

老化制御研究部

(1) 構成員

部長 今井 剛

室長

分子制御研究室 福井由宇子
遺伝子治療研究室 中西 章

流動研究員

丹下 正一朗

外来研究員

前川 尚也

研究生

伊崎 美加
深山 優子

(2) 平成 22 年度研究活動の概要

要約；実験研究成果も出始めた。査読付き学術論文 7 報。

前年度に行ったセットアップもほぼ終了し、通常に研究活動ができるようになった。まだ、必要な機器は存在するが、一応実験が行えるようになった。また、研究所 4 階の老化制御研究部実験室以外の実験場所として共通実験施設が本研究所には存在する。即ち、放射線実験施設や実験動物施設等で

ある。感染実験室も含めて、種々の申請等の業務をこなし、これら共通実験も滞りなく行えるようになった。

また、機関内共同研究や、機関外共同研究も徐々にはじまった。

機関内共同研究としては、独自性の高い、ナノテクノロジーを用いて精製した、種々のタンパク質を「共同利用推進室 渡辺淳室長」との共同研究により同タンパク質の同定を行ったことがあげられる。

機関外共同研究としては東京工業大学小林教授との共同研究で、世界的に合成が難しいといわれるプロスタグランジン誘導体の合成を行っていたき、その解析を行っている。さらには、部長が東京工業大学の特任教授公募に応募し、採用が決まったことである。平成 22 年度も東京工業大学特任教授として東京工業大学においても研究・教育等を行うことになった。

また、研究テーマはとして

- ①新規骨代謝制御シグナル
- ②女性ホルモンの新規作用
- ③人工ウイルスベクター

この 3 種の研究に関して成果が得られた。詳しい内容は後述する。

今井グループ: 福井由宇子、前川尚也、伊崎美加、深山優子、今井剛

新規骨代謝制御シグナルに関する研究

要約; 寝たきりの最も多い要因である骨粗鬆症の新規予防・治療法の開発につながる基盤研究が進んでいる。内在性ホルモンである PGJ2 の新規標的因子の精製・同定に成功した。

はじめに; 加齢に伴う疾患で、なおかつ介護が必要な寝たきりの主な要因であるものは骨粗鬆症である。

よって、骨粗鬆症の予防・治療法の開発は極めて重要である。

足腰がしっかりしていれば、実際の年齢よりも若返ることも可能で、老化も制御できるであろう。

よって、国立長寿医療研究センター老化制御研究部としては、全てに満足のいくテーマであると考えている。

東京工業大学小林教授が合成した PGJ2 誘導体を用いて、種々の解析を行った。ちなみに、PGJ2 は標的細胞において、転写因子核内受容体 PPAR- γ に結合して、転写を制御すると考えられている。PPAR- γ 作動薬コントロールとして Rosiglitazone を用いた。Rosiglitazone は高い親和性型 PPAR- γ アゴニストとして知られており、抗糖尿病薬である。TZD 骨格化合物の一つである。他のものは武田薬品工業の Pioglitazone (商品名アクトス) 等が知られている。

骨芽細胞株 MC3T3-E1 に PPRE-luciferase vector をトランスフェクションし、Rosiglitazone、PGJ2 誘導体を加えたところ、全ての化合物において PPRE 依存的転写量の増大が見られた。PGJ2 誘導体に関してはその増大量の最も大きい物は内因性 15d-PGJ2 であり、最も小さい物を PGJ2-4 と命名した。

次に、PGJ2s を骨芽細胞株 MC3T3-E1 に投与して、アポトーシスの活性を調べた。その結果、15d-PGJ2 にくらべて、前述の PGJ2-4 は極めて細胞死が少なかった。そこで、アポトーシスのトリガーであるミトコンドリアについての解析を行った。まず、骨芽細胞株に PGJ2s を投与して、ローダミン 123 の取り込みをみた。ローダミン 123 はミトコンドリアのマーカーとして知られているもので、とくにミトコンドリア膜状のイオンチャンネルの活性を見ていると考えられている。

通常は FACS 等を用いて解析を行うが、MC3T3-E1 細胞は浮遊細胞ではなく、接着細胞のため、接着した状態での解析が好ましいため、蛍光顕微鏡をもちいて解析を行った。その結果、15d-PGJ2 も PGJ2-4 も共にコントロールに比べて、ローダミン 123 の取り込みが減った。

福井グループ: 福井由宇子、前川尚也、伊崎美加、深山優子、今井剛

女性ホルモンの新規作用に関する研究

要約 ; 寝たきりの主な要因である骨粗鬆症の多くは女性ホルモン欠損（主には閉経による）ことは明らかである。女性ホルモン受容体は2種類知られているが、メインと考えられている ER- α の遺伝子改変マウスを作製・解析を行っている。

背景 ; 加齢に伴う疾患で骨粗鬆症は患者数、その後（とくに寝たきりへの移行）が悪い疾患である。

地域高齢者および当センターの患者の疫学的研究より高齢者（とくに後期高齢者）において、脂肪の量と骨密度が極めて密接に関係していることが判明した。

そのため、脂肪・骨を共に制御する因子の存在が示唆された。一つは前述の PGJ2 であり、もう一つは女性ホルモンである。

結果 ; まずは、女性ホルモン受容体 ER- α の脂肪細胞における機能解析を行った。

成熟脂肪細胞にて ER- α をノックアウトしたマウスを作製した。同マウスは脂肪萎縮症であった。よって、女性ホルモン-ER- α シグナルはアディポジェニック（脂肪分化促進）であることが判明した。平行して、いわゆる ER- α のノックアウトマウスを解析したところ、極めて興味深い結果が得られた。

脂肪のみにて ER- α を欠損すると脂肪萎縮症で、脂肪以外も ER- α を欠損すると、肥満（脂肪肥大）になった。即ち、正反対の結果である。解釈すれば、脂肪細胞自身の ER- α はアディポジェニックであるが、脂肪以外の ER- α は、例えば視床下部の ER- α 等、何かの内分泌的な因子の発現を介して反アディポジェニックであることが推測された。即ち細胞特異的な ER- α の機能である。少なくとも脂肪細胞において ER- α は正の制御因子であることが判明した。

このことは、培養脂肪細胞において試験管内脂肪分化をさせる時に、フェノールレッドを抜いた培地で行うと、脂肪分化が抑制される。フェノールレッドは女性ホルモン様の働きがあるため、試験管内においても女性ホルモンは脂肪分化因子である可能性がある。

次に、成熟脂肪細胞特異的に ER- α を強制発現するマウスを作製している。これは前述の強制発現とは正反対になくす物である。成熟脂肪細胞ノックアウトマウスの時と同様に脂肪細胞特異的発現が期待される aP2 遺伝子のプロモーターを用いた。そのプロモーターの下流にラビット β グロビン遺伝子のスプライスサイト、ER- α cDNA、SV40 ウイルスのポリ A サイトを挿入した発現ベクターを作成している。

中西グループ：中西章、丹下正一郎

人工ウイルスベクターに関する研究

要約；アルツハイマー病に対する経口ワクチン担体として腸管ウイルスを利用した各種ベクターの検討を行った。腸管ウイルスの一つであるアストロウイルスを用い、ウイルスベクター作成の基盤となる新規のリバースジェネティックス系を開発した。また、ノロウイルス人工粒子作成のための再構成系構築に着手し、より高い効果が期待できる経口ワクチンの作成をめざす。

はじめに；アルツハイマー病に対する免疫療法の一つとして、 $A\beta$ を腸管に発現させ粘膜免疫を誘起することにより、脳内アミロイド沈着の軽減、そして認知症病理の軽減が報告されている。われわれは、この療法効果を確認しかつより効果的なものとすべく、従来の経口ワクチン担体より高率な $A\beta$ 導入が期待できる腸管ウイルスをベースにした経口用導入ベクターの開発に取り組んでいる。

結果；アストロウイルスは、乳幼児に感染性胃腸炎をおこす腸管ウイルスである。このウイルスは比較的単純な遺伝子構造を持ち、ベクター化は難しくないと考えた。このウイルスの組換え体を作成するために、リバースジェネティックス系の作成をまず行った。GAPDH, HBVX, CAG プロモーターを利用

したプラスミドベースの発現系を作成して、組換えアストロウイルスの生成に成功した。

また、ヒトに対する非常に高い感染性で知られるノロウイルスをベクター化する研究も同時並行で進めた。ノロウイルス粒子は外殻タンパク質 VP1、内部タンパク質 VP2 及び Vpg、そしてゲノム RNA から構成されている。各コンポーネントの大量合成・精製を行い、試験管内で再構成することにより粒子を作成する条件検討を行った。再構成時の液量、各種コンポーネントの濃度、塩濃度、pH、各種バッファーを調べ、最も高率な粒子形成条件を検討した。

（以上国立感染症研究所ウイルス第二部片山和彦室長との共同研究）。

今後

ノロウイルス人工粒子作成については、条件検討を重ねてよりウイルス粒子に近い遺伝子導入性をもつ粒子の試験管内作成を試みる。アストロウイルスについては、感染性粒子生成の条件検討を進めつつ、そのアプローチを徐々にノロウイルスベクター作成に移行させ、ワクチン用担体として腸管ウイルスベクターの有効性の検証を行っていく。

I 論文発表

1 原著

高齢者住民における保有歯数と認知機能

Association with the lipid and sugar metabolism parameters, the number of teeth and cognitive function in elderly population.

今井剛、西永正典、中村知子、奥宮清人、松林公蔵、土居義典、松下健二

愛知学院大学歯学会誌 第48巻59-66ページ 2010年

Hiramoto M, Maekawa N, Masaike Y, Kuge T, Ayabe F, Watanabe A, Masaike Y, Hatakeyama M, Handa H & Imai T*.

High-performance affinity chromatography method for identification of L-arginine interacting factors using magnetic nanobeads.

Biomed Chromatogr 24:606-612, 2010.

高齢者の残存歯数と認知機能との関連性

今井剛、西永正典、松下健二

鹿児島大学医学雑誌 第61巻47-51ページ 2010年

Kusaka M, Katoh-Fukui Y, Ogawa H, Miyabayashi K, Baba T, Shima Y, Sugiyama N, Sugimoto Y, Okuno Y, Kodama R, Iizuka-Kogo A, Senda T, Sasaoka T, Kitamura K, Aizawa S, Morohashi KI.

Abnormal Epithelial Cell Polarity and Ectopic Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Expression Induced in Emx2 KO Embryonic Gonads.

Endocrinology 151:5893-5904, 2010.

Yokoyama C, Katoh-Fukui Y, Morohashi K, Konno D, Azuma M, Tachibana T.

Production and characterization of monoclonal antibodies to mouse germ cells.

Hybridoma 29:53-57, 2010.

Mizutani T, Sayama Y, Nakanishi A, Ochiai H, Sakai K, Wakabayashi K, Tanaka N, Miura E, Oba M, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Ono S.

Novel DNA virus isolated from samples showing endothelial cell necrosis in the Japanese eel, *Anguilla japonica*

Virology 412:179-87, 2011.

Tange S, Imai T, Nakanishi A.

An SV40 mutant defective in Vp4 expression exhibit a temperature sensitive growth defect.

Virus Research 157: 116-120, 2011.

2 総説

該当なし

3 著書、Chapters

今井 剛

皮膚の創傷治癒促進および老化防止機構の解明とその応用

中富健康科学、21、65-66、2010

4 その他、新聞・報道等

該当なし

5 特許申請、取得状況

該当なし

Ⅰ 学会・研究会等発表

前川尚也、伊崎美加、池田麻里衣、福井由宇子、川井絢也、稲富 聡、今井 剛

キノコ類におけるアルギニン誘導性インスリン分泌促進活性

日本きのこ学会第14回大会、2010年9月16日、東京

Minor capsid proteins of polyomavirus influence the cell tropism of the virus.

Nakanishi, A.

DNA tumour virus meeting (2010) July 15, Madison, USA

Association of Large T Antigen and Cellular Proteins to SV40 Vp1 During its Folding

Watanabe, M., Phamduong, E., Itoh, N., Nakanishi, A., Kasamatsu, H.

DNA tumour virus meeting (2010) July 16, Madison, USA

アストロウイルスリバーシジェネティック系の改良

丹下正一郎、Benoit Chapellier、左近田中直美、中西章

日本ウイルス学会 第58回 (2010) 11月8日 徳島

ヒトポリオーマウイルスの糖脂質結合解析とメルケル細胞ポリオーマウイルス
感染細胞系の樹立

松田 麻未, 李 天成, 中西 章, 片野 晴隆, 中村 智之, 鈴木 亮介, 畑中 研一,
脇田 隆字, 鈴木 哲朗

日本分子生物学会 第33回 (2010) 12月9日 神戸

II 公的研究費

1 厚生労働省

今井 剛 (分担) 600 万円

厚生労働省科学研究費補助金 創薬推進基盤研究事業

中西 章 (分担) 350 万円

厚生労働省科学研究費 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

2 文部科学省

福井由宇子 (主任 170 万円)

文部科学省 基盤研究 (C)核内膜構造とクロマチン・