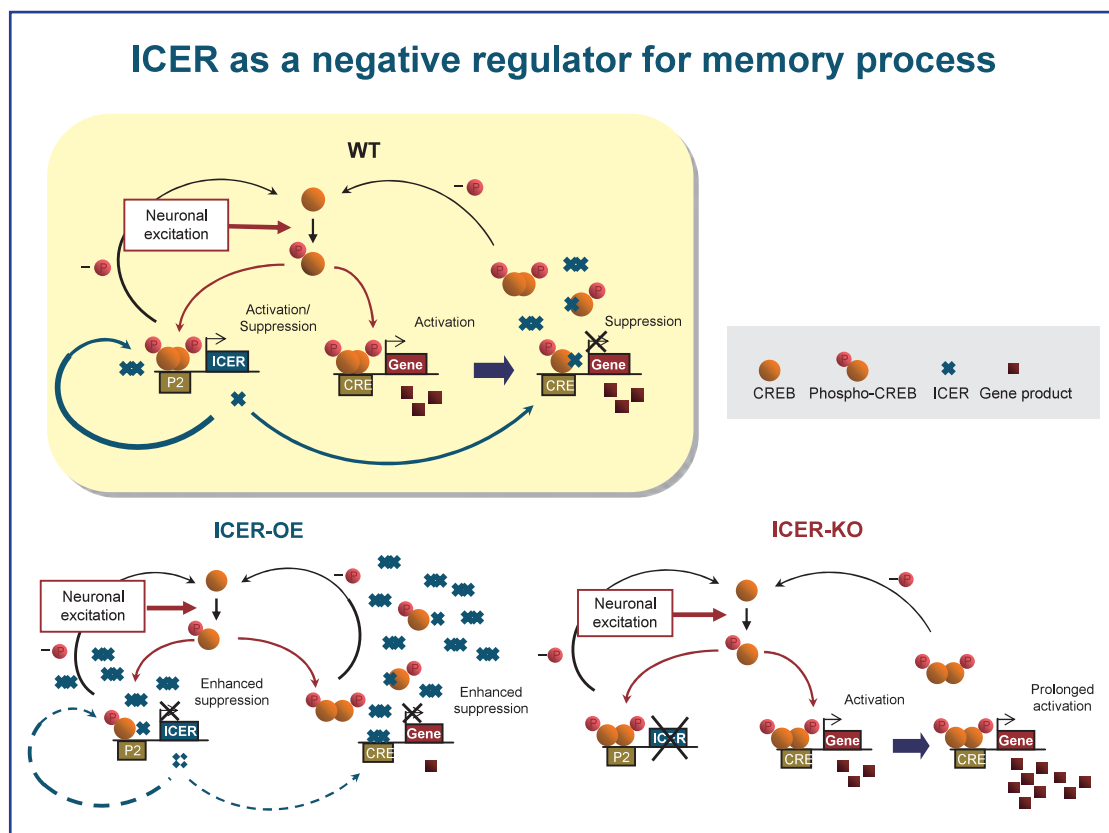


# BIOMEDICAL GERONTOLOGY

## 基礎老化研究

- 総説 | 記憶のスーパーマウスが教える記憶障害治療へのアプローチ  
遠藤 昌吾
- 総説 | 加齢に伴う侵害受容機構の変化  
鈴木 郁子、岩田 幸一
- 総説 | ゼブラフィッシュがもたらす発生生物学と老化生物学の新しい接点  
貴志 周司
- トピックス | 加齢に伴って増加するPD-1陽性Tリンパ球の正体は？  
猪股 光司、嶋田有紀子、林 昌美、岩下 淑子
- 随筆 | 老化研究事始め—大学病院がカロリー制限食で奮闘 三井 洋司
- お知らせ | 第33回日本基礎老化学会大会のご案内 磯部 健一

### ICER as a negative regulator for memory process



- 編集委員会委員長: 重本 和宏 東京都健康長寿医療センター研究所 老年病研究チーム  
〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2
- 編集委員会幹事: 堀田 晴美 東京都健康長寿医療センター研究所 老化制御研究チーム  
〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2
- 編集委員会委員: 三浦 ゆり 東京都健康長寿医療センター研究所 老化機構研究チーム  
〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2
- 内田 さえ 東京都健康長寿医療センター研究所 老化制御研究チーム  
〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2
- 清水 孝彦 東京都健康長寿医療センター研究所 老化機構研究チーム  
〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2
- 福 典之 東京都健康長寿医療センター研究所 老化制御研究チーム  
〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2
- 島田 厚良 愛知県心身障害者コロニー 発達障害研究所 病理学部  
〒480-0392 愛知県春日井市神屋町713-8
- 

- Editor-in Chief: Kazuhiro Shigemoto, Research Team for Geriatric Medicine,  
Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku,  
Tokyo 173-0015, JAPAN
- Managing Editor: Harumi Hotta, Research Team for Functional Biogerontology, Tokyo  
Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku,  
Tokyo 173-0015, JAPAN
- Editors: Yuri Miura, Research Team for Mechanism of Aging, Tokyo  
Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku,  
Tokyo 173-0015, JAPAN
- Sae Uchida, Research Team for Functional Biogerontology, Tokyo  
Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku,  
Tokyo 173-0015, JAPAN
- Takahiko Shimizu, Research Team for Mechanism of Aging, Tokyo  
Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku,  
Tokyo 173-0015, JAPAN
- Noriyuki Fuku, Research Team for Functional Biogerontology, Tokyo  
Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku,  
Tokyo 173-0015, JAPAN
- Atsuyoshi Shimada, Institute for Developmental Research, Aichi Human  
Service Center, 713-8 Kamiya-cho, Kasugai, Aichi 480-0392, JAPAN

## この雑誌について（投稿される方へ）

「基礎老化研究」(Biomedical Gerontology) は、日本基礎老化学会の会誌で、年4回:2月、5月、8月、11月発行される。内容は、本学会員から投稿された、または、本学会員及び編集委員会より依頼を受けた者からの巻頭言、総説（老化理論を含む）、トピックス、学会報告、随筆、書評、その他で構成される。但し、2号には年次大会のプログラムと発表抄録が、4号には基礎老化学会シンポジウムの抄録も掲載される。本誌は会員に無料で配布されるほか、希望に応じて頒価（現在は2,000円）で販売される。

1. 依頼・投稿による総説を含み全ての原稿の採用については、編集委員会で決定する。総説については、編集委員または編集委員会で依頼した審査委員（評議委員）による査読を行う。
2. 著者による校正は、総説、トピックスについてのみ1回行う。その際の追加、変更は出来ない。
3. 本誌に掲載された記事の著作権は、日本基礎老化学会に帰属する。但し、自分の著作を使用する場合には、本学会に断り無く自由に使用できる。
4. 目次、総説の要旨、およびトピックスはインターネットのホームページに掲載される。発行後2年経過した総説、は公開される。
5. 総説、トピックスの著者には、別刷り30部を無料で進呈する。30部以上希望の場合は有料（実費）となるので、投稿・原稿提出時にその旨連絡すること。
6. 原稿の執筆に際しては、本誌の執筆要領に従うこと。

## 執筆要領

原稿は全てワードプロセッサを使用する（原稿はコンピュータファイルとハードコピーで提出する）。1）第1頁には、原稿の表題、著者名、所属機関、所在地を和文、英文で、また、電話番号、FAX番号、E-mailアドレス記載する。

著者が複数の場合は、連絡先の著者を明記する。2）第2頁にも初めに、表題、氏名を書き、その後に本文を書く。3）本文に節を設ける場合、1.、2.、3.、・・・を付けて節を示す。以下の項目は1)、2)、3)・・・、a)、b)、c)・・・とする。原稿のハードコピーはA4用紙を用い、横書きにプリントする。また、イタリック体、ギリシャ文字、記号が正しく出力されていることに注意する。同時に提出するコンピュータファイルは、テキストファイルまたはMSワードファイルで（欧語・数字は半角を用いる）、CDディスクに記録したものとす。図・表および写真は、EPS形式またはJPEG形式に圧縮したもの（使用ソフトを明記する）あるいはAdobe Acrobatで作製したPDFファイルおよびプリントアウトしたものを提出する。雑誌への印刷は白黒またはグレースケールで行う。カラー希望の場合は著者の負担とする。図表の挿入部位はプリントアウトしたものの欄外に示す。尚、本誌1ページは約1,600字に相当する。図の大きさを考慮して、全体の長さを調節すること。原稿（コンピュータファイル）はE-mailに添付して送付することができる。コンピュータファイルについては、印刷所あるいは編集委員会で対応できない場合は、著者に協力を求めることがある。

1. 巻頭言（展望） 刷り上がり1頁に収まるようにする。本文の長さは1,500字以内（タイトルと氏名を除く）。
2. 総説 一つのテーマについて、専門的知識に基づき、関連する多くの研究論文を総括、解説、評価した、所謂ミニレビュー。和文。
  - 1) 本文の長さ：図、表も含めて刷り上がりで6ページ（9,600字）程度を基本とする。
  - 2) 題名：40字以内とし、内容を的確に表したもので、且つ、読者の興味を引くよう工夫する。
  - 3) 要約およびキーワード：要約およびキーワード（5個以内の英語）を必ず付す。要約は日本語（400字以内）、およびその英訳（200 words 以内）とする。
  - 4) 用語：本文中の用語はなるべく日本語にする。但し、欧語の方が一般的なもの、解りやすい場合は欧語でよい。外国の人名は原語、地名はカタカナで表記する。  
専門術語：それぞれの専門分野の用語集に従う。動植物の学名、遺伝子名などでイタリック体で印刷されるべきものについては、原稿に下線をつけるなどして区別する。  
略語：初出箇所にフルタームの後に括弧で括った略語を記入する。可能なら日本語を入れる。  
文体：「である」調とする。  
数字・単位：数字はアラビア数字とし、単位は国際単位系を用いる。
- 5) 引用・参考文献：引用文献は論文中に引用した順に番号をつけて表示する。本文中では該当する位置に [ ] で括って表示する。1つの事柄に複数の論文を引用する場合には [1,5,7] または [2-6] のように記述する。著者名を引用する場合で3名以上の連名の時は、それ以下を“ら”を用いて省略する。末尾文献リストは引用した順とし、記載は以下の通りとする。未発表論文、私信は末尾文献リストには加えず、本文中の該当す

る位置に [ ] で括って表示する。

1. Sun J and Tower J. FLP recombinase-mediated induction of Cu/Zn-superoxide dismutase transgene expression can extend the life span of adult *Drosophila melanogaster* flies. *Mol Cell Biol* 19:216-228, 1999.
  2. Roth GS, Ingram DK and Cutler RG. Primate models for dietary restriction research. In: *Biological Effects of Dietary Restriction*, edited by Fishbein L. Berlin: Wiley, 1991, p. 193-204.
  3. 仲村賢一, 下村・泉山七生貴, 田久保海誉 ヒト組織の加齢に伴うテロメア短縮. *基礎老化研究* 24:72-76, 2000.
- 6) 図、表、写真: そのまま印刷できるものに限る (手書きのもの受け付けない)。文献から引用する場合は、引用を明記すると共に、引用の許可が必要な場合には、著者の責任で許可を取っておくこと (許可証のコピーを原稿と共に提出すること)。白黒またはグレースケールが原則。
- 7) 図、写真にはタイトルと説明文を付ける。
3. トピックス 最近の話題性のある研究及び最近行った自身の研究の紹介。長さは刷り上がり4頁以内 (1,600 - 6,400字)。その他は総説に準じる。但し、要旨は不要である。
  4. 学会報告、海外便り 国内外の学術集会の紹介記事。長さは1,600字以内。留学などで滞在しているまたは過去に滞在していた研究室、訪問した研究施設の見聞の紹介記事。
  5. 書評 最近出版された書籍の紹介。1,600字以内。
  6. 随筆 長さは刷り上がり2頁 (3,200字) 以内。
  7. その他
  8. 原稿の送付およびその他の問い合わせは、下記宛に。(e-mail の使用が望ましい。)  
編集委員会委員長: 重本和宏 (kazshige@tmig.or.jp)  
または、編集幹事: 堀田晴美 (hotta@tmig.or.jp)

## 目 次

### 総説

記憶のスーパーマウスが教える記憶障害治療へのアプローチ 遠藤昌吾…………… 1-12

### 総説

加齢に伴う侵害受容機構の変化 鈴木郁子、岩田幸一…………… 13-16

### 総説

ゼブラフィッシュがもたらす発生生物学と老化生物学の新しい接点

貴志周司…………… 17-22

### トピックス

加齢に伴って増加するPD-1陽性Tリンパ球の正体は？

猪股光司、嶋田有紀子、林 昌美、岩下淑子…………… 23-27

### 随筆

老化研究事始め —— 大学病院がカロリー制限食で奮闘 三井洋司…………… 29-31

### お知らせ

第33回日本基礎老化学会大会のご案内 磯部 健一…………… 33

### 附

基礎老化学会サーキュラー 第84号

---

## CONTENTS

### <REVIEW>

Memory-enhanced mice provide clues to treatments of memory impairment.

Shogo Endo

### <REVIEW>

Change in nociceptive mechanisms during advancing age.

Ikuko Suzuki and Koichi Iwata

### <REVIEW>

A novel contact point between developmental biology and senescence biology  
provided by zebrafish

Shuji Kishi



## 【総 説】

# 記憶のスーパーマウスが教える記憶障害治療へのアプローチ

遠藤昌吾

### 要約

行動や思考に必須な記憶は、古くから哲学そして心理学の研究対象であった。しかし、記憶が脳に存在する事が明らかにされたのはわずか60年前である。記憶が生物学の研究対象となり、記憶を支える脳の柔軟性（可塑性）の存在が科学的に証明されたのは30年ほど前である。その後、分子生物学の急速な発展に伴い各種の遺伝子改変マウスを用いて記憶や神経可塑性の分子機構に迫る事ができるようになった。本総説では、はじめに過去にさかのぼり哲学における記憶研究の歴史、心理学における記憶の基礎概念について述べる。そして、現在行われている遺伝子改変動物を用いた記憶の研究について、我々が最近発見した記憶が増強された遺伝子改変マウスについて述べる。最後に、記憶が増強されたマウス（スーパーマウス）が、老化や疾病等による記憶障害治療のカギとなりうる事を議論したい。

### 1. はじめに

記憶は情動、言語、思考等の高次脳機能を支える基盤である。また、記憶は様々な形で我々の行動に関与して人格の形成に寄与する。すなわち、記憶はヒトが人であるための必須の機能である。それゆえ、老化や各種の疾病による記憶障害は、本人のみならず家族や社会にきわめて大きな影響を与える。記憶障害の克服や記憶障害の発症を遅らせることは、今後訪れる超高齢化社会にとってきわめて重要な課題である。しかし、記憶に関する膨大な量の研究にも関わらず、感覚情報の獲得、保存、そして保存された情報の読み出しという、記憶の基礎的な機構についてさえ明確な答えは得られていない。

老化のみならず、アルツハイマー病、統合失調症、うつ病、パーキンソン病[1-4]など様々な脳神経疾患により認知機能は低下し、特に、記憶や学習の能力は大きく影響を受ける[1-4]。脳神経疾患の研究は機能低下の原因となる遺伝子、タンパク質、神経伝達物質、脳部位（回路）の同定という一連の研究を通して疾患や記憶の機構解明に大量の基礎的情報を供給してきた。そして、これらの情報をもとにして脳の高次機能を含む様々な生理機能のために、マウス、ショウジョウバエ等様々な遺伝子改変動物が作出され、詳細に解析されてきた。その過程で、様々な認知機能が増強された動物が見いだされた。記憶が増強されたマウスも得られており、これらのマウスは記憶障害の治療戦略上大きな手がかりとなる。

本総説では、記憶研究の過去にさかのぼり哲学や心理学でどのように記憶が扱われてきたかについて述べ、また、記憶の分類について概説する。そして、分子生物学の急速な進歩に伴う遺伝子組替え技術の産物である遺伝子改変動物を用いた記憶の研究について、我々が最近得た記憶が増強されたマウスの研究結果を交えながら議論する。さらに、これら記憶研究の記憶をもとに、近い未来の記憶研究そして記憶障害治療の新しいアプローチについて議論してみたい。

### 2. 過去—哲学と心理学による記憶の研究

#### 1) 哲学と記憶

トト 「文字を学ぶ事でエジプト人の知恵は高まり、物覚えは良くなるでしょう」  
アモン 「文字は人の記憶力の訓練をおごなりにし、人の魂に忘れっぽさを植え付ける。文字により外から思い出すようになり、内部の“しるし”から思い出す訓練がおごなりになる」

トトは古代エジプト象形文字（ヒエログリフ）の発明者とされ、文化、技能の神とされる。また、アモン（アメン）はエジプトをおさめる神である。今から5000年以上も前に記憶についてこのようなエジプト神話の挿話が残されている事は驚くべきことであるとともに、“しるし”をハードディスクに貯め込んでいる我々への警告にも聞こえる。

トトとアモンとの挿話は、紀元前400年頃にソクラテスにより引用され、文字記録の危険性の議論に用いられた[5]。ソクラテスは書き言葉（文字）が「記憶を破壊する」と考えた。書かれた言葉は「死んだ言葉であって反論を許さない柔軟性に欠けたもの」と考え、思考や議論には個々人の中の“記憶”が重要であるとした[5,6]。そして、文字記録に頼る危うさを主張した[5,6]。文字記録を否定したソクラテスは自身で著作を残すことはなかった。我々が知りうるソクラテスの言葉は弟子たちの文字

連絡先：〒173-0015

東京都板橋区栄町35-2

東京都健康長寿医療センター研究所

（東京都老人総合研究所）

老化制御研究チーム

TEL: 03-3964-3241 内線3063

FAX: 03-3579-4776

E-mail: sendo@tmig.or.jp

記録によるものである事は皮肉である。

ソクラテスの弟子プラトンは、人間は魂と肉体からなると考えた(2元論)。外界からの刺激により魂と肉体が共同して動く事を「感覚」と呼び[7]、その動き(感覚)を留めておくのが「記憶」であり、「記憶そのものは魂の領域に属する」とした[8]。どのように感覚が留めおかれているのだろうか?我々の中には固まっていない蜜蠟(みつろう)があって、蜜蠟に感覚をスタンプのように押し付けて刻印する事により感覚の痕跡をとどめる[9]、これが記憶である。この蜜蠟を人に授けたのがムネーモシュネー(ムネモシュネ、Μνημοσύνη)、ギリシャ神話の“記憶の女神”である。そして、蜜蠟に刻まれている限り、魂が単独で記憶を想起する事ができる。

プラトンの弟子であるアリストテレスは、記憶を動物の優位性の判断基準に使った。「動物は感覚を有するが、ある動物では得られた感覚情報から記憶が形成され、ある動物においては形成されない[6, 10]。記憶が形成できる動物は形成できない動物よりも優秀であり、さらに学ぶ事ができる」と考えた[6, 10]。アリストテレスは人間の記憶について、“On Memory and Reminiscence(記憶と想起)”のなかでさらに深い議論を進めている[11]。記憶は哲学の初期からきわめて重要な議論の対象であった。記憶は人間を内側から考えるために必須の概念であり、記憶が様々な心的活動の中心である事が議論されてきた[6]。ちなみに、アリストテレスの記憶形成可否と動物優位性の議論について、我々はほぼ全ての動物が“記憶”を形成できることを知っているし、植物でさえも記憶と類似の機能を持つことを知っている[12]。

また、アリストテレスは「知性は心臓にあり、脳は血液を冷やすための器官」と考えた[13]。「脳に知性が、感情は心臓に、欲望は肝臓に」と考えた同時代の哲学者は世界が微粒子(アトム)からなると考え唯物論の基礎を作ったデモクリトスであり、記憶を含む人の認知機能が脳にあると考えたのは医学の父、ヒポクラテスであった[14]。その後、様々な形で哲学において記憶の重要性が議論されてきたが、記憶についての科学的解析は現代の心理学による詳細な研究を待たなければならなかった。

## 2) 心理学と記憶

哲学と並んで心理学は行動の基礎となる記憶を古くから主要な研究対象としたが、ドイツの実験心理学者Ebbinghausが科学的研究を用いて本格的に記憶の機構を研究したのは、今からわずか120年程前、1885年であった[15]。それ以降、心理学分野では記憶の新しい解析法や記憶に影響を与える要因等の研究が進み、また、記憶のステップの解析やその特徴付けそして各種の記憶分類法が提案された。心理学で用いられる記憶の分類法は、現在でも広く用いられている。記憶の定義の一つは以下の通りである；

「経験により引き起こされる行動の変化」

(Changes of behaviors by the function of experience.)

後述する神経可塑性は記憶を担う細胞機構と考えられるが、記憶そのものではなく、記憶の評価は修飾された“行動”を観察することでのみ可能である。

我々の内部あるいは外部環境からの感覚情報(sensory information)は脳で処理され、そのごく一部が記憶として蓄えられる(図1)。感覚情報を獲得するステップ(記録、acquisition)、獲得した情報を保存するステップ(保持、storage)、そして、保存した情報を読み出すステップ(想起、retrieval)の3ステップが記憶の形成に必要であり、どのステップがかけなくても記憶は成立しない。また、情報を獲得するステップは学習(learning)とも呼ばれる。学習は内容的に記録と同じ過程であるが、「訓練により習得する過程を重視する時」に学習という用語が用いられる。想起は、手がかりなしに自由に思い出す再生(自由再生)と、いくつかの中から(手がかりを与えられて)思い出す再認に分けられる(図1)。

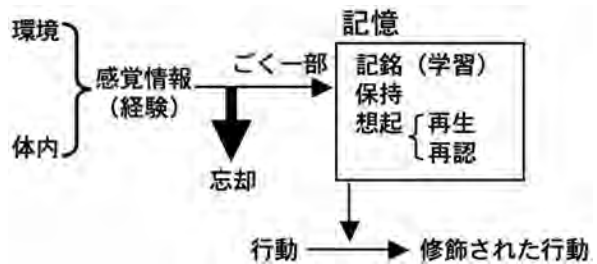


図1 記憶の概念図

我々は環境からそして体内から常に感覚情報を得ている。大部分はホメオスタシスや姿勢維持等に用いられ1秒以内に失われる。しかし、我々が注意を払った感覚情報のごく一部は記憶として蓄えられる。形成された記憶は各種の行動に影響を与え、また、パーソナリティ形成にも大きく寄与する。

## 3) 記憶の分類

記憶は心理学者により様々な分類がなされている。中でも、我々の感覚となじみやすくかつ各種の研究に有用な2種類の分類方法について紹介する；a) 記憶の保持時間による分類、b) 記憶の保持内容による分類。

### a) 保持時間による記憶の分類—長期記憶と短期記憶(表1)

毎秒毎秒身体の内外部から得られる大量の感覚情報は、一旦「感覚貯蔵(感覚記憶)」に蓄えられ、生理的応答等に用いられる。しかし、これら大量の感覚情報のほとんどは1秒以内に失われる。ごく一部の情報、例えば我々が注意を払った感覚情報は、「短期記憶(short-term memory)」として蓄えられる(表1)。短期記憶は短時間で形成されることから、このような神経可塑性を神経細胞内分子の生化学的変化に置き換えると、タンパク質などの生体分子の修飾平衡の変化や合成・分解平衡の変化、細胞内の酸化還元状態の変化やpH変化、そして、これらの一群の変化に伴い引き起こされる細胞表面上のイオンチャネルや受容体の活性、感受性、数量、分布の変化などが対応すると考えられる。

一方、「長期記憶(long-term memory)」は、ヒトでは一生保存される事もある。それゆえ、長期記憶は寿命



表1. 保持時間による記憶の分類

保持時間	形成	容量	リハーサル (繰り返し)	記憶形成後の 妨害に対して	遺伝子の 転写・翻訳	関与する分子機構
秒一分 (短期記憶)	容易	小	必須	弱い	不要	タンパク質修飾変化、 受容体の数、活性、分布 変化、細胞内pH変化など
時間一日 (長期記憶)	困難	大	不要	強い	必要	シナプスや神経細胞の 数、構造変化など

のある(代謝される)生体高分子を用いて貯えることはできず、新しいタンパク質合成 (de novo protein synthesis) により誘導されたシナプスの数や構造の変化や神経突起の構造変化など、神経細胞の形態変化により維持されるという考えが有力である[16]。しかし、脊椎動物で長期記憶の貯蔵場所(記憶の座、記憶の痕跡、エングラム)が確定された例はなく、特定の長期記憶に伴う神経細胞の形態変化は証明されていない。一方、海産無脊椎動物であるアメフラシでは長期記憶に伴う神経細胞の顕著な形態変化とシナプス様構造の増加が観察され[16-18]、哺乳類においても、特定の記憶に伴う神経組織の形態変化の可能性を示唆する現象が観察されている[19-21]。

短期記憶あるいは感覚記憶が長期記憶へと変換されることを、「記憶の固定 (consolidation)」と呼ぶ。このとき、短期記憶は既に存在する記憶の知識体系と結びつくことにより、長期記憶として固定されると考えられる。長期記憶には遺伝子の転写と翻訳が必要であるが、短期記憶ではその必要がない事でも両記憶は区別される(表1)[16]。

程度の差こそあれ使わない記憶は失われる(忘却、forgetting)。これと似た言葉に記憶の消去 (extinction) がある。消去は記憶を失う事ではなく、「新しい記憶の獲得」である。メトロノーム音と肉粉を犬に対提示して訓練し、メトロノームの音だけで唾液が分泌するように学習させる有名なPavlovの実験がある。肉粉とメトロノームの音の連合を学習した犬に、肉粉なしでメトロノーム音を聞かせ続けると、唾液の分泌が起らなくなる。これは、「肉粉を意味していたメトロノーム音が何も意味しない事」を新しく学習したのである。消去のメカニズムは、たった一回の経験でも形成される強烈な記

憶である薬物中毒やPTSDの治療の基礎となるとして、その細胞機構や分子機構が注目されている[22,23]。

b) 保持内容による記憶の分類—陳述記憶と非陳述記憶 (表2)

獲得された記憶により、どのような行動が影響を受けるのかを基にして、Squireは記憶を「陳述記憶」と「非陳述記憶」に分類した(表2)[24,25]。陳述記憶(declarative memory)は言葉で述べることのできる記憶、非陳述記憶(non-declarative memory)は言葉で述べることのできない記憶である。この二つの記憶は完全に分離されたものではない。たとえば、初めは操作を思い出しながら自動車を運転するが、いつのまにか、無意識で運転操作が可能となる。陳述記憶が非陳述記憶になる例である。

3. 現在—細胞レベル、分子レベルでの記憶研究の夜明け

1) 神経可塑性の発見

前章で述べたように、記憶は古くから哲学、心理学の研究対象であった。一方、脳に記憶が存在する事が予想され、脳の神経回路網がある種の柔軟性を持つこと、そして、それが記憶の基礎となることが予想されたのはごく最近である。

脳が柔軟性(可塑性)を持ち、それが行動の基礎、そして、記憶の基礎となるという仮説を1949年に提案したのはHebbであった[26]。脳に記憶が存在するという実験的な証明がなされたのは、1950年代のPenfieldによる側頭葉電気刺激による記憶の想起実験の報告[27]、そして、ScovilleとMilnerによる海馬を含む側頭葉内側部を失った患者の前向き健忘症の報告[28]である。これらの報告は記憶が脳によって処理され、記憶痕跡(エンゲ

表2. 保持内容による記憶の分類

記憶の種類	形成	言語表現	想起する努力
陳述記憶 (意味記憶、エピソード記憶)	比較的容易	可能	必要 (意識上で処理)
非陳述記憶 (反射、技術、技能、癖)	時間を要する	困難	不必要 (意識に上らずに処理)

ラム、engram) が脳に存在する事を明らかにした。これらの研究は、以降の海馬における神経可塑性やその分子機構研究に大きな弾みをつけた。

実際に脳に神経活動依存性に神経細胞間の信号伝達効率が変化する事、すなわち、神経可塑性が報告されたのは、1973年BlissとLomoによるウサギの海馬におけるLTP (long-term potentiation) の報告[29]、そして、1982年東京大学の伊藤正男らによる小脳におけるLTD (long-term depression) の報告[30]である。

陳述記憶を支える可塑性にふさわしい性質を持つ海馬LTPについては記憶を支える細胞モデルとして多くの研究が行われ、その分子機構や海馬における記憶処理機構とともに多くの議論が未だ行われている。陳述記憶における海馬の役割そして海馬の神経可塑性に関して[31-34]、そして、その分子機構については多くの総説がある[35-39]。

非陳述記憶における小脳の重要性は、小脳傷害患者の解析等から明らかにされてきた[40-42]。小脳依存性記憶の基盤として小脳に神経可塑性が存在することをAlbusとMarrが予想し[43,44]、1982年に東京大学の伊藤正男が電気生理学的にその存在を証明した[42,45]。小脳LTDは世界で初めて示された神経伝達“抑圧”を伴う神経可塑性であり、日本で発見された可塑性である。小脳は運動学習において、早く、正確に、なめらかに動作を行うのに重要な役割を果たしている[42]。この時、LTDは誤った動きを担うシナプスを除去すると仮定されている。小脳LTDには海馬LTPと同様に多数の分子が関与する事が明らかにされている[42]。

## 2) 神経可塑性の分子機構から記憶の行動解析へ

記憶を支える諸機構についてその時間経過と分子機構との関連を図2に示した。記憶システムは、数ミリ秒のイオンチャネル活動により開始される神経活動を、数分間あるいは一生保存可能な形に変換し保ち続けるという驚くべき能力を持った精密かつ巨大なシステムである。記憶が神経可塑性により支えられると考えると、神経可塑性を支える神経細胞内の分子機構の解明は、様々な疾病等の分子ターゲットを明らかにするためにきわめて重要である。そして、図2のひとつひとつのステップが疾病治療のターゲットとなりうる。それゆえ、記憶そして神経可塑性を担う分子機構の解明は現代神経科学の重要課題の一つであり、多くの研究が行われてきた。前述の海馬や小脳の神経可塑性の分子機構は、主に、薬理的解析により明らかにされてきた[31,32,35,46,47]。しかし、これらの神経可塑性が記憶において果たす生理的役割の解析には、行動解析すなわち感覚器、ネットワーク、運動系等がそろった“個体”の解析が必要である。

近年、分子生物学やその関連分野が急速に進歩した。胚操作や生殖技術の進歩や相同組換えを含む遺伝子操作等の進歩により、単一タンパク質を欠損させたり、過剰発現させたマウスを作出することが可能となった。この技術により作出した各種の遺伝子改変マウスが脊椎動物の記憶や学習モデルとして、また、神経可塑性の研究に



図2 記憶を担う細胞機構の時間的動態

記憶の形成に伴う各種の生理現象を時間軸に沿って配置した。横軸はミリ秒(msec)である。上半分には各種の細胞内機構を、時間軸の下には記憶に伴う各種の行動を示した。生化学反応ではcAMP系を例にとり示した。記憶はミリ秒単位の感覚情報を数年にわたって保持できるような形に変換する巨大かつ精密なシステムである。CRE, cAMP response element; CREB, cAMP response element binding protein;

大きな寄与をしている[16,48-50]。

海馬LTPや小脳LTDに関与する遺伝子を欠損させた、あるいは、過剰発現させたマウスが多数作出されてきた。また、全身性に遺伝子を欠損させたマウス (nullマウス) に加え、条件的遺伝子操作技術 (conditional gene manipulation) により、特定の細胞で特定の時期に標的タンパク質を欠損させたマウスも利用可能となった[49]。Nullマウスは発生の段階から標的遺伝子を欠損して成長するため、遺伝子欠損により引き起こされる様々な補償作用等を考慮しなければならない。それに対して、条件的遺伝子欠損技術により作出されたマウスでは、成体において時間的・空間的に制御された遺伝子欠損を引き起こす事ができるので、発達段階でのタンパク質欠損による影響を回避しながら、生体における標的遺伝子欠損の影響を詳細に検討する事が可能となる[48,49]。

さて、このように作出されたマウスの多くでは記憶の障害が観察されていた。しかし、遺伝子改変により記憶が増強されたマウスも存在する事が明らかになってきた。記憶が増強されたマウス (スーパーマウス) の初めての報告は、東京大学の真鍋らによるNociceptin受容体 (ORL1) を欠損させたマウスである[51]。その後も、予期しない形で記憶が増強されたスーパーマウスが報告されてきた (表3)。我々もcAMP系の転写因子ICER(inducible cAMP early repressor)の遺伝子改変マウスにおいて、ICER KOマウスがいわゆる記憶のスーパーマウスである事を最近明らかにした[52]。次の章では、このマウスそしてICERを過剰発現させたマウス (ICER-OE) について詳しく述べてみたい。

表3. 記憶が増強された主な遺伝子改変マウス\*

遺伝子 名称 (タンパク質名)	操作	記憶テストの成績**			神経可塑性	文献
		水迷路	恐怖条件付け			
			環境依存性	音依存性		
<b>受容体、チャネル</b>						
ORL1	KO	(+)			LTP (+)	51
NR2B	OE	(+)	(+)	(+)	LTP (+)	75
GABAA $\alpha$ 5	KO	(+)				76
GRPR	KO		(+)	(+)	LTP (+)	77
5-HT1B	KO	(+)				78
5-HT3	OE		(+)			79
Kv $\beta$ 1.1	KO	(+)			LTP (+)	80
RyR3	KO	(+)			LTP (+)	81
Adenosine (A2)	KO	(+)				82
$\alpha$ -2AR	KO			(+)		83
BEC1 (KCNH1)	KO	(+)				84
<b>キナーゼ、ホスファターゼ</b>						
CaMKIV	OE			(+)	LTP (+)	85
PP1		(+)			LTP (+)	86
inducible OE of inhibitor						
Calcineurin (PP2B)		(+)		(+)	LTP (+)	87
inducible OE of autoinhibitory domain						
<b>転写、翻訳</b>						
ICER	KO	(+) <sup>***</sup>	(+)	(+)		52, 64
ATF4, C/EBP		(+)			LTP (+)	88
inducible OE of dominant negative forms						
C/EBP $\delta$	KO		(+)			89
eIF2 $\alpha$	OE	(+)	(+)	(+)	LTP (+)	90
<b>その他</b>						
tPA	OE	(+)			LTP (+)	91
GAP43	OE	(+)			LTP (+)	92
SOD	OE	(+)			LTP (+)	93
KChIP3	KO		(+)			94
<b>グリア細胞由来</b>						
S100 $\beta$	KO	(+)	(+)		LTP (+)	95
DAAO	KO	(+)			LTP (+)	96
<b>-----</b>						
<b>小脳依存性記憶</b>						
Delphilin	KO	眼球運動 (OKR) 順応 (+)			小脳LTD (+)	97
Semaphorin	KO	運動協調性および水泳能力 (+)				98
NR2B		運動協調性 (+) (自発運動トレーニング後)				99
inducible OE in granule cells						

\*遺伝子操作により記憶が向上した主なマウスを示した。OE, overexpression、遺伝子過剰発現; KO, knockout、ノックアウト (遺伝子欠損); LTP, long-term potentiation; LTD, long-term depression

\*\* (+) は記憶テストの成績向上あるいは神経可塑性 (LTP, LTD) の増強を示す。成績はそれぞれの遺伝子改変マウスに対応する野生型と比較しての結果である。空欄は解析されていないか、解析されていても成績向上が観察されない事を示す。

\*\*\*Borlikova, Kojima and Endo, unpublished results.

3) 記憶のブレーキとしてのICER (inducible cAMP early repressor) と長期記憶[52,64]

a) cAMP系と記憶

長期記憶には転写と翻訳すなわち遺伝子の発現と新しいタンパク質の合成が必要であり[16]、シナプスの形態変化やその数の増減が関与すると考えられている[16,53]。cAMP系は進化の過程を通じて極めて良く保存されたシグナル伝達系であり[54,55]、また、アメフラシ、ショウジョウバエ等の無脊椎動物、そして、哺乳類の神経可塑性や長期記憶に重要である[56-63]。様々なタンパク質、情報伝達系が記憶に関与するが、その中でもcAMP系は各種のモデル動物において記憶への関与が詳細に研究されている[6]。

cAMPにより活性化されたPKA (cAMP-dependent protein kinase) は転写因子CREB (cAMP response element binding protein) をリン酸化し、リン酸化CREBは遺伝子上のCRE (cAMP response element) からの転写を促進する (図3A; 本誌の表紙も参照) [62,64]。同時に、リン酸化CREBはCREM遺伝子の内部プロモーター P2からICERの転写を誘導する (図3B)。転写活性ドメインを有しないICERタンパク質は遺伝子上のCREに競争的に結合することでCREBやCREMによる遺伝子転写を抑制する[52, 64]。我々はICERを欠損したマウス(ICER-KOマウス)およびICERを前脳に過剰発現させたマウス(ICER-OEマウス)を作出して、それらの一般行動や記憶を詳細に解析した[52, 64]。CREB/CREMによる遺伝子転写は、ICER-KOマウスでは過剰に起こり、一方、ICER-OEマウスでは転写が抑制される事が考えられる。

b) ICER遺伝子改変と長期恐怖記憶

快—不快、好き—嫌いなどの情動は過去の経験や社会的背景等に依存するためその解析は困難である。たとえば、筆者の好きな食べ物は読者が大嫌いである可能性がある。一方、情動の中でも不安や恐怖は種を越えて共通に観察される。マウスでは音依存性恐怖記憶やコンテク

スト (環境) 依存性恐怖記憶が一般に用いられ (図4 A)、恐怖により引き起こされる心拍数や血圧の変化、そして、すくみ反応 (フリージング反応) などを尺度として恐怖記憶は定量的に測定可能である。マウスでは、恐怖記憶の尺度としてすくみ反応測定が一般的に用いられる。

ICER-KOマウス、ICER-OEマウスともに“短期”恐怖記憶はそれぞれのコントロールマウスと有意な差はなかった。次に、“長期”恐怖記憶を解析した。ICER-OEマウスでは、24時間後、48時間後に測定した“長期”恐怖記憶が有意に減少し (図4 B)、一方、ICER-KOマウスでは“長期”恐怖記憶が、音依存性、コンテクスト依存性ともに有意に増加していた (図4 C)。すなわち、ICER量を“過剰発現 (OE) —欠損 (KO)”と反対方向に操作することにより、長期の恐怖記憶が“減弱—増強”と正反対に制御された。

マウスにおけるICER発現量の操作が短期記憶には影響を与えず長期記憶を増減させること、さらに、転写因子ICERがCREB依存性の転写活性を抑制することを考慮すると、ICERの発現量操作は長期記憶に必要なCREB依存性の遺伝子発現に影響を及ぼした結果マウスの長期恐怖記憶において正反対の表現型を与えたと考えられる[52,64]。神経可塑性やエビレプシーのモデルとして考えられているキンドリングや水迷路課題でもこのような正反対の表現型が観察される事から[52,64; Borlikova, 児島, 遠藤, 未発表], ICERは転写機能を通じて、長期記憶を抑制する極めて重要な因子であると考えられる。

さて、ICERは誘導型の分子、すなわち、通常は発現が見られず神経活動に伴い発現が誘導され(図3)、過剰な記憶形成にブレーキをかけるという重要な生理的役割を果たすと考えられる[52,64]。過剰な恐怖記憶はPTSD(post-traumatic stress disorder)を引き起こし日常生活を妨害することがある[65]。それゆえ、我々の身体にあらかじめ過剰な記憶を防ぐブレーキが備えられ、そのおかげで適度な記憶が形成される。この機構は生体にとってきわめて重要である。

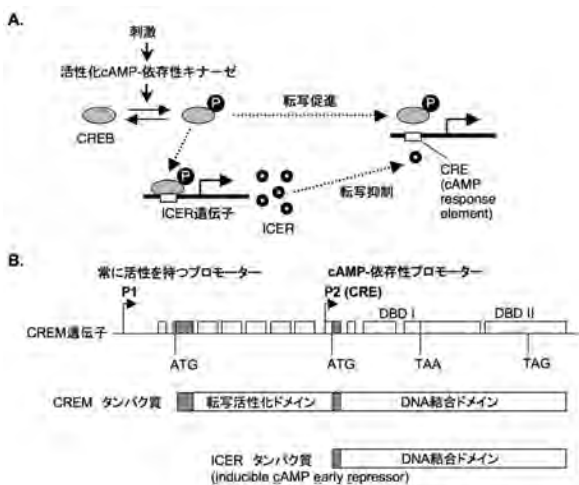


図3 CREBとICERによる遺伝子活性化の制御(A)とCREM遺伝子の構造とCREMおよびICERタンパク質のドメイン構造(B)

A. 神経活動等により活性化されたcAMP依存性キナーゼによりCREB(cAMP response element binding protein)がリン酸化される。リン酸化されたCREBはCRE(cAMP response element)依存的に遺伝子Xの転写を活性化する。一方、リン酸化CREBはICER(inducible cAMP early repressor)の転写をも活性化してICERタンパク質が合成される。合成されたICERはリン酸化CREBと競争的にCREに結合するが、ICERは転写活性化能を有しないために、結果としてリン酸化CREBによる遺伝子Xの転写を抑制する。このシステムにより、時間的、空間的な遺伝子発現制御が達成される。Pはリン酸基。

B. CREM類は常時活性を持つプロモーター P1から転写される。一方ICERはCREM遺伝子内部に存在するcAMP依存性プロモーター P2(CREを4つ含む)から転写される。CREM類はDNA結合ドメインと転写活性化ドメインを有する。一方、P2から転写されるICER類は、DNA結合ドメイン(DBD IとDBD IIのどちらか一方)のみを有する。ICERはCREに結合するが転写活性を有しないためにリン酸化CREM/CREB類の阻害剤として機能する。DBDはDNA結合ドメイン(DNA binding domain)。翻訳開始点をATGで、ストップコドンでTAA、TAGで示した。

ICERのような内在性の“記憶ブレーキ”の発見は、記憶が障害される老化や疾病等の治療に対して、どのようにアタックするかのヒントを与えてくれる。すなわち、「記憶のブレーキをはずせば記憶が増強される」という仮説である。次の章ではこの事について考察する。

#### 4. 未来—記憶増強マウスが教える記憶障害治療への手がかり

様々な疾病による記憶の障害が報告されている[1-4]。さらに、全ての人が経験する老化や老化に伴う各種の疾患でも記憶障害が報告されている[66]。特に老化に伴う記憶障害を改善する事、あるいは、記憶障害が始まる時期を少しでも遅らせる事は、急速に高齢人口が増加する現代社会において、きわめて緊急度の高い課題である。現在の多くの研究では、疾病の原因遺伝子や原因となるタンパク質の同定が精力的にすすめられ、その結果を基礎にした病態モデルマウスの作出も行われている。しかし、一つの疾病が複数遺伝子の変異に起因することも多数報告されており、遺伝子変異の結果を直接治療に結びつける事は容易ではない。

そこで考えられるのは、これまでの研究で得られてきた遺伝子改変個体において、遺伝子Xの欠損が記憶増強を引き起こした時には、「遺伝子Xの生理機能を阻害あるいは減少させる事で記憶改善が可能であろう」というシンプルな考え方である(図5)。筆者はこれまでに全く異なる2つの遺伝子の欠損が記憶の増強を引き起こす事を見だしている[52, 64, 67]。

表3に記憶が増強された遺伝子改変マウスを抜粋して示した。これら、遺伝子欠損、過剰発現を引き起こす分子には、プレシナプス、ポストシナプスに存在する分子群、CREBを含めた遺伝子発現制御に関わる分子群、あるいは、グリア細胞に存在する分子群も含まれる。これらの分子群を阻害あるいは活性化したりする事で、記憶

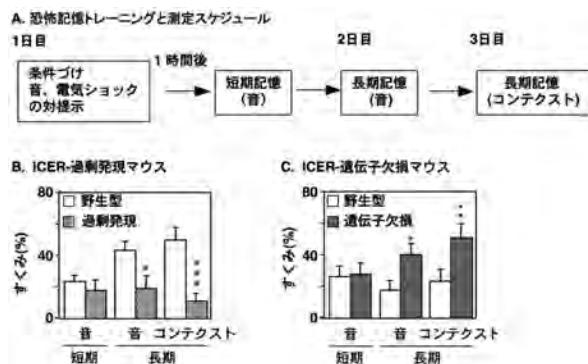


図4 ICER過剰発現マウスとICER欠損マウスの恐怖記憶

- A. 恐怖記憶形成のトレーニング  
音と電気ショックをマウスに対提示して条件付けを行う。条件付け1時間後に音依存性の短期恐怖記憶を測定する。2日目に音依存性の長期記憶を、3日目にコンテキスト(環境)依存性の長期記憶を測定する。恐怖記憶の測定は、条件付け時と同じ音あるいはコンテキストを提示したときのすくみ反応(フリージング反応)を測定する事で行った。
- B. ICER過剰発現マウス(ICER-OE)における恐怖記憶
- C. ICER欠損マウス(ICER-KO)における恐怖記憶  
縦軸は測定時間(1分間)中のすくみ反応の割合を示す。  
\*、P<0.05; \*\*、P<0.01; \*\*\*、P<0.001。

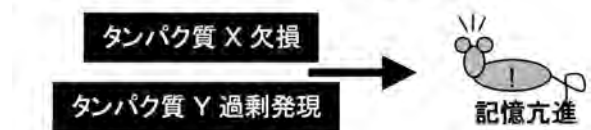
を調節できる可能性を示している。たとえば、ICERの記憶ブレーキ効果を弱める薬物は記憶増強作用を有するであろうことが期待される(図5)。

しかし、上記のアプローチをもとにした薬物の開発は、困難も予想される。そのひとつは、常に細胞に存在する酵素群や結合タンパク質群を薬物標的とする場合である。薬物は常在タンパク質の性質を恒常的に変化させる事になり、生体への副作用が懸念される。そこで重要なターゲットになりうるのが、誘導性タンパク質群である。たとえば本総説で詳述したICERは通常はほとんど観察されないが、記憶を形成する刺激、すなわち、神経活動により発現が誘導される[52,64]。それゆえ、ICERの機能を薬物等で阻害しても副作用が少ないことが予想される。ICERの機能を抑制する薬物は記憶障害改善のためにきわめて有望である。このように、記憶が増強された遺伝子改変動物を新しい観点から見直すことにより、記憶を増強する遺伝子の組み合わせを考えることができる。将来、これらの遺伝子を活性化(阻害)する薬物や生理的刺激が発見されて、記憶障害克服に応用される事を望みたい。

#### 5. おわりに

膨大な量の記憶や神経可塑性に関する研究にも関わらず、脊椎動物において記憶に必要な神経回路が全て明らかにされ、記憶痕跡が確定された例は未だ存在しない。近年の各種のイメージングシステムの発展はPETやfMRIの精度や分解能を格段に進歩させ、ネットワークレベルでの記憶の研究に大きく寄与している。さらに、電子顕微鏡を用いて何億枚という写真を撮り、脳の全神経回路網を再構築しようという大胆な提案もなされている[65]。これらの研究を通じて、記憶が脳内の神経ネッ

#### A. 遺伝子改変マウスにより得られた結果



#### B. 記憶障害治療への応用の可能性



図5 遺伝子改変マウスと記憶障害治療への応用

- A. 遺伝子Xを欠損させて記憶増強がもたらされた時には、遺伝子Xの生理機能を阻害あるいは減少させる事で記憶改善が可能であり、一方、遺伝子Yの過剰発現により記憶増強が観察された時には、Yを活性化する事で記憶増強が可能であろうと考えられる。
- B. Aにおいて観察されたXあるいはYの記憶に対する効果を基礎にして、標的分子(X、Y)の酵素活性を阻害あるいは活性化、結合の強弱を制御する事により記憶を調節できる可能性がある。たとえば、本文で述べた記憶ブレーキICERの機能を弱める薬物は、記憶を増強することが期待される。

トワークのどこに存在するのか、そして、記憶がどのような形で保存されているのかという根本的な問題が明らかにされる日が近いのかもしれない。

また、分子レベルでは、DNA配列解読技術の進歩は目覚ましく、ギガシークエンサー (giga sequencer; 次世代シークエンサー, next generation sequencer) を用いることで、ひとりの遺伝子配列解読を安価でかつ数日で完了できるようになった。このことは、個人の遺伝子配列解析から疾病の原因遺伝子の情報が得られ、生後すぐに、いや、受精後すぐに、将来の疾病リスク、がんリスク等がわかる時代が来る事を意味する[70,71]。次世代シークエンサーが与える膨大な情報は、記憶障害を引き起こす遺伝子の同定そして記憶に関与する遺伝子の発現制御解析などにも大きな力を発揮すると考えられる。疾病や老化に伴う記憶障害にこれらの手法が融合的に用いられ、治療に結びつけられる日が来る事を切に望みたい。その時には、老化に伴う記憶や認知機能が改善され、高齢者の質の高い生活、すなわち、サクセスフルエイジングへの大きな希望が見えてくるはずである。

## 追記

本総説執筆中に、ここ数十年ほどの記憶研究について Kandel [72] と Squire [73] が、また、Silva が、遺伝子改変マウスと記憶障害治療について [74]、それぞれ総説を発表した。本総説に加えそちらも参照いただきたい。

## 謝辞

本総説執筆の機会を与えてくださいました、東京都健康長寿医療センター (東京都老人研)、丸山直記先生、重本和宏先生に感謝いたします。初稿を読んでもういただきました鈴木真佐子氏に感謝いたします。

## 引用文献

1. Kidd PM. Alzheimer's disease, amnesic mild cognitive impairment, and age-associated memory impairment: current understanding and progress toward integrative prevention. *Altern Med Rev* 13:85-115, 2008.
2. Danion JM, Huron C, Vidailhet P, Berna F. Functional mechanisms of episodic memory impairment in schizophrenia. *Can J Psychiatry* 52:693-701, 2007.
3. Pfennig A, Littmann E, Bauer M. Neurocognitive impairment and dementia in mood disorders. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 19:373-82, 2007.
4. Tröster AI. Neuropsychological characteristics of dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease with dementia: differentiation, early detection, and implications for "mild cognitive impairment" and biomarkers. *Neuropsychol Rev* 18:103-19, 2008.
5. Plato, Phaedrus, 274e-275b; <http://www.davemckay.co.uk/philosophy/plato/plato.php?name=phaedrus&trns=jowett>  
以下、同様にギリシャ語の文献については英訳されている参考文献を記した。  
文献は引用したインターネットサイトで自由に読むことができる。
6. 鈴木繁男、記号学の胎動：ギリシャ・ローマ時代における記憶技芸の系譜、名古屋大学言語文化論集21、69-110、1999
7. Plato, Timaeus 43c; Plato's Cosmology, edited by Francis M. Conford, Hackett Publishing Co. Indianapolis, 1997, p148. <http://www.davemckay.co.uk/philosophy/plato/plato.php?name=timaeus&trns=jowett>
8. Plato, Cratylus 437b; Plato. Plato in Twelve Volumes, Vol. 12 translated by Harold N. Fowler. Cambridge, MA, Harvard University Press, 1921, p. <http://www.davemckay.co.uk/philosophy/plato/plato.php?name=cratylus&trns=jowett>
9. Plato, Theaetetus ,191c-d; Plato 3, The Dialogues Second and Third Periods, translated by Paul Friedlander, Chapter XXIII, Theaetetus, 1969, PP181-182. <http://www.davemckay.co.uk/philosophy/plato/plato.php?name=theaetetus&trns=jowett>
10. Aristotle, On Metaphysics, Book I, Chapter I, translated by W.D. Ross. <http://www.davemckay.co.uk/philosophy/aristotle/aristotle.php?name=metaphysics.ross.01>
11. Aristotle, On Memory and Reminiscence translated by J. I. Beare; <http://www.davemckay.co.uk/philosophy/aristotle/aristotle.php?name=on.memory.and.reminiscence.beare>
12. Ueda M, Nakamura Y, and Okada M. Endogenous factors involved in the regulation of movement and "memory" in plants, *Pure and Applied Chemistry* 79: 513-521, 2007.
13. Aristotle, On Sleep and Sleeplessness, Part III, translated by J. I. Beare; <http://www.davemckay.co.uk/philosophy/aristotle/aristotle.php?name=on.sleep.and.sleeplessness.beare>
14. Finger S. Origin of Neuroscience, New York, Oxford University Press, 1994.
15. Ebbinghaus H. Memory: A Contribution to Experimental Psychology, translated by Henry A. Ruger & Clara E. Bussenius, 1885.

- <http://psy.ed.asu.edu/~classics/Ebbinghaus/index.htm>
16. Kandel ER. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Biosci Rep* 21: 565-611, 2001.
  17. Bailey CH, Chen M. Long-term memory in *Aplysia* modulates the total number of varicosities of single identified sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 2373-2377, 1988.
  18. Bailey CH, Kandel ER, Si K. The persistence of long-term memory: A molecular approach to self-sustaining changes in learning-induced synaptic growth. *Neuron* 44: 49-57, 2004.
  19. Maguire EA, Gadian DG, Johnsrude IS, Good CD, Ashburner J, Frackowiak RS, Frith CD. Navigation-related structural change in the hippocampi of taxi drivers. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4398-4403, 2000.
  20. Draganski B, Gaser C, Busch V, Schuierer G, Bogdahn U, May A. Neuroplasticity: changes in grey matter induced by training. *Nature* 427: 311-312, 2004.
  21. Mechelli A, Crinion JT, Noppeney U, O'Doherty J, Ashburner J, Frackowiak RS, Price CJ. Neurolinguistics: structural plasticity in the bilingual brain. *Nature* 431: 757, 2004
  22. Taylor JR, Olausson P, Quinn JJ, Torregrossa MM. Targeting extinction and reconsolidation mechanisms to combat the impact of drug cues on addiction. *Neuropharmacology*. 56 :186-195, 2009.
  23. Heim C, Nemeroff CB. Neurobiology of post-traumatic stress disorder. *CNS Spectr*. 14:13-24, 2009.
  24. Squire LR, Zola SM. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 13515-13522, 1996.
  25. Gazzaniga MS. *The Cognitive Neuroscience*. New York: WW Norton & Co., 2002
  26. Hebb, D.O. *The organization of behavior*. New York: Wiley and Sons, 1949.
  27. Penfield W. *The Excitable Cortex in Conscious Man*. Liverpool University Press. Liverpool, 1985.
  28. Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurochem* 20: 11-21, 1957.
  29. Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361: 31-39, 1993.
  30. Ito M. Cerebellar long-term depression: characterization, signal transduction, and functional roles. *Physiol Rev* 81: 1143-1195, 2001.
  31. Malenka RC, Bear MF. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44: 5-21, 2004.
  32. Lynch MA. Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* 84: 87-136, 2004.
  33. Popov VI, Davies HA, Rogachevsky VV, Patrushev IV, Errington ML, Gabbott PL, Bliss TV, Stewart MG. Remodelling of synaptic morphology but unchanged synaptic density during late phase long-term potentiation (LTP): a serial section electron micrograph study in the dentate gyrus in the anaesthetised rat. *Neuroscience* 128: 251-262, 2004.
  34. Bliss TV, Collingridge GL, Morris RG. Introduction. Long-term potentiation and structure of the issue. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358: 607-611, 2003.
  35. Mulkey RM, Endo S, Shenolikar S, Malenka RC. Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature* 369: 486-488, 1994.
  36. Newpher TM, Ehlers MD. Glutamate receptor dynamics in dendritic microdomains. *Neuron* 58, 472-497, 2008.
  37. Malenka RC. Synaptic plasticity and AMPA receptor trafficking. *Ann NY Acad Sci* 1003, 1-11, 2003.
  38. Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW, Kida S. CREB and memory. *Annu Rev Neurosci* 21, 127-148, 1998.
  39. Klann E, Dever TE. Biochemical mechanisms for translational regulation in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 5, 931-942, 2004.
  40. Holmes G. The cerebellum of man. *Brain* 62: 1-30, 1939.
  41. Dow R, Moruzzi G. *The physiology and pathology of the cerebellum*. Minneapolis: University of Minnesota Press, 1958.
  42. Ito M. *The cerebellum and Neural Control*. New York: Raven Press, 1984.
  43. Albus JS. A theory of cerebellar function. *Math Biosci* 10: 25-61, 1971.
  44. Marr D. A theory of cerebellar cortex. *J Physiol* 202: 437-470, 1969.
  45. Ito M, Sakurai M, Tongroach P. Climbing fibre induced depression of both mossy fibre responsiveness and glutamate sensitivity of cerebellar Purkinje cells. *J Physiol* 324: 113-134, 1982.
  46. Ito M. Cerebellar long-term depression: characterization, signal transduction, and functional roles. *Physiol Rev* 81: 1143-1195, 2001.
  47. Ito M. Long-term depression. *Annu Rev Neuro-*

- sci 12: 85-102, 1989.
48. Mayford M, Kandel ER. Genetic approaches to memory storage. *Trends Genet* 15: 463-470, 1999.
  49. Morozov A, Kellendonk C, Simpson E, Tronche F. Using conditional mutagenesis to study the brain. *Biol Psychiatry* 54: 1125-1133, 2003.
  50. Ito M. Mechanisms of motor learning in the cerebellum. *Brain Res* 886: 237-245, 2000.
  51. Manabe T, Noda Y, Mamiya T, Katagiri H, Houtani T, Nishi M, Noda T, Takahashi T, Sugimoto T, Nabeshima T, Takeshima H. Facilitation of long-term potentiation and memory in mice lacking nociceptin receptors. *Nature* 394: 577- 581, 1998.
  52. Kojima N, Borlikova G, Sakamoto T, Yamada K, Ikeda T, Itohara S, Niki H, Endo S. Inducible cAMP early repressor acts as a negative regulator for kindling epileptogenesis and long-term fear memory. *J Neurosci* 28:6459-6472, 2008.
  53. Mayford M, Kandel ER. Genetic approaches to memory storage. *Trends Genet* 15: 463-470, 1999.
  54. Frank DA, Greenberg ME. CREB: a mediator of long-term memory from mollusks to mammals. *Cell* 79:5-8, 1994.
  55. Lonze BE, Ginty DD. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35: 605-623, 2002.
  56. Bourtchuladze R, Frenguelli B, Blendy J, Cioffi D, Schutz G, Silva AJ. Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell* 79:59-68, 1994.
  57. Yin JC, Wallach JS, Del Vecchio M, Wilder EL, Zhou H, Quinn WG, et al. Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in *Drosophila*. *Cell* 79:49-58, 1994.
  58. Bartsch D, Ghirardi M, Skehel PA, Karl KA, Herder SP, Chen M, et al. *Aplysia* CREB2 represses long-term facilitation: relief of repression converts transient facilitation into long-term functional and structural change. *Cell* 83:979-992, 1995.
  59. Schulz S, Siemer H, Krug M, Holtt V. Direct evidence for biphasic cAMP responsive element-binding protein phosphorylation during long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vivo. *J Neurosci* 19:5683-5692, 1999.
  60. Barco A, Alarcon JM, Kandel ER. Expression of constitutively active CREB protein facilitates the late phase of long-term potentiation by enhancing synaptic capture. *Cell* 108:689-703, 2002.
  61. Alberini CM, Ghirardi M, Huang YY, Nguyen PV, Kandel ER. A molecular switch for the consolidation of long-term memory: cAMP-inducible gene expression. *Ann N Y Acad Sci* 758:261-286, 1999.
  62. Josselyn SA, Nguyen PV. CREB, synapses and memory disorders: past progress and future challenges. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 4: 481-497, 2005.
  63. Wu H, Zhou Y, Xiong ZQ. Transducer of regulated CREB and late phase long-term synaptic potentiation. *FEBS J* 274:3218-3223, 2007.
  64. Borlikova G, Endo S. Inducible cAMP early repressor (ICER) and brain functions. *Mol Neurobiol* 40: 73-86, 2009.
  65. Heim C, Nemeroff CB. Neurobiology of post-traumatic stress disorder. *CNS Spectr* 14:13-24, 2009.
  66. Rosenzweig ES, Barnes CA. Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Prog Neurobiol* 69:143-179, 2003.
  67. Nishiyama H, Knopfel T, Endo S, Itohara S. Glial protein S100B modulates long-term neuronal synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 4037-4042, 2002.
  68. Poeppel TD, Krause BJ. Functional imaging of memory processes in humans: positron emission tomography and functional magnetic resonance imaging. *Methods* 44: 315-328, 2008.
  69. Anderson JR, Jones BW, Yang JH, Shaw MV, Watt CB, Koshevoy P, Spaltenstein J, Jurrus E, U V K, Whitaker RT, Mastronarde D, Tazdizen T, Marc RE. A computational framework for ultrastructural mapping of neural circuitry. *PLoS Biol* 7: e1000074, 2009.
  70. Avent ND, Madgett TE, Maddocks DG, Soot-hill PW. Cell-free fetal DNA in the maternal serum and plasma: current and evolving applications. *Curr Opin Obstet Gynecol* 21:175-179, 2009.
  71. Toyota M, Suzuki H, Yamashita T, Hirata K, Imai K, Tokino T, Shinomura Y. Cancer epigenomics: implications of DNA methylation in personalized cancer therapy. *Cancer Sci* 100:787-791, 2009.
  72. Eric R. Kandel. The Biology of Memory: A Forty-Year Perspective. *J Neurosci* 29: 12748-12756, 2009.



73. Larry R. Squire. Memory and Brain Systems: 1969– 2009. *J Neurosci* 29: 12711-12716, 2009.
74. Lee YS, Silva AJ. The molecular and cellular biology of enhanced cognition. *Nat Rev Neurosci* 10:126-140, 2009.
75. Tang YP, Shimizu E, Dube GR, Rampon C, Kerchner GA, Zhuo M, Liu G, Tsien JZ. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* 401:63-69, 1999.
76. Collinson N, Kuenzi FM, Jarolimek W, Maubach KA, Cothliff R, Sur C, Smith A, Otu FM, Howell O, Atack JR, McKernan RM, Seabrook GR, Dawson GR, Whiting PJ, Rosahl TW. Enhanced learning and memory and altered GABAergic synaptic transmission in mice lacking the alpha 5 subunit of the GABAA receptor. *J Neurosci* 22:5572-5580, 2002.
77. Shumyatsky GP, Tsvetkov E, Malleret G, Vronskaya S, Hatton M, Hampton L, Battey JF, Dulac C, Kandel ER, Bolshakov VY. Identification of a signaling network in lateral nucleus of amygdala important for inhibiting memory specifically related to learned fear. *Cell* 111: 905-918, 2002.
78. Malleret G, Hen R, Guillou JL, Segu L, Buhot MC. 5-HT1B receptor knock-out mice exhibit increased exploratory activity and enhanced spatial memory performance in the Morris water maze. *J Neurosci* 19:6157-6168, 1999.
79. Harrell AV, Allan AM. Improvements in hippocampal-dependent learning and decremental attention in 5-HT3 receptor overexpressing mice. *Learn Mem* 10:410-419, 2003.
80. Murphy GG, Fedorov NB, Giese KP, Ohno M, Friedman E, Chen R, Silva AJ. Increased neuronal excitability, synaptic plasticity, and learning in aged Kvbeta1.1 knockout mice. *Curr Biol* 14:1907-1915, 2004.
81. Futatsugi A, Kato K, Ogura H, Li ST, Nagata E, Kuwajima G, Tanaka K, Itohara S, Mikoishiba K. Facilitation of NMDAR-independent LTP and spatial learning in mutant mice lacking ryanodine receptor type 3. *Neuron* 124:701-713, 1999.
82. Zhou SJ, Zhu ME, Shu D, Du XP, Song XH, Wang XT, Zheng RY, Cai XH, Chen JF, He JC. Preferential enhancement of working memory in mice lacking adenosine A(2A) receptors. *Brain Res* 1303:74-83, 2009.
83. Davies MF, Tsui JY, Flannery JA, Li X, DeLorey TM, Hoffman BB. Augmentation of the noradrenergic system in alpha-2 adrenergic receptor deficient mice: anatomical changes associated with enhanced fear memory. *Brain Res* 986:157-165, 2003.
84. Disruption of the ether-a-go-go K<sup>+</sup> channel gene *BEC1/KCNH3* enhances cognitive function. Miyake A, Takahashi S, Nakamura Y, Inamura K, Matsumoto S, Mochizuki S, Katou M. *J Neurosci.* 29:14637-14645, 2009.
85. Fukushima H, Maeda R, Suzuki R, Suzuki A, Nomoto M, Toyoda H, Wu LJ, Xu H, Zhao MG, Ueda K, Kitamoto A, Mamiya N, Yoshida T, Homma S, Masushige S, Zhuo M, Kida S. Upregulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV improves memory formation and rescues memory loss with aging. *J Neurosci* 28:9910-9919, 2008.
86. Genoux D, Haditsch U, Knobloch M, Michalon A, Storm D, Mansuy IM. Protein phosphatase 1 is a molecular constraint on learning and memory. *Nature* 418:970-975, 2002.
87. Malleret G, Haditsch U, Genoux D, Jones MW, Bliss TV, Vanhose AM, Weitlauf C, Kandel ER, Winder DG, Mansuy IM. Inducible and reversible enhancement of learning, memory, and long-term potentiation by genetic inhibition of calcineurin. *Cell* 104:675-686, 2001.
88. Chen A, Muzzio IA, Malleret G, Bartsch D, Verbitsky M, Pavlidis P, Yonan AL, Vronskaya S, Grody MB, Cepeda I, Gilliam TC, Kandel ER. Inducible enhancement of memory storage and synaptic plasticity in transgenic mice expressing an inhibitor of ATF4 (CREB-2) and C/EBP proteins. *Neuron* 39:655-669, 2003.
89. Sterneck E, Paylor R, Jackson-Lewis V, Libbey M, Przedborski S, Tessarollo L, Crawley JN, Johnson PF. Selectively enhanced contextual fear conditioning in mice lacking the transcriptional regulator *CCAAT/enhancer binding protein delta*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:10908-10913, 1998.
90. Costa-Mattioli M, Gobert D, Stern E, Gamahe K, Colina R, Cuello C, Sossin W, Kaufman R, Pelletier J, Rosenblum K, Krnjević K, Lacaillle JC, Nader K, Sonenberg N. eIF2alpha phosphorylation bidirectionally regulates the switch from short- to long-term synaptic plasticity and memory. *Cell* 129:195-206, 2007.
91. Madani R, Hulo S, Toni N, Madani H, Steimer T, Muller D, Vassalli JD. Enhanced hippocampal long-term potentiation and learning by increased neuronal expression of tissue-

- type plasminogen activator in transgenic mice. *EMBO J* 18:3007-3012, 1999.
92. Routtenberg A, Cantalalops I, Zaffuto S, Serrano P, Namgung U. Enhanced learning after genetic overexpression of a brain growth protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97:7657-7662, 2000.
  93. Hu D, Serrano F, Oury TD, Klann E. Aging-dependent alterations in synaptic plasticity and memory in mice that overexpress extracellular superoxide dismutase. *J Neurosci* 26:3933-3941, 2006.
  94. Alexander JC, McDermott CM, Tunur T, Rands V, Stelly C, Karhson D, Bowlby MR, An WF, Sweatt JD, Schrader LA. The role of calsenilin/DREAM/KChIP3 in contextual fear conditioning. *Learn Mem* 16:167-177, 2009.
  95. Nishiyama H, Knopfel T, Endo S, Itohara S. Glial protein S100B modulates long-term neuronal synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:4037-4042, 2002.
  96. Maekawa M, Watanabe M, Yamaguchi S, Konno R, Hori Y. Spatial learning and long-term potentiation of mutant mice lacking D-amino-acid oxidase. *Neurosci Res* 53:34-38, 2005.
  97. Takeuchi T, Ohtsuki G, Yoshida T, Fukaya M, Wainai T, Yamashita M, Yamazaki Y, Mori H, Sakimura K, Kawamoto S, Watanabe M, Hirano T, Mishina M. Enhancement of both long-term depression induction and optokinetic response adaptation in mice lacking delphinin. *PLoS One* 3:e2297, 2008.
  98. Yukawa K, Tanaka T, Takeuchi N, Iso H, Li L, Kohsaka A, Waki H, Miyajima M, Maeda M, Kikutani H, Kumanogoh A. Sema4D/CD100 deficiency leads to superior performance in mouse motor behavior. *Can J Neurol Sci* 36:349-355, 2009.
  99. Jiao J, Nakajima A, Janssen WG, Bindokas VP, Xiong X, Morrison JH, Brorson JR, Tang YP. Expression of NR2B in cerebellar granule cells specifically facilitates effect of motor training on motor learning. *PLoS One* 3:e1684, 2008.

“Memory-enhanced mice provide clues to treatments of memory impairment.”

Shogo Endo

Aging Regulation Research Team  
Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital and Institute of Gerontology  
(Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology)  
Sakae-cho 35-2, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, Japan

Memory has been a subject of research for philosophy and psychology for a long time because of its essential nature of human behaviors and thoughts. Localization of memory in the brain was proved only six decades ago, and the existence of flexibility of neuronal network (neuronal plasticity) was scientifically established a few decades ago. Recently, we are able to approach the molecular mechanisms underlying memory using genetically-modified animals thanks to the great advances in molecular biology. In this review, I unwind the memory of memory research in philosophy and give a brief description on the general concept of memory in psychology. Further, I discuss our genetically-modified mice with enhanced memory. In addition, I comment that the mice with enhanced memory will provide potential clues to overcome memory deficits associated with aging, diseases and traumas.

【総 説】

加齢に伴う侵害受容機構の変化

鈴木郁子、岩田幸一  
日本大学歯学部生理学教室

キーワード：Pain, aging, descending inhibitory system, nociceptive neuron

要約

老齢ラットを用いて侵害性行動、脊髄後角（DH）および三叉神経脊髄路核尾側亜核（Vc）に分布する侵害受容ニューロン活動について解析し、成熟ラットと比較したところ、以下のような結果を得た。1）侵害的熱刺激に対する四肢のひっこめ反射が起こるまでの時間は老齢ラットにおいて有意に短かった。これに対し、熱刺激後に誘導されるリッキング行動の発現率は老齢ラットにおいて有意に少なかった。2）DHに分布する侵害受容ニューロンの安静時および侵害刺激中の活動は老齢ラットにおいて有意に高い値を示した。3）DH侵害受容ニューロン活動は脊髄ブロックにより、成熟ラットでは増大したのに対し、老齢ラットにおいては全く変化を示さなかった。4）成熟ラットでは、ナロキソン投与により活性型のVc侵害受容ニューロン数が増加したのに対し、老齢ラットにおいては変化が認められなかった。

以上から、老齢ラットにおいては下行性抑制系の機能不全が誘導され、DHおよびVcに存在する侵害受容ニューロン活動が増強し、侵害性反射が亢進した可能性が示された。

はじめに

加齢は末梢神経および中枢神経系に対し、様々な変化を誘導すると言われている [1,2,3]。加齢の運動機能への影響に関する研究結果から、運動神経線維の脱髄が老齢ラットの運動機能障害に対する原因の一つである可能性が報告された [4,5]。末梢神経線維の脱髄は、有髄神経線維における活動電位の伝導速度の低下を生じ、運動機能低下を誘導すると考えられている [6]。また、加齢によるシナプス伝達の障害も運動機能変化の一因であるとされているが、その詳細については不明である。

痛覚も加齢により強く影響されるものの一つであるとされているにもかかわらず、痛覚と加齢に関する研究は少ない。特に、加齢に伴う痛覚受容メカニズムに関して、動物実験による基礎研究はほとんどない。これまで、ヒトを対象とした心理学的研究により、加齢に伴って疼痛閾値が上昇するという報告、あるいは全く逆に低下するという報告があり、加齢と痛みの関係については一定した見解が得られておらず、その神経機構に関してはほとんど明らかにされていない。

本稿では、これまでに行ってきた加齢と疼痛に関する動物実験の結果を中心に紹介し、老化によって誘導される痛覚異常の神経機構について考察したい。

1. 老齢ラットの逃避行動

これまでの運動機能に対する老化の影響を調べた研究によると、Fisher系ラットは25ヶ月齢以後、急激に運動機能が低下するといわれ、25ヶ月齢より高齢のラットが老齢ラットとして研究に用いられることが多い [5]。そこで、我々の研究では、生後7-13ヶ月齢のFisher系ラットを成熟群、28-34ヶ月齢のラットを老齢群として研究を進めている。

まず、侵害性行動に対する老化の影響を明らかにするため、老齢および成熟ラットの後肢に侵害的熱刺激を与え逃避反応が起こるまでの時間を測定した [7]。図1Aに示したように、老齢ラットの熱刺激に対する逃避時間は成熟ラットに比べ有意に短かった。これは、老齢ラット

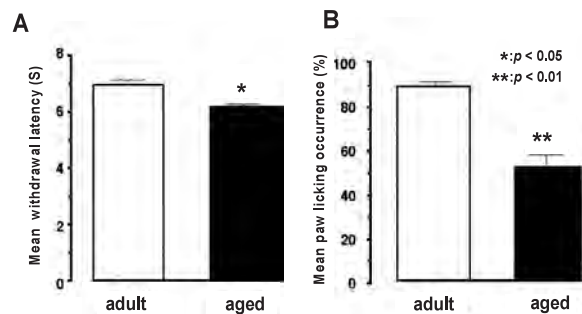


図1  
老齢および成熟ラットにおける侵害熱刺激に対する逃避行動  
A：後肢に熱刺激を与えてから、引っ込めるまでの時間  
B：後肢に熱刺激を与えたとき、後肢のリッキングを示したラットの割合  
(Iwata et al. J Neurophysiol 2002より改変)

連絡先：〒101-8310  
東京都千代田区神田駿河台1-8-13  
TEL: 03-3219-8112  
FAX: 03-3219-8341  
E-mail: iwata-k@dent.nihon-u.ac.jp

において、何らかのメカニズムで侵害反射の機能亢進が起こっている可能性があることを意味している。また、侵害刺激後のリッキング行動の誘導には大脳皮質を含む上位中枢が必要であるといわれており、リッキング行動が痛み認知の指標となる可能性があると考えられる。そこで、我々は熱刺激による後肢のリッキング発現率を成熟ラットと比較し、さらに検討を加えた。その結果、老齢ラットでは成熟ラットに比べ熱刺激によって誘導されるリッキング発現率は有意に低い値を示した(図1B)。これらの行動実験の結果から、老齢ラットは侵害刺激に対してより敏感に反応するにもかかわらず、痛みの認知機能は低下している可能性があることが示された。では何故、侵害反射が亢進され、疼痛認知機能が低下するのであろうか。この行動学実験から得られた研究結果の神経メカニズムを解明するために、脊髄後角から単一神経活動を導出し、その生理学的性質を詳細に調べた。

## 2. 脊髄後角侵害受容ニューロンの機能変化

老齢ラットの脊髄後角(DH)に存在する侵害受容ニューロンの活動性変化について詳細な検討を加えた。まず、老齢ラットの脊髄後角から単一侵害受容ニューロン活動を記録し、詳細な電気生理学的検索を行った。DHから後肢の侵害刺激に反応する単一ニューロン活動を導出し、自発活動および温度刺激に対する応答特性変化について解析を行った。その結果、老齢ラットDHの侵害受容ニューロン活動は成熟ラットに比べ、有意に高い自発放電頻度および温度刺激に対する有意に強い誘発反応を示した[7]。さらに、このような老齢ラットにおけるDH侵害受容ニューロン活動の増強には、脊髄における下行性抑制系機能変化が関与する可能性が考えられる。そこで本研究では胸髄レベルで脊髄ブロックを行い腰髄侵害受容ニューロン活動の応答性変化についても解析を行った。胸髄レベルで脊髄ブロックを行うと、成熟ラットにおいては有意な熱刺激に対する応答性の増加を認めたが、老齢ラットにおいてはほとんど応答性の変化を示さなかった(図2)。この結果は、老齢ラットが下行性抑制系の機能不全を起こし、結果的にDH侵害受容ニューロン活動の増強が誘導された可能性を示している。

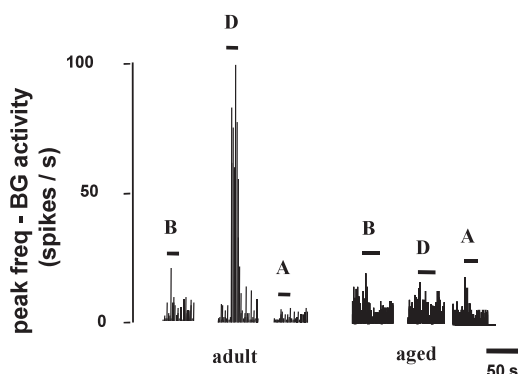


図2 脊髄ブロックによる後角侵害受容ニューロンの反応性変化  
B: 脊髄ブロック前の熱刺激(48°C)に対する反応  
D: 脊髄ブロック中の熱刺激に対する反応A:熱刺激5分後の反応(Iwata et al. J Neurophysiol 2002より改変)

さらに、我々は下行性抑制系に関与するセロトニンおよびノルアドレナリン合成酵素含有神経線維について免疫組織学的に検討を加えた。その結果、老齢ラットでは成熟ラットに比べ両神経線維の有意な減少が認められた[7]。以上の結果から、老齢ラットにおいて観察された脊髄後角侵害受容ニューロンの活動性増強には、下行性抑制系の機能不全およびセロトニンやノルアドレナリンの放出量減少が強く関与すると考えられる。

## 3. 顔面皮膚の侵害刺激によって三叉神経脊髄路核尾側亜核(Vc)に発現するpERK陽性細胞の動態

最近、脊髄後角あるいは三叉神経脊髄路核尾側亜核ニューロンにおいて、MAP kinaseの一つであるextracellular signal-regulated kinase (ERK)が侵害刺激後5分以内にリン酸化され、侵害刺激によって発現したpERK陽性細胞数は刺激強度依存的に増加すると報告されている[8,9]。最近、我々の研究室で得られた結果によると、末梢組織の侵害刺激後、リン酸化ERKとFos様タンパクが延髄後角に存在する多くの細胞において共発現していた。これは、侵害刺激により細胞が活性化され、次いでERKがリン酸化されることにより、それより下流の細胞内情報伝達系の活性化が進む可能性を示している[8,9]。このことから、ERKのリン酸化は侵害刺激により活性化されたニューロンの指標として有用であると考えられている。そこで、pERKをニューロン活性化のマーカーとし、加齢に伴う侵害情報伝達機構の変化について免疫組織学的手法を用いて検討した。

我々は老齢および成熟ラットの口髭部へのカプサイシン注入によりVcに認められるpERK陽性細胞について解析を行った[10]。その結果、pERK陽性細胞はVc領域の表層に限局して認められ、その発現数は老齢ラットの方が成熟ラットに比べ、わずかに多い傾向を示した(図3A、BおよびE)。さらに、下行性抑制系を活性化させるオピオイド拮抗薬であるナロキソン投与の影響について検討した。ナロキソン投与により、成熟ラットにおいては

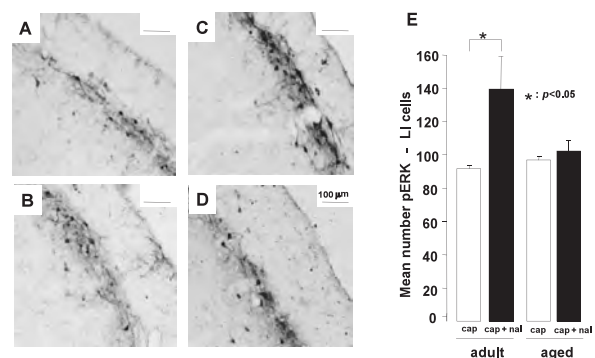


図3 老齢および成熟ラットの口髭部へのカプサイシン刺激により、三叉神経脊髄路核尾側亜核内に認められたpERK陽性細胞(A:成熟ラット, B:老齢ラット)および、ナロキソン静注後に口髭部にカプサイシン刺激したときに認められたpERK陽性細胞(C:成熟ラット, D:老齢ラット)の組織標本写真とpERK陽性細胞数のグラフ(E)  
cap: カプサイシン刺激, cap+nal: ナロキソン静注後にカプサイシン刺激 (Suzukiet al. Neurosci Lett 2009より改変)

非ナロキソン投与群と比較し、カプサイシン刺激によって発現したpERK陽性細胞数に有意な増加がみられた。これに対し、老齢ラットにおいてはpERK陽性細胞数に変化はみられなかった(図3C,DおよびD)。この結果は、脊髄ブロックを行っても老齢ラットにおいてはニューロンの応答性に変化は認められなかったという、これまでの研究結果とよく一致しており、老齢ラットにおいては下行性抑制系の機能不全が誘導されている可能性が強く示唆された [7]。

#### まとめ

これまでの加齢と痛みに関する研究は、ほとんどがヒトを対象としたもので実験動物を用いた基礎研究は非常に少ない。我々の研究結果は、老齢ラットにおいて下行性抑制系が機能不全を起こし、それが老化に伴って発症する異常な侵害反射亢進の原因となる可能性を示した。

高齢化が進む日本において、加齢に伴う痛みの受容機構の変化を解明することは、高齢者のQOLの維持につながる重要な研究テーマであり、さらなる研究の推進が望まれる。

#### 参考文献

1. Hayflick L. How and why we age. *Exp Gerontol* 33:639-653, 1998.
2. Janssens JP, Pache JC, Nicod LP. Physiological changes in respiratory function associated with ageing. *Eur Respir J* 13: 197-205, 1999
3. Ribera-Casado JM. Ageing and the cardiovascular system. *Z Gerontol Geriatr* 32: 412-419, 1999
4. Kanda K, Hashizume K. Effects of long-term physical exercise on age-related changes of spinal motoneurons and peripheral nerves in rats. *Neurosci Res* 31:69-75, 1998.
5. Sugiura M, Kanda K. Progress of age-related changes in properties of motor units in the gastrocnemius muscle of rats. *J Neurophysiol* 92:1357-1365, 2004.
6. Kanda K, Hashizume K. Changes in properties of the medial gastrocnemius motor units in aging rats. *J Neurophysiol* 61:737-746, 1989.
7. Iwata K, Fukuoka T, Kondo E, Tsuboi Y, Tashiro A, Noguchi K, Masuda Y, Morimoto T, Kanda K. Plastic changes in nociceptive transmission of the rat spinal cord with advancing age. *J Neurophysiol* 87:1086-1093, 2002.
8. Shimizu K, Asano M, Kitagawa J, Ogiso B, Ren K, Oki H, Matsumoto M, Iwata K. Phosphorylation of Extracellular Signal-Regulated Kinase in medullary and upper cervical cord

neurons following noxious tooth pulp stimulation. *Brain Res* 1072:99-109, 2006.

9. Noma N, Tsuboi Y, Kondo M, Matsumoto M, Sessle BJ, Kitagawa J, Saito K, Iwata K. Organization of pERK-immunoreactive cells in trigeminal spinal nucleus caudalis and upper cervical cord following capsaicin injection into oral and craniofacial regions in rats. *J Comp Neurol* 20: 1428-1440, 2008.
10. Suzuki I, Kitagawa J, Noma N, Tsuboi Y, Kondo M, Honda K, Kanda K, Hasegawa M, Saito K, Okamoto R, Iwata K. Attenuation of naloxone-induced Vc pERK hyper-expression following capsaicin stimulation of the face in aged rat. *Neurosci Lett* 442:39-43, 2008.

## “Change in nociceptive mechanisms during advancing age

Ikuko Suzuki, Ph. D, Koichi Iwata, , D. D. S., Ph. D.

Department of Physiology, School of Dentistry, Nihon University  
1-8-13 Kandasurugadai, Chiyoda-ku Tokyo 101-8310, Japan

### Summary

Although a few animal studies have reported the effect of aging on pain pathways, the neuronal mechanisms of pain sensation with advancing age are not well understood. Therefore, we have studied the nocifensive behavior, dorsal horn (DH) and trigeminal spinal subnucleus caudalis (Vc) nociceptive neuronal activities in aged rats to evaluate the change in neuronal mechanisms with advancing age. Our data were summarized as follows: 1) The paw withdrawal latency to heat stimulation of the hind paw was significantly shorter in aged rats compared to adult rats, whereas the occurrence of the paw licking behavior was significantly higher in adult rats compared to aged rats. 2) The DH nociceptive neuronal activities were significantly higher in aged rats compared to adult. 3) The spinal block caused an enhancement of DH nociceptive neuronal excitability in adult rats but not in aged. 4) The Vc neuronal activity increased after naloxone administration in adult rats but not in aged.

These findings suggest that an impairment of the descending inhibitory system in aged rats causes an enhancement of the DH and Vc nociceptive neuronal activities, resulting in an enhancement of noxious reflex during advancing age.

## 【総 説】

# ゼブラフィッシュがもたらす発生生物学と老化生物学の新しい接点

貴志周司

スクリプス研究所 代謝加齢研究部門、ハーバード大学医学部 眼科学部門

### 要約

発生と老化という一見対峙するかに思える現象の背後には共通の分子が似通った機能、もしくは異なった機能をもって働いている可能性が存在する。我々は、小型の淡水魚であるゼブラフィッシュを用いて、初期発生と老化の両過程に存在する関連制御機構を解析する研究を進め、初期胚で起こる『老化』（“胚老化”）の表現型を指標に変異体の単離と責任遺伝子の同定を行ってきた。それらの遺伝子の中には、加齢にともなう実際の老化と関連が既に示唆されているものも存在したが、多くは未だ具体的な老化現象との関連が示されていない遺伝子である。生理的老化は単一の遺伝子変異により引き起こされるよりは、複数の遺伝子が巧みに絡み合い、外的環境との歪みとして生じると理解することもできる。本来は予期せぬ遺伝子が老化の現象と過程を担っていることもありうる。では、複数の相互に絡み合うそのような遺伝子群を無作為かつ迅速に検出し、同定することは脊椎動物で可能なのであろうか。小型魚類、とりわけゼブラフィッシュは、おそらくこの事を現実的に可能なものとし、網羅的な老化関連遺伝子と低分子化合物の探索、及び表現型の解析を同時遂行することができる唯一の実験用脊椎動物モデルに成りうるであろう。

### 1. 実験室での小型魚類を用いた老化研究

老化の研究には無脊椎動物とげっ歯類が実験動物として中心的な役割を演じてきたが、近年、小型魚類を実験モデル動物として用いた老化研究の数が徐々に増加しつつある。このことは、魚類が本来持つ老化の実験『脊椎』動物としての優れた特性とともに、研究技術の進歩に伴う時代背景も影響していると言えるであろう。Woodhead (Woodhead, 1978) は、魚類が老化研究に適している理由として、1) 1回の交配でたくさんの同世代の子孫を得られること、2) 変温動物であることから、外部環境の変化に容易に反応しうること、3) 哺乳類に比べ、比較的寿命の短い種が存在することを挙げている。さらに Patnaikら (Patnaik et al., 1994) は、4) 多数の個体を生涯飼育する際のコストが哺乳類に比して圧倒的に少なくすむこと、5) 水温調節や食事制限による成長速度や老化速度の操作が容易なこと、6) 魚類の野生種での年齢特定が容易なこと、7) 魚類には生涯成長を続ける種が存在することから老化と成長の関連について特有の研究も可能であること、を挙げている。さらに、1970年代から発生学の分野で脊椎動物の実験動物として登場したゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) (Streisinger et al., 1981) やメ

ダカ (Japanese killifish, *Oryzias latipes*) (Egami, 1973) などの小型魚類が基礎生物学のみにとどまらず応用実験医学に与えた影響は大きい。胚の観察や実験操作が容易なニワトリやカエルの特徴と遺伝学的操作が容易なマウスの長所をあわせもつ脊椎動物として小型魚類、特にゼブラフィッシュは、世界的に発生学と発生生物学の研究分野において実験動物としてきわめて重要な地位をしめるようになった (Haffter and Nusslein-Volhard, 1996) (Eisen, 1996) (Kimmel, 1989) (Fishman, 1999) (Fishman et al., 1997) (Talbot and Hopkins, 2000) (Detrich et al., 1999). それに伴い、8) 遺伝子導入や改変などの遺伝子工学技術の蓄積 (大規模突然変異の導入とスクリーニング、cDNAやmRNAの微量注入による過剰発現やモルフォリノ・アンチセンスオリゴ導入による遺伝子のノックダウン (遺伝子発現抑制) 等) 9) 遺伝子情報の蓄積 (イギリスMRCのSanger Centerによるゼブラフィッシュ全ゲノム塩基配列解析の完成) が進行し、実験室での魚類を用いた老化の遺伝子レベルでの詳細な研究が可能になりつつある。10) 小型魚類 (グッピー: *Poecilia reticulata* やキリーフィッシュ: *Nothobranchius guentheri*, *Nothobranchius furzeri*) の老化に伴う各臓器の機能的変化、組織学的変化 (Woodhead, 1984) (Markofsky and Milstoc, 1979) の研究に引き続き、ゼブラフィッシュでは老化に伴う表現形質と寿命 (Gerhard et al., 2002)、各種の細胞老化マーカーや酸化タンパク質 (Kishi et al., 2003) (Tsai et al., 2007)、ヒートショックタンパク質の変化 (Murtha and Keller, 2003)、行動と記憶の変化 (Yu et al., 2006) (Zhdanova et al., 2008) がすでに報告さ

連絡先: Shuji Kishi, M.D., Ph.D.  
The Scripps Research Institute,  
Scripps Florida, 130 Scripps Way #3B3, Jupiter,  
FL 33458  
TEL: 561-228-2959  
FAX: 561-228-3059  
E-mail: kishi@scripps.edu

れ、老化研究のための基礎データが揃いつつある。また、キリーフィッシュにおいても、その中で極端に短い寿命の種 (*Nothobranchius furzeri*) を用いることで、薬物効果や温度変化の老化に与える影響を簡便に解析できることが報告されている (Valenzano et al., 2006)。さらに最近我々は、ゼブラフィッシュの初期発生段階においても検出可能なストレス・老化バイオマーカーを用いて変異体 (ミュータント) をスクリーニングし、成魚において早期老化の形質を示す個体を単離することに成功している (Kishi et al., 2008) (Kishi et al., 2009)。これは、脊椎動物モデルにおける最初の無作為な老化変異体 (“aging mutant”) の単離である。ゼブラフィッシュでの老化研究については次にもう少し詳しく触れることとするが、ここで述べた小型魚類の実験における有用性と最近の研究の進歩は、小型魚類を用いて今後新たな老化研究を推進するための基盤になると言えるであろう。フィールドワークによる魚類の老化研究と、特に小型魚類を用いた分子遺伝学や分子生物学的手法を含む実験室での老化研究が融合することで、更なる魚類老化研究の進展と脊椎動物一般への応用が期待される。

## 2. ゼブラフィッシュを用いた基礎老化研究へのアプローチ

今日までに様々なモデル実験動物が老化研究に用いられてきたが、脊椎動物における進化と老化の多様性を考える上で魚類は重要な役割を担う。魚類は脊椎動物の系統発生と進化という点を考察する上で基礎生物学においてきわめて重要な位置にあり、また最近では脊椎動物共通の遺伝学的、機能的保存性という点をふまえて医学生物学への貢献が期待されている。とりわけゼブラフィッシュは近年、研究材料としてその注目度が急速に広がり、様々な研究領域で最も研究者人口が増加しているモデル動物と言えるであろう。比較的簡便な飼育方法と多産に加え、透明な胚は体外発生でその過程が可視化できるという利点から発生生物学の実験材料として汎用され、また蓄積された遺伝学的手法や近年目覚ましく進歩したゲノム解析技術が駆使できるという利点から人の病気や病体のモデル作成へと応用範囲をますます広げてきた。一方で、ゼブラフィッシュを用いた老化に関する研究は後進的であったがそのような中にあり我々は先駆的な役割をはたし、老化の組織病理学的観察に加え、簡便なマーカーとなり得る評価系を広範囲に探索してきた (Kishi, 2004) (Kishi, 2006)。我々以外ではGerhardのグループがゼブラフィッシュの寿命と老化過程における体型などのおおまかな生物学的変化を報告 (Gerhard et al., 2002) (Gerhard and Cheng, 2002) (Malek et al., 2004) し、Kellerらのグループも熱ストレスの影響について老化との関連で解析した報告 (Keller et al., 2008) (Murtha and Keller, 2003) がある。また、眼の老化に限れば、ヘテロ接合変異体 (ホモ接合変異体は稚魚致死) の加齢に伴う網膜の変化について記載した報告がいくつか見受けられる (Li and Dowling, 1997) (Stenkamp et al., 2008) (Morris et al., 2005) (Stenkamp et al., 2008) (Maaswinkel et al., 2003)

(Maaswinkel et al., 2005)。ここでは独自の視点から発生と老化の接点を探るため、ゼブラフィッシュでの老化研究について著者らが中心になって進めてきた仕事の経緯を簡単に紹介したい。

我々はゼブラフィッシュを用いた老化研究を2001年の春に開始した。しかし、その頃はゼブラフィッシュの老化に関する情報や文献の蓄積は皆無であったため、メダカやグッピーの情報収集や、その他の実験動物で用いられている老化の評価基準となり得るバイオマーカーを探索、老化関連遺伝子のデータベース検索から取りかかることとなった。何よりその頃はまだそもそも老化した (と言えそうな) ゼブラフィッシュを研究者では誰も持っていなかったため、実験材料そのものがなかったわけである。ただ、研究者の間では、ゼブラフィッシュは結構長く生きそうなので老化の研究は大変だろうという雰囲気があった (実際、平均寿命は約3年、最長では5年以上生きるものも存在する)。老化の研究にはハエや線虫に代表される寿命の短い動物や先述したキリーフィッシュを選ぶことが正攻法だと思われた。それでも敢えて我々が寿命の長そうなゼブラフィッシュを老化研究の実験材料として選んだのにはそれなりに理由があった。その一つ目の理由は、趣味的にはあるが、長寿としても知られる淡水魚のコイに非常に興味があったからである。そして実は、ゼブラフィッシュはコイ目コイ科の魚 (Cyprinidae) である。コイ目コイ科といえども、成魚で5cm以下のゼブラフィッシュと時として100cmを超えるコイでは大きさはまるで違うし、実際に細胞の染色体数もゼブラフィッシュは50本であるのに対し、コイや同じ科目のフナなど (ギンブナは染色体数が150本) では100本と倍の違いはあるが、脊椎動物の約半数を占める魚類は当然のごとく多様性を秘めており倍数体変異もめずらしくない。分子レベルで解明されていない「おとぎ話」ではあるが、コイは終身成長を続け、前述の不顕性老化 (老化しない?) を示すのではないかという俗説はたいへん興味深く、実際に200歳を超える長寿のコイの存在が日本で記録されているようである <<http://www.echigo.ne.jp/~koi/zen/hanako.htm>>、<<http://users.vnet.com/rrenshaw/hanako.html>>。直接コイの老化研究を分子レベルで行うことは実験規模から考えて現実的には困難を伴うため、まずは同じコイ目コイ科に属するゼブラフィッシュはどうだろうと思い始めたのがそもそもの研究動機である。二つ目の理由は、より現実的で、ちょうど時期を同じくしてゼブラフィッシュのゲノムプロジェクトもほぼ終了したことである。このことにより、ヒトと魚の全遺伝子配列が比較検討できることになり、ゼブラフィッシュを癌も含めたヒトの様々な病気のモデル動物としてゲノムの機能的解析を含めて役立てようという研究者も増え (老化は様々な病の源でもある)、筆者らも本格的にゼブラフィッシュでの老化研究に乗り出す決意をした。

老化は完全にはプログラムされたものではないとしても、おそらくは避けることはできない自然の摂理なのであろう。一方で生物の初期発生段階は綿密にプログラム



された過程であることに疑いはない。発生は建設的過程であり、その対局にある崩壊過程が老化であることから、発生学的なアプローチは老化研究には殆ど貢献できないとする考えもある。果たして本当にそうなのであろうか。我々は初期発生段階における遺伝子レベルの異変や多型性を予備的に見極めることにより、将来的な年代的老化過程や生物学的老化さえも部分的には予測できると考えている。発生段階では十分な遺伝子発現量やその機能が、年を重ねるに連れて個体、細胞、遺伝子へのストレス損傷の蓄積やそれに伴う生体内周辺状態の異変により、個体の恒常性の維持に十分ではなくなることはあり得る。個体の恒常性を保持できなくなることは崩壊過程への引き金となり、様々な病気の発症につながる。老化自体は病気ではなく、独自の疾患として取り上げることはないとしても、老化関連疾患を予防することが健康な老化過程を全うすることにつながることは明らかである。そして、もし発生過程を老化研究に役立てられるとすれば、ゼブラフィッシュはきわめて強力な実験モデル動物となり得る。我々はゼブラフィッシュにおける老化の組織病理学的観察と同時に老化のマーカー（バイオマーカー）探索を進め（Kishi et al., 2003）（Kishi, 2006）、酸化タンパク、過酸化脂質、酸化DNAの検出、テロメア長やテロメラーゼ（テロメラーゼ）活性の検出、行動科学的検討等を行い、それらの中でも皮膚における老化関連ベータ・ガラクトシダーゼの検出がきわめて簡便で、加齢依存性の有意差もあり、将来的にハイスループットな実験汎用性があると判断した（Kishi et al., 2008）（図1）。一方で、ゼブラフィッシュのテロメラーゼは終身発現しており（Kishi et al., 2003）、再生能力や持続成長との関連では興味深い。我々はそのcDNAを独自にクローニングし、テロメア自身の制御には直接関与しない、発生段階にある造血細胞の分化に関わる新規機能についても報告した（Imamura et al., 2008）。このことは、発生、再生と老化を結ぶテーマとしても大変面白く、重要な知

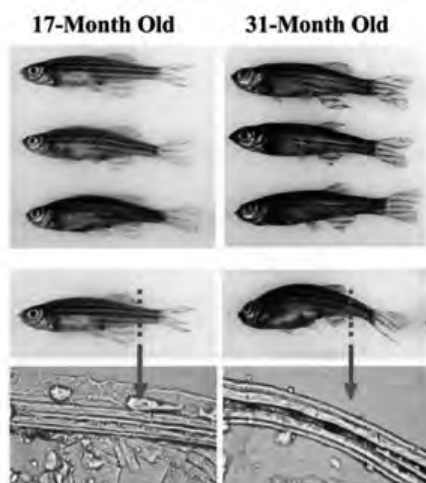


図1 17ヶ月齢と31ヶ月齢のゼブラフィッシュにおける老化関連ベータ・ガラクトシダーゼ活性を全身染色  
皮膚断面の顕微鏡写真（一番下の2つのパネル）によって、老化したゼブラフィッシュ（31ヶ月齢）の真皮に強い活性が見られる。【図は（Kishi et al., 2003）からの引用】

見であると考えている。しかしながら、終身発現を続けるテロメラーゼそのものは単純に老化のマーカーとしては適切ではないと言える。

もちろん、老化の唯一無二のマーカーはほぼあり得ないと思えるべきであり、研究をさらに進める上でのその他のバイオマーカーや従来の組織病理学的解析等も必要であることは当然であろう。また、ゼブラフィッシュに限らず、魚類は一般的に再生能力が高く、老化に伴う創傷治癒や再生の研究にも有用であると考えられる。我々は、加齢と放射線照射ストレスがゼブラフィッシュの尾ひれの再生能力を損うが、魚体の成長そのものは抑制しないことを示し、ゼブラフィッシュにおいて成長と老化が同時並行で起こり得ていることを明らかにした（Tsai et al., 2007）。ゼブラフィッシュには生殖老齢、行動や認知老化も見られ、これらも放射線照射ストレスにより促進される（Yu et al., 2006）（Tsai et al., 2007）。老化関連ベータ・ガラクトシダーゼはゼブラフィッシュ加齢とともに、また同じ暦年齢であれば放射線照射ストレスを過去に与えられた個体では上昇する。興味深いことに、成魚ではなく初期発生段階の胚においても様々なストレス暴露により検出可能となる。そしてこのことは、ゼブラフィッシュの老化の変異体を胚の段階で探索可能であることを予期させた。

これまでの実験結果をもとに、老化関連ベータ・ガラクトシダーゼを用いたゼブラフィッシュの老化の変異体のスクリーニングを2003年に開始し、今までに「老化を促進する」可能性のある変異体とその責任遺伝子を10種類以上単離することに成功した（Kishi et al., 2008）（図2）。個々の同定された遺伝子の特徴と紹介は他の総説にゆずるが（Kishi et al., 2009）、それらの単離された遺伝子の中には、他の動物種ですでに老化と

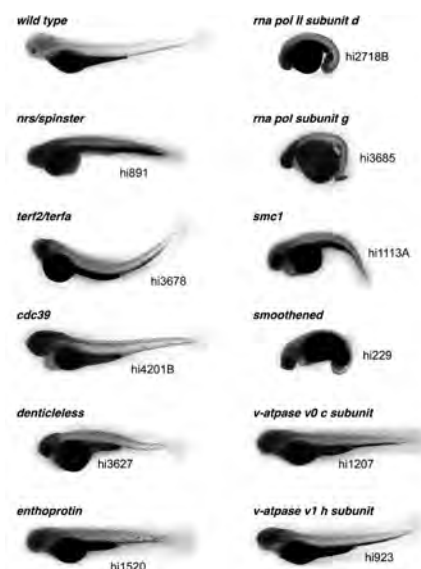


図2 ゼブラフィッシュの変異体での初期発生の3.5日目における老化関連ベータ・ガラクトシダーゼ活性の検出  
レトロウイルスの挿入変異による11種類の遺伝子のホモ変異体が初期発生段階において強い老化関連ベータ・ガラクトシダーゼ活性を示すことが明らかとなった。遺伝子名と対立遺伝子座名をそれぞれの変異体の写真と共に記した。【図は（Kishi et al., 2008）からの引用】

の関連が強く論議されているものも存在し、我々の『発生段階から老化を探る』戦略の正当性 (proof-of-principle) を示すことができた。脊椎動物における無作為な老化変異体単離の試みはこれが初めてであり、ようやくここに来て魚類での老化をゼブラフィッシュというモデルを用いて分子レベルで解析を進められる時期を迎えたこととなる。このことは魚類における老化研究の新たな局面を切り拓くものであると期待される。次の段階では、既に同定された10種以上の遺伝子それぞれの発生と老化における機能の詳細と遺伝子間の相互作用 (epistasis) の重要性を見極める必要がある。単一の遺伝子だけではなく、複数の遺伝子の相互作用とバランスが老化の表現型に与える影響を明らかにすることが重要であろう。さらには、「老化を抑制する」変異体とその責任遺伝子の同定、もしくは、「老化を促進する」変異体から『復帰突然変異体 (revertant)』を回収し、新たな機能修飾分子を同定することが重要な課題となるであろう。

一方で、生物工学的にゼブラフィッシュをコイのように大きくて長寿な魚に改変することは可能であろうとも考えている。成長と老化を制御する鍵となる分子とその作用機構の解明が近い将来なされることを期待したい。個々人の発生段階もしくは少なくとも若年期に、以後に起こりうる老化過程を遺伝子レベルの背景から正確に予測し、事前に予防策や対応策を準備して治療にもそなえる事のできる時代がやってくるであろうか。

ゼブラフィッシュの老化研究の歴史は始まったばかりである。今日、我々の他にも少なくとも2、3のほどのグループが米国において研究を進めているが、その研究者数は実験動物としては老化研究の主流である線虫やハエ、それにマウスに比べればまだまだ少ないと言える。しかし、ゼブラフィッシュを用いた発生の研究が再生とともに老化の基礎研究にも貢献できることは確実であり、今後の医学的な老化研究の展開には欠かせない実験動物になるであろう。

### 3. 今後の老化研究の展開と小型魚類の役割

生命科学全般が新たに変革しつつある今日、分子レベルの解析も一本釣りのアプローチから網羅的アプローチへと変容し、我々は個別分子の複雑な関連をネットワークの中でシステムとして捉える方向へと進んでいる。老化という生命現象はまさしくこの複雑系を扱うものであり、時代背景を考えてもこれまでは不可能であった学問領域を統合させることにより、ここに来て初めて考察しうる課題が山積している。加齢に伴った細胞、組織、臓器のそれぞれのレベルでの機能的後退がもたらされ、個体としての統合性を崩壊させる過程が老化であるとすれば、それらの機能後退を食い止めようとする反発力が細胞 (内) には存在しながらも高次のレベル (組織や臓器) での統合性を見出せず、細胞の社会性を喪失して無秩序に増殖する過程が癌化であると言えよう。一方で、多くの老化に伴う変性疾患にあっては、これらの高次段階での統合性の消失が組織や臓器構築そのものの進行性後退を促していると言える。したがって、老化の研究は

単に生理的な寿命 (life span) を延ばすためにあるのではなく、加齢とともに増加するあらゆる疾患への予防と治療への道筋を与え、健康な生活 (health span) を増進させるために存在すると言える。老化の生物学的神秘性の解明を基礎研究として押し進めることは結果として老化にまつわる現実的な病への打開策を与えるに違いない。酵母、線虫、ショウジョウバエというような単細胞生物や無脊椎動物における老化の基礎研究により、いくつもの単一遺伝子の変異が老化と寿命に影響しうることが見出され、それが人を含めた高等脊椎動物である哺乳類においても共通に保存された事実として認識されることとなった。しかしながら、単一遺伝子・分子の枠を超えた複雑系としての老化研究は今まさに始まろうとしており、次の10年ではその老化の複雑系を解くためのシステムズ・バイオロジーの展開と、システムズ・バイオロジーを構築するに足る精密で広範かつ斬新な情報収集が必要とされよう。ゼブラフィッシュを中心とした小型魚類は、ゲノム遺伝子 (genotype における 'genomics' 解析) から表現型 (phenotype における 'phenomics' 解析) までを網羅的に解析する上で実験手法上、最適な老化研究のモデルであると同時に、その種の特性から成長と老化の神秘を解き明かす可能性をも併せ持っており、実力と夢を兼ね備えた実験動物であると言えよう。

### 文献

- Detrich, H. W., 3rd, Westerfield, M., and Zon, L. I. (1999). Overview of the Zebrafish system. *Methods Cell Biol* 59, 3-10.
- Egami, N. (1973). The medaka, *Oryzias latipes* (teleost fish) as a laboratory animal. *Jikken Dobutsu* 22 *Suppl*, 109-114.
- Eisen, J. S. (1996). Zebrafish make a big splash. *Cell* 87, 969-977.
- Fishman, M. C. (1999). Zebrafish genetics: the enigma of arrival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10554-10556.
- Fishman, M. C., Stainier, D. Y., Breitbart, R. E., and Westerfield, M. (1997). Zebrafish: genetic and embryological methods in a transparent vertebrate embryo. *Methods Cell Biol* 52, 67-82.
- Gerhard, G. S., and Cheng, K. C. (2002). A call to fins! Zebrafish as a gerontological model. *Aging Cell* 1, 104-111.
- Gerhard, G. S., Kauffman, E. J., Wang, X., Stewart, R., Moore, J. L., Kasales, C. J., Demidenko, E., and Cheng, K. C. (2002). Life spans and senescent phenotypes in two strains of Zebrafish (*Danio rerio*). *Exp Gerontol* 37, 1055-1068.
- Haffter, P., and Nusslein-Volhard, C. (1996). Large scale genetics in a small vertebrate, the zebrafish. *Int J Dev Biol* 40, 221-227.

- Imamura, S., Uchiyama, J., Koshimizu, E., Hanai, J., Raftopoulos, C., Murphey, R. D., Bayliss, P. E., Imai, Y., Burns, C. E., Masutomi, K., *et al.* (2008). A non-canonical function of zebrafish telomerase reverse transcriptase is required for developmental hematopoiesis. *PLoS ONE* *3*, e3364.
- Keller, J. M., Escara-Wilke, J. F., and Keller, E. T. (2008). Heat stress-induced heat shock protein 70 expression is dependent on ERK activation in zebrafish (*Danio rerio*) cells. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* *150*, 307-314.
- Kimmel, C. B. (1989). Genetics and early development of zebrafish. *Trends Genet* *5*, 283-288.
- Kishi, S. (2004). Functional aging and gradual senescence in zebrafish. *Ann N Y Acad Sci* *1019*, 521-526.
- Kishi, S. (2006). Zebrafish as Aging Models, In *Handbook of Models for Human Aging*, M. Conn, ed. (Elsevier Academic Press), pp. 317-338.
- Kishi, S., Bayliss, P. E., Uchiyama, J., Koshimizu, E., Qi, J., Nanjappa, P., Imamura, S., Islam, A., Neuberg, D., Amsterdam, A., and Roberts, T. M. (2008). The identification of zebrafish mutants showing alterations in senescence-associated biomarkers. *PLoS Genet* *4*, e1000152.
- Kishi, S., Slack, B. E., Uchiyama, J., and Zhdanova, I. V. (2009). Zebrafish as a genetic model in biological and behavioral gerontology: where development meets aging in vertebrates—a mini-review. *Gerontology* *55*, 430-441.
- Kishi, S., Uchiyama, J., Baughman, A. M., Goto, T., Lin, M. C., and Tsai, S. B. (2003). The zebrafish as a vertebrate model of functional aging and very gradual senescence. *Exp Gerontol* *38*, 777-786.
- Li, L., and Dowling, J. E. (1997). A dominant form of inherited retinal degeneration caused by a non-photoreceptor cell-specific mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 11645-11650.
- Maaswinkel, H., Mason, B., and Li, L. (2003). ENU-induced late-onset night blindness associated with rod photoreceptor cell degeneration in zebrafish. *Mech Ageing Dev* *124*, 1065-1071.
- Maaswinkel, H., Riesbeck, L. E., Riley, M. E., Carr, A. L., Mullin, J. P., Nakamoto, A. T., and Li, L. (2005). Behavioral screening for nightblindness mutants in zebrafish reveals three new loci that cause dominant photoreceptor cell degeneration. *Mech Ageing Dev* *126*, 1079-1089.
- Malek, R. L., Sajadi, H., Abraham, J., Grundy, M. A., and Gerhard, G. S. (2004). The effects of temperature reduction on gene expression and oxidative stress in skeletal muscle from adult zebrafish. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* *138*, 363-373.
- Markofsky, J., and Milstoc, M. (1979). Aging changes in the liver of the male annual cyprinodont fish, *Nothobranchius guentheri*. *Exp Gerontol* *14*, 11-20.
- Morris, A. C., Schroeter, E. H., Bilotta, J., Wong, R. O., and Fadool, J. M. (2005). Cone survival despite rod degeneration in XOPS-mCFP transgenic zebrafish. *Invest Ophthalmol Vis Sci* *46*, 4762-4771.
- Murtha, J. M., and Keller, E. T. (2003). Characterization of the heat shock response in mature zebrafish (*Danio rerio*). *Exp Gerontol* *38*, 683-691.
- Patnaik, B. K., Mahapatro, N., and Jena, B. S. (1994). Ageing in fishes. *Gerontology* *40*, 113-132.
- Stenkamp, D. L., Satterfield, R., Muhunthan, K., Sherpa, T., Vihtelic, T. S., and Cameron, D. A. (2008). Age-related cone abnormalities in zebrafish with genetic lesions in sonic hedgehog. *Invest Ophthalmol Vis Sci* *49*, 4631-4640.
- Streisinger, G., Walker, C., Dower, N., Knauber, D., and Singer, F. (1981). Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature* *291*, 293-296.
- Talbot, W. S., and Hopkins, N. (2000). Zebrafish mutations and functional analysis of the vertebrate genome. *Genes Dev* *14*, 755-762.
- Tsai, S. B., Tucci, V., Uchiyama, J., Fabian, N. J., Lin, M. C., Bayliss, P. E., Neuberg, D. S., Zhdanova, I. V., and Kishi, S. (2007). Differential effects of genotoxic stress on both concurrent body growth and gradual senescence in the adult zebrafish. *Aging Cell* *6*, 209-224.
- Valenzano, D. R., Terzibasi, E., Genade, T., Cattaneo, A., Domenici, L., and Cellerino, A. (2006). Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Curr Biol* *16*, 296-300.
- Woodhead, A. D. (1978). Fish in studies of aging. *Exp Gerontol* *13*, 125-140.
- Woodhead, A. D. (1984). Aging changes in the heart of a poeciliid fish, the guppy *Poecilia reticulatus*. *Exp Gerontol* *19*, 383-391.
- Yu, L., Tucci, V., Kishi, S., and Zhdanova, I. V. (2006). Cognitive aging in zebrafish. *PLoS ONE* *1*, e14.
- Zhdanova, I. V., Yu, L., Lopez-Patino, M., Shang, E., Kishi, S., and Guelin, E. (2008). Aging of the circadian system in zebrafish and the effects of melatonin on sleep and cognitive performance. *Brain Res Bull* *75*, 433-441.

# A novel contact point between developmental biology and senescence biology provided by zebrafish

Shuji Kishi, M.D., Ph.D.

Department of Metabolism and Aging, The Scripps Research Institute  
Scripps Florida, 130 Scripps Way #3B3, Jupiter, FL 33458, U.S.A.

Senescence might be thought as the opposite of early development, but there is a possibility that a common molecule having a similar or even different function is working between these two phenomena. We have investigated to analyze the relational regulatory mechanism that exists in the both process of the early development and the senescence by using the zebrafish, a small freshwater fish. We also have identified to isolate the mutants and responsible genes, targeting the phenotype of the “senescence” (“embryonic senescence”) appeared during early embryogenesis. Some of the genes have already been suggested the relationship with the actual senescence with chronological aging, but many of them have not yet demonstrated. The physiological senescence may arise as the distortion of the external environment interweaving with multiple genes rather than a simple gene mutation. An unexpected gene originally may induce the phenomenon and the process of senescence. Then, is it possible to detect and identify a number of potentially unanticipated genes under complicated regulations randomly and promptly? The small fish, especially zebrafish will make it feasible and would be the only experimental model animal in vertebrates where we can perform the exhaustive exploration of senescence-related genes and small molecular compounds parallel with analysis of the phenotype.

【トピックス】

加齢に伴って増加するPD-1陽性Tリンパ球の正体は？

猪股光司、嶋田有紀子、林 昌美、岩下淑子  
 東京都健康長寿医療センター研究所（東京都老人総合研究所）  
 老化制御研究チーム 環境老化

1. はじめに

加齢に伴う免疫機能の低下は易感染性、ガンや自己免疫疾患の発症、ストレスに対する抵抗力の低下等と密接に関連しており、健康長寿を阻む大きな要因である。超高齢化社会が急速に進行しつつある今日、低下した免疫機能を如何に回復させるかが重要な課題となっている。

免疫系は造血系幹細胞から分化した様々な細胞から構成されており、マクロファージや好中球を中心とする自然免疫系と抗原特異的レセプターを有するT細胞やB細胞等のリンパ球を主体とする獲得免疫系に大別される。加齢の影響は自然免疫系よりも獲得免疫系が受け易く、なかでも免疫応答全体をコントロールするT細胞系が特に影響を受け易い[1]。T細胞は表面に発現する共受容体の違いからCD4<sup>+</sup> T細胞とCD8<sup>+</sup> T細胞に分けられる。加齢の影響はCD4<sup>+</sup> T細胞で良く調べられており、増殖能やIL-2産生能が加齢に伴って著しく低下することが知られている [2-4]。CD4<sup>+</sup> T細胞はB細胞の抗体産生能やCD8<sup>+</sup> T細胞の細胞傷害能を制御するだけでなく、自然免疫系のマクロファージや好中球の機能制御にも関与することから、この細胞の機能低下は免疫系全体に悪影響を及ぼすことになる。従って、免疫機能の回復を考える場合、CD4<sup>+</sup> T細胞の機能低下に関わる情報は最も重要なものとなる。

最近、我々はマウスのCD4<sup>+</sup> T細胞を用いた解析から細胞表面にPD-1と呼ばれる分子を発現する細胞集団が加齢に伴って著しく増加することや、その集団が抗原刺激に対して応答能を失っていることを発見した[5]。また、我々の報告に続いて同様の報告が相次いでなされ[6-7]、加齢に伴う免疫機能の低下とPD-1陽性CD4<sup>+</sup> T細胞との関係が注目を集めている。本稿ではPD-1陽性 CD4<sup>+</sup> T細胞の性質や特徴を紹介するとともに、この細胞集団を標的にした免疫機能回復の可能性について考えてみたい。

2. T細胞の免疫応答と補助シグナル受容体

T細胞の機能はT細胞受容体 (TCR) を介した抗原刺激シグナルと補助シグナル受容体を介した第二のシグナルによって厳密に制御されている(図1)。補助シグナル受

容体にはTCRシグナルの伝達を正に制御する活性型と負に制御する抑制型がある [8]。T細胞上の主要な補助シグナル受容体は活性型のCD28であり、恒常的に発現している。一方、抑制型はCD28のスーパーファミリーであるPD-1やCTLA-4等が存在しており、これらの分子はT細胞の活性化に伴って一過性に細胞表面に発現する。CD28を介した補助シグナルは、病原体の排除に必要な抗原特異的T細胞のクローン増殖、CD4<sup>+</sup> T細胞の分化に必要なサイトカイン(リンフォカイン)の分泌、CD8<sup>+</sup> T細胞(キラー T細胞)やメモリー T細胞の分化等の免疫応答を促進する。一方、病原体の除去が終了して免疫応答を収束させる場合やTCRが自己抗原と反応するようになった場合には抑制型の補助シグナルが優勢となり、T細胞の増殖抑制、アポトーシス、アナジー等を誘導して免疫応答を抑制する。このように、T細胞の免疫応答は活性型および抑制型補助シグナルの強度のバランスによって制御されている。

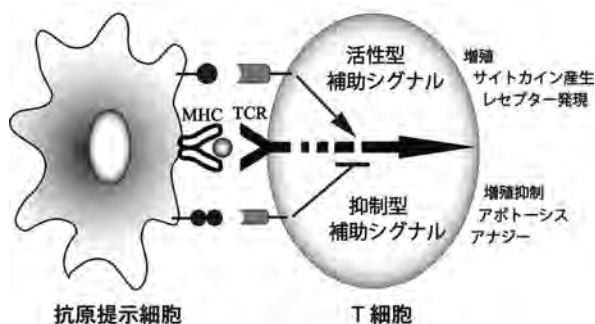


図1 活性型/抑制型補助シグナルによるT細胞機能の制御

T細胞の機能は、主にT細胞受容体 (TCR) を介した抗原刺激シグナルと補助シグナル受容体を介した補助シグナルによって制御されている。補助シグナルにはTCRシグナルの伝達を促進する活性型と「負」に制御する抑制型が存在する (<http://www.rs.noda.tus.ac.jp/~immunol/review.html>より改変)。

3. 加齢に伴って増加するPD-1陽性CD4<sup>+</sup> T細胞

TCRシグナル伝達経路に及ぼす加齢の影響や活性型補助シグナル受容体CD28の加齢変化に関する報告は数多く存在する [9-11]。しかし、抑制型の補助シグナル受容体に焦点を当てた研究は殆どなされていない。そこで我々は、若齢および老齢マウスの未刺激CD4<sup>+</sup> T細胞を用い、補助シグナル受容体の発現量を調べてみた。その結果、抑制型の受容体であるPD-1とCTLA-4の発現が老齢では若齢に比べてmRNAおよびタンパク質レベルで亢進していることが明らかになった。それに対し、活性

連絡先：〒173-0015  
 東京都板橋区栄町35-2  
 TEL: 03-3964-3241 内線3068  
 FAX: 03-3579-4776  
 E-mail: minomata@tmig.or.jp

型のCD28の発現には有意な差が認められなかった[5]。補助シグナル受容体は細胞表面に発現して初めてその機能を発揮することから、次に細胞表面に於ける発現量を調べた(図2)。その結果、CTLA-4やCD28の発現には有意な差が認められなかったが、PD-1では顕著な違いが見いだされた。つまり、若齢マウスではPD-1を発現するCD4<sup>+</sup> T細胞が僅かしか存在しないのに対し、老齢ではPD-1陽性細胞が劇的に増加し、約70%にも達することが判明した。また、この細胞集団(PD-1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T細胞)が加齢に伴ってほぼ直線的に増加することも確認されている[図4および引用文献5-7]。PD-1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T細胞が増加する機構については未だ良くわかっていないが、老齢マウスのT細胞ではPD-1の細胞内への取り込み機構に障害があることが示唆されている[5]。

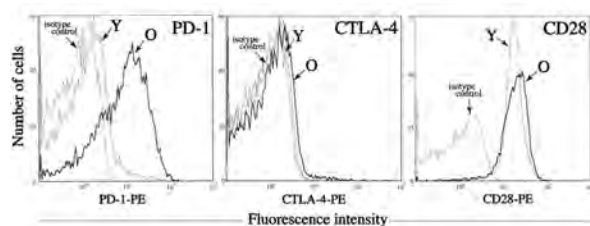


図2 CD4<sup>+</sup> T細胞に於ける補助シグナル受容体の加齢変化

若齢(Y, 3ヶ月齢)および老齢(O, 23ヶ月齢)マウスから調製した未刺激CD4<sup>+</sup> T細胞の表面に発現するPD-1、CTLA-4、CD28をフローサイトメーターで解析した。若齢ではPD-1を発現する細胞はごく僅かであるが、老齢では未刺激であるにも拘らず著しく増加している。それに対し、CTLA-4とCD28には有意な差が認められない(引用文献5より改変)。isotype control:染色に用いた抗体の反応が特異的であることを確認するために用いた抗体で、免疫動物、アイソタイプ(抗体クラス)、標識が同じものである。

#### 4. PD-1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T細胞はTCR刺激に不応答性である

PD-1はTCR刺激に伴って一過性に細胞表面に発現すると考えられてきた[12]。しかし上記の結果は、老齢マウスのCD4<sup>+</sup> T細胞の場合、刺激を加えなくてもPD-1が発現していることを示している。このことから、老齢マウスのCD4<sup>+</sup> T細胞は調製時に於いて既に活性化状態にあることも考えられる。そこで、活性化マーカーであるCD25やCD69の発現を調べて見たが、PD-1を発現する大半の細胞は不活化状態であった[5]。PD-1はTCRシグナルの伝達を抑制することから、未刺激状態でPD-1を細胞表面に発現するCD4<sup>+</sup> T細胞は抗原刺激に対して応答性が低下していることが予想される。そこで、老齢マウスのCD4<sup>+</sup> T細胞をPD-1陽性とPD-1陰性の細胞集団に分別し、各々の集団に於ける細胞分裂能を解析した(図3)。その結果、PD-1陰性の細胞集団ではTCR刺激に応答した細胞分裂が認められるのに対し、PD-1を発現する細胞集団では刺激に対して全く応答しないことが判明した。また、PD-1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T細胞ではIL-2、IFN- $\gamma$ 、IL-4等のリンフォカイン産生能も著しく低下している[7]。ところが、ごく最近、制御性のCD4<sup>+</sup> T細胞(Treg)に於いてもPD-1を発現する集団が加齢に伴って増加することが報告された[6]。従って、PD-1を指標にしたソーティングではTregが混入する可能性がある。しか

し、Tregを完全に取り除いてもPD-1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T細胞の増殖能には全く影響しないことから[7]、PD-1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T細胞の応答性の低下はTregによる外的な抑制とは無関係である。これらの結果から、PD-1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T細胞の機能低下にはPD-1を介した補助シグナルの関与が第一に考えられる。ところが、PD-1欠損マウスのCD4<sup>+</sup> T細胞や白血病細胞株を用いた解析ではPD-1シグナルの関与に否定的な結果が得られている[7]。今後、PD-1のリガンドであるPD-Lの動態やPD-1とPD-Lの相互作用等を詳細に解析し検証する必要がある。

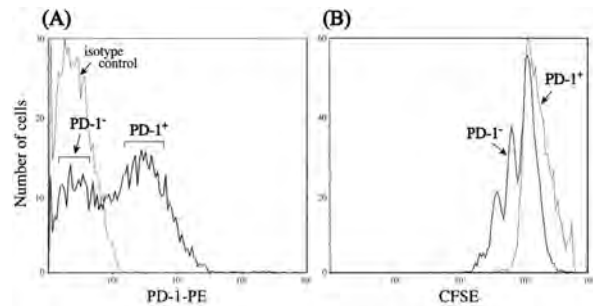


図3 PD-1陽性CD4<sup>+</sup> T細胞はTCR刺激に不応答性である

(A)老齢マウスから調製した未刺激CD4<sup>+</sup> T細胞の表面に発現するPD-1をフローサイトメーターで解析した。(B)セルソーターで分取したPD-1陰性およびPD-1陽性の細胞集団(Aを参照)をCFSEで染色した後、抗CD3抗体でコートしたプレート上で抗CD28抗体の共存下で刺激培養した。48時間後に細胞分裂能をフローサイトメーターで解析した。PD-1陰性の細胞集団では細胞分裂が認められる(分裂によるCFSEの希釈)が、PD-1陽性の集団では認められない。(B)の横軸の蛍光ピークは右側から0、1、2の細胞分裂周期を示す(引用文献5より改変)

#### 5. PD-1はメモリータイプのCD4<sup>+</sup> T細胞に発現する

T細胞には抗原未感作のナイーブフェノタイプ(NP)と抗原感作を受けたメモリーフェノタイプ(MP)が存在する。加齢に伴って前者は減少し、後者は増加することが知られている[13]。そこで、PD-1が何れのサブセットに発現しているかをCD44とCD62-Lをマーカーにして調べた。その結果、PD-1はMP(CD44<sup>high</sup>CD62-L<sup>low</sup>)のCD4<sup>+</sup> T細胞に選択的に発現し、NP(CD44<sup>low</sup>CD62-L<sup>high</sup>)の細胞には発現していないことが明らかになった[図4および引用文献5-7]。前述の如く、加齢はNP CD4<sup>+</sup> T細胞の減少とMP CD4<sup>+</sup> T細胞の蓄積をもたらすことから、PD-1陽性細胞の動態は単に若齢と老齢マウスに於けるNP/MP CD4<sup>+</sup> T細胞の存在比を示しているに過ぎないとも考えられる。しかし、PD-1は全てのMP CD4<sup>+</sup> T細胞に発現しているわけではなく、PD-1を発現するMP CD4<sup>+</sup> T細胞の割合が加齢に伴って増加することが確認されている[5-6]。また、MPのT細胞はエフェクター(CD44<sup>low</sup>CD62-L<sup>low</sup>)、エフェクター/メモリー(CD44<sup>high</sup>CD62-L<sup>low</sup>)、セントラルメモリー(CD44<sup>high</sup>CD62-L<sup>high</sup>)に分類されるが、PD-1は何れのサブセットにも発現している[6]。PD-1<sup>+</sup> MP CD4<sup>+</sup> T細胞は、Rag2<sup>-/-</sup>マウス(TCRや抗体分子の遺伝子再構成に必要なRag2遺伝子を欠くためTおよびBリンパ球を持たず、獲得免疫系が機能しない)や $\gamma$ 線照射C57BL/6マウス( $\gamma$ 線の照射で造血機能が障害を受けている)へ

の移入実験等の結果から、ホメオスタシス増殖は可能であるものの抗原特異的な免疫応答ができない特異なメモリーフェノタイプの集団と考えられている[7]。

一連の解析から、加齢に伴って抗原刺激に不応答性のPD-1<sup>+</sup> MP CD4<sup>+</sup> T細胞が蓄積することが明らかになった。しかし一方では、老齢マウスのCD4<sup>+</sup> T細胞であってもPD-1陰性MP CD4<sup>+</sup> T細胞やNP CD4<sup>+</sup> T細胞には若齢マウスに匹敵する機能が保持されていることも判明している [図3および引用文献7]。これまで加齢に伴う免疫機能の低下は、T細胞全体に起こる不可逆的な機能低下が原因と考えられてきた。しかし上記の事実から、実際は免疫応答を失った特定の細胞集団が蓄積することが主な原因である可能性が強いと考えられる。

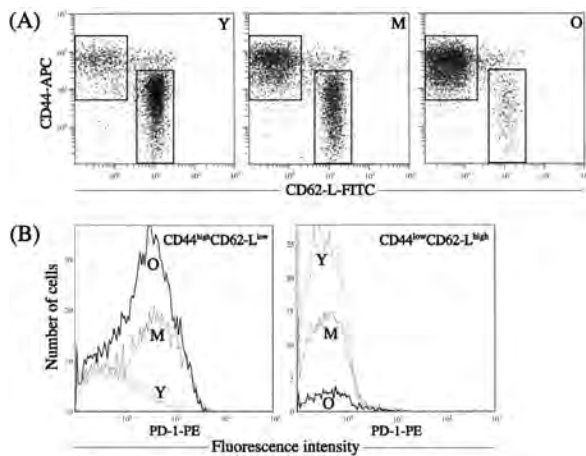


図4 PD-1はメモリータイプのCD4<sup>+</sup> T細胞に選択的に発現する

(A): 若齢(Y, 3ヶ月齢)、中齢(M, 11ヶ月齢)、老齢(O, 23ヶ月齢) マウスから調製した未刺激CD4<sup>+</sup> T細胞についてCD44とCD62-Lに対する特異抗体を用いてサブセット解析を行った。加齢に伴ってナイーブタイプ(CD44<sup>low</sup>CD62-L<sup>high</sup>)の細胞集団が減少し、エフェクター/メモリータイプ(CD44<sup>high</sup>CD62-L<sup>low</sup>)の集団が著しく増加した。(B): それぞれのサブセットに於けるPD-1の発現を比較した。PD-1はエフェクター/メモリータイプのCD4<sup>+</sup> T細胞に選択的に発現しており(左)、ナイーブタイプでは殆ど発現が認められない(右)。PD-1を発現するCD4<sup>+</sup> T細胞は加齢に伴ってほぼ直線的に増加する(左)(引用文献5より改変)。

## 6. PD-1<sup>+</sup> MP CD4<sup>+</sup> T細胞の特異な遺伝子発現

PD-1<sup>+</sup> MP CD4<sup>+</sup> T細胞はユニークな遺伝子発現を示すことが明らかになってきた[7]。PD-1<sup>+</sup> MP CD4<sup>+</sup> T細胞ではPD-1<sup>-</sup> MP CD4<sup>+</sup> T細胞に比べて*Pdcd1*、*Cd121b*、*Spp1*(各々 PD-1、IL-1レセプタータイプ-2、オステオポンチンをコードする)を含む17個の遺伝子で選択的な発現上昇が認められている。その中で最も過剰に発現するのはオステオポンチン遺伝子である。オステオポンチンはマクロファージ、樹状細胞、活性化したTh1細胞等の細胞が産生する非コラーゲン性の細胞外マトリックスである。しかし、近年、強力な炎症性サイトカインとしての性質を併せ持つことが明らかとなり、炎症性疾患との関係が注目されている [14, 15]。また、PD-1<sup>+</sup> MP CD4<sup>+</sup> T細胞は転写関連遺伝子の発現に於いても特徴的な変化が認められ、C/EBP $\alpha$ の発現亢進や*c-Myc*、*cyclin D1*の発現抑制等が確認されている[7]。

C/EBP $\alpha$ はマクロファージや好中球等の骨髄球系細胞の分化を司る転写因子であり、通常T細胞には発現しない分子である [16-17]。これらの事実から、PD-1<sup>+</sup> MP CD4<sup>+</sup> T細胞はPD-1陰性のMP CD4<sup>+</sup> T細胞から特異な遺伝子再プログラミングによって派生するものと考えられている(図5)。C/EBP $\alpha$ は*Cdk*インヒビターとの相互作用もしくは*c-Myc*を抑制することによって強力な抗増殖効果を発揮する [18]。実際、若齢マウスのCD4<sup>+</sup> T細胞にC/EBP $\alpha$ をコードする*Cebpa*を強制発現させると*c-Myc*、*cyclin D1*の発現抑制並びに増殖能の著しい低下が観察されている。また、*Spp1*の顕著な活性化と*IL-2*、*IL-4*の活性化抑制も認められる[7]。これらの結果から、PD-1<sup>+</sup> MP CD4<sup>+</sup> T細胞が示す増殖能の低下やオステオポンチン産生などの機能異常にはC/EBP $\alpha$ が重要な役割を担っているものと考えられる。

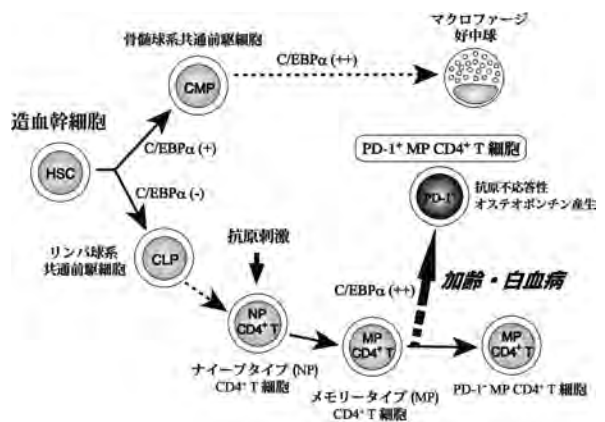


図5 PD-1<sup>+</sup> MP CD4<sup>+</sup> T細胞の由来とその性質

加齢に伴って増加するPD-1<sup>+</sup> MP CD4<sup>+</sup> T細胞は、遺伝子再プログラミングによるC/EBP $\alpha$  (本来は非リンパ球系細胞の分化や機能の制御に関係する転写因子)等の発現によってPD-1陰性MP CD4<sup>+</sup> T細胞から派生するものと考えられている。また、この細胞集団と機能的にも遺伝子発現パターンに於いても同様の集団が白血病でも著しく増加する。PD-1<sup>+</sup> MP CD4<sup>+</sup> T細胞は抗原刺激に対して不応答性であることや炎症性サイトカインであるオステオポンチンを大量に産生するなど特異な性質を有している ([http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news\\_data/h/h1/news6/2009/090908\\_1.htm](http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news_data/h/h1/news6/2009/090908_1.htm)より改変)。

## 7. 白血病でも増加するPD-1<sup>+</sup> MP CD4<sup>+</sup> T細胞

白血病等の悪性腫瘍ではではしばしば深刻なT細胞の免疫抑制が認められ、PD-1<sup>+</sup> MP CD4<sup>+</sup> T細胞との関係が注目される。湊らの研究グループは白血病細胞BA-1を移植したC57BL/6マウスの解析並びに白血病を自然発症するSpa-1<sup>-/-</sup>マウスの解析から、白血病の発症に伴ってPD-1陽性のMP CD4<sup>+</sup> T細胞が著しく増加することを明らかにした[7]。また、白血病で同定されたPD-1<sup>+</sup> MP CD4<sup>+</sup> T細胞に於いて老齢マウスの場合と同様に増殖能の低下、リンフォカイン産生能の低下、オステオポンチンの産生等の機能変化が起こることを観察している。更に、老齢マウスおよび白血病マウス由来PD-1<sup>+</sup> MP CD4<sup>+</sup> T細胞の遺伝子発現プロファイリングの結果、両者に高い相関を見いだしている。これらの事実から、白血病に於いても加齢で増加するPD-1<sup>+</sup> MP CD4<sup>+</sup> T細胞とほぼ同様の細胞集団が増加するものと考えられて

いる (図5)。

PD-1<sup>+</sup> MP CD4<sup>+</sup> T細胞は、抗原刺激に対して不応答性であることから老齢個体や白血病に於ける免疫抑制に関与している可能性が高い。また、PD-1<sup>+</sup> MP CD4<sup>+</sup> T細胞が過剰に産生するオステオポンチンにはガン細胞の浸潤や転移を促進する作用が認められており[19]、この細胞集団がガンの進展にも関与する可能性がある。更に、自己反応性T細胞の除去システムに影響を及ぼすことも考えられる。生体は自己反応性T細胞を細胞死によって除去するが、オステオポンチンには活性化CD4<sup>+</sup> T細胞のアポトーシスを抑制する作用がある [20]。このことから、老齢個体や悪性腫瘍では自己反応性T細胞の除去システムに障害があることも予想される。

## 8. おわりに

加齢に伴って増加する細胞集団として発見されたPD-1陽性CD4<sup>+</sup> T細胞の特徴がかなり明らかになってきた。T細胞は病原体に反応すると活性化して増殖するが、役割を終えるとその殆どはアポトーシスを起こして死滅する。しかし、そのごく一部はメモリー T細胞として長期間生き続け二度目の感染に備えている。PD-1陽性CD4<sup>+</sup> T細胞はこのメモリー T細胞から派生した特異な細胞集団であることが明らかになった。この細胞集団 (PD-1<sup>+</sup> MP CD4<sup>+</sup> T細胞) は抗原刺激に対して応答能を失っているだけでなく、オステオポンチンを大量に産生するなど、元の細胞とは機能的にも大きく変化している。また、これと同様の細胞集団が白血病でも増加することが明らかになった。

前述の如く、PD-1<sup>+</sup> MP CD4<sup>+</sup> T細胞は老齢個体や悪性腫瘍に於ける免疫抑制と密接に関連すると考えられる。そこで最後に、PD-1<sup>+</sup> MP CD4<sup>+</sup> T細胞を標的にした免疫機能の回復の可能性について考えてみたい。慢性のウイルス感染で疲弊状態に陥ったCD8<sup>+</sup> T細胞は、抗PD-1抗体等によるPD-1-PD-L経路の遮断で機能が回復することが知られている [21]。このことから、加齢や白血病で蓄積するPD-1<sup>+</sup> MP CD4<sup>+</sup> T細胞についても機能回復が期待される。しかし、PD-1<sup>+</sup> MP CD4<sup>+</sup> T細胞機能低下へのPD-1の関与については否定的な見方があるだけでなく、PD-1<sup>+</sup> MP CD4<sup>+</sup> T細胞は機能的に元の細胞とは大きく変化している。これらの事実を考え合わせると、単なるPD-1-PD-L経路の遮断では本来の機能を回復させることは難しいと思われる。次に考えられる手段としては、機能を失ったPD-1<sup>+</sup> MP CD4<sup>+</sup> T細胞を抗PD-1抗体やPD-LのPD-1結合部位に相当するペプチド等を用いて選択的に取り除くことである。この手法で残存するPD-1<sup>-</sup> MP CD4<sup>+</sup> T細胞やNP CD4<sup>+</sup> T細胞には十分な機能が保持されており、ホメオスタシス増殖による細胞数の回復が期待できることから有用な手段になると考えられる。今後、PD-1<sup>+</sup> MP CD4<sup>+</sup> T細胞を効率良くしかも安全に除去する方法を検討する必要がある。また、今後の解析からPD-1<sup>+</sup> MP CD4<sup>+</sup> T細胞が増加するメカニズムが解明されれば、その細胞集団を増加させないような手立ても可能になるかも知れない。

何れにしても、上記の手段はあくまでもマウスの結果に基づいたものである。ヒトで免疫機能の回復を実現するためにはまだまだ解決すべき課題が多いのが実態である。しかし、PD-1<sup>+</sup> MP CD4<sup>+</sup> T細胞の発見によって新たな展望が生まれてきたことは間違いない。今後の研究から免疫機能回復法の開発に結びつく成果を期待したい。

## 引用文献

1. Hirokawa K, Utsuyama M, Kasai M, Kurashima C. Aging and immunity. *Acta Pathol Jpn* 42:537-548, 1992.
2. Chakravarti B, Abraham GN. Aging and T-cell-mediated immunity. *Mech Ageing Dev* 108:183-206, 1999.
3. Linton PJ, Dorshkind K. Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat Immunol* 5:133-139, 2004.
4. Sadighi Akha AA and Miller RA. Signal transduction in the aging immune system. *Curr Opin Immunol* 17:486-491, 2005.
5. Shimada Y, Hayashi M, Nagasaka Y, Ohno-Iwashita Y, Inomata M. Age-associated up-regulation of a negative co-stimulatory receptor PD-1 in mouse CD4<sup>+</sup> T cells. *Exp Gerontol* 44:517-522, 2009.
6. Channappanavar R, Twardy BS, Krishna P, Suvas S. Advancing age leads to predominance of inhibitory receptor expressing CD4 T cells. *Mech Ageing Dev* 130:709-712, 2009.
7. Shimatani K, Nakashima Y, Hattori M, Hamazaki Y, Minato N. PD-1<sup>+</sup> memory phenotype CD4<sup>+</sup> T cells expressing C/EBP $\alpha$  underlie T cell immunodepression in senescence and leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:15807-15812, 2009.
8. Khoury SJ, Sayegh MH. The roles of the new negative T cell costimulatory pathways in regulating autoimmunity. *Immunity* 20:529-538, 2004.
9. Miller RA, Garcia G, Kirk CJ, Witkowski JM. Early activation defects in T lymphocytes from aged mice. *Immunol Rev* 160:79-90, 1997.
10. Inomata M, Shimada Y, Hayashi M, Shimizu J, Ohno-Iwashita Y. Impairment in a negative regulatory system for TCR signaling in CD4<sup>+</sup> T cells from old mice. *FEBS Lett* 581:3039-3043, 2007.
11. Vallejo AN. CD28 extinction in human T cells: altered functions and the program of T-cell senescence. *Immunol Rev* 205:158-169, 2005.
12. Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y,



- Tsubata T, Yagita H, Honjo T. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol* 8:765-772, 1996.
13. Pawelec G, Hirokawa K, Fülöp T Jr. Altered T cell signalling in ageing. *Mech. Ageing Dev* 122:1613-1637, 2001
  14. Jansson M, Panoutsakopoulou V, Baker J, Klein L, Cantor H. Cutting edge: Attenuated experimental autoimmune encephalomyelitis in eta-1/osteopontin-deficient mice. *J Immunol* 168:2096-2099, 2002.
  15. Wang KX, Denhardt DT. Osteopontin: Role in immune regulation and stress responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 19:333-345, 2008.
  16. Zhang P, Iwasaki-Arai J, Iwasaki H, Fenyus ML, Dayaram T, Owens BM, Shigematsu H, Levantini E, Huettner CS, Lekstrom-Himes JA, Akashi K, Tenen DG. Enhancement of hematopoietic stem cell repopulating capacity and self-renewal in the absence of the transcription factor C/EBP alpha. *Immunity* 21:853-863, 2004.
  17. Johnson PF. Molecular stop signs: Regulation of cell-cycle arrest by C/EBP transcription factors. *J Cell Sci* 118:2545-2555, 2005.
  18. Laiosa CV, Stadtfeld M, Xie H, de Andres-Aguayo L, Graf T. Reprogramming of committed T cell progenitors to macrophages and dendritic cells by C/EBP alpha and PU.1 transcription factors. *Immunity* 25:731-744, 2006.
  19. El-Tanani MK, Campbell FC, Kurisetty V, Jin D, McCann M, Rudland PS. The regulation and role of osteopontin in malignant transformation and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 17:463-474, 2006.
  20. Hur EM, Youssef S, Haws ME, Zhang SY, Sobel RA, Steinman L. Osteopontin-induced relapse and progression of autoimmune brain disease through enhanced survival of activated T cells. *Nat Immunol* 8:74-83, 2007.
  21. Rowland-Jones S, Dong T. HIV: tired T cells turn around. *Nature* 443:282-283, 2006.



【随 筆】

老化研究事始め——大学病院がカロリー制限食で奮闘

三井 洋司  
徳島文理大学 香川薬学部

はじめに

生物種としてのヒトに対して、その寿命を延伸しようと、科学的な試みが米国において本気で進められようとしています。今回は主に、カロリー制限協会メンバーの自発的な運動を詳しく紹介した上、米国NIHのNIAが主導して始まった「健康人へのCALERIEプロジェクト」の趣旨とその進め方を、実際に現地訪問してインタビューした内容を基に、報告したところです。

今回は、プロジェクトを実施している3つの大学のClinical siteにおける特徴を、詳しく紹介します。実は、先に訪問したNIAで、プロジェクト責任者に質問しました。「NIHには、カロリー制限による霊長類の寿命延長を推進する優れた研究グループがある上、大きな病院も抱えている筈なのに、どうしてCALERIE プロジェクトをNIA自身がやらないのでしょうか?」と。答えは、「これらの大学に比べて、NIHには、それを推進するのに必要な人材や施設を十分に確保出来ないのです」でした。

これは、そんなに大変な事業なのでしょうか? 日本の大学、行政、研究機関が、大規模な病院と協力すれば、スムーズに実施できるのでしょうか?

その問題点を見極める事を念頭に、調査内容と感じた事をご報告しましょう。

第23話 ワシントン大学病院

——コーディネーターの活躍

アメリカ東部五大湖から下るミシシッピー川の畔に面し、ゴールドラッシュ当時、鉄道で西部へ渡る入り口だった歴史的な町、セントルイスに、その近代的な巨大病院群がありました。歴史の名残が目立つこの地域を活性化するため学園を誘致したようです。

主幹研究員のHolloszy博士が出張中なので、study coordinator の Mary Uhrich が私の為に全てをアレンジしてくれました。本プロジェクトに各専門職種のスタッフ40人程が協同するなか、それらの関係を繋ぎ、スケジュールを調整し、患者グループを各部門に誘導し、会議、打ち合わせを設定します。プロジェクト提案と論文執筆以外は何もかも、主幹研究員の意をくんでアレンジを引き受けているようです。このお役目、日本の研究チームにはない貴重な存在です。こう

連絡先：〒769-2101  
香川県さぬき市志度1314-1  
TEL: 087-894-5111 内線6613  
FAX: 087-894-0181  
E-mail: y-mitsui@kph.bunri-u.ac.jp



Gatewayから見るセントルイスの町並み



健康測定機器の紹介

したstudy coordinatorは、今後、日本のプロジェクトでも必須の人材になるでしょう。

その御陰で、先ず、彼女の指示を受けた臨床機器室の責任者から、患者グループの健康をチェックする機器類を紹介してもらいました。

何を検査するのでしょうか。下記の各項目を測定する機器類が並んでいた訳です。

- 1 経口耐糖能 (OGTT)
- 2 VO<sub>2</sub> 最大値
- 3 安息時代謝率
- 4 筋肉強度と持久力
- 5 脂肪と筋肉の生検
- 6 心理検査
- 7 中心部体温——24時間の連続測定
- 8 DEXA——X線により脂肪、骨、筋肉量を測定
- 9 二重標識水法——身体活動レベルとカロリー燃焼量を測定
- 10 免疫機能

これら項目内に多くの細目が有りますが、その測定は共通して、どの大学病院でも、実施する義務が有ります。ただし、血液、尿サンプルの検査等は、どの大学病院も共通に指定された検査機関に送って、データを得るようと、NIAの指示です。この依頼分析に以外と費用がかさむとほやいていました。

開始時期に、全項目の基準値を計って、ベースラインを確認します。その後、制限食摂取による影響を、2年間に渡って、モニターするのです。

これに関して、NIAの担当官から、重要な指摘がありました。

日本でCALERIEプロジェクトを立ち上げるなら、二重標識水法を実施出来る施設が必須だと言う事です。安定同位体を含む水を飲んだあと、代謝される同位体をNMRで検出するため、極めて高価な機器を必要なのですが、日本では、ごく一部の国立機関にしか、今は導入されていないようです。

この測定が重要な訳は、後で、述べましょう。

#### 第24話 栄養チームの活躍

さて、次に案内を受けたのは、栄養チームです。修士の学位を持つ管理栄養士達が、制限食用の献立を創ります。そして、調理グループがいわゆるキッチンで工夫を重ねながらつくって、各患者に応じた量の食事を、準備します。ここで、患者と言いましたが、実際は、病人では有りませんので、不適切な表現ですがしかたありません。スタッフは Patient あるいはVolunteer とも呼んでいましたが、実際は、(50万円受け取るので)有償ボランティアです。

そうした正規に登録されたこの患者グループには、最初の1ヶ月間は、毎日3食分の食事が個人々に応じて用意され、支給されるので、この制限食だけを自宅で食べる必要が有ります。人によって食事量のカロリーは違うのですが、一定の栄養素比率を維持して、支給の食事が増減されています。ただし、ビタミンとミネラルは、一定量の錠剤を用意されます。写真に有るように、おやつや軽い夜食等も用意されて、勝手な食物は、摂れません。その一ヶ月の間に、カロリー計算や栄養について指導されるということでした。



中央のMaryと栄養チームの面々



病院キッチンで準備した制限食おやつ

さて、患者の個人毎に違う制限食メニューを管理栄養士はどのように設定しているのでしょうか。

先に紹介した条件をクリアし(これをスクリーニングと言いますが、その問題点は、後で説明します)、患者候補グループになった人について、最終的に適格者を選定する為、40日をかけていろいろな健康状態を詳細に調べます(其れをベースライン設定といい、後述します)。その一つで重要な項目は現状の安定したエネルギー摂取量を定める事です。普段の食事で体重も安定しているなら、二重標識水(DLW)法を実施して、エネルギー燃焼量を測定します。カロリー摂取のベースラインを決めるのです。最終的に食事制限グループに登録された場合、其の値をもとに、カロリーを最終的には25%だけ減らした制限食をとるようにしますが、いきなりではありません。登録され次第 一人一人固有のスケジュールになりますが、その時から2年間のCALERIE研究が始まるのです。

最初の1週間は10%減、次の2週目から20%減、そして3週目から25%減と制限食に慣らしていきます。こうして、1ヶ月間にわたってこのプログラムにそって、提供された制限食だけを食べてもらうわけですが、その間に、どのように体重が減っていくかについては、予め理論的に計算されて、減衰曲線がグラフで示されています(それをCTSつまりコンピューター追跡システムと呼んでいます)。ですから、この制限食プログラム以外に過食すると、バレバレになってしまうのです。この一ヶ月は、患者にとっても、管理栄養士にも、そして、カウンセラーの心理学者(後で、詳しく説明しましょう)にとっても、プロジェクト成否がかかる大変な時期です。独り住まいの偏屈な人物でなければ、家族、友人など周囲との交流が大事です。それに関わらず、自分だけが制限食のみを食べるといのは、大変な苦痛です。制限食だからお腹がすきます。おいしいものの誘惑がどこでもあふれています。自分だけ別の食事だと孤立感や対人不協が生じ易くなります。パーティなど社交にも義理を欠きます。これを乗り越えるため、応援する病院スタッフは、患者のプライバシーに踏み込みながらも、なるべく落伍者が出ないよう懸命に対応するのです。



制限食のカロリー計算に必要なPDAを説明する  
チーフ管理栄養士

さて、その一ヶ月にわたる指導のあと、今度は、病院からの制限食をFeedingされずに、自分自身で調理した25%減の制限食を、毎日2年間、摂り続けます。勿論、パーティ等で、一時的に制限を超えても、次の食事機会に、補正するという方法をとります。そのために必須なのが患者それぞれに配布されたPDA（携帯情報端末）です。これによって、元になる食品材料の情報も勿論、得る事が出来ます、大事なのは、調理した食事のカロリーと栄養素量を計算、記録出来ることです。こうして自ら、カロリー制限プログラムを実施して行ける事です。勿論、体重等の変動も記録をつけます。そして、定期的に、病院で、健康チェックを受けたり、心理カウンセリングを受けると言う事です。

病院に置けるカウンセラーの働きは、実に目覚ましいものがありました。このプロジェクト実施に必須です。患者の症例検討のミーティングに、幸運にも参加出来ましたので、次回ご紹介しましょう。



## 【お知らせ】

### 第33回日本基礎老化学会大会のご案内

20010年6月17日～6月18日、名古屋大学 野依記念学術交流館で開催します。

世の中は景気低迷で研究者の職、研究費等にも大きな影響がおよんでいます。老化の研究は日本のみならず、世界中で最も重要な研究の1つになりつつあります。本学会は一貫して、老化の学術的研究を押し進めてきました。この姿勢に、さらに新しい方法論や、考え方を取り入れて、学術的で老化に関係すれば何でも発表できる自由な雰囲気学会に成長することが求められていると思います。

今回は参加者にできるだけ口演にて発表をお願いしたいと考えています。そのため、ワークショップの口演形式にします。また、一階のコーヒーショップに飲み物、食べ物持ち込み自由にします（余裕があれば一部こちらで用意します）のでぜひ自由な討論をお願いします。口演の発表内容をpower point（機種、version 明記）で大会長のメールアドレス（kisobe@med.nagoya-u.ac.jp）に6月10日までに送っていただき動作確認を受けることをお進めします。なお、演題の中でシンポジウムに組み込めるだけの内容のあるものがあればそちらに回します。

#### 予定 プログラム

6/17	9:00～9:10	大会会長、学会理事長挨拶
	9:10～11:30	ワークショップ（口頭発表）
	11:30～12:30	昼食、理事会
	13:00～15:00	シンポジウム
	15:00～17:00	ワークショップ（口頭発表）
	18:00～20:00	懇親会
6/18	9:00～11:30	ワークショップ（口頭発表）
	11:30～12:30	昼食、評議委員会
	13:00～15:00	シンポジウム
	15:00～16:00	ポスター発表
	16:00～17:00	若手奨励賞発表、総会

演題募集中（3月15日〆切）

- 1) 演題登録用紙（Wordファイル）
- 2) 抄録用紙（Wordファイル）

kisobe@med.nagoya-u.ac.jp にお送りください。40歳以下はすべて若手奨励賞対象です。

33回大会会長 磯部 健一





## 複写される方へ

本誌に掲載された著作物を複写されたい方は、日本複写権センターと包括複写許諾契約を締結されている企業の従業員以外は、著作権者から複写権等の委託を受けている次の団体から許諾を受けて下さい。尚、著作物の転載・翻訳のような複写以外許諾は、直接本会へご連絡下さい。

107-0052 東京都赤坂 9-6-41 乃木坂ビル 9F 学術著作権協会  
TEL: 03-3475-5618; FAX: 03-3475-5619; E-mail: kammori@msh.biglobe.ne.jp

### Notice about photocopying (In the USA)

In order to photocopy any work from this publication, you or your organization must obtain permission from the following organization which has been delegated for copyright for clearance by the copyright owner of this publication.

Copyright Clearance Center, Inc.  
222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923 USA  
TEL: 978-750-8400; FAX: 978-750-4744; www.copyright.com

## 基礎老化研究 第34巻 第1号

平成22年（2010）2月25日

発行者 日本基礎老化学会  
〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2  
東京都健康長寿医療センター研究所内  
電話 03-3964-3241

編集 編集委員会

印刷所 三陽工業株式会社