

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590886

研究課題名(和文) Apop遺伝子を標的とした抗加齢療法の創出

研究課題名(英文) Creation of the anti-aging therapy that assumed Apop gene as a target

研究代表者

安田 修 (Yasuda, Osamu)

熊本大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：00372615

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：pop遺伝子は動脈硬化を発症した血管からクローニングされた機能不明の遺伝子である。機能解析の結果、Apop遺伝子の発現は細胞内小器官であるミトコンドリアの機能に影響を与えることが明らかになった。ミトコンドリアはエネルギーを生産するとともに酸化ストレスを発生し、細胞老化にも影響を与える器官でもある。本研究成果によってApop遺伝子の発現制御は細胞老化を制御しうることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Apop gene was originally identified as a gene of unknown function in the atherosclerotic aorta. Functional analysis showed that Apop, a mitochondrial protein, gene expression affects the function of mitochondria. Mitochondria are intracellular organs that generate energy, oxidative stress, and contribute to cellular senescence. This study revealed that the Apop gene expression may regulate the cellular senescence.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般(含心身医学)

キーワード：老年医学

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 世界中のいかなる国も経験したことはない急激な高齢化によって我が国は 2007 年に超高齢社会に突入した。したがって「健全なる老化」の確立は我が国にとって急務となっている。

(2) 我々は高脂血症により動脈硬化を発症するマウスの動脈硬化巣から複数の遺伝子をクローニングした。そのなかのひとつは機能不明の遺伝子であり機能推定も困難であったが、培養細胞に遺伝子を導入した実験結果から細胞内のミトコンドリアに局在するタンパク質であり、発現によってアポトーシス(細胞の能動的な死:自殺)を誘導することを明らかにした。そこでこの遺伝子を Apoptogenic Protein (Apop) 遺伝子と名付けた。近年、多くの研究からアポトーシスならびにミトコンドリアが細胞老化に関与していることが明らかになりつつある。そこで Apop 発現細胞の老化を解析した結果、Apop 発現細胞は老化の兆候を示すことを発見した。

### 2. 研究の目的

動脈硬化を発症した血管では老化遺伝子の発現ならびにアポトーシスが認められることが知られている。しかし老化誘導機構は明らかにされておらず、まして老化を誘導する機能を持つ遺伝子を明らかにした研究は世界的にも例がない。本研究においては我々が独自にクローニングしたアポトーシス誘導因子(Apop)が細胞および個体の老化に関与していることを明確にし、臨床に応用することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) Apop 欠損マウスの解析

ミトコンドリアに富む臓器である心臓の機能低下は老化に伴う症状のひとつである。心臓機能における Apop の関与を検討するため、心筋特異的 Apop 欠損マウス(Conditional Knockout Mouse)を作製する。我々は遺伝子ターゲティング法により、Apop 遺伝子が LoxP 配列にはさまれたマウスを作製している。このマウスを心筋特異的 Cre 発現マウスと交配させることによって、心臓特異的に Apop を欠損したマウスを作製する。一方、我々はすでに Apop 遺伝子を全身で欠損したマウス(Apop KO マウス)を作製している。これらのマウスを解析することにより、Apop の老化における役割を明確にする。

#### (2) Apop 発現機構の解析

Apop 遺伝子発現を制御する細胞内転写因子は明らかにされていない。Apop 遺伝子の 5' 上流領域は極めて短いため、転写調節領域が存在する可能性は少なく転写調節領域はイントロン内に存在すると考えられる。Apop 遺伝子の発現調節機構を培養細胞を用いて解析する。

### 4. 研究成果

(1) 培養細胞を用いた Apop 機能の解析  
培養血管内皮細胞を用いた実験の結果、Apop 遺伝子発現はミトコンドリア機能に大きな影響を与えることが明らかになった。ミトコンドリアは細胞のエネルギー産生器官であるとともに、酸化ストレスの産生器官でもある。Apop 遺伝子発現を抑制した細胞においては酸化ストレス産生レベルにおいても有意な変化が認められた。これらのミトコンドリア機能の変化はクエン酸回路、ペーア酸化等を含むミトコンドリア内代謝に依存していることが示唆される成果であった。

#### (2) Apop 欠損マウスの解析

Apop はミトコンドリア内でも膜に局在するタンパク質であり、ミトコンドリアでのエネルギー代謝に重要な機能を果たしていることが本研究によって明らかになった。Apop 遺伝子の発現抑制はミトコンドリアの代謝機構に働きかけることによって酸化ストレス産生に影響を及ぼす。これらは Apop 発現を抑制した培養細胞においても観察された。

Apop が局在するミトコンドリアは脂肪酸代謝(ペーア酸化)を行い、エネルギー(ATP)を生産する細胞内器官である。Apop 欠損マウスの表現系解析によって Apop 発現がミトコンドリア機能に影響することは明らかであった。Apop 欠損マウスにおいては血清中の中性脂肪ならびにコレステロールレベルの有意な変化が認められ、脂肪酸代謝が変化しているものと考えられた。個体の老化ではミトコンドリア機能の変化によって脂質異常症や脂質の蓄積が起こりやすくなるものと予想される。本研究の成果は Apop が個体の老化に関与することを示唆するものであった。

Apop 遺伝子を心筋特異的に欠損したマウスを作製し、高齢者の代表的な疾患である心筋梗塞の誘導を行った。生じた心筋梗塞の範囲を定量的に測定した結果、Apop 欠損マウスでは梗塞範囲が野生型よりも小さくなる傾向は認められたが統計的に有意な差は認められなかった。

#### (3) Apop 発現機構の解析

Apop 遺伝子の発現を血管平滑筋細胞において制御すると思われる遺伝子配列が Apop 遺伝子内に認められた。平滑筋細胞は収縮型および合成型の 2 種類の表現型を有している。そこでそれぞれの表現系を有する血管平滑筋細胞を培養し Apop 遺伝子の発現解析を行った。その結果、Apop 遺伝子は収縮型の平滑筋細胞において高レベルであった。また動脈硬化を起こした血管組織を染色した結果、Apop 遺伝子発現は収縮型の平滑筋細胞において認められ、合成型の平滑筋細胞では認められなかった。これらの結果から平滑筋細胞における Apop 遺伝子の発現は表現型に依存しており、Apop は平滑筋細胞の新しい表現系マーカーであることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 21 件)

Hanaoka Y, Yasuda O, Soejima H, Miyata K, Yamamoto E, Izumiya Y, Maeda N, Ohishi M, Rakugi H, Oike Y, Kim-Mitsuyama S, Ogawa H. Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3 Knockout Mice Exhibit Enhanced Energy Expenditure through Thermogenesis. *PLoS One*. 2014;9:e94930. 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0094930. eCollection 2014.

Takashio S, Yamamuro M, Uemura T, Utsunomiya D, Morita K, Izumiya Y, Sugiyama S, Kojima S, Yamamoto E, Tsujita K, Tanaka T, Tayama S, Kaikita K, Hokimoto S, Yasuda O, Yamashita Y, Ogawa H. Correlation between extent of myocardial fibrosis assessed by cardiac magnetic resonance and cardiac troponin T release in patients with nonischemic heart failure. *Am J Cardiol*. 2014;113:1697-1704. 査読有  
DOI: 10.1016/j.amjcard.2014.02.029.

Toyama K, Koibuchi N, Uekawa K, Hasegawa Y, Kataoka K, Katayama T, Sueta D, Ma MJ, Nakagawa T, Yasuda O, Tomimoto H, Ichijo H, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. Apoptosis signal-regulating kinase 1 is a novel target molecule for cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34:616-625. 査読有  
DOI: 10.1161/ATVBAHA.113.302440.

Hanaoka Y, Soejima H, Yasuda O, Nakayama H, Nagata M, Matsuo K, Shinohara M, Izumi Y, Ogawa H. Level of serum antibody against a periodontal pathogen is associated with atherosclerosis and hypertension. *Hypertens Res*. 2013;36:829-833. 査読有  
DOI: 10.1038/hr.2013.46.

Sueta D, Kataoka K, Koibuchi N, Toyama K, Uekawa K, Katayama T, Mingjie M, Nakagawa T, Waki H, Maeda M, Yasuda O, Matsui K, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. Novel mechanism for disrupted circadian blood pressure rhythm in a rat model of metabolic syndrome--the critical role of angiotensin II. *J Am Heart Assoc*. 2013;2:e000035. 査読有  
DOI: 10.1161/JAHA.113.000035.

Hosomi N, Aoki S, Matsuo K, Deguchi K, Masugata H, Murao K, Ichihara N,

Ohyama H, Dobashi H, Nezu T, Ohtsuki T, Yasuda O, Soejima H, Ogawa H, Izumi Y, Kohno M, Tanaka J, Matsumoto M. Association of serum anti-periodontal pathogen antibody with ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis*. 2012;34:385-392. 査読有  
DOI: 10.1159/000343659.

Yamamoto E, Kataoka K, Dong YF, Koibuchi N, Toyama K, Sueta D, Katayama T, Yasuda O, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. Calcium channel blockers, more than diuretics, enhance vascular protective effects of angiotensin receptor blockers in salt-loaded hypertensive rats. *PLoS One*. 2012;7(6):e39162. 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0039162.

Fukuda Y, Fukuda N, Morishita S, Shinohara H, Yoshida H, Yasuda O, Shimoe Y, Tamura Y. A novel Doppler echocardiographic score reflecting cardiac functional status can predict adverse outcome in acute myocardial infarction. *J Echocardiogr*. 2012;10:41-47. 査読有  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22707909>

Sueta D, Nakamura T, Dong YF, Kataoka K, Koibuchi N, Yamamoto E, Toyama K, Yasuda O, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. Amlodipine enhances amelioration of vascular insulin resistance, oxidative stress, and metabolic disorders by candesartan in metabolic syndrome rats. *Am J Hypertens*. 2012 Jun;25(6):704-710. 査読有  
DOI: 10.1038/ajh.2012.26.

Congrains A, Kamide K, Katsuya T, Yasuda O, Oguro R, Yamamoto K, Ohishi M, Rakugi H. CVD-associated non-coding RNA, ANRIL, modulates expression of atherogenic pathways in VSMC. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;419:612-616. 査読有  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.02.050.

Kawai T, Nozato Y, Kamide K, Onishi M, Yamamoto-Hanasaki H, Tatara Y, Takemura Y, Yamamoto K, Takeya Y, Sugimoto K, Kusakabe N, Yasuda O, Ohishi M, Rakugi H. Case report of a long-surviving Werner syndrome patient with severe aortic valve stenosis. *Geriatr Gerontol Int*. 2012;12:174-175. 査読有  
DOI: 10.1111/j.1447-0594.2011.00748.x.

Congrains A, Kamide K, Oguro R, Yasuda O, Miyata K, Yamamoto E, Kawai T, Kusunoki H, Yamamoto H, Takeya Y,

Yamamoto K, Onishi M, Sugimoto K, Katsuya T, Awata N, Ikebe K, Gondo Y, Oike Y, Ohishi M, Rakugi H. Genetic variants at the 9p21 locus contribute to atherosclerosis through modulation of ANRIL and CDKN2A/B. *Atherosclerosis*. 2012;220:449-455. 査読有

DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2011.11.017.

Nako H, Kataoka K, Koibuchi N, Dong YF, Toyama K, Yamamoto E, Yasuda O, Ichijo H, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. Novel mechanism of angiotensin II-induced cardiac injury in hypertensive rats: the critical role of ASK1 and VEGF. *Hypertens Res*. 2012;35:194-200. 査読有

DOI: 10.1038/hr.2011.175.

Rokutanda T, Izumiya Y, Miura M, Fukuda S, Shimada K, Izumi Y, Nakamura Y, Araki S, Hanatani S, Matsubara J, Nakamura T, Kataoka K, Yasuda O, Kaikita K, Sugiyama S, Kim-Mitsuyama S, Yoshikawa J, Fujita M, Yoshiyama M, Ogawa H. Passive exercise using whole-body periodic acceleration enhances blood supply to ischemic hindlimb. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:2872-2880. 査読有

DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.229773.

Yamamoto E, Yasuda O, Fukuo K, Rakugi H, Ogiwara T, Ogawa H. Crucial role of apoptogenic protein in cellular apoptosis and senescence. *Nihon Ronen Igakkai Zasshi*. 2011;48:138-141. 査読無

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21778628>

Nakamura T, Kataoka K, Tokutomi Y, Nako H, Toyama K, Dong YF, Koibuchi N, Yamamoto E, Yasuda O, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. Novel mechanism of salt-induced glomerular injury: critical role of eNOS and angiotensin II. *J Hypertens*. 2011;29:1528-1535. 査読有

DOI: 10.1097/HJH.0b013e328348ca95.

Toyama K, Nakamura T, Kataoka K, Yasuda O, Fukuda M, Tokutomi Y, Dong YF, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. Telmisartan protects against diabetic vascular complications in a mouse model of obesity and type 2 diabetes, partially through peroxisome proliferator activated receptor- $\alpha$ -dependent activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;410:508-513. 査読有

DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.06.012.

Maekawa Y, Ohishi M, Ikushima M, Yamamoto K, Yasuda O, Oguro R, Yamamoto-Hanasaki H, Tataka Y, Takeya Y, Rakugi H. Klotho protein diminishes endothelial apoptosis and senescence via a mitogen-activated kinase pathway. *Geriatr Gerontol Int*. 2011;11:510-516. 査読有

DOI:

10.1111/j.1447-0594.2011.00699.x.

Nakamura T, Fukuda M, Kataoka K, Nako H, Tokutomi Y, Dong YF, Yamamoto E, Yasuda O, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. Eplerenone potentiates protective effects of amlodipine against cardiovascular injury in salt-sensitive hypertensive rats. *Hypertens Res*. 2011;34:817-824. 査読有

DOI: 10.1038/hr.2011.35.

安田 修、小川久雄、正常血圧者の降圧療法による心血管病二次予防効果、*血圧*、18、1186-1187、2011、査読無

<http://mol.medicalonline.jp/library/journal/abstract?GoodsID=ae6keatd/2011/001812/004&name=1186-1187j&UseRID=133.95.81.49>

21 安田 修、メタボリックシンドローム患者の加齢による血圧変化、*血圧*、18、520-521、2011、査読無

<http://mol.medicalonline.jp/library/journal/abstract?GoodsID=ae6keatd/2011/001806/002&name=0520-0521j&UseRID=133.95.81.49>

〔学会発表〕(計13件)

安田 修、Apoptogenic Protein is a Novel Phenotypic Marker of the Contractile Vascular Smooth Muscle Cells、第78回日本循環器学会学術集会、2014年03月21日～2014年03月23日、東京、東京国際フォーラム

安田 修、Apop Inhibition Reduces Inflammation after Cerebral Ischemia、第78回日本循環器学会学術集会、2014年03月21日～2014年03月23日、東京、東京商工会議所

花岡 洋右、Timp-3 Deficiency Increases Energy Expenditure and Thermogenesis in Mice、第78回日本循環器学会学術集会、2014年03月21日～2014年03月23日、東京、東京国際フォーラム

安田 修、Apop 遺伝子抑制と血管内皮細胞傷害、第61回日本心臓病学会学術集会、2013年09月20日～2013年09月22日、熊本、熊本市現代美術館

花岡 洋右、Timp-3 欠損はマウスのミトコンドリア代謝に影響を与える、第61回日本心臓病学会学術集会、2013年09

月 20 日～2013 年 09 月 22 日、熊本、熊本市現代美術館

安田 修、Apop 遺伝子発現制御による認知機能低下の抑制、第 55 回日本老年医学会学術集会、2013 年 06 月 04 日～2013 年 06 月 06 日、大阪、大阪国際会議場  
花岡洋右、Timp-3 欠損はマウスの代謝に影響を与える、第 55 回日本老年医学会学術集会、2013 年 06 月 04 日～2013 年 06 月 06 日、大阪、大阪国際会議場

安田 修、Apop is a Novel Therapeutic Target for the Prevention of Impaired Cognitive Function after Cerebral Ischemia、第 77 回日本循環器学会学術集会、2013 年 03 月 15 日～2013 年 03 月 17 日、神奈川、パシフィコ横浜

安田 修、Apop Gene Inhibition Induces Reactive Oxygen Species Production and Dysfunction of Vascular Endothelial Cells、第 77 回日本循環器学会学術集会、2013 年 03 月 15 日～2013 年 03 月 17 日、神奈川、パシフィコ横浜  
花岡洋右、Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3 Deficiency Enhances Metabolism in Mice、第 77 回日本循環器学会学術集会、2013 年 03 月 15 日～2013 年 03 月 17 日、神奈川、パシフィコ横浜

花岡洋右、歯周病と動脈硬化および高血圧との関連、第 1 回高血圧フォーラム、2012 年 05 月 12 日～2012 年 05 月 13 日、大阪、千里ライフサイエンスセンター

安田 修、Apop Gene Expression is Implicated in Senescence of Vascular Endothelial Cells Induced by High Glucose、第 76 回日本循環器学会学術集会、2012 年 03 月 16 日～2012 年 03 月 18 日、福岡、福岡国際会議場

安田 修、Implication of Apop, a Novel Mitochondrial Protein, in the Mitochondrial Oxidative Stress Production、第 76 回日本循環器学会学術集会、2012 年 03 月 16 日～2012 年 03 月 18 日、福岡、福岡国際会議場

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kumadai-junnai.com/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安田 修 (YASUDA, Osamu)

熊本大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：00372615

### (2) 研究分担者

樂木 宏実 (RAKUGI, Hiromi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20252679

福尾 恵介 (FUKUO, Keisuke)

武庫川女子大学・生活環境学部・教授

研究者番号：40156758

### (3) 連携研究者

山本 英一郎 (YAMAMOTO, Eiichirou)

熊本大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：50573614