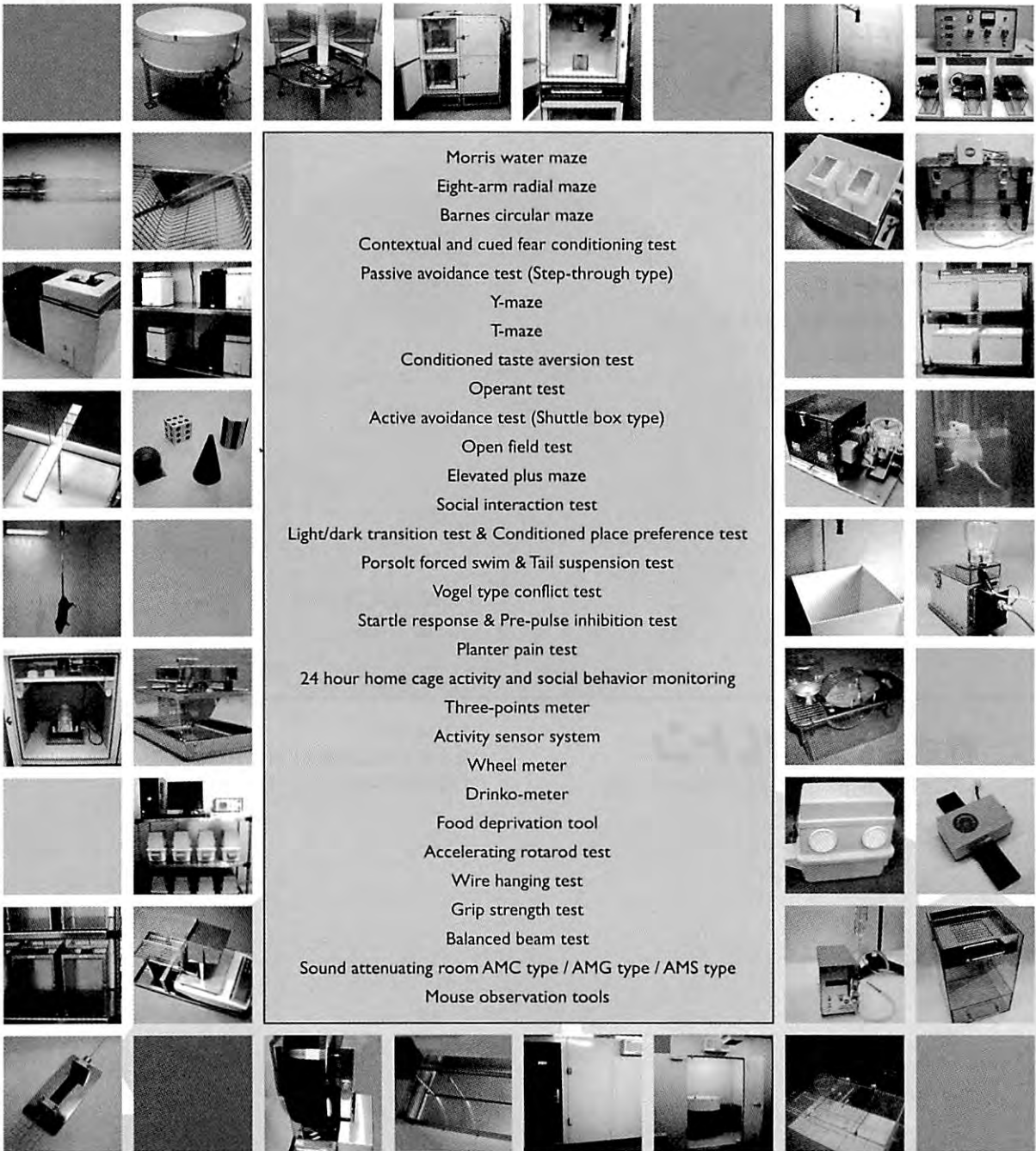
〒103-0023 東京都中央区日本橋本町3-2-10
TEL:03-3241-2572 FAX:03-3270-2444

www.iwai-chem.co.jp

O'HARA & CO., LTD.

4-28-16 Ekoda, Nakano-ku, Tokyo 165-0022, JAPAN
 TEL 81-3-3389-2451
 FAX 81-3-3389-2453

- DFCR
- DFCR1
- DFCR4
- EP1
- EP2
- LD1
- LD4
- CSI1
- SSI
- TIME
- MWM
- ERM
- BCM
- TM1
- YM1
- YM2
- FZ1
- FZ4
- HP4
- VD8
- FC8
- FC12
- SR2
- SR4
- HC8
- FW1



Morris water maze
 Eight-arm radial maze
 Barnes circular maze
 Contextual and cued fear conditioning test
 Passive avoidance test (Step-through type)
 Y-maze
 T-maze
 Conditioned taste aversion test
 Operant test
 Active avoidance test (Shuttle box type)
 Open field test
 Elevated plus maze
 Social interaction test
 Light/dark transition test & Conditioned place preference test
 Porsolt forced swim & Tail suspension test
 Vogel type conflict test
 Startle response & Pre-pulse inhibition test
 Planter pain test
 24 hour home cage activity and social behavior monitoring
 Three-points meter
 Activity sensor system
 Wheel meter
 Drinko-meter
 Food deprivation tool
 Accelerating rotarod test
 Wire hanging test
 Grip strength test
 Balanced beam test
 Sound attenuating room AMC type / AMG type / AMS type
 Mouse observation tools

www.ohara-time.co.jp

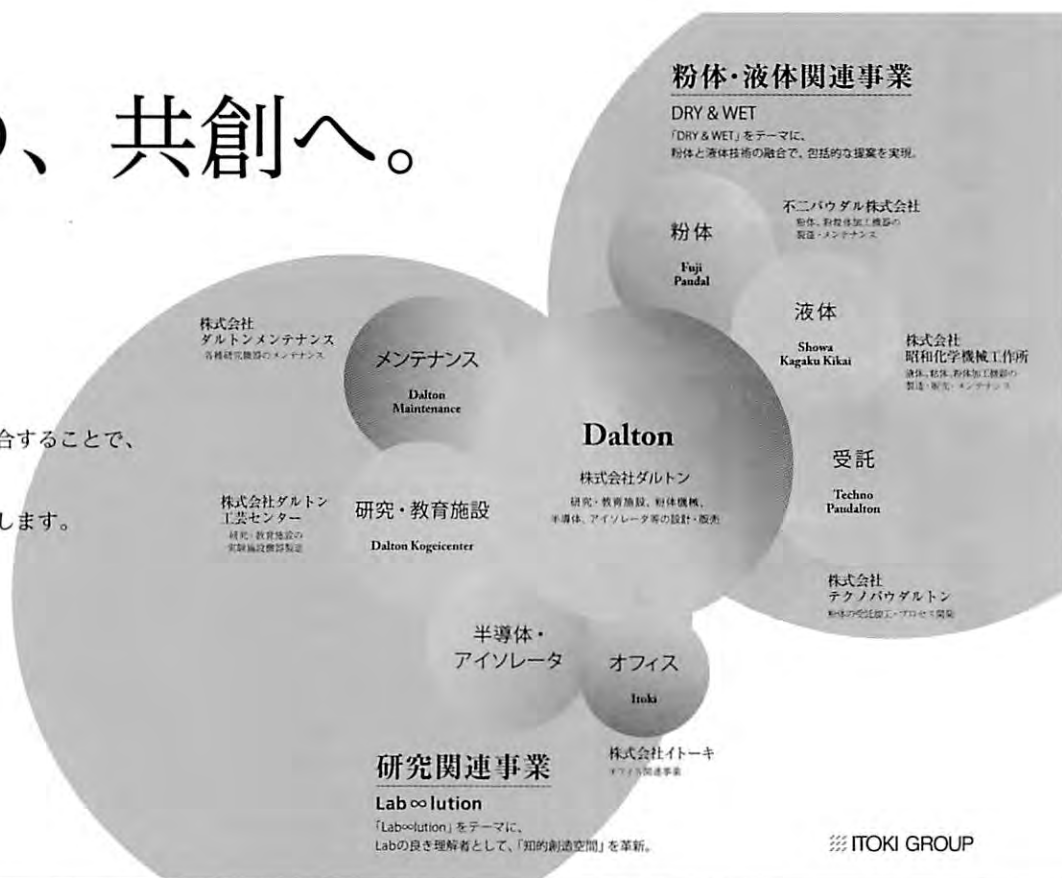
〒165-0022 東京都中野区江古田4-28-16 TEL 03-3389-2451 FAX 03-3389-2453 小原医科産業株式会社

TIME IS ALWAYS ON YOUR SIDE

創造の、共創へ。

—創造の、共創へ。—

私たちダルトングループは、
おのこの知と技術を結集し、
お客様のあらゆる創造活動と融合することで、
革新的な価値を共に創造し、
豊かな社会と輝ける未来に貢献します。



株式会社 **ダルトン**

www.dalton.co.jp/ info@dalton.co.jp

〒104-0045
東京都中央区築地5丁目6-10 浜離宮パークサイドプレイス
TEL03-3549-6810 FAX03-3549-6851

【日本基礎老化学会賛助会員一覧】

下記の諸団体が賛助会員として本学会を支えています。協力を感謝いたします。

賛助会員は随時募集しております。事務局にお問い合わせください。

あなたの会社も老化研究を支えてみませんか？入会をお待ちしています。

株式会社 明治 研究本部

株式会社ファンケル総合研究所

東京大学高齢社会総合研究部門

小林製薬 中央研究所 研究部

東レ株式会社 医薬医療事業本部

日本水産株式会社

株式会社 ライフイズ

株式会社 小原医科産業

株式会社 ブレインサイエンス・アイデア

岩井化学薬品株式会社

株式会社 DALTON

テクニプラスト・ジャパン株式会社

ライカマイクロシステムズ株式会社

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（但し、当面は年3回）発行される。内容は、本学会員より投稿された、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、3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。

投稿規定

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、研究報告はインターネット上に公開される。
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、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：初出箇所にフルタ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 [] で括弧表示する。

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, 田久保海誉 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(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。
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. 原稿の送付およびその他の問い合わせ、下記宛てにe-mailで。

編集委員会委員長: 重本和宏 (kazshige@tmig.or.jp)

または、編集幹事: 清水孝彦 (shimizut@chiba-u.jp)

目 次

総説

サーチュインと老化

來生 (道下) 江利子.....1-6

総説

細胞内異常タンパク質凝集体の細胞間伝播：神経変性疾患の病態進行に関する新たなメカニズム

野中 隆, 長谷川 成人.....7-11

トピックス

ミトコンドリア酸化ストレス発生 *mev-1* モデルの解析

石井 恭正.....13-20

トピックス

エボジアミンは肥満とインスリン抵抗性を改善する

山下 均, 王 挺, 楠堂 達也, 竹内 環, 李 勇学, 喬 善楼, 紺谷 靖英, 森 望.....21-23

トピックス

食にまつわる老化関連疾患－疾患に学ぶ抗老化食－

白井 厚治.....25-28

対談

細胞老化に意義はあるか

三井 洋司, 後藤 佐多良.....29-32

学会報告

2012 Spring conference of the Korean Society for Gerontology and the 11th Korea-Japan Gerontologist Joint meetingに参加して

堀田 晴美.....33-34

2012 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Molecular Genetics of Agingを終えて

松田 剛典, 丸山 光生.....35-36

「老化、代謝、神経生物学」日韓合同会議 (AACL 2012 (Seoul))

大山 恭司.....37-38

研究室紹介

東京都健康長寿医療センター研究所 老化機構研究チーム 老化バイオマーカー研究グループ

伊藤 雅史.....39

書評

「健康に老いる～老化とアンチエイジングの科学」後藤佐多良著

丸山 直記.....41

お知らせ

第36回日本基礎老化学会大会のご案内

森 望.....43-44

附

基礎老化学会サーキュラー 第95号

CONTENTS

<REVIEW>

Sirtuins and Aging

Eriko Michishita-Kioi.....1-6

<REVIEW>

Cell-to-cell propagation of intracellular aberrant protein aggregates: New possible mechanisms on the progression of neurodegenerative diseases

Takashi Nonaka, Masato Hasegawa.....7-11

表紙：シード依存的な細胞内 α シヌクレイン蓄積の培養細胞モデル

詳しい説明は7ページ（総説）を参照

【総 説】

サーチュインと老化

來生（道下） 江利子

第一三共株式会社・研究開発本部・先端医薬研究所

要約

サーチュインは長寿遺伝子とよばれ、いまや科学に直接たずさわる者だけではなく一般の人々にも広く知られる存在となった。サプリメントや薬、また食事制限などでサーチュインを活性化させることで健康長寿を目指す試みがなされている。そして世界中の研究者がこの領域にこぞって参入したことから、競争はますます激しくなり、新しい知見がつぎつぎと見出されている（図1）。しかしその一方でNatureなどの一流誌にサーチュインの過去の研究を覆すnegative dataが掲載され、またそれに応酬する形で論文が出されるなど前例のない事態がおきている。本稿では、サーチュイン発見の歴史と最新の研究の動向を紹介する。

キーワード：サーチュイン、長寿、カロリー制限、老化関連疾患、脱アセチル化酵素

<長寿遺伝子として>

Sir2遺伝子（サーチュイン）はHM loci, テロメア、及びrDNA領域のクロマチンサイレンシング因子の一つとして出芽酵母で見出された。その後、米マサチューセッツ工科大学のGuarente博士等によって、Sir2遺伝子を1コピー過剰に発現させると寿命が約30%伸び、逆にSir2に変異を導入すると寿命が約半分に短縮することが発見された。出芽酵母では、rDNA領域が切り出されて細胞にとって有害な extrachromosomal rDNA (ERC) が形成され蓄積することで老化が引き起こされるが、Sir2はこのERCの形成を抑制する^{注1)}。さらにサーチュインを過剰発現させると、酵母だけではなく線虫やショウジョウバエといった多細胞生物の寿命も延ばすことが見出され、次第に長寿遺伝子とよばれるようになっていった。

しかしここまで注目されるようになったのは、サーチュインがカロリー制限の主要なメカニズムとして関連付けられたことが大きい。以前より摂取カロリーを制限することで様々な生物の寿命が延びることが実験的に示されており、現在わかっている中で唯一確実に寿命を延ばすことのできる方法であると考えられている^{注2)}。また寿命を延ばすだけでなく、見た目を若く保ち、運動機能を改善し、さらに生物学的な老化が背景にあると考えられる老化関連疾患とよばれるさまざまな疾患（代謝疾患、がん、心疾患、神経疾患、免疫疾患など）を抑制する。酵母、線虫、またショウジョウバエを用いた研究

では、サーチュインを欠損させるとカロリー制限による寿命の延長がみられなくなることから、サーチュインがカロリー制限のメカニズムの中で中心的な役割を持ち、サーチュインを活性化することで、カロリー制限でみられるような抗老化と長寿命が得られると考えられるようになった¹⁾。

<酵素活性の発見>

上述したように、サーチュインはクロマチンサイレンシング因子として見いだされたが、その生化学的な機能については長らく不明であった。1999年に、Sir2がADP-リボース転移酵素活性を示すことが複数のグループから報告されたがこの活性は非常に弱いものであった。しかしほぼ時を同じくして、現ワシントン大学の今井博士等が、ヒストンH4の16番目のリジンがアセチル化されているペプチド（H4K16ac）を基質にして質量分析で解析したところ、Sir2がNAD⁺依存的に脱アセチル化することを見出した。この活性はADP-リボース転移酵素

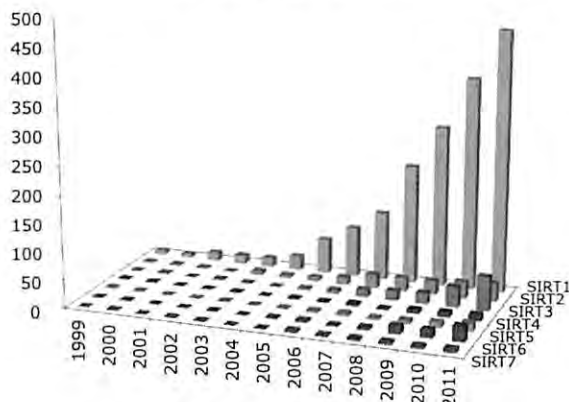


図1 SIRT1-7の論文数の年次推移

連絡先：〒140-8710
東京都品川区広町1-2-58
Tel: 03-3492-3131
Fax: 03-5740-3644
E-mail: kioi.eriko.ur@daiichisankyo.co.jp

活性に比べて非常に強く、またH4K16の脱アセチルはクロマチンのサイレンシングに必須であることから、Sir2の主要な酵素活性であることが強く示唆された²⁾。その後、他のサーチュインファミリーでも同様に脱アセチル化酵素活性があることが示され、ヒストン以外の基質も多く見つっている。

タンパク質のアセチル化修飾は可逆的な反応で、他の翻訳修飾と同様に、DNA-タンパク間の結合、細胞内局在、タンパクの安定化、タンパク間相互作用、酵素活性などに関わる。サーチュインの活性はNAD⁺依存性であることから、細胞内のエネルギー状態のセンサーとして働き、基質タンパク質のアセチル化を調節することでさまざまな細胞機能を制御していると考えられる。

<哺乳類サーチュインについて>

ヒトを含めた哺乳類のゲノム上には7種類のサーチュイン (SIRT1-7) が存在する。酵素活性部位であるサーチュインドメインの配列はよく保存されているが、全体的な相同性はそれほど高くはない。筆者らが細胞内の局在を調べたところ、SIRT1、SIRT6、SIRT7は主に核内に局在するが、SIRT6はヘテロクロマチン領域に、またSIRT7は核小体によく局在することが分かった。SIRT2は主に細胞質に局在し、細胞周期依存的に核内にも局在する。一方他のサーチュイン (SIRT3,4,5) はミトコンドリアに局在する。SIRT3は不活性型の前駆体タンパク質として細胞質で翻訳され、ミトコンドリアに移行した後に、N末側の100アミノ酸残基が切断されることで活性化型となる³⁾。またSIRT3については一部核内にも局在している。このようにSIRT1-7は、細胞内の局在が異なることから、それぞれ異なる細胞機能を制御していると考えられる。以下にそれぞれのSIRTの生理活性、生物学的役割などについて述べる。

<SIRT1>

SIRT1は、酵母Sir2に高いDNA相同性を示すことから特に注目され、SIRT1-7の中で最も解析が進んでいる。Sir2と同様に、*in vitro*で非常に強い脱アセチル化酵素活性をもつ。ヒストン以外にもSIRT1の基質として、がん抑制遺伝子p53や、ストレス応答やアポトーシス制御などに関わるFOXO3、炎症や免疫応答などに関わるNF- κ B、筋分化の制御因子MyoDや、血管新生に関わるeNOS、また核内受容体のPPAR γ コファクター1(PGC1 α)などがある。このようにSIRT1は生命現象に関わる重要なタンパク質を制御して細胞機能を調節している。詳細については文字数の関係で割愛するが、多くの総説がだされているので参照されたい¹⁾。

SIRT1の発現はカロリー制限により、複数の組織 (骨格筋、脳、腎臓、肝臓、白色脂肪組織など) で上昇する^{注2)}。この現象はマウスなどだけではなくヒトでもみられている。SIRT1を過剰発現するSIRT1トランスジェニックマウスは、耐糖能が高く、血中コレステロール値やインスリン値が低いなど、カロリー制限をしたマウスでみられるように代謝状態が良好である。一方で、SIRT1を全身

性にノックアウトしたマウスでは、カロリー制限をしても、運動機能の改善や寿命の延長がみられなくなることからも、SIRT1はカロリー制限の生理応答に重要な役割を果たすと考えられる⁴⁾。しかし、SIRT1のトランスジェニックマウスが複数の研究室で作製されたが、良好な代謝状態に加えて加齢による発がんの抑制などがみられるものの、いずれも寿命の延長はみられていない。

<SIRT2>

SIRT2もSIRT1と同様に*in vitro*で非常に強い脱アセチル化酵素活性を示す。SIRT2の基質として、 α -チューブリン、ヒストンH4、FOXO1/3、PEPCK1などが見出されている。SIRT2によるFOXO1の脱アセチル化は脂肪細胞の分化を抑制し、また脂肪細胞でSIRT2を過剰発現すると脂肪が分解 (lipolysis) される。これらのことからSIRT2は脂肪代謝を制御していると考えられている⁵⁾。

またSIRT2はがん抑制遺伝子としても働くことが示唆されている。SIRT2の発現は、神経膠腫 (グリオーマ) や悪性黒色腫 (メラノーマ) で低下しており、グリオーマの細胞でSIRT2を過剰発現させるとコロニー形成が阻害される⁶⁾。またSIRT2のノックアウトマウスでは発がん率が上昇する。興味深いことに、がんの発生部位には性差があり、雌で乳がんの、そして雄で肝細胞がんの発生率が上昇する。

一方、中枢神経系でのSIRT2の働きも興味深い。パーキンソン病 (PD) はアルツハイマー病 (AD) に次いで頻度が高く、加齢にともない発症リスクの高まる神経変性疾患である。 α -synuclein蛋白の蓄積と封入体形成が神経細胞変性の原因であると考えられているが、SIRT2を阻害すると α -synucleinの封入体形成が抑制され、神経毒性が軽減される⁷⁾。またSIRT2の阻害はドーパミン作動性ニューロンの細胞死を抑制や、ハンチントン病でもSIRT2の阻害が有用であることが報告されていることから、神経疾患に対する創薬標的として注目されている。

<SIRT3>

ミトコンドリアでは多くのタンパク質がアセチル化されており、エネルギー代謝に関わるタンパク質が多く含まれる。SIRT3を欠損させたマウスでは、他のサーチュイン (SIRT4とSIRT5) 存在下でもミトコンドリアに局在する多くのタンパク質のアセチル化が亢進することから、SIRT3はミトコンドリアの主要な脱アセチル化酵素であると考えられる⁸⁾。

SIRT3は、カロリー制限や絶食によって肝臓や脂肪組織で発現が顕著に亢進される。一方でSIRT3をノックアウトしたマウスの肝臓では、絶食時でも脂肪酸酸化の中間代謝物や中性脂肪の蓄積が認められるようになる。これらの結果は、SIRT3がカロリー制限においてミトコンドリアの代謝調節機能に重要な働きをしていることを示す。

野生型のマウスに高脂肪食 (HFD) を与え続けると、メタボリックシンドロームの症状である肥満、高脂血症、

2型糖尿病、インスリン抵抗性、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) などが引き起こされる。SIRT3をノックアウトすると、これらの症状は加速し、IL-6やTNF- α などの炎症性サイトカインの発現が上昇する。最終的にSIRT3ノックアウトマウスのほとんどが、肝細胞癌を発症する。興味深いことに、白人のNASHの患者では、SIRT3遺伝子にSNP(rs11246020)が見つかっている。これはSIRT3の酵素活性を不活性化させる多型である。

老人性難聴は、加齢ともなう進行的な聴力の衰えで、主な原因は内耳にある末梢感覚器である蝸牛のラセン神経節細胞や有毛細胞の喪失や障害である。カロリー制限は、多くの老化関連疾患の発症や進行を抑制できるが、老人性難聴もその一つである。SIRT3をノックアウトすると、ラセン神経節細胞および有毛細胞に異常がみられ、カロリー制限による老人性難聴の改善はみられなくなる。これはSIRT3によるイソクエン酸脱水素酵素2の活性化を介した活性酸素の濃度低下がみられなくなったことで、蝸牛の細胞死の抑制がおきなくなったことによる⁹⁾。

<SIRT4>

SIRT4はグルタミン脱水素酵素 (GDH) を阻害して膵 β 細胞のインスリン分泌を制御したり、脂肪酸酸化を調節していると考えられている。しかしその酵素活性やミトコンドリアにおける機能はほとんどわかっていない。SIRT4はADP-リボシル基転移酵素活性を有することが報告されているものの、一般的なADPリボシル基転移酵素と比べてその活性は非常に弱く、他の酵素活性や基質があるのではないかと考えられている¹⁰⁾。

<SIRT5>

SIRT5も、SIRT3とSIRT4と同様にミトコンドリアに局在するが、その酵素活性はユニークで、NAD⁺依存的にリジンの脱スクニル化と脱マロニル化する活性をもつ。この反応は非常に特異的で、アセチル基に比べてスクニル基およびマロニル基を効率良く加水分解する。また、SIRT5をノックアウトしたマウスでは、多くのタンパク質でマロニル化とスクニル化の顕著な亢進がみられるので、SIRT5は主要な脱スクニル化酵素、脱マロニル化酵素であると考えられる¹¹⁾。マロニル化やスクニル化を受けるタンパク質として代謝酵素が見出されていることから、SIRT5もSIRT3と同様に代謝経路を制御していると考えられているが、リジン残基のマロニル化やスクニル化修飾がタンパク質の機能にどのような影響を与えるかはほとんどわかっておらず今後の課題である。一方で、SIRT5は脱アセチル化酵素であることも報告されており、1型カルバミルリン酸合成酵素 (CPS1) を脱アセチル化して尿素回路を制御していると考えられている。

<SIRT6>

SIRT1からSIRT7まで全てのノックマウスが作製されているが、SIRT6のノックアウトマウスが最も顕著な早期老化様症状を示す。SIRT6のノックアウトマウスは、

生後約2~3週までは正常に発育するが、その後急速に、皮下脂肪の低下、骨密度の低下、脊柱彎曲、リンパ球の減少などの老化様症状を呈し、約1ヶ月で死に至る¹²⁾。

筆者達は、ヒストンのアセチル化ライブラリーを用いたスクリーニングを実施したところ、SIRT6がヒストンH3の9番目や56番目のリジンを特異的に脱アセチル化することを見出した¹³⁻¹⁵⁾。同じく核内に局在するSIRT1とは異なり基質特異性が非常に高いことが特徴としてあげられる。また先述したように他のサーチュインに比べてin vitroでの脱アセチル化酵素活性は弱いですが、SIRT6をノックアウトしたマウスの神経細胞では、SIRT1やSIRT2を含む他ヒストン脱アセチル化酵素 (HDACs) の存在下でも、H3K9とH3K56のアセチル化が共に顕著に亢進することから、SIRT6は主要な脱アセチル化酵素として働いていると考えられる。

またSIRT6はヒストンの脱アセチル化を介してさまざまなクロマチンのメタボリズムに働くこともわかってきた¹³⁻¹⁵⁾。例えば染色体末端のテロメアへ特異的に結合して、H3K9とH3K56を脱アセチル化することでテロメアのクロマチンを安定化している。SIRT6を欠損させると、早期老化症であるウエルナー症候群の原因遺伝子であるWRNのテロメアへの結合が阻害される。そして末端融合などのテロメア異常が引き起こされて細胞老化が誘導される¹³⁾。また最近ではテロメア領域における遺伝子発現の抑制にも関与していることも見出されている。

さらにSIRT6は、炎症、免疫、細胞増殖、アポトーシス、老化などさまざまな生命現象にかかわる重要な転写因子NF- κ Bの転写制御に働く。NF- κ BはTNF- α などの刺激に応答して活性化され、細胞質から核内へ移行する。SIRT6はRELA (NF- κ Bのサブユニット) に結合して、NF- κ Bの標的遺伝子のプロモーターへリクルートされ、その領域のH3K9の脱アセチル化を誘導する。この結果、RELAはプロモーターから解離して、NF- κ Bによる転写は終結する。SIRT6ノックアウトマウスではNF- κ Bによる転写が恒常的に活性化されており、NF- κ Bを抑制するとSIRT6ノックアウトマウスの早期老化様症状がみられなくなり寿命が回復する¹⁶⁾。すなわちNF- κ Bの恒常的な活性化が老化様症状の引き金となっており、正常な状態ではSIRT6がNF- κ Bの転写を厳密に制御していると考えられる。

SIRT6は代謝制御にも関わっている。例えばSIRT6は転写因子HIF1- α に結合して糖代謝に関わる遺伝子の発現を制御する。SIRT6を抑制すると、糖代謝に関わる遺伝子の発現が上昇し、細胞への糖の取り込みが活発になる¹⁷⁾。この現象はSIRT6をノックアウトしたマウスが低血糖となる一因となっている。また神経細胞特異的にSIRT6をノックアウトすると、成長ホルモン (GH) やIGF-1が低下し、生後間もなくは成長遅延がみられるが、成熟したSIRT6ノックアウトマウスは肥満となる¹⁸⁾。これはヒトで肥満の原因となることが知られている神経ペプチドPOMC、SIM1やBDNFの発現低下によると考えられる。詳細な分子メカニズムは不明だが、脳においてSIRT6の基質のエピジェネティックマークであるヒス

トンH3K9acのレベルが顕著に亢進していることから、遺伝子発現の変化によるものであると考えられる。また肝特異的にSIRT6をノックアウトすると、糖代謝、中性脂肪の合成、脂質代謝に異常をきたし、脂肪肝になることから、SIRT6が代謝制御の中で重要な働きをもつと考えられる。なおヒトの脂肪肝でもSIRT6の発現量の低下がみられる¹⁹⁾。

SIRT6を全身性に過剰に発現させたSIRT6トランスジェニックマウスは、高脂肪食を与えても、中性脂肪の合成や、高脂血症、体脂肪の増加、また糖耐性の低下などに対して耐性となる。これはカロリー制限でみられる効果とよく似ている。また重要なことに雄に特異的ではあるものの、SIRT6のトランスジェニックマウスは、コントロールの野生型のマウスに比べて、約10~17%寿命が延びる。このマウスでは、IGF-1のシグナル経路の抑制がみられる。IGF-1のシグナルを伝える遺伝子の欠損はさまざまな生物種で寿命を延ばすことが知られており、またカロリー制限でもこのシグナルが抑制されることから、老化や寿命との関連が深い²⁰⁾。

さらに最近では、SIRT6ががん抑制遺伝子として働いていることや²¹⁾、SIRT6の活性化はIGF-1-Aktのシグナルを阻害し心肥大を抑制することが報告されるなど²²⁾、老化関連疾患における重要性も明らかにされつつある。

<SIRT7>

SIRT7は生化学的活性や生理学的機能についてほとんど知られていなかったが、筆者達はごく最近SIRT7がNAD⁺依存的にヒストンH3の18番目のリジンを特異的に脱アセチル化することを報告した。またChIP-seq法による全ゲノム結合解析などから、SIRT7が特定の遺伝子のプロモーターに結合し、H3K18acを脱アセチル化することで転写を抑制していることを見出した。SIRT7が制御する遺伝子の多くには、がんに関連する遺伝子が多く含まれており、また半分以上の遺伝子のがん遺伝子ELK4との結合を介していると考えられる。がん細胞のSIRT7の発現を抑制すると、足場非依存性増殖や接触阻害の喪失などのがん細胞の形質維持が失われる。またマウスにおけるがん細胞の腫瘍形成能は、SIRT7の抑制でいちじるしく阻害されることから、SIRT7によるH3K18acの脱アセチル化活性は、がん細胞の増殖や形質維持に働いていると考えられる²³⁾。一方で、SIRT7が制御している遺伝子に数多くのリボソーマルタンパク質が含まれている。細胞に依存するようだが、SIRT7はrRNAの転写を制御しているという報告もあることから²⁴⁾、SIRT7がタンパク質合成系を制御している可能性が考えられる。興味深いことに、リボソーマルタンパク質をコードしている遺伝子の欠失や翻訳の阻害が、老化や寿命の延長に関わっていることがさまざまな生物種で知られている。また、SIRT7のノックアウトマウスはストレーンに依存するが、心疾患がみられ寿命が短くなる²⁵⁾。老化関連疾患や寿命におけるSIRT7の役割を明らかにしていくことは今後の課題である。

<さいごに>

サーチュインが寿命を延ばすということが発見されてから約10年がたった。この間、哺乳類を含む様々な生物でサーチュインを中心とした研究が多くなされ、老化研究は大きく進展したと考えられる。また赤ワインにふくまれるポリフェノールの一種であるレスベラトロールが、サーチュインを活性化してカロリー制限を模倣することを示す結果も報告され、人類の夢の一つである健康長寿をかなえるための大きな一歩であると考えられた。

ところが、レスベラトロールによるサーチュインの活性化を否定する論文や、サーチュインが寿命を延ばすという初期の研究結果を否定する論文が一流誌に掲載されるなど、前例のない事態がおきている。前者については、レスベラトロールやその類似化合物がSIRT1を活性化するとされてきたが、これはSIRT1の基質に結合させた蛍光タグによるアーティファクトで、SIRT1に直接作用するものではないということが報告されたのである²⁶⁾。しかしその後、サーチュインに直接作用する活性化剤が得られ、現在、2型糖尿病、心疾患、自己免疫疾患に対する治療薬として臨床開発中である (<http://www.sirtrispharma.com/index.html>)。後者については、当初Sir2を過剰発現させると線虫やショウジョウバエの寿命が延びることが報告されていたが、最近になってこの現象は遺伝的背景による影響によるものが大きく、Sir2の効果ではないということがNature誌に報告されたのである²⁷⁾。ところがその一方で、線虫の遺伝的背景による影響をなくしたとしても、Sir2を過剰発現させることで約10%の寿命が延長することを報告する論文が同じ号に出され²⁸⁾、科学的真理は現時点では不明であると考えられる。一つ確実に言えることは、遺伝子操作がしやすく寿命も比較的短い線虫やショウジョウバエは老化のモデル生物として汎用されているが、遺伝的背景と適切なコントロールの使用が非常に重要であることを再認識させられたことである。

しかし本稿で述べたように、哺乳類において、カロリー制限や、代謝疾患、がん、心疾患、神経疾患、免疫疾患などの老化関連疾患との関連がつつぎと見出されており、サーチュインが老化や老化関連疾患において重要な分子であることは疑いない。一方でサルを用いた研究から、カロリー制限による抗老化や長寿の作用は、総摂取カロリーだけで論じられるほど単純なものではなく、食餌の内容や遺伝的背景に影響を受ける可能性が示唆されるなど、当初考えられていたよりも複雑であることがわかってきた^{注3)}。老化の分子メカニズムの本格的な研究はまだ始まったばかりだが、高齢化は世界的な問題で深刻さを増していることから、このような一連の研究を通じて老化や老化関連疾患のメカニズムを明らかにしていくことはますます重要になっていくであろう。

注1) ERCの蓄積による老化誘導は酵母に特異的な現象であると考えられている。

注2) カロリー制限によるSIRT1の発現変化は種差があり、また細胞種によっても異なることが示唆されている。

例えばカロリー制限をしたラットの肝臓ではSIRT1の発現は増加するが、マウスの肝臓では増えるどころかむしろ減少することが報告されている²⁹⁾。

注3) 米国ウィスコンシン大学と米国立加齢研究所の2箇所で、サルを用いた検証が行われた。両研究所で結果は異なり、摂取カロリーを単純に制限するだけでは長寿にはならず食餌の内容などに大きく影響を受けることが示唆されている^{30,31)}。

<参考文献>

1. Imai S and Guarente L. Ten years of NAD-dependent SIR2 family deacetylases: implications for metabolic diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2010 31(5):212-20.
2. Imai S, Armstrong CM, Kaeberlein M, et al. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature.* 2000 403(6771):795-800
3. Michishita E, Park JY, Burneskis JM, et al. Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol Biol Cell.* 2005 16(10):4623-35.
4. Bordone L, Cohen D, Robinson A, et al. SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction. *Aging Cell.* 2007 6(6):759-67.
5. Wang F, Tong Q. SIRT2 suppresses adipocyte differentiation by deacetylating FOXO1 and enhancing FOXO1's repressive interaction with PPARgamma. *Mol Biol Cell.* 2009 20(3):801-8
6. Hiratsuka M, Inoue T, Toda T, Kimura N, et al. Proteomics-based identification of differentially expressed genes in human gliomas: down-regulation of SIRT2 gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 309(3):558-66.
7. Outeiro TF, Kontopoulos E, Altmann SM, et al. Sirtuin 2 inhibitors rescue alpha-synuclein-mediated toxicity in models of Parkinson's disease. *Science.* 2007 317(5837):516-9.
8. Hirschey MD, Shimazu T, Huang JY, et al. SIRT3 regulates mitochondrial protein acetylation and intermediary metabolism. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2011 76:267-77.
9. Someya S, Yu W, Hallows WC, et al. Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction. *Cell.* 2010 143(5):802-12.
10. Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM, et al. SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell.* 2006 126(5):941-54.
11. Du J, Zhou Y, Su X, et al. Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase. *Science.* 2011 334(6057):806-9.
12. Mostoslavsky R, Chua KF, Lombard DB, et al. Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell.* 2006 124(2):315-29
13. Michishita E, McCord RA, Berber E, et al. SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. *Nature.* 2008 452(7186):492-6.
14. Michishita E, McCord RA, Boxer LD, et al. Cell cycle-dependent deacetylation of telomeric histone H3 lysine K56 by human SIRT6. *Cell Cycle.* 2009 8(16):2664-6.
15. McCord RA, Michishita E, Hong T, et al. SIRT6 stabilizes DNA-dependent protein kinase at chromatin for DNA double-strand break repair. *Aging* 2009 1(1):109-21
16. Kawahara TL, Michishita E, Adler AS, et al. SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span. *Cell.* 2009 136(1):62-74.
17. Zhong L, D'Urso A, Toiber D, et al. The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hif1alpha. *Cell.* 2010 140(2):280-93
18. Schwer B, Schumacher B, Lombard DB, et al. Neural sirtuin 6 (Sirt6) ablation attenuates somatic growth and causes obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 107(50):21790-4.
19. Kim HS, Xiao C, Wang RH, et al. Hepatic-specific disruption of SIRT6 in mice results in fatty liver formation due to enhanced glycolysis and triglyceride synthesis. *Cell Metab.* 2010 12(3):224-36
20. Sebastián C, Zwaans BM, Silberman DM, et al. The Histone Deacetylase SIRT6 Is a Tumor Suppressor that Controls Cancer Metabolism. *Cell.* 2012 151(6):1185-99
21. Kanfi Y, Naiman S, Amir G, et al. The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice. *Nature.* 2012 483(7388):218-21.
22. Sundaresan NR, Vasudevan P, Zhong L, et al. The sirtuin SIRT6 blocks IGF-Akt signaling and development of cardiac hypertrophy by targeting c-Jun. *Nat Med.* 2012 18(11):1643-50.
23. Barber MF, Michishita-Kioi E, Xi Y, et al. SIRT7 links H3K18 deacetylation to maintenance of oncogenic transformation. *Nature.* 2012 487(7405):114-8.
24. Ford E, Voit R, Liszt G, et al. Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription. *Genes Dev.* 2006 20(9):1075-80.

25. Vakhrusheva O, Smolka C, Gajawada P, et al. Sirt7 increases stress resistance of cardiomyocytes and prevents apoptosis and inflammatory cardiomyopathy in mice. *Circ Res.* 2008 102(6):703-10.
26. Pacholec M, Bleasdale JE, Chrnyk B, et al. SRT1720, SRT2183, SRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1. *J Biol Chem.* 285(11):8340-51.
27. Burnett C, Valentini S, Cabreiro F, et al. Partridge L, Gems D. Absence of effects of Sir2 overexpression on lifespan in *C. elegans* and *Drosophila*. *Nature.* 2011 477(7365):482-5
28. Viswanathan M, Guarente L. Regulation of *Caenorhabditis elegans* lifespan by sir-2.1 transgenes. *Nature.* 2011 477(7365):E1-2.
29. Chen D, Bruno J, Easlou E, et al. Tissue-specific regulation of SIRT1 by calorie restriction. *Genes Dev.* 2008 22(13):1753-7.
30. Mattison JA, Roth GS, Beasley TM, et al. Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature.* 2012 489(7415):318-21.
31. Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, et al. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science.* 2009 325(5937):201-4.

Sirtuins and Aging

Michishita-Kioi, Eriko

Frontier Research Laboratory, R&D Division, Daiich Sankyo Co., LTD.

Sirtuins are called longevity genes and became widely known to the public. Activation of sirtuins by natural products, small molecules and/or by calorie restriction has been challenged to achieve healthy lifespan and longevity. Many scientists have joined and started to work on sirtuins, leading the research field highly competitive, so in a relatively short period of time many discoveries on sirtuins have been made. However, on the other hand, negative results such as against the previous works on sirtuins showing the conserved role of Sir-2 in mediating lifespan in worms and flies, were recently published to high impact journals, including *Nature*. Then, the accompanying manuscript was published showing not as long as reported previously but still sirtuins extend lifespan of these species. In this manuscript, I will describe the history and the recent findings of sirtuins in aging.

Key words : Sirtuins, Longevity, Calorie restriction, Age-associated diseases, Deacetylase

【総 説】

細胞内異常タンパク質凝集体の細胞間伝播：神経変性疾患の病態進行に関する新たなメカニズム

野中 隆、長谷川 成人

東京都医学総合研究所・認知症プロジェクト・病態細胞生物学研究室

要約

神経変性疾患の発症に関与する細胞内異常タンパク質が細胞間を伝播するという興味深い知見が、最近相次いで報告されている。それらの研究成果は、アルツハイマー病 (AD) におけるタウやパーキンソン病 (PD)・レビー小体型認知症における α シヌクレインなどの細胞内凝集体が、プリオン病におけるプリオンのように細胞間を伝播し、そこで更なる凝集を引き起こす凝集核 (シード) として機能し、その結果、新たな凝集体が次々に脳内に拡がることを示唆する。細胞内異常タンパク質の伝播を抑制することは、新たな神経変性疾患の治療戦略を考える上で、今後重要なファクターとなる可能性が高い。

キーワード：tau, alpha-synuclein, TDP-43, propagation, prion

はじめに

近年、神経変性疾患の発症に関与する細胞内異常タンパク質に関する興味深い報告が相次いでいる。それらの研究成果は、アルツハイマー病 (AD) におけるタウやパーキンソン病 (PD) やレビー小体型認知症における α シヌクレインなどの異常蓄積による細胞内凝集体が、プリオン病におけるプリオンのように細胞間で伝播することを強く示唆している。この「凝集タンパク質の細胞間伝播」は、病状の進行に伴って異常病変が拡大していく現象を部分的に説明する可能性を秘めており、最近国内外で非常に注目されているトピックスの一つである。本稿では、これまでに報告されたタウや α シヌクレインなどの細胞間伝播に関する知見と共に最近の我々の研究成果を紹介する。

1. タウ

AD患者脳に出現する神経原線維変化は、Paired helical filaments (PHF) と呼ばれる細胞内封入体であり、特異な線維束状の構造物である。その主要な構成タンパク質として、ユビキチン化および高度にリン酸化されたタウタンパク質が同定された。微小管結合タンパク質として知られるタウは神経細胞に豊富に発現しており、微小管に結合してこれを安定化させる。タウは分子量 55~62 kDa のポリペプチドであり、選択的スプライシングにより6種のアイソフォームが存在しており、微小管結合部位を4つ有する4リピートタウと3つ有する3リ

ピートタウに分けられる。

タウの細胞内蓄積を伴う神経変性疾患はタウオパチー (tauopathy) と総称されており、細胞内に蓄積するタウのアイソフォームが疾患ごとに異なる。ADにおけるPHFには、6種類全てのタウアイソフォームが蓄積しているが、進行性核上性麻痺 (Progressive supranuclear palsy: PSP)、大脳皮質基底核変性症 (Corticobasal degeneration: CBD)、嗜銀顆粒型認知症 (Argyrophilic grain dementia: AGD) などでは、4リピートタウが主に蓄積する異常構造物が認められる。またPick病では、3リピートタウが主に蓄積する特徴的な異常構造物 (Pick球など) が出現する。しかしながら、なぜこのように蓄積するタウのアイソフォームが疾患によって異なるのかについては明らかになっていない。

ADにおけるタウ病変の拡がり、Braakらにより報告されている[1]。彼らは、海馬傍回より始まるタウの病変は、嗅内野から固有海馬に達し、さらに新皮質連合野、固有野に到達すること、またこのタウ病変の広がりにはランダムではなく、規則的に進行することを記している。これらの知見は、タウの封入体が細胞から細胞へと伝達する可能性を示唆するが、これまでにそれを実証するような実験結果は報告されていなかった。しかし最近、異常蓄積したタウが細胞から細胞へと伝播することを示唆する実験結果が報告された。培養細胞を用いた検討では、Frostらは、4リピートタウの微小管結合ドメインのリコンビナントタンパク質を *in vitro* で線維化し、これを培養細胞に振りかけるとエンドサイトーシスにより取り込まれることを報告した[2]。さらにその凝集体を含む細胞と含まない細胞とを共培養すると、凝集体が他の細胞に伝達され、そこで全長タウの凝集が誘導されるらしい。しかしながら異常蓄積したタウの細胞間伝達の効率はかなり低いようで、それほど容易に起こる現象ではないと

連絡先：〒156-8506

東京都世田谷区上北沢2-1-6

Tel: 03-6834-2349

Fax: 03-6834-2349

e-mail: nonaka-tk@igakuken.or.jp

考えられる。後述するように、筆者らも最近、培養細胞を用いた系において、市販のリポフェクション試薬によって *in vitro* で調製したタンパク質線維を凝集体形成のシードとして細胞内に導入する方法を考案した[3, 4]。この方法を用いて、予めタウのプラスミドを一過性に発現した培養細胞に *in vitro* で調製した全長タウの線維を凝集体形成のシードとして導入することによって、シード依存的な全長タウ蓄積モデルの構築に世界で初めて成功した[4]。興味深いことに、このシード依存的なモデルにおいて、細胞に発現した可溶性タウ（プラスミド由来のタウ）と、添加したシードタウのアイソフォームが同じ場合に、可溶性タウの細胞内蓄積が認められ、異なる組み合わせでは蓄積は見られなかった。また筆者らの系では、先のFrostらの報告とは異なり、リポフェクション試薬がないと *in vitro* で調製したタウ線維を細胞内に導入できなかった。

また最近、動物モデルにおいて異常蓄積したタウが伝播する可能性が示された。FTDP-17において見いだされたP301L変異を有するタウを発現するトランスジェニック (Tg) マウスでは、脳や脊髄にリン酸化タウからなる凝集体が出現するが、Clavagueraら[5]は、P301LのTgマウス脳より抽出した画分を、タウの蓄積が見られない野生型4リピードタウを発現するTgマウスの脳に注入した。注入後6ヶ月において、嗜銀性のタウ病変が認められ、その後の経過時間に伴ってその分布の広がりも観察された。一方、抗タウ抗体によりP301Lマウス脳の抽出物を処理してタウを除去した画分を注入したマウスではそのような病変は見られなかった。この結果から、外から加えたタウの凝集体が *in vivo* においても、本来なら蓄積しにくい脳内の可溶性タウの蓄積を誘導することが示唆された。

2. α シヌクレイン

1997年に南イタリアの家族性PD家系の遺伝学的解析により α シヌクレインが原因遺伝子として同定され[6]、それとほぼ同時に、PDの特徴的な病理構造物であるレビー小体の主要構成成分として α シヌクレインが同定された[7, 8]。 α シヌクレインは140アミノ酸からなるポリペプチドであり、脳に多く存在する可溶性タンパク質である。中枢神経系におけるその機能はあまりはっきりしていないが、最近では、神経伝達物質の放出や小胞輸送に関するSNAREタンパク質複合体の形成・解離に作用する分子シャペロンとして機能することが報告された[9, 10]。また患者脳において α シヌクレインはリン酸化およびユビキチン化を受けて蓄積・線維化していることが明らかとなり[11, 12]、またレビー小体の出現部位は神経細胞脱落の部位とよく一致することから、細胞内 α シヌクレインの蓄積が神経細胞死あるいは細胞毒性を引き起こすのではないかとすることは容易に想像される。

弧発性PDにおけるレビー小体病変の広がりについて、レビー小体の出現部位は中脳黒質が最初ではなく、さらに下位の脳幹の迷走神経背側運動核から始まり、レビー小体病変が脳幹に沿って上行性に広がり黒質に達する頃

に臨床兆候が出現するという仮説が提唱されている[13-16]。また実際の患者脳においてレビー小体病変が伝播することを最初に示唆したのは、胎児の中脳神経細胞を移植したPD患者脳の解析から、その移植部位のドーパミン神経細胞にレビー小体が見いだされたという報告である[17, 18]。この結果から、ホスト側のPD患者の組織に存在する α シヌクレイン線維が移植片の神経細胞に伝達され、本来レビー小体は存在しないはずの移植された神経細胞においてシード依存的な α シヌクレイン蓄積が生じた可能性が考えられる。

最近我々は、培養細胞を用いて、不溶化した α シヌクレインが細胞内に導入できること、およびその導入した不溶化 α シヌクレインをシードとして可溶性の α シヌクレインが細胞内で蓄積することを見だし、 α シヌクレインの異常病変が細胞間伝播する可能性を世界で初めて示した[3, 4]。すなわち、予め α シヌクレインのプラスミドを一過性に発現した細胞に、*in vitro* で調製したリコンビナント α シヌクレインの線維をリポフェクトアミン試薬（インビトロジェン）と共に処理すると、プラスミド由来の可溶性 α シヌクレインが、細胞外から導入された線維をシードとして、シード依存的に細胞内で蓄積することを見いだした。これらの凝集体は直径約10 μ m であり、その大きさが患者脳に出現するレビー小体とほぼ同じであるだけでなく、リン酸化やユビキチン化といった蓄積 α シヌクレインの特徴をも有しており、患者脳に見られるレビー小体を再現した細胞モデルと考えられる (図1)。また前述したように、リコンビナントタウタンパク質からなる線維もリポフェクトアミン処理によって細胞内に導入することができるが[4]、 α シヌクレインを発現するプラスミドを予めトランスフェクトした細胞にタウ線維を導入しても、細胞内において α シヌクレインの蓄積は認められなかった。この結果は、細胞内において、タウ線維は可溶性 α シヌクレインのシードにはなり得ない(クロスシードしない)ことを意味する。さらにこのリポフェクトアミンを利用したタンパク質線維の導入方法は応用性に富んでおり、 α シヌクレインやタウなどのリコンビナントタンパク質からなる線維を細胞内に導入できるだけでなく、患者脳より調製した界面活性剤不溶画分を細胞内に導入することも可能である。実際、我々は、レビー小体型認知症患者脳より調製した界面活性剤不溶画分（蓄積した α シヌクレインが豊富に含まれる画分）を α シヌクレインプラスミド発現細胞に導入すると、リコンビナント α シヌクレイン線維を導入したときと同様な、リン酸化およびユビキチン化 α シヌクレイン陽性な細胞内凝集体を多数観察している（筆者ら、未発表データ）。

さらにこのモデル細胞において、凝集体の形成から4~5日経過した時点で細胞死が生じていることを確認した (図2)。種々の解析によりこの細胞死はアポトーシスではなく、ネクローシス様であることが判明した[4]。細胞内 α シヌクレインの蓄積を伴う細胞では、プロテアソーム活性が抑制されており、この抑制と細胞死誘導には何らかの関連性が存在すると考えられる[4]。またこ

の細胞死を抑制する低分子化合物は治療薬として開発できる可能性があり、本モデルを用いたスクリーニング系の確立は非常に有用であると考えられる。筆者らは以前に、*in vitro*における α シヌクレイン凝集体形成を抑制する化合物のスクリーニングを行い、数種類のポリフェノールなどに強い抑制作用があることを報告した[19]。そこで、細胞内 α シヌクレインの蓄積を伴う細胞の培地にこれらのポリフェノール化合物を添加したところ、エキシフォンやゴシペチンといったポリフェノールの添加により上記の細胞死が抑制され、同時に細胞内 α シヌクレインの蓄積量の減少が認められた[4]。以上の結果より、これらのポリフェノールは新たな神経変性疾患治療薬として開発されることが期待される。

不溶化したタンパク質を細胞内に導入するというこの方法は、培養細胞だけでなく実験動物にも応用できることが容易に考えられる。実際、前述したようにタウタンパク質については、不溶性タウをマウスの脳内に導入し、タウの異常病変が拡がることを確認されている[5]が、最近、 α シヌクレインについても同様の報告がなされた。Lukら[20]は、 α シヌクレインTgマウスを用いて、高齢の同マウス脳より調製した不溶化 α シヌクレイン、あるいはリコンビナント α シヌクレインより調製した α シヌクレイン線維を若いTgマウスの脳に注入すると、注入側だけでなく反対側においても、 α シヌクレインの異常病変が観察されることを示した。またごく最近、このグループは α シヌクレインTgマウスでなく普通の野生型マウス脳へ不溶化 α シヌクレインを投与することにより、やはり注入側だけでなく反対側においても α シヌクレインの異常病変が出現することを報告した[21]。一方で、筆者らのグループも以前から同様の実験を行っており、やはり野生型マウス脳にリコンビナント α シヌクレイン線維を注入すると、注入側のみならず反対側にもリン酸化 α シヌクレインの凝集体が観察されること、リコンビナントタンパク質の線維だけでなく患者脳由来の不溶化 α シヌクレインの注入によっても同様の異常病変が観察されること、さらにその α シヌクレインの異常病変の一部は、神経回路に沿って拡がることも見いだした[筆者ら、未発表データ]。これらの動物モデルより得られた結果から、不溶化 α シヌクレインはプリオンのように細胞から細胞へと伝播し、伝播した先の細胞内において可溶性 α シヌクレインの凝集体形成を促進することにより、その病変が次第に拡がる可能性が示唆される。

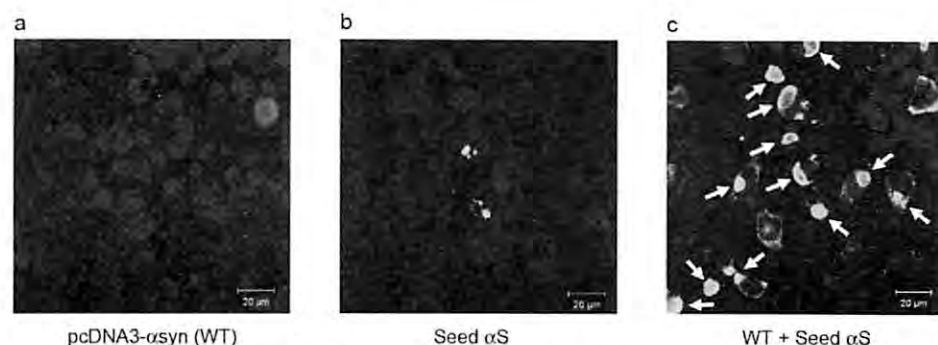


図1 シード依存的な細胞内 α シヌクレイン蓄積の培養細胞モデル

- a: α シヌクレインのプラスミド (pcDNA3- α syn: WT) を一過性発現した細胞
 b: α シヌクレイン線維 (Seed α S) をリポフェクトアミンと共に処理した細胞
 c: 予めWTを一過性に発現した細胞に、Seed α Sをリポフェクトアミンと共に処理した細胞

いずれのサンプルも、リン酸化 α シヌクレイン特異抗体で免疫染色 (白色) し、核をTO-PRO-3で染色した (濃いグレー)。 α シヌクレインは細胞に一過性に発現しただけではリン酸化はほとんど受けないので (a) においてはほとんど何も染色されていない。また (b) では、導入された α シヌクレイン線維が細胞内でリン酸化され、ドット状に染色された。予め α シヌクレインのプラスミドを発現した細胞にSeed α Sを処理すると (c)、リン酸化 α シヌクレイン抗体に陽性な細胞内凝集体 (矢印) が多数観察される。いずれも直径は約10 μ mである。スケールバーは20 μ m。文献[4]より抜粋。

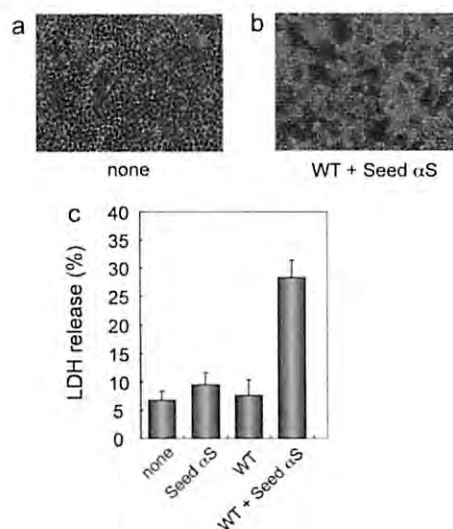


図2 シード依存的な α シヌクレイン蓄積細胞におけるネクロシス様の細胞死

未処理のSH-SY5Y細胞 (none) を培養しても細胞の形態に異常は見られないが (a)、 α シヌクレインのプラスミド (WT) を発現させ、その後 α シヌクレイン線維 (Seed α S) をリポフェクトアミンと共に処理した細胞 (WT + Seed α S: b) では、細胞の形態変化が認められる。それぞれの細胞について乳酸脱水素酵素 (Lactate dehydrogenase: LDH) 放出アッセイにより細胞死を測定したところ、シード依存的な凝集体形成が見られるWT + Seed α S細胞において顕著な細胞死が認められた。文献[4]より抜粋および改変。

3. その他のタンパク質

タウや α シヌクレイン以外のタンパク質凝集体の伝播の可能性については、ポリグルタミンについてはいくつか報告されている。Yangらは、ポリグルタミンの凝集体が容易に細胞に取り込まれ、その後核に伝達され、細胞死を誘導することを報告した[22]。また最近Renらは、ポリグルタミン凝集体が細胞質に導入され、可溶性ハン

チンチンのN末端断片のシードとして作用することを示した[23]。またTDP-43についても、in vitroで調製したTDP-43のC末端断片の凝集体が、BioPORTER試薬(Genlantis)によりHEK293細胞内に導入され、一過性に発現した全長TDP-43の蓄積を誘導したことが報告された[24]。筆者らも、一過性にTDP-43を発現したSH-SY5Y細胞に、ALS患者脳より調製した不溶性画分(TDP-43凝集体が含まれる画分)をリポフェクション試薬と共に添加すると、プラスミド由来のTDP-43が細胞内蓄積し、直径10 μ m程度のリン酸化およびユビキチン化を受けたTDP-43からなる細胞質凝集体の出現を確認している[筆者ら、未発表データ]。

おわりに

近年、筆者らだけでなく他の研究グループからも、神経変性疾患の患者脳に蓄積する異常タンパク質がプリオンのように振る舞い、神経細胞間を伝播する可能性が示唆されている。この異常タンパク質の伝播の可能性は、ADやPDにおける異常病変が規則的に拡がる現象を、部分的ではあるが、ある程度説明しうるものであり、その実証過程においては慎重に議論を進める必要はあるが、非常に興味深い可能性であることは言うまでもない。これまで、神経変性疾患の治療戦略において、中枢神経系における異常タンパク質の「最初の蓄積」を抑制することを念頭にした基礎研究が展開されてきたように思うが、この異常タンパク質の伝播の可能性を考慮すると、必ずしも最初の凝集体形成ステップを抑制することに固執する必要はなく、その後の凝集体が細胞間を伝播するステップを抑制することも治療のターゲットになり得る。そうすると、これまでとは発想の異なる治療薬・治療方法の研究が展開されることが予想され、これまで以上に効果が期待できる治療薬などを患者さんに提供できるかもしれない。今後の研究の進展に注目したい。

文献

1. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82: 239-259, 1991.
2. Frost B, Jacks RL, Diamond MI. Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J Biol Chem* 284: 12845-12852, 2009.
3. 野中隆, 渡辺小百合, 増田雅美, 長谷川成人. タンパク質重合体の重合核となりうるタンパク質又はその重合体が導入された細胞及びその製造法. 特願2005-352486. 2005.
4. Nonaka T, Watanabe ST, Iwatsubo T, Hasegawa M. Seeded aggregation and toxicity of α -synuclein and tau: cellular models of neurodegenerative diseases. *J Biol Chem* 285: 34885-34898, 2010.
5. Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, Abramowski D, Frank S, Probst A, Fraser G, Stalder AK, Beibel M, Staufenbiel M, Jucker M, Goedert M, Tolnay M. Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol* 11: 909-913, 2009.
6. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276: 2045-2047, 1997.
7. Baba M, Nakajo S, Tu PH, Tomita T, Nakaya K, Lee VM, Trojanowski JQ, Iwatsubo T. Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am J Pathol* 152: 879-884, 1998.
8. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388: 839-840, 1997.
9. Chandra S, Gallardo G, Fernández-Chacón R, Schlüter OM, Südhof TC. Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. *Cell* 123: 383-396, 2005.
10. Burré J, Sharma M, Tsetsenis T, Buchman V, Etherton MR, Südhof TC. alpha-Synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science* 329: 1663-1667, 2010.
11. Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah E, Goldberg MS, Shen J, Takio K, Iwatsubo T. alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol* 4: 160-164, 2002.
12. Hasegawa M, Fujiwara H, Nonaka T, Wakabayashi K, Takahashi H, Lee VM, Trojanowski JQ, Mann D, Iwatsubo T. Phosphorylated alpha-synuclein is ubiquitinated in alpha-synucleinopathy lesions. *J Biol Chem* 277: 49071-49076, 2002.
13. Braak H, Rüb U, Sandmann-Keil D, Gai WP, de Vos RA, Jansen Steur EN, Arai K, Braak E. Parkinson's disease: affection of brain stem nuclei controlling premotor and motor neurons of the somatomotor system. *Acta Neuropathol* 99: 489-495, 2000.
14. Braak H, Rüb U, Gai WP, Del Tredici K. Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J Neural Transm* 110: 517-536, 2003.

15. Saito Y, Kawashima A, Ruberu NN, Fujiwara H, Koyama S, Sawabe M, Arai T, Nagura H, Yamanouchi H, Hasegawa M, Iwatsubo T, Murayama S. Accumulation of phosphorylated alpha-synuclein in aging human brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62: 644-654, 2003.
16. Saito Y, Ruberu NN, Sawabe M, Arai T, Kazama H, Hosoi T, Yamanouchi H, Murayama S. Lewy body-related alpha-synucleinopathy in aging. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63: 742-749, 2004.
17. Li JY, Englund E, Holton JL, Soulet D, Haggell P, Lees AJ, Lashley T, Quinn NP, Rehn-crona S, Björklund A, Widner H, Revesz T, Lindvall O, Brundin P. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med.* 14: 501-503, 2008.
18. Kordower JH, Chu Y, Hauser RA, Freeman TB, Olanow CW. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat Med.* 14: 504-506, 2008.
19. Masuda M, Suzuki N, Taniguchi S, Oikawa T, Nonaka T, Iwatsubo T, Hisanaga S, Goedert M, Hasegawa M. Small molecule inhibitors of alpha-synuclein filament assembly. *Biochemistry* 45: 6085-6094, 2006.
20. Luk KC, Kehm VM, Zhang B, O'Brien P, Trojanowski JQ, Lee VM. Intracerebral inoculation of pathological α -synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative α -synucleinopathy in mice. *J Exp Med* 209:975-86, 2012.
21. Luk KC, Kehm V, Carroll J, Zhang B, O'Brien P, Trojanowski JQ, Lee VM. Pathological α -synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science* 338:949-53, 2012.
22. Yang W, Dunlap JR, Andrews RB, Wetzel R. Aggregated polyglutamine peptides delivered to nuclei are toxic to mammalian cells. *Hum Mol Genet* 11: 2905-2917, 2002.
23. Ren PH, Lauckner JE, Kachirskia I, Heuser JE, Melki R, Kopito RR. Cytoplasmic penetration and persistent infection of mammalian cells by polyglutamine aggregates. *Nat Cell Biol* 11: 219-225, 2009.
24. Furukawa Y, Kaneko K, Watanabe S, Yamanaka K, Nukina N. A seeding reaction recapitulates intracellular formation of Sarkosyl-insoluble transactivation response element (TAR) DNA-binding protein-43 inclusions. *J Biol Chem* 286: 18664-18672, 2011.

Cell-to-cell propagation of intracellular aberrant protein aggregates: New possible mechanisms on the progression of neurodegenerative diseases

Takashi Nonaka, Masato Hasegawa

Department of Neuropathology and Cell Biology, Dementia Research Project, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science

Recently, cell-to-cell propagation of aggregated proteins in neurodegenerative diseases has been focused. Many experimental results support that intracellular aggregates of tau, alpha-synuclein or huntingtin could be transferred intercellularly to neighbor cells and seeded for aggregation of each soluble protein. Propagation of these aggregated proteins may therefore occur through mechanisms similar to those that underlie prion pathogenesis. If this possibility is verified in vivo, it will suggest new therapeutic strategies to block propagation of aggregated proteins throughout the brain.

Key words : tau, alpha-synuclein, TDP-43, propagation, prion

【トピックス】

ミトコンドリア酸化ストレス発生 *mev-1* モデルの解析

石井 恭正

東海大学医学部分子生命科学

はじめに

細胞内活性酸素種 (ROS) の発生は、主にミトコンドリア電子伝達系からの電子漏出によって生じるスーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$) に起因している。筆者らは、電子伝達系複合体IIサブユニットSDHCのアミノ酸点変異 (線虫: G71E, ショウジョウバエ: I71E, マウス: V69E) がミトコンドリア電子伝達を阻害し、過剰な $O_2^{\cdot-}$ を発生することを明らかにしてきた。近年、このアミノ酸点変異をコードする遺伝子発現を誘導するコンディショナルトランスジェニックマウス (*Tet-mev-1* マウス) の作製に成功し、その表現型解析に取り組んでいる。当該モデルマウスは、変異型SDHC^{V69E} サブユニットの誘導に応じて複合体IIとユビキノン間で電子伝達が阻害され、細胞内ROSを過剰発生していることが明らかにされた。この結果、細胞分裂が盛んでミトコンドリア電子伝達系が活発な時期にある胚発生時や新生児期においては、ミトコンドリア酸化ストレスが過剰誘導されることで無秩序なアポトーシスが惹起され、低出生体重あるいは成長遅延を生じることが確認された。最近、正常発生後の生体において角膜と涙腺の表現型解析を実施し、新たな研究成果を得たので報告する。

1. ミトコンドリアと酸化ストレスと老化

酸化ストレスと老化の関係を追及した研究の歴史は古く、Denham Harman博士が老化のフリーラジカル説を提唱した1956年頃から始まっている。その後、1972年にミトコンドリア局在型のマンガンスーパーオキシドジスムターゼ (MnSOD) が発見されたことで、同博士は老化のミトコンドリア説を提唱し、酸化ストレスを発生するミトコンドリアの障害が老化の原因になるとの仮説を述べた。酸化ストレスとは、生命反応の酸化還元 (レドックス) 反応が酸化側に偏る、あるいは酸化型-還元型の生体分子量が酸化型に偏ることを意味する。生体は、組織器官を構成する最小単位である細胞の営みによって生命を維持している。細胞は、ミトコンドリアを中心とした呼吸活性を基に、エネルギーを産生し、自身の機能発揮と生存の恒常性を維持している。細胞内の酸化ストレスは、その大部分がミトコンドリアから発生すると考えられている。その理由は、好氣的環境下で

のエネルギー代謝において、細胞のエネルギー源となるATP合成 (酸化的リン酸化) を担うため、ミトコンドリア内膜にある電子伝達系複合体間において酸化還元反応を繰り返すことで、ミトコンドリア膜間腔にプロトン勾配を生じさせる電子が伝達されおり、この過程で幾つかの電子が漏れ出ることが酸化ストレスの起因になっていると報告されているためである。ミトコンドリア内膜には、酸化的リン酸化反応を担う4つの電子伝達系複合体と電子伝達体ユビキノンとシトクロムcが存在し、複合体I (NADH-ユビキノン酸化還元酵素)、II (コハク酸-ユビキノン酸化還元酵素)、III (ユビキノール-シトクロムc酸化還元酵素)、IV (シトクロムc酸化酵素) の間で、電子伝達反応が担われている。これらの反応は、クエン回路で生じるNADHおよびコハク酸を基質として生じる電子を基に、ミトコンドリア膜間腔にプロトン濃度勾配を生じさせATP産生を担っている。複合体IとIIIからは伝達される電子の内0.1-2%が逸脱することが報告されており、ミトコンドリア機能異常を有した細胞や老化した細胞では複合体IIを含め、さらに多くの電子が逸脱されていると考えられている。漏出した電子は、近傍の酸素と直接反応しミトコンドリアからスーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$) を発生する原因になると報告されている。 $O_2^{\cdot-}$ は、銅/亜鉛やマンガンスーパーオキシドジスムターゼ (Cu/ZnSOD, MnSOD) の触媒反応によって過酸化水素 (H_2O_2) へと変換され、その後カタラーゼやグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) 酵素によって水へと変換され、無毒化される。一部の過酸化水素 (H_2O_2) は、二価の金属イオンとのフェントン反応によってヒドロキシラジカル ($\cdot OH$) へと変換される。このような酸化ストレスの起因となる分子群を活性酸素種 (ROS) といい、この他にも、一重項酸素 (1O_2)・一酸化窒素 (NO)・ペルオキシナイトライト ($ONOO^-$)・ヒドロペルオキシラジカル ($HOO\cdot$)・アルコキシラジカル ($L\cdot$)・アルキルペルオキシラジカル ($LOO\cdot$)・脂質ヒドロペルオキシド ($LOOH$) などの派生体分子が存在する。これらROSの酸化力の攻撃により、細胞内構成成分であるタンパク質・脂質・核酸が酸化され、それらの機能が障害される。実際、タンパク質では酸化されることで生じるカルボニル化タンパク質、脂質では不飽和脂肪酸の過酸化によりリソソーム内に生成されるリポフスチンや、近年ではコレステロールの一部が酸化されることで生じる酸化型低比重リポ蛋白質 (LDL) などの過酸化脂質やその分解物 (4-ヒドロキシ-2-ノネナル (4-HNE) など)、核酸ではグアニン残基が酸化されて生じる8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン (8-OHdG) が老化に伴い増加するこ

連絡先: 〒259-1193

神奈川県伊勢原市下糟屋143

Tel: 0463-93-1121 (2650)

Fax: 0463-94-8884

E-mail: 1amfd001@is.icc.u-tokai.ac.jp

とが報告されている。このような報告から、細胞内で産生されたROSは細胞内構成成分に直接酸化障害を惹き起こし、これらが蓄積することで細胞機能の恒常性を破壊させ、加齢依存的に老化が加速されていくことが示された。このような細胞内構成成分の酸化障害は、細胞内ROSの主な発生源であるミトコンドリアにおいて最も頻度が高いと考えられることから、Denham Harman博士によって提唱されたフリーラジカル説とミトコンドリア説の老化仮説は密接に関わり合っていることが容易に推察できる。

$O_2^{\cdot-}$ は酸化力・反応性共に高いものの半減期が短く、生体内で直接酸化ストレスを惹起しているとは考え難いと考えられている。一方、 H_2O_2 は $O_2^{\cdot-}$ と比較し、酸化力は弱いものの半減期が長く、細胞内で安定し、細胞膜などの生体膜の透過性が高いことが知られており、生体内や細胞内でレドックスシグナルを維持する重要な役割を担っていると考えられている。 H_2O_2 はチオール基(-SH)間のジスルフィド結合を容易に誘導し、生体内の様々なレドックス反応を担い、生体の恒常性を維持している。例えば、チオール基を有するシステイン(C)などの含硫黄アミノ酸は高い還元力を持ち、自身は容易に酸化され、これを含むタンパク質全体の構造を変え、自身の酵素活性や生体分子の物質輸送機能を制御することが知られている。また、 $\cdot OH$ は酸化力・生体膜透過性共に高く、遺伝子への酸化障害を最も惹き起こしやすいROSと考えられている。 $\cdot OH$ はベータカロチン、ビタミンE、フラボノイド、グルタチオン(GSH)などによって除去されることが報告されている。

これらの生体への影響を解析する研究手法は様々で、生体への薬剤投与や放射線照射などにより酸化ストレス発生源を人為的に制御する手法により行われている。酸化ストレス負荷の度合いにより、これらの手法は急性的・部分的制限・慢性的酸化ストレスの誘導に分類でき、それぞれで様々な解析を可能としてきた。X線などの電離放射線や紫外線などの照射、過酸化水素などのROSの直接暴露、生体内に取り込まれるとROSを発生する殺虫剤や農薬などの投与、これらは「急性的酸化ストレス誘導」の処置を可能とし、様々な細胞障害や組織器官障害、生体異常を明らかにしてきた。さらに、遺伝子工学的技術の進歩により、生体での遺伝子組換えが可能になると抗酸化酵素群や抗酸化物質を発現する遺伝子を欠失(ノックアウト)あるいは過剰発現(トランスジェニック)させる操作によって、酸化ストレスを部分的制限下で誘導する研究が行われるようになった。酸化還元反応を繰り返し触媒する特定の抗酸化酵素活性やその反応を担う抗酸化物質の阻害や過剰反応によって「部分的酸化ストレス誘導」を可能とし、中・長期的な生体モデル研究を可能とした。これにより、疾患を対象とした研究ばかりでなく老化研究が飛躍的に進歩した。1989年、ショウジョウバエにおいてCu/ZnSODの遺伝子欠失モデルが短寿命になることが報告され、その後多くの抗酸化酵素群の遺伝子組換え(欠失あるいは過剰発現)モデル動物が作製された。しかし、マウスのような高等動物モデ

ルになるにつれ、これら抗酸化酵素群の遺伝子組換えモデルでの酸化ストレス誘導が老化の表現型に直接結びつくといった研究成果は得られず混沌とした時期が経過している。抗酸化酵素群や抗酸化物質を阻害あるいは過剰反応させたことによる「部分的酸化ストレス誘導」の影響を高等動物の老化の諸過程で明確に知ることは困難であることが分かる。ある特定の組織器官に生じる病的な表現型が得られることはあるが、生体での長期的な影響を解析する老化研究への目覚ましい報告は少ないのが現状である。一方、「慢性的酸化ストレス誘導」を長期的に発生させる確固たる手法は確立されておらず、自然な生体内環境を再現した酸化ストレス負荷の研究報告は少ない。放射線などの線量を微弱にした低線量放射線研究は、低線量放射線応答といった新たな研究分野を生み出す成果となり、自然な生体内環境を再現した研究とは一線を画した研究成果が得られている。また、生体内でROSを発生する薬剤や強力な酸化力を有する酸化剤などの微量投与では、その投与量によって正と負を跨いだシグモイド型効果を示すため、中・長期的な「慢性的酸化ストレス誘導」の老化過程への影響を確認することは難を極め、明確な研究成果を得られていないのが現状である(正と負を跨いだシグモイド型効果とは、生体にとって微量作用であるとその効果は目的に反して働き、その量的変化によってシグモイド型に目的に応じた効果を発揮する形態を示す)。

このような背景において、筆者らはミトコンドリア電子伝達系を遺伝的に制御することで「慢性的酸化ストレス誘導」を可能にするモデル動物の取得に成功している。これまでに、ミトコンドリア電子伝達系を制御する方法は、電子伝達系複合体の電子伝達を阻害する薬剤を投与する方法しかなかった。しかし、このような方法では上記したシグモイド型効果の影響により、中・長期的な酸化ストレス研究を実施することは困難であった。しかし、1998年に筆者らは線虫を用いた研究から、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(G71E)を生じることで、電子伝達が部分的に阻害され、ミトコンドリア $O_2^{\cdot-}$ の過剰発生に起因する酸化ストレスが誘導されることを明らかにした。現在までに、ショウジョウバエ・マウス胎児細胞・マウス個体で検証し、「慢性的酸化ストレス誘導」を可能にした*Tet-mev-1*マウスの樹立に至っている[1, 2]。

2. 線虫とショウジョウバエ*mev-1*変異体の解析

線虫*mev-1*(*kn-1*)変異体は、パラコート(methyl viologen)に高感受性の短寿命突然変異株として単離された[3]。*mev-1*変異体は高酸素濃度に対しても高い感受性を示し、濃度依存的に平均寿命と最大寿命が共に減少し、早老化・発生遅延・発生障害などの表現型が確認された[4]。*mev-1*変異体の原因遺伝子は、ミトコンドリア電子伝達系複合体IIチトクローム*b*大サブユニット(*cyt-1*, SDHC)の71番目のグリシンがグルタミン酸へと置換されるミスセンスアミノ酸点変異を生じる遺伝子変異であると特定された[5]。ミトコンドリア電子伝達系複合

体IIは核遺伝子にコードされた4つのサブユニットからなり、コハク酸脱水素酵素活性 (SDH) を有するフラビンタンパク質 (SDHA, Fp) と電子伝達を担う鉄硫黄タンパク質 (SDHB, Ip)、これら二つのサブユニットをミトコンドリア内膜に局在させるための二つのアンカーサブユニット (SDHCとチトクロームb小サブユニット (SDHD)) から構成されている。*mev-1*変異体では、コハク酸脱水素酵素活性に変化は確認されなかったものの、複合体II-III酸化還元酵素活性 (コハク酸依存性シトクロームc還元活性) は80%以上も低下しており、電子伝達が阻害されていることが確認された[5]。SDHCに確認されたアミノ酸点変異は、ユビキノンの結合領域内に存在していたことから、複合体IIとユビキノンの間で電子逸脱が生じているものと示唆された。*mev-1*変異体では、不飽和脂肪酸の過酸化によりリソソーム内に生成されるリポフスチン、タンパク質の酸化により生じるカルボニル化タンパク質の加齢依存的な増加が亢進され、酸化ストレスに起因した早老・短寿命モデルとして確立された[6, 7]。

その後、生化学的解析によりミトコンドリア電子伝達系複合体IIからの電子逸脱により $O_2^{\cdot-}$ を過剰発生し、グルタチオン (GSH) レベルが減少していることが確認された[8]。*mev-1*変異体はこのような酸化ストレス誘導下で、さらに高酸素濃度環境下となるとミトコンドリアアポトーシス誘導シグナル (*ced-9/ced-3/ced-4*) が活性化し、過剰な細胞死が誘導されることが確認された[9]。また、これらシグナル伝達の阻害で、短寿命であった*mev-1*変異体は寿命を回復することが明らかにされ、線虫*mev-1*変異体での短寿命の一因にミトコンドリア酸化ストレス誘導による過剰なアポトーシス誘導が関与していると明らかにされた。線虫の体細胞は、生殖系列細胞以外有糸分裂後細胞によって構成されたモデル動物であり、生体成熟後は幹細胞などが存在せず細胞分裂を繰り返さないため、過剰なアポトーシス誘導が直接寿命に影響していると考えている。また、これらの表現型はユビキノンの暴露処置によって改善されたことから、複合体IIとユビキノン間での電子伝達の阻害によって生じる酸化ストレスが線虫*mev-1*変異体の根本的原因であると理解された[10]。

その他、細胞内ATP存在量に変化は確認されないが乳酸アシドーシスや核遺伝子変異率の増加など神経変性疾患や癌などの疾患発症に寄与するであろう表現型が明らかにされている[11]。またLemire博士らは、我々の報告より少し遅れて電子伝達系複合体II鉄硫黄タンパク質 (SDHB, Ip, SDHB-1) のP211ミスセンスアミノ酸変異を誘導したSDHB-1変異体を取得しており、*mev-1*変異体同様に高濃度酸素とパラコート (methyl viologen) に感受性を示し短寿命になることを報告している。

次に、我々はショウジョウバエにおいて、線虫*mev-1*変異体同様のSDHC (SdhC) のアミノ酸点変異を検証した。線虫*mev-1*変異体のミスセンスアミノ酸点変異 (G71E) を生じていた部位は、ショウジョウバエにおいても同様の71番目のイソロイシンアミノ酸残基と特定され、*mev-*

*1*変異体同様のミスセンスアミノ酸点変異 (I71E) をコードする外来遺伝子を構築し、ドミナントネガティブ型のトランスジェニックショウジョウバエを作製した。その結果、線虫*mev-1*変異体と同様にタンパク質の酸化障害マーカーであるカルボニル化蛋白質の増加を伴い平均寿命が20%程度まで短縮することが明らかにされた[12]。

また、我々の報告より後になったがBenzer博士らは高酸素濃度 (100%) に対し高感受性を示し生存率が低下する変異体の単離を行った結果、電子伝達系複合体II鉄硫黄タンパク質 (SDHB, Ip, SdhB) をコードする遺伝子発現が10%まで阻害されているP配列挿入EY12081 (*sdhBEY12081*) 変異体を取得している。*sdhBEY12081*変異体は、平均寿命・最大寿命共に短縮し、線虫*mev-1*変異体同様に複合体II-III酸化還元酵素活性 (コハク酸依存性シトクロームc還元活性) 低下に依存し、 H_2O_2 産生量が増加していたことから、ミトコンドリア電子伝達系阻害による酸化ストレス障害が原因となって短寿命になったことを報告している。

以上の結果から、電子伝達系複合体IIサブユニットSDHCあるいはSDHB変異を有する線虫・ショウジョウバエは、共通して高酸素濃度や酸化ストレス誘発剤パラコートに高感受性を示し、短寿命になることが明らかにされた。このことから、線虫とショウジョウバエのモデル動物において、ミトコンドリア電子伝達系複合体II変異による電子伝達阻害に誘導される酸化ストレス障害は寿命決定に寄与していることが明らかにされた。そこで、さらに我々は線虫*mev-1*変異体同様のSDHCのアミノ酸点変異を哺乳動物モデルにおいて検証することにした。

3. マウス胎児SDHC^{V69E} (*mev-1*) 細胞株の解析

まずは、マウス胎児NIH3T3細胞株を用いて検証をおこなった。生物種間SDHCアミノ酸配列相同検索の結果、線虫*mev-1*変異体でミスセンスアミノ酸点変異 (G71E) を生じていた部位は、マウスにおいては69番目のバリンアミノ酸残基と特定され、*mev-1*変異体同様にミスセンスアミノ酸点変異 (V69E) をコードする外来遺伝子を構築した[13]。線虫同様この変異部位は、コハク酸-ユビキノン酸化還元酵素活性中心の内、ユビキノン結合領域内の求核性アミノ酸群 (ヒスチジン・セリンなど) の近傍に位置している。本来、変異部位は生物種を問わず中性アミノ酸であり、これが酸性アミノ酸のグルタミン酸に置換されることで、酸化還元反応中心である求核性アミノ酸残基の働きを阻害し、電子の逸脱を生じていると示唆される。構築した外来遺伝子をNIH3T3細胞株に導入し、内在性のsdhc遺伝子と外来遺伝子由来の変異型sdhc遺伝子の発現量が同等である細胞株を、線虫*mev-1*変異体を模したSDHC^{V69E} (*mev-1*) 細胞株として樹立した[13]。変異型SDHC^{V69E}サブユニットをコードする変異型sdhc遺伝子を過剰発現した細胞株は樹立に至らなかった。80%以上のミトコンドリアDNAに遺伝子変異が生じたヘテロプラスミーの状態になると、細胞は致死あるいは細胞機能不全になるという報告から、変異型SDHC^{V69E}サブユニットを過剰発現した細胞は死に到っ

たとえられた。線虫においても、SDHCのRNAi法によるノックダウン法を試みると致死であることが確認されている[14]。したがって、正常な内在性SDHCの量的変化は細胞の生存に重大な影響を与えることを示唆している。

樹立したSDHC^{V69E} (*mev-1*) 細胞株を用いて、線虫*mev-1*変異体同様の解析を実施し、哺乳動物細胞での変異型SDHC^{V69E}サブユニットの検証を行った。その結果、線虫*mev-1*変異体同様に、*mev-1*細胞株でもコハク酸脱水酵素活性に変化は確認されず、電子伝達系複合体II-III酸化還元酵素活性（コハク酸依存性シトクロムc還元能力）が低下しており、O₂⁻を過剰発生していることが確認された。また、ミトコンドリアO₂⁻の蓄積量は細胞の継代期間に応じて増加することが確認された[13]。さらに、*mev-1*細胞株では細胞内構成成分における酸化ストレス障害マーカーである、カルボニル化タンパク質量および8-OHdGが増加しており、線虫同様に細胞内酸化ストレスが誘導されていることが確認された[13]。細胞内ATP存在量に変化が確認されなかったことから、線虫同様に*mev-1*変異体の原因遺伝子がミトコンドリアの総エネルギー代謝には影響を及ぼしていないことが明らかにされた。したがって、内在性の正常型SDHCと均等の量で競合するように遺伝子導入された変異型SDHC^{V69E}による生体への第一段階の影響は、ミトコンドリア電子伝達系（複合体II-ユビキノロン間）からの電子逸脱によるO₂⁻の発生であると結論付けた。

次に、細胞の形態を確認したところ、樹立後1ヶ月間培養を継続した*mev-1*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小顆粒、細胞増殖倍加時間の遅延が確認された。興味深いことに、樹立後凍結保存した*mev-1*細胞株で同様の表現型を確認するためには、再培養後数週間の培養継続が必要になることが明らかにされた[13]。このことから、*mev-1*細胞株で確認された形態の変化は細胞内に蓄積された酸化ストレスに起因していることが示唆された。一方、樹立後3ヶ月以上の培養を継続した*mev-1*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小顆粒出現に加え、細胞形態が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。この現象は、軟寒天培養法およびヌードマウスへの皮下移植実験の結果から形質転換したものであることが明らかにされた[13]。軟寒天培養法での1ヶ月間の培養期間中に生じる*mev-1*細胞株の形質転換効率は、NIH3T3細胞野生株に比べ、約100倍から1000倍へと増加していることが確認された。さらに、ヌードマウス皮下において腫瘍化した組織の形態観察を行った結果、自然突然変異によって形質転換したNIH3T3細胞は移植定着後に肥大化した。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*mev-1*細胞株は移植定着後の肥大化は確認されず、良性腫瘍の組織像が確認された[15]。

電子顕微鏡によるミトコンドリア構造の形態観察から、*mev-1*細胞株はクリステの消失や膨潤化・肥大化が確認され、ミトコンドリア膜電位の低下が確認されている。これに応じて、ミトコンドリアアポトーシス誘導シグナル

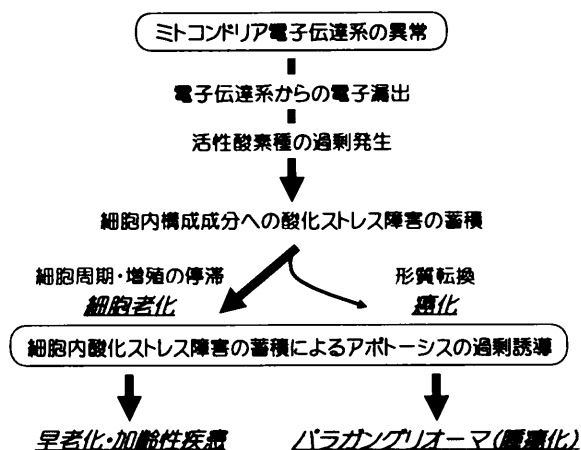


図1. ミトコンドリア電子伝達異常を起因とする細胞機能変化

を介したシトクロムcの放出、カスパーゼ8、9を介したカスパーゼ3の活性化、p53やp21の活性化、DNA断片化が確認され、アポトーシスを過剰誘導していることが明らかにされた[15]。このことから、アポトーシスを免れた細胞が酸化ストレス障害を蓄積し、高頻度に形質転換しているものと示唆された。また大変興味深いことに、ヌードマウス皮下に移植された形質転換後の*mev-1*細胞株はAP-1転写活性に依存したRas-Raf/ Ras-MEKK細胞増殖シグナル伝達系を活性化しているものの、過剰なアポトーシス誘導を継続することで良性腫瘍形質を維持しているものと示唆された[15]。

従来、形質転換後の癌細胞はアポトーシス誘導の抑圧や阻害により細胞分裂の無秩序化や無限増殖化が進行すると考えられてきたが、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*mev-1*細胞株ではアポトーシス誘導を継続していることから、先ず良性腫瘍の形質（いわゆる、癌幹細胞に類似した状態）を維持し、その後遺伝子変異が誘発されることで悪性化する可能性を示唆していた。実際、線虫*mev-1*変異体同様に*mev-1*細胞株は核遺伝子の突然変異率が顕著に高く、*mev-1*細胞株は癌の悪性化機序あるいは発癌機序を解明するモデル細胞として有用であると確信している。これら*mev-1*細胞株の解析結果は、ミトコンドリア電子伝達系複合体IIのSDHB、SDHC、SDHDサブユニットの遺伝子変異が原因で発症する家族性傍神経節腫（パラガングリオーマ）の疾患報告を支持しており、本成果は、パラガングリオーマ発症の分子機序解明の一端を担ったと評価されている（図1）。

4. ミトコンドリア電子伝達系複合体II変異と疾患

ヒトでも、電子伝達系複合体IIはコハク酸脱水酵素素の働きを担い、核の遺伝子にコードされた4つのサブユニットから構成されている。SDHA（70 kDa, 664アミノ酸）、SDHB（27 kDa, 280アミノ酸）、これらをミトコンドリア内膜に局在するアンカーサブユニットの役割を担うSDHC（15 kDa, 169アミノ酸）とSDHD（12 kDa, 159アミノ酸）である。これらの遺伝子変異は、それぞれで遺伝疾患を発症することが報告されており、

SDHAサブユニットのホモ接合体遺伝子変異はミトコンドリア病に挙げられるLeigh脳症を発症すると報告されている。一方、SDHB (PGL4, OMIM ID: 185470)、SDHC (PGL3, OMIM ID: 602413)、SDHD (PGL1, OMIM ID: 602690) サブユニットのヘテロ接合体遺伝子変異は、家族性傍神経節腫 (パラガングリオーマ) や褐色細胞腫を発症する原因遺伝子であると報告された。SDHCの遺伝子変異は、2000年にNiemann博士らによって報告され、パラガングリオーマ・タイプ3の原因遺伝子であると報告された[16]。これ以降、パラガングリオーマや褐色細胞腫などの造腫瘍とSDHC変異との関連は約10報ほどの学術論文に報告されている。これらの大部分が、コハク酸-ユビキノ酸化還元酵素活性中心であるユビキノ結合領域やヘム結合領域欠失を報告するものであり、複合体II内あるいは複合体II-ユビキノ間の電子伝達を阻害していると示唆される。

SDHCのアミノ酸配列は、大腸菌K-12株 (CybL: GenBank ID: AAA23893.1)・線虫 (CYT-1: GenBank ID: AAA20081.1)・ショウジョウバエ (SdhC: GenBank ID: AAF54602.2)・マウス (GenBank ID: AAH05779.1)・ブタ (UniProtKB/Swiss-Prot ID: D0VWV4.2)・ヒト (GenBank ID: AAC27993.1) など生物種間を超えて高い相同性が保持されている。特に、コハク酸-ユビキノ酸化還元酵素活性中心であるユビキノ結合領域やヘム結合領域のコンセンサ配列は80%以上の相同性を有している。したがって、線虫*mev-1*変異体の原因遺伝子がコードするユビキノ結合領域内のアミノ酸点変異も、パラガングリオーマ疾患原因遺伝子同様の電子伝達阻害を惹き起こしていると考えられ、パラガングリオーマや褐色細胞腫などの発癌モデルとして有用であることが窺える。

現在、パラガングリオーマや褐色細胞腫などの発癌原因となる複合体IIサブユニットの変異による影響は、線虫*mev-1*変異体で報告された酸化ストレス発生ばかりではないと考えられている。パラガングリオーマの発症リスクには、慢性動脈低酸素血症を伴う呼吸器疾患や心臓疾患、高地での生活などによる慢性低酸素環境が挙げられている。実際、これらの患者あるいは腫瘍組織ではコハク酸脱水酵素活性の低下に伴うコハク酸の蓄積が細胞質でのHIF1- α や2 α のプロリルヒドロキシル化を阻害することで、HIF1- α や2 α のユビキチンプロテアソーム系を阻害し、血管新生を担う血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) が増加していたという報告がある。さらに未だ不明な点が多いものの、癌細胞における低酸素環境下でのエネルギー代謝について興味深い報告がされた。これまで、細菌類において確認されていた低酸素環境下で働くNADH-フマル酸還元酵素活性が癌細胞においても確認されたというのである。

さらに最近、クエン酸回路でコハク酸脱水酵素の上流で働く、イソクエン酸脱水酵素の遺伝子変異が悪性神経膠腫や急性骨髄性白血病などの発癌の原因遺伝子であると報告され、第二のミトコンドリア癌抑制遺伝子として注目を集めた。イソクエン酸脱水酵素の阻害は2-

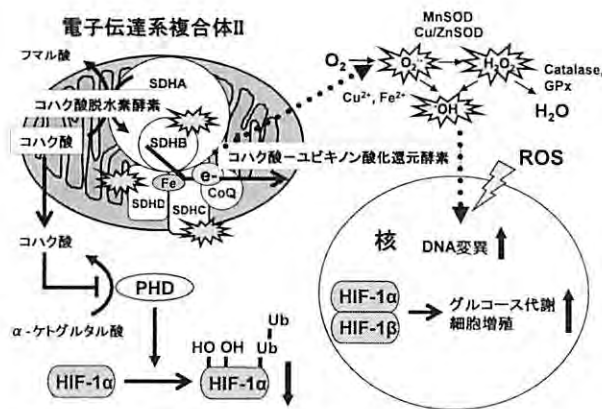


図2. 電子伝達系複合体II変異を起因とする発癌機序

ヒドロキシグルタル酸 (2-HG) の蓄積を誘導し、 α -ケトグルタル酸 (α -KG) と競合し、ヒストン脱メチル化酵素 (JMJD2A, C) 活性の阻害を惹き起こすことが報告された。また、2-HGと α -KGとの競合は、ミトコンドリアエネルギー代謝の中心を担うクエン酸回路を阻害する。これは、好氣的エネルギー代謝を阻害することを意味しており、前述した細菌で起こる嫌氣的エネルギー代謝NADH-フマル酸還元酵素の活性化を想起させる。

*mev-1*細胞株では、核遺伝子の高頻度変異が確認されていることから、イソクエン酸脱水酵素の阻害によって生じているヒストン脱メチル化酵素活性の阻害との関連が興味深い。さらに、*mev-1*細胞株での複合体IIでの電子伝達阻害による $O_2^{\cdot -}$ 発生が、イソクエン酸脱水酵素の阻害によって生じる2-HGと α -KGとの競合による低酸素誘導因子の活性化と嫌氣的エネルギー代謝であるNADH-フマル酸還元酵素活性の誘導と如何に関連があるのかも大変興味深い。今後、*mev-1*細胞株においてこれらの関連を明らかにすることで、ミトコンドリア癌抑制遺伝子群の変異による発癌機序の一端を明らかにできると期待している (図2)。

5. *mev-1* コンディショナルトランスジェニック (*Tet-mev-1*) マウスの解析

外来遺伝子発現の誘導をテトラサイクリン系薬剤の投与によって制御するテトラサイクリンシステムを用い、細胞株同様にSDHC^{V69E}をコードする外来遺伝子を導入したコンディショナルトランスジェニック (*Tet-mev-1*) マウスを作製した[17]。遺伝子発現のオン (rtTA (VP16) 依存的遺伝子発現誘導)・オフ (tTS (KRAB) 依存的遺伝子発現抑制) スイッチをテトラサイクリン薬剤投与・非投与で制御する従来のテトラサイクリン (Tet-On/Off) システムでは、線虫*mev-1*変異体を模したSDHC^{V69E}を発現する目的のマウス取得には至らなかった。従来のTet-On/Offシステムでは、テトラサイクリン系薬剤ドキシサイクリン非依的に微量な目的遺伝子の発現が確認されてしまう、あるいはドキシサイクリン依的に誘導されるSDHC^{V69E}遺伝子発現量は内在性のSDHC遺伝子発現量に比べ過剰量となることが問題となっていることが示唆された。そこで我々は、このTet-On/Offシステムを独

自に改良し、ドキシサイクリン薬剤依存的なSDHC^{V69E}遺伝子発現量を以下の点で厳密に制御できるシステムを構築した[17]。ドキシサイクリン薬剤非依存的な遺伝子発現の誘導とドキシサイクリン依存的に誘導される遺伝子発現量のそれぞれを従来のTet-On/Offシステムの1割程度となるように制御した。これにより、マウス個体内でドキシサイクリン薬剤依存的な遺伝子発現誘導を厳密なものとし、さらにその遺伝子発現量を単純な過剰発現誘導ではなく、厳密な量的制御下で内在性のものと競合を可能にしたシステムを実現した。このシステムの確立によって、我々は線虫*mev-1*変異体を模した*Tet-mev-1*マウスの作製に成功した。線虫*mev-1*変異体はホモ接合型突然変異遺伝子変異モデルであるが、ヒトでのパラガングリオーマなどの癌原遺伝子の遺伝形質はヘテロ接合型遺伝子変異である。このことは、マウス・ヒトなどの高等動物ではホモ接合型遺伝子変異体は致死であることを示唆しており、*mev-1*マウス細胞株やマウス個体作製の際、SDHC^{V69E}過剰発現変異体を得られなかったことが理解できる。このことを踏まえ、*mev-1*マウス作製の過程においてゲノムインプリンティングの可能性が示唆され個体差が生じてしまうヘテロ接合型ノックイン遺伝子変異モデルではなく、既に*mev-1*細胞株で実績が得られていたトランスジェニックシステムを用いたテトラサイクリンシステムを利用した遺伝子組換えモデル*Tet-mev-1*マウスの作製に至った。

現在、14系統の*Tet-mev-1*マウスの中からSDHC^{V69E}をコードする遺伝子発現の誘導が確認され、線虫*mev-1*変異体同様にパラコートに高感受性を示した1系統を解析に用いている。受精後胎生期を通してSDHC^{V69E}をコードする遺伝子発現を誘導させた*Tet-mev-1*マウスは、低出生体重仔として出生し、その後12週齢頃まで成長遅延を生じていることが確認された[17]。これらの表現型は、線虫*mev-1*変異体と同様の結果である。出生直後の新生仔*Tet-mev-1*マウスにおいて、ミトコンドリアO₂⁻の発存量、およびカルボニル化タンパク質の量が増大し、酸化ストレスが負荷されていることが確認された。ミトコンドリア電子伝達系複合体II - IIIのユビキノンを介した電子伝達効率が減少していることが確認され、線虫*mev-1*変異体同様に電子伝達系からの電子逸脱によりO₂⁻の発生が惹起されていると示唆された[17]。さらに、新生児期の全身薄切切片を作成しTUNEL染色と活性化カスパーゼ3の免疫組織化学染色を行った結果、全身において無秩序で過剰なアポトーシス誘導が確認された。特に、脳・筋肉・肝臓・腎臓・肺・外分泌腺器官において過剰なアポトーシス誘導が確認された。線虫*mev-1*変異体同様に、胎生期や新生児期の体細胞分裂が盛んな時期でのミトコンドリア酸化ストレスに惹起された過剰なアポトーシス誘導が低出生体重や成長遅延といった表現型の原因になっていることが明らかになった[17]。また、出生時や新生児期の表現型や成長遅延はユビキノンの摂取により改善されたことから、*Tet-mev-1*マウスの酸化ストレスの原因となるO₂⁻の発生は、タンパク質の一次構造からも示唆されていた複合体IIとユビキノンの親和性

低下による電子の逸脱によって生じていることが再確認された[17]。

現在、成長遅延を乗り越えた3ヶ月齢以降の生体において、その表現型解析に尽力している。*Tet-mev-1*マウスの表現型解析を実施する以前に、我々は*Tet-mev-1*マウスのコントロールとなっているC57BL/6jマウスの加齢依存的なミトコンドリアO₂⁻発生増加による酸化ストレス障害およびその影響について解析を進めてきた。その結果、ミトコンドリア酸化ストレスに起因する酸化障害は、眼で最も鮮明な加齢依存的な増加を示した[18]。近年、加齢黄斑変性・糖尿病網膜症などの網膜疾患やドライアイなどの角膜疾患の発症において、酸化ストレスが一因であるといった研究報告が注目を集めている。そこで、*Tet-mev-1*マウスにおけるミトコンドリア酸化ストレスと眼疾患について解析を進め、角膜と涙腺において表現型解析を終えたので報告する。角膜は5層構造を持ち、角膜上皮・ボーマン膜・角膜実質層・デスメ膜・角膜内皮に分類され、角膜表面は常に涙液で満たされている。ミトコンドリア酸化ストレス発生は細胞の生育環境における酸素濃度に依存しており、涙液の酸素分圧は血液中と同等であることから角膜における酸化ストレス障害は高いことが示唆されていた。実際、線虫*mev-1*変異体は酸素高感受性で、飼育環境の酸素濃度に依存してミトコンドリア酸化ストレス障害が蓄積されることが明らかにされている。

まず、*Tet-mev-1*マウスの眼において、SDHC^{V69E}をコードする遺伝子発現に依存した複合体II - III酸化還元酵素活性の低下が認められ、複合体IIとユビキノ間で生じる電子伝達障害に起因したO₂⁻の発生が確認された。これによって、細胞内構成成分の酸化障害マーカーであるカルボニル化タンパク質と8-OHdGの加齢依存的な蓄積が亢進されていた[19]。角膜では、内皮細胞数や実質層が加齢依存的に減少することが知られており、*Tet-mev-1*マウスではこれらの進行がさらに亢進していた。また、*Tet-mev-1*マウスではデスメ膜の肥厚が確認されたことから、角膜内皮細胞数の低下とデスメ膜の肥厚を病態とするフックス角膜内皮変性症の発症はミトコンドリアO₂⁻に起因する酸化ストレス障害によるものと示唆される成果を得た。また、*Tet-mev-1*マウスの角膜実質層の非薄化は加齢依存的なカタラーゼ活性の上昇に伴い生じており、未だ酸化ストレスとその発症機序との関連は明確にされていないが円錐角膜の病態を示しているものと示唆され、*Tet-mev-1*マウスが円錐角膜発症のモデル動物と成り得る成果が得られた[19]。さらに、*Tet-mev-1*マウスの角膜上皮では細胞分裂能が低下しており、加齢依存的な細胞数の減少が加速していた。その結果、角膜炎を発症し、角膜上皮剥離後の再上皮化が遅延することが確認された[19]。また、*Tet-mev-1*マウスでは涙腺の炎症が確認され、涙液の分泌量が低下していることから、ドライアイモデルとして有用であることが明らかにされた[20]。涙腺の炎症は、自己免疫疾患の一つシェーグレン症候群に確認される病態であるが、唾液腺での炎症は確認されなかった。このことから、*Tet-mev-1*マウスでの涙



図3. 酸化ストレスを起因とする生体の恒常性変容・破綻

腺炎症はミトコンドリア酸化ストレス障害に起因した表現型であり、ドライアイと角膜炎を発症する原因になっていると示唆された。

以上のことから、加齢依存的なミトコンドリア酸化ストレスの増加に起因するフックス角膜内皮変性症・円錐角膜・ドライアイ・角膜炎発症の眼疾患モデルとして*Tet-mev-1*マウスの有用性が示された。

6. おわりに

近年、様々な疾患が酸化ストレスに起因していると考えられるようになったが、その発症機序への酸化ストレスの明確な寄与が報告された例は少ない。特に老化研究において、ある特定の組織器官に生じる病的な加齢変化（病理学的老化の諸過程）を捉えた報告は数多く存在するが、慢性的な長期酸化ストレスによる個体レベルの加齢依存的な生理学的変化（生理学的老化の諸過程）を捉えた目覚ましい報告は少ないのが現状である。実際、抗酸化酵素群の遺伝子組換えを実施した酸化ストレス誘導モデルにおいて、寿命の決定あるいは個体老化の表現型に直接結びつくような研究成果を得ることは難しく、酸化ストレスと老化を対象とした研究分野では混沌とした時期が経過している。このような背景において、筆者らは、電子伝達系複合体IIのSDHCサブユニットのアミノ酸点変異（線虫：G71E、ショウジョウバエ：I71E、マウスV69E）が短寿命の原因となるミトコンドリア酸化ストレスを誘導することを報告している。この変異型SDHC^{V69E}をコードした遺伝子発現を任意の時期に誘導可能な*Tet-mev-1*マウスをミトコンドリアO₂⁻発生制御する慢性的酸化ストレス誘導モデルとして、その表現型解析に尽力している。これまで、低出生体重や成長遅延、フックス角膜内皮変性症・円錐角膜・角膜炎・ドライアイなどの角膜疾患の表現型を確認している。老化のフリーラジカル説あるいはミトコンドリア説の証明に直接貢献できる研究成果は未だ報告できていないものの、今後、当該モデルを用いてミトコンドリアO₂⁻に起因した慢性的酸化ストレスと短寿命との関連を個体レベルでの明確な生理学的変化を基に明らかに出来ると期待してい

る（図3）。

References

1. T. Ishii, M. Miyazawa, P.S. Hartman, N. Ishii, Mitochondrial superoxide anion (O₂⁻) inducible "*mev-1*" animal models for aging research, *BMB Rep.* 44 (2011) 298-305.
2. T. Ishii, M. Miyazawa, H. Onouchi, Y. Uchino, K. Yasuda, P.S. Hartman, N. Ishii, Model animals for the study of oxidative stress from complex II, *Biochim. Biophys. Acta.* (2012) *in press.* [PMID 23142169]
3. N. Ishii, T. Takahashi, S. Tomita, T. Keino, S. Honda, K. Yoshino, K. Suzuki, A methyl viologen-sensitive mutant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mutat. Res.* 237 (1990) 165-171.
4. S. Honda, N. Ishii, K. Suzuki, M. Matsuo, Oxygen-dependent perturbation of life span and aging rate in the nematode, *J. Gerontol. Ser. A Biol. Sci.* 48 (1993) B57-B61.
5. N. Ishii, M. Fujii, P. S. Hartman, M. Tsud, K. Yasuda, N. Senoo-Matsuda, S. Yanase, D. Ayusawa, K. Suzuki, A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome *b* causes oxidative stress and ageing in nematodes. *Nature* 394 (1998) 694-697.
6. H. Hosokawa, N. Ishii, H. Ishida, K. Ichimori, H. Nakazawa, K. Suzuki, Rapid accumulation of fluorescent material with aging in an oxygen-sensitive mutant *mev-1* of *Caenorhabditis elegans*, *Mech. Ageing Dev.* 74 (1994) 161-170.
7. H. Adachi, Y. Fujiwara, Ishii, N. Effects of oxygen on protein carbonyl and aging in *Caenorhabditis elegans* mutants with long (*age-1*) and short (*mev-1*) life spans, *J. Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* 53 (1998) B240-244.
8. N. Senoo-Matsuda, K. Yasuda, M. Tsuda, T. Ohkubo, S. Yoshimura, H. Nakazawa, P.S. Hartman, N. Ishii, 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 (2001) 41553-41558.
9. N. Senoo-Matsuda, P.S. Hartman, A. Akatsuka, S. Yoshimura, N. Ishii, A complex II defect affects mitochondrial structure, leading to *ced-3*- and *ced-4*-dependent apoptosis and aging, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 22031-22036.
10. N. Ishii, N. Senoo-Matsuda, K. Miyake, K. Yasuda, T. Ishii, P.S. Hartman, S. Furukawa, Coenzyme Q₁₀ can prolong *C. elegans* lifespan by lowering oxidative stress, *Mech. Ageing*

- Dev. 125 (2004) 41-46.
11. P.S. Hartman, N. Ishii, E.B. Kayser, P.G. Morgan, M.M. Sedensky, Mitochondrial mutations differentially affect aging, mutability and anesthetic sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. Mech. Ageing Dev. 122 (2001) 1187-1201.
 12. M. Tsuda, T. Sugiura, T. Ishii, N. Ishii, T. Aigaki, A *mev-1*-like dominant-negative SdhC increases oxidative stress and reduces lifespan in *Drosophila*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 363 (2007) 342- 346.
 13. T. Ishii, K. Yasuda, A. Akatsuka, O. Hino, P.S. Hartman, N. Ishii, A mutation in the SDHC gene of complex II increases oxidative stress, resulting in apoptosis and tumorigenesis. Cancer Res. 65 (2005) 203-209.
 14. H. Ichimiya, R.G. Huet, P. Hartman, H. Amينو, K. Kita, N. Ishii, Complex II inactivation is lethal in the nematode *Caenorhabditis elegans*, Mitochondrion 2 (2002) 191-198.
 15. M. Miyazawa, T. Ishii, M. Kirinashizawa, K. Yasuda, O. Hino, P.S. Hartman, N. Ishii, Cell growth of the mouse SDHC mutant cells was suppressed by apoptosis throughout mitochondrial pathway, BioScience Trends 2 (2008) 22-30.
 16. S. Niemann, U. Müller, Mutations in SDHC cause autosomal dominant paraganglioma, type 3. Nat. Genet. 26 (2000) 268-270.
 17. T. Ishii, M. Miyazawa, A. Onodera, K. Yasuda, N. Kawabe, M. Kirinashizawa, S. Yoshimura, N. Maruyama, P.S. Hartman, N. Ishii, Mitochondrial reactive oxygen species generation by the SDHC V69E mutation causes low birth weight and neonatal growth retardation, Mitochondrion 11 (2011) 155-165.
 18. M. Miyazawa, T. Ishii, K. Yasuda, S. Noda, H. Onouchi, P.S. Hartman, N. Ishii, The role of mitochondrial superoxide anion (O₂⁻) on physiological aging in C57BL/6J mice, J. Radiat. Res. 50 (2009) 73-83.
 19. H. Onouchi, T. Ishii, M. Miyazawa, Y. Uchino, K. Yasuda, P.S. Hartman, K. Kawai, K. Tsubota, N. Ishii, Mitochondrial superoxide anion overproduction in *Tet-mev-1* transgenic mice accelerates age-dependent corneal cell dysfunctions, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 53 (2012) 5780-5787.
 20. Y. Uchino, T. Kawakita, M. Miyazawa, T. Ishii, H. Onouchi, K. Yasuda, Y. Ogawa, S. Shimmura, N. Ishii, K. Tsubota, Oxidative stress induced inflammation initiates functional decline of tear production, PLoS One 7 (2012) e45805.

【トピックス】

エボジアミンは肥満とインスリン抵抗性を改善する

山下 均¹、王 挺²、楠堂 達也¹、竹内 環¹、李 勇学¹、喬 善楼¹、紺谷 靖英³、森 望⁴

¹中部大・生命健康、²岩手医大・消化器肝臓内科、³南九州大・健康栄養、⁴長崎大・医・解剖

1. はじめに

現在、内臓肥満をベースとするメタボリックシンドロームはその予備軍を含めて2,000万人を超え、男女ともに40歳以上でその割合が高くなる。肥満によるインスリン抵抗性はⅡ型糖尿病の最も重要な成因と考えられ、加齢と共に発症率が上昇する。従って、肥満の治療はⅡ型糖尿病の予防と治療につながるばかりでなく、他の生活習慣病の予防および健康寿命の延長に寄与するものと考えられる。

肥満はエネルギー収支の結果余ったエネルギーが白色脂肪細胞に過剰に蓄積した状態である。肥満は様々な要因により進行するが、体温調節に係わる分子群がエネルギー代謝の中でも極めて重要な役割を担い、その機能低下が肥満など老化の過程で生ずる種々の病態と関連することが近年明らかとなってきた。また最近、熱産生によりエネルギー消費に寄与する褐色脂肪細胞が加齢と共に減少していくことが肥満の原因の1つと考えられ、褐色脂肪細胞をターゲットとした肥満予防法の開発に注目が集まっている[1]。我々は、褐色脂肪熱産生の中心分子であるミトコンドリア脱共役蛋白質-1 (UCP1) を欠損するマウスが、ヒトと同様に加齢と共にインスリン抵抗性を伴う肥満を呈すること[2]、生薬ゴシュユの主要成分であるエボジアミン (Evodiamine) がUCP1欠損型肥満に対しても予防効果を示すこと[3,4]を報告している。

エボジアミンは、温度受容体TRPV1のリガンドであるカプサイシンと類似の薬理作用を有することが古くから知られてきた。しかし、我々の研究からエボジアミンはカプサイシンにはみられない白色脂肪細胞の分化阻害やインスリン抵抗性の改善などの新規作用も有することが明らかとなっている。本稿では、肥満およびインスリン抵抗性に対するエボジアミンの作用について紹介する。

2. エボジアミンの抗肥満メカニズム

カプサイシンやエボジアミンは血管拡張作用により体表からの熱放散を促進する[5]。続いて、交感神経系が活性化されて褐色脂肪細胞による熱産生が起こる際に、エネルギーが消費され抗肥満につながると考えられる。そこで我々は、実際にエボジアミンが褐色脂肪細胞におけ

るUCP1機能依存的に抗肥満作用を発揮するかどうかをUCP1欠損マウスを用いて検討した。その結果、予想に反してエボジアミンは、野生型マウスに対してと同様に、UCP1欠損マウスの食事誘導性肥満を強く抑制し耐糖能を改善することが明らかとなった[3]。すなわち、エボジアミン (300mg/kg飼料) を添加した高脂肪食を2ヶ月間摂取したマウスでは、高脂肪食のみを摂取したマウスに比べて、摂食量に差はみられなかったが、体重、脂肪組織量、血中レプチンおよびインスリン量などの有意な低下が観察された。また、肥満に伴う脂肪肝の改善なども認められ、エボジアミンが褐色脂肪細胞のUCP1機能に依存しないユニークな抗肥満作用を有することが明らかとなった。

それでは、エボジアミンはどのような作用メカニズムで抗肥満作用を発揮するのであろうか？肥満が進行する過程では、白色脂肪細胞は過剰なエネルギーを中性脂肪としてより多く蓄えるために肥大化するが、それと同時に、成熟白色脂肪細胞の数の増加が肥満の進展における重要な要素となる。脂肪細胞の分化は様々なシグナル伝達分子や転写因子により制御される。特に、白色脂肪前駆細胞が増殖から分化に移行する初期過程において、増殖期に高いERK/MAPK活性が低下することが白色脂肪細胞への分化のトリガーとして重要である[6]。3T3-L1脂肪前駆細胞の培養系を用いてエボジアミンの白色脂肪細胞に対する直接作用を検討した結果、エボジアミンは脂肪前駆細胞の初期分化においてERK/MAPK活性の低下を阻害することが明らかとなった[7]。3T3-L1脂肪前駆細胞はTRPV1をほとんど発現せず、実際にカプサイシンにはエボジアミンと同様の作用は認められないことから、TRPV1以外のターゲットとなる受容体の関与を検討した。その結果、エボジアミンはEGF受容体のリン酸化を介してPKC α -MEK経路を経てERK/MAPKを活性化することが明らかとなった(図1)。このERK/MAPKの活性化により、脂肪細胞分化に重要な役割を果たす転写因子C/EBP β およびPPAR γ 蛋白質の発現が強く阻害されて白色脂肪前駆細胞の分化が阻害されることが判明した。また、ERK/MAPKの活性化はPPAR γ をリン酸化(不活性化)することも報告されている[8]。

3. エボジアミンの抗インスリン抵抗性メカニズム

エボジアミンはERK/MAPKの活性化を介して白色脂肪細胞分化を強く阻害することが明らかとなったが、インスリン抵抗性に対する作用は明らかではない。組織におけるインスリン抵抗性のメカニズムとしては、インス

連絡先：〒487-8501

愛知県春日井市松本町1200

Tel: 0568-51-1111

Fax: 0568-51-6017

E-mail: hyamashi@isc.chubu.ac.jp

リン受容体基質1 (IRS-1) のSerリン酸化が重要である。また、IRS-1のSerリン酸化はラパマイシン標的蛋白質 (mTOR) を介してp70S6キナーゼ (S6K) により活性化される[9]。肥満によりインスリンレベルが上昇すると、Aktのリン酸化を介してmTOR-S6K経路が活性化され、IRS-1のSerリン酸化によるインスリン抵抗性が亢進することが予想される。そこで、エボジアミン添加高脂肪食を摂取したUCP1欠損マウスの白色脂肪組織についてこれらのシグナル分子を解析した結果、コントロール群に比べて、エボジアミン摂取群においてAkt、mTORおよびIRS-1のSerリン酸化レベルが低いことが見出された (図2)。同様の結果は、肥満糖尿病モデルKK-Ayマ

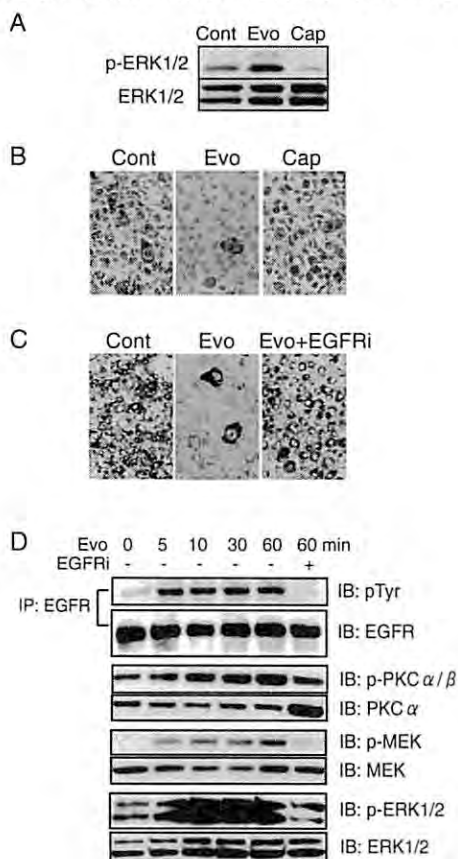


図1 エボジアミンの脂肪細胞分化阻害メカニズム
A, B. 3T3-L1脂肪前駆細胞におけるERKリン酸化 (A) 及び分化 (B) に対するエボジアミン (Evo) とカプサイシン (Cap) の効果。C. EGF受容体阻害剤 (EGFRi) によるエボジアミンの抗脂肪細胞分化作用の阻害。D. 脂肪前駆細胞のエボジアミン刺激によるEGFR、PKC α 、MEK及びERKリン酸化の経時変化とEGFRiの作用。(文献3, 7より引用改変)

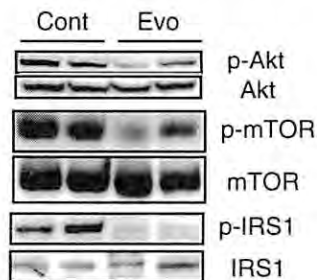


図2 エボジアミン添加 (300mg/kg) 高脂肪食を2ヶ月間摂取したUCP1欠損マウスの白色脂肪組織におけるAkt、mTOR及びIRS-1 Serリン酸化レベル

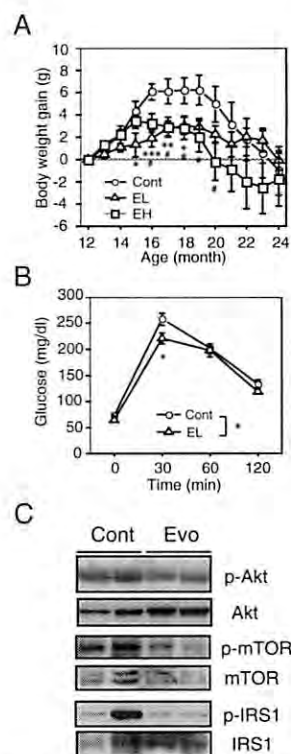


図3 加齢性肥満及びインスリン抵抗性に対するエボジアミンの効果

A. 12ヶ月齢からエボジアミンを1 mg/kg (EL群) 又は10mg/kg (EH群) 添加した標準食を摂取したC57BL/6Jマウス体重の経時変化。B, C. 18ヶ月齢における耐糖能試験 (B) 及び白色脂肪組織におけるAkt、mTOR及びIRS-1 Serリン酸化レベル (C)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ Cont vs. EL group. # $P < 0.05$ Cont vs. EH group.

ウスにエボジアミンを1週間腹腔内投与した実験においても観察された。従って、エボジアミンはmTOR-S6K経路の活性化を阻害することにより過剰なインスリンシグナル経路の活性化とIRS-1のSerリン酸化を抑制しインスリン抵抗性の改善に寄与するものと考えられた。

4. 加齢性肥満とインスリン抵抗性に対するエボジアミンの効果

カロリー制限による寿命延長においてmTOR経路の重要性が最近明らかとなってきた。実際に、マウス実験においてmTOR-S6K経路を阻害すると高脂肪食下でも肥満にならずインスリン抵抗性が改善すること[9]、mTOR阻害薬のラパマイシンの長期投与により寿命が延びること[10]が報告された。エボジアミンが細胞および組織レベルにおいてmTOR経路を阻害し抗肥満/抗インスリン抵抗性作用を示すことから、エボジアミンの長期摂取による加齢性肥満とインスリン抵抗性に対する効果について検討した。C57BL/6Jマウスの体重は低脂肪の標準食摂取によっても自由摂食下において加齢とともに増加し、18ヶ月齢頃にピークとなる。しかし、12ヶ月齢からエボジアミン添加飼料 (1又は10mg/kg標準食) を摂取したマウスでは、コントロール群に比べて摂食量はむしろ高い傾向がみられたが体重増加は有意に抑制され、18ヶ月齢ではインスリンレベルの低値と耐糖能の改善も認められた (図3A,B)。また、白色脂肪組織のシグナ

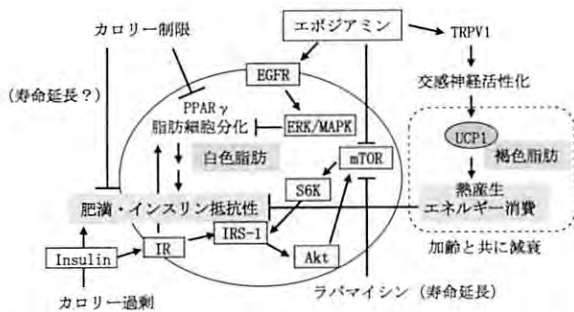


図4 エボジアミンによる脂肪細胞機能の制御

ル解析を行った結果、コントロール群に比べて、エボジアミン摂取群においてAkt、mTORおよびIRS-1のSerリン酸化が低下していることが観察された。一方、寿命に対する効果については、エボジアミン群とコントロール群の間に有意差はみられなかった。

5. おわりに

最近、Mattisonらはアカゲザルの研究からカロリー制限は疾患発症リスクを軽減して健康を増進する効果はあるが寿命延長効果については否定する結果を報告した[11]。一方、我々が直面するカロリー過剰状態により加齢とともに進行する肥満は、糖尿病や動脈硬化発症を助長して心血管系疾患を招き寿命短縮につながる。現在、加齢に伴う褐色脂肪細胞の減少を抑えることにより肥満を予防する方法の開発に注目が集まっているが[1]、エボジアミンは褐色脂肪細胞の活性化作用と白色脂肪細胞の分化阻害作用を併せもつ極めてユニークな機能性分子であり、褐色脂肪細胞の減衰したヒトに対しても摂食量を減らすことなく、加齢性肥満及びインスリン抵抗性を改善する新しい予防/治療法を提供する可能性が明らかとなった(図4)。エボジアミンはラパマイシンと同様に抗ガン作用を有することも報告されている。健康寿命を延長する画期的なアンチエイジング剤として、エボジアミン研究のさらなる進展が期待される。

参考文献

1. 文部科学省科学技術政策研究所. 肥満解消に期待される褐色脂肪細胞における新知見. 科学技術動向 99(6):4, 2009.
2. Kontani Y, Wang Z, Kimura K, Inokuma K, Saito M, Suzuki-Miura T, Wang Z, Sato Y, Mori N and Yamashita H. UCP1 deficiency increases susceptibility to diet-induced obesity with age. *Aging Cell* 4:147-155, 2005.
3. Wang T, Wang Y, Kontani Y, Kobayashi Y,

Sato Y, Mori N and Yamashita H. Evodiamine improves diet-induced obesity in a UCP1-independent manner: Involvement of anti-adipogenic mechanism and ERK/MAPK signaling. *Endocrinol* 149: 358-366, 2008.

4. 山下 均. 脂肪細胞の役割からみる肥満-新しい肥満予防法開発の試み-. 中部大学生命健康科学研究所紀要 4:47-53, 2008.
5. Wang Y, Kimura K, Inokuma K, Saito M, Kontani Y, Kobayashi Y, Mori M and Yamashita H. Potential contribution of vasoconstriction to suppression of heat loss and homeothermic regulation in UCP1-deficient mice. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 452: 363-369, 2006.
6. Sakaue H, Ogawa W, Nakamura T, Mori T, Nakamura K and Kasuga M. Role of MAPK phosphatase-1 (MKP-1) in adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 279:39951-39957, 2004.
7. Wang T, Wang Y and Yamashita H. Evodiamine inhibits adipogenesis via EGFR- $PKC\alpha$ -ERK signaling pathway. *FEBS Lett* 583:3655-3659, 2009.
8. Hu E, Kim JB, Sarraf P and Spiegelman BM. Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma. *Science* 274:2100-2103, 1996.
9. Um SH, Frigerio F, Watanabe M, Picard F, Joaquin M, Sticker M, Fumagalli S, Allegrini PR, Kozma SC, Auwerx J and Thomas G. Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* 431:200-205, 2004.
10. Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, Nadon NL, Wilkinson JE, Frenkel K, Carter CS, Pahor M, Javors MA, Fernandez E and Miller RA. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* 460:392-395, 2009.
11. Mattison JA, Roth GS, Beasley TM, Tilmont EM, Handy AM, Herbert RL, Longo DL, Allison DB, Young JE, Bryant M, Barnard D, Ward WF, Qi W, Ingram DK and de Cabo R. Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature* 489:318-321, 2012.

【トピックス】

食にまつわる老化関連疾患 —疾患に学ぶ抗老化食—

白井 厚治

東邦大学医療センター佐倉病院血管機能学講座

1. はじめに

「人は、食べたものそのものである」という諺があるが、唯物論的には正しく、人間が食べて生きている以上この柵からは逃れられない。老化のメカニズムと対策は永遠のテーマであり基礎研究から多くの知見が得られているが、この「食」が老化を大きく左右していることは、近年多くの研究から支持されている。日常臨床でも、老化と関連する動脈硬化、筋肉減少症には「食」が密接に関わっていることを痛感する。

食と関連する老化類似疾患は様々あるが、身近に接するものを大別すると、過食による疾病と小食による疾病に分けられる。過食の典型的弊害はメタボリック症候群であり、動脈硬化へとつながる。小食はサルコペニア（筋肉委縮症）であり、脚力低下、転倒、骨折、寝たきり、認知症へとつながってゆく。いずれも老化と密接に関わる。

また、老化研究の問題点の一つに評価系がある。これまで多くの指標がとり上げられてきたが、「人は血管と共に老いる」とも言われている。近年わが国で開発された新しい動脈弾性指標、cardio-ankle vascular index (CAVI)は、測定時血圧に非依存的で、年齢と相関、喫煙、肥満、高血圧、糖尿病で増加し、ほぼあらゆるストレスは血管に集約されていることを明らかにしている。このCAVIを指標にすれば、老化研究は大いに進む可能性がある。

本項では、「食にまつわる老化関連疾患」から「食」を眺め、抗老化対策につながる「食」のあり方、及び、血管年齢を表すCAVIについて述べる。

2. 過食と老化

1) メタボリック症候群と老化

老化研究の中で、もっとも老化との関連が認められるものに摂取エネルギー量がある。中でも確実に生命予後と関係するのは、摂取エネルギー制限であると言われていた[1]。動物種を問わず、線虫から猿まで、摂取エネルギーを過剰あるいは自由摂取で飼育するよりは、多少減じたほうが、寿命が延びると報告されている[2]。たくさん食べれば元気がよく長生きと考えられてもいたが、そ

れは食糧不足時代の妄想であり、飽食の時代を迎えたこの現代社会においては、過食は寿命を縮める最大要因であることが指摘されたわけである。それを人で実証しているのが、いわゆるメタボリック症候群であろう。わが国では、2000年頃に健康に関する沖縄問題から気付かれ始めた。1990年までは全国でも長寿県として誇り高き沖縄県で、10年後の2000年には男性の平均寿命は全国で5位から24位に転落したのである。その原因は、高齢者の寿命が短くなったためでなく30-50歳代の死亡率が上昇したためで、全国平均の1.5倍を呈していた。死因は、心筋梗塞、脳梗塞などの動脈硬化性疾患であった。その原因として有力視されたのが「肥満」であり、BMI>25以上の頻度が、沖縄では日本全体の約2倍であり、これがメタボリック症候群を引き起こしたためと思われる。当時、海外でも肥満が問題視され、内臓脂肪蓄積が主因で、それに高血圧、糖尿病、脂質異常(高トリグリセリド血症、低HDL血症)を合わせて発生する病態と認識され、世界中でこれを「メタボリックシンドローム」と呼ぶようになった。問題は決して沖縄に限ったことでなく、世界の趨勢の一端であり、その後確実に日本全国に蔓延したのである。男子のBMI 25以上の発生率は平成10年当時に25%であったものが、平成19年には31%となり、なおも増加傾向という現実がある。近年、糖尿病が増加し、1000万人とされている。動脈硬化性疾患の温床となっているが、さらに糖尿病は腎症、腎不全を引き起こし、現在30万人いる透析患者の約50%は糖尿病性腎症からのものである。今後、この傾向は更に進行すると予測されている。

2) メタボリック症候群の病態発生

メタボリック症候群の病態は、その背景にインスリン抵抗性の亢進があり、さまざまな関連する核内レセプター、分子マーカーが発見されている。脂肪細胞で重要と思われる代謝調節要因の変動をみると、過食により肥大した脂肪細胞からTNF α の分泌亢進があり、これがインスリンによる糖の取り込みを抑制する。アンジオテンシノーゲンの産生亢進により栄養血管が収縮し血流を途絶させる。またリポタンパクリパーゼの産生低下は血中のトリグリセリドの分解抑制に働く。これらは、それぞれ全身に対しては、高血糖—糖尿病、高血圧、高トリグリセリド血症をもたらす反応である。しかし、脂肪細胞にとっては、糖、脂肪酸の供給過剰を抑制させる抵抗であり、過食に対する脂肪細胞の肥大化阻止反応、或いは防衛反応ともいえる。

問題は、今の臨床現場では、原因を絶つべく食事指導

連絡先：〒285-8741

千葉県佐倉市下志津564-1

Tel: 043-462-8811

Fax: 043-489-9770

E-mail: kshirai@kb3.so-net.ne.jp

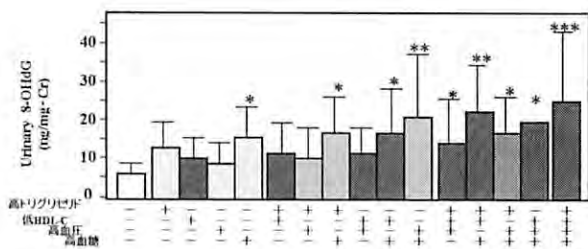


図1. メタボリックシンドローム諸症状と酸化マーカー (尿中8-OHdG)

東邦大佐倉病院内科講座 齋木ら

で減量を行えば解決すべきところを、その「食」管理は後回しで、インスリンに始まる抗糖尿病薬、降圧剤、脂質異常改善薬の投与に奔走している傾向が必ずしも否定できないことである。

次に、なぜいづれも軽微な兆候しかないメタボリック症候群がかくも臓器障害を起こすに至るのか考えてみた。我々はメタボリック症候群兆候の増加と酸化ストレスとの関係を調べた (図1)。明らかに、重症化と共に酸化物質の増加が観察された。メタボリック症候群は、表面に現れた症状に加えて根底に「酸化」充進病態があり、これが諸症状と相まって血管障害性に働き、動脈硬化促進と腎機能障害を引き起こし、ひいては老化に促進的に作用していると考えられる。

以上の悪循環を断つとすれば、本病態を過食症候群と認識し、医療体制全体が「食」の見直しと改善にチャレンジする必要がある。

3) 抗メタボリックシンドローム食は抗老化食

エネルギー制限を中心に肥満治療を行うに際し、まず、総摂取エネルギーは腹7分目にし、蛋白、ビタミン、ミネラルを必要量とり、糖質、脂肪成分は極端に減らしてよいはずである。それを容易に実現するものとしてフォーミュラ食がある。医療用に用いられているものにオベキアやマイクロダイエット (1パック180 kcal、蛋白20 g、各種ビタミン、ミネラル含有) があり、一袋を水400 mlに溶かし飲んでもらう。我々は、積極的にこのフォーミュラ食を日常の食事指導に用いている。その効果は一般食で指導をするより顕著である。しかも、指導

表1. 一般食とフォーミュラ食利用による体重1%減少に於ける心疾患危険因子の改善率 (%) の比較。

心疾患危険因子	体重1%減少に於ける心疾患危険因子の改善率 (%)		
	通常食群 (CD)	フォーミュラ食群 (FD)	P値
内臓脂肪部分 高値グループ (>100cm ²)	24週 1.342 (n=50)	2.373 (n=64)	0.029
8週 0.591	1.988	0.093	
拡張期血圧 高値グループ (>140mmHg)	16週 0.845 (n=44)	1.470 (n=47)	0.142
24週 0.633	0.713	0.834	
8週 1.203	1.432	0.810	
収縮期血圧 高値グループ (>90mmHg)	16週 0.883 (n=28)	1.212 (n=22)	0.654
24週 1.185	0.200	0.161	
8週 1.872	2.249	0.503	
HbA _{1c} 高値グループ (>7%)	16週 1.626 (n=56)	2.742 (n=58)	0.030
24週 1.096	2.187	0.032	
8週 -0.354	-0.855	0.643	
Non HDLコレステロール 高値グループ (>160mg/dL)	16週 -0.122 (n=43)	-0.197 (n=51)	0.854
24週 0.000	0.168	0.720	
8週 1.133	5.304	0.031	
トリグリセリド 高値グループ (>150mg/dL)	16週 -0.306 (n=44)	3.667 (n=44)	0.229
24週 2.337	3.349	0.534	
8週 0.957	-0.050	0.266	
HDLコレステロール 高値グループ (<50mg/dL)	16週 -0.270 (n=48)	-0.662 (n=58)	0.417
24週 -0.016	-1.251	0.013	

Shirai et al. Obes Res Clin Pract doi:10.1016/j.orcp.2012.03.002. 2012より

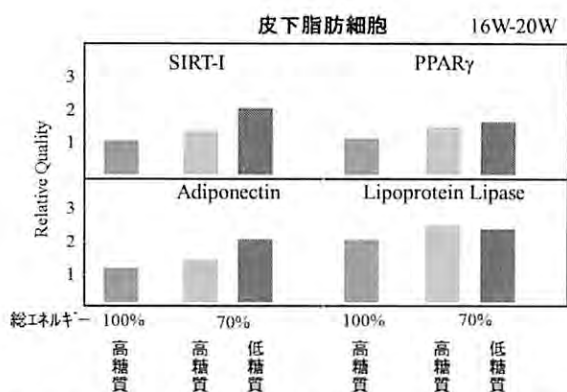


図2. Zuckerラットでの摂取エネルギー制限+低糖質食による各種分子発現

J Atheroscler Thromb 19:127-136. 2012より

も「今の食事の中で、一食をこれに代えて服用してください」と容易で、エネルギー制限と、高蛋白、低糖質を保障できる。その効果を多施設で検討した結果をみると、体重の減少、血圧低下は、一般食でのエネルギー制限食よりは顕著であった[3]。しかも、1%の体重減少あたりの代謝改善度をみると、内臓脂肪低下度、HbA_{1c}改善度、非HDLコレステロールの改善、HDL-Cの改善度はより改善度が高かった (表1)。それは高蛋白、低糖質食が、減量とメタボリックシンドロームに効果的で、結局、抗老化食につながることを示唆していると思われる。

それを動物実験で検証することにした成績を図2に示す。メタボリックシンドロームのモデルであるZuckerラットに30%の低エネルギーかつ低糖質食を与えて飼育したところ、高糖質食に比し、体重、内臓脂肪量は減量がより顕著で、かつ血糖低下、脂質改善も優れていた。さらに、脂肪細胞でのSIRT1 (長寿遺伝子)、PPARγ (インスリン感受性促進)、アヂポネクチン (脂肪細胞由来抗動脈硬化因子)、リポタンパクリパーゼ (インスリン感受性のマーカー) の発現をみると、低エネルギー食+低糖質食が、最もこれら因子の発現増加を認めた。長寿遺伝子とされるSIRT1を中心に、細胞自体の形質が変化していることが確認されたわけである[4]。単に供給が減ったため、血液で糖質成分が減り、やつれたのではなく、脂肪細胞の生き生きと活性化している断面像が見

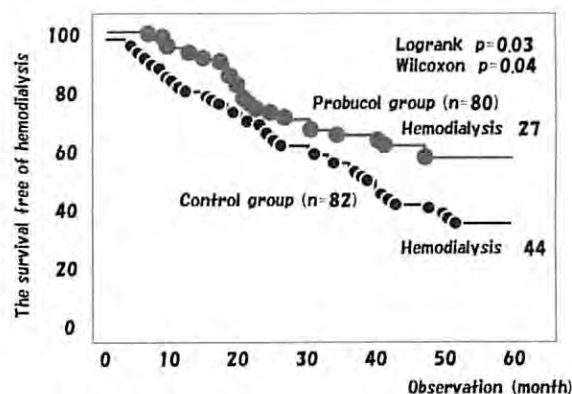


図3. 糖尿病性腎機能低下例に対するプロブコールの効果-透析移行率の比較-

Endo K, et al. J Atheroscl Thromb 2012 in pressより

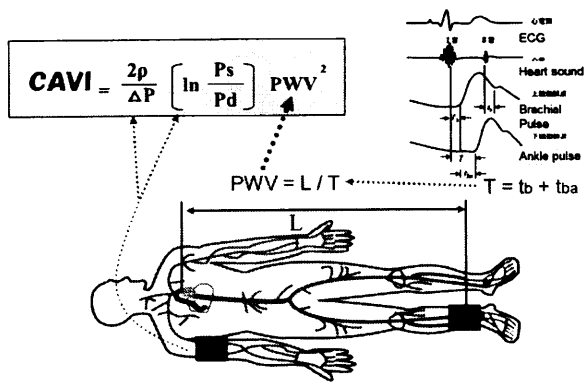


図4. Cardio Ankle Vascular Stiffness Index (CAVI)の測定法と原理
Shirai K, Utino J, et al. J Arterioscl Thromb 13:101-107, 2006より

えたと解釈している。

もう一つ重要なことは「酸化」への対策である。減量でも減るが、もっと積極的に薬物で抗酸化作用が効果を表すか検証を試みた。腎不全末期は、結局、腎血管の動脈硬化対策が求められる。我々は、動脈硬化はコレステロール酸化物による慢性炎症と考えてきたが、そうであれば抗酸化作用が最も強いとされるプロブコール投与で腎不全進展が抑制可能ではないかと考えた。糖尿病性腎症、それも蛋白尿2+、クレアチニン1.5 mg/dl以上に対して、プロブコール500 mg / 日服用で開始後5年間追跡すると、クレアチニン上昇抑制と透析移行率(図3)は明らかに抑制された[5]。

抗酸化療法は腎硬化症を抑制しうる可能性があり、ひいては抗老化も期待できるかもしれない。食事、薬物も含め、抗酸化療法はさらに強力なものを模索する価値は十分にあると思われる。

3. 小食の老化への弊害

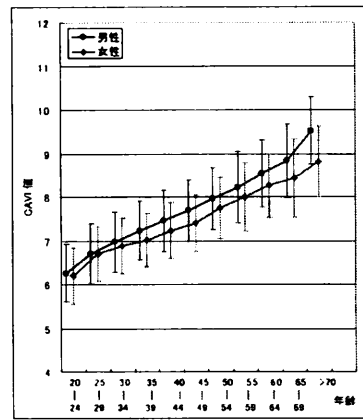
1) 筋肉減少症

近年、高齢化社会を迎え、蛋白質を摂取しないで痩せている高齢者が増加しつつある。一人暮らしなど社会体制のひずみがここにあらわれ、由々しき状況である。筋肉低下は、さまざまな機能を低下させる。嚥下障害、呼吸筋力低下、脚力低下などをもたらし、これにとどまらず、誤嚥性肺炎、心機能低下、転倒、骨折、心不全、寝たきりになる可能性が十分にある。

2) 褥瘡治療から学ぶ。高蛋白食と組織再生

褥瘡は、しばしば高齢者の体動困難者、長期臥床者で見られる合併症であり、治療に苦慮する。褥瘡患者では、しばしば低栄養が回復の困難な原因となっている。低アルブミン血症が主因である。それに対し通常食を食べるように工夫してもなかなかアルブミン値は上昇しない。そのような例に、高蛋白食となるようフォーミュラ食追加を行った。すると、速やかなアルブミン上昇と共に、褥瘡の改善が認められた例を経験した。現在、さらに多人数で検証中である。

今、慢性腎透析患者に対して、食事療法が変わりつつある。かつては低蛋白食を極限まで強いていた。しかし、



1. 10歳毎、CAVI=0.5 (1年で、0.05)
2. 男女差 0.2 (=約5年差)

男性:
3,259名
女性:
3,534名

図5. 日本人健常群での性・年齢別CAVI平均値(5歳毎)
Shirai K, et al. J Arterioscl Thromb 18:928-938, 2011より

前向き調査で見ると高蛋白(1.0-1.5 g/日)ほど、生命予後の良いことが報告されるようになった。それを境にリンを若干無視しても高蛋白をすすめる傾向にある。

腎機能低下で透析中の人ですら高蛋白食が生命予後を良くするとすると、一般人においても高蛋白食がすすめられることになる。おそらく、抗老化食として意味を持つであろう。

4. 血管老化の新定量法としてのCAVIの役割について

老化を定量化することは必ずしも容易でなく、しわ、アルブミン値、動脈石灰化などがメルクマールとして用いられてきた。これまで「血管と共に人は老いる」と言われ、血管の硬化を指標とする考え方もあった。それには動脈伝搬速度(PWV)が「血管年齢」などともよばれ、用いられてきた。残念なことPWVは測定時の血圧に依存するという欠点がありそれを克服できなかった。それに対し、新たに血管の伸展性に着目し、CAVIが我が国で開発された[6]。その基礎データ作成に、東邦大学佐倉病院の若き医師、コメジカル、更に誠仁会みはま病院の臨床工学技士の多大な協力を得たが、現在、世界的にも認められはじめた。

そもそも、動脈は単なる無機的な管ではなく弾力性がある。この弾力性のおかげで、心臓は効率よく末梢に血液ひいては栄養素を送ることができるわけである。原理は、林紘三郎先生が開発提示したstiffness parameter β

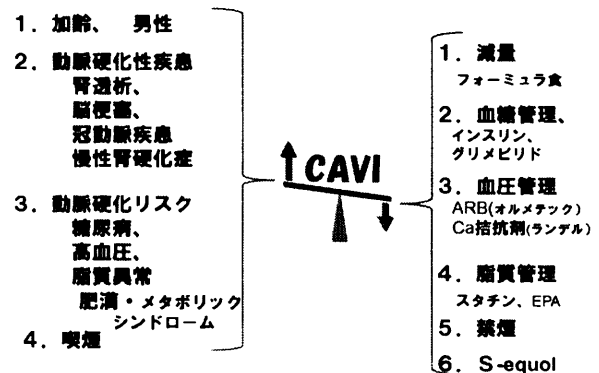


図6. CAVIを上げる諸因子と改善因子
Shirai K, et al. J Arterioscl Thromb 18:928-938, 2011より

であるが、それに、脈波速度の2乗は血管容積変化と相関 (Brammwell-Hillの式) することから、口径変化は脈波速度の2乗と関係するとの式を導き、これを stiffness parameter β の式に導入したもので、一定の血管口径の変化に必要な圧として求められる (図4)。このCAVIは測定時血圧に依存せず、年齢と共に直線的に増加 (図5)、動脈硬化と相関し、他に脳梗塞、腎不全、冠動脈疾患で高値、また、糖尿病、高血圧、脂質異常、喫煙で高値を示す。また、治療による改善が望め、減量、血糖コントロール、降圧治療、脂質管理、禁煙で抑制される (図6)。これをみると、生体にとって殆どすべての生活習慣の乱れやストレスは血管に硬化亢進をもたらしていることが判明した [7]。

このCAVIは、個人ごとに追跡すると心血管イベント発生を予測する可能性がある。動脈の拘縮が動脈破綻の原因となっている可能性である (contracture theory)。現在その詳細を検討中である。

いずれにせよ、日常生活のなかでCAVIを計測することは恒常性の乱れの早期発見につながり、今後、老化研究の新しい指標として役立つ可能性がある。

謝辞：本研究の多くは東邦大学佐倉病院内科講座の若手医師の尽力で行われたものであり、ここで改めて感謝の意を表したい。

引用文献

1. Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, et al. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science* 305:390-392, 2004.
2. Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, et al. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* 325: 201 - 204, 2009.
3. Shirai K, Saiki A, Oikawa S, et al. The effects of partial use of formula diet on weight reduction and metabolic variables in obese type 2 diabetic patients — - Multicenter trial. *Obes Res Clin Pract* doi:10.1016/j.orcp.2012.03.002, 2012.
4. Yamaguchi T, Miyashita Y, Saiki A, et al. Formula diet is effective for the reduction and differentiation of visceral adipose tissue in Zucker fatty rats. *J Atheroscler Thromb* 19:127-136, 2012.
5. Endo K, Miyashita Y, Sasaki H, et al. Probuco delays progression of diabetic nephropathy. *Diab Res Clin Pract* 71:156-163, 2006.
6. Shirai K, Utino J, Otsuka K and Takata M. A novel blood pressure-independent arterial wall stiffness parameter : cardio-ankle vascular index (CAVI). *J Arterioscler Thromb* 13:101-107, 2006.
7. Shirai K, Hiruta N, Song M, et al. Cardio-ankle vascular index (CAVI) as a novel indicator of arterial stiffness: theory, evidence and perspectives. *J Arterioscler Thromb* 18:928-938, 2011.