

土谷智史論文内容の要旨

主論文

Acute stress response in calorie-restricted rats to lipopolysaccharide-induced inflammation

カロリー制限ラットにおける、リポポリサッカライド誘起性炎症への急性ストレス反応

土谷智史、樋上賀一、小松利光、田中賢治、本田純久、山座治義、千葉卓也、綾部公認、下川功

(Mechanism of Ageing and Development, 2005 in press)

長崎大学大学院医学研究科外科系専攻
(指導教授；永安 武 教授)

【緒言】カロリー制限(CR)は、酵母から rhesus monkey に至るまで、種々の生物で老化の進行を遅らせ、寿命を延長する。この事実は、老化の進行と寿命を制御する、進化論的に保存されたメカニズムの存在を予見させる。集積した証拠によれば、CR は、炎症や毒物を含む多くのストレスから、生物を守ることが示唆されている。ストレス誘導物質が、種々の疾患や加齢の原因とされる活性酸素(ROS)や窒素酸化物(RNS)を増加させ、組織を障害していると考えられており、これらストレス因子に対する CR の特異的なメカニズムを解明することは、加齢現象をより深く理解することに繋がる。

【対象と方法】この実験では、CR ラットのリポポリサッカライド(LPS)へのストレス反応を解析した。生後6週より雄 F344 ラットを自由摂食(AL)群、または70%のCR群に分けた。6ヶ月齢のAL、CR群の尾静脈より1.6mg/kgのLPSを投与し、0から8時間後に屠殺し、組織、血漿サンプルを採取した。急性炎症反応に対するCR効果を評価するために、血漿中のALT、TNF- α 、IL6、IFN- γ 、NOの濃度を測定し、核内と細胞質内蛋白を抽出して、Western blot法により核内転写因子であるNF- κ B濃度と細胞質内のI κ B濃度を測定した。また、cDNAアレイによって、炎症負荷に伴うCR特異的なメカニズムを解明しようと試みた。肝臓から抽出、精製されたmRNAを、クロンテック社のRat 1.2 nylon arrayにハイブリダイズして、各食餌群、各時間帯(0、1、4時間)の計6群につき、3-4

回実験を繰り返した。メンブレン上に存在する遺伝子のうち、発現の信頼できる 427 遺伝子について、DataDisk v.6.0 software を使用して、クラスター解析を行った。

【結果と考察】CR は、LPS 投与に対して血漿 TNF- α のより高い反応性を示すとともに、LPS に誘導される肝障害を抑制した。TNF- α は LPS による組織障害に中心的な働きをするが、組織障害と TNF- α の血漿濃度は相関しないことが報告されており、この実験の結果は、CR が TNF- α の転写制御を修飾している可能性を示唆するとともに、TNF- α のシグナル伝達を部分的に介して、LPS による組織障害を減弱させていることも考えられた。LPS は Toll-like receptor 4 (TLR-4) に結合して、細胞内シグナルを誘起し、I κ B の分解、NF κ B の活性化を誘導する。この実験では、細胞質の I κ B の分解と、その後におこる核内への NF κ B 転移は、CR によって影響されなかった。また、炎症のプロセスで増加する IL6、IFN- γ 、NO の血漿濃度や mRNA レベルも、CR によって影響されなかった。

このような、CR の LPS に対する効果を見極めるため、cDNA アレイを使用して数百の遺伝子発現をクラスター解析した。LPS 投与後に劇的に上昇したクラスターには、炎症によって反応する遺伝子が多く含まれていた。LPS 投与 0 時間において、CR で遺伝子発現の増加したクラスターには、サイトカインや炎症中間物が多く、G-protein couple receptor に関連しており、僅かであるが定常的に、CR が免疫または炎症細胞の機能を賦活化していることが示唆された。CR で発現の抑制されたクラスターは、エネルギーまたは異物の代謝、ストレス反応遺伝子として分類された。特に興味深いことには、ROS の代謝に関連する数種類の遺伝子が CR で低下しており、CR が酸化ストレスを下げるため、結果的に防御的なメカニズムが必要とされないことが示唆された。LPS 投与後 1、4 時間で、CR によって相対的に発現の増加するクラスターはなかった。

投与後 1 時間で、CR で相対的に発現の低下していたクラスターは、プロテアーゼとユビキチン-プロテアソーム経路のものを多く含んでいた。これらの蛋白融解性の遺伝子発現の低下は、CR の組織破壊抑制効果と関連していると考えられた。また、免疫、炎症反応に関与する重要なペプチドの分解制御を通じ、炎症過程をコントロールする、転写後のメカニズムの存在が示唆された。我々の結果は、CR が早期炎症反応を抑制することなしに肝臓障害を抑制することを示した。急性炎症に対する CR の組織障害抑制効果は、誘導的なものよりむしろ構造的に発現している遺伝子産物によって、引き起こされているのかもしれない。