

老化制御におけるインスリンシグナル伝達系の役割  
(11672170)

平成11年度～平成12年度科学研究費補助金  
(基盤研究(C) (2)) 研究成果報告書

平成13年3月

研究代表者 黒川知則  
広島大学医学部助教授

老化制御におけるインスリンシグナル伝達系の役割  
(11672170)

平成11年度～平成12年度科学研究費補助金  
(基盤研究(C) (2)) 研究成果報告書

平成13年3月

研究代表者 黒川知則  
広島大学医学部助教授

## はしがき

科学研究費(基盤研究(C) (2))「老化制御におけるインスリンシグナル伝達系の役割」に関する研究は、平成11年度より2ヶ年計画で実施された。この研究成果報告書は、平成11年度および平成12年度における成果をまとめたものである。

本研究を実施するにあたり、広島大学医学部総合薬学科薬効解析科学講座、樋木修教授には研究分担者として多くのご教示およびご協力を頂いた。なお実験においては当研究室の全面的な協力を受けたが、中でも西谷しのぶ修士、藤本康博修士、鈴木沙織学士、高木陽子学士、浅田真治学士の諸君に多くの労をとって頂いた。また岡村直樹博士にも助言を頂いた。ここに感謝の意を表したい。

また平成11年度より2ヶ年にわたり科学研究費補助金を与えられたことに対して、改めて厚くお礼申し上げます。

平成13年3月

研究代表者  
広島大学医学部助教授  
黒川知則

## 研究組織

研究代表者 黒川知則 (広島大学医学部助教授)

研究分担者 櫛木 修 (広島大学医学部教授)

## 研究経費

平成11年度 2,300 千円

平成12年度 900 千円

計 3,200<sup>6</sup> 千円

## 研究発表

### (1) 学会誌等

- 1 T. Kurokawa, S. Nishitani, O. Hazeki  
Metabolic abnormality in the cerebrum of senescence-accelerated mouse (SAMP8).  
Neurochem. Res. 25 (7), 985, (2000)
- 2 T. Kurokawa, S. Asada, S. Nishitani, O. Hazeki  
Age-related changes in manganese superoxide dismutase activity in the cerebral cortex of senescence-accelerated prone and resistant mouse.  
Neurosci. Lett., 298 (2), 135-138, (2001)

### (2) 口頭発表

- 1 黒川知則  
薬学、薬理学から見た脳・神経系の加齢変化  
第10回日本発達心理学会(シンポジウム)、1999年3月27日
- 2 黒川知則  
脳障害発症に先行した酸化ストレスの上昇  
第15回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会(シンポジウム)、1999年7月8日
- 3 黒川知則、西谷しのぶ、榎木 修  
老化促進モデルマウスSAMP8大脳皮質に見られる代謝異常  
第42回日本神経化学学会(シンポジウム)、1999年9月16日
- 4 西谷しのぶ、高木陽子、黒川知則、榎木 修  
老化促進モデルマウスSAMP8大脳皮質における酸化ストレス増大への  
ミトコンドリアの関与  
日本薬学会第120年会、2000年3月30日
- 5 藤本康博、黒川知則、鈴木沙織、榎木 修  
SAMP8における血糖値の変化 - 絶食および加齢の影響 -  
第16回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会、2000年7月27日
- 6 浅田真治、黒川知則、西谷しのぶ、榎木 修  
SAMP8大脳皮質におけるMn-SOD活性の加齢変化  
第16回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会、2000年7月28日

# 研究成果

## 1 緒言

ヒトを含めた哺乳動物において、老化に伴って見られる生理的変化を分子レベルで理解し、老化機構を解明する上でモデル動物は優れたアプローチ法を提供する。研究代表者である黒川は、従来より京都大学再生医科学研究所のグループにより開発された老化促進モデルマウス(Senescence-accelerated mouse; SAM)、中でも促進老化とともに生後早期に学習や記憶障害を自然発症するSAMP8を研究対象にして個体老化の機構解明を試みてきた。その結果、生後早期のSAMP8心筋においてグルコーストランスポーター(GLUT4)量が増加し、さらにインスリンによるGLUT4タンパクの細胞内から膜表面へのトランスロケーションが対照マウス(SAMR1)に比して増大することを見出してきた。一方同時期のSAMP8心筋において過酸化脂質量も増加することを認めている。これらの結果から、インスリンにより心筋細胞内に過剰に取り込まれたグルコースの代謝過程で生成される活性酸素種による心筋障害と寿命短縮との関連性を推察してきた。こうした考えは、老化機構としてHarmanにより提唱された酸化的ストレス説とも一致しており、また個体におけるカロリー摂取量の多寡が寿命を規定する一要因であるという考えとも矛盾しない。

一方老化研究に繁用されている線虫において、インスリンレセプターをコードしている*daf-2*遺伝子やその下流に位置するホスファチジルイノシトール3-キナーゼ(PI3-キナーゼ)をコードしている*age-1*遺伝子の変異がその寿命を延長することが明らかにされてきた。またヒト繊維芽細胞(WI-38)において、PI3-キナーゼの阻害剤であるLY294002が老化に類似した遺伝子の発現を調節することが示された。これらの報告は、哺乳動物においてもインスリンシグナル伝達系におけるPI3-キナーゼが個体老化の鍵を握っている可能性を示唆するものである。

本研究は、SAMP8とSAMR1におけるインスリン作用を比較検討することにより個体老化におけるインスリンシグナル伝達系の役割を明らかにすることを目的とした。さらに老化とカロリー摂取との関連性に着目して、両系統間におけるエネルギー代謝を比較した。

## 2 結果

### (1) 脂肪細胞を用いたインスリン作用の検討

10週齢の両系統からコラゲナーゼ処理により脂肪細胞を調製し、インスリン存在下および非存在下において $[2-^3\text{H}]$ -2-デオキシグルコースの取り込み活性を測定した。その結果、両系統間に有意な相違は観察されなかった。一方脂肪細胞からホモジネートを調製し抗ホスホチロシン抗体を用いてウェスタン解析を行った。しかしチロシンリン酸化されたタンパク質量は両系統間に有意な相違は観察されなかった。

## (2) 血糖値へのインスリン投与の影響

各週齢(5、10、16、20、25週齢)のSAMP8とSAMR1にインスリン(0.4U/10g体重)の腹腔注射を施し、その20分および60分後の血糖値をグルコースオキシダーゼ法を用いて測定した。しかしどの週齢においても、またいずれの時間においても両系統間に有意な相違は観察されなかった。

## (3) 血糖値への絶食の影響

10週齢SAMP8とSAMR1において、自由摂食時および6時間絶食後の血糖値を測定した。その結果、6時間絶食後SAMP8の血糖値はSAMR1に比して著しく低下した。さらに絶食による血糖値の経時変化を検討したところ、SAMP8ではSAMR1に比して急速に24時間絶食後の血糖値レベルまで低下することが示された。またこのような両系統間の相違は、生後5週齢前後では観察されず10週齢以降でのみ認められたことから加齢に関連した現象であることが示唆された。一方自由摂食時においては両系統間に有意な相違は観察されなかった。

## (4) 絶食後血糖値に影響を及ぼす要因

両系統間に見られた短期間絶食後血糖値の相違の原因として、空腹時の血中グルコース供給源である肝グリコーゲン分解量の違いが考えられた。そのため10週齢SAMP8とSAMR1を用いて、6時間絶食後および自由摂食時においてアンスロン法をにより肝グリコーゲン量を測定した。その結果、いずれの場合にも両系統間に差異は認められず、絶食後により両系統とも約95%のグリコーゲン量を消失していることが示された。一方血漿インスリン濃度の違いも原因として考えられた。そのため各週齢(5、10、20週齢)のSAMP8とSAMR1を用いて、6時間絶食後および自由摂食時において血漿インスリン濃度をELISA法により測定した。しかしいずれの週齢においても両系統間に有意な相違は観察されなかった。

## (5) グルコース代謝活性

各週齢(5、10、20週齢)のSAMP8とSAMR1より単離脳細胞を調製し、6-[<sup>14</sup>C]-グルコースから産生される<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>を測定することによりグルコース代謝活性の加齢に伴う変化を検討した。その結果、10-20週齢SAMP8において同週齢のSAMR1に比して<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>産生量が増加することが明らかとなった。一方5週齢では両系統間に有意な相違は観察されなかった。この結果は、(3)で示した絶食による血糖値の減少が10週齢以降でのみ認められたことと良く相関した。

## (6) 脳内ATP含量

各週齢(5、10、20週齢)のSAMP8とSAMR1において脳内ATP含量をヘキソキナーゼとグルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼを組合わせて生じるNADPHを測定することにより定量した。その結果、5-20週齢の両系統間における脳内ATP含量はほぼ同程度であることが明らかになったが、加齢変化は認められなかった。

### 3 まとめ

老化促進モデルマウス(SAMP8)を用いた本研究からは哺乳類の個体老化機構にインスリンシグナル伝達系が果たしている役割は明らかにはならなかった。しかしSAMP8は、生後10週齢以降から血中グルコースの消費が対照マウスであるSAMR1より増大することが明らかになった。またそれに伴って同時期のSAMP8の脳内グルコース代謝活性が上昇しているにも拘らず、両系統の脳内ATP含量はほぼ同程度であることが判明した。これらの結果から生後10週齢以降からSAMP8では、ミトコンドリアにおけるATP産生効率の低下が生じ、その補償として血中グルコースの過剰な消費やグルコース代謝活性を上昇させることによってATP含量を維持する必要性が生じているものと推察される。また本研究の結果を老化と酸化的ストレス説との関連から展望すると、生後10週齢以降からSAMP8で見られるグルコース代謝活性の上昇は、必然的な酸素消費の増大を惹起しフリーラジカルの発生原因になるとも考えられ興味深いものである。

# 老化促進モデルマウスにおける老化機構への糖代謝の関与

広島大学大学院医学系研究科

藤本 康博

## 目次

第一章 序論	4
第一節 緒言	4
第二節 老化促進モデルマウス	4
第三節 老化のフリーラジカル説	6
第四節 栄養環境の老化に対する影響	7
第二章 実験方法	8
第一節 実験に用いた動物	8
第二節 生体試料の採取	8
第三節 実験法	8
第四節 統計学的解析	13
第五節 主な使用試薬	13
第六節 主な使用機器	13
第三章 SAMP8に見られる加齢変化	14
第一節 緒言	14
第二節 老化に伴う外観の変化	14
第三節 体重および食餌摂取量の変動	16
第四節 考察	18
第四章 血糖値の変動	19
第一節 緒言	19
第二節 血糖値の比較	20
第三節 血糖値の変動における加齢の影響	21
第四節 絶食時間に依存した血糖値の変動	22
第五節 考察	23
第五章 肝グリコーゲン量	24
第一節 緒言	24
第二節 肝グリコーゲン量の比較	24
第三節 考察	25
第六章 血漿インスリン濃度	26
第一節 緒言	26
第二節 血漿インスリン濃度の加齢変動	26
第三節 考察	27

第七章	グルコース代謝活性	28
第一節	緒言	28
第二節	グルコース代謝活性の加齢変動	29
第三節	ATP および Cr-P 量の加齢変動	30
第四章	ATP および Cr-P 量への絶食の影響	31
第五節	考察	32
第八章	総括	33
参考文献		35
謝辞		39

#### 略語一覧

ADP	adenosine 5'-diphosphate
ATP	adenosine 5'-triphosphate
BSA	bovine serum albumin
CB	cytochalasin B
Cr-P	creatine phosphate
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
G6PDH	glucose-6-phosphate dehydrogenase
NADP	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
PIPES	1,4-piperazinediethanesulfonic acid
SAM	senescence accelerated mouse
SAMP	senescence accelerated mouse-prone strain
SAMR	senescence accelerated mouse-resistant strain
SPF	specific pathogen-free
TCA	trichloroacetic acid
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane

## 第一章 序論

### 第一節 緒言

高齢化社会を迎え、老化に伴う生理的变化とその機構解明の必要性はますます高まりつつある。様々な視点から老化に関する研究が行われている一方で、老化現象が、緩やかに進行する生理変性であり、その速度、パターンは同一生物種であっても大きなばらつきがあるといった点から、多様な様相を示す老化現象に関して基本原理なるものを解明することは非常に困難であるのが実状である。しかし、今日までの多くの業績により、着実に老化機構解明への道のりは縮まってきている。特に近年、老化研究の進展に大きく貢献したのは、酵母、繊毛虫、線虫、ショウジョウバエ、そしてマウスといったモデル動物を用いた研究の急速な進歩にあると言えよう。

### 第二節 老化促進モデルマウス

老化促進モデルマウス(Senescence-Accelerated Mouse: SAM)は、1968年米国ジャクソン研究所より導入された AKR/J マウスをもとにして京都大学結核胸部疾患研究所病理学部門老化生物学分野(現 再生医科学研究所再生誘導研究分野)において開発された老化研究のためのモデル動物である。

導入された高頻度のリンパ腫を発生する AKR/J マウスを継代維持していたところ 1972-73年頃より比較的若齢期から活動性の低下、脱毛、被毛光沢の減退消失、被毛粗雑、眼周囲病変、白内障、脊椎前後弯増強、および寿命短縮を示す同腹仔があり、しかもこれら形質が次世代に確実に受け継がれていくことが報告された<sup>1)</sup>。1975年これらの徴候が最も著しい 5 腹が選ばれ、以後寿命や病理所見のデータに基づいて選択交配が開始された。このとき、それぞれに由来する集団を P(prone) 1, 2, 3, 4, 5 と呼称された。一方、対照として正常な老化を示すと考えられた 3 腹が選ばれ、それぞれに由来するものを R(resistant) 1, 2, 3 とされた。これら P 系および R 系の集団としての老化特性を老化度評点<sup>2)</sup>、成長曲線、生存率曲線、ゴムペルツ関数<sup>3)</sup>および弊死例の病理所見より P 系にみる老化徴候は正常な成長過程の終了後より現われ、急速かつ不可逆的に進展する促進老化であり、成長過程の途中から老化する早期老化とは区別されるべきものである(図1)。したがって 1981年 P 系は、老化促進モデルマウスと名付けられた。なお、この時点の注目すべき病理組織学的所見は、P 系および R 系の胸腺腫を含むリンパ腫の頻度が、各々 8.3%、16.3% と、極めて低値を示すことである。このことは AKR/J マウスとしての遺伝学的背景が既に失われていたことを強く示唆している<sup>4)</sup>。

その後、今日までに P4, 5 および R2, 3 は継代不能となったが、一方近交系として必要とされる 1) 兄妹交配が 20 世代を越え、少なくとも遺伝的モニタリングで均一性を示す、2) 老化病態としての形質を安定して発現するという条件を満足する数

系統が加えられた。なお、兄妹交配 20 世代を越えた系は、例えば SAMP1 のように表示されることとなった。したがって現時点でこれら系統を整理すると、SAMP1, P2, P3, P6, P7, P8, P9, P10, P11, SAMR1, R4, R5 となり、前者 9 系統、後者 3 系統を各々総称して SAMP 系および SAMR 系と呼ばれる。

また、SAMP 系は各系統が特徴的な老化諸病態を示すことが知られている(表1)。これまで老年性アミロイドーシス(SAMP1)<sup>4,5)</sup>、顎関節症(SAMP3)<sup>6)</sup>、老年性骨粗鬆症(SAMP6)<sup>7)</sup>、白内障(SAMP9)<sup>8)</sup>などが報告されている。本研究に用いた SAMP8 については加齢に伴い顕著な脳障害(学習・記憶障害)を自然発症することが知られ<sup>9-11)</sup>、さらに脳幹海綿状変性<sup>12)</sup>や PAS 陽性顆粒構造物の蓄積<sup>13)</sup>および  $\beta$ /A4 タンパク質様構造物の蓄積<sup>14)</sup>などの神経病理学的変化についての詳細な検討もなされており、老化モデルに加え、学習・記憶障害モデルとしての有用性も示されている。

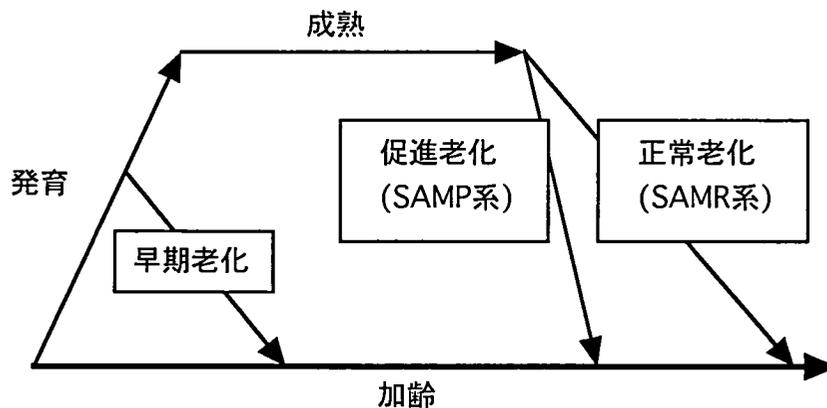


図1 SAMに見られる老化特性

SAMP系に見られる促進老化は正常な成熟後より開始し、その進行速度が速いと考えられている。一方、早期老化は正常な老化過程が寿命早期より進行するとされ、促進老化と早期老化は概念的に区別される。

表1 SAMの老化病態に伴う表現形質

系統	表現形質
SAMP1	老年性アミロイド症、免疫機能低下、難聴、腎臓萎縮、肺腫脹
SAMP2	老年性・持続性アミロイド症、免疫機能低下、腎臓萎縮、白内障
SAMP3	顎関節の変形性関節症
SAMP6	老年性骨粗鬆症
SAMP7	老年性アミロイド症、胸腺腫
SAMP8	学習・記憶障害、免疫機能低下、日内リズム障害、情動行動の異常
SAMP9	白内障、胸腺性リンパ腫、老年性アミロイド症
SAMP10	脳萎縮を伴う学習・記憶障害、日内リズム障害
SAMP11	老年性アミロイド症、腎臓萎縮
SAMR1	高齢に伴う非胸腺性リンパ腫、組織球肉腫、卵巣嚢胞
SAMR4	高齢に伴う非胸腺性リンパ腫、組織球肉腫
SAMR5	大腸炎

### 第三節 老化のフリーラジカル説

活性酸素は、老化、炎症、癌、虚血など多様な病態との関連性が着目されている。特に老化に関しては、1956年 Harman によるフリーラジカル説の提唱<sup>15)</sup>以来、好氣的生物において、活性酸素の発生とその酸化障害の蓄積が、細胞および生体の寿命を規定する重要な因子であると考えられている。

活性酸素とは、一般に酸素の1電子還元で生じるスーパーオキシド( $O_2^-$ )、これより派生する過酸化水素( $H_2O_2$ )、ヒドロキシラジカル( $HO\cdot$ ) および励起状態の酸素である1重項酸素( $^1O_2$ )を指すが、広義においては脂質ペルオキシラジカル( $LOO\cdot$ )、脂質ヒドロペルオキシド( $LOOH$ )、脂質アルコキシラジカル( $LO\cdot$ )なども入る。さらに、ペルオキシナイトライト( $ONOO\cdot$ )もその一つとして近年注目されている。

これら活性酸素種は、いずれも極めて化学的反応性に富むため、核酸、タンパク質、脂質など種々の生体成分の酸化修飾を惹き起こし、その酸化物の蓄積が加齢に伴い増加することが数多く報告されている<sup>16-18)</sup>。

## 第四節 栄養環境の老化に対する影響

寿命延長を可能とする術としてカロリー制限が挙げられる。1935年、McCayらがラットの発育成長期に低栄養条件による飼育によってその成長を遅延させて寿命を延長させた<sup>19)</sup>ことにはじまり、ラット尾の腱コラーゲンを老化の指標とした検討においても低栄養によって老化が遅延された<sup>20,21)</sup>ことや、間欠的な食餌と飢餓によって老化が抑制され、逆に無制限に摂取が可能である飼育環境が老化過程に対して不利である<sup>22)</sup>ことなどが報告されている。その後も低栄養による老化の遅延と栄養過剰による寿命の短縮に関する数多くの研究が行われ、現在では代謝率すなわち体重当たりの一日のカロリー摂取量が小さい動物種ほど長寿であることが広く知られている<sup>23)</sup>。

一方、線虫において *daf-2* という遺伝子の変異で、寿命が延長することが発見された<sup>24)</sup>。その後、この寿命に関係する *daf-2* 遺伝子の構造がヒトのインスリン受容体遺伝子に極めて類似していることが確認された<sup>25)</sup>。このことから、線虫においても変異により栄養の取込みが妨げられ、カロリー摂取を制限されたことが延命効果をもたらしたのではないかと議論されている。

これらの報告は、前述のフリーラジカル説に拠るところが大きい。すなわち、カロリー摂取をはじめ代謝の亢進がミトコンドリア呼吸鎖における活性酸素生成を増加させ老化に繋がると考えられている。そのため、老化機構を解明する糸口として、栄養環境、生体のエネルギー状態、そしてエネルギー代謝の変動が重要な因子であることが推察される。

そこで本研究では、SAMP系の substrain である SAMP8 において、糖代謝に関わる種々の生理現象を SAMR1 と比較し、SAMP系に見られる促進老化と糖代謝との関連性について検討を試みた。

## 第二章 実験方法

## 第一節 実験に用いた動物

1998年4月、武田ラビックス株式会社、阿部敏男先生より SAMP8/Ta および SAMR1TA の分与を受けた。以後、SPF 環境において、水および餌の自由摂取下で飼育を行い、種々の実験に供するため兄妹交配により継代維持した。

## 第二節 生体試料の採取

## 1) 尾静脈採血

エーテル麻酔下で、マウス尾の先端に傷をつけた後、尾の両端を走る静脈を先端方向へ摩るように押し進め、傷口から滲み出た血液をキャピラリーにて 20  $\mu$ l 吸い上げ採取した。

## 2) 各組織の採取

測定当日、頸椎脱臼により屠殺し、組織を摘出した。摘出した組織は速やかに氷上に移し以下の測定に用いた。

## 第三節 実験法

## 1) 血糖値測定

血糖値測定は、Guilbault のグルコースオキシダーゼ法<sup>26)</sup>に準じて行った。

## 1-1) 測定試料の調製

全血 20  $\mu$ l を H<sub>2</sub>O 340  $\mu$ l に溶血させた後、2 N HClO<sub>4</sub> 40  $\mu$ l 加え、遠心分離 (6,000×g、5 分間) した。上清を 200  $\mu$ l 分取し、1.2 N KOH 80  $\mu$ l を加えて中和し、氷上で 30 分間静置した。静置後 100  $\mu$ l をガラスチューブに取り、これを測定試料とした。

## 1-2) 測定

得られた測定試料に下記の反応溶液 2 ml を加えて、室温にて 40 分間静置した後、70% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 ml 加え、呈した赤色を 530 nm において吸光度を測定した。

## [反応溶液]

酵素溶液と呈色試薬を用時、容量比 100 : 1 で混和した。

## [酵素溶液 (pH 7.4)]

glucose oxidase                      2 units / ml

peroxidase	1.5 units / ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9.72 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.28 mM

## [呈色試薬]

o-dianisidine	9 mM
---------------	------

エタノールにて溶解した。

## 2) グリコーゲン量の測定

摘出した肝臓に 30% KOH 2 ml を加えて沸騰水浴中で 20 分間加熱し、組織を溶解した。これに H<sub>2</sub>O 3 ml と エタノール 4 ml を加え遠心(3,000×g、15 分間)し、グリコーゲンの沈澱を得た。上清を除いた後、沈澱を H<sub>2</sub>O 5 ml で懸濁し、硫酸アンスロン法<sup>27)</sup>を用いて定量した。すなわち、1 ml のグリコーゲン懸濁液に 2 ml の硫酸アンスロン試薬(0.2% anthrone / 36 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)を加えた後、沸騰水浴中で 10 分間加熱した。これを室温で放冷し、620 nm における吸光度を測定した。

## 3) 血中インスリン濃度測定

全血 20 μl を 下記の EDTA 溶液中に懸濁した後、遠心分離(1,500×g、15分間)を行い、上清 5 μl を分取し、これを測定試料とした。測定は、ELISA キット(森永生科学研究所)を用いて行った。すなわち、測定試料中のインスリン、モルモット抗インスリン抗体および抗モルモット酵素標識抗体の複合物を形成させ、基質であるオルトフェニレンジアミンを加え呈する赤橙色をプレートリーダー(主波長 405 nm、副波長 655 nm)にて吸光度を測定した。

## [EDTA 溶液]

EDTA	10 mM
NaCl	136 mM
KCl	2.68 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6.48 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.47 mM

## 4) グルコース代謝活性の測定

単離脳細胞の調製およびグルコース代謝活性の測定は、Tildon らの方法<sup>28)</sup>に準じて行った。

## 4-1) 単離脳細胞の調製

摘出した脳を細切後、下記のトリプシン溶液 10 ml を加えて、37℃ で 20 分間インキュベートした。これを遠心分離(50×g、2 分間)した後、得られた沈澱に下記の Hanks' PIPES 溶液 10 ml を加えて懸濁した。これを、10 分間静置し、上清と沈澱を分画後、沈澱に再び同様の操作を行い、得られた上清をレンズペーパーで濾過し、その濾液を遠心分離(100×g、5 分間)した。この沈澱に Hanks' PIPES 溶液を加えて懸濁して、これを細胞懸濁液とした。また、この懸濁液中の細胞の生存率

を、トリパンプルーを用いた色素排除試験により検討したところ、得られた細胞の95%以上が無傷であることが確認された(データ不掲載)。

[トリプシン溶液]

Trypsin	0.2%
NaCl	136 mM
KCl	5.35 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.425 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.441 mM
PIPES	8.0 mM

pH は、NaOH にて 7.3 に調製した。

[Hanks' PIPES 溶液]

NaCl	136 mM
KCl	5.35 mM
MgSO <sub>4</sub>	0.812 mM
CaCl <sub>2</sub>	1.28 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.425 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.441 mM
PIPES	8.0 mM

pH は、NaOH にて 7.3 に調製した。

4-2) グルコース代謝活性の測定

得られた細胞懸濁液を 37℃ で 2 分間プレインキュベートした後、1 mM [6-<sup>14</sup>C]グルコース(3.7 kBq / μmol) を含む Hanks' PIPES 溶液を添加し、密閉した容器中で反応を開始させた。この反応液を 37℃ で 60 分間インキュベートした後、10% TCA 2 ml を加え、さらに 30 分間インキュベートした。この操作により反応を停止させるとともに、[6-<sup>14</sup>C]グルコースから生成し液中に溶存する <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> が気相に放出される。この <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> を SOLVABLE™ を染み込ませた濾紙に捕集し、この濾紙の放射活性を測定した。このとき、細胞内へのグルコースの膜輸送を介した特異的活性を求めるため、促進性糖輸送担体の阻害剤である CB(最終濃度20 μM) を添加し、同様に測定したものを差し引き、グルコース代謝活性とした。

なお、本測定に際して、代謝活性と細胞懸濁液中のタンパク質量との相関について検討したところ、CB 非存在下ではタンパク質量に依存した直線的な活性の上昇が認められた(図2)。また、この代謝活性は CB の添加により抑えられ、グルコースの膜輸送を介したものであることが示された。

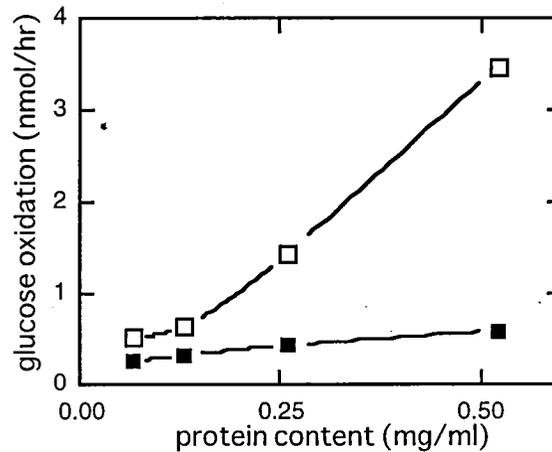


図2 グルコース代謝活性におけるタンパク量依存性

単一の個体より得た細胞懸濁液を段階希釈し、各々について20 μM CB 存在下(■)、非存在下(□)におけるグルコース代謝活性を測定した。

#### 5) ATP および Cr-P 量の測定

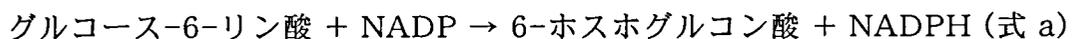
ATP および Cr-P 量の測定は、Lowry らの方法<sup>29)</sup>に準じて行った。

##### 5-1) 測定試料の調製

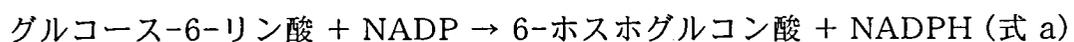
摘出した組織に湿重量の 5 容量の 1 mM EDTA, 0.5 M HClO<sub>4</sub> 溶液を加え、氷水中でホモジナイズした。これをガラスチューブに取り、遠心分離(1,000×g、5 分間)した。上清を 300 μl 分取し、30% KOH 24 μl を加えて中和し、直ちに氷上で冷却した後、遠心分離(300×g、5 分間)を行い、上清 100 μl をガラスチューブに取り測定試料とした。

##### 5-2) ATP 量の測定

得られた測定試料に下記の反応溶液 2.8 ml を加え、全量 2.9 ml とした。



上の反応における NADPH の発光を測定するために、この反応を触媒するグルコース-6-リン酸脱水素酵素懸濁液を調製し、その 30 μl を上記の試料溶液に加え、30℃ で 10 分間振盪し、反応させた後、蛍光光度計(励起 350 nm、発光 450 nm)で蛍光光度(A)を測定した。



次に上の 2 段階反応において生成する NADPH の発光を測定するために、(式 b)の反応を触媒するヘキソキナーゼ懸濁液を調製し、その 30 μl を加え、30℃ で 10 分間振盪し、反応させて同様に、蛍光光度(B)を測定した。組織内 ATP 量は蛍光光度(B)と蛍光光度(A)の差により得た。

## [反応溶液]

Tris	100 mM
glucose	1 mM
MgCl <sub>2</sub>	2.5 mM
NADP	50 μM
BSA	0.02%
ADP	100 μM

pH は、HCl にて 7.5 に調製した。

## [グルコース6リン酸脱水素酵素懸濁液]

G6PDH	60 units / ml
Tris	100 mM

pH は、HCl にて 7.5 に調製した。

## [ヘキソキナーゼ懸濁液]

hexokinase	150 units / ml
Tris	100 mM

pH は、HCl にて 7.5 に調製した。

## 5-3) Cr-P 量の測定

グルコース-6-リン酸 + NADP → 6-ホスホグルコン酸 + NADPH (式 a)

ATP + グルコース → ADP + グルコース-6-リン酸 (式 b)

クレアチンリン酸 + ADP → クレアチン + ATP (式 c)

前項に引き続き、上の 3 段階反応において生成する NADPH の発光を測定するために、さらに (式 c) の触媒酵素であるクレアチンキナーゼの懸濁溶液を調製し、この 30 μl を加え、30℃ で 30 分間振盪し、反応させて同様に、蛍光光度(C) を測定した。組織内 Cr-P 量は蛍光光度(C) と蛍光光度(B) の差により得た。

## [クレアチンキナーゼ懸濁溶液]

creatine kinase	750 units / ml
Tris	100 mM

pH は、HCl にて 7.5 に調製した。

## 6) タンパク質定量

Lowry らの方法<sup>30)</sup>に準じて行った。なお、標準物質として BSA を用いた。

## 第四節 統計学的解析

上述のすべての実験における結果の統計学的な検討は Student's  $t$  検定により行った。検討の結果、2 群間の差について  $p < 0.05$  である場合について有意差があるとした。

## 第五節 主な使用試薬

anthrone	ナカライテスク
ATP	SIGMA
BSA	SIGMA
CB	SIGMA
[6- <sup>14</sup> C]glucose	American Radiolabeled Chemicals
creatine kinase	オリエンタル酵母
Cr-P	SIGMA
EDTA	和光純薬工業
glucose	ナカライテスク
glucose oxidase	BOEHRINGER MANNHEIM
G6PDH	オリエンタル酵母
hexokinase	オリエンタル酵母
o-dianisidine	和光純薬工業
peroxidase	BOEHRINGER MANNHEIM
SOLVABLE™	Packard
trypsin	和光純薬工業

他の試薬は市販の特級を用いた。

## 第六節 主な使用機器

液体シンチレーションカウンター	Aloka
吸光光度計(Ubest-30)	日本分光工業
卓上遠心機(KN-70)	久保田
分光蛍光光度計(RF-5000)	島津製作所
マイクロプレートリーダー(Model 450)	BIORAD
冷却遠心機(MRX-152)	TOMY SEIKO

## 第三章 SAMP8 に見られる加齢変化

### 第一節 緒言

SAMP8 は促進老化の兆候を示すことが知られている。本章では、実際に広島大学医学部附属動物実験施設において SPF の環境下で継代維持されている SAMP8 がその形質を保持しているものか否かを確認するため、老化に伴う外観の変化について対照マウスである SAMR1 と比較した。加えて、体重および食餌摂取量の測定を行い加齢による変動について検討した。

### 第二節 老化に伴う外観の変化

図3A に 50 週齢の SAMP8 および SAMR1 の外観を示す。SAMP8 において、脱毛、被毛光沢の減退、被毛粗雑、さらには眼瞼皮膚の発赤が観察され、このマウスにおける典型的な老化兆候が認められた。一方、SAMR1 においてはこれらの現象は認められなかった。また、10 週齢の SAM では両系統とも、老化兆候と考えられる外観的变化が認められなかった(図3B)。このことから、50 週齢に見られた現象は、正常な成長の後、急速に進展する老化過程で現れるものであることが推察された。

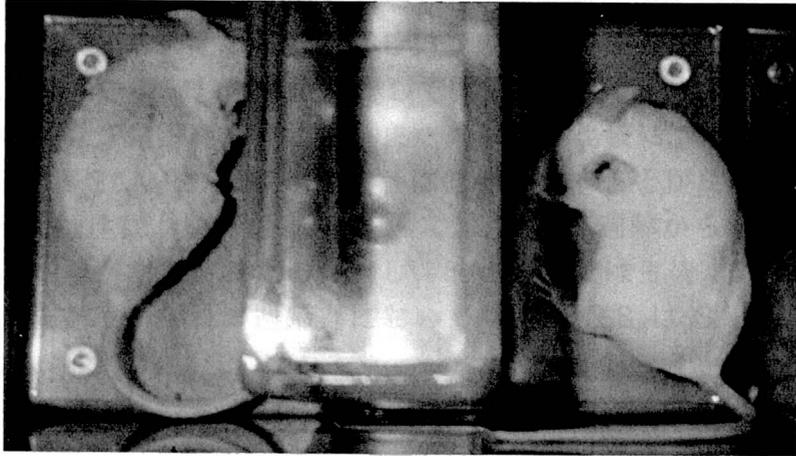


図3A 50週齢 SAMP8 および SAMR1 の外観  
SAMP8(左)、SAMR1(右)

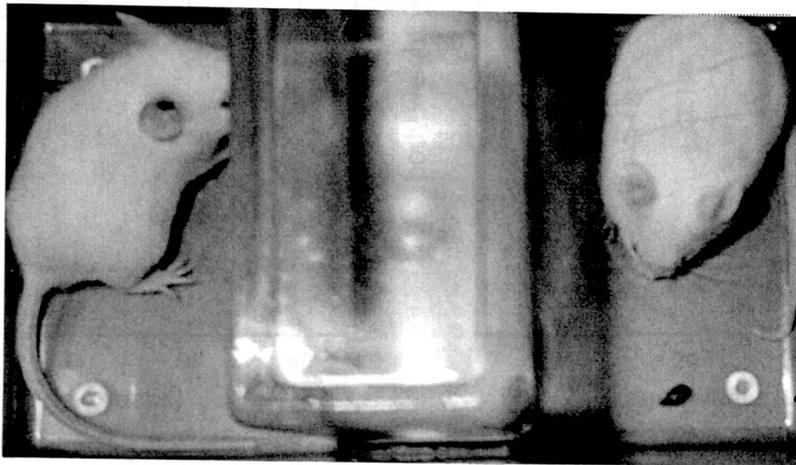


図3B 10週齢 SAMP8 および SAMR1 の外観  
SAMP8(左)、SAMR1(右)

## 第三節 体重および食餌摂取量の変動

各週齢(5, 10, 15, 20, 30, 40 週齢)の SAMP8 および SAMR1 における体重の測定結果を図4 に表す。図4A に示すように雄性マウスにおいては、SAMP8 では生後 20 週齢までは体重の増加傾向が見られるが、20 週齢と 40 週齢との比較において有意差は認められず、この間の体重の著しい変動はないことが示された。これに対し SAMR1 では生後 20 週齢以降も依然として体重の増加が見られ 20 週齢と 40 週齢との比較において有意差が認められた。また両系統の比較については、生後 10 週齢以降の SAMP8 は SAMR1 と較べて有意に低値を示すことが認められた。一方、図4B に示すように雌性においては SAMP8 では生後 5 週齢から 10 週齢にかけてのみ、有意な体重増加が認められたのに対し、SAMR1 では生後 30 週齢までその傾向が認められた。また、いずれの週齢期においても SAMP8 は SAMR1 と比較し有意に低値を示した。

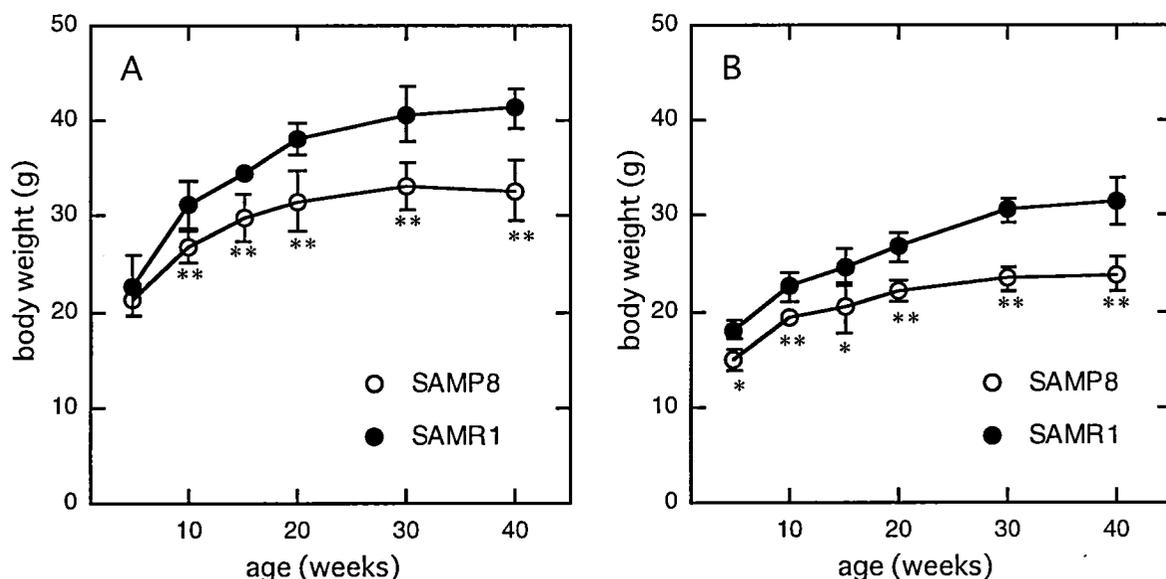


図4: 加齢に伴う体重変動

各週齢の SAMP8 および SAMR1 の体重の測定結果を、雄性(A)、雌性(B)の別で示した。平均値±標準偏差(n=3-10)、\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ ; 対応する SAMR1 の値と比較した。

次に、各週齢(5, 10, 20 週齢)における食餌摂取量について検討した。その結果、図5に示すように、いずれの週齢期においても両系統の間で有意差は認められなかった。また、加齢に伴う著しい変動も認められなかった。

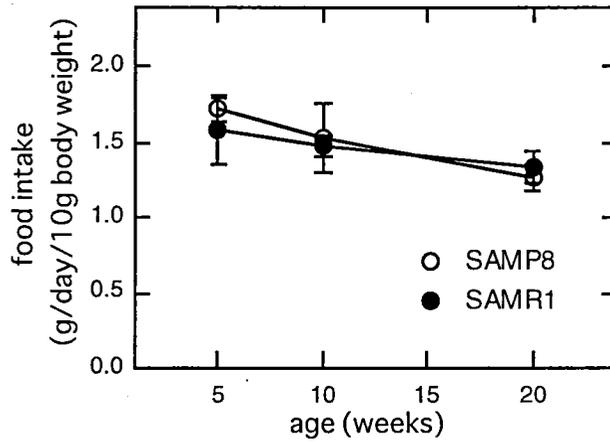


図5 食餌摂取量の加齢変動

各週齢の SAMP8 および SAMR1 の食餌摂取量を比較した。食餌摂取量は、給餌量から3日後の残余餌量を差し引いて算出した。平均値±標準偏差(n=3-4)。

## 第四節 考察

本章では、まず SAM の外観の変化について検討した。その結果、SAMP8 に見られた加齢に伴う外観の変化は、これまで報告されてきた SAM の特性<sup>2)</sup>に一致するものであり、当研究室において維持している SAM はその形質を保持したまま継代されていることが示唆された。

続いて、体重および摂食量の変動について検討し、以下の結果を得た。

- 1) SAMP8 は SAMR1 と比較し、より早期に体重の増加が見られなくなる。
- 2) SAMP8 の体重は雄性では 10 週齢以降、雌性では 5 週齢以降より、SAMR1 と較べて有意に低値を示す。
- 3) 両系統間において食餌摂取量には違いはない。

したがって、SAMP8 は SAMR1 と同程度の食餌を摂取しているにも拘わらず、それに伴う体重増加は SAMR1 を下回っており、摂取された食餌が剰余エネルギー源として脂肪組織などへ貯蔵されていないことが示唆された。また、自発行動量においては SAMP8 は SAMR1 に比較して低下していることが報告<sup>3)</sup>されており、SAMP8 における食餌によるエネルギーが行動により消費されるのではないと推察される。これらのことから、SAMP8 は摂取エネルギー、貯蔵エネルギー、運動消費エネルギーの不均衡といったエネルギー代謝の特異性を有することが示唆された。

## 第四章 血糖値の変動

### 第一節 緒言

老化促進モデルマウス SAMP 系は、正常な成長過程の後、急速かつ不可逆的に進行する老化、すなわち促進老化が起こり種々の老化変性あるいは老化病態が観察される<sup>1-11)</sup>。特に SAMP8 については、脳幹海綿状変性<sup>12)</sup>、PAS 陽性顆粒構造物や  $\beta$ /A4 蛋白質様構造物の蓄積<sup>13,14)</sup>さらに前脳アセチルコリンニューロンの減少やアセチルコリン合成酵素の活性が低下する<sup>15)</sup>ことなど、神経化学的、行動薬理的知見が多数報告されている。しかしながら、これらはいずれも SAMP8 の示す学習・記憶障害との関連に帰結しており、SAMP 系本来の主徴である促進老化の機構への追究を目的とした、生理的、生化学的変化の解明には至っていない。また、第三章では SAMP8 において摂取、貯蔵、運動消費間のエネルギーの不均衡が示された。

そこで本章では、生体にとって主要なエネルギー源とされるグルコースに関して、その摂取および貯蔵、消費の中間過程にある血中グルコースに着目し、その変動について検討した。

## 第二節 血糖値の比較

生後 10 週齢の SAMP8 および SAMR1 において、自由摂食時および 6 時間絶食後の血糖値を測定した。ここで自由摂食時とは、食餌、飲水ともに自由摂取の環境下において、12:00 に採血したことを指す。また 6 時間絶食後とは、同環境下において、12:00 より給水は継続して行い、給餌のみを除いて、18:00 に採血したことを指す。

図6 に示すように、自由摂食下において両系統間における血糖値の差異は認められなかった。さらに生後 5 週齢および 20 週齢についても検討を行ったが、両系統間における有意な差は認められなかった(データ不掲載)。また、このとき同系統における加齢に伴う変動も認められなかった。

次に、6 時間絶食下における血糖値を比較すると、SAMP8 の血糖値は SAMR1 と較べて有意に低値を示した。

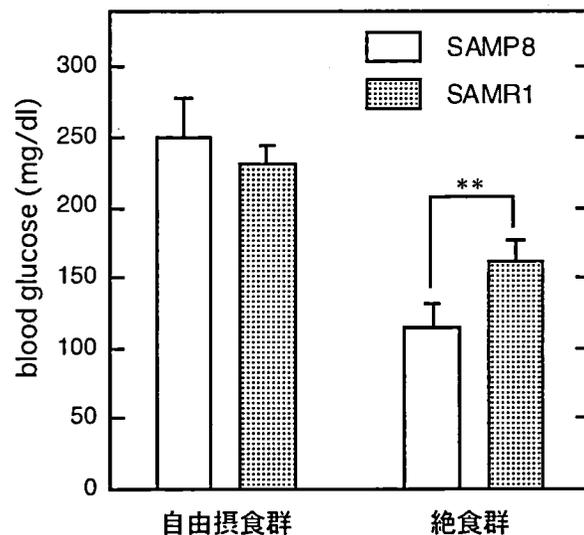


図6 SAMP8 および SAMR1 における血糖値の比較

10 週齢の SAMP8 および SAMR1 において、自由摂食時および 6 時間絶食後における血糖値を比較した。平均値±標準偏差(n=4)、\*\*p < 0.01。

## 第三節 血糖値の変動における加齢の影響

生後 10 週齢 SAMP8 で認められた、絶食時血糖値の急激な低下現象の出現時期を検討するため、各週齢 (4, 6, 10, 20, 25 週齢) の 6 時間絶食時の血糖値を測定した。その結果、図7 のような変動を示した。生後 5 週齢前後では両系統間に血糖値の差は認められなかった。その後 10 週齢にかけて 両系統とも血糖値の低下が見られるが、SAMP8 はより急激に減少しており 10 週齢期の血糖値は SAMR1 と比較し有意に低値を示した。さらに、両系統の値は 10 週齢以降、大きな変動は見られず 20 および 25 週齢期においても有意差が認められた。

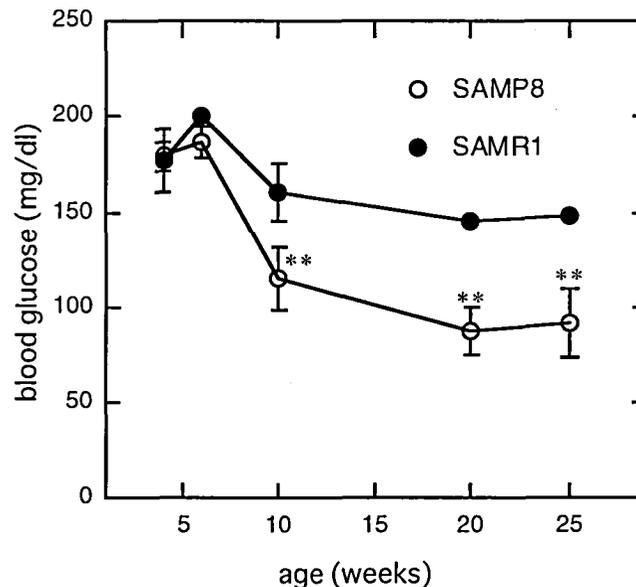


図7 加齢に伴う絶食時血糖値の変動

各週齢(4, 6, 10, 20, 25 週齢)の SAMP8 および SAMR1 において、6 時間絶食後における血糖値を測定した。平均値±標準偏差(n=3-6)、\*\*p < 0.01; 対応する SAMR1 の値と比較した。

## 第四節 絶食時間に依存した血糖値の変動

これまでに認められた両系統間における血糖値の相違は、絶食期間が 6 時間という比較的短時間に観察された。そこで、さらに長期間の絶食条件下における血糖値の変動を検討するため、生後 10 週齢の SAMP8 および SAMR1 において絶食時間の影響を調べた。その結果、図8 に示すように SAMR1 では絶食開始から 12 時間後まで血糖値の低下が見られた。これに対し SAMP8 では 6 時間までの間に、より急速な低下が認められた。また、両系統の血糖値はともに低下の後、一定値に留まり、以降 24 時間後までその値が保たれていることが明らかとなった。これらのことから、図7 で認められた両系統間における血糖値の差異は絶食開始から 6 時間までの限られた期間においてのみ見られることが示されるとともに、その間の血糖値の低下速度の相違に起因していることが推察された。

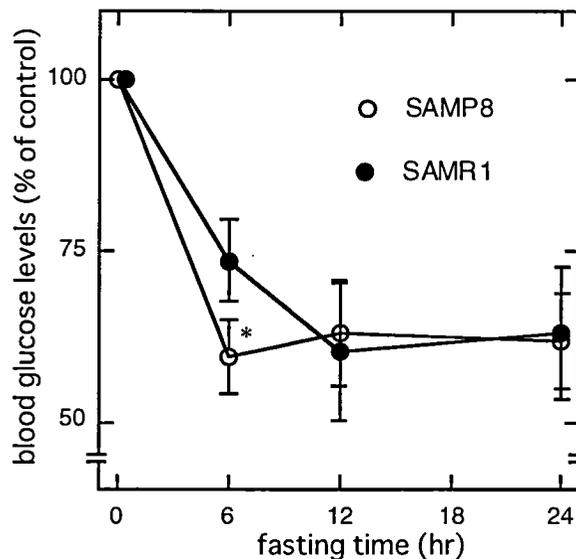


図8 血糖値の絶食時間依存的変動

10 週齢の SAMP8 および SAMR1 において、12:00 より 0, 6, 12, 24 時間絶食後の血糖値を測定した。各個体において絶食時間 0 時間における値(SAMP8;  $213.8 \pm 12.3$  mg/dl, SAMR1;  $208.1 \pm 26.8$  mg/dl)を 100% としたときの比率を求め、その平均値  $\pm$  標準偏差 ( $n=4$ ) を示した。\* $p < 0.05$ ; 対応する SAMR1 の値と比較した。

## 第五節 考察

本章では、血糖値を指標として種々の検討を行った。その結果、生後 10 週齢以降の SAMP8 において、

- 1) 自由摂食時の血糖値は対照の SAMR1 と較べて有意な差は認められない
- 2) 6 時間絶食時の血糖値は SAMR1 と較べて有意に低値を示す
- 3) 絶食条件下における SAMR1 との血糖値の差異は、絶食期間 6 時間までの血糖値の低下速度の違いによる可能性が高く、さらに長期間の絶食条件下においては両系統の血糖値はともに一定値を維持する

ことが示された。

1) については、前章において示した摂食量にも両系統間で有意な差が認められなかったことと一致しており、腸管におけるグルコースの吸収過程は両系統ともに正常であると考えられる。グルコースの他に主として食物から摂取されて血中に存在するトリグリセリドおよび栄養状態の指標とされる総タンパクやアルブミンについて、自由摂食下の血中濃度に有意差が認められないとの報告<sup>31)</sup>から、腸管における糖、脂肪、アミノ酸の吸収は両系統において同程度であると推察される。従って、先に述べたエネルギーの摂取、貯蔵、運動消費の不均衡の要因は単なる吸収障害によるものとは異なると考えられた。

2) における 6 時間の絶食は前述のとおり、12:00 から 18:00 までに行ったものである。SAM の明暗サイクルにおける自発行動量については、SAMR1 では他の齧歯類と同様に暗期に高く明期に低い典型的な日内リズムを示すことが知られている。一方、SAMP8 はリズム障害を発症し、明期直後の自発行動量が高値を示すとされているものの、大きくは SAMR1 と同じくその自発運動量は暗期に高く明期に低いことが認められている<sup>32)</sup>。即ち、上記絶食期間は両系統ともに非活動期である時期にあたり、自由摂食条件下であっても、摂食行動は抑えられていると推察される。したがって、ここで見られた両系統間における血糖値の相違は、拘束的な絶食条件に拠らなくとも、通常の日内活動においても現れる可能性が高いと考えられた。

3) に記したように絶食時間依存的な血糖値の変動は、両系統とも低下時期を過ぎると一定値に保持されていた。2) の考察に関連して明期、暗期の別を考慮すると、12 時間を越える絶食期間は活動期である暗期と重なるため、拘束的な絶食に相当する。このような条件下にも拘わらず、絶食開始から 24 時間まで生命活動に耐え得る血糖値を維持していることから、通常絶食下において生体内で起こる代謝系の変化、即ち、グルコースから脂肪酸へのエネルギー源の代替が、両系統とも正常に行われていると考えられた。

以上のことから SAMP8 における血糖値の急速な低下を促す原因は、食餌後から空腹期を経る過程にある可能性が推察された。

なお、これらの考察は促進老化を示す SAMP8 が有す特異性がもたらすものとの考えに基づいており、SAMP8 における変動について特に着目している。しかし、現在のところ報告はないが SAMR1 が糖尿病などの疾患により短時間の絶食下では血糖値に変化が見られないことも考えられる。この問題については第六章で議論する。

## 第五章 肝グリコーゲン量

### 第一節 緒言

摂取したグルコースは小腸で吸収された後、門脈を経て肝に至る。他の単糖類も同様に肝に移行しグルコースに変換される。肝臓に集積したグルコースは、その大部分がグリコーゲン合成にあてられる。食物摂取直後の吸収期から空腹期にかけて、生体内の中間代謝は著しい変容を遂げる。この間、上記過程により貯蔵された肝グリコーゲンは空腹期のグルコース供給源として第一に利用され血糖値の維持に働く。

そこで本章では、前章で認められた絶食時における両系統間の血糖値の相違が、肝グリコーゲンの分解過程の違いによるものかを確認すべく、絶食による肝グリコーゲン量の変化について検討した。

### 第二節 肝グリコーゲン量の比較

生後 10 週齢の SAMP8 および SAMR1 を用いて、自由摂食時および 6 時間絶食後の肝グリコーゲン量を測定した。その結果、図9 に示すように、自由摂食時、6 時間絶食時、いずれにおいても両系統間に有意差は認められなかった。またこのとき両系統とも 6 時間の絶食により肝グリコーゲンを約 95% 消失していることが示された。

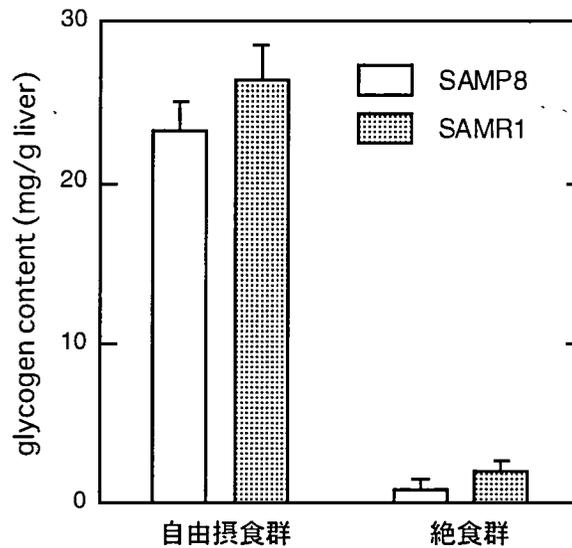


図9 肝グリコーゲン量の比較

10週齢 SAMP8 および SAMR1 において、自由摂食時および6時間絶食後における肝グリコーゲン量を測定した。平均値±標準偏差(n=4)。

### 第三節 考察

本章では、SAM 肝臓におけるグリコーゲン量の絶食による変化を比較検討したが、自由摂食時、6時間絶食時ともに両系統間に差異は認められなかった。従って、肝グリコーゲンの分解によるグルコース供給量には両系統間で相違ないことが推察された。また、絶食によるグリコーゲンの消失量に着目すると、齧歯類では明期間にその75%以上を失うという報告<sup>34)</sup>とほぼ一致する結果であると考えられる。

## 第六章 血漿インスリン濃度

## 第一節 緒言

インスリンは、筋肉や脂肪組織において細胞内へのグルコース輸送を促進し、摂食直後一過的に上昇する血糖値を低下させる。

そこで本章では、絶食時における両系統間の血糖値の相違が、インスリンの作用に基づくものであるかを確認すべく、その血中濃度を比較検討した。

## 第二節 血漿インスリン濃度の加齢変動

各週齢(5, 10, 20 週齢)の SAMP8 および SAMR1 において、血漿インスリン濃度を測定した。図10 に示すように、SAMP8 では 20 週齢において 10 週齢に比較して減少傾向 ( $p < 0.1$ ) が見られた。一方、SAMR1 では 20 週齢において 5 週齢に比較して減少傾向 ( $p < 0.07$ ) にあった。また、両系統間の比較については、10 週齢においてのみ SAMP8 は SAMR1 に比べ血漿インスリン濃度が高い傾向 ( $p < 0.09$ ) にあった。しかしながら、いずれの比較においても顕著な差異は認められなかった。

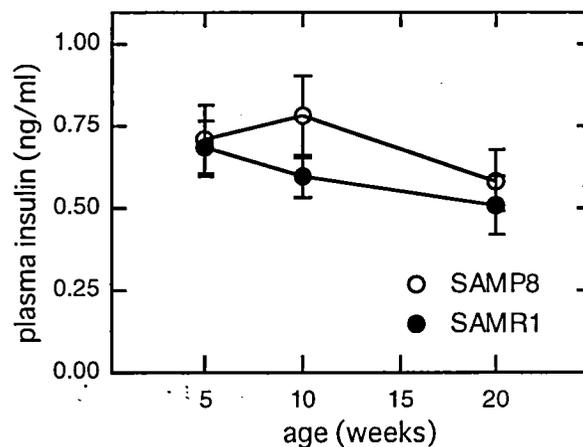


図10 加齢に伴う血漿インスリン濃度の変動

各週齢(5, 10, 20 週齢)の SAMP8 および SAMR1 において、血漿インスリン濃度を測定した。平均値±標準偏差(n=3-4)。

## 第三節 考察

本章では、各週齢の SAM における血漿インスリン濃度を測定し、その加齢変動および系統間の比較について検討したが、有意な変化は認められなかった。さらに、インスリン静注による血糖値の変動や脂肪組織におけるインスリン刺激下の糖取込み活性の検討においても両系統間における相違は認められず(当研究室 鈴木沙織、未発表データ)、個体レベル、細胞レベル、いずれにおいても両系統間におけるインスリン感受性に差異はないことが示唆された。

また、第四章で認められた両系統間における絶食後の血糖値の相違については、SAMP8 の急激な血糖値低下を注視する一方で、SAMR1 が糖尿病を発症している可能性も考慮した。しかし、過食、高インスリン血症、インスリン抵抗性などを特徴とし、糖尿病のモデル動物として繁用されている *ob/ob* マウスや *A<sup>y</sup>* マウス<sup>35)</sup> などとは異なり、SAMR1 はこれまでの検討結果より、摂食量、血漿インスリン濃度、さらにインスリン感受性についても SAMP8 との比較において有意差は認められなかった。したがって、上記の可能性は極めて低いものと考えられた。

これらのことから、先の絶食後血糖値の相違は SAMP8 における糖代謝の特異性を示すものであると改めて推察された。加えて、この相違はインスリン量およびインスリン感受性の差異によるものではないことが示唆されるとともに、SAMP8 ではインスリンに依存しないグルコース取込みの増大により、血糖値の急速な低下が惹き起こされている可能性が推察された。

## 第七章 グルコース代謝活性

### 第一節 緒言

インスリンに非感受性組織として、脳、赤血球、腎髄質などが挙げられる。このうち脳は、他の組織のようにエネルギー源を糖質から脂質へといった代替調節を行わないため、空腹期において脳のグルコース消費量は全体に占める割合が相対的に増加し、個体における消費量の過半に及ぶことが知られている。そのため、脳におけるグルコース代謝活性の多寡は、血糖値の変動に大きく影響することが推察される。一方、第一章に述べたように代謝過程で生じる活性酸素と老化との関連性が注目されるなか、活性酸素産生の場合とされる電子伝達系の最終代謝産物である ATP の量的変化については、興味深いところである。また、個体のエネルギー状態を知る上で、ATP 欠乏時にその補償に働く Cr-P も重要な指標と言える。

そこで本章では、脳におけるグルコースの消費量を両系統間で比較することを目的とし、単離脳細胞を調製してグルコース代謝活性を検討した。加えて、脳内の ATP 量および Cr-P 量の測定を行い、同様に比較検討した。

## 第二節 グルコース代謝活性の加齢変動

各週齢(5, 10, 20 週齢)の SAMP8 および SAMR1 において、単離脳細胞を調製しグルコース代謝活性を検討した。図11 に示すように、生後 5 週齢では両系統間に差異は認められなかったが、10 および 20 週齢において SAMP8 は SAMR1 と比較し、有意に高値を示した。また、両系統とも 5 から 10 週齢期にかけてグルコース代謝活性の増大が見られるが、SAMP8 では、その変動がより顕著であった。

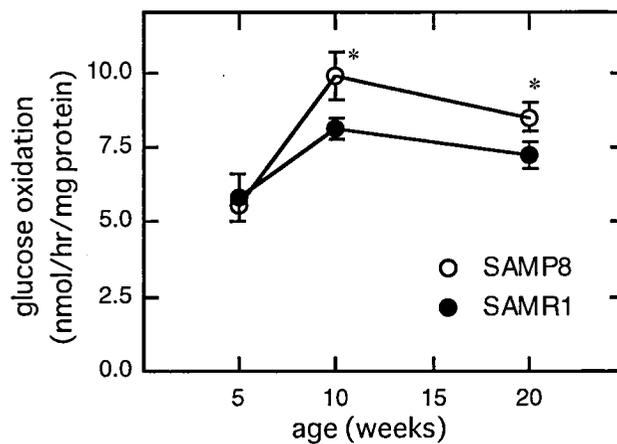


図11 加齢に伴うグルコース代謝活性の変動

各週齢(5, 10, 20 週齢)の SAMP8 および SAMR1 より、単離脳細胞を調製しグルコース代謝活性を測定した。平均値±標準偏差(n=3)、\*p < 0.05; 対応する SAMR1 の値と比較した。

## 第三節 ATP および Cr-P 量の加齢変動

各週齢(5, 10, 20 週齢)の SAMP8 および SAMR1 において、脳内の ATP 量および Cr-P 量を測定した。その結果、図12A に示すように、ATP 量は SAMP8 では 5 週齢から 10 週齢にかけて有意な増加が認められた。また、いずれの週齢期においても両系統間には、有意差は認められなかった。

一方、図12B に示すように Cr-P 量も ATP の場合と同様 SAMP8 では 5 から 10 週齢にかけて有意に増加していた。また、この場合は 20 週齢においてのみ、両系統間には有意差が認められた。

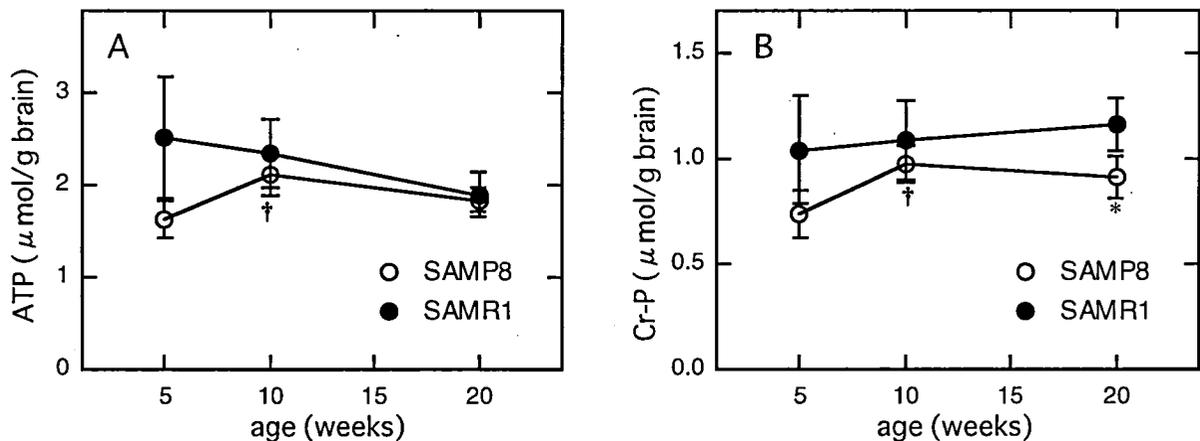


図12 脳における ATP および Cr-P 量の加齢変動

各週齢(5, 10, 20 週齢)の SAMP8 および SAMR1 脳における ATP(A) および Cr-P(B) 量を測定した。平均値±標準偏差(n=3-4)、\*p < 0.05; 対応する SAMR1 の値と比較、†p < 0.05; 5 週齢 SAMP8 の値と比較した。

## 第四節 ATP および Cr-P 量への絶食の影響

絶食による影響を検討するため、10 週齢の SAMP8 および SAMR1 において 24 時間絶食後の脳における ATP および Cr-P 量を測定した。その結果、両系統ともに ATP(図13A) および Cr-P(図13B) 量には絶食による有意な変動は認められなかった。

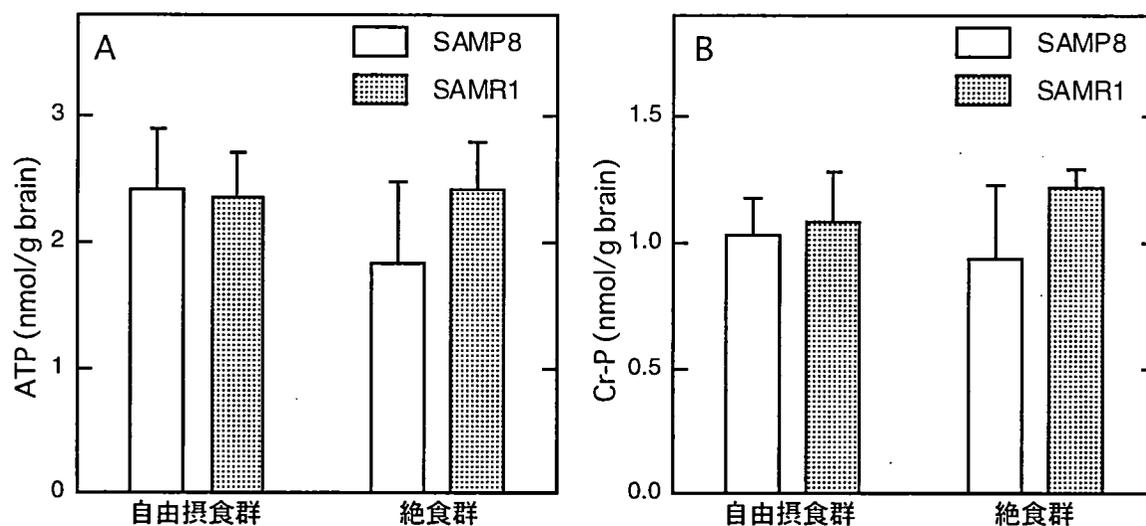


図13 ATP および Cr-P 量への絶食の影響

10 週齢 SAMP8 および SAMR1 において、自由摂食時および 24 時間絶食後における ATP(A) および Cr-P(B) 量を測定した。平均値±標準偏差(n=3)。

## 第五節 考察

本章では、まず単離脳細胞におけるグルコース代謝活性についてその加齢変動と両系統の比較を行った。その結果、

- 1) グルコース代謝活性は、10 週齢以降の SAMP8 において対照の SAMR1 と比べて有意に高値を示すこと
- 2) 両系統とも 5 週齢から 10 週齢にかけてグルコース代謝活性の増大を示すが、SAMP8 においては、その変化がより顕著であること

が認められた。

これらの結果から、両系統におけるグルコース代謝活性の加齢に伴う変化と、図7に示した血糖値の変動とはよく近似しており、これら両者は因果関係にあることが推察された。つまり、SAMP8 においてはグルコース代謝活性の亢進により空腹期の急激な血糖値低下が惹き起こされている可能性が考えられた。

また、このように両系統間においてグルコース代謝活性に相違が認められたことに関連し、グルコース代謝の最終産物である ATP 量、およびその補償に働く Cr-P 量について検討した結果、

- 3) SAMP8 においては 5 から 10 週齢にかけて ATP および Cr-P 量はともに有意に増加したこと
- 4) 脳内の ATP および Cr-P 量には、両系統において相違ないこと
- 5) ATP および Cr-P 量に対する絶食の影響はないこと

が、認められた。

3) については、血糖値の低下、グルコース代謝活性の増大、さらに ATP 量の増加の時期が一致していることから、これら生理変化の連動性かつその変動期にあたる 5 から 10 週齢期の重要性を示すものと考えられる。

4) については、10 週齢以降の SAMP8 において SAMR1 に比較しグルコース代謝の亢進が観察されたことから、これに伴う ATP 産生の増大が予想されたが、両系統間において相違は認められなかった。このことから、10 週齢以降の SAMP8 においては、a) ATP 産生もまた亢進しているものの、その利用の増加あるいは過度の分解により蓄積量が減少している可能性、または b) ATP 産生過程そのものに障害を持つ可能性が推察される。特に b) に関しては、SAMP8 脳において電子伝達系の複合体Ⅲの有意な活性低下を示唆する報告<sup>36)</sup>や肝において respiratory control ratio の減少から、呼吸の uncoupling を推察する報告<sup>37)</sup>もあり、SAMP8 では ATP 産生機構が機能不全を来している可能性が高いと考えられる。

また 5) については、上記の推察の下、ATP 産生効率に劣る SAMP8 において、長時間の絶食による ATP および Cr-P の量的変化に及ぼす影響の有無を検討したが、変化は認められなかった。

## 第八章 総括

本研究では、SAM の substrain である SAMP8 および SAMR1 において、糖代謝に関わる種々の生理現象における、両系統の比較および加齢に伴う変化について検討した。その結果および考察を以下にまとめる。

- 1) SAMP8 は SAMR1 と比較し食餌摂取量に差異がないにも拘わらず、体重増加はより早期から見られなくなり、SAMR1 を有意に下回った。一方、両系統とも糖質吸収過程に関わる異常所見は認められておらず、上記結果は SAMP8 におけるエネルギー代謝の特異性を示すものと推察された(第三章)。
- 2) SAMP8 は比較的短時間の絶食により、急速な血糖値の低下が認められ SAMR1 に較べ有意に低値を示した。さらに、この現象は生後 10 週齢以降においては観察されたが、5 週齢前後の若齢期においては認められなかった(第四章)。
- 3) 両系統間において、肝グリコーゲンの変化量および血漿インスリン濃度に差異は認められず、2) の現象は肝グリコーゲンからのグルコース供給量やインスリンの作用に基づく相違として説明することはできないと考えられた(第五章、第六章)。
- 4) SAMP8 脳における単離細胞のグルコース代謝活性は、SAMR1 と較べて有意に増大していた。一方、脳内の ATP 量には両系統間において相違なかったことから、SAMP8 の ATP 産生および消費過程における特異的変化の可能性が推察された。また、SAMP8 におけるグルコース代謝活性や ATP および Cr-P 量の加齢に伴う変動に着目すると、これらはいずれも 5 から 10 週齢にかけて有意に増大していた(第七章)。

加えて、当研究室では既に SAMP8 大脳皮質における酸化ストレスの増大を確認している。特に 5 から 10 週齢にかけての SAMP8 における過酸化脂質の増加<sup>38)</sup>や活性酸素の酸化障害により不活化するグルタミンシンターゼの活性低下は顕著であった。すなわち、SAMP8 における酸化ストレスの増大と本研究により得られた糖代謝の変動は同一期に起こっており、これらの関連性が高いことを示唆するものと考えられる。

以上のことから推考される SAMP8 における促進老化の発症機構について以下に述べる。SAMP8 は先天的あるいは若齢期より ATP 消費量の増大や分解の亢進または、ミトコンドリアの異常などの理由から ATP の枯渇といった致死的状态に置かれる危険性がある。これを回避すべく、グルコースからのエネルギー産生は盛んに行われる。しかし、一方で糖代謝の亢進に伴い活性酸素の産生も増大しており、種々の生体成分が高い酸化ストレス下に曝され、老化を招来することとなる。

上の仮説において、その初発にあたる ATP の消費、分解の増加については、現在のところ予測の域を脱しないが、ミトコンドリアの異常に関しては幾つかの報告により実験的証明がなされている<sup>36,37)</sup>。特に Nishikawa らは、SAMP8 脳における電子伝達系は低効率かつ高活性化状態にあることを示している<sup>38)</sup>。このような状態を惹き起こすものに電子伝達系の uncoupling が予想される。したがって、uncoupling protein、proton pump、あるいはミトコンドリア内膜の透過性に関する詳細な検討は本研究に続く進展として、その方向性の一つと考えられる。一方、糖代謝の亢進に関しては未だ一定の見解が得られておらず、細胞内へのグルコース輸送量を指標とした検討において、SAMP8 脳における糖代謝は、むしろ低下しているとの報告もある<sup>39)</sup>。しかしながら、本研究においては *in vitro* における検討に加え、血糖値を指標とした *in vivo* における結果も得ており、これらは高い相関性を示している。さらに幾重もの調節機構によって制御されている血糖値が、短時間の絶食条件により著しく低下することから、脳以外の組織においてもグルコース利用が増大している可能性も考えられる。また、細胞内に流入したグルコースによるタンパク質の糖化反応についても考慮すべきである。この反応過程において活性酸素を産生すること<sup>40)</sup>や老齢個体において糖化産物が蓄積すること<sup>41)</sup>などが知られており、老化関連の重要な現象であることが示されている。

ところで、SAMP8 に見られる促進老化は、発育・成熟過程は正常であり、その後加速度的な老化を示すとされてきた<sup>1)</sup>。しかし、近年の多様な解析により本研究をはじめ若齢期からの異常を唱える報告が増えており、促進老化の概念は変わりつつあると考えられる。この問題の解決さらに促進老化を概念ではなく定義として捉えるには、遺伝子工学的手法が有用であろう。他の動物種を用いた老化研究においては、線虫におけるインスリン受容体様遺伝子 *daf-2* やショウジョウバエにおけるジカルボン酸輸送体様遺伝子 *Indy* の変異により寿命が延長されることが示され、いずれもこれら変異体におけるエネルギー代謝の低下およびそれに伴う酸化ストレスの軽減が延命効果の要因であると議論している<sup>25,42)</sup>。したがって SAM においても、促進老化、正常老化の別を区分するような代謝関連遺伝子が潜在する可能性は決して低いとは言えない。

最後に、本研究により得られた知見が老化機構解明のための基礎的情報として供されることを期待する。

## 参考文献

- 1) Takeda, T., Hosokawa, M., Takeshita, S., Irino, M., Higuchi, K., Matsushita, T., Tomita, Y., Yasuhira, K., Hamamoto, H., Shimizu, K., Ishii, M. and Yamamuro, T., A new murine model of accelerated senescence, *Mech. Ageing Dev.*, **17**, 183-194 (1981)
- 2) Hosokawa, M., Kasai, R., Higuchi, K., Takeshita, S., Shimizu, K., Hamamoto, H., Honma, A., Irino, M., Toda, K., Matsumura, A., Matsumura, M. and Takeda, T., Grading score system: a method for evaluation of the degree of senescence in senescence accelerated mouse (SAM), *Mech. Ageing Dev.*, **26**, 91-102 (1984)
- 3) Gompertz, B., On the nature of the function expressive of the law of human mortality and on a new model of determining life contingencies, *Philos. Trans. R. Soc. London*, **115**, 513-585 (1825)
- 4) Higuchi, K., Yonezu, T., Kogishi, K., Matsumura, A., Takeshita, S., Higuchi, K., Kohno, A., Hosokawa, M. and Takeda, T., Purification and characterization of a senile amyloid-related antigenic substance (apo SASSAM) from mouse serum. apoSASSAM is an apoA-II apolipoprotein of mouse high density lipoproteins, *J. Biol. Chem.*, **261**, 12834-12840 (1986)
- 5) Matsumura, A., Higuchi, K., Shimizu, K., Hosokawa, M., Hashimoto, K., Yasuhira, K. and Takeda, T., A novel amyloid fibril protein isolated from senescence-accelerated mice, *Lab. Invest.*, **47**, 270-275 (1982)
- 6) Chen, W. H., Hosokawa, M., Tsuboyama, T., Ono, T., Iizuka, T. and Takeda, T., Age-related changes in the temporomandibular joint of the senescence accelerated mouse. SAM-P/3 as a new murine model of degenerative joint disease, *Am. J. Pathol.*, **135**, 379-385 (1989)
- 7) Matsushita, M., Tsuboyama, T., Kasai, R., Okumura, H., Yamamuro, T., Higuchi, K., Higuchi, K., Kohno, A., Yonezu, T., Utani, A., Umezawa, M. and Takeda, T., Age-related changes in bone mass in the senescence-accelerated mouse (SAM). SAM-R/3 and SAM-P/6 as new murine models for senile osteoporosis, *Am. J. Pathol.*, **125**, 276-283 (1986)
- 8) Hosokawa, M., Ashida, Y., Matsushita, T., Takahashi, K. and Takeda, T., Persistent hyaloid vascular system in age-related cataract in a SAM strain of mouse, *Exp. Eye. Res.*, **57**, 427-434 (1993)
- 9) Miyamoto, M., Kiyota, Y., Yamazaki, N., Nagaoka, A., Matsuo, T., Nagawa, Y. and Takeda, T., Age-related changes in learning and memory in the senescence-accelerated mouse (SAM), *Physiol. Behav.*, **38**, 399-406 (1986)
- 10) Ohta, A., Hirano, T., Yagi, H., Tanaka, S., Hosokawa, M. and Takeda, T., Behavioral characteristics of the SAM-P/8 strain in Sidman active avoidance task, *Brain Res.*, **498**, 195-198 (1989)

- 11) Yagi, H., Katoh, S., Akiguchi, I. and Takeda, T., Age-related deterioration of ability of acquisition in memory and learning in senescence accelerated mouse: SAM-P/8 as an animal model of disturbances in recent memory, *Brain Res.*, **474**, 86-93 (1988)
- 12) Akiguchi, I., Yagi, H., Ueno, M., Takemura, M., Kitabayashi, T., Seriu, N., Kawamata, T., Nakamura, S., Shimada, A. and Takeda, T., Age related morphological changes in the brain of senescence-accelerated mouse (SAMP8), *The SAM model of senescence*, Elsevier, Amsterdam, 67-72 (1994)
- 13) Akiyama, H., Kameyama, M., Akiguchi, I., Sugiyama, H., Kawamata, T., Fukuyama, H., Kimura, H., Matsushita, M. and Takeda, T., Periodic acid-Schiff (PAS)-positive, granular structures increase in the brain of senescence accelerated mouse (SAM), *Acta. Neuropathol. Berl.*, **72**, 124-129 (1986)
- 14) Takemura, M., Nakamura, S., Akiguchi, I., Ueno, M., Oka, N., Ishikawa, S., Shimada, A., Kimura, J. and Takeda, T., Beta/A4 protein-like immunoreactive granular structures in the brain of senescence-accelerated mouse, *Am. J. Pathol.*, **142**, 1887-1897 (1993)
- 15) Harman, D., Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry, *J. Gerontol.*, **2**, 298-300 (1956)
- 16) Fraga, C. G., Shigenaga, M. K., Park, J. W., Degan, P. and Ames, B. N., Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 4533-4537 (1990)
- 17) Berlett, B. S. and Stadtman, E. R., Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress, *J. Biol. Chem.*, **272**, 20313-20316 (1997)
- 18) Miyazawa, T., Suzuki, T. and Fujimoto, K., Age-dependent accumulation of phosphatidylcholine hydroperoxide in the brain and liver of the rat, *Lipids*, **28**, 775-778 (1993)
- 19) McCay, C. M., Crowell, M. F. and Maynard, L. A., The effect of retarded growth upon the length of the life span and upon the ultimate body size, *J. Nutr.*, **10**, 63-79 (1935)
- 20) Chvapil, M. and Hruza, Z., The influence of aging and undernutrition on chemical contractility and relaxation of collagen fibres in rats, *Gerontologia*, **3**, 241-252 (1959)
- 21) Everitt, A. V., Food intake, growth and the ageing of collagen in rat tail tendon, *Gerontologia*, **17**, 98-104 (1971)
- 22) Holeckova, E. and Chvapil, M., The effect of intermittent feeding and fasting and of domestication on biological age in the rat, *Gerontologia*, **11**, 96-119 (1965)
- 23) Sohal, R. S. and Weindruch, R., Oxidative stress, caloric restriction, and

aging, *Science*, **273**, 59-63 (1996)

24) Lakowski, B. and Hekimi, S., Determination of life-span in *Caenorhabditis elegans* by four clock genes, *Science*, **272**, 1010-1013 (1996)

25) Kimura, K. D., Tissenbaum, H. A., Liu, Y. and Rurkun, G., *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*, *Science*, **277**, 942-946 (1997)

26) Guilbault, G. G., Use of enzymes in analytical chemistry, *Anal. Chem.*, **38**, 527R-536R (1966)

27) Hassid, W. Z., and Abraham, S., Chemical procedures for analysis of polysaccharides, *Methods Enzymol.*, **3**, 34-35 (1959)

28) Tildon, J. T., Merrill, S. and Roeder, L. M., Differential substrate oxidation by dissociated brain cells and homogenates during development, *Biochem. J.*, **216**, 21-25 (1983)

29) Lowry, O. H., Passonneau, J. V., Hasselberger, F. X. and Schulz, D. W., Effect of Ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain, *J. Biol. Chem.*, **239**, 18-30 (1964)

30) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J., Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951)

31) Shimano, Y., Studies on aging through analysis of the glucose metabolism related to the ATP-production of the senescence accelerated mouse(SAM), *Hokkaido Igaku Zasshi*, **73**, 557-569 (1998)

32) Oomura, Y., Sasaki, K., Li, A., Yoshii, H., Fukata, Y., Yago, H., Kimura, H., Tooyama, I., Hanai, K., Nomura, Y. and Yanaihara, N., Protection against impairment of memory and immunoreactivity in senescence-accelerated mice by acidic fibroblast growth factor, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **786**, 337-347 (1996)

33) Miyamoto, M., Characteristics of age-related behavioral changes in senescence-accelerated mouse SAMP8 and SAMP10, *Exp. Gerontol.*, **32**, 139-148 (1997)

34) Newsholme, E. A. and Start, C.; 動物の代謝調節(中沢 淳, 森田 敬 訳), 講談社 (1975)

35) Herberg, L. and Coleman, D. L., Laboratory animals exhibiting obesity and diabetes syndromes, *Metabolism*, **26**, 59-99 (1977)

36) Nishikawa, T., Takahashi, J. A., Fujibayashi, Y., Fujisawa, H., Zhu, B., Nishimura, Y., Ohnishi, K., Higuchi, K., Hashimoto, N. and Hosokawa, M., An early stage mechanism of the age-associated mitochondrial dysfunction in the brain of SAMP8 mice: an age-associated neurodegeneration animal model, *Neurosci. Lett.*, **254**, 69-72 (1998)

- 37) Nakahara, H., Kanno, T., Inai, Y., Utsumi, K., Hiramatsu, M., Mori, A. and Packer, L., Mitochondrial dysfunction in the senescence accelerated mouse(SAM), *Free Radic. Biol. Med.*, **24**, 85-92 (1998)
- 38) Kurokawa, T., Asada, S., Nishitani, S. and Hazeki, O., Age-related changes in manganese superoxide dismutase activity in the cerebral cortex of senescence-accelerated prone and resistant mouse, *Neurosci. Lett.*, in press (2001)
- 39) Ohta, H., Nishikawa, H., Hirai, K., Kato, K. and Miyamoto, M., Relationship of impaired brain glucose metabolism to learning deficit in the senescence-accelerated mouse, *Neurosci. Lett.*, **217**, 37-40 (1996)
- 40) Sakurai, T. and Tsuchiya, S., Superoxide production from nonenzymatically glycated protein, *FEBS Lett.*, **236**, 406-410 (1988)
- 41) Sell, D. R., Lane, M. A., Johnson, W. A., Masoro, E. J., Mock, O. B., Reiser, K. M. Fogarty, J. F., Cutler, R. G., Ingram, D. K., Roth, G. S. and Monnier, V. M., Longevity and genetic determination of collagen glycoxidation kinetics in mammalian senescence, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 485-490 (1996)
- 42) Rogina, B., Reenan, R. A., Nilsen, S. P. and Helfand, S. L., Extended life-span conferred by cotransporter gene mutations in *Drosophila*, *Science*, **290**, 2137-2140 (2000)

## 謝辞

本研究遂行ならびに本論文作成に際し、数多くの方々から御協力を戴きました。

終始、懇篤なる御教示を賜りました、広島大学医学部総合薬学科 樫木 修 教授、黒川 知則 助教授に感謝いたします。

機略にあたって、有益な御助言を賜りました、岡村 直樹 講師、濁川 清美 技官、黒瀬 陽子 修士、鈴木 沙織 修士に感謝いたします。

審査にあたり、御尽力賜りました、広島大学医学部総合薬学科 井出 利憲 教授、北村 繁幸 助教授に感謝いたします。

実験動物の継代維持をはじめとして多大な御助勢を賜りました、高木 陽子 学士、浅田 真治 学士、長岡 晃史 学士に感謝いたします。

最後に、精神的、経済的に支援してくれた両親に至心をもってお礼申し上げます。

2001年2月

藤本 康博