

平成 14 年度～平成 17 年度

科学研究費補助金基盤研究 (C)

課題番号 (No.14570202)

変異スーパーオキシドジスムターゼ遺伝子導入マウス
におけるカルボニルストレスの解析



研究成果報告書

東京女子医科大学病理学第一講座助教授

柴田 亮行

平成 18 年 3 月



平成 14 年度～平成 17 年度

科学研究費補助金基盤研究 (C)

課題番号 (No.14570202)

変異スーパーオキシドジスムターゼ遺伝子導入マウス
におけるカルボニルストレスの解析

研究成果報告書

東京女子医科大学病理学第一講座助教授

柴田 亮行

平成 18 年 3 月

<はしがき>

本冊子は、平成14年度～平成17年度科学研究費補助金基盤研究(C)により支援された課題番号(No.14570202)「変異スーパーオキシドジスムターゼ遺伝子導入マウスにおけるカルボニルストレスの解析」の研究成果報告書である。

<研究組織>

研究代表者：柴田 亮行 (東京女子医科大学医学部助教授)
研究分担者：加藤 陽一郎 (東京女子医科大学医学部助手)
研究分担者：小林 槇雄 (東京女子医科大学医学部教授)

<交付決定額 (配分額)>

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成14年度	1,100,000	0	1,100,000
平成15年度	700,000	0	700,000
平成16年度	700,000	0	700,000
平成17年度	400,000	0	400,000
総計	2,900,000	0	2,900,000

<研究発表>

下線は本課題研究の担当者を示す。

学会誌等 (巻末に供覧)

- 1) N. Shibata, K. Kawaguchi, K. Uchida, A. Kakita, H. Takahashi, R. Nakano, H. Fujimura, S. Sakoda, Y. Ihara, K. Nobukuni, Y. Takehisa, S. Kuroda, Y. Kokubo, S. Kuzuhara, T. Honma, Y. Mochizuki, T. Mizutani, S. Yamada, S. Toi, S. Sasaki, M. Iwata, A. Hirano, T. Yamamoto, Y. Kato, T. Sawada, M. Kobayashi: Protein-bound crotonaldehyde accumulates in the spinal cord of superoxide dismutase-1 mutation-associated familial amyotrophic lateral sclerosis and its transgenic mouse model. *Neuropathology* (in press) 2006
- 2) M. Kawaguchi, N. Shibata, S. Morikawa, K. Uchida, T. Yamamoto, T. Sawada, M. Kobayashi: Crotonaldehyde accumulates in glial cells of Alzheimer's disease brain.

Acta Neuropathol (in press) 2006

- 3) T. Shibata, K. Iio, Y. Kawai, N. Shibata, M. Kawaguchi, S. Toi, M. Kobayashi, M. Kobayashi, K. Yamamoto, K. Uchida: Identification of a lipid peroxidation product as a potential trigger of the p53 pathway. *J Biol Chem* **281**: 1196-1204, 2006
- 4) S. Sasaki, H. Warita, T. Murakami, N. Shibata, T. Komori, K. Abe, M. Kobayashi, M. Iwata: Ultrastructural study of aggregates in the spinal cord of transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Acta Neuropathol* **109**: 247-255 2005
- 5) 柴田亮行, 遠井素乃, 内田浩二, 内山真一郎, 澤田達男, 小林槇雄: PPAR γ (peroxisome proliferators-activated receptor-gamma). *Vasc Med* **1**: 196-203, 2005
- 6) T. Yamamoto, N. Shibata, Y. Kato, M. Kobayashi: Oxidative stress in the developing rat brain: an immunohistochemical study. *Trends Dev Biol* **1**: 89-93, 2005
- 7) M. Kawaguchi, N. Shibata, S. Horiuchi, M. Kobayashi: Glyoxal inactivates glutamate transporter-1 in rat astrocytes. *Neuropathology* **25**: 27-36, 2005
- 8) W. Takabe, Y. Kanai, A. Chairoungdua, N. Shibata, S. Toi, M. Kobayashi, T. Kodama, N. Noguchi: Lysophosphatidylcholine enhances cytokine production of endothelial cells via induction of L-type amino acid transporter 1 and cell surface antigen 4F2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**: 1640-1645, 2004
- 9) S. Yamada, T. Funada, N. Shibata, M. Kobayashi, Y. Kawai, E. Tatsuda, A. Furuhashi, K. Uchida: Protein-bound 4-hydroxy-2-hexenal as a marker of oxidative n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res* **45**: 625-634, 2004
- 10) N. Shibata, S. Yamada, K. Uchida, A. Hirano, S. Sakoda, H. Fujimura, S. Sasaki, M. Iwata, S. Toi, M. Kawaguchi, T. Yamamoto, M. Kobayashi: Accumulation of protein-bound 4-hydroxy-2-hexenal in spinal cords from patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res* **1019**: 170-177, 2004
- 11) K. Itakura, A. Furuhashi, N. Shibata, M. Kobayashi, K. Uchida: Maillard reaction-like lysine modification by a lipid peroxidation product: immunochemical detection of protein-bound 2-hydroxyheptanal in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* **308**: 452-457, 2003
- 12) Y. Kawai, A. Saito, N. Shibata, M. Kobayashi, S. Yamada, T. Osawa, K. Uchida: Covalent binding of oxidized cholesteryl esters to protein. Implications for oxidative modification of low density lipoprotein and atherosclerosis. *J Biol Chem* **278**: 21040-21049, 2003
- 13) N. Shibata, A. Hirano, E.T. Hedley-Whyte, M.C. Dal Canto, R. Nagai, K. Uchida, S. Horiuchi, M. Kawaguchi, T. Yamamoto, M. Kobayashi: Selective formation of certain advanced glycation end products in spinal cord astrocytes of humans and mice with superoxide dismutase-1 mutation. *Acta Neuropathol* **104**: 171-178, 2002

- 14) M. Kondo, T. Shibata, T. Kumagai, T. Osawa, N. Shibata, M. Kobayashi, S. Sasaki, M. Iwata, N. Noguchi, K. Uchida: 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂: The endogenous electrophile that induces neuronal apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 7367-7372, 2002

出版書籍 (巻末に供覧)

- 1) 柴田亮行, 遠井素乃, 川口素子, 山本智子, 小林槇雄: 神経変性疾患. 酸化ストレスマーカー (二木鋭雄, 野口範子, 内田浩二 編) 学会出版センター, 東京, pp265-pp271, 2005
- 2) 柴田亮行, 遠井素乃, 内山真一郎, 澤田達男, 小林槇雄: 頸動脈アテローム硬化病変の分子病理. 生活習慣病の最前線 (岡芳知, 内山真一郎, 倉林正彦 編) 中山書店, 東京, pp427-pp433, 2005
- 3) T. Oya-Ito, S. Kawakishi, N. Shibata, M. Kobayashi, T. Osawa, K. Uchida: A novel monoclonal antibody against methylglyoxal-arginine adduct. In: *The Maillard Reaction in Food Chemistry and Medical Sciences: Update for the Postgenomic Era. International Congress Series 1245* (eds. by S. Horiuchi, N. Taniguchi, F. Hayase, T. Kurata, T. Osawa) Elsevier, Amsterdam, pp397-pp399, 2002
- 4) N. Shibata, A. Hirano, K. Uchida, R. Nagai, S. Horiuchi, S. Yamada, T. Sawada, M. Kobayashi: Immunohistochemical detection of products of lipid peroxidation and protein glycation in the cerebellum of Menkes' kinky hair disease patients. In: *The Maillard Reaction in Food Chemistry and Medical Sciences: Update for the Postgenomic Era. International Congress Series 1245* (eds. by S. Horiuchi, N. Taniguchi, F. Hayase, T. Kurata, T. Osawa) Elsevier, Amsterdam, pp365-pp366, 2002

口頭発表

- 1) 柴田亮行, 川口素子, 山本智子, 加藤陽一郎, 澤田達男, 小林槇雄: 筋萎縮性側索硬化症を発症する変異 SOD1 導入マウスの脊髄におけるクロトンアルデヒドの蓄積. 第46回日本組織細胞化学会総会 (2005年10月1日; 京都; **一般口演 IA-2**)
- 2) 柴田亮行: 酸化ストレスマーカーの免疫組織化学染色. 日本学術振興会・レドックス生命科学第170委員会公開シンポジウム「酸化ストレスマーカー: 基礎研究から応用・開発まで」 (2005年9月12日; 東京; **シンポジウム**)
- 3) 川口素子, 柴田亮行, 山本智子, 澤田達男, 小林槇雄: ALS transgenic mouse

- model (G93A) における Fas signaling pathway の解析. 第46回日本神経病理学会総会 (2005年5月16日; 宇都宮; **一般口演** O-II-A-22)
- 4) 柴田亮行: 筋萎縮性側索硬化症の診断と病態の新知見. 第93回日本病理学会総会 (2004年6月10日; 札幌; **ワークショップ** WS-8-3)
- 5) N. Shibata, S. Toi, K. Uchida, Y. Kato, F. Muramatsu, N. Sakayori, T. Yamamoto, T. Sawada, M. Kobayashi: Accumulation of 9-oxononanoylcholesterol in smooth muscle cells in human atherosclerotic aorta. *In: 13th International Symposium on Atherosclerosis* (2003年10月1日; 京都; **一般示説** 3P-0671)
- 6) N. Shibata, K. Uchida, S. Yamada, S. Toi, M. Kawaguchi, T. Yamamoto, Y. Kato, T. Sawada, M. Kobayashi: Protein-bound 4 hydroxy-2-hexenal accumulates in the spinal cord of amyotrophic lateral sclerosis patients. *In: International Joint Meeting on Food Factors and Free Radicals in Health & Diseases* (2003年12月8日; 京都; **シンポジウム** S09-5)
- 7) N. Shibata, K. Uchida, A. Hirano, M.C. Dal Canto, M. Kawaguchi, M. Kobayashi: 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ in amyotrophic lateral sclerosis and a transgenic mouse model. *In: 13th International Symposium on ALS/MND* (2002年11月18日; Melbourne; **一般示説** P31)

<研究成果による工業所有権の出願・取得状況>

なし

<研究成果の目次>

- 抄録とキーワード
- 背景と目的
- 材料と方法
- 結果
- 考察と結論
- 結論と展望
- 参考文献
- 表
- 図の説明
- 略語一覧
- 図 1～18
- 業績論文別刷

◆抄録

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は筋萎縮と筋力低下を特徴とする進行性神経変性疾患である。近年、ALS における酸化ストレスと炎症反応の関与が注目されている。一般に、好気性生物の生体内における酸化ストレスの亢進は、脂質過酸化や蛋白糖酸化を介して反応性に富むアルデヒド (カルボニル) を生じ、炎症またはアポトーシスのシグナルを活性化することが指摘されている。本研究の目的は、ALS の動物モデルである G93A 変異スーパーオキシドジスムターゼ-1 遺伝子導入マウス (G93A マウス) において、酸化ストレスと炎症を結びつけるカルボニルストレスが実際に発生しているかどうかを明らかにすることであった。免疫組織化学的に、蛋白糖酸化に由来するカルボニル蛋白付加体である N^{ϵ} -(carboxymethyl)lysine (CML)、 N^{ϵ} -(carboxyethyl)lysine、argpyrimidine および pyrroline、脂質過酸化に由来するカルボニル蛋白付加体である crotonaldehyde-lysine (CRA-Lys) および脂質過酸化に由来するカルボニル DNA 付加体である 4-oxo-2-nonenal-2'-deoxyguanosine (ONE-dG) は、G93A マウス脊髄の主に反応性グリアに局在していた。CML、pyrroline、CRA-Lys および ONE-dG は、運動ニューロンにも局在していた。脊髄前角におけるカルボニル化合物含有グリアの密度は加齢とともに上昇した。炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子- α や Fas リガンドが受容体に結合すると細胞質側で会合する Fas-associated death domain (FADD) およびこのシグナルをカスパーゼ 8 介在性アポトーシスから NF- κ B 誘導性炎症の活性化に転換する細胞内因子 cFLIP の発現は、加齢とともに G93A マウス脊髄の反応性グリアで上昇した。RT-PCR 解析とイムノブロット解析は、G93A マウス脊髄中の FADD mRNA および cFLIP 蛋白の発現上方調節を示した。以上の結果は、G93A マウスではカルボニルストレスがグリアの炎症反応を介して運動ニューロン死をもたらす可能性を示唆する。

◆キーワード

- (1) 筋萎縮性側索硬化症
- (2) スーパーオキシドジスムターゼ
- (3) トランスジェニックマウス
- (4) 酸化ストレス
- (5) カルボニルストレス
- (6) 炎症
- (7) グリア
- (8) ニューロン

◆背景と目的◆

筋萎縮性側索硬化症 (ALS; amyotrophic lateral sclerosis) は、上位ならびに下位運動ニューロンの変性脱落にもとづいた進行性の筋萎縮と筋力低下を特徴とする原因不明の神経変性疾患である [引用文献 (1)]。ALS は通常壮年期以降に発症し、平均数年以内に呼吸麻痺で死亡する。Charcot によって疾患概念が確立されて以来 100 年以上経過した現在も、ALS の病態の全容は依然として闇に包まれたままである。ALS は疫学的に、孤発性 (SALS; sporadic ALS)、家族性 (FALS; familial ALS) および地域性 (EALS; endemic ALS) の 3 型に大別される。全 ALS 患者のうち、SALS 患者は約 90% を占めており、FALS 患者は約 10% であり、EALS 患者は残りの少数に過ぎない。

近年の研究により、ALS の各病型に共通する病態として酸化ストレスと興奮性アミノ酸毒性の関与が想定されている [引用文献 (1) (2)]。酸化ストレスは、脊髄前角に存在するアストロサイトのグルタミン酸トランスポーター-1 (GLT-1; glutamate transporter-1) の機能を阻害することにより、運動ニューロンに興奮性アミノ酸毒性をもたらす。興奮性アミノ酸毒性は、グルタミン酸受容体と共役するカルシウムチャンネルを持続的に開放して運動ニューロン細胞質のカルシウム濃度を上昇させ、カルシウム依存性のフリーラジカル産生酵素群を活性化して酸化ストレスをもたらす。このように、酸化ストレスと興奮性アミノ酸毒性は互いに増強し合う関係にある。

今から 10 年ほど前、多国間共同研究により、家族性 ALS 患者の約 20% がスーパーオキシドジスムターゼ-1 (SOD1; superoxide dismutase-1) の遺伝子変異を有することが判明した [引用文献 (1) (2) (3)]。その後、それらの患者に検出される変異 SOD1 遺伝子を導入したマウス (トランスジェニックマウス) は ALS を発症する [引用文献 (4)] 一方で、SOD1 ノックアウトマウスは ALS を発症しない [引用文献 (5)] ことが判明した。野生型 SOD1 分子がスーパーオキシドラジカル (O_2^- ; superoxide radical) を不均化分解によって解毒するのと対照的に、変異 SOD1 分子は O_2^- 、過酸化水素 (H_2O_2 ; hydrogen peroxide)、水酸ラジカル ($\cdot OH$; hydroxyl radical) などに代表される活性酸素種 (ROS; reactive oxygen species) を発生する [引用文献 (1) (2) (3)] という生化学的知見にもとづいて、現在では変異蛋白に由来する酸化ストレスが ALS の発病に関わると考えられている。我々は以前に、SOD1 変異を伴う FALS 患者と変異 SOD1 導入マウスの脊髄運動ニューロンに出現する Lewy 小体様硝子様封入体 (LBHI; Lewy body-like hyaline inclusion) が SOD1 蛋白の凝集物であることを世界に先駆けて報告した [引用文献 (6) (7) (8)]。以上のような経緯で、変異 SOD1 導入マウスは ALS の優れた疾

患動物モデルとしての地位を確立し、世界中の研究者によって繁用されている。SALS 患者における酸化ストレス発生源は不明であるが、変異 SOD1 導入マウスの ALS 発病機構を調べることは、ヒト ALS の病態解明のみならず、新たな治療戦略の展開に貢献するものと期待されている。

好気性生物は生理的状态においても、ミトコンドリア、小胞体およびペルオキシソームでの電子伝達系のエラーの副産物として ROS を産生する運命を背負っている (図 1) [引用文献 (3)]。また、ROS 産生量は発生、加齢あるいは病的過程で増大することが知られている (図 2) [引用文献 (9) (10) (11) (12) (13) (14); 学会誌等業績 (6)]。通常量の ROS は SOD、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPX; glutathione peroxidase)、カタラーゼなどの酸化ストレス防御酵素によって速やかに分解されるが、過剰量の ROS は分解しきれずに生体内に残り、Fenton 反応または Haber-Weiss 反応によって毒性の高い $\cdot\text{OH}$ を生じ、核酸、蛋白、脂質などに代表される細胞の主な構成成分を攻撃する。その結果、これらの成分は酸化的に修飾を受け (図 2)、蛋白糖酸化と脂質過酸化の過程で種々の産物が形成される (図 3) [引用文献 (15) (16) (17) (18) (19); 学会誌等業績 (8) (9) (10) (11) (12) (14)]。今回我々が着目したカルボニル化合物は、脂質過酸化や蛋白糖酸化の過程で生じる低分子のアルデヒドである (図 4-6) [引用文献 (20)]。遊離カルボニルは不安定で反応性に富んでおり、蛋白のアミノ基や核酸の塩基と強固に結合して安定な付加体を形成する過程で細胞内の代謝と情報伝達を阻害し、炎症反応や細胞死を誘導する。この状態はカルボニルストレスと称される。生体組織内でこれらの付加体を検出することは、その組織がカルボニルストレスに曝されていた証拠を得るための有効な手段である。我々は以前に、SALS 脊髄の残存運動ニューロンと反応性グリアに蛋白糖酸化や脂質過酸化に由来する種々のカルボニル蛋白付加体や DNA 酸化修飾産物 (OH-dG; 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) が検出されることを報告し [引用文献 (21) (22)]、ALS の発病機構における酸化ストレスおよびこれに惹起されるカルボニルストレスの関与を考察した。我々はまた、アルツハイマー病海馬、パーキンソン病脳幹およびメンケス病小脳のニューロンとグリアに種々のカルボニル蛋白付加体を検出している [引用文献 (23) (24); 学会誌等業績 (2); 出版書籍業績 (1) (4)]。

近年、酸化ストレスやカルボニルストレスによって誘導されるシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2; cyclooxygenase-2) や誘導型一酸化窒素産生酵素 (iNOS; inducible nitric oxide synthase) に代表される炎症関連酵素の発現が ALS 脊髄中で上方調節されている事実をもとに、本疾患における炎症反応の関与が指摘されている [引用文献 (25) (26)]。一般に炎症反応は、シグナル伝達酵素群 (MAPKs; mitogen-activated protein kinases) やこれらに関連する転写因子群に支配されている。MAPK に属する p38 と転写因子に属する活性化転写因子 (ATF; activating

transcription factor)、活性化蛋白-1 (AP-1; activator protein-1) および核内因子- κ B (NF- κ B; nuclear factor-kappaB) は、酸化ストレスやカルボニルストレスによって活性化するとともに滲出性炎症に深く関わる (図 7) [引用文献 (3) (20) (27)]。滲出性炎症とは病理学的に、血管透過性の亢進にもとづく血漿成分または血球成分の血管外遊離あるいは組織固有の炎症担当細胞の活性化によって生じる現象である [引用文献 (28)]。活性化した p38 や NF- κ B などにより腫瘍壊死因子- α (TNF α ; tumor necrosis factor-alpha)、Fas リガンド (FasL)、インターロイキン-1 β (IL-1 β ; interleukin-1beta) などのサイトカインが病巣構成細胞で産生分泌され、炎症担当細胞の表面にある各受容体に結合すると、その細胞膜の内側で Fas 関連細胞死ドメイン (FADD; Fas-associated death domain) の会合が起こる。FADD 会合シグナルは、細胞の種類によって異なる二通りの経路へ受け継がれる。一方はカスパーゼ-8 介在性のアポトーシス活性化経路であり、他方は NF- κ B 活性化経路である。NF- κ B は、FADD の基質であるカスパーゼ-8 を競合的に阻害する細胞質因子 (cFLIP; cellular FLICE inhibitory protein) の存在下で活性化される [引用文献 (29)]。カルボニルストレスはまた、ユビキチン・プロテアソーム系 (UPS; ubiquitin-proteasome system) を破綻させてアポトーシスを誘導する (図 7) [引用文献 (3) (30)]。

このようにして強力に活性化された NF- κ B は、種々の炎症関連物質を誘導する (図 7) [引用文献 (3) (31); 出版書籍業績 (2)]。すなわち、前述のサイトカイン群に加えて単球化学走化性因子-1 (MCP-1; monocyte chemoattractant protein-1)、マクロファージ炎症性蛋白-1 α (MIP-1 α ; macrophage inflammatory protein-1 α)、インターロイキン-8 (IL-8; interleukin-8) などのケモカイン群、細胞間細胞接着分子-1 (ICAM-1; intercellular cell adhesion molecule-1)、血管性細胞接着分子-1 (VCAM-1; vascular CAM-1)、神経細胞接着分子-1 (NCAM-1; neuronal cell adhesion molecule-1) などの細胞接着蛋白群、マトリックスメタロプロテイナーゼ (MMPs; matrix metalloproteinases) などの細胞外基質分解酵素群および iNOS、細胞質型ホスホリパーゼ A₂ (cPLA₂; cytosolic phospholipase A₂)、COX-2、5-リポキシゲナーゼ (5-LOX; 5-lipoxygenase) などの炎症促進性酵素群が産生される。iNOS は一酸化窒素 (NO; nitric oxide) を、cPLA₂ はアラキドン酸と ROS を、COX-2 はプロスタグランジン (PG; prostaglandin) 類と ROS を、5-LOX はロイコトリエン (LT; leukotrien) 類と ROS をそれぞれ過剰に産生するため、これらの産物が反応しあってペルオキシニトリト (ONOO⁻; peroxy nitrite) や二酸化窒素 (NO₂; nitric dioxide) などの活性窒素種 (RNS; reactive nitrogen species) および最も生体毒性の強い \cdot OHを生じる (図 2)。これらのうち、 \cdot OH は核酸、蛋白および脂質を酸化修飾ないし断片化して細胞内代謝を阻害し、ONOO⁻は蛋白のチロシン残基をニトロ化してニトロチロシン構造体を形成することでチロシンキナー

ぜによるリン酸化を介するシグナル伝達を阻害する。このように、酸化ストレスとカルボニルストレスは炎症反応を通じて細胞レベルの傷害を誘導する。従って、これらの機構について調べることは ALS の病態を解明する上で大きな意義があると考えられる。

以上を踏まえて我々は、ALS において酸化ストレスを背景としたカルボニルストレスと炎症反応が実際に生じているかどうかを明らかにすることを目的として、ALS の疾患動物モデルである変異 SOD1 導入マウスを用いて分子病理学的解析を行った。なお、本研究は東京女子医科大学動物実験研究倫理委員会の承認を受けた後に開始された。

◆材料と方法◆

<動物飼育法>

Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) から購入した繁殖ペア [雄親マウス: B6SJL-TgN (SOD1-G93A) 1Gur hemizygote (JR#002726); 雌親マウス: B6SJLF1/J (JR#100012)] を同一ケージで飼育し、誕生した子供のマウスを得た。雌親 (SJL; strain of Jackson Laboratory) マウス (SJL マウス) は全く遺伝子導入されていないのに対し、雄親 (G93A; carrying a transgene for human SOD1 with glycine to alanine substitution at codon 93) マウス (G93A マウス) は SJL マウスを基盤にしてヘテロ導入された変異 SOD1 を過剰発現する [引用文献 (4)]。G93A マウスを雌親に選ばなかった理由は、本マウスが生後 12 週齢頃に発症しするため、歩行機能が低下して出産や授乳が困難になるからである。第一世代のマウス群は、離乳期 (生後 3 週) 以降にジェノタイプングされた。簡潔にまとめると、個体識別のために採取された耳介皮膚組織中の総蛋白抽出物をイムノプロット解析する際に、マウス内因性 SOD1 蛋白と比較してヒト由来 SOD1 蛋白の分子量が大きく泳動度が異なることを考慮して、過剰発現ヒト SOD1 が検出された場合は G93A マウス、検出されなかった場合は SJL マウスと判定した。

以上に加えて、少数のマウスを用いて予備的な投薬実験を行った。すなわち、一部の G93A マウスと SJL マウスを、6 週齢以降、ピオグリタゾン (pioglitazone) (Takeda Pharmaceutical Co., Osaka, Japan) [引用文献 (32)] の原末を 1,200 ppm に調整した食餌を投与する群と投与しない群とに分け、発症前と発症後で薬物の効果を分子病理学的に判定した。ピオグリタゾンは、炎症抑制転写因子ペルオキシソーム増殖因子応答受容体- γ (PPAR γ ; peroxisome proliferators-activated receptor- γ) の活性化リガンドでかつ炎症促進転写因子 NF- κ B の阻害により消炎

効果を発揮するチアゾリジン系薬物のうち、国内での入手が容易なものである。

<組織調整法>

G93A マウスと SJL マウスは、生後 9 週齢、12 週齢および 15 週齢の時期に漸次、エーテルアルコール吸入麻酔下で無痛的に屠殺された。これらの週齢は、G93A マウスではそれぞれ、発症前、発症期および進行期に該当している。屠殺直後に摘出された脊髄から、4%パラホルムアルデヒド (PFA; paraformaldehyde) リン酸緩衝食塩水 (PBS; phosphate-buffered saline, pH 7.6) 溶液による灌流または浸漬固定後のパラフィン包埋常温保存材料または凍結専用 (OCT; optimal cutting temperature) コンパウンド (Sakura Finetech, Tokyo, Japan) 包埋凍結保存材料、OCT コンパウンド包埋新鮮凍結材料および新鮮凍結材料が作製された。新鮮凍結材料は定量的解析に使用され、それ以外の材料は形態学的解析に使用された。

<免疫組織化学染色法>

使用した一次抗体に関する情報を表 1 にまとめる [引用文献 (21) (22) (33) (34) (35) (36) (37); 学会誌等業績 (1) (3) (10) (13); 出版書籍業績 (3)]。これらが認識する抗原のうち、カルボキシメチルリジン [CML; N^{ϵ} -(carboxymethyl)lysine]、カルボキシエチルリジン [CEL; N^{ϵ} -(carboxyethyl)lysine]、アルギピリミジン (APM; argpyrimidine) およびピラリン (pyrraline) は蛋白糖酸化カルボニル蛋白付加体であり、クロトンアルデヒドリジン (CRA-Lys; crotonaldehyde-lysine)、マロンジアルデヒドリジン (MDA-Lys; malondialdehyde-lysine)、ヒドロキシヘキセナールヒスチジン (HHE-His; 4-hydroxy-2-hexenal-histidine) およびヒドロキシノネナールヒスチジン (HNE-His; 4-hydroxy-2-nonenal-histidine) は脂質過酸化カルボニル蛋白付加体であり、オキソノネナールデオキシグアノシン (ONE-dG; 4-oxo-2-nonenal-2'-deoxyguanosine) は脂質過酸化カルボニル DNA 付加体である (図 4-6)。また、炎症関連物質である FasL、Fas、FADD および cFLIP に対する各種特異抗体も用いた。以上に加えて、グリア線維酸性蛋白 (GFAP; glial fibrillary acidic protein) および CD11b はそれぞれ、アストロサイトとミクログリアの細胞マーカーとして用いた。

パラフィン包埋材料および OCT コンパウンド包埋凍結材料から切片を薄切し、親水操作ののち、3% H_2O_2 による内因性ペルオキシダーゼ活性阻害、PBS による洗浄、および 3% 非免疫動物血清 PBS 溶液または 3% スキムミルク PBS 溶液による非特異的抗体結合反応阻止を経て、4°C で一晩、一次抗体と反応させた。免疫

反応産物は、Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) または mouse on mouse (M.O.M.) kit (Vector) を用いたアビジンビオチン複合体法 (ABC; avidin-biotin-immunoperoxidase complex) 法により可視化された。呈色反応はジアミノベンジジン (DAB; 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) で、対比染色はヘマトキシリン (hematoxylin) によった。以上の染色行程のうち一次抗体反応を省略した手技で陰性反応対照標本を作製した。あらかじめ過剰な抗原 [各カルボニルで飽和修飾された最終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ウシ血清アルブミン (BSA; bovine serum albumin) TBS 溶液] と常温で 1 時間反応させた一次抗体溶液の遠心上清を用いて免疫吸収試験標本を作製した。

カルボニル蛋白付加体に対する免疫反応産物の局在は、隣接切片のヘマトキシリン・エオジン (H&E; hematoxylin-eosin) 染色標本とアストロサイトのマーカー GFAP およびミクログリアのマーカー CD11b の免疫染色標本との比較により概括的に評価され、さらに、同一切片における GFAP または CD11b の再免疫染色標本により厳密に吟味同定された [引用文献 (6)]。再免疫染色の際、第一抗体による免疫反応産物の検出にはアミノエチルカルバゾール (AEC; 3-amino-9-ethylcarbazole) を呈色色素とする ABC 法を用い、光学顕微鏡写真撮影後、100%エタノールによる AEC 色素の除去とクエン酸緩衝液 (citrate buffer, pH 6.0) 中でのマイクロウェーブ (95°C, 10 分) 処理による免疫複合体解離操作を経て、第二抗体を反応させた。免疫反応産物の検出は DAB を呈色色素とし Envision kit (Dako Cytomation, Kyoto, Japan) を用いたポリマー免疫複合体 (PIC; polymer-immunocomplex) 法によった。第一抗体による染色結果と第二抗体による染色結果を同一部位で比較することにより、免疫反応産物の局在を特定した。

<細胞数計測法>

免疫組織化学染色標本上でカルボニル蛋白付加体に対する免疫反応産物が検出されるグリア細胞の個数を光学顕微鏡下で計測し、単位面積 (1 mm^2) 当たりの細胞数を陽性細胞密度と定義した。G93A マウスおよび SJL マウスの 9 週齢、12 週齢および 15 週齢の各群における陽性細胞密度を平均 \pm 標準偏差 (mean \pm SD) で表現し、異なる群間で t 検定の p 値を算出した。統計学的に $p < 0.05$ の場合、有意差ありと判定した [引用文献 (37); 学会誌等業績 (1)]。

<RT-PCR 法>

組織の総 RNA を専用キット (ISOGEN; Nippon Gene, Toyama, Japan) で抽出し、逆転写酵素処理 (RT; reverse transcription) により cDNA を得た。FADD 遺伝子

に特異的なプライマーセットを設計し、cDNA を鋳型にしてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR; polymerase chain reaction) 法により増幅産物を得た。この RT-PCR 産物を 1%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド (ethidium bromide) 法により可視化し、FADD cDNA 増幅シグナルを X 線フィルムに感光させた。フィルム上のシグナルをスキャナーと専用ソフト (NIH image & ATTO Densitograph) を用いてパーソナルコンピュータに取り込み、シグナルの密度を測定した。

<イムノプロット法>

組織総蛋白抽出物を得るのに当たっては、新鮮凍結脊髄材料を 10 倍量のホモジェネート緩衝液の中でソニケーターを用いて破砕した後、12,500 x g で 15 分間遠心分離して上清を分離した。ホモジェネート緩衝液の組成は、蛋白分解酵素阻害剤カクテル Complete Mini (Roche, Diagnostics, Tokyo, Japan) を 13%相当添加した放射性免疫沈降測定用 (RIPA; radioimmunoprecipitation assay) 緩衝液 [20 mM トリス塩酸緩衝生理食塩水 (TBS; Tris-buffered saline, pH 7.5); 10%グリセロール; 1% Triton X-100; 0.1%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS; sodium dodecyl sulfate); 0.5%デオキシコール酸 (deoxycholate); 5 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA; ethylenediaminetetraacetate)] であった。核内蛋白抽出物を得るのに当たっては、専用のキット NE-PER (Pierce, Rockford, IL, USA) を用いた。蛋白濃度はマイクロプレートリーダーを用いた Bradford 法で測定された。

各抽出物を同量のサンプル緩衝液 [62.5 mM トリス塩酸緩衝液 (TB); 10%グリセロール (glycerol); 2% SDS; 6.125% 1,4-dithreitol] と混和し、100°C で 10 分間加熱し、1 レーン当たり 20 µg を 10% SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動 (SDS-PAGE; SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) した後、二フッ化ポリビニリデン (PVDF; polyvinylidene difluoride) プロット膜に電氣的に転写した。プロット膜は、5%スキムミルクまたは 5% BSA の PBS 溶液を用いた室温一晩処理による非特異的抗体結合反応阻止と 1% Tween-20 添加 TBS (T-TBS) による入念な洗浄を経て、一次抗体と室温で一時間反応させた。使用した一次抗体は、cFLIP、PPAR γ 、NF- κ B および β -actin に対するものである (表 1)。免疫反応産物は、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP; horseradish peroxidase) 標識二次抗体 [ロバ由来抗ウサギ IgG (GE Healthcare Bio-Science, Piscataway, NJ, USA; 1:10,000); ウサギ由来抗ヤギ IgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; 1:10,000)] と ECL/ECL-plus kit (GE) を用いた化学発光法により可視化し、免疫反応シグナル X 線フィルムに感光させた。フィルム上のシグナルをスキャナーと専用ソフト (NIH image & ATTO Densitograph) を用いてコンピュータに取り込み、シグナ

ル密度を測定し、同一レーンの β -actin 密度で補正した。

◆結果◆

<免疫組織化学的解析所見>

G93A マウスでは加齢に伴って脊髄に組織学的変化が生じた [引用文献 (38)]。9 週齢では、明らかな変化はみられなかった。12 週齢では、運動ニューロンやニューロピルに空胞が出現し、運動ニューロンの細胞体と軸索に LBHI が観察され、脊髄前角にはスフェロイドと索状腫大軸索が散見された。15 週齢では、運動ニューロンの脱落と反応性グリアの増加が明らかになった。SJL マウスでは加齢に伴う形態学的変化は顕著でなかった。

陰性反応対照標本と吸収試験染色標本 (図 8 下段) では免疫反応産物が全く検出されなかったことから、一次抗体と二次抗体の特異性が確認された。解析の対象としたカルボニル化合物の免疫活性は、低倍で観察すると、SJL マウスでは脊髄横断面全体に概ね不明瞭であったのに対し、G93A マウスでは脊髄灰白質に集積する傾向を示した (図 8 上段; 9A-D)。高倍で観察すると、CML、ピラリン、ONE-dG および CRA-Lys の免疫活性は、G93A マウスの運動ニューロンと反応性グリアに局在しており、その他のカルボニル化合物は主に反応性グリアに局在していた (図 9E, F; 10; 11)。細胞内においては、ONE-dG は核と細胞質の両方に存在していたが、そのほかのカルボニル化合物は細胞質に局限していた。同一切片上再染色法によれば、これらの付加体含有グリアは反応性アストロサイトと活性化ミクログリアであり (図 12)、形態学的には変性に陥るといよりもむしろ活発に活動しているように見えた。CML 免疫活性はまた、変性運動ニューロンの LBHI において SOD1 およびリン酸化ニューロフィラメント蛋白 (p-NFP; phosphorylated neurofilament protein) の免疫活性と共存していた (図 13) [引用文献 (7) (39)]。CRA-Lys 免疫活性は、とくに空胞形成ニューロンの細胞質、スフェロイドおよび索状腫大軸索に (図 11) [引用文献 (37); 学会誌等業績 (1)]、HNE-His 免疫活性はスフェロイドと索状腫大軸索に、ONE-dG 免疫活性は空胞形成ニューロンの細胞質にも局在していた。MDA-Lys、HHE-His および HNE-His の免疫活性は全般的に軽度であった。G93A マウスにおける FasL、Fas、FADD および cFLIP の免疫活性は、発症前には主に運動ニューロンに局在していたのに対し、発症後には主に反応性グリアに局在していた (図 14; 15)。

<細胞数計測解析所見>

カルボニル蛋白付加体を含有する脊髄前角グリアは、SJL マウスと G93A マウスのいずれにおいても、加齢に伴って増加する傾向を示した。また、G93A マウスにおけるカルボニル蛋白付加体含有脊髄グリアの密度は、9 週齢群、12 週齢群および 15 週齢群のいずれにおいても、年齢一致 SJL マウス群と比較して有意に上昇していた (図 16) [引用文献 (37); 学会誌等業績 (1)]。

<RT-PCR 解析所見>

FADD mRNA の RT-PCR 産物は、SJL と比較して G93A マウスで増加しており、その変化は発症前から発症後にかけて観察された (図 17)。

<イムノブロット解析所見>

細胞質蛋白のイムノブロットでは、G93A マウスにおける cFLIP (cFLIP_L および cFLIP_γ) 免疫反応シグナルは、SJL マウスと比較して統計学的に有意に増加しており、その変化は発症前から進行期に至るまで観察された (図 18)。少数例で実施した核内蛋白のイムノブロットでは、SJL マウスと比較して G93A マウスで NF-κB の核内移行が促進しており、SJL マウスおよび G93A マウスのいずれにおいても、ピオグリタゾン投与により PPAR_γ免疫反応シグナルは増加し、NF-κB 免疫反応シグナルは減少した (data not shown)。

◆考察と結論◆

本研究において、ALS の動物モデルである G93A マウスの脊髄にカルボニル蛋白付加体と DNA 付加体が検出されたことは特筆に値する。免疫活性が顕著であったカルボニル蛋白付加体は、CML、CEL、APM、ピラリン、CRA-Lys および ONE-dG であり、我々がこれまでに ALS 脊髄で検出したものと概ね一致する [引用文献 (21) (22) (33) (35) (36) (37) (39); 学会誌等業績 (1) (3) (10) (13)]。以上の結果は、当該組織が、これらの付加体の前駆体で細胞毒性を有するグリオキサール (glyoxal)、メチルグリオキサール (MG; methylglyoxal)、3-デオキシグルコソン (3-DG; 3-deoxyglucosone)、CRA および ONE (図 4-6) に強く曝露されていたことを表現している。これらの構造体は、いずれも灰白質を中心に広い範囲に亘って反応性グリアの細胞質とニューロピルに検出された。ニューロピルは主にニューロンの樹状突起と原形質性アストロサイトの突起で構成されること

が知られている。さらに、CMLはLBHIにも、CRA-Lysは空胞化運動ニューロンの細胞質、スフェロイドおよび索状腫大軸索にも、HNE-Hisはスフェロイドと索状腫大軸索にも局在していた。カルボニル蛋白付加体含有グリアは加齢とともに増加し、その密度はSJLマウスと比較してG93Aマウスで有意に上昇していた。これらの結果は、カルボニルストレスおよびその源である酸化ストレスが、加齢のみならずSOD1変異によってもたらされることを意味しており、フリーラジカルが加齢と密接に関連する事実 [引用文献 (10) (11) (12) (13)] と変異SOD1蛋白が種々のROSを産生する事実 [引用文献 (1) (2) (3)] によって説明が可能である。

ALS脊髄中のアストロサイトは、脂質過酸化カルボニルであるHNEに修飾されたGLT-1および蛋白糖酸化カルボニル蛋白付加体CMLを含有している [引用文献 (21) (33) (40); 学会誌等業績 (13)]。また、HNEとCMLの前駆体であるグリオキサール (glyoxal) は、ラット培養アストロサイトのグルタミン酸取り込みを阻害する [引用文献 (41) (42); 学会誌等業績 (7)]。電子顕微鏡を用いた研究によれば、G93Aマウスの運動ニューロンに出現する空胞は、腫大したミトコンドリア、小胞体ならびにペルオキシソームであることが判明している [引用文献 (38) (43) (44)]。これら病的な細胞内小器官は多量のROSを発生するので、空胞化運動ニューロンにおけるCRA-Lysの集積はその結果と理解される。スフェロイドと索状腫大軸索はリン酸化ニューロフィラメントが凝集したものである [引用文献 (1)]。脂質過酸化カルボニルのうち、最もよく調べられているHNEはニューロフィラメントや微小管関連蛋白を修飾して凝集させる性質を有する [引用文献 (45) (46)]。従って、HNEと同様にCRAは、細胞骨格蛋白を修飾することによって、これらの異常構造物の形成に関与する可能性がある。細胞骨格蛋白のカルボニル修飾は、細胞内物質輸送や細胞形態保持の障害を介して運動ニューロンに対する毒性を発揮しうる [引用文献 (1) (3)]。ヒトSALS脊髄で大量に検出されるMDA-Lys、HNE-HisおよびHNE-His [引用文献 (21) (22) (35); 学会誌等業績 (10)] がG93Aマウスにおいて必ずしも多く存在していなかったことは、動物種によるカルボニル代謝機構の違いやSALSと変異SOD1導入マウスモデルでの酸化ストレスの程度の違い [引用文献 (1) (2) (3)] を反映しているのかもしれない。

今回、カルボニル蛋白付加体が検出された反応性グリアが変性に陥ることなくむしろ活動性を保持しているようにみえた観察結果は、グリアにおいて抗酸化機構が有効に作動していることを窺わせる [引用文献 (47) (48) (49)]。一方、カルボニル蛋白付加体が灰白質全体に分布していたにもかかわらず運動ニューロンが選択的に変性していた事実は、抗酸化物質の一種グルタチオン (GSH; glutathione) に依存する神経保護機構が脊髄においては非運動ニューロンと比較

して運動ニューロンではもともと不完全であること [引用文献 (50)] に起因すると理解される。これに関連して、CML や CRA-Lys が検出された運動ニューロンの多くが変性に陥っていた点は興味深い。

一般に、カルボニル類が保有するアルデヒド基は細胞内の抗酸化物質 GSH を消費するため、細胞内の酸化ストレスを高めるといわれている [引用文献 (3) (20) (27)]。細胞内環境が酸化ストレスに曝されると、p38 MAPK が活性化して炎症シグナルが生じる。その結果、炎症反応の最も早期には TNF α や FasL などのサイトカインが産生分泌され、各受容体に結合するとその細胞質側に FADD を会合させる。FADD は通常カスパーゼ 8 を活性化するが、cFLIP はこれを阻害することによりアポトーシスを抑制するばかりでなく、NF- κ B を活性化して炎症反応を増強する [引用文献 (29)]。今回、発症前から G93A マウスの主に運動ニューロンに FasL、Fas、FADD および cFLIP が検出されたことは、この時期にグリアは活性化しておらず、運動ニューロンのカスパーゼ 8 介在性アポトーシスが抑制されていることを示している。また、発症後の G93A マウスでこれらの物質が主に反応性グリアに発現していた事実は、この時期におけるグリアのアポトーシス抑制と炎症活動促進および運動ニューロンのアポトーシスの解除が起こっていることを示唆する。炎症活動は、サイトカイン、ケモカイン、細胞接着分子、細胞外基質分解酵素およびラジカル産生酵素の産生をもたらすので、運動ニューロンを様々な角度から攻撃して細胞死に迫りやることが予想される [引用文献 (3) (20) (27)]。核内蛋白のイムノプロットの結果は、G93A マウスで NF- κ B 依存性炎症反応の亢進およびピオグリタゾンによる PPAR γ の核内移行促進と NF- κ B の核内移行抑制を示しており、炎症抑制治療が ALS の改善に効果を発揮する可能性を窺わせる [引用文献 (51); 学会誌等業績 (5)]。

我々は DNA のカルボニル修飾産物についても検討を加えた。我々はこれまでに、SALS 脊髄の運動ニューロンと反応性グリアの核と細胞質に OH-dG および ONE-dG が集積するのみならず、脂質過酸化カルボニルの一種 ONE が培養神経細胞のアポトーシスを誘導し、その際に核と細胞質に ONE-dG が集積することを報告してきた [引用文献 (22) (36); 学会誌等業績 (3)]。今回 G93A マウス脊髄の運動ニューロンとグリアに ONE-dG が検出されたことは、これらの細胞が酸化ストレスとカルボニルストレスに曝されていたことを表しており、運動ニューロンのアポトーシスにおける ONE-dG 形成の関与を示唆する。ONE-dG 含有グリアが形態学的によく保存されていたことは、他のカルボニルストレスに対するのと同様に、ONE に対してもグリアが耐性を有する可能性を示す。ONE を含むカルボニル類は、直接的または小胞体ストレスを介して間接的にユビキチン・プロテアソーム系 (UPS; ubiquitin-proteasome system) を破綻させることが知られている [引用文献 (3) (30) (36) (52) (53); 学会誌等業績 (3)]。UPS の破綻は、

活性型のリン酸化 p53 蛋白の分解を遅延させてカスパーゼ 9 介在性アポトーシスを誘導するだけでなく、細胞内に変性蛋白を蓄積させて小胞体ストレスを惹起することによりカスパーゼ 12 介在性アポトーシスを誘導すると理解される (図 7)。

◆結論と展望◆

本研究では、ALS の動物モデルとして周知されている G93A 変異ヒト SOD1 導入マウスの脊髄組織内に、蛋白糖酸化および脂質過酸化に由来するカルボニル化合物が検出された。また、カルボニルストレスにもとづくグリアの炎症反応と運動ニューロンのアポトーシスに関連する証拠が得られた。運動ニューロンのアポトーシスは、グリアに由来する炎症性メディエーターによる間接的細胞傷害またはニューロン構成成分のカルボニル修飾による直接的細胞傷害にもとづくと考えられた。以上から、G93A マウスの ALS におけるカルボニルストレスの関与が明らかになった。カルボニルストレスの消去ならびにこれにもとづく炎症反応の抑制は ALS における運動ニューロン死の抑制ないし予防に繋がると期待され、この分野での研究の一層の発展が望まれる。

◆引用文献◆

- [1] Brown Jr RH, Meininger V, Swash M (eds): Amyotrophic Lateral Sclerosis, Martin-Duniz, London, 2000
- [2] Shibata N, Hirano A, Yamamoto T, Kato Y, Kobayashi M: Superoxide dismutase-1 mutation-related neurotoxicity in familial amyotrophic lateral sclerosis. *ALS* **1**: 143-161, 2000
- [3] Halliwell B, Gutteridge JMC (eds): Free Radicals in Biology and Medicine, 3th edn, Oxford, New York, 1999
- [4] Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX, Chen W, Zhai P, Sufit RL, Siddique T: Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* **264**: 1772-1775, 1994
- [5] Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, Wilcox HM, Flood DG, Beal MF, Brown Jr RH, Scott RW, Snider WD: Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit cell death after axonal injury. *Nat Genet* **13**: 43-47, 1996
- [6] Shibata N, Hirano A, Kobayashi M, Siddique T, Deng HX, Hung WY, Kato T, Asayama K: Intense superoxide dismutase-1 immunoreactivity in intracytoplasmic hyaline inclusions of familial amyotrophic lateral sclerosis with posterior column involvement. *J Neuropathol Exp Neurol* **55**: 481-490, 1996
- [7] Shibata N, Hirano A, Kobayashi M, Dal Canto MC, Gurney ME, Komori T, Umahara T, Asayama K: Presence of Cu/Zn superoxide dismutase (SOD) immunoreactivity in neuronal hyaline inclusions in spinal cords from mice carrying a transgene for Gly93Ala mutant human Cu/Zn SOD. *Acta Neuropathol* **95**: 136-142, 1998
- [8] Sasaki S, Warita H, Murakami T, Shibata N, Komori T, Abe K, Kobayashi M, Iwata M: Ultrastructural study of aggregates in the spinal cord of transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Acta Neuropathol* **109**: 247-255 2005
- [9] Yamamoto T, Shibata N, Kato Y, Kobayashi M: Oxidative stress in the developing rat brain: an immunohistochemical study. *Trends Dev Biol* **1**: 89-93, 2005
- [10] Sastre J, Pallardó FV, Viña J: Mitochondrial oxidative stress play a key role in aging and apoptosis. *IUBMB Life* **49**: 427-435, 2000
- [11] Lenaz G, Bovina C, D'Aurelio M, Fato R, Formiggini G, Genova ML, Giuliano G, Pich MM, Paolucci U, Castelli GP, Ventura B: Role of mitochondria in oxidative

stress and aging. *Ann NY Acad Sci* **959**: 199-213, 2002

[12] Harman D: The free radical theory of aging. *Antiox Redox Signal* **5**: 557-561, 2003

[13] Beal MF: Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann Neurol* **58**: 495-505, 2005

[14] Nohl H, Gille L, Staniek K: Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria. *Biochem Pharmacol* **69**: 719-723, 2005

[15] Takabe W, Kanai Y, Chairoungdua A, Shibata N, Toi S, Kobayashi M, Kodama T, Noguchi N: Lysophosphatidylcholine enhances cytokine production of endothelial cells via induction of L-type amino acid transporter 1 and cell surface antigen 4F2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**: 1640-1645, 2004

[16] Yamada S, Funada T, Shibata N, Kobayashi M, Kawai Y, Tatsuda E, Furuhashi A, Uchida K: Protein-bound 4-hydroxy-2-hexenal as a marker of oxidative n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res* **45**: 625-634, 2004

[17] Itakura K, Furuhashi A, Shibata N, Kobayashi M, Uchida K: Maillard reaction-like lysine modification by a lipid peroxidation product: immunochemical detection of protein-bound 2-hydroxyheptanal in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* **308**: 452-457, 2003

[18] Kawai Y, Saito A, Shibata N, Kobayashi M, Yamada S, Osawa T, Uchida K: Covalent binding of oxidized cholesteryl esters to protein. Implications for oxidative modification of low density lipoprotein and atherosclerosis. *J Biol Chem* **278**: 21040-21049, 2003

[19] Kondo M, Shibata T, Kumagai T, Osawa T, Shibata N, Kobayashi M, Sasaki S, Iwata M, Noguchi N, Uchida K: 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂: The endogenous electrophile that induces neuronal apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 7367-7372, 2002

[20] Uchida K: Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med* **28**: 1685-1696, 2000

[21] Shibata N, Nagai R, Uchida K, Horiuchi S, Yamada S, Hirano A, Kawaguchi M, Yamamoto T, Sasaki S, Kobayashi M: Morphological evidence for lipid peroxidation and protein glycoxidation in spinal cords from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Brain Res* **917**: 97-108, 2001

[22] Shibata N, Nagai R, Miyata S, Jono T, Horiuchi S, Hirano A, Kato S, Sasaki S, Asayama K, Kobayashi M: Nonoxidative protein glycation is implicated in familial amyotrophic lateral sclerosis with superoxide dismutase-1 mutation. *Acta Neuropathol* **100**: 275-284, 2000

- [23] Kawaguchi M, Shibata N, Morikawa S, Uchida K, Yamamoto T, Sawada T, Kobayashi M: Crotonaldehyde accumulates in glial cells of Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol* (in press) 2006
- [24] 柴田亮行, 遠井素乃, 川口素子, 山本智子, 小林槇雄: 神経変性疾患. 酸化ストレスマーカー (二木鋭雄, 野口範子, 内田浩二 編) 学会出版センター, 東京, pp265-pp271, 2005
- [25] Maihöfner C, Probst-Cousin S, Bergmann M, Neuhuber W, Neundörfer B, Heuss D: Expression and localization of cytochrome oxidase-1 and -2 in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* **18**: 1527-1534, 2003
- [26] Sasaki S, Shibata N, Komori T, Iwata M: iNOS and nitrotyrosine immunoreactivity in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* **291**: 44-48, 2000
- [27] Leonarduzzi G, Arkan MC, Basaga H, Chiarpotto E, Sevanian A, Poli G: Lipid oxidation products in cell signaling. *Free Radic Biol Med* **28**: 1370-1378, 2000
- [28] Kumar V, Abbas AK, Fausto N (eds): Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 7th edn, Elsevier, Philadelphia, 2005
- [29] Thome M, Schneider P, Hofmann K, Fickenscher H, Meini E, Neipel F, Mattmann C, Burns K, Bodmer JL, Schröter M, Scaffidi C, Krammer RH, Peter ME, Tschopp J: Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* **386**: 517-521, 1997
- [30] Hyun PH, Lee MH, Halliwell B, Jenner P: Proteasomal dysfunction induced by 4-hydroxy-2,3-trans-nonenal, an end-product of lipid peroxidation: a mechanism contributing to neurodegeneration? *J Neurochem* **83**: 360-370, 2002
- [31] 柴田亮行, 遠井素乃, 内山真一郎, 澤田達男, 小林槇雄: 頸動脈アテローム硬化病変の分子病理. 生活習慣病の最前線 (岡芳知, 内山真一郎, 倉林正彦 編) 中山書店, 東京, pp427-pp433, 2005
- [32] Ishibashi M, Egashira K, Hasa K, Inoue S, Ni W, Zhao Q, Usui M, Kitamoto S, Ichiki T, Takeshita A: Antiinflammatory and antiarteriosclerotic effects of pioglitazone. *Hypertension* **40**: 687-693, 2002
- [33] Shibata N, Hirano A, Hedley-Whyte ET, Dal Canto MC, Nagai R, Uchida K, Horiuchi S, Kawaguchi M, Yamamoto T, Kobayashi M: Selective formation of certain advanced glycation end products in spinal cord astrocytes of humans and mice with superoxide dismutase-1 mutation. *Acta Neuropathol* **104**: 171-178, 2002
- [34] Oya-Ito T, Kawakishi S, Shibata N, Kobayashi M, Osawa T, Uchida K: A novel monoclonal antibody against methylglyoxal-arginine adduct. In: *The Maillard Reaction in Food Chemistry and Medical Sciences: Update for the Postgenomic Era. International Congress Series 1245* (eds. by S. Horiuchi, N. Taniguchi, F. Hayase, T.

Kurata, T. Osawa) Elsevier, Amsterdam, pp397-pp399, 2002

- [35] Shibata N, Yamada S, Uchida K, Hirano A, Sakoda S, Fujimura H, Sasaki S, Iwata M, Toi S, Kawaguchi M, Yamamoto T, Kobayashi M: Accumulation of protein-bound 4-hydroxy-2-hexenal in spinal cords from patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res* **1019**: 170-177, 2004
- [36] Shibata T, Iio K, Kawai Y, Shibata N, Kawaguchi M, Toi S, Kobayashi M, Kobayashi M, Yamamoto K, Uchida K: Identification of a lipid peroxidation product as a potential trigger of the p53 pathway. *J Biol Chem* **281**: 1196-1204, 2006
- [37] Shibata N, Kawaguchi K, Uchida K, Kakita A, Takahashi H, Nakano R, Fujimura H, Sakoda S, Ihara Y, Nobukuni K, Takehisa Y, Kuroda S, Kokubo Y, Kuzuhara S, Honma T, Mochizuki Y, Mizutani T, Yamada S, Toi S, Sasaki S, Iwata M, Hirano A, Yamamoto T, Kato Y, Sawada T, Kobayashi M: Protein-bound crotonaldehyde accumulates in the spinal cord of superoxide dismutase-1 mutation-associated familial amyotrophic lateral sclerosis and its transgenic mouse model. *Neuropathology* (in press) 2006
- [38] Dal Canto MC, Gurney ME: Neuropathological changes in two lines of mice carrying a transgene for mutant human Cu,Zn SOD, and in mice overexpressing wild type human SOD: a model of familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS). *Brain Res* **676**: 25-40, 1995
- [39] Shibata N, Kobayashi M, Hirano A, Asayama K, Horiuchi S, Dal Canto MC, Gurney ME: Morphological aspects of superoxide dismutase-1 mutation in amyotrophic lateral sclerosis and its transgenic mouse model. *Acta Histochem Cytochem* **32**: 17-30, 1999
- [40] Pedersen WA, Fu W, Keller JN, Markesbery WR, Appel S, Smith RG, Kasarkis E, Mattson MP: Protein modification by the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the spinal cords of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Ann Neurol* **44**: 819-824, 1998
- [41] Blanc EM, Keller JN, Fernanedz S, Mattson MP: 4-Hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, impairs glutamate transport in cordtial astrocytes. *Glia* **22**: 149-160, 1998
- [42] Kawaguchi M, Shibata N, Horiuchi S, Kobayashi M: Glyoxal inactivates glutamate transporter-1 in rat astrocytes. *Neuropathology* **25**: 27-36, 2005
- [43] Wong PC, Pardo AC, Borchelt DR, Lee MK, Copeland NG, Jenkins NA, Sisodia SS, Cleveland DW, Price DL: An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* **14**: 1105-1116, 1995

- [44] Higgins CMJ, Jung C, Xu Z: ALS-associated mutant SOD1^{G93A} causes mitochondrial vacuolation by expansion of the intermembrane space and by involvement of SOD1 aggregation and peroxisomes. *BMC Neurosci* **4**: 16, 2003
- [45] Wataya T, Nunomura A, Smith MA, Siedlak SL, Harris PL, Shimohama S, Szweda LI, Kaminski MA, Avilá J, Price DL, Cleveland DW, Sayre LM, Perry G: High molecular weight neurofilament proteins are physiological substrates of adduction by the lipid peroxidation product hydroxynonenal. *J Biol Chem* **277**: 4644-4648, 2002
- [46] Liu Q, Smith LA, Avilá J, DeBernardis J, Kansal M, Takeda A, Zhu X, Nunomura A, Honda K, Moreira PI, Oliveira CR, Santos MS, Shimohama S, Aliev G, de la Torre J, Ghanbari HA, Siedlak SL, Harris PLR, Sayre LM, Perry G: Alzheimer-specific epitopes of tau represent lipid peroxidation-induced conformations. *Free Radic Biol Med* **38**: 746-754, 2005
- [47] Silveira Smitt PA, Mulder TP, Verspaget HW, Blaauwgeers HG, Troost D, de Jong JM: Metallothionein in amyotrophic lateral sclerosis. *Biol Signals* **3**: 193-197, 1994
- [48] Gong YH, Elliott JL: Metallothionein is altered in a transgenic murine model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* **162**: 27-36, 2000
- [49] Shibata N, Asayama K, Hirano A, Kobayashi M: Immunohistochemical study on superoxide dismutases in spinal cords from autopsied patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Dev Neurosci* **18**: 492-498, 1996
- [50] Shinpo K, Kikuchi S, Sasaki H, Ogata A, Morikawa F, Tashiro K: Selective vulnerability of spinal motor neurons to reactive dicarbonyl compounds, intermediate products of glycation, in vitro: implication of inefficient glutathione system in spinal motor neurons. *Brain Res* **861**: 151-159, 2000
- [51] 柴田亮行, 遠井素乃, 内田浩二, 内山真一郎, 澤田達男, 小林慎雄: PPAR γ (peroxisome proliferators-activated receptor-gamma). *Vasc Med* **1**: 196-203, 2005
- [52] Münch G, Shepherd CE, McCann H, Brooks WS, Kwok JB, Arendt T, Hallupp M, Schofield PR, Martins RN, Halliday GM: Intraneuronal advanced glycation endproducts in presenilin-1 Alzheimer's disease. *Neuroreport* **13**: 601-604, 2002
- [53] Menéndez-Benito V, Verhoef LGGC, Masucci MG, Dantuma NP: Endoplasmic reticulum stress compromises the ubiquitin-proteasome system. *Hum Mol Genet* **14**: 2787-2799, 2005

表 1. 免疫組織化学染色に使用した一次抗体

Antigen	Animal	Fraction	Clonality	Clone	Dilution	[Ref.] or Source
APM	mouse	IgG ₁	mAb	3C	1.0 µg/mL	[33, 34]; NOF
β-Actin	goat	IgG	pAb	–	1:1,000	Santa Cruz
CD11b	rat	IgG _{2b}	mAb	M1/70.15	1:1,000	UK-Serotec
CEL	mouse	IgG ₁	mAb	KNH-30	2.0 µg/mL	[33]
cFLIP	rabbit	IgG	pAb	–	1:1,000	Upstate
CML	mouse	IgG ₁	mAb	6D12	1.0 µg/mL	[21, 22, 33]
CRA-Lys	mouse	IgG _{2a}	mAb	82D3	1.0 µg/mL	[21, 37]
FADD	rabbit	IgG	pAb	–	1:1,000	Neomarkers
Fas	rabbit	IgG	pAb	–	1:500	Wako
FasL	rabbit	IgG	pAb	–	1:500	BD Biosciences
GFAP	goat	IgG	pAb	–	1:500	Santa Cruz
HHE-His	mouse	IgG ₁	mAb	HHE53	1.0 µg/mL	[16, 35]; NOF
HNE-His	mouse	IgG ₁	mAb	HNEJ2	0.1 µg/mL	[21, 22, 33]; NOF
MDA-Lys	mouse	IgG ₁	mAb	1F83	1.0 µg/mL	[33]; NOF
NF-κB	rabbit	IgG	pAb	–	1:2,000	StressGen
ONE-dG	mouse	IgG	mAb	6A3	1:1,000	[36]
p-NFP	mouse	IgG ₁	mAb	SMI-31	1:10,000	SMI
PPARγ	rabbit	IgG	pAb	–	1:2,000	BioMol
Pyrraline	mouse	IgG ₁	mAb	H-12	1.5 µg/mL	[22, 33]
SOD1	rabbit	IgG	pAb	–	1:5,000	[6]

略語: 最終頁参照

◆図の説明◆

- 図 1. 定常状態にある好気性生物におけるラジカル発生機構。
- 図 2. 炎症状態にある好気性生物におけるラジカル発生機構。
- 図 3. 細胞構成成分のカルボニル修飾機構。
- 図 4. 蛋白糖酸化カルボニルとその蛋白付加体の分子構造。
- 図 5. 脂質過酸化カルボニルとその蛋白付加体の分子構造。
- 図 6. DNA の酸化およびカルボニル修飾産物の分子構造。
- 図 7. カルボニルストレスによる炎症とアポトーシスの誘導機構。
- 図 8. マウス脊髄前角における CRA-Lys の免疫組織化学的解析。酵素抗体法; Bar = 100 μm (A, B), 50 μm (C, D)
- 図 9. マウス脊髄における蛋白糖酸化カルボニル蛋白付加体の免疫組織化学的解析。矢印 = 反応性グリア; 酵素抗体法; Bar = 500 μm (A-D), 50 μm (E, F)
- 図 10. マウス脊髄前角における脂質過酸化カルボニル付加体の免疫組織化学的解析。矢印 = 反応性グリア; 酵素抗体法; Bar = 50 μm
- 図 11. マウス脊髄前角における CRA-Lys の免疫組織化学的局在の加齢性変化。黒矢印 = 空胞変性ニューロン, 白矢印 = 単純萎縮ニューロン, 矢尻 = 反応性グリア; 酵素抗体法; Bar = 20 μm
- 図 12. 同一切片再免疫染色法によるマウス脊髄前角における CRA-Lys 含有グリアの同定。黒矢印 = 反応性アストロサイト, 白矢印 = 活性化ミクログリア; 酵素抗体法; Bar = 20 μm
- 図 13. G93A マウス脊髄運動ニューロンに出現する Lewy 小体様硝子様封入体の免疫組織化学的解析。矢印 = LBHI; 酵素抗体法; Bar = 20 μm

図 14. マウス脊髄前角における FasL および Fas の局在。矢印 = 反応性グリア; 酵素抗体法; Bar = 50 μm

図 15. マウス脊髄前角における FADD および cFLIP の局在。矢印 = 反応性グリア; 酵素抗体法; Bar = 50 μm

図 16. G93A マウスと SJL マウスの脊髄前角における CRA-Lys 含有グリアの密度の比較と加齢に伴う変化。* $p < 0.01$

図 17. マウス脊髄総 RNA 抽出物中の FADD mRNA の RT-PCR 解析。エチジウムブロマイド法

図 18. マウス脊髄細胞質蛋白抽出物中の cFLIP のイムノブロット解析。化学発酵法; * $p < 0.01$

◆略語一覧◆

ABC, avidin-biotin-immunoperoxidase complex; *ACDH*, acyl-CoA dehydrogenase; *ACR*, acyl-CoA reductase; *AEC*, 3-amino-9-ethylcarbazole; *ALS*, amyotrophic lateral sclerosis; *AP-1*, activator protein-1; *APM*, argpyrimidine; *ATF*, activating transcription factor; *BSA*, bovine serum albumin; *CAM*, cell adhesion molecule; *cFLIP*, cellular FLICE inhibitor protein; *CEL*, N^{ϵ} -(carboxyethyl)lysine; *CIO*, hypochlorite; *CML*, N^{ϵ} -(carboxymethyl)lysine; *COX-2*, cyclooxygenase-2; *cPLA₂*, cytosolic phospholipase A₂; *CRA*, crotonaldehyde; *CRA-Lys*, crotonaldehyde-lysine; *DAB*, 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; *3-DG*, 3-deoxyglucosone; *DHP-Lys*, dihydropyridine-lysine; *DTT*, 1,4-dithreitol; *EALS*, endemic amyotrophic lateral sclerosis; *EDTA*, ethylenediaminetetraacetate; *EMP-Lys*, N^{ϵ} -(5-ethyl-2-methylpyridinium)lysine; *ER*, endoplasmic reticulum; *FADD*, Fas-associated death domain; *FALS*, familial amyotrophic lateral sclerosis; *FasL*, Fas ligand; *G93A*, carrying a transgene for human superoxide dismutase-1 with glycine to alanine substitution at codon 93; *GFAP*, glial fibrillary acidic protein; *GLT-1*, glutamate transporter-1; *GPX*, glutathione peroxidase; *GSH*, reduced form of glutathione; *GSSG*, oxidized form of glutathione; *H₂O₂*, hydrogen peroxide; *H&E*, hematoxylin-eosin; *HHE*, 4-hydroxy-2-hexenal; *HHE-His*, 4-hydroxy-2-hexenal-histidine; *HNE*, 4-hydroxy-2-nonenal; *HNE-His*, 4-hydroxy-2-nonenal-histidine; *HRP*, horseradish peroxidase; *ICAM-1*, intercellular cell adhesion molecule-1; *IKK*, inhibitor of κ B kinase; *IL*, interleukin; *iNOS*, inducible nitric oxide synthase; *JNK*, c-Jun N-terminal kinase; *LBHI*, Lewy body-like hyaline inclusion; *5-LOX*, 5-lipoxygenase; *LT*, leukotrien; *mAb*, monoclonal antibody; *MAPK*, mitogen-activated protein kinase; *MCP-1*, monocyte chemoattractant protein-1; *MDA*, malondialdehyde; *MDA-Lys*, malondialdehyde-lysine; *MG*, methylglyoxal; *MIP-1 α* , macrophage inflammatory protein-1 α ; *MMP*, matrix metalloproteinase; *MPO*, myeloperoxidase; *NCAM-1*, neuronal cell adhesion molecule-1; *NF- κ B*, nuclear factor- κ B; *NIK*, nuclear factor- κ B-inducing kinase; *NO*, nitric oxide; *NO₂*, nitric dioxide; *NOF*, Nippon Oil and Fat; *NOX*, NADPH oxidase; *NTyr*, nitrotyrosine structure; *O₂*, molecular oxygen; *O₂⁻*, superoxide radical; *OCT*, optimal cutting temperature; *·OH*, hydroxyl radical; *OH-dG*, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; *ONE*, 4-oxo-2-nonenal; *ONE-dG*, 4-oxo-2-nonenal-2'-deoxyguanosine; *ONOO⁻*, peroxynitrite; *pAb*, polyclonal antibody; *PAGE*, polyacrylamide gel electrophoresis; *PBS*, phosphate-buffered saline; *PFA*, paraformaldehyde; *PG*, prostaglandin; *PIC*, polymer-immunocomplex; *p-NFP*,

phosphorylated neurofilament protein; *PPAR γ* , peroxisome proliferator-activated receptor- γ ; *P450R*, cytochrome P450 reductase; *PVDF*, polyvinyliden difluoride; *RIPA*, radioimmunoprecipitation assay; *RNS*, reactive nitrogen species; *ROS*, reactive oxygen species; *RT-PCR*, reverse transcription-polymerase chain reaction; *SALS*, sporadic amyotrophic lateral sclerosis; *SDS*, sodium dodecyl sulfate; *SJL*, strain of Jackson Laboratory; *SMI*, Sternberger Monoclonal Inc.; *SOD*, superoxide dismutase; *TB*, Tris-HCl buffer; *TBS*, Tris-buffered saline; *TNF α* , tumor necrosis factor- α ; *TNFR*, tumor necrosis factor receptor; *UPS*, ubiquitin-proteasome system; *VCAM-1*, vascular cell adhesion molecule-1

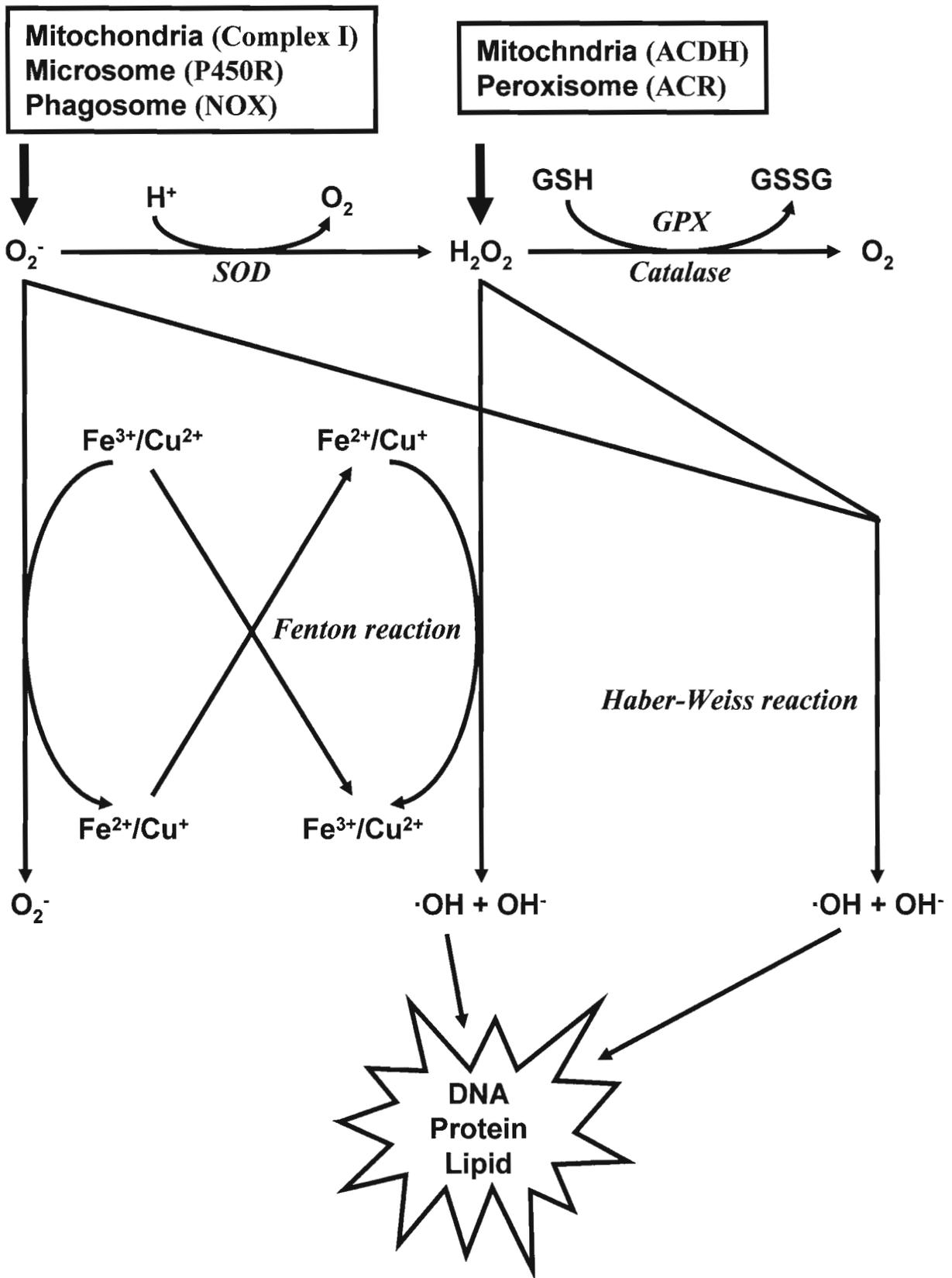


图 1

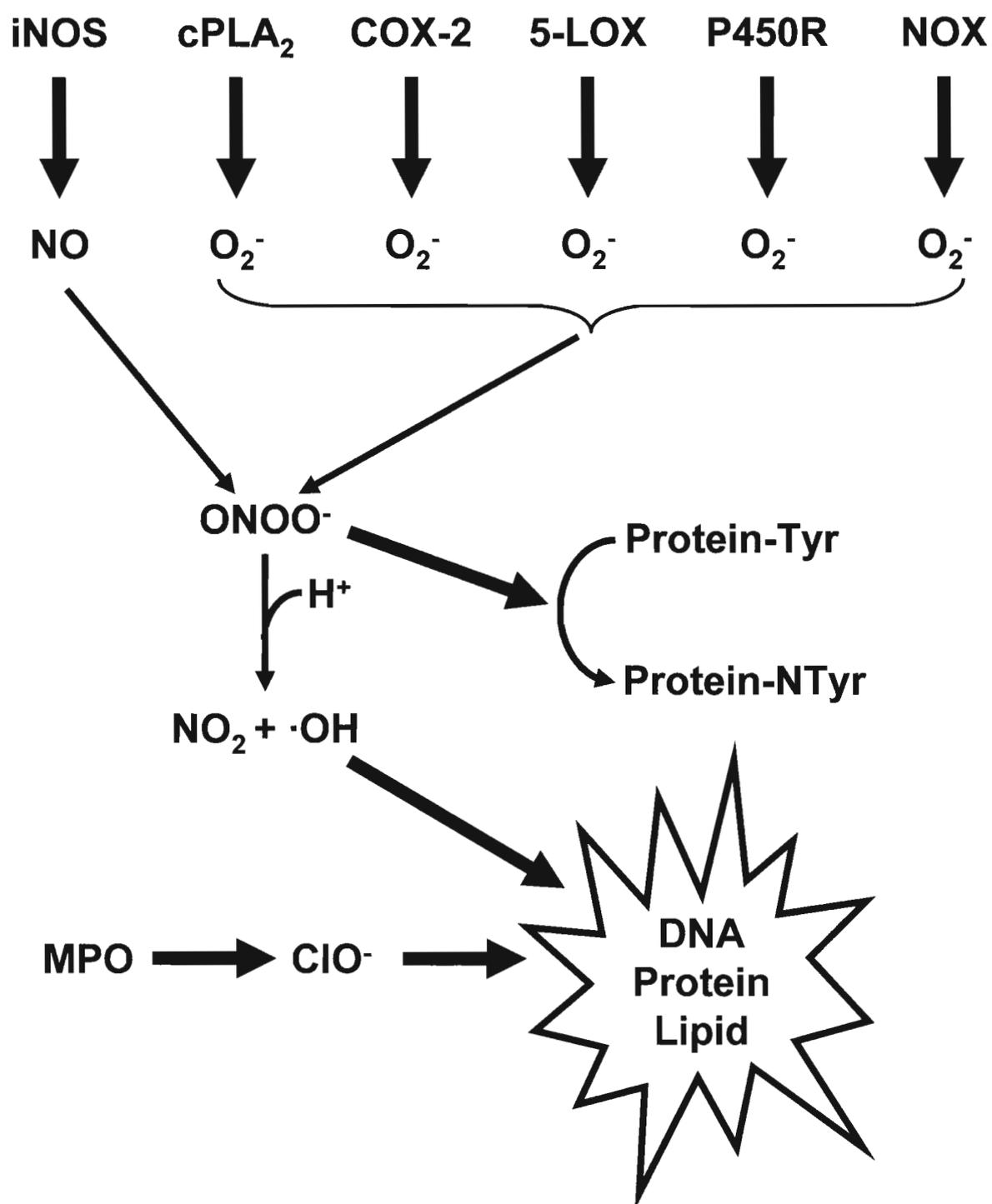
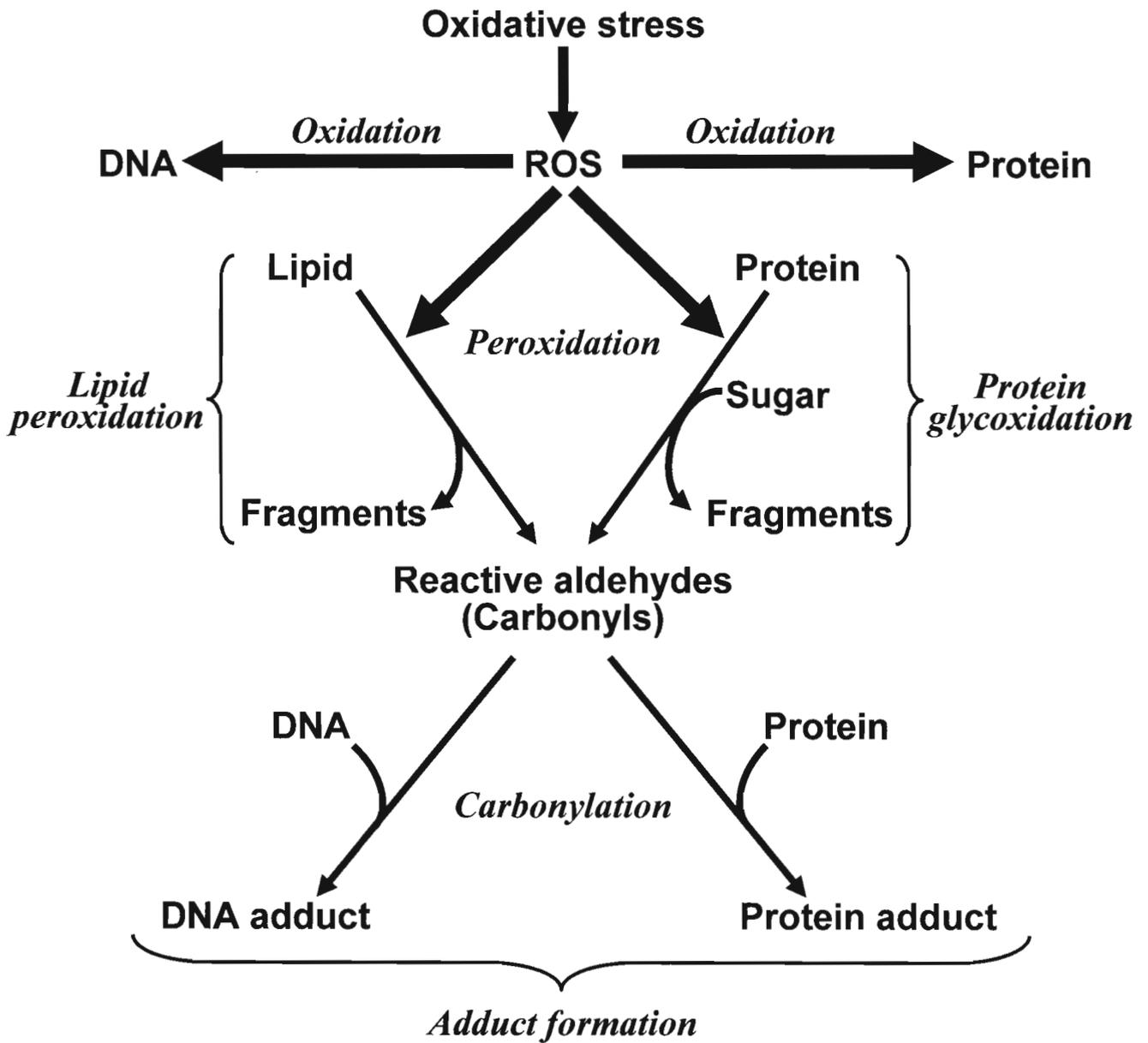


图 2



☒ 3

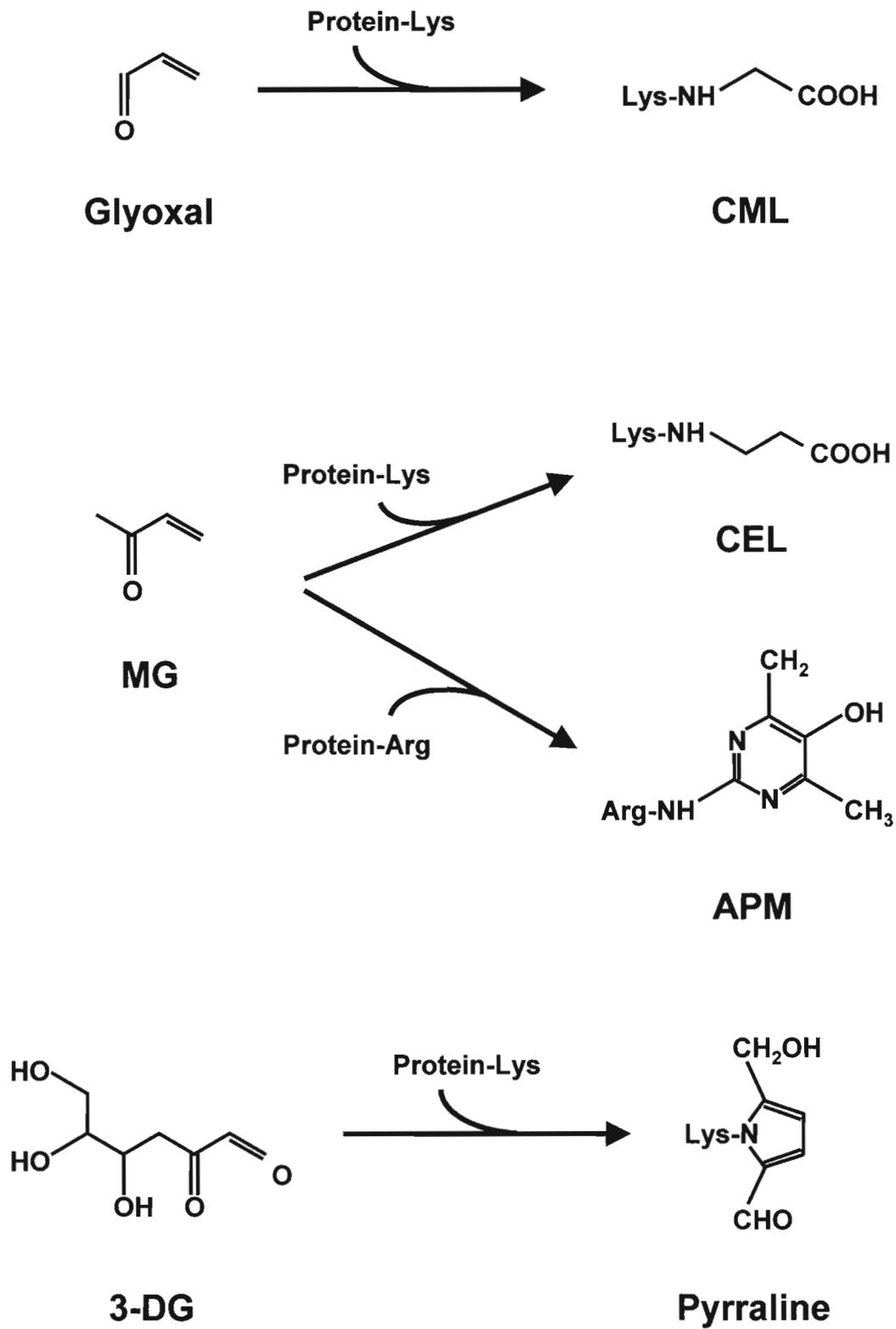


图 4

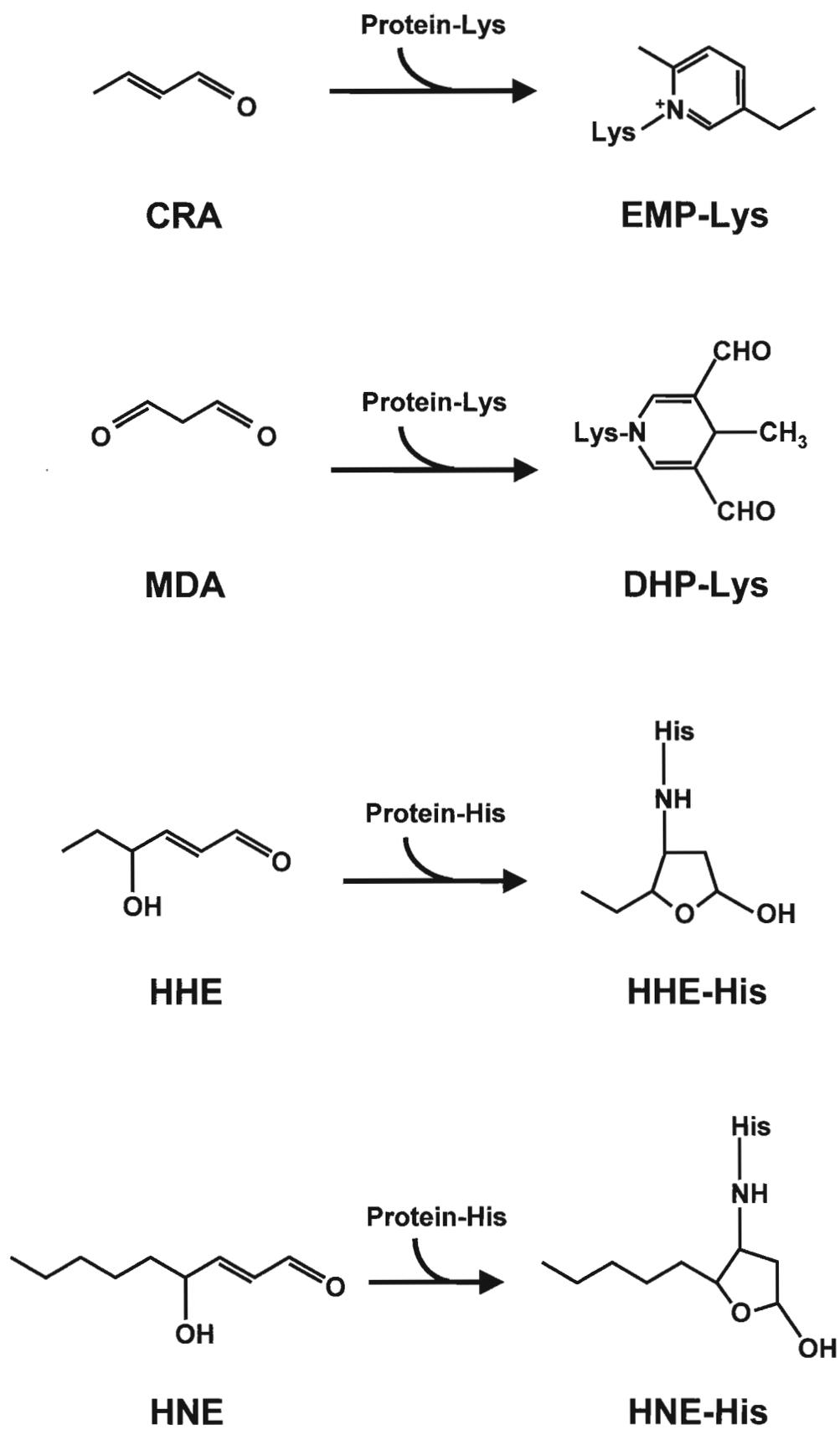


图 5

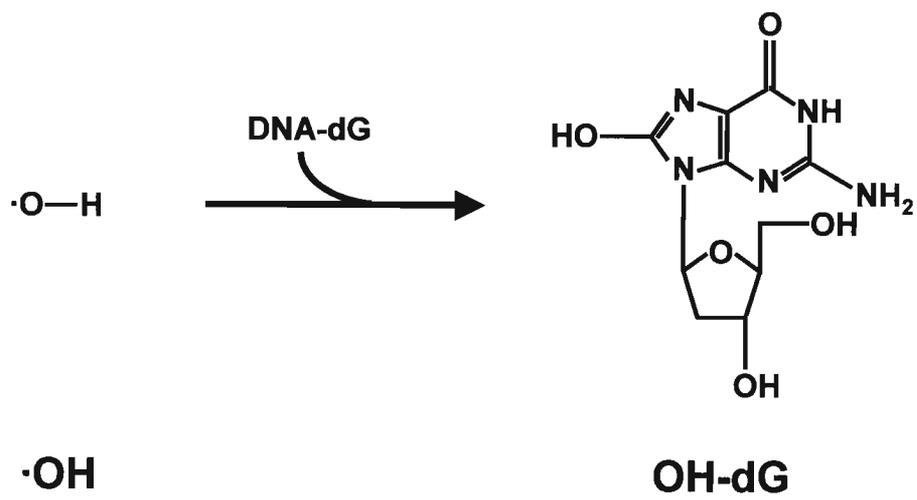
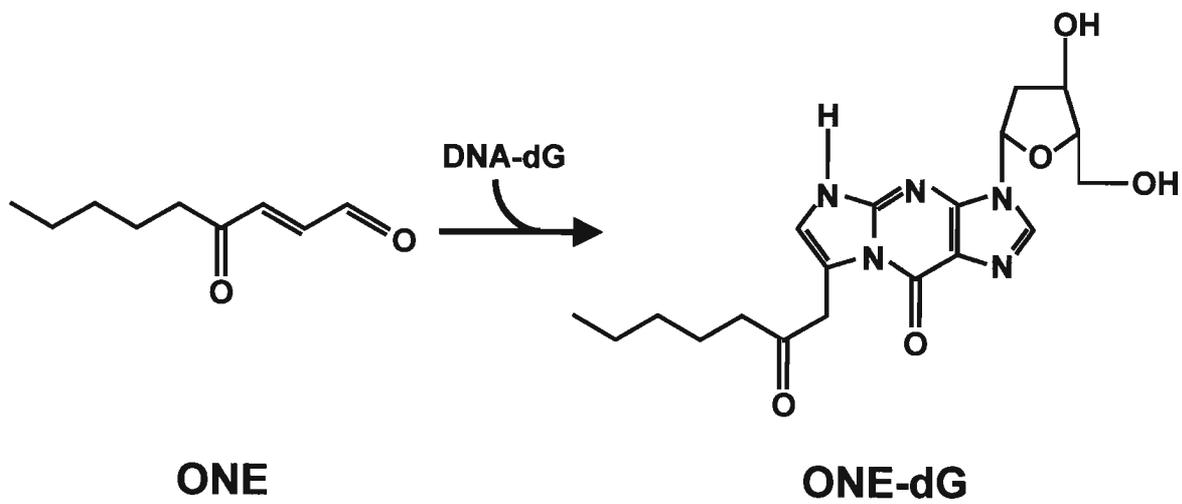


图 6

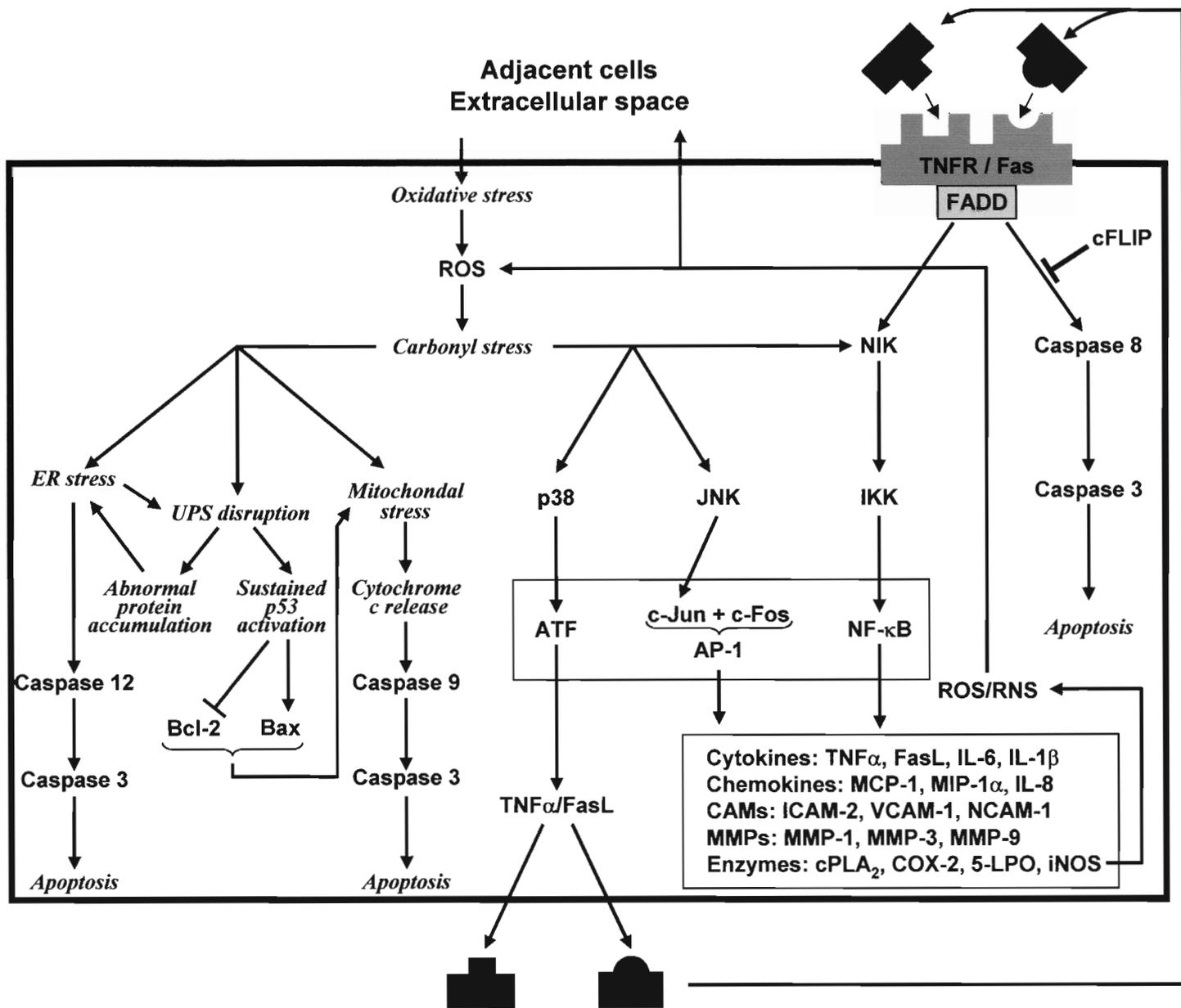
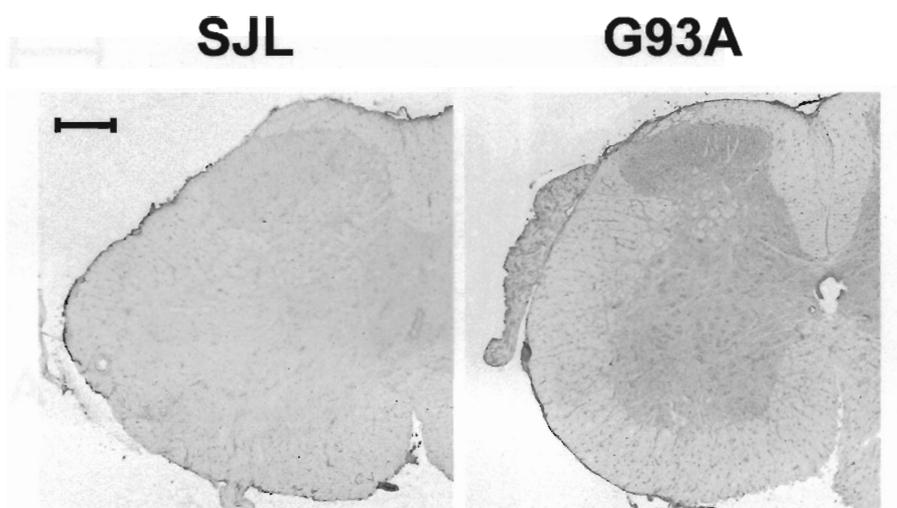
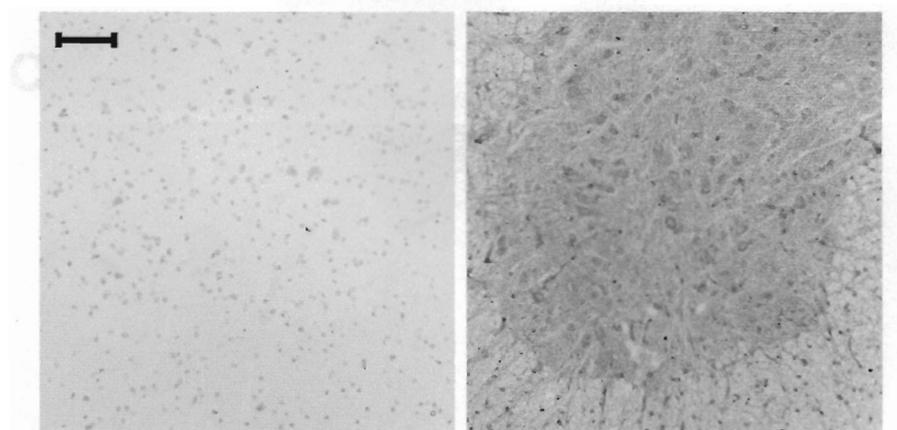


图 7



G93A脊髓前角



吸収試験

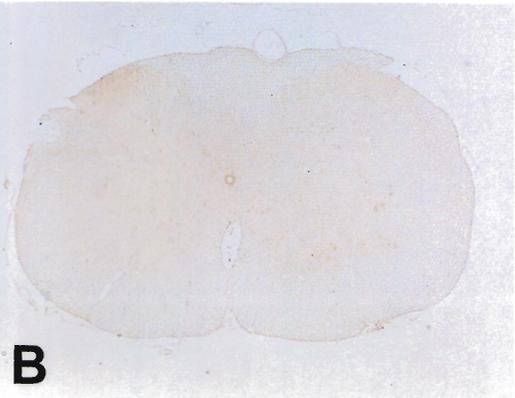
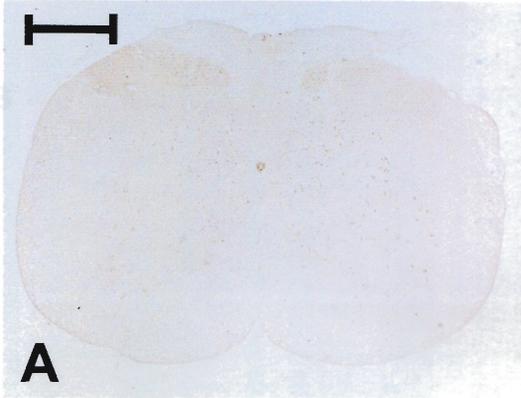
通常染色

图 8

CML

Pyrraline

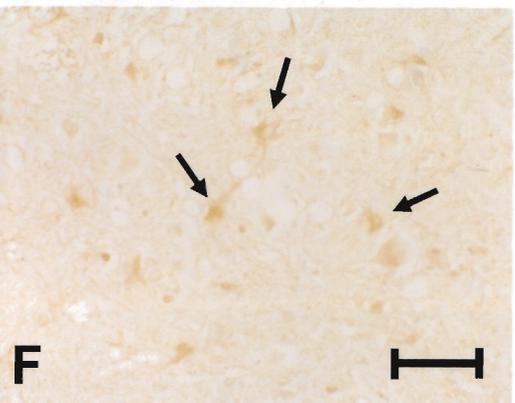
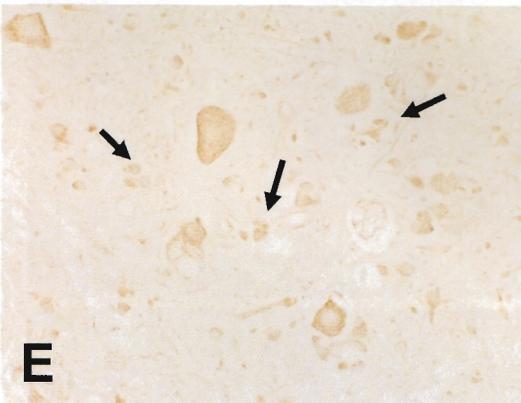
SJL



G93A



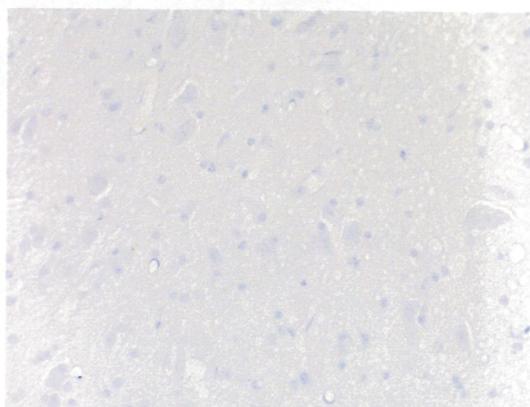
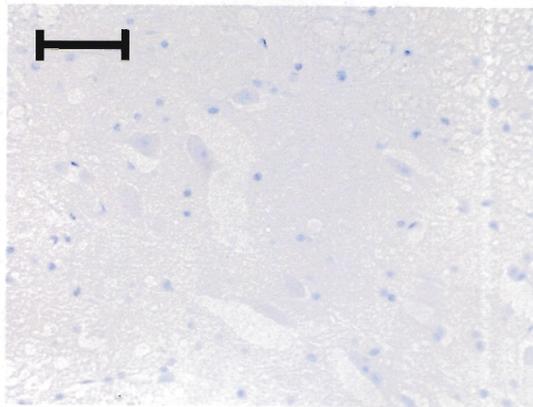
G93A



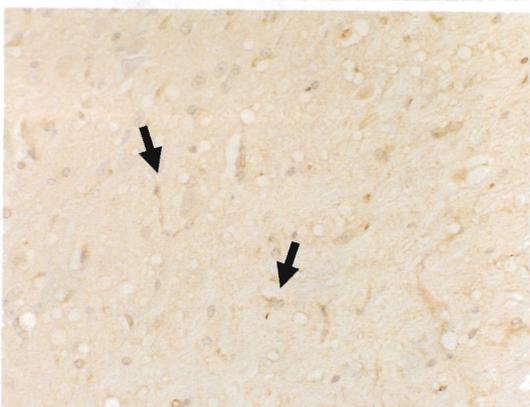
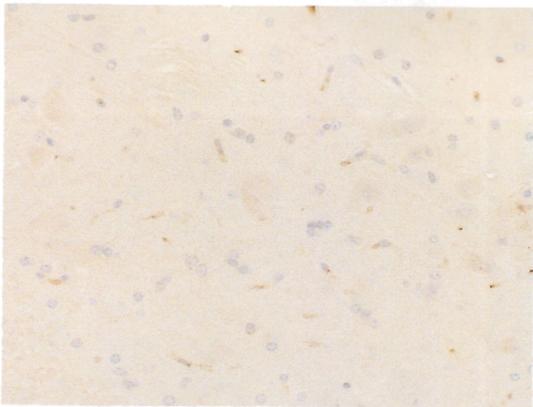
SJL

G93A

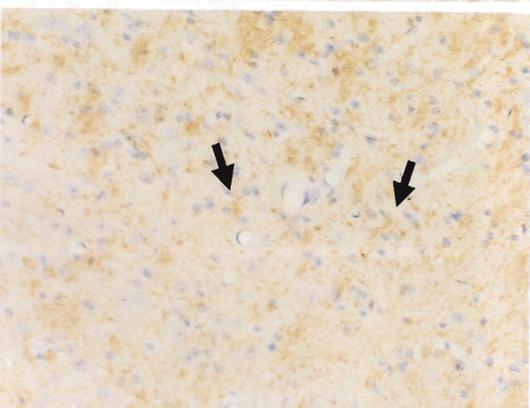
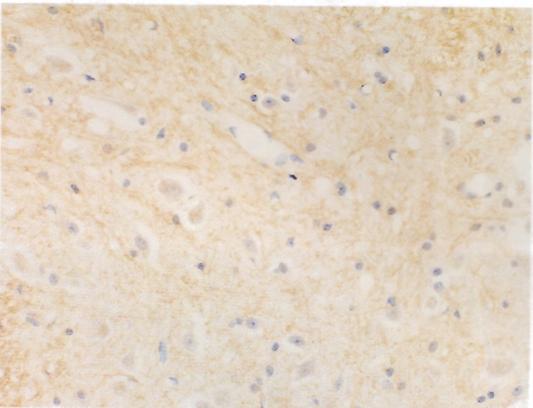
MDA-Lys



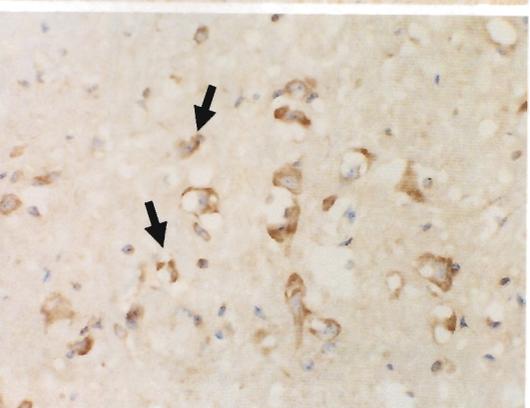
HHE-His



HNE-His



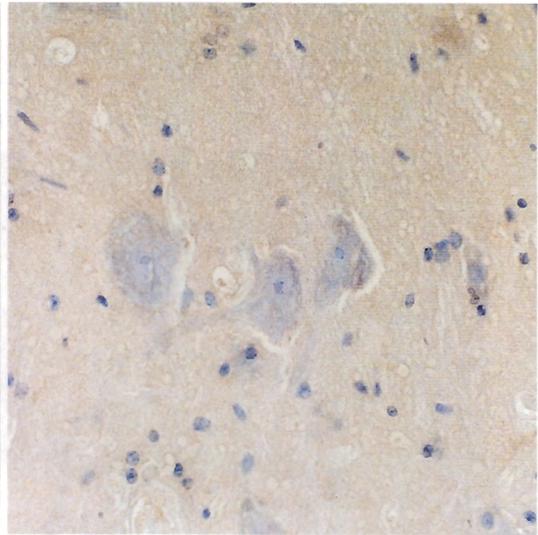
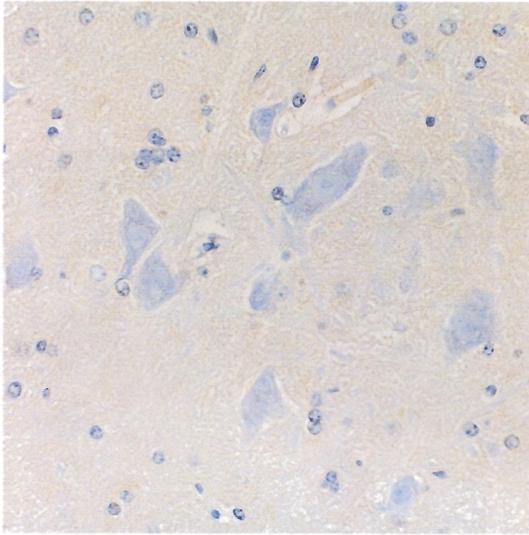
ONE-dG



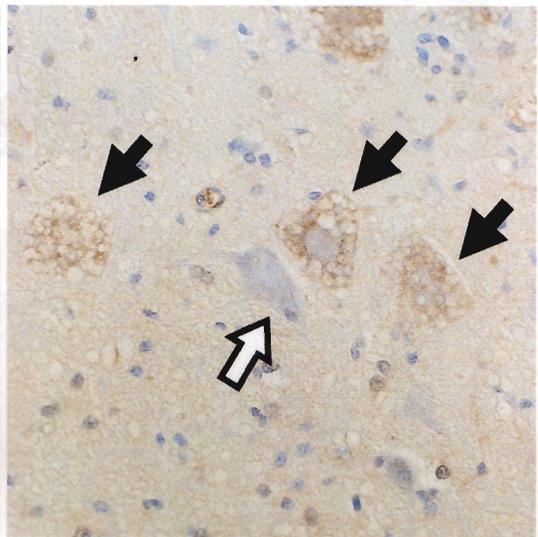
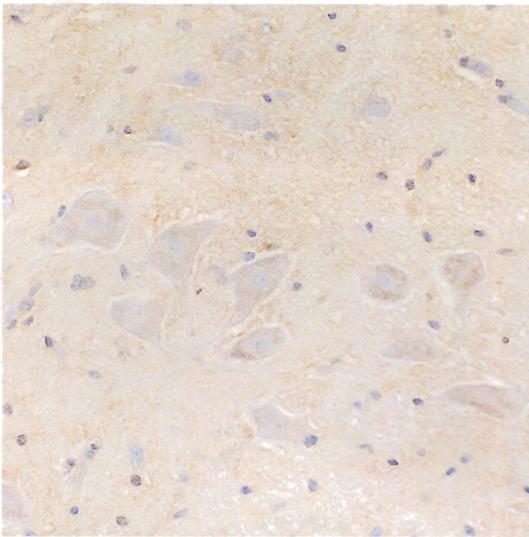
SJL

G93A

9 w



12 w



15 w

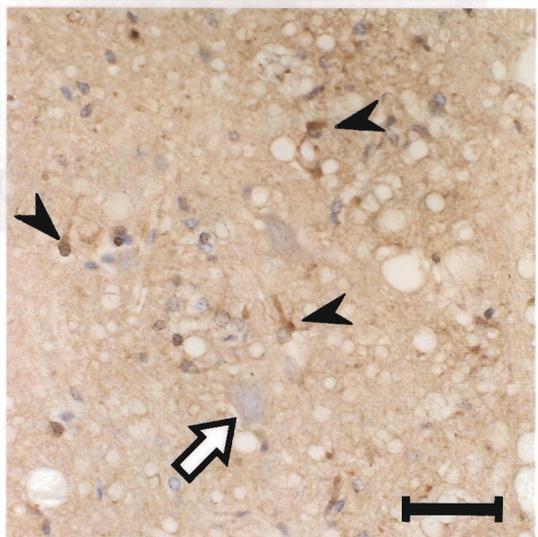
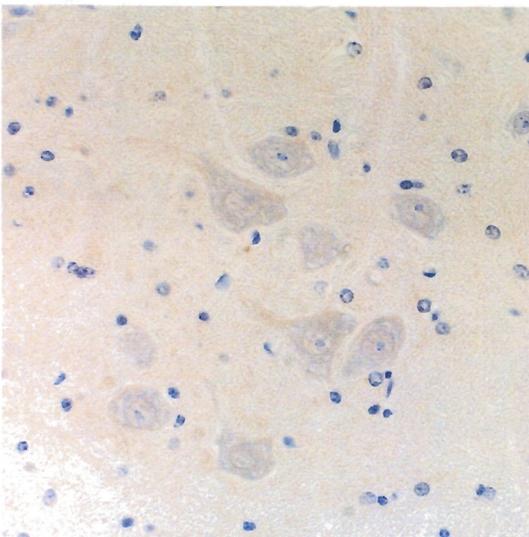


图 11

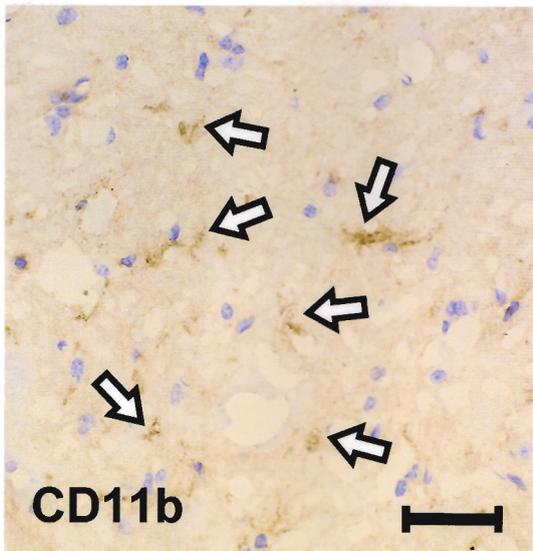
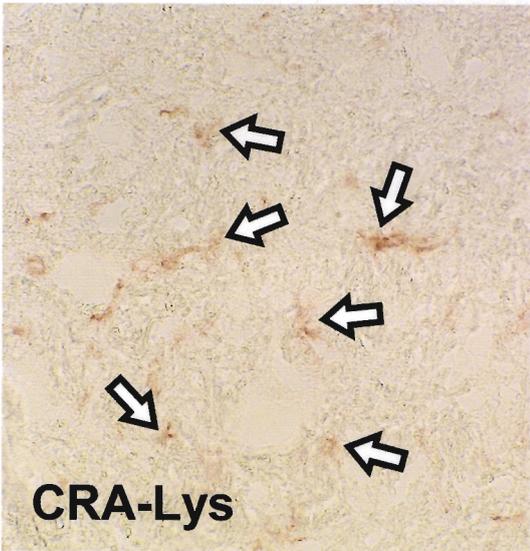
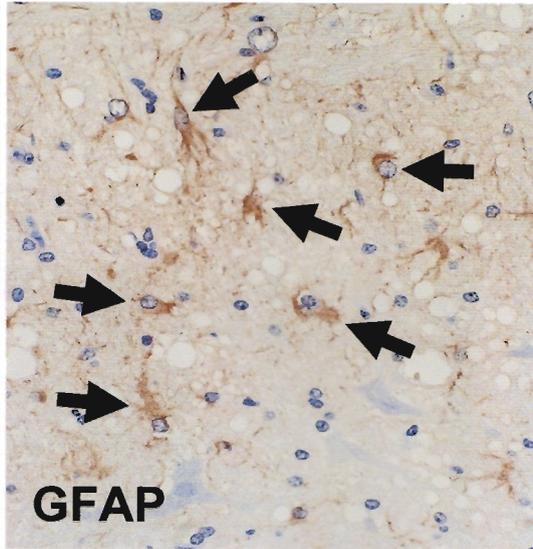
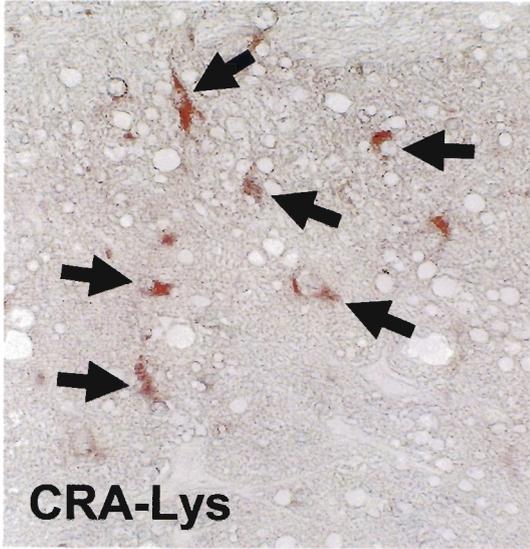


图 12

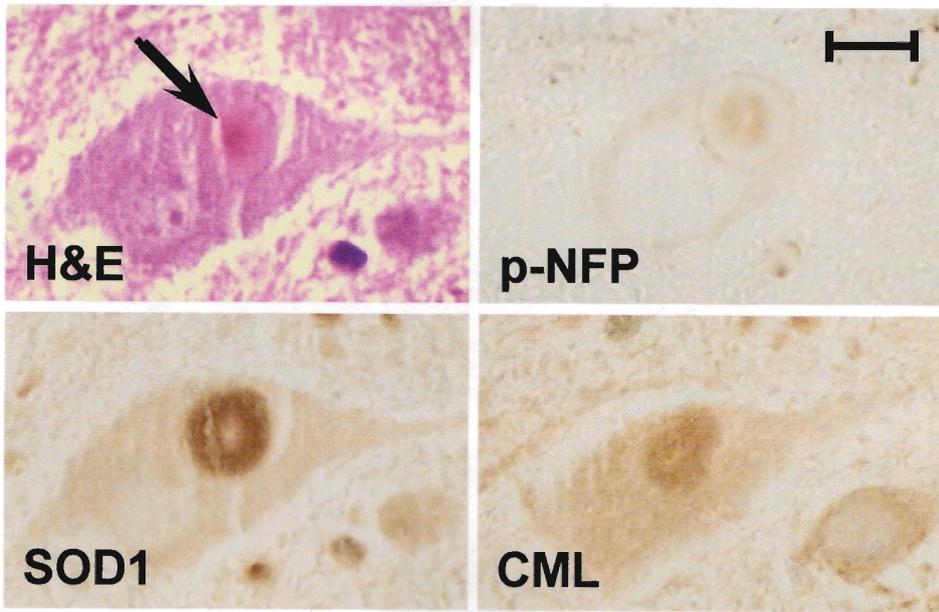


图 13

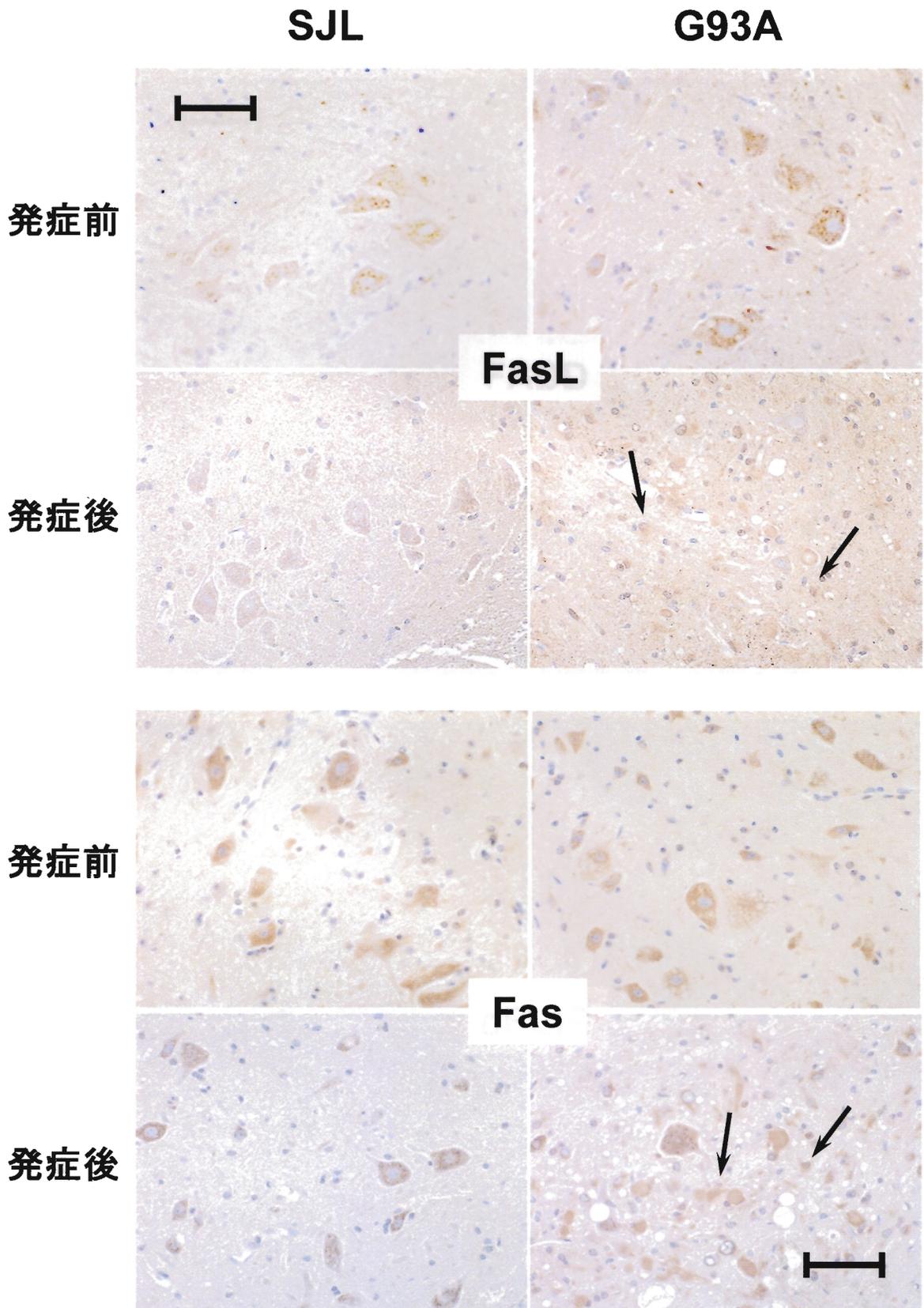


図 14

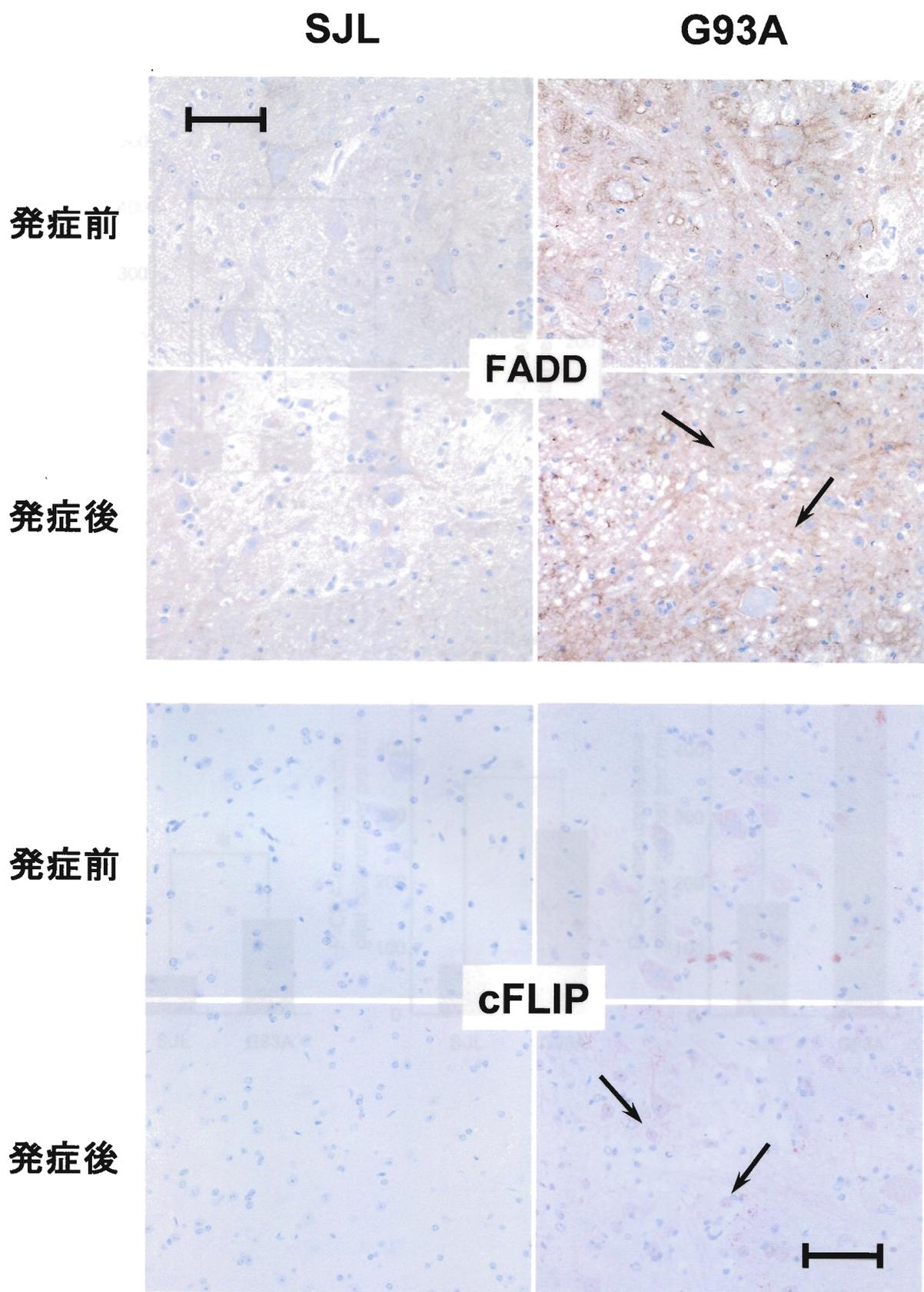
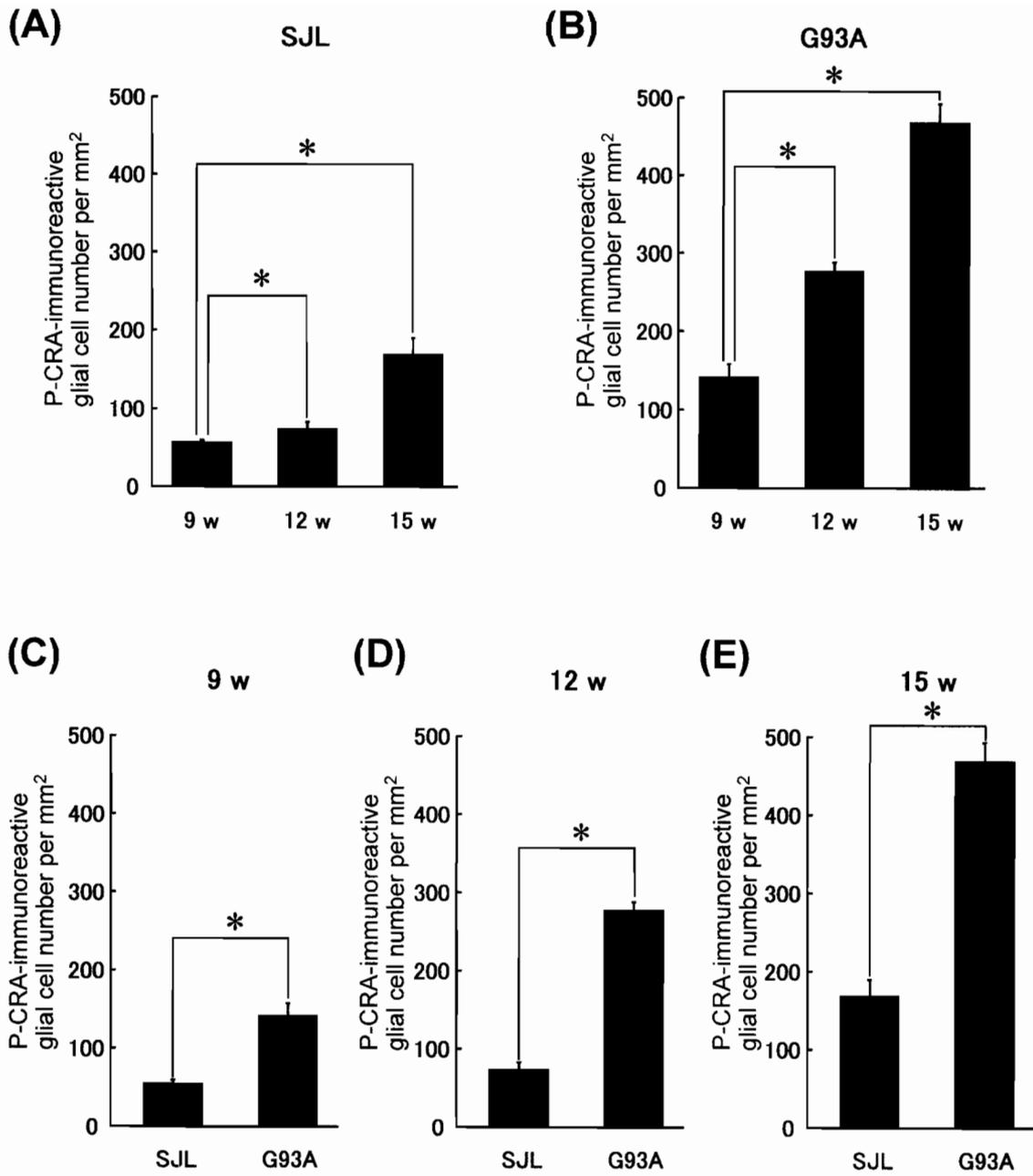


図 15



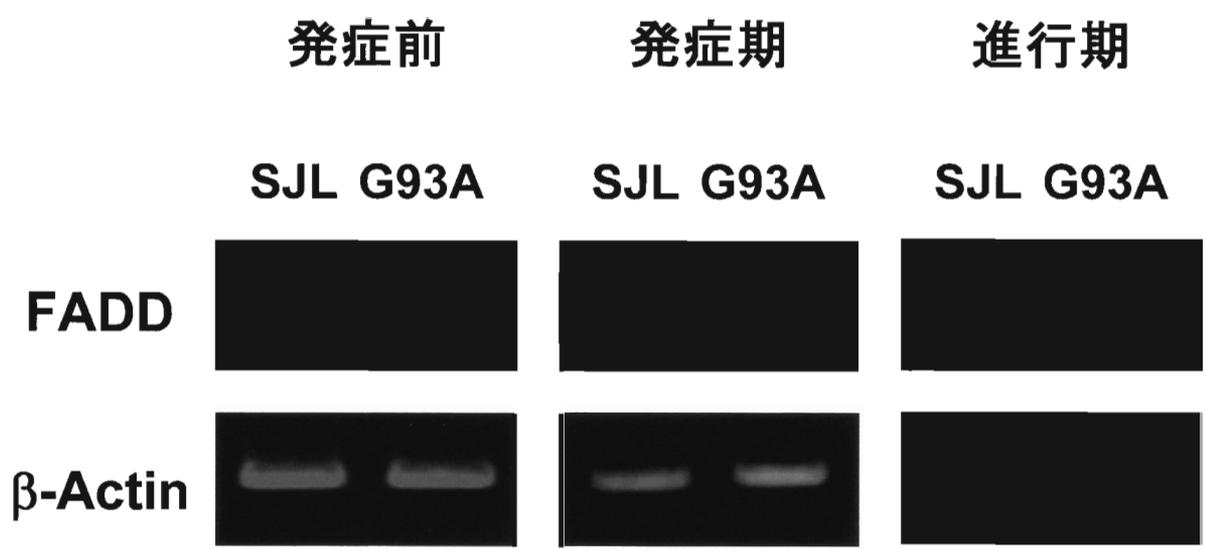
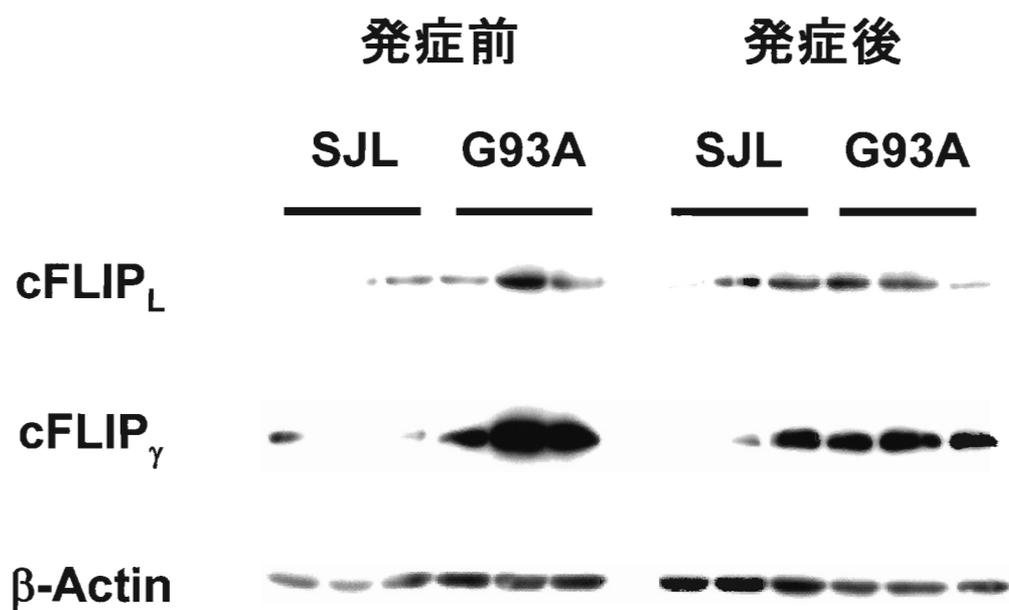


図 17

(A)



(B)

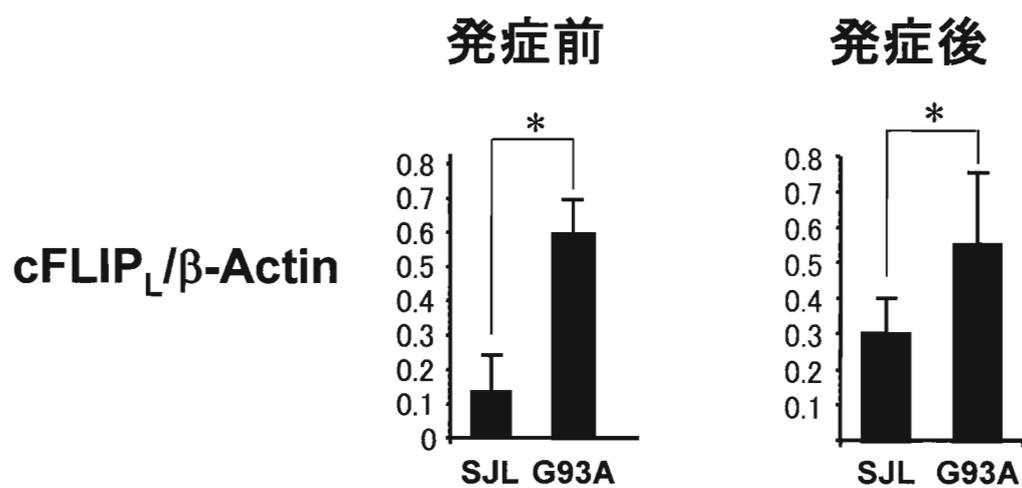


図 18