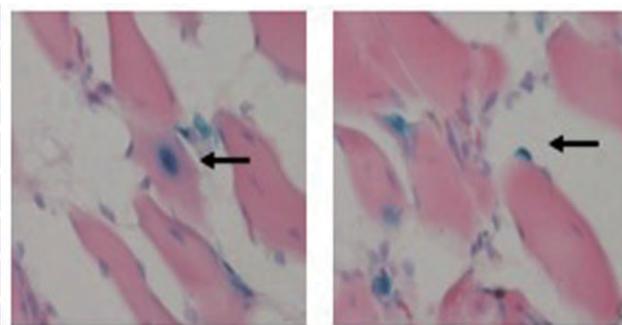
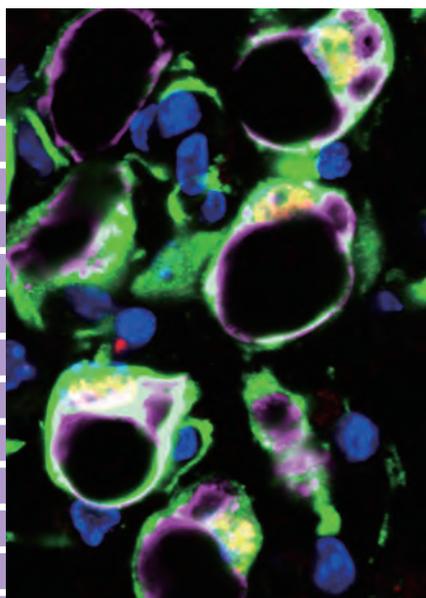


BIOMEDICAL GERONTOLOGY

基礎老化研究

第32回日本基礎老化学会シンポジウム(プログラム・発表抄録)

- 総説 ■ 老化や疾患における骨格筋の萎縮と治療への応用
上住 聡芳、中谷 直史、常陸 圭介、土田 邦博
- 総説 ■ アセチルコリンのルーツと非神経性アセチルコリン
川島紘一郎
- 総説 ■ 老化遺伝子 $clk-1$ の哺乳動物における機能
高橋真由美、白澤 卓二
- トピックス ■ 老化と再生—老化マウスからiPS細胞の樹立
磯部 健一、Zhao Cheng、伊藤佐知子、西尾 直美
- 学会報告 ■ “2010 Spring Conference of the Korean Society for Gerontology and 10th Korea-Japan Gerontologist Joint Meeting”に参加して
遠藤 昌吾
- 学会報告 ■ 10th Korea-Japan Gerontologist Joint Meetingに参加して
森 秀一
- 随筆 ● 老化研究事始め—化学物質で寿命延長の時代なのか? 三井 洋司



- 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: 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
- 編集委員会委員: 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
- 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
- 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
- 樋上 賀一 東京理科大学薬学部生命創薬科学科
〒278-8510 千葉県野田市山崎2641
- 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
-

- 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: Yuri Miura, Research Team for Mechanism of Aging, Tokyo
Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku,
Tokyo 173-0015, JAPAN
- Editors: Sae Uchida, 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
- Takahiko Shimizu, Research Team for Mechanism of Aging, Tokyo
Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku,
Tokyo 173-0015, JAPAN
- Yoshikazu Higami, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of
Science, 2641 Yamazaki, Noda-shi, Chiba-ken 278-8510
- Noriyuki Fuku, Research Team for Functional Biogerontology, Tokyo
Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku,
Tokyo 173-0015, 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る。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: 三浦ゆり (miura@tmig.or.jp)

目 次

第32回日本基礎老化学会シンポジウム

プログラム	1
発表抄録	2-4
総説	
老化や疾患における骨格筋の萎縮と治療への応用 上住 聡芳、中谷 直史、常陸 圭介、土田 邦博	5-11
総説	
アセチルコリンのルーツと非神経性アセチルコリン 川島紘一郎	13-24
総説	
老化遺伝子 <i>clk-1</i> の哺乳動物における機能 高橋真由美、白澤 卓二	25-31
トピックス	
老化と再生—老化マウスからiPS細胞の樹立 磯部 健一、Zhao Cheng、伊藤佐知子、西尾 直美	33-35
学会報告	
“2010 Spring Conference of the Korean Society for Gerontology and 10th Korea-Japan Gerontologist Joint Meeting”に参加して 遠藤 昌吾	37
学会報告	
10th Korea-Japan Gerontologist Joint Meetingに参加して 森 秀一	39
随筆	
老化研究事始め—化学物質で寿命延長の時代なのか？ 三井 洋司	41-43
附	
基礎老化学会サーキュラー 第87号	

CONTENTS

<REVIEW>

Mechanism and therapeutic application against skeletal muscle atrophy in aging and diseases

Akiyoshi Uezumi, Masashi Nakatani, Keisuke Hitachi, Kunihiro Tsuchida 5-11

<REVIEW>

Origin of acetylcholine and expression of non-neuronal acetylcholine

Koichiro Kawashima 13-24

<REVIEW>

Functions of the gerontogene *clk-1* in mammals

Mayumi Takahashi 25-31

表紙：(左) 脂肪変性条件下での骨格筋内移植による間葉系前駆細胞の脂肪細胞への分化

詳しい説明は8ページ(総説)を参照

(右) Lac Z陽性サテライト細胞

詳しい説明は33ページ(トピックス)を参照

第32回基礎老化学会シンポジウム

市民講演会『老いをみつめる科学』

日時：平成22年11月21日（日）午後1時半～5時

場所：長崎歴史文化博物館ホール

13:30-13:40

はじめに

森 望

13:40-14:10

老： 未病からみる老い

福生 吉裕

((財) 博慈会老人病研究所長)

14:10-14:40

食： 腹八分目の老化学

下川 功

(長崎大学医学部病理学教授)

14:40-15:10

動： 運動ホルミシスからの健康長寿

後藤佐多良

(順天堂大学スポーツ健康医科学研究所客員教授)

15:10-15:30

(休憩)

15:30-16:00

脳： 認知症脳をみる

伊藤 健吾

(国立長寿医療研究センター
／認知症先進医療開発センター部長)

16:00-16:30

寿： 脳の中の寿命遺伝子

森 望

(長崎大学医学部神経解剖学教授)

16:30-16:40

おわりに

石井 直明

(東海大学医学部教授／日本基礎老化学会会長)



発 表 抄 録

未病からみる老い

福生 吉裕 ((財) 博慈会老人病研究所)

(幸齢社会をめざして)

あと5年先の2015年には団塊の世代が65歳以上となり4人に一人が高齢者となる時代となります。日本がこれまで経験しなかった未曾有の高齢社会が誕生することになります。この高齢社会を“幸齢社会”とする為には社会保障システムの充実が何よりも望まれる事ではありますが、一方では少子化が進んでいるのでその調節は難しくなって来る事は確かでありましょう。そのような時代にあっては孫子の兵法ではないが自分の身体の老化について良く知ることが少なくとも相手(政府および若者)を当てにせず、身を守る第一歩であります。

(健康と病気とは連続している)

“幸齢者”になるには先ず当然ですが今から病気にならないことです。病気は突然やってくるものではありません。健康と病気は連続しているのです。

例えば脳卒中という病気は突然に起こるようですが実はその前には高血圧や動脈硬化の状態の時期があるのです。動脈硬化の前は高脂血症で、高脂血症の前はメタボリックシンドロームでそのまた前は肥満です。このように病気にむかわしめる自覚症状の少ない時期が必ずあります。この時期を“未病”と言います。老化により各臓器にそれぞれの未病の時期を発症させてきます。身体の臓器機能の劣化が未病の状態を作ります。そしてこの未病の状態は老化によって増え、より多様化してきます。老化は未病の集合体でもあります。一歩間違えばそれぞれの未病の時期から病気を発症させてきます。これが老化の臨床的特徴でもあります。この未病の時期に鋭くなって早くに自分の身体の対応をすることが老化対策につながります。

(良い老化、悪い老化)

誰にでも平等に死は必ず訪れてきます。しかし寿命は平等ではありません。同じ同級生がバタバタと時を同じくして一斉に亡くなることはありません。格差が出てくるのです。その原因は病気の発症であり、病気を発症させるかどうかは良い老化と悪い老化の差によります。良い老化とは身体の全体が未病のまま平等に老化することであり、悪い老化とは一部の臓器だけが老ける事です。良い老化と悪い老化を未病の時期から見分けることが大事です。

貧血、高血圧、高血糖、メタボリックシンドロームそれに前癌状態は悪い老化の始まりです。これらの悪い老化のサインを未病として痛くも痒くも無い時期に発見することが出来ます。目で見える未病としては、耳たぶのしわ、鼻の下のしわ、先の太い指、唇の黒子、赤い掌などがあります。本日はこれらの悪い老化を見分ける未病のチェックとその対策についてお話し致します。

腹八分目の老化学

下川 功 (長崎大学・医学部・探索病理学(第一病理))

2009年1月、厚生労働省の研究班が、40歳以上の人の健康状態を12年間に亘って追跡調査した結果、やや太り気味の人も死亡率は増加しておらず、逆にやせている人の死亡率が高いことを報告しました。メディアはそれを「小太りは長生きする」と報道しました。やや肥満、メタボリック症候群の予備群には、朗報(?)として話題になりました。

ラットやマウスを用いた実験的研究では、自由に摂食させた動物に比べて、摂食量を10~40%程度制限する(カロリー制限と呼びます)と様々な疾患や老化現象が遅延され、長生きすることが知られています。ヒトと同じ霊長類であるサルにおいても類似した効果があることが報告されています。摂食量を制限すると当然、体重および体脂肪は減少します。このような研究から、一般的にやせている方が長生きすると考えられていたので、「小太りが長生き」とする報道に皆驚いたのです。

ヒトを含めた動物は、自由に摂食できる環境におくと、過剰に食物(カロリー)を摂取するよう神経内分泌系がセットされています。野生の環境下では、季節的あるいは突発的に食物不足が起こるため、動物は食べることができるときにできるだけエネルギーを脂肪として蓄え、飢餓に備えることができるように進化してきたと考えられています。つまり、太りやすい性質をもつ動物が長生きであったのです。ところが、現代では、食物が安定して供給されるようになったため、つい摂食しすぎて、肥満してしまい、メタボリックシンドロームを引き起こし、死亡率を高めています。メディアでは、様々なダイエット法が紹介されていますが、進化生物学的な視点からみれば、ダイエットは失敗して当たり前なのです。

しかしながら、これまでの研究から「腹八分目に医者いらず」という諺が正しいことは明らかです。でも、過食し太

りやすくできている私たちはどのようにしたら摂取量を制限し、長生きできるのでしょうか。

摂取量を制限しなくても、低インスリン、低体温などカロリー制限動物のエネルギー代謝の特徴を持つ人々がいます。これらの人々は、長命であることが示されています。よって、摂取量を制限しなくても、何らかの方法（薬剤や化合物、植物の抽出物など）で、カロリー制限あるいはその効果を模倣することが可能であると考えられています。これに取り組み現代科学の現状、つまりアンチエイジングとその危うさについてお話できればと考えています。

運動ホルミシスからの健康長寿

後藤佐多良（順天堂大学スポーツ健康医科学研究所）

40歳を過ぎるころになると肌のきめが粗くなってきたとか、疲れやすくなってきたとか、歳を実感し、何とかしたいと思うようになります。世にいうアンチエイジング医学は、こうした中年世代の若返り願望をターゲットにしていますが、高齢社会での真の問題は、60代・70代・80代の人々が病気になりにくく、身体機能と生きがいを長く保つにはどうしたらいいかということにあります。

老化は病気ではありません。健康なヒトや動物にも時間の経過とともに起こる肉体的精神的な衰えです。老化が進むと老年病にかかり易くなります。老年病専門の臨床医や医学者は動脈硬化・認知症その他の神経変性疾患・骨格筋萎縮（サルコペニア）・骨粗しょう症などの最大の危険因子は老化であるといえます。多くの人は、いわゆる三大死因ががん・心臓疾患・脳血管障害、それに肺炎などの感染症で亡くなります。運よく老年病から免れたとしても次第に虚弱が進み、老衰で亡くなることとなります。健康長寿のためには、出来るだけ老化を遅らせて老年病のリスクを減らし、虚弱の進行を遅くすることが大切です。

老化の仕組みについての有力な説は、生体内で生じる活性酸素がタンパク質やDNAを傷つけて、それが蓄積して細胞機能を低下させるというものです。この考え方では活性酸素は悪玉です。アンチエイジングではこの悪玉を抑え込もうと、抗酸化ビタミンやポリフェノールのような抗酸化物質の摂取を勧めています。しかし、活性酸素は生体にとって必要な物質でもあり、過剰な抗酸化物質は有害無益です。

運動(身体活動)にはがん・認知症などの病気のリスクを減らす作用があることが知られています。運動ホルミシスは運動による活性酸素の増加を通じて生体がつまみ抗酸化機能を活性化し、活性酸素の有害な側面を軽減しようとするものです。ホルミシスとは量が多ければ有害でも少量だと有益に働く現象のことをいいます。確かに、過激な運動は活性酸素を増やし、細胞機能を損なう可能性があります。一方、動物に定期的な運動をさせるとタンパク質やDNAの酸化傷害が減る、ヒトでは抗酸化ビタミンの摂取で運動の有益効果が減ってしまう、と報告されています。定期的運動の有益効果の一部は活性酸素の適度な産生を通じて引き起こされているといえそうです。このような効果は高齢者にも期待できます。実際、トレーニングによる筋力の増強は90歳を過ぎても起こることが知られています。遅すぎることはないのです。

認知症脳をみる

伊藤 健吾（国立長寿医療研究センター／認知症先進医療開発センター）

高齢化社会の進展に伴い、認知症の増加は深刻な社会問題となっています。認知症の中でもっとも頻度の高いのはアルツハイマー病ですが、まだ根本的な治療法が確立されていないことから、社会的な関心も高い疾患です。このため、有効な治療を開発し、早期の治療を可能にしてアルツハイマー病を制圧することは、極めて必要性が高く、その実現が待たれています。アルツハイマー病では「もの忘れ」などの症状が発現する10年以上前から、老人斑（アミロイドプラーク）と呼ばれる脳内の沈着物など病的な変化が生じているとされ、今後は出来る限り早期、出来れば症状がはっきりしないような段階でアルツハイマー病を診断して治療を開始することが最も重要となってきます。

アルツハイマー病の診断の基本は臨床診断基準と呼ばれる症状や心理検査の成績に基づく診断が基本ですが、臨床診断基準は進行したアルツハイマー病の診断のために作成されたもので、アルツハイマー病の初期、とくに軽度認知障害と呼ばれる「もの忘れ」のみを訴えて日常生活に支障のないような段階では臨床診断基準だけでは診断が付きません。このため、症状や心理検査に加えて脳の画像診断や脳脊髄液中のバイオマーカーと呼ばれる成分の測定が早期に確実にアルツハイマー病を診断する方法として期待されています。とくに脳の画像診断は近年の進歩が著しく、また体に優しい検査なので、アルツハイマー病の診断にさらに広く使用されていくと思われれます。

今回の講演では脳の画像診断の中でもごく微量の放射性同位元素（アイソトープといえます）を体内に投与して脳の働きを画像化する核医学検査を中心にして、現在アルツハイマー病の早期診断をどこまで確実にできるのか、また老人斑の画像化（アミロイドイメージング）など画像診断には今後どのような進歩が期待されるのかといった点を中心に紹介するとともに、アルツハイマー病の画像診断がどのように治療に結びついていくのかを考えてみたいと思います。

脳の中の寿命遺伝子

森 望（長崎大学・医学部・神経形態学（第一解剖））

人間にはいわゆる五感というものがあり、これで自分の外の状況を感じています。嗅覚、味覚、触覚、聴覚、視覚。しかし、これ以外にも、たとえば、時間感覚というものもあります。一日の感覚、一年の経過の感覚、そして一生を把握する時間感覚も確かにあります。これは自分を自分として認識する感覚と密接に関係しているはずですが、すなわち、一人の人間の寿命感覚は人間の自己意識あるいは心とも強く関係するのです。

寿命を計る時計、それはどこにあるのでしょうか？まだ、すべてが解き明かされたわけではありませんが、脳内にある、と考えられます。人間を含めて、生物の寿命は遺伝的に決まっています。つまり「寿命遺伝子」というものがあるのです。これまでの研究から寿命遺伝子にはいくつかのタイプがあることがわかってきました。

十年ほど前にイタリアの研究グループがネズミのある遺伝子（p66-Shc/ShcA）を潰すと寿命が延びることを発見しました。その当時、私たちはそのイタリアのグループが手にしていた遺伝子と非常によく似た遺伝子を二つ手がけていました。これをShcBとShcCといいます。そのふたつともが、脳神経系での発現が非常に強いものでした。

この脳で発現している寿命遺伝子に非常によく似ている遺伝子の働きを調べる過程で、いろいろなことがわかってきました。たとえば、ShcC遺伝子がないマウスは記憶学習能力が高く、神経系の「可塑性」が高まっていました。それを裏付けるように、神経の微細構造を注意深く観察するとスパインという神経と神経の接点が多くなっている、つまり脳の中の特に海馬という部分での神経ネットワークが密になっていることがわかりました。しかし、一方で、このShcCは神経細胞を酸化ストレスから保護する働きもありました。p66-Shcは酸化ストレス下に細胞を死に至らしめる分子だったのに対し、このShcCはそれを阻止する分子だったのです。つまり、p66-Shcはないほうがいいのですが、ShcCは必ずしもないほうがいいとは言えないということです。

脳内にはこれ以外にも寿命に関わる遺伝子があります。それらの機能を知り、うまく調節することで、科学的に長寿を支えることが可能になると思われます。老化を制御する遺伝子、寿命を制御する遺伝子、その一部は脳の中で神経細胞（ニューロン）の機能性を操ることで私たちの健康長寿を支えているのです。

【総 説】

老化や疾患における骨格筋の萎縮と治療への応用

上住 聡芳、中谷 直史、常陸 圭介、土田 邦博
藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・難病治療学研部門

要約

老化や難治性筋疾患等に伴って、骨格筋は形態的变化および機能低下が生じる。老化では特に速筋型のタイプII筋線維の萎縮が顕著に見られ、脂肪沈着や繊維化が見られる。骨格筋の再生を担うのは筋衛星細胞であるが、老化に伴い、筋再生能力の低下を来す。近年、骨格筋量調節因子であるマイスタチンやアクチビンの機能制御により、筋萎縮が防げる事が明らかとなってきた。マイスタチン阻害によって、筋萎縮の防止、繊維化の抑制、体脂肪量の減少、脂肪肝抑制が期待されており、老化、筋疾患、悪液質への応用も現実味を帯びてきた。更に、脂肪細胞の起源に関する研究に近年大きな進展があり、骨格筋内の異所性脂肪変性を担う細胞群や脂肪組織での脂肪産生細胞の起源が明らかとなってきた。本総説では、老化、筋疾患等に伴って生じる筋萎縮の病態と治療法開発の現状、そして、脂肪細胞の起源と異所性脂肪変性に関する最新の知見を筆者らの研究を中心に紹介する。

キーワード: sarcopenia, muscle atrophy, myostatin, muscular disease, ectopic fat formation

1. はじめに

筋骨格系は、骨格筋、腱、骨、軟骨、脂肪組織、結合組織から構成され、生体の最重量を占める組織である。とりわけ、骨格筋は成人の身体中の重量の約40%を占め、関節運動を協調させた円滑な動きや姿勢の維持に関与している。熱産生による体温の維持やインスリンの標的臓器として血糖調節にも重要な役割を果たしている。骨格筋は、老化や各種病態によって劇的な変化と機能低下を示す。筋骨格系組織の機能低下は、運動能力低下に直結し、日常生活動作(ADL)や生活の質(QOL)を低くするため、その対策は医学的に重要である。

骨格筋は、筋膜に包まれた筋線維と結合組織で構成されている。筋線維は、多くの筋芽細胞が融合した結果、多核を形成する筋細胞で形成されるが、分裂して新たな筋線維を生み出す事は出来ない。その役割を担うのは、筋線維の基底膜直下に存在する単核の筋衛星細胞(サテライト細胞)である。筋衛星細胞は骨格筋の発生に寄与すると共に、筋線維の損傷時には、増殖、分化、融合といった経過をたどり、筋再生に重要な働きをしている。筋線維は、遅筋線維(タイプI)と速筋線維(タイプIIA, IIB, IIX)に分けられ、遅筋線維はミトコンドリアを豊富に含み、酸化系酵素の活性が高く、収縮速度は遅いが疲労しにくい性質を持つ。ミオグロビンを多く含み赤筋

線維とも呼ばれる。速筋線維は、解糖系酵素活性が高く収縮速度は早い、特にIIB, IIX線維は疲労しやすい。無酸素状態での代謝に依存しており、白筋線維とも呼ばれる。

脊髄前角に細胞体を持つ α 運動ニューロンとそれに支配される筋線維を運動単位と呼ぶ。身体内には400を超える骨格筋が存在し、遅筋線維と速筋線維が混在しているがそれぞれの骨格筋では、その比率は異なっている。トレーニング等で、筋線維を肥大させたり、線維タイプをIIB型からIIA型への変換させることで持久力を改善させる事は可能と考えられている。

骨格筋組織は生体内で隣接する骨格筋内の細胞のみならず、身体内の脂肪組織や内臓臓器、神経組織との間で、サイトカインの産生と受容、神経連絡を介して相互連携しており、生体の恒常性維持に重要な役割を果たしている。

最近の研究で、老化や筋疾患によって生じる筋萎縮を抑制可能であることが示されている。特に、骨格筋から産生されるマイオスタチンと呼ばれる分子を阻害する治療法は、有望視されている。骨格筋は、再生医療の分野からのアプローチも期待されている。骨格筋は再生能力の高い組織であり、筋衛星細胞が筋再生に大きな役割を担っている。筋衛星細胞以外にも独特の分化能や特徴を持った前駆細胞が存在し、骨格筋の恒常性維持に寄与している。本総説では、骨格筋の老化や疾患における変化を述べると共に、筋萎縮の防止法や最近発見された脂肪前駆細胞群について紹介する。

連絡先: 〒470-1192

愛知県豊明市杣掛町田楽ヶ窪1-98

Tel: 0562-93-9384

Fax: 0562-93-5791

E-mail: tsuchida@fujita-hu.ac.jp

2. 骨格筋の形成と筋萎縮

1) 骨格筋の形成

横紋筋である骨格筋は、胎児期の体節に由来し、体節中の筋前駆細胞が運命決定され筋分化に寄与している。筋前駆細胞は遊走と増殖を行ない、細胞融合と成熟過程を経て多核の筋線維を形成する。Helix-loop-helix構造を持ったMyoDファミリー転写因子群が骨格筋の分化制御に決定的な役割を果たしており、筋分化決定因子 (muscle determining factor, MRF) と呼ばれる。MyoDとMyf5は主として筋芽細胞への分化決定と維持に働き、myogeninとMRF4は主に筋芽細胞から筋管細胞への最終分化に関与する [1]。

Pax7は、胚期や周産期の骨格筋形成に必須の分子であり、生後は筋衛星細胞の生存に必須であると考えられている [2]。筋衛星細胞は、筋細胞の筋形質膜と基底膜の間に存在し、成体の筋再生を担う細胞であり、Pax7は筋衛星細胞のマーカーとして頻用されている。胎生期の皮筋節のPax3/Pax7陽性細胞が筋衛星細胞の起源であることが示されている [2]。長らく、Pax7の筋衛星細胞での発現が筋再生に必須であると考えられていたが、マウスの実験から、生後2-3週以降では、Pax7は筋衛星細胞による筋再生に必須ではない事が示された [3]。なお、試験管内で、筋分化を示す細胞には、筋衛星細胞以外に、骨髄等の間葉系幹細胞、血管由来の前駆細胞、iPS細胞等がある。

2) 骨格筋形成におけるマイオスタチンの役割

生体内の個々の組織の大きさを決定するための抑制因子が存在するという仮説があり、カローン仮説と呼ばれている [4]。骨格筋のカローンの最有力候補が骨格筋から産生され筋量を負に制御しているマイオスタチンである。マイオスタチンは、1997年に機能が明らかになったTGF- β ファミリーに属するサイトカインである [5]。マイオスタチンが遺伝子変異等で欠損したり、マイオスタチン阻害分子を投与すると、骨格筋量が増大する。遺伝子破壊マウスやウシ、羊、Whippetと呼ばれる短距離レースの犬などで遺伝子レベルでのマイオスタチン阻害動物の例が報告されている [5-8]。羊の場合は、マイオスタチン遺伝子の3' 翻訳領域が変異することで、骨格筋特異的なmiRNAである miRNA1やmiRNA 206の標的的部位となることで、発現が減少する [8]。ヒトのマイオスタチン変異も報告されており、筋量と筋力が増大し脂肪量が少ない [9]。マイオスタチンが筋量を調節する詳細な分子機構は不明点も多いが、筋線維構成分子のタンパク分解系の亢進が作用機構の一つだと想定されている。マイオスタチン阻害は、筋衛星細胞の分化調節へ影響を及ぼすが、その寄与は当初考えられていたより少ないとする報告もある [10,11]。マイオスタチンとタンパク質の一次構造上類似したアクチビンAも筋量の調節に関与している [12]。マイオスタチンの作用が骨格筋に特異的であるのに比較して、アクチビンの作用は全身におよぶ。アクチビンは下垂体からの卵胞刺激ホルモンの分泌作用を基に精製されたホルモンであるが、生殖系への作

用以外にも、神経栄養因子としての作用や記憶への関与など多彩な作用を有している [13]。アクチビンとマイオスタチンの阻害分子としてホリスタチン (FSTN) が知られている [14]。我々は、FSTNに由来しアクチビンへの阻害がないマイオスタチン阻害因子を開発した [15]。開発因子やFSTNには成体の筋量を増加させる効果がある [15,16]。FSTN等のマイオスタチン阻害因子の遺伝子導入や因子の投与で筋量を増大させ、筋ジストロフィーモデル動物の病態を軽減可能である事が確認されている [15,16]。

3) 骨格筋萎縮の分子機構

骨格筋萎縮は、筋肉構成タンパク質の合成と分解の正常なバランスが崩れた状態で引き起こされる。老化に伴う筋萎縮はサルコペニア (sarcopenia) と呼ばれる。加齢の初期の筋萎縮には、筋自体の寄与が大きい。形態学的には、筋線維数は加齢に伴って40%もの減少が見られる。横断面積の縮小もII型筋線維に顕著に見られ、I型とII型筋線維が混在した筋線維が増える。また、同系統の筋線維が束になって存在する筋線維のグループ化が生じる。この原因としては、高齢者ほど運動単位数が減少する事による神経原性変化に起因する事が示唆されている。つまり、老化では、筋原性萎縮と運動単位の減少による神経原性変化の両者が生じる。さらに、細胞死も関与すると考えられている。サルコペニアの特徴は、ゆっくりと筋力や筋持久力が低下していく事である。一方、重症の脊椎損傷による半身麻痺や脳梗塞などで長期の寝たきり (ベッドレスト) やギブス固定で生じる筋萎縮は廃用性筋萎縮と呼ばれるが、遅筋型のタイプI線維が優位に萎縮し、速筋優位となる。

筋萎縮は、加齢に伴って生じる以外にも、筋ジストロフィーを代表とする遺伝性の神経筋疾患で見られる。さらには、癌や感染症、慢性心不全、肝不全の末期に生じる悪液質 (カヘキシー、cachexia) では、筋萎縮と共に脂肪細胞の萎縮が生じて体の恒常性が維持出来ない。悪液質では、食思不振、体重減少、栄養障害、疲労が見られる。TNF α やIL-6などのサイトカインの発現の変化が病態に関与するが、現状では治療法は存在しない。

蛋白質分解系には、ライソソーム系、カルパイン系、ユビキチン/プロテアソーム系があるが、骨格筋萎縮では、筋特異的ユビキチンリガーゼの発見がなされ、主にユビキチン/プロテアソーム活性の上昇によるタンパク分解の亢進の解析が大きく進展した [17]。MuRF1(muscle RING finger-1)とMAFbx-1/atrogen-1は、坐骨神経切断等の筋萎縮で発現上昇する骨格筋と心筋特異的なユビキチンリガーゼであり、筋萎縮時に活性化される [17]。これらの遺伝子破壊マウスや阻害で、筋萎縮に抵抗性を示す事から筋萎縮を担う重要分子であると考えられている [17]。IGF-1 (insulin-like growth factor-1)は強力に筋形成を促すが、その下流で、Akt-1がリン酸化により活性化される。Akt-1が活性化すると、S6キナーゼ系によりタンパク質合成が上昇すると共に、転写因子のFOXO (forkhead box O)がリン酸化する。リ

ン酸化FOXOは核内へ移行せず、その標的遺伝子であるMuRF1とMAFbx-1の発現が抑制される。ベッドレスト等の廃用性筋萎縮においては、IGF-1が低下し、Akt-1が抑制され、FOXOは脱リン酸化状態になり、核移行して、MuRF1とMAFbx-1の発現を高め、筋タンパク分解が亢進するモデルが提唱されている [18]。マイオスタチンは、IGF-1と拮抗して作用する事で、筋萎縮を促進する [19]。

サルコペニアにおける筋萎縮は、廃用性筋萎縮とは異なり、加齢に伴い緩やかに生じる現象である。廃用性筋萎縮とは異なった分子機構が示唆されている。MuRF1とMAFbx-1の関与については、相反する報告もあり、明らかではない。サルコペニアにおいて、筋衛星細胞を活性化する因子が減少する事が知られている。老化によって、筋衛星細胞の増殖能が低下し、筋再生能が弱まり、線維化や脂肪化が生じる。老齢マウスでは、筋衛星細胞の筋分化への寄与が弱まり、Wnt経路の活性が高まり、線維化を起こす [20]。これは、循環血液を含めた細胞環境が加齢によって異なることに起因することが分かっている [21]。

4) 筋ジストロフィー

代表的な難治性筋疾患に筋ジストロフィーがあり、現在では40種を超える病型に分類することが出来る。筋ジストロフィーの中で最も頻度が高く症状も重篤なのが、X連鎖性劣性遺伝性疾患のデュシェンヌ型ジストロフィン (DMD) である。DMDの責任分子であるジストロフィン遺伝子は79個のエクソンから成り、ゲノムサイズが2.3Mb、mRNAのサイズが14Kbにおよび、タンパク質の分子量が40万を超える巨大分子である。そのため遺伝子治療は難しく、現在に至るまで有効な治療法はない。ジストロフィン、ジストログリカン、ラミニンからなる複合体 (ジストロフィン/グライコプロテイン複合体、DGC) の主な構成要素であり、細胞内ではアクチンフィラメントと結合している。ジストロフィンが存在しないと、DGC自体が膜に集積出来ないため、筋膜の修復に支障を来し、軽度の運動負荷でも筋崩壊し、筋萎縮と筋力低下を起こす。筋線維の大小不同、円形化、中心核の増加が生じる。筋線維の変性・破壊と再生を繰り返しながら、進行性の筋萎縮が生じる。末期では骨格筋内に脂肪化や繊維化が見られる。

3. マイオスタチン阻害による筋萎縮の治療法開発

老化や筋ジストロフィーによる筋萎縮は治療が難しいと考えられて来たが、近年の分子生物学、細胞生物学的手法の発展に伴って、有望な治療法が開発されつつある。本総説では、萎縮した筋肉量を取り戻し、筋力を増加させるマイオスタチン阻害療法を紹介する。実験動物レベルでは、デュシェンヌ型、肢帯型等多くの筋ジストロフィーの病型でマイオスタチン阻害療法の有効性が示されている [15,16,22-27]。しかしながら、メロシン欠損型など病型によっては、病態を悪化させる場合もあるので注意が必要である [28]。筋ジストロフィーは、遺伝病

なので、マイオスタチン阻害療法と原因遺伝子を補う手法とを組み合わせるとより有効性が増すと考えられている [29]。

マイオスタチン阻害の候補分子としては、マイオスタチンに結合して活性を阻害するマイオスタチン前駆体ペプチド、ホリスタチンやその改変分子、マイオスタチン阻害抗体、マイオスタチン受容体であるアクチンタイプIIB受容体の細胞外領域 (ACVR2B-Fc) 等がある [30]。なお、ACVR2B-Fcとホリスタチンは、マイオスタチン阻害のみならず、アクチビンの阻害作用も有している。現状では、欧米を中心に多くの阻害抗体が開発されている。また、ACVR2B-Fcに強力な筋肥大効果が見出され、筋ジストロフィーに対する治験が行なわれつつある段階にある。マイオスタチン阻害やアクチビン阻害による筋量増加治療法は、サルコペニアや悪液質による筋萎縮にも効果があることが期待されている [31-34]。老齢マウスにおいて、マイオスタチン阻害によって、筋衛星細胞の活性化や筋損傷時のマクロファージの遊走が促進されることで、筋再生が促進され、サルコペニアが改善するという興味深い報告がある [31]。さらに、ホリスタチン遺伝子をアデノウイルスベクターで1回投与しただけで、長期発現とサルコペニア抑制効果がある [33]。また、マイオスタチンやアクチビンの阻害分子であるホリスタチンを用いた遺伝子導入による治療が霊長類モデル動物を用いて筋力増加と筋力増強効果が証明されている [34]。ヒトへの応用も実現することが期待される。遺伝子変異によるマイオスタチン阻害では、主に速筋線維が増加し、筋線維の肥大と筋線維数増加の両方が見られる [5]。一方、最終分化が終わった後の成体のマイオスタチン阻害による筋肥大は、必ずしも速筋線維優位ではなく、筋線維数の増加よりも筋線維の肥大効果が大きいと考えられている。また、マイオスタチン阻害により、骨格筋の繊維化も抑制される [22-24]。

癌による悪液質では、脂肪量の低下と共に筋量低下が生じるが、ACVR2B-Fc投与によって、主にマイオスタチンを阻害する事で筋量増加と生存率の改善が見られている [32]。癌の悪液質に陥った骨格筋では、ジストロフィンの発現が低下し、正常なDGCが形成されないとの報告もあり、悪液質による筋萎縮と筋ジストロフィーによる筋疲弊に共通点がある可能性が示唆されている [35]。

4. 骨格筋と脂肪組織との臓器間相互作用について

1) 異所性脂肪沈着と疾患

内臓脂肪、皮下脂肪に加えて、第3の脂肪として異所性脂肪が近年注目されている。異所性脂肪蓄積とは、肝臓、血管、腎臓などの脂肪組織以外の組織や細胞中に脂肪細胞や脂質が蓄積した状態である。異所性脂肪細胞の脂質は毒性を持ち、細胞の機能障害や細胞死を起こして、糖尿病、動脈硬化、脂質代謝異常をきたす。外側広筋内の異所性脂肪蓄積とインスリン抵抗性との関係が解析されている。体重減少と運動を行なうと、脂肪細胞の油滴サイズは減少し、インスリン抵抗性を改善しうる [36]。

異所性脂肪の中には、組織内の細胞に脂質が蓄積する場合と、脂肪細胞そのものが出現する場合があります。骨格筋は後者の代表的な組織である。筋ジストロフィーの病態の一つにも、骨格筋内脂肪沈着があり、病態の進行を把握する指標として有用である。

脂肪細胞の起源については間葉系幹細胞に由来すると考えられていたものの、不明点も多かったが、近年細胞レベルでの詳細な解析がなされている。筋衛星細胞は、多分化能を有し脂肪細胞にも分化するとの報告もあるが、我々の詳細な解析では、脂肪分化能は検出出来ないほど低いことが示された。骨格筋内に存在する単核細胞を網羅的に単離し、その脂肪分化能を検討したところ、筋衛星細胞とは異なる、血小板由来増殖因子受容体 α (PDGFR α) 陽性の間葉系前駆細胞に強い脂肪細胞への分化能があることが分かった [37]。生体内への移植実験の結果では、この間葉系前駆細胞のみが脂肪細胞への分化能を持つことが示された [37] (図1及び表紙参照)。なお、移植細胞の脂肪分化は、脂肪変性条件下でのみ見られ、筋再生条件下では見られなかった。細胞の微小環境の重要性が示唆される。さらに、筋衛星細胞由来の筋線維と共培養したところ、PDGFR α 陽性細胞の脂肪分化は抑制された。PDGFR α 陽性細胞は、骨格筋の間質、特に、血管の近傍に存在していた。これらの結果から、骨格筋に存在するPDGFR α 陽性細胞が異所性脂肪沈着に関わる主要細胞であり、筋衛星細胞と共に骨格筋の恒常性に関与するものと結論された [37]。筋ジストロフィー等の筋疾患やメタボリック症候群で骨格筋内に沈

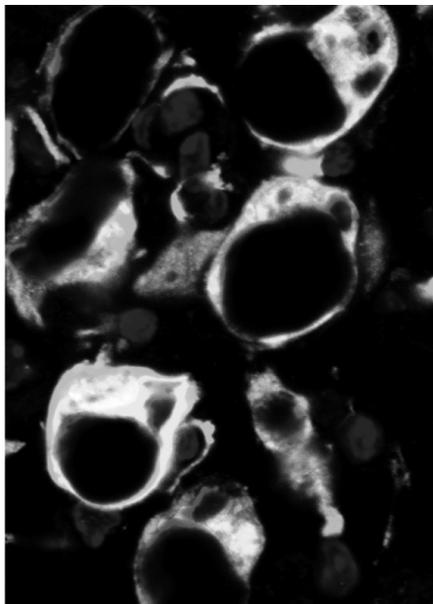


図1. (カラー図は表紙に掲載)

脂肪変性条件下での骨格筋内移植による間葉系前駆細胞の脂肪細胞への分化

GFPを全身に発現しているマウスの骨格筋からPDGFR α 陽性の間葉系前駆細胞 (緑) を単離し、脂肪変性条件下で野生型マウスの前頸骨筋に移植を行なった。PDGFR α 陽性細胞が、PPAR γ (赤) やペリリピン (紫) で染色される脂肪細胞の分化に寄与することが観察される。なお、核はDAPI (青) で染色されている。この結果から、骨格筋内脂肪沈着を起こすのはPDGFR α 陽性の間葉系前駆細胞であること、そして、脂肪変性には骨格筋組織内で細胞がおかれる微小環境が重要であることが示された。

着する新たな細胞を発見した成果であり、治療標的にもなりうる細胞であり非常に興味深い細胞である。一方、我々とは別に、筋損傷時に活性化され、筋形成を促す新たな細胞集団が骨格筋内に発見された [38]。FAP (fibro/adipogenic progenitor) 細胞と名付けられた細胞で、筋肉内や皮下から細胞を移植すると脂肪分化が見られた。PDGFR α 陽性細胞と同様に、筋肉内投与では脂肪変性条件下で、脂肪細胞に分化した。FAP細胞自身は、筋線維を産生しないが、筋前駆細胞の分化率を高める作用を有していた。細胞表面マーカーや細胞の性質から見て、我々の解析したPDGFR α 陽性細胞と極めて類似した細胞であると考えられる [38]。筋衛星細胞による筋形成とPDGFR α 陽性細胞による脂肪細胞産生のバランスが骨格筋の恒常性に重要だと考察される。

ヒトの骨格筋には、上記の細胞以外にも、骨髄同様に多くの治療用あるいは疾患の治療標的となる細胞集団が存在している。CD56陽性細胞は、増殖能が高く、その一部がCD56陽性細胞に由来するCD15陽性細胞と共に、間葉系細胞系譜のマーカーを発現する。この点で、骨髄由来間葉系前駆細胞と類似している。分化培養系では、CD56陽性細胞、CD15陽性細胞共に、骨分化と軟骨細胞分化能力を有しているが、前者は筋分化能を有し、一方後者のCD15陽性細胞は脂肪細胞分化能を有する点で違いが見られる [39]。

一方、異所性脂肪の解析の進展と共に、脂肪組織の脂肪細胞を生み出す細胞の解析も近年、急速な展開を見せている。脂肪組織は白色脂肪組織と褐色脂肪組織に分類されるが、両者は組織学的にも機能的にも異なっており、発生過程にも違いがある。白色脂肪は、全身に存在し、余剰エネルギーを中性脂肪として貯蓄している。最近、白色脂肪組織内の壁細胞が白色脂肪の供給源となることが示された。脂肪組織に存在するLin(-)CD29(+)CD34(+)Scarl(+)+細胞や血管近傍のPPAR γ 陽性細胞が脂肪細胞の前駆細胞として働く [40, 41]。

褐色脂肪細胞は、肩甲骨周囲、腋下などに存在し、ミトコンドリアに存在するUCP1 (uncoupling protein 1, 脱共役タンパク質1) を介して熱産生に働く。エネルギー消費の役割を担う脂肪細胞である。褐色脂肪細胞は、白色脂肪細胞よりも骨格筋細胞系譜に類似した遺伝子発現を示す。Myf 5は、筋形成に関わる筋芽細胞のマーカーであるが、Myf 5陽性細胞から筋芽細胞と褐色脂肪細胞が分化するという報告がなされた [42]。その際に重要な働きをするのが、PRDM16と呼ばれるZinc finger型の転写因子である。筋芽細胞にPRDM16を発現させると褐色脂肪細胞に分化する。逆に、PRDM16活性が弱いとMyf 5陽性細胞の褐色脂肪細胞への分化能が低下し、筋分化が活性化する。PRDM16は、PPAR γ と結合しその転写活性を上昇させる働きがある [42]。身体中に存在する褐色脂肪以外に、人為的に褐色脂肪細胞を産生させることが可能である。例えば、ノルアドレナリンの β 3アゴニストを投与すると、白色脂肪内に褐色脂肪が出現する。寒冷刺激も褐色脂肪産生に働く。興味深い事に、これらの褐色細胞は、Myf 5陽性細胞由来ではない。

従って、褐色脂肪の起源は単一ではなく、Myf 5陽性細胞以外に、白色脂肪細胞と褐色脂肪細胞を生み出す共通の脂肪前駆細胞が存在する可能性があると考えられている [43]。

2) マイオスタチンが仲介する骨格筋と脂肪細胞の相互作用 (図2)

骨格筋と脂肪細胞は生体内で相互に連携し生理的作用を発揮している。マイオスタチンのノックアウトマウスやマイオスタチン阻害によって、筋量が増加すると共に、全身の体脂肪量が減少する事が知られている [44]。実際、我々が開発したホリスタチンに由来するマイオスタチン阻害因子を発現させたマウスの脂肪組織は、対照と比較して内臓脂肪量、皮下脂肪量共に著しく低下し脂肪細胞が肥大化しない。高脂肪食を負荷しても脂肪量の上昇は抑制され、特に脂肪肝は全く見られない。マイオスタチン阻害によって筋量が増加し、二次的に脂肪組織や肝臓に影響が現れると考えられている。脂肪肝形成阻害の分子機構として、ステアрилCoA不飽和化酵素の低下、オレイン酸等の不飽和脂肪酸の減少が観察された。マイオスタチン阻害療法は、筋量を適切に維持する事で、体脂肪の蓄積を防ぎ、脂肪肝の形成も阻止出来る可能性が示されたと言える。

5. おわりに

我が国は、超高齢化社会を迎えており、筋骨格系の機能を維持しながら、健康に老いる事が重要になっている。本総説では、骨格筋の萎縮機構、マイオスタチン制御による筋量増加作用と近年急速な展開が見られる脂肪細胞を生み出す新たな細胞群について紹介した。こういった研究によって、老化、神経筋難病、悪液質の病態が明らかとなり、治療法開発に繋がる事を期待したい。また、骨格筋や脂肪細胞の基になる幹細胞の解析は、筋疾患、肥満/糖尿病における脂肪細胞の動態に対する理解を深め、新たな再生医療の開発にもつながることが期待される。

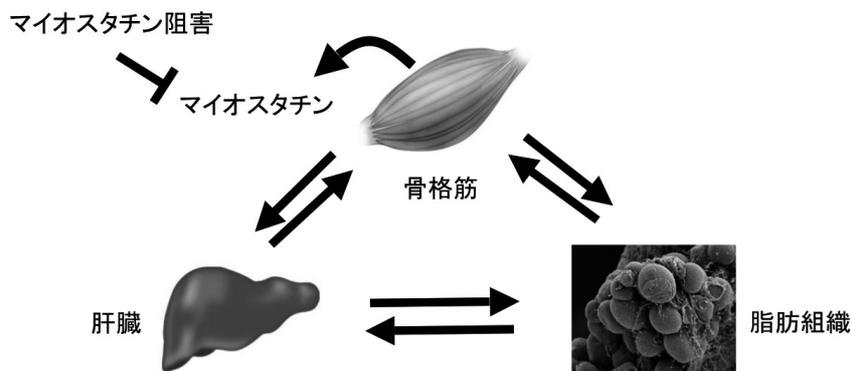


図2. マイオスタチン阻害による組織間のクロストーク。

マイオスタチンは、骨格筋から産生されて、血液中を循環する細胞増殖因子である。マイオスタチンは、骨格筋形成を強力に抑制する。マイオスタチンの活性を阻害すると骨格筋量の増加が見られる。それと共に、脂肪細胞が肥大化せず、脂肪量が減少する。高脂肪食を負荷しても、脂肪肝の形成が見られないことも分かっている。骨格筋組織は生体内で隣接する骨格筋内の細胞のみならず、脂肪組織や内臓臓器との間で、サイトカインの産生と受容を介して相互連携しており、生体の恒常性維持に重要な役割を果たしている。マイオスタチンの活性制御によって、骨格筋-脂肪組織-肝臓の組織間相互作用を介して、体内の脂肪動態が影響を受ける。

文献

1. Pownall ME, Gustafsson MK and Emerson CP Jr. Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18:747-783, 2002.
2. Relaix F, Rocancourt D, Mansouri A et al., A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature* 435:948-953, 2005.
3. Lepper C, Conway SJ and Fan CM. Adult satellite cells and embryonic muscle progenitors have distinct genetic requirements. *Nature* 460:627-631, 2009.
4. Bullough WS. Chalone control mechanisms. *Life Sci* 16:323-330, 1975.
5. McPherron AC, Lawler AM and Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 387:83-90, 1997.
6. McPherron AC and Lee SJ. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:12457-12461, 1997.
7. Mosher DS, Quignon P, Bustamante CD et al., A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. *PLoS Genet* 3:e79, 2007.
8. Clop A, Marcq F, Takeda H et al., A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat Genet* 38:813-818, 2006.
9. Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE et al., Myostatin mutation associated with gross muscle

- hypertrophy in a child. *N Engl J Med* 350:2682-2688, 2004.
10. McCroskery S, Thomas M, Maxwell L et al., Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *J Cell Biol* 162:1135-1147, 2003.
 11. Amthor H, Otto A, Vulin A et al., Muscle hypertrophy driven by myostatin blockade does not require stem/precursor-cell activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:7479-7484, 2009.
 12. Gilson H, Schakman O, Kalista S et al., Follistatin induces muscle hypertrophy through satellite cell proliferation and inhibition of both myostatin and activin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297:E157-164, 2009.
 13. Ageta H, Ikegami S, Miura M et al., Activin plays a key role in the maintenance of long-term memory and late-LTP. *Learn Mem* 17:176-185, 2010.
 14. Tsuchida K, Nakatani M, Hitachi K et al., Activin signaling as an emerging target for therapeutic interventions. *Cell Commun Signal* 7:15, 2009.
 15. Nakatani M, Takehara Y, Sugino H et al., Transgenic expression of a myostatin inhibitor derived from follistatin increases skeletal muscle mass and ameliorates dystrophic pathology in mdx mice. *Faseb J* 22:477-487, 2007.
 16. Rodino-Klapac LR, Haidet AM, Kota J et al., Inhibition of myostatin with emphasis on follistatin as a therapy for muscle disease. *Muscle Nerve* 39:283-296, 2009.
 17. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S et al., Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 294:1704-1708, 2001.
 18. Sandri M, Sandri C, Gilbert A et al., Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 117:399-412, 2004.
 19. McFarlane C, Plummer E, Thomas M et al., Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism. *J Cell Physiol* 209:501-514, 2006.
 20. Brack AS, Conboy MJ, Roy S et al., Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science* 317:807-810, 2007.
 21. Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ et al., Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* 433:760-764, 2005.
 22. Bogdanovich S, Krag TO, Barton ER et al., Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature* 420:418-421, 2002.
 23. Wagner KR, McPherron AC, Winik N et al., Loss of myostatin attenuates severity of muscular dystrophy in mdx mice. *Ann Neurol* 52:832-836, 2002.
 24. Bogdanovich S, Perkins KJ, Krag TO et al., Myostatin propeptide-mediated amelioration of dystrophic pathophysiology. *Faseb J* 19:543-549, 2005.
 25. Ohsawa Y, Hagiwara H, Nakatani M et al., Muscular atrophy of caveolin-3-deficient mice is rescued by myostatin inhibition. *J Clin Invest* 116:2924-2934, 2006.
 26. Bartoli M, Poupiot J, Vulin A et al., AAV-mediated delivery of a mutated myostatin propeptide ameliorates calpain 3 but not alpha-sarcoglycan deficiency. *Gene Ther* 14(9):733-740, 2007.
 27. Parsons SA, Millay DP, Sargent MA et al., Age-dependent effect of myostatin blockade on disease severity in a murine model of limb-girdle muscular dystrophy. *Am J Pathol* 168:1975-1985, 2006.
 28. Li ZF, Shelton GD and Engvall E. Elimination of myostatin does not combat muscular dystrophy in dy mice but increases postnatal lethality. *Am J Pathol* 166:491-497, 2005.
 29. Dumonceaux J, Marie S, Beley C et al., Combination of myostatin pathway interference and dystrophin rescue enhances tetanic and specific force in dystrophic mdx mice. *Mol Ther* 18:881-887, 2010.
 30. Tsuchida K, Sunada Y, Noji S et al., Inhibitors of the TGF-beta superfamily and their clinical applications. *Mini Rev Med Chem* 6:1255-1261, 2006.
 31. Siriett V, Platt L, Salerno MS et al., Prolonged absence of myostatin reduces sarcopenia. *J Cell Physiol* 209:866-873, 2006.
 32. Zhou X, Wang JL, Lu J et al., Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival. *Cell* 142:531-543, 2010.
 33. Haidet AM, Rizo L, Handy C et al., Long-term enhancement of skeletal muscle mass and strength by single gene administration of myostatin inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:4318-4322, 2008.
 34. Kota J, Handy CR, Haidet AM et al., Follista-

- tin gene delivery enhances muscle growth and strength in nonhuman primates. *Sci Transl Med* 1:6ra15, 2009.
35. Acharyya S, Butchbach ME, Sahenk Z et al., Dystrophin glycoprotein complex dysfunction: a regulatory link between muscular dystrophy and cancer cachexia. *Cancer Cell* 8:421-432, 2005.
 36. He J, Goodpaster BH and Kelley DE. Effects of weight loss and physical activity on muscle lipid content and droplet size. *Obes Res* 12:761-769, 2004.
 37. Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N et al., Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 12:143-152, 2010.
 38. Joe AW, Yi L, Natarajan A et al., Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat Cell Biol* 12:153-163, 2010.
 39. Lecourt S, Marolleau JP, Fromiguet O et al., Characterization of distinct mesenchymal-like cell populations from human skeletal muscle in situ and in vitro. *Exp Cell Res* 316:2513-2526, 2010.
 40. Tang W, Zeve D, Suh JM et al., White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science* 322:583-586, 2008.
 41. Rodeheffer MS, Birsoy K and Friedman JM. Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo. *Cell* 135:240-249, 2008.
 42. Seale P, Bjork B, Yang W et al., PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 454:961-967, 2008.
 43. Enerbäck S. The origins of brown adipose tissue. *N Engl J Med* 360: 2021-2023, 2009.
 44. Guo T, Jou W, Chanturiya T et al., Myostatin inhibition in muscle, but not adipose tissue, decreases fat mass and improves insulin sensitivity. *PLoS One* 4:e4937, 2009.

Mechanism and therapeutic application against skeletal muscle atrophy in aging and diseases.

Akiyoshi Uezumi, Masashi Nakatani, Keisuke Hitachi, Kunihiro Tsuchida

Division for Therapies against Intractable Diseases,
Institute for Comprehensive Medical Science, Fujita Health University

Musculoskeletal tissues undergo dramatic morphological and functional changes by aging, obesity, and muscular dystrophies. Atrophy of type II myofibers and ectopic fat formation are observed in aged muscles. Properties of satellite cells change by aging as well. Protein degradation also plays an important role in muscle atrophy.

Recently, blocking myostatin, which is a skeletal muscle-specific TGF- β superfamily, was found to be effective to prevent various types of muscle atrophy including sarcopenia. Controlling of the activities of myostatin and/or activin is promising for treatment not only of muscle atrophy but also of obesity, fatty liver and even cachexia. Ectopic fat formation in skeletal muscle and other tissues is observed in muscular diseases, metabolic syndrome and aging. Origins of several types of adipogenic progenitors including intramuscular adipocytes, are clarified by sophisticated cell isolation technology. In this review, we will summarize the pathophysiology of muscle atrophy by aging and muscular diseases, and discuss about the origins and functions of adipogenic progenitors.

Key words: sarcopenia, muscle atrophy, myostatin, muscular disease, ectopic fat formation

【総 説】

アセチルコリンのルーツと非神経性アセチルコリン

川島紘一郎
武蔵野大学薬学研究所

要約

Acetylcholine (ACh) は「神経活動の化学伝達」メカニズムの発見に係わった物質であることから、神経伝達物質として広く知られている。しかしながら、AChは、ほぼすべての生物に、また哺乳動物の様々な非神経性細胞と組織にも存在し、局所的な細胞間の情報伝達に関与し、様々な生理的役割を果たしている可能性が明らかになってきた。すなわち、神経伝達物質としてのAChは、多様な役割のうちの一側面に過ぎない。ここでは、まずAChが神経伝達物質として認定されるまでの歴史的展開を総説した。次に、哺乳動物の非神経性細胞と組織におけるAChの存在とその役割に関する研究を紹介した。さらに真正細菌、始原菌（古細菌）および真核生物などの各種生物におけるAChの存在、ACh産生能および役割に関する知見を展望した。これらの知見から、AChはほぼすべての生物に存在しており、細胞間情報伝達物質として広範な役割を担っている可能性が考えられる。

キーワード：acetylcholine, mAChR, nAChR, ChAT, SLURP

1. はじめに

これまでの研究活動を振り返ると、研究が走り出してから考えることが多かった。欧米の優れた研究助成申請書を拝見すると、研究背景を総説し、研究テーマが創造的であるか、あるいは権威が提唱した説の確認かを検討して、綿密な研究計画が立案されている。研究完了時には、申請書の一部をそのままIntroductionとして使えるほど整っている。研究背景の批判的総説は、研究の質的向上と無駄の削減に役立つであろう。ここでは、「神経活動の化学伝達」の発見に係わったacetylcholine (ACh) を巡る研究の歴史と、AChの様々な生物や非神経性の細胞や組織における存在と役割に関する研究を紹介する。効率的学習を主眼にしたコア・カリキュラムに制約された生理学の講義の中では、神経伝達物質の発見に至る歴史を学ぶ余裕はないであろう。しかしながら、歴史の中には、重要な研究のヒントや参考になる思考法がちりばめられていることがある。

2. 神経活動の化学伝達とacetylcholineに関する研究の歴史

AChは神経伝達物質として一般的に広く知られている。Alzheimer病患者において、著明な脳の委縮と、大

脳基底核から皮質へ、また中隔から海馬へ投射するAChを伝達物質とする神経の変性や脱落が観察されている [1]。さらに、acetylcholinesterase (AChE) 阻害薬がAlzheimer病の症状を一時的に緩和することが明らかになった [2]。そのため、AChの記憶、学習、あるいは情動などへの関与が想定され、神経伝達物質としてのAChの研究が大いに発展した。私たちのもつAChの合成、分解および作用に関する知識は、確かに大部分が神経系における知見から得られたものである。しかしながら、AChが神経伝達物質として認定されるに至る歴史（表1） [3-18]を振り返ると、AChが果たしているさらに多様な生理的役割が見えてくる。研究の現状をより良く理解し、研究計画の立案や実験結果の説明に役立つ知見を掘り起こしてみるのも良いかもしれない。

1) Cholineの発見と血圧作用

1865年にLiebreich [3] は、脳から脂肪を含まない抽出物を調製してprotagonと命名した。さらに、protagonをアルカリ分解して、glycerol phosphoric acidと塩基性物質neurineを単離した。後にneurineは、protagonから生成したcholine ((CH₃)₃N⁺CH₂CH₂-OH・OH⁻) の脱水産物 ((CH₃)₃N⁺CH=CH₂・OH⁻) であることが判明した [3]。Cholineは1864年にStreckerにより胆汁中から発見され、1866年に合成された。

Baeyer (1867) [4] は、protagonからneurineが生成する過程で別の水酸基をもつ化合物もできるはずだと考えて、脳からcholineを単離することに成功した。単離した化合物がcholineであることを証明するために、acetylchlorideでアセチル化してAChができることを示した。

連絡先：〒202-8585

東京都西東京市新町1-1-20

TEL: 042-468-8669

FAX: 042-468-8669

e-mail: koichiro-jk@piano.ocn.ne.jp;

k_kawas@musashino-u.ac.jp

表1. 神経刺激の化学伝達の証明とアセチルコリンの発見に至る研究の歴史

年	人名	事項	文献
1865	Liebreich	脳の脂肪を含まない抽出物 (protagon) をアルカリ処理して neurine を単離	3*
1867	Baeyer	Acetylcholine (ACh) を合成	4*
1867	Bezold & Bloebaum	Atropine による迷走神経刺激の心拍に及ぼす作用の抑制を報告	4*
1869	Schmiedeberg & Koppe	<i>Amanita muscaria</i> より muscarine を単離	4*
1899	Mott & Halliburton	脳変性疾患患者の脳脊髄液中に choline を発見	5
1904	Elliott	交感神経終末からの adrenaline 類縁化合物の放出 (神経刺激の化学伝達) を想定	6
1906	Hunt & Taveau	数種の choline-ester 類の血圧作用を検討し, ACh の choline よりも強力な作用を発見	7
1906 ~ 1907	Dixon	副交感神経の伝達物質を muscarine と想定して, 迷走神経付き心臓標本を用いた実験するも失敗	8, 9*
1908	Howell & Duke	迷走神経刺激によるカリウム放出を報告	10
1914	Dale	ACh の作用を nicotine と muscarine 様作用に分類	11
1914	Erwins	麦角における ACh の存在を発見	12
1921	Loewi	迷走神経刺激の化学伝達を決定づける報告	13
1926	Loewi & Navratil	迷走神経刺激の化学伝達に関与する Vagusstoff は ACh と報告	14
1929	Dale & Dudley:	動物体内 (脾臓) における ACh の存在を初めて確認	15
1933	Chang & Gaddum	ヒト胎盤を始めとする種々の臓器における ACh の存在を報告	16
1935	Dale	副交感神経終末からの ACh 遊離を認定し, cholinergic と adrenergic の用語を提案	9
1936	Dale, Feldberg & Vogt	イヌの随意筋の神経終末からの ACh 遊離を発見	17
1936	Dale & Loewi	神経刺激の化学伝達の発見により Nobel 賞受賞	
1938	Loewi & Hellauer	ウシの脊髄前根における ACh の存在を発見	18*
1941	MacIntosh	ネコの大脳皮質と一部の神経核における ACh の存在を発見	18

*番号の文献より引用.

しかしながら、AChの生理作用は調べなかった。以来、AChは試薬リストに掲載されていたが、化学的興味しかもたれていなかった。

1869年にSchmiedeberg & Koppe [4] は、ベニテングタケ (*Amanita muscaria*) から muscarine を抽出した。Muscarineの心臓作用は、迷走神経刺激時に類似し、atropineにより拮抗されることを発見した。これらの結果を muscarineは迷走神経を刺激し、atropineは心臓の迷走神経終末を遮断したと解釈した。

1899年にMott & Hulliburton [5] は、脳に委縮性病変のある患者から採取した脳脊髄液 (CSF) をイヌ、ネ

コおよびウサギに静脈内投与すると、血圧下降を引き起こすことを発見した。患者CSFに含まれる血圧下降物質は、化学的にcholineとして同定され、脳組織が分解してできたと考えられた。これらのCSFにはneurineは含まれていなかった。cholineによる血圧下降は、一部は心臓に対する作用であるが、大部分は末梢血管の拡張を介するものであると報告した。morphineとatropine前処置後にcholineを投与すると、血圧は上昇した。これらの知見は、後にDaleがcholine ester類の血圧作用を検討した時の参考になったであろう。さらに、cholineが muscarineおよびnicotine作用の両方をもつことを示す

最初の観察結果であった。また、これらの知見から、cholineが最近nAChRの内因性リガンドとして使用されている理由が分かるであろう。

2) 神経活動の化学伝達説

1904年にElliott [6] は、交感神経を刺激した時とadrenalineを投与した時の作用の類似性に着目して、神経刺激によりadrenaline類縁化合物が交感神経終末から放出されて作用を発現すると考えた。すなわち、Elliottは「神経活動の化学伝達」説の最初の提唱者である。この論文から、Dixon [8,9]は、同様なメカニズムが副交感神経系でも働いており、muscarine類似物質が副交感神経活動の伝達に関与していると考えた。瀉血したイヌの迷走神経を長時間刺激した後に心臓を摘出し、水で煮沸後、アルコール抽出物を調製した。この抽出物を拍動しているカエルの心臓に適用して、心収縮力の抑制作用と、atropineによる拮抗を観察した。活性物質をvagus substanceと命名したが、Dixonが観察した作用は遊離型cholineに由来すると考えられる。しかしながら、これらの知見は、後に多くの研究者たちに手掛かりを与えずである。

3) cholineおよび類縁化合物の薬理作用

choline、muscarineおよびneurineの化学的類似性、およびMott & Halliburtonの研究 [5] に触発され、cholineの薬理作用に関する研究が盛んに行なわれた。

1906年にHunt & Taveau [7] は、副腎抽出物がadrenaline以外に、血圧下降物質としてcholineを含んでいることを発見した。しかし、抽出物がcholineとは別の血圧下降物質も含んでいることに着目した。副腎と脳の抽出物のいずれもが、cholineよりも強力な血圧下降を起こすことを発見した。残念ながら、活性物質の化学的単離は成功しなかった。そこで、これらの作用はcholineの前駆体か、もしくはある種のcholine系化合物に由来すると考えて、彼らは一連のcholine系化合物を合成して薬理作用を検討した。AChの血圧作用は最も強力で、cholineの10万倍も高い活性を示したと記載している。AChの血圧下降作用がatropineで遮断されたことから、心臓の迷走神経終末に対する作用であると考えた。

1908年にHowell & Duke [10] は、ウサギ、イヌ、ネコなど哺乳動物の心臓を単離してLocke液で灌流した。心臓への迷走神経を30秒から1分間刺激して、灌流液中へのカリウム放出を観察した。そこで、迷走神経の心臓に対する抑制作用は、心臓から遊離されたカリウム化合物の影響によるものと考えた。

1914年にDale [11] は、小麦やライ麦に*Claviceps purpurea*菌が寄生して生成する菌核である麦角(ergot)の抽出物が既知の活性物質とは明確に異なる血圧下降作用を示すことに注目した。麦角中の活性物質の作用はmuscarine型であり、真のnatural muscarineはcholine-esterであろうと考えた。Hunt & Taveau [7] の知見を参考に数種のcholine-esterおよびcholine-etherを合成して、

主としてネコの血圧に及ぼす作用や、摘出カエル心標本における作用を比較検討した。その結果、choline-esterとcholine-etherは、nicotine-curare作用を示すこと、および麦角抽出物の加水分解に対する不安定性から、麦角中の血圧下降物質はmuscarineではないと判定した。これらの一連の研究から、Dale [11]は、choline-esterおよびcholine-ether類のもつ作用を、(1) atropineで遮断されるmuscarine作用、および(2) 過剰のnicotineで遮断されるnicotine作用の二つに明確に分けられることを報告した。さらにDaleは、AChを始めとするcholine-esterが自律神経節前神経シナプスと大部分の副交感神経線維から放出される伝達物質であろうと考えた。またAChは、血中では迅速に加水分解され、かなり不安定であるが、Ringer液を用いたカエル摘出心の灌流実験では強力な心抑制を起こすことを観察した。しかしながら、その時点においてAChに類似のcholine類縁化合物が動物体内に存在する証拠がないことから、AChが神経伝達物質であると結論づけることはできなかった。

3) 生物によるAChの産生

Daleから麦角中に含まれる血圧下降物質の単離を依頼されたEwins [12]は、抽出活性物質の化学的不安定性やHunt & Taveau [7]の知見を踏まえて、化学合成したAChとウサギ腸管を用いて生理作用を比較検討した。その結果、抽出活性物質の生理作用が、質的および量的にもAChと同一であることを発見した。そこで麦角から大量に活性物質を抽出し、血圧下降物質がAChであることを化学的にも同定した。これらの結果より、生物(菌類)によるACh産生が初めて確認された。

4) 神経活動の化学伝達説の証明

Loewi (1921) [13] は、ある薬が特定の神経を刺激した時とほぼ同じ作用を引き起こす事実を踏まえて、神経活動によりある物質が産生されて効果器に作用を及ぼす可能性を考えた。丸ごとの動物を用いた実験条件下では、この問題の解明は不可能と考えて、摘出カエル心標本を用いた単純明快な実験系を考案した(図1)。迷走神経を刺激しながらRinger液で心標本内を灌流した。採取したRinger液を別の拍動している心標本に灌流して、心収

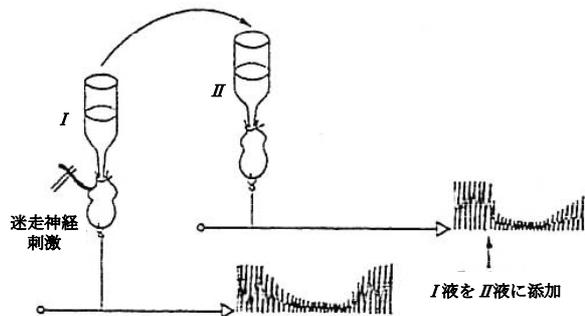


図1. Loewiの摘出カエル心標本を用いた実験[13]の模式図 (Lembeck F. The chemical language of the nervous system. The first Symposium on Non-neuronal Acetylcholine, San Francisco, USA, July 6, 2002の特別講演配布資料から)。

縮力の減弱を観察した。心収縮力の減弱は、atropine添加により消失した。これらの結果から、Loewiは神経活動の化学伝達を明確に決定づけることができた。Atropineによる作用の消失は、カリウム化合物が化学伝達物質である可能性を否定した。Loewiの論文 [13]には一つの引用文献もないが、Elliottが提唱した「神経刺激の化学伝達」説 [6]やDixonによる実験的証明の努力[8,9]、およびDale (1914) [9]のカエル摘出心を用いたAChの強力な心収縮力抑制作用の報告 [9]などを参考にした可能性が考えられる。また、実験計画は単純なほど結果の解釈が容易で、明快な結論が得られることが分かるであろう。

さらに1926年にLoewi & Navratil [14] は、迷走神経から遊離されるVagusstoffが心臓でesteraseにより分解され、そのesterase活性はeserine (physostigmine)により阻害されることを示した。これらの結果から、Loewiは、VagusstoffはAChそのものであると主張した。Dale [11]はすでに、副交感神経系の伝達物質がAChであれば、esteraseにより速やかに分解されるはずであると言っていたが、いまだAChが動物体内から発見されていなかったため、AChが副交感神経終末から遊離される神経伝達物質であるとの認定を躊躇していた。

5) AChの動物体内における存在と神経伝達物質としての認定

1929年にDale & Duddley [15] は、ウマの脾臓からhistamineとは異なる血圧下降物質の単離に成功し、その活性物質がAChであることを化学的に同定した。これにより、動物組織中におけるAChの存在が初めて証明された。幸運にも、ウマ脾臓のACh含量は、他の動物と比較して、非常に高濃度であった。脾臓は免疫器官の一部でもあることから、多数のリンパ球を含んでいる。Fujiiら [19]は、ウシやウマの血中ACh含量は、他動物比較して5-20倍も高く、その95%以上が血球成分中に分布することを報告した。ヒトでは、血中AChの約60%がリンパ球を含む単核白血球分画に分布することから [20]、脾臓のAChの起源はリンパ球であったと考えられる。

さらに、1933年にChang & Gaddum [16]は、ヒト胎盤や、ウマ、イヌおよびウシの血中に50-80 ng/g のAChが存在することを報告した。ここでは、AChの定量にeserine処置したカエル腹直筋またはヒル縦走筋を使用した。後にFujiiら [19]がRIAで測定した含量とほぼ同じであった。これにより、動物体内におけるAChの存在が確認された。

1934年末のFirst Dixon Memorial Lectureにおいて、Dale [9] は「副交感神経の作用はAChによって、また交感神経の作用はadrenaline類縁物質によって伝達されることが広く認められている」と講演した。さらに「自律神経節と運動神経 - 筋接合部のシナプスにおいても同様な神経活動の化学伝達が行なわれている証拠が最近集まった」と講演した。さらに、AChを遊離して作用を伝達する神経に対して"cholinergic"、そしてadrenaline類縁物質を遊離する神経に対して"adrenergic"という用語

を使うこと提案した。そして、自律神経節前線維の化学伝達物質もAChであることを認めざるを得ないと述べた。これらの経緯により、AChは神経伝達物質として認定された最初の化合物となった。

1936年に「神経刺激の化学伝達に関連する発見」に対して、Dale と Loewiにノーベル生理学賞が授与された。

1938年にLoewiとHellauerは、ウシの脊髄前根にAChが高濃度に存在することを発見した [18]。しかしながら、脊髄後根にはAChはほとんど存在しなかった。これらの知見は、AChを伝達物質とする自律神経節前線維の細胞体が脊髄前根に存在することと合致する。1941年に、MacIntoshは、eserineを前投与して分解を阻害しておいたネコの脳におけるAChの存在を確認した。大脳基底核、中脳、前頭葉皮質および橋などにおいて、高いACh含量が観察された [18]。また、イヌの脊髄前根では、灰白質に高濃度のAChが存在することを発見した。このように、中枢神経系におけるAChの存在の発見は遅れたが、その後の研究の発展は周知のとおりである。

以上見てきたように、非神経性AChの存在や、神経系をもたない生物によるAChの産生がすでにこの時点で発見されていた。

3. 哺乳動物における非神経性コリン作動系の発現

脾臓 [15] や胎盤 [16] などにおけるAChの発見に続き、多くの細胞や組織における非神経性AChとコリン作動系の存在が明らかになってきた。すでに2回の"International Symposia on Non-neuronal Acetylcholine"が開催され ([21,22] を参照)、2011年には第3回がオランダ (Groningen) で開催される。さらに Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (11th ed, 2006) に"Extraneuronal Cholinergic Systems" (Page 153)として取り上げられ、非神経性AChとコリン作動系の存在が認知されるに至った。表2に非神経性コリン作動系が発現する細胞と組織を示す。

1) 非神経性コリン作動系の構成要素

非神経性コリン作動系においても、神経系と同様な構成要素が発現している。

(1) ACh合成酵素

神経細胞では、choline acetyltransferase (ChAT) がcholineとacetyl coenzyme-A (ACoA)に働いてAChを産生する。ミトコンドリア酵素carnitine acetyltransferase (CarAT) もcholineとACoAからAChを産生することができる。いわゆるFonummm法 [23] によりACoAと[³H]cholineを用いて、細胞や組織ホモジネートのACh合成酵素活性を測定すると、ChATとCarATの両方の活性が反映される。脳試料のACh合成酵素活性は、90%以上がChATに由来する [24]。他方、末梢組織試料では、観察されたACh合成酵素活性に占めるChAT活性の割合は、試料ごとに異なる。それぞれの酵素に対する特異的阻害薬bromoACh (BrACh) およびbromoacetylcarnitine

表2. 非神経性コリン作動系発現細胞と組織

細胞と組織	機能	参考文献
免疫系細胞	免疫機能調節	29,40, 42,43
血管内皮細胞	血管新生, 血管拡張	21,27,46,47
胎盤	水, 電解質, および栄養物質の輸送	48-50
ケラチノサイト	増殖, 分化, 遊走, アポトーシス	22,51,52
気道上皮細胞	分化, 恒常維持, 線毛運動	53,54
消化管内皮細胞	線毛運動の促進	28,56
心筋細胞	心保護	57
膀胱	排尿筋の緊張の維持	59-60

(BrACar) を用いて、個々の酵素活性を分けて測定することをお勧めしたい。

多くの非神経性コリン作動系では、上記のようにACh合成酵素としてChATおよびCarATが発現している。我々はリンパ球において、しばしばACh合成酵素活性とACh含量との間に大きな乖離を認めた [25,26]。T細胞を活性化させると、ChAT 活性が上昇してACh含量と遊離量が増大するが、CarAT活性は変化しなかった [25,26]。これらの結果から、リンパ球コリン作動系の活性調節にはChATが重要な役割を果たしていることが判明した。他の非神経性コリン作動系では、ACh合成酵素活性をChATとCarATに分別した検討はほとんど行われていない。実際にはコリン作動系機構が発現していない細胞や組織においても、恐らくCarATが関与した見かけ上のACh産生能が観察される場合があり、注意する必要がある。

(2) ACh受容体 (AChR)

神経系と同様に非神経性コリン作動系においても、muscarinicおよびnicotinic AChR (それぞれ、mAChRおよびnAChR) が発現している。非神経性コリン作動系では、ほぼすべてのmAChRサブタイプ (M₁-M₅) が発現している [22,27,28]。他方、nAChRサブユニットの発現は、各非神経性コリン作動系で異なる。多くの非神経性コリン作動系で、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 7$ 、 $\alpha 9$ および $\alpha 10$ サブユニットの発現が認められている。

(3) Acetylcholinesterase (AChE)

神経終末から遊離されたAChは、神経シナプスにおいてAChEにより2~3ミリ秒以内に分解されて失活する。AChEは、神経細胞内およびその周辺細胞にも発現している。AChEは、ほぼすべての非神経性コリン作動系細胞および組織にも発現し、AChの不活性化に関与していると考えられている。T細胞の活性化は、上記のようにChAT発現を上昇させてACh産生を増大させるが、AChE発現も増強する [29]。

(4) Vesicular ACh transporter (VAcHT)

神経細胞ではAChは細胞質内で生合成され、VAcHTによりシナプス小胞内へ輸送されて貯蔵される。神経終末へ刺激が到達して、電位依存性Ca²⁺チャネルが開口して細胞内遊離Ca²⁺濃度が上昇すると、シナプス小胞

が細胞膜に融合して、AChは開口分泌により放出される。非神経性AChの貯蔵と遊離のメカニズムは不明である [22,28]。非神経性コリン作動系細胞および組織におけるVAcHTの発現に関しては、様々な報告がある。Organic cation transporter (OCT) がAChの遊離と取込みに関与しているとの説もある [28]。

(5) High affinity choline transporter (CHT1)

神経細胞では、CHT1が取り込んだcholineが専らACh合成に使われると考えられている。CHT1は、非神経性コリン作動系の様々な細胞にも発現している。非神経性細胞では、OCTにより取り込まれたcholineや細胞膜の分解により生成したcholineもACh合成に使われる可能性が示唆されている [22,28,30]。

(6) 新規内因性nAChRアロステリック・リガンド

Secreted Ly-6/uPAR-related peptide-1 (SLURP-1) およびSLURP-2は、分子量およそ10 kDaの内因性ポリペプチドである [31-33]。分子内に10個のシステイン残基を含み、 α -bungarotoxinに類似の立体構造をとっていると想定されている。SLURP-1およびSLURP-2は、それぞれ、 $\alpha 7$ および $\alpha 3$ nAChRのアロステリック・リガンドとして働き、それぞれの受容体においてAChの作用を増強する働きをされると考えられている。しかしながら、SLURP-1およびSLURP-2自体が、固有の作用をもつ可能性も考えられる。遺伝子発現や免疫組織化学的検討により、いずれもケラチノサイト、気道線毛上皮細胞を始めとする様々な非神経性コリン作動系細胞や組織、および一部の神経系における発現が報告されている [34-38]。SLURP-1およびSLURP-2の非神経性コリン作動系における役割の解明は、まだ始まったばかりである。

2) 非神経性コリン作動系発現細胞と組織

表2に示す非神経性コリン作動系発現細胞と組織のリストは、今後さらに拡大すると考えられる。ここでは代表的な非神経性コリン作動系について、若干の説明を加える。

(1) 免疫系細胞

我々はAChに対する特異抗体を作製し、比活性の高い [³H]AChを入手して、1 pg/tubeの測定感度をもつラジ

オイムノアッセイ (RIA) の開発に成功した [39,40]。RIAを用いて、ヒトを始めとする様々な動物の血中にAChの存在を確認した [19]。血中AChの起源は、リンパ球を含む単核白血球であることが判明した [20]。リンパ球のモデルとしてヒト白血病細胞株を用いて、主としてT細胞がChATによりAChを産生することを発見した。1995年にFujiiら [41] は、世界に先駆けてT細胞系白血病細胞株MOLT-3におけるChAT の遺伝子と蛋白質の発現を発見した。いわゆるACh合成酵素活性はB細胞にも認められるが、ChATは発現していなかった。別の動物種では、T細胞に加えて、B細胞にもChATの発現が報告されており、種差があるかもしれない [22, 28, 42]。

T細胞、B細胞、樹状細胞およびマクロファージなどの免疫系細胞には、様々なmAChRおよびnAChRが発現している [29, 40, 42,43]。T細胞と種々の免疫細胞との間で抗原提示反応が行なわれる時に、T細胞から遊離されたAChが自身および直近の細胞上のmAChRおよびnAChRを刺激して、免疫機能の調節に関与する可能性が考えられる。例えば、M₁/M₅ mAChRノックアウト (KO) マウスを卵白アルブミンで免疫すると、INF- γ およびIL-6産生抑制とIgG₁抗体の産生の遅延が観察された [44]。他方、 $\alpha 7$ nAChR KOマウスを免疫した場合には、TNF- α 、INF- γ およびIL-6産生増大とIgG₁およびIgM抗体の産生が増大した [45]。これらの知見は、免疫細胞におけるコリン作動系はmAChRおよびnAChRを介して、免疫機能の調節に関与している可能性を支持するものである。

(2) 血管内皮細胞 (VEC)

AChによりVECのmAChRを刺激すると、一酸化窒素 (NO) が産生され、血管拡張が起こることが知られている。血中には高いAChE活性があるため、VECのmAChRに働くAChの起源は不明であった。我々は、ウシ大動脈VECおよびブタ脳微小血管初代培養VECにおけるACh産生を発見した [46,47]。VECには、ChATはもとより、M₃を始めとする様々なmAChRサブタイプと $\alpha 3, \alpha 5, \alpha 7, \beta 2, \beta 4$ などのnAChRサブユニットの発現が報告されている [22]。

VECのコリン作動系は、M₃ mAChRを介する血管拡張の他に、 $\alpha 7$ nAChRを介する血管新生への関与が示唆されている。VECの $\alpha 7$ nAChRを介する癌の増殖や加齢性黄斑変性発症への関与についての研究が今後進展するものと考えられる [22]。

(3) 胎盤

Sastry [48] はChang & Gaddum [16] の胎盤におけるAChの存在を確認し、AChが水・電解質および栄養物質の輸送調節に関与していると考えた。Sakuragawaら [49,50]は、羊膜上皮細胞におけるChATの発現、およびAChの産生と遊離を発見した。さらに胎盤への血流制限によるACh産生の上昇を観察し、AChが血流の調節にも関与している可能性を報告した。

(4) ケラチノサイト

Grandoら [51] はケラチノサイトにおけるACh合成能や、M₁-M₅ mAChRサブタイプと $\alpha 3, \alpha 5, \alpha 7, \alpha 9,$

$\alpha 10, \beta 2$ および $\beta 4$ nAChRサブユニットの発現を発見した。ケラチノサイトが産生したAChは、オートクラインおよびパラクライン的に自身および周囲のケラチノサイトに作用して、増殖、分化、接着、遊走、表皮バリアー形成、色素や皮脂の産生などに関与する可能性が示唆されている。さらに血流調節、血管新生および免疫反応への関与も考えられている [52]。

最近、SLURP-1はケラチノサイトの $\alpha 7$ nAChRに作用して、細胞増殖、分化およびアポトーシスを促進することが報告された [34]。他方、SLURP-2はケラチノサイトの $\alpha 3$ nAChRに作用して、分化を遅延させ、アポトーシスを抑制した [35]。これらの新規内因性nAChRアロステリック・リガンドに関する研究の進展が待たれている。

(5) 気道上皮細胞

気道上皮細胞には、ChAT遺伝子および蛋白質が発現している。また気道上皮細胞には、M₃やM₅を含む様々なmAChRサブタイプと $\alpha 2, \alpha 3, \alpha 4, \alpha 5, \alpha 7, \alpha 9, \alpha 10, \beta 2$ および $\beta 4$ などのnAChRサブユニットが発現している [22,53,54]。気道上皮細胞が産生したAChは、M₃ mAChRに作用して細胞増殖や線毛運動の促進に、また $\alpha 7$ nAChRに作用してホメオステシスの維持に関与している可能性が報告されている。Horiguchiら [37]は、気道線毛上皮におけるSLURP-1の特異的発現を発見し、またNarumotoら[55]は喘息モデルにおけるSLURP-1発現の低下を観察した。病態時における気道上皮細胞上の $\alpha 7$ nAChRとSLURP-1の役割の解明が期待されている。

(6) 消化管上皮細胞

胃や小腸などの消化管上皮細胞、特に線毛部分におけるChATの免疫組織化学的発現とACh産生が報告されている [28,56]。消化管上皮細胞には、様々なmAChRサブタイプとnAChRサブユニットが発現している。消化管上皮細胞における非神経性AChの役割として、水、電解質および栄養物質の輸送と線毛運動への関与が想定されている。

(7) 心筋細胞

2009年にKakinumaら [57]は、心筋細胞 (cardiomyocyte) におけるChATおよびVAcHTの発現を発見し、心筋がAChを産生・遊離することを報告した。mAChR刺激やAChE阻害により心筋細胞内ACh含量が増大した。続いて、Ranaら [58]は、ラット心筋におけるACh産生と遊離を確認した。ヒト心筋でM₁、M₂、M₃およびM₅、およびラット心筋でM₁、M₂、M₃およびM₄ mAChRサブタイプの発現が報告されている。さらにラットの心筋で $\alpha 3, \alpha 4, \alpha 5, \alpha 7$ および $\alpha 10$ nAChRサブユニットの発現が報告されている。心筋細胞における非神経性AChの役割は現時点では不明であるが、心筋への迷走神経活動を補完する役割をして、心臓を保護する働きをする可能性が考えられている。

(8) 膀胱

Yoshidaら [59,60] は、免疫組織化学的にヒト膀胱上皮とその下部にChAT発現を認めた。さらに、膀胱切片

からのACh遊離は、上皮細胞の有無によって大きく変化することから、膀胱上皮細胞がAChの大きな起源であることを証明した。膀胱切片を伸展させると、ACh遊離は増大した。ラットの培養膀胱上皮細胞において、CHT1、ChATおよびCarATの発現が観察されている [28,61]。ヒトの膀胱ではM₁-M₅ mAChRサブタイプと $\alpha 7$ 、 $\alpha 9$ および $\alpha 10$ nAChRサブユニットの発現が報告されている [22]。膀胱の非神経性AChは、mAChRを介して、排尿筋の緊張度の持続的刺激に関与している可能性が考えられている [59,60]。

(9) その他

上記の他に、線維芽細胞、腱細胞、脂肪細胞、卵巣細胞、および小細胞性肺癌細胞、結腸上皮細胞などにも非神経性AChの発現が報告されている [22,28]。

3) 非神経性コリン作動系の加齢による変化

非神経性コリン作動系に関する研究は比較的最近始まったばかりで、加齢の影響を検討した研究は少ない。

(1) 免疫系細胞

高血圧自然発症ラット (SHR) と正常血圧ラット (WKY) の血中ACh含量は、5週齢と比較して、10および20週齢で著明に減少していた [62]。またSHRではWKYと比較して、どの週齢においても血中ACh含量と末梢血単核白血球中のChAT遺伝子発現は有意に低下していた。SHRでは、胸腺細胞傷害性自己抗体が発現することが、これらの変化に関与している可能性が考えられる。

他方、Evaら [63]は、ヒト末梢血のTリンパ球における非特異的mAChRリガンド [³H]N-methylscopolamine を使用した結合実験により年齢に依存した結合部位の増大を発見した。リンパ球上のmAChRあるいはnAChRの量的変化と神経疾患との関連が示唆されたこともあるが、まだ結論は得られていない。

(2) 心筋細胞

20-24月齢のラット心筋におけるChAT発現が、PCR、Western-Blottingおよび免疫組織化学により検出され、加齢により発現レベルが低下した [58]。同時に心筋細胞からのACh遊離も加齢により減少した。他方、6-8週齢のラットではChAT発現は確認できなかった。加齢によるChAT発現変化の生理的意義は現時点では不明である。

(3) 膀胱上皮細胞

ヒト膀胱切片から伸展により誘発されるACh遊離量は、年齢と共に増大して、正の相関を示すことが観察された [59]。静止時における膀胱の緊張度は、年齢と共に上昇することから、膀胱における非神経性AChと高齢者における排尿障害との関連が想定されている [59,60]。

4. 生物におけるAChの発現

Erwins [12]による麦角におけるAChの発見は、菌類によるACh産生を示唆した。その他に、原生動物 [64]、細菌 [65]、および植物 [67-69]などにおけるAChの存在が散発的に報告されている。

我々は高感度RIAを利用して、様々な生物におけるACh発現および産生能を検討した [70,71]。Woeseら [72]は、リボソームの16S RNAの塩基配列に基づいて、生物を真正細菌、始原菌 (古細菌) および真核生物の3ドメインに分類した。これらのドメインの様々な生物におけるACh含量とACh産生能の測定結果を表3 [70,71]に示す。

1) 真正細菌 [70]

枯草菌、大腸菌および黄色ブドウ球菌におけるAChの存在を確認した。ACh産生能は、枯草菌で検討したが、BrAChおよびBrACarのいずれにも阻害されなかった。

2) 始原菌 (古細菌) [71]

超好熱菌、メタン生成菌および好塩菌のいずれにもAChの存在とACh産生能の発現を認めた。超好熱菌*T. kodakaraensis* KOD1は、始原菌の中で最も高いACh含量を示し、またACh産生能はBrAChにより部分的に抑制された。しかし、他の始原菌におけるACh産生能はBrAChに感受性を示さなかった。

3) 真核生物 [70]

(1) 菌類

イースト (子囊菌) およびシイタケ (担子菌) にかかなり高いACh含量が認められた。シイタケは、傘と軸に分けて測定したところ、軸の部分の方がACh含量とACh産生能が高かった。また軸の部分のACh産生能は、一部BrAChに感受性を示した。AChは生育に必要な水、電解質および栄養物質の輸送に関与している可能性が考えられる。

(2) 植物

被子植物は、一般的に裸子植物よりも高いACh含量とACh産生能を示した。特にタケノコのACh含量は、モルモット回腸縦走筋やラット脳幹よりも、それぞれ、16~84倍も高かった。タケノコでは、先端部の方が下端部よりもACh含量およびACh産生能が高く、活発な生長に関与している可能性が考えられる。またタケノコのACh産生能は、一部BrAChに感受性を示した。因みに、タケノコは、喘息患者では誤嚥した場合に発作を誘発する可能性があるために注意が必要な食品であるとされている。

その他にシダ類やコケ類にも少量のAChの存在とACh産生能が認められた。

(3) 神経系が存在するホヤ (脊索動物) とウニ (棘皮動物)、および神経系が存在しない海綿にも、少量のAChの存在とACh産生能が認められた。これらの試料におけるACh産生能はBrAChに感受性を示さなかった。

4) AChの役割

哺乳動物や一部の動物では、AChRの発現と機能の研究が進められているが、ここに示した大部分の試料におけるAChR発現とAChの役割は不明である。

トウモロコシの芽やアッケシソウにおけるAChE遺伝

表3. 代表的生物におけるACh含量と産生能*

生物名	ACh 含量	ACh 産生能
真正細菌		
枯草菌 <i>B. subtilis</i>	pmol/10 ¹⁰ CFU 8130	pmol/10 ¹⁰ CFU/min 17.6
始原菌 (古細菌)		
超好熱菌 <i>T. kodakaraensis</i> KOD1	pg/g 175	pmol/g/min 87.0
メタン生成菌 <i>M. berkeri</i>	75.9	13.9
好塩菌 <i>H. volcanii</i>	19.0	22.8
真核生物		
子嚢菌類 イースト <i>S. cerevisiae</i>	ng/g 415	pmol/min 5.39
担子菌類 シイタケ (傘)	18.3	0.25
<i>Lentinus eddoes</i> (軸)	135	4.79
被子植物 タケノコ マダケ (先端)	430,000	1,160,000
<i>Phyllostachys bambusoides</i>	371,900	239,400
被子植物 ナス <i>Solanum melongena</i>	60,900	2.91
裸子植物 イヌマキ	18.4	0.25
<i>Podocarpus macrophyllus</i> (nut)		
シダ類 ウラジロ <i>Gleichenia glauca</i>	244	39.2
コケ類 スギゴケ <i>Polytrichum</i>	28.6	83.1
脊索動物 ホヤ <i>Halocynthia roretizi</i>	40.7	17.8
棘皮動物 バフンウニ 卵巣	2.19	145
<i>Pseudocentrotus depressus</i>		
刺胞動物 シライトイソギンチャク	13.6	17.0
<i>Radianthus crispus</i>		
海綿動物 ダイダイイソカイメン	2.19	124
<i>Halichondria japonica</i>		

*参考文献[70,71]から、データを一部改変して示した。

子が最近クローニングされ、AChが水、電解質および栄養物質の輸送を調節して、植物の生長に関与している可能性が報告されている [73-75]。植物にACh産生酵素の遺伝子を導入して、植物の生長を促進することができれば、食料増産や大気中の炭酸ガス濃度の低減に貢献できる可能性が考えられる。また乾燥や高塩分含有による耕作不適地にも生育可能な改良植物を創生できるかもしれない。

5. おわりに

生物における分布を見ると、AChはおよそ39億年以前に地上に生物が出現したごく初期から存在し、細胞間の情報伝達物質として働いていた可能性が考えられる。そして神経系をもつ生物が出現した時に、AChは神経伝達物質の一つとして利用されたものであろう。したがって、

神経伝達物質としてのAChは、多様な作用をもつAChのごく限られた一側面に過ぎない。非神経性AChの存在は以前から示唆されていたが、その役割に関する研究はまだ端緒に就いたばかりである。多くの困難が予想されるが、非神経性AChは挑戦する価値のある研究課題であると考えられる。また内因性nAChRアロステリック・リガンドSLURP-1およびSLURP-2の発見は、コリン作動系の研究における新たな展開を予感させる。本稿が、AChの未知の役割に目を向ける糸口となれば幸いである。

6. 参考文献

1. Whitehouse PJ, Price DL, Clark AW et al. Alzheimer disease: Evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis.

- Ann Neurol 10: 122-126, 1981.
2. Delagarza VE. Pharmacologic treatment of Alzheimers' s disease: An update. *Am Fam Physician* 68: 1365-1372, 2003.
 3. Cramer W. On protagon, cholin and neurin. *J Physiol (Lond)* 31: 30-37, 1904.
 4. Burgen ASV. The background of the muscarinic system. *Life Sci* 56: 801-806, 1995.
 5. Mott FW, Halliburton WD. On the physiological action of choline and neurine. *Br Med J* 2: 1083-1084, 1899.
 6. Elliott TR. On the action of adrenalin. *J Physiol (Lond)* 31: 20P-21P, 1904.
 7. Hunt R, Taveau RdeM. On the physiological action of certain cholin derivatives and new methods for detecting cholin. *Br Med J* 2:1788-1791, 1906.
 8. Dixon WE. Vagus inhibition. *Br Med J* 2: 1807, 1906.
 9. Dale HH. Walter Ernest Dixon Memorial Lecture. *Pharmacology and Nerve-endings. Proc R Soc Med* 28: 15-28, 1935.
 10. Howell WH, Duke WW. The effect of vagus inhibition on the output of potassium from the heart. *Am J Physiol* 21: 51-63, 1908.
 11. Dale HH. The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine. *J Pharmacol Exp Ther* 6: 147-190, 1914.
 12. Ewins AJ. Acetylcholine, a new active principle of ergot. *Biochem J* 8: 44-49, 1914.
 13. Loewi O. Uber humorale Ubertragbarkeit der Herznwirkung. *Pflügers Arch ges Physiol* 189: 239-242, 1921.
 14. Loewi O, Navratil E. Uber hormonale Ubertragbarkeit der Herznervenwirkung. (Mit teilung X). *Uber das Schicksal des Vagusstoff. Pflügers Arch ges Physiol* 214: 678-688, 1926.
 15. Dale HH, Dudley HW. The presence of histamine and acetylcholine in the spleen of the ox and the horse. *J Physiol* 68:97-123, 1929.
 16. Chang HC, Gaddum. Choline esters in tissue extracts. *J Physiol. (Lond)* 79: 255-285, 1993.
 17. Dale HH, Feldberg W, Vogt M. Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings. *J Physiol (Lond)* 86: 353-380, 1936.
 18. MacIntosh FC. The distribution of acetylcholine in the peripheral and central nervous system. *J Physiol (Lond)* 99: 436-442, 1941.
 19. Fujii T, Yamada S, Yamaguchi N et al. Species differences in the acetylcholine content in blood and plasma. *Neruosci Lett* 201: 207-210, 1995.
 20. Kawashima K, Kajiyama K, Fujimoto K et al. Presence of acetylcholine in human blood and its localization in circulating mononuclear leukocytes. *Biog Amine* 9: 251-258, 1993.
 21. Grando SA, Kawashima K, Wessler I. Editorial: The non-neuronal cholinergic system in humans. *Life Sci* 72: 2009-2012, 2003.
 22. Grando SA., Kawashima K, Kirkpatrick CJ et al. Introduction: Recent progress in understanding the non-neuronal cholinergic system in humans. *Life Sci* 80: 2181-2185, 2007.
 23. Fonnum F. A rapid radiochemical method for the determination of choline acetyltransferase. *J Neurochem* 24: 407-409, 1975.
 24. Tucek S. The synthesis of acetylcholine in skeletal muscles of the rat. *J Physiol (Lond)* 322: 53-69, 1982.
 25. Fujii T, Yamada S, Watanabe Y et al. Induction of choline acetyltransferase mRNA in human mononuclear leukocytes stimulated by phytohemagglutinin, a T-cell activator. *J Neuroimmunol* 82: 101-107, 1998.
 26. Fujii T, Tajima S, Yamada S et al. Constitutive expression of mRNA for the same choline acetyltransferase as that in the nervous system, an acetylcholine-synthesizing enzyme, in human leukemic T-cell lines. *Neurosci Lett* 259: 71-74, 1999.
 27. Kawashima K, Fujii T. Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: Overview of non-neuronal cholinergic systems and their biological significance. *J Pharmacol Sci* 106: 167-173, 2008.
 28. Wessler I, Kirkpatrick CJ. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br J Pharmacol* 154: 1558-1571, 2008.
 29. Kawashima K, Fujii T. Expression of non-neuronal acetylcholine in lymphocytes and its contribution to the regulation of immune function. *Front Biosci* 9: 2063-2085, 2004.
 30. Fujii T, Masai M, Misawa H et al. Acetylcholine synthesis and release in NIH3T3 cells co-expressing the high-affinity choline transporter and choline acetyltransferase. *J Neurosci Res* 87: 3024-3032, 2009.
 31. Adermann K, Wattler F, Wattler S et al. Structural and phylogenetic characterization of human SLURP-1, the first secreted mammalian member of the Ly-6/uPAR protein superfamily. *Prot Sci* 8: 810-819, 1999.
 32. Chimienti F, Hogg, RC, Plantard L et al. Identification of SLURP-1 as an epidermal neuro-modulator explains the clinical phenotype of

- Mal de Meleda. *Hum Mol Genet* 12: 3017-3024, 2003.
33. Tsuji H, Okamoto K, Matsuzaka Y et al. SLURP-2, a novel member of the human Ly-6 superfamily that is up-regulated in psoriasis vulgaris. *Genomics* 81: 26-33, 2003.
 34. Arredondo J, Chernyavsky AI, Webber RJ et al. Biological effects of SLURP-1 on human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 125:1236-1241, 2005.
 35. Arredondo J, Chernyavsky AI, Webber RJ et al. SLURP-2: a novel cholinergic signaling peptide in human mucocutaneous epithelium. *J Cell Physiol* 208: 238-245, 2006.
 36. Moriwaki Y, Yoshikawa K, Fukuda H et al. Immune system expression of SLURP-1 and SLURP-2, two endogenous nicotinic acetylcholine receptor ligands. *Life Sci* 80: 2365-2368, 2007.
 37. Horiguchi K, Yamashita N, Horiguchi S et al. Expression of SLURP-1, an endogenous $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor allosteric ligand, in murine bronchial epithelial cells. *J Neurosci Res* 87: 2740-2747, 2009.
 38. Moriwaki Y, Watanabe Y, Shinagawa T et al. Primary sensory neuronal expression of SLURP-1, an endogenous nicotinic acetylcholine receptor ligand. *Neurosci Res* 64: 403-412, 2009.
 39. Kawashima K, Ishikawa H, Mochizuki M. Radioimmunoassay for acetylcholine in the rat brain. *J Pharmacol Methods* 3: 115-123, 1980.
 40. Kawashima K, Fujii T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacol Ther* 86: 29-48, 2000.
 41. Fujii T, Yamada S, Misawa H et al. Expression of choline acetyltransferase mRNA and protein in T-lymphocytes. *Proc Japan Acad* 71B: 231-235, 1995.
 42. Kawashima K, Fujii T. Minireview: The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. *Life Sci* 74: 675-696, 2003.
 43. Fujii T, Takada-Takatori Y, Kawashima K. Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: Expression of an independent, non-neuronal cholinergic system in lymphocytes and its clinical significance in immunotherapy. *J Pharmacol Sci* 106: 186-192, 2008.
 44. Fujii YX, Tashiro A, Arimoto K et al. Diminished antigen-specific IgG₁ and interleukin-6 production and acetylcholinesterase expression in combined M₁ and M₅ muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *J Neuroimmunol* 188: 80-85, 2007.
 45. Fujii YX, Fujigaya H, Moriwaki Y et al. Enhanced serum antigen-specific IgG₁ and proinflammatory cytokine production in nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit gene knockout mice. *J Neuroimmunol* 189: 69-74, 2007
 46. Kawashima K, Watanabe N, Oohata H et al. Synthesis and release of acetylcholine by cultured bovine arterial endothelial cells. *Neurosci Lett* 119: 156-158, 1990.
 47. Ikeda C, Morita I, Mori A et al. Phorbol ester stimulates acetylcholine synthesis in cultured endothelial cells isolated from porcine cerebral microvessels. *Brain Res* 655: 147-152, 1994.
 48. Sastry BVR. Human placental cholinergic system. *Biochem Pharmacol* 53: 1577-1586, 1997.
 49. Sakuragawa N, Elwan MA, Uchida S et al. Non-neuronal neurotransmitter and neurotrophic factors in amniotic epithelial cells: expression and function in humans and monkey. *Japan J Pharmacol* 85: 20-23, 2001.
 50. Horikoshi T, Fujii T, Kawashima K et al. Acetylcholine increase in amniotic fluid of experimental rats for intrauterine growth retardation. *Life Sci* 72: 2145-2150, 2003.
 51. Grando SA. Biological functions of keratinocyte cholinergic receptors. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2: 41- 48, 1997.
 52. Kurzen H, Wessler I, Kirkpatrick CJ et al. The non-neuronal cholinergic system of human skin. *Horm Metab Res* 39: 125-135, 2007.
 53. Song P, Spindel ER. Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: Expression of non-neuronal acetylcholine in lung cancer provides a new target for cancer therapy. *J Pharmacol Sci* 106: 180-185, 2008.
 54. Gatherine R, Donnelly LE, Rogers DF. The non-neuronal cholinergic system in the airways: An unappreciated regulatory role in pulmonary inflammation? *Ther Pharmacol* 115: 208-222, 2007.
 55. Narumoto O, Horiguchi K, Horiguchi S et al. Down-regulation of secreted lymphocyte antigen-6/urokinase-type plasminogen activator receptor-related peptide-1 (SLURP-1), an endogenous $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor modulator, in murine and human asthmatic conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 398: 713-718, 2010.
 56. Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racke K. Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule widely distributed in biological system: expres-

- sion and function in humans. *Pharmacol Ther* 77: 59-79, 1998.
57. Kakinuma Y, Akiyama T, Sato T. Cholinergic and cholinergic properties of cardiomyocytes involving an amplification of mechanism for vagal efferent effects in sparsely innervated ventricular myocardium. *FEBS J* 276: 5111-5125, 2009.
 58. Rana OR, Schauerte P, Kluttig R et al. Acetylcholine as an age-dependent non-neuronal source in the heart. *Autonom Neurosci Basic Clin* 156: 82-89, 2010.
 59. Yoshida M, Inadome A, Maeda Y et al. Non-neuronal cholinergic system in human bladder urothelium. *Urology* 67: 425-430, 2006.
 60. Yoshida M, Masunaga K, Satoji Y et al. Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: Expression of non-neuronal acetylcholine in urothelium and its clinical significance. *J Pharmacol Sci* 106: 193-198, 2008.
 61. Hanna-Mitchell AT, Beckel JM, Barbadora S et al. Non-neuronal acetylcholine and urinary bladder urothelium. *Life Sci* 80: 2298-2302, 2007.
 62. Fujimoto K, Matsui M, Fujii T et al. Decreased acetylcholine content and choline acetyltransferase mRNA expression in circulating mononuclear leukocytes and lymphoid organs of the spontaneously hypertensive rat. *Life Sci* 69: 1629-1638, 2001.
 63. Eva C, Ferrero P, Rocca P et al. [³H]N-methylscopolamine binding to muscarinic receptors in human peripheral blood lymphocytes: Characterization, localization on T lymphocyte subsets and age-dependent changes. *Neuropharmacology* 28: 719-726, 1989.
 64. Bülbring E, Lourie EM, Pardoe E. The presence of acetylcholine in trypanosoma rhodesiense and its absence from plasmodium gallinaceum. *Br J Pharmacol* 4: 290-294, 1949.
 65. Stephenson M, Rowatt E. The production of acetylcholine by a strain of *Lactobacillus plantarum*. *J Gen Microbiol* 1: 279-298, 1947.
 66. Hartmann E, Kilbinger H. Gas-liquid-chromatographic determination of light-dependent acetylcholine concentration in moss callus. *Biochem J* 137: 249-252, 1974.
 67. Jaffe MJ. Evidence for the regulation of phytochrome-mediated processes in bean roots by the neurohumor, acetylcholine. *Plant Physiol* 46: 768-777, 1970.
 68. Saxena PR, Tangri KK, Bhargava KP. Identification of acetylcholine, histamine, and 5-hydroxytryptamine in *Girardinia heterophylla* (Decne.). *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 44: 621-627, 1966.
 69. Smallman BN, Maneckjee A. The synthesis of acetylcholine by plants. *Biochem J* 194: 361-364, 1981.
 70. Horiuchi Y, Kimura R, Kato N et al. Evolutional study on acetylcholine expression. *Life Sci* 72: 1745-1756, 2003
 71. Yamada T, Fujii T, Kanai T et al. Expression of acetylcholine (ACh) and ACh-synthesizing activity in archaea. *Life Sci* 77: 1935-1944, 2005
 72. Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Nat Acad Sci USA* 87: 4576-4579, 1990.
 73. Momonoki, YS, Kawai N, Takamura I et al. Gravitropic response of acetylcholinesterase and IAA-inositol synthase in lazy rice. *Plant Produc Sci* 3: 17-23, 2000.
 74. Sagane Y, Nakagawa T, Yamamoto K et al. Molecular characterization of maize acetylcholinesterase. A novel enzyme family in the plant kingdom. *Plant Physiol* 138: 1359-1371, 2005.
 75. Yamamoto K, Oguri S, Chiba S, Momonoki YS: Molecular cloning of acetylcholinesterase gene from *Salicornia europaea* L. *Plant Signal Behav* 4-5: 361-366, 2009.

Origin of acetylcholine and expression of non-neuronal acetylcholine

Koichiro Kawashima

Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Musashino University

Abstract:

Although acetylcholine (ACh) is mostly known as the neurotransmitter in the cholinergic nervous system, in mammalian species, ACh is present and its synthesis occurs in various non-neuronal cells and tissues such as immune cells, epithelial cells of digestive and respiratory tracts, and reproductive organs. Furthermore, ACh is also expressed in almost all life forms on the earth. This wide expression suggests that ACh plays a role as a universal cytotransmitter between cells and modulates functions of relevant cells and tissues. In this review, I will describe a brief history of the discovery of chemical transmission of nerve impulses involving ACh, and discuss the expression and function of non-neuronal ACh. Knowledge on the history of ACh research and the non-neuronal cholinergic system in mammalian species should be useful for understanding multiple roles of ACh other than that as a neurotransmitter.

【総 説】

老化遺伝子 *clk-1* の哺乳動物における機能

高橋真由美、白澤 卓二*

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 分子老化制御

*順天堂大学大学院 医学研究科 加齢制御医学講座

要約

clk-1 遺伝子は線虫の長寿命変異体の原因遺伝子として同定された。変異した *clk-1* 遺伝子が機能喪失することにより、*clk-1* 変異線虫は発生や運動リズムが遅延し寿命が延長する。*clk-1* 遺伝子産物はミトコンドリア呼吸鎖の電子伝達体であるユビキノン (コエンザイム Q: CoQ) の合成酵素である。また CoQ は ATP 産生と同時に活性酸素の最大の発生源であり、老化制御に深く関わっているとされる。本稿では *clk-1* 欠損マウスを用いた研究を中心に、哺乳動物における生体リズムや老化の制御における *clk-1* 遺伝子のかかわりについて紹介する。

キーワード: *clk-1*, coenzyme Q, mitochondria, apoptosis, ultradian rhythm

1. 老化遺伝子としての *clk-1*

たった一つの細胞・受精卵が分裂を繰り返し、様々な機能を持った細胞に分化しダイナミックな形態形成を繰り返しながら複雑な生命体が形成される。そのメカニズムを研究する発生生物学は古くから科学者達の興味を引き、近年の分子生物学の発展に伴って分子の言葉で発生過程が語られるようになってきた。ところがこれに比べ同じ時間軸上にありながら、老化現象はただ役割を終えた生物が崩れ落ちていく過程に過ぎず、科学的な研究対象とは遠いかに思われた。実際初期の老化研究は過程や現象の記述が主で、科学的研究とは言いがたいものも多々あった。しかし近年、特に線虫 *C. elegans* など比較的下等な生物を用いた解析により老化研究は目覚ましい発展を遂げ、科学者達にとって充分魅力的な研究対象になってきた。

線虫では1900年代後半より多くの寿命変異体が発見され、その原因遺伝子も次々特定されて寿命を規定する老化遺伝子(gerontogene)の存在が確かなものとなり、老化は遺伝子により制御される生命現象であることが広く認識されるようになった。そのようななか、1995年に寿命が野生型の約1.5倍に延長し、発生や咽頭部のポンピング、スイミング、脱糞などの生体リズム(ウルトラディアンリズム: 縮日リズム)が遅くなる突然変異体が発見され、その原因遺伝子は運動や発生のタイミングに係わるものとして *clk-1* (クロック1) と命名された[1]。*clk-1* 遺伝子の変異しその機能を失う事 (loss of func-

tion) により寿命が延長し、ウルトラディアンリズムが遅延することから *clk-1* は寿命を規定し、ウルトラディアンリズムを制御する遺伝子の1つであると考えられた。

寿命を制御するシグナル伝達経路のうち現在最も解析が進んでいるのはインスリン/インスリン様成長因子 (IGF-1) シグナル伝達経路である[2]。この経路の最上流に位置する *daf-2* はインスリン/IGF-1受容体の相同体をコードしている遺伝子で、*daf-2* が変異した線虫は野生型線虫の2~3倍に寿命が延長する。この *daf-2* 遺伝子と *clk-1* 遺伝子との二重変異体は野生型の約6倍にも寿命が延長し、長寿命変異体の中でも最も寿命の長い線虫のひとつとして知られている[3]。*daf-2* 遺伝子と *clk-1* 遺伝子とが寿命に関して相乗的に作用していることから、両遺伝子が関与している老化制御機構は互いに独立したものであると考えられている。

当初 *clk-1* 遺伝子産物 CLK-1 の機能は不明であったが、その後線虫や酵母の研究から、ミトコンドリア呼吸鎖の電子伝達体であるユビキノン (コエンザイム Q: CoQ) の合成経路で、デメトキシユビキノン (DMQ) の3位に水酸基を付加する水酸化酵素として機能している事が明らかにされた[4-6] (図1)。従って *clk-1* の機能が欠損した *clk-1* 変異線虫には CoQ がなく、代わりに中間代謝物である DMQ が蓄積していることが報告された[7]。

CoQ は酸化還元活性の高いレドックスアクティブな疎水性の分子で、ベンゾキノン骨格とそこから伸びるイソプレニル側鎖から成っている[8,9]。イソプレニル側鎖の数は種によって異なり高等動物ほど多い傾向がある (図2)。CoQ には多様な機能が知られているが、最も主要な役割はミトコンドリア内膜に局在する電子伝達系の呼吸鎖複合体 I から III へあるいは複合体 II から III へ電子を運搬しエネルギー源である ATP 産生に寄与している点である[10]。一方、CoQ は電子伝達の際漏出した電子とミトコ

連絡先: 〒173-0015

東京都板橋区栄町35-2

Tel: 03-3964-3241 ex.3022

Fax: 03-3579-4776

E-mail: mmtaka@tmig.or.jp

ンドリア内に存在する酸素とが結合してできる細胞傷害性の活性酸素の最大の発生源でもあるため[9]、老化のメカニズムを探る上で最も重要な分子である。

本稿では線虫で発見された老化遺伝子*clk-1*の哺乳動物における生物学的役割について*clk-1*欠損マウスを用いて行った我々の研究を中心に紹介し、老化制御メカニズムと*clk-1*遺伝子との関係について考察してみたい。

2. 哺乳動物における*clk-1* 遺伝子の機能

線虫で発見された*clk-1*が哺乳動物においても寿命とウルトラディアンリズムを制御しているか明らかにする目的で、まず哺乳動物においても*clk-1* 遺伝子が保持されているかを調べた。*clk-1*のマウスおよびヒト相同遺伝子を単離、同定した結果、*clk-1*遺伝子の構造は原核生物や酵母から、マウス、ヒトにいたるまで広く保存されていることがわかった[11-14]。ヒトのCLK-1は217個のアミノ酸からなる分子量約24 kDaのタンパクで、1分子あたり2個のFe原子を配位し、アミノ末端にあるミトコンドリアターゲティングシグナルによりミトコンドリアに移行しミトコンドリア内膜に局在していた[12,15,16]。次に我々はマウスあるいはヒトの*clk-1*相同遺伝子を*clk-1*変異線虫に遺伝子導入する事により、*clk-1*変異線虫の寿命と生体リズムを野生型線虫のレベルに回復させる事に成功した[17]。この結果から哺乳動物においても*clk-1*遺伝子は構造とともに機能的にも進化的に保存されている可能性が強く示唆された。従って、*clk-1*遺伝子による老化制御機構には種を超えて共通のメカニズムが存在する可能性が考えられた。

1) *clk-1*欠損マウスの作成

*clk-1*遺伝子がどのようなメカニズムで寿命と生体リズムを制御しているかを哺乳動物において解明する目的で常法に則り*clk-1*欠損マウスを作成した[18]。*clk-1*遺伝子の第2エクソンをネオマイシン耐性遺伝子で置換したターゲティングベクターを作成して電気穿孔法でES細胞(胚幹細胞)に導入し、相同組み換えを起こしたES細胞をクローン化して凝集法により仮親の子宮に移植しキメラマウスを誕生させた。キメラマウスと野生型マウスとの交配により得た*clk-1*ヘテロ接合体(*clk-1*^{+/-})マウス同志を交配し*clk-1*ホモ接合体(*clk-1*^{-/-})マウスの誕生を期した。

ところが期待に反し、*clk-1*^{-/-}マウスは胎生(E) 8.5日からE11.5日の間に致死となった。死亡直前のE10.5の胎児は野生型に比べ著しく小さく、神経管が未閉鎖であることから約48時間の発生遅延があることがわかった(図3)。また胎児抽出物を高速液体クロマトグラフィー及び質量分析した結果、*clk-1*^{-/-}マウスには、CoQが全く同定されず、代わりにCoQの前駆体であるDMQの蓄積が確認された[18]。一方*clk-1*^{+/-}マウスでは*clk-1*

の遺伝子量およびCLK-1タンパク量は野生型(*clk-1*^{+/+})マウスの半分であるにもかかわらず合成されるCoQ量はほぼ同じであった。

線虫においてもその後の研究により、*clk-1*変異線虫の寿命が延長するのはエサとして与える大腸菌がCoQを産生する野生株のときに限られ、CoQを合成できない変異大腸菌で育てた*clk-1*変異線虫は幼虫期に死亡することが報告された[7]。これらの結果は*clk-1*遺伝子産物に依存

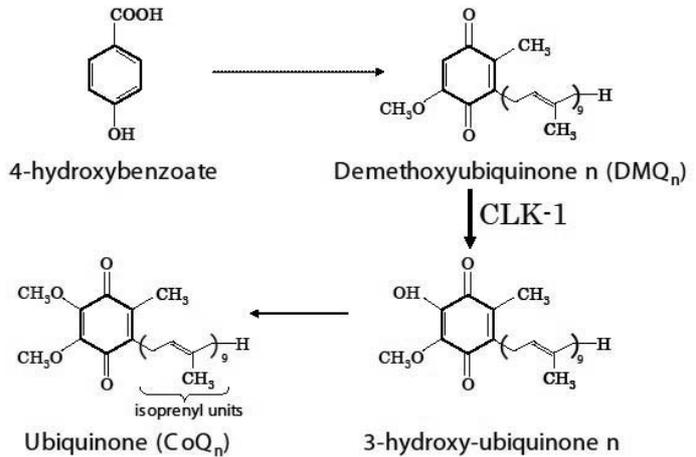


図1: CoQ合成経路

CLK-1タンパクはデメトキシビキノンの水酸化酵素としてCoQの合成に関わっている。

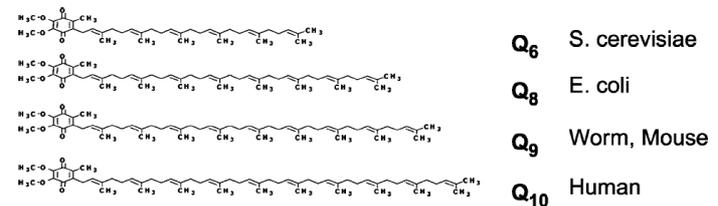


図2: 種によるCoQ側鎖長の多様性

CoQのイソプレニ側鎖は種によって異なり高等動物ほど長い傾向がある。

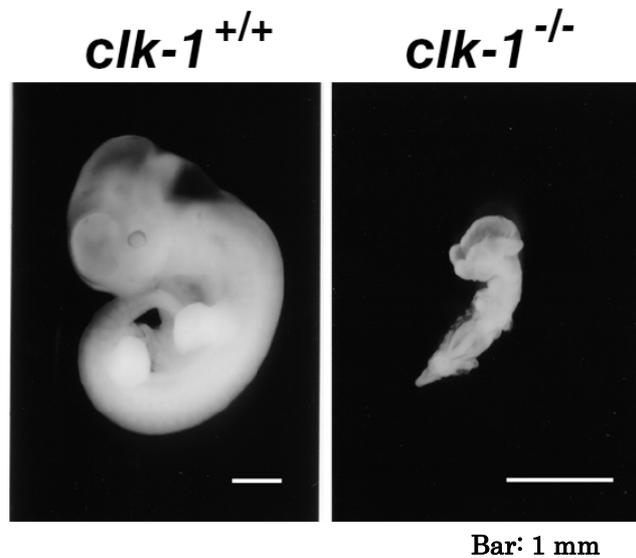


図3: *clk-1*^{-/-}マウスの発生遅延

胎生10.5日目のマウス胎児。野生型に比べ欠損マウスは非常に小さく、約48時間の発生遅延が認められた。

(Takahashi et al., 2008からの引用)

して産生されるCoQは線虫およびマウスの初期発生に必須であることを示唆している。

2) *clk-1*欠損マウス胎生致死の原因

*clk-1*欠損マウスの作成は我々とほぼ同時にカナダのHekimiらのグループにより報告された[18,19]。両者ともCoQがマウスの発生に必須であるという点では一致したが、我々が*clk-1*欠損によるミトコンドリアの形態異常を報告したのに対し、Hekimiらはミトコンドリア呼吸にCoQは必須ではないとの考えを示した。これを受けScienceのSAGEKE (Science of Aging Knowledge Environment) においてミトコンドリア呼吸が正常のになぜ胎児は死ぬのかとのコメントが寄せられた[20]。

そこで我々は致死直前のE10.5日目のマウス胎児及び胎児由来細胞を用いて解析を行った。まずマウス胎児のパラフィン切片をヘマトキシリン・エオジン染色したところ、*clk-1*^{-/-}マウスでは全身にアポトーシスを示す典型的な核の凝縮および断片化が多数観察された。そこでアポトーシスによるDNAの断片化を検出するTUNEL法により胎児切片を免疫染色した結果、TUNEL陽性細胞は*clk-1*^{+/+}マウスではほとんど見られなかったのに対し、*clk-1*^{-/-}マウスでは多数認められた。さらにアポトーシスの指標であるphosphatidylserineの細胞膜上での外在化とcaspase-3の活性化をそれぞれ免疫染色及びウエスタンブロット法により確認した。その結果*clk-1*^{-/-}マウスの胎児の細胞ではアポトーシスが高頻度で誘導されている事が明らかとなった[21]。

アポトーシスの誘導にはいくつかの経路が知られている。CoQがミトコンドリア機能に深くかかわっていることから、ミトコンドリア経路のアポトーシスが誘導されている可能性を検討した。ミトコンドリア依存性アポトーシスの指標としては、チトクロームCの細胞内局在、ミトコンドリア膜電位変化、ATP量について解析した。*clk-1*^{-/-}マウス胎児の細胞をチトクロームCに対する抗体で免疫染色した結果、ミトコンドリアから細胞質へのチトクロームCの放出が確認された。また、JC-1蛍光染色法によるミトコンドリア膜電位測定およびルシフェラーゼ法によるATP定量の結果、*clk-1*^{-/-}マウス胎児由来細胞では野生型マウスに比べミトコンドリア膜電位とATPレベルが有意に低下していることが明らかとなった(図4A&B)。以上の結果から*clk-1*^{-/-}マウスで誘導されているアポトーシスはミトコンドリア由来であることが強く示唆された[21]。

既に述べたように*clk-1*^{-/-}マウスはCoQを合成することが出来ない。そこで*clk-1*^{-/-}マウスにおけるミトコンドリア機能不全やアポトーシスの誘導がCoQ処理により回避できるかを検討した。*clk-1*^{-/-}細胞を無血清条件下で5時間25 μM CoQ₁₀処理した結果、CoQ₁₀はミトコンドリア機能を有意に回復させ、またアポトーシス

の頻度も有意に低下させた(図4C) [21]。以上の結果から、*clk-1*欠損マウスは*clk-1*の欠損によりCoQが合成できず、CoQ欠失に伴うミトコンドリア機能不全によるアポトーシスが全身の細胞で誘導された結果、胎生致死にいたると考えられた。すなわちCoQはミトコンドリア機能を維持してATP産生に寄与し、アポトーシスの誘導を抑制する事によりマウスの初期発生に必須な役割を担っていると考えられた。

3) *clk-1*欠損マウスにおけるウルトラディアンリズムの遅延

生体リズムの中で最もポピュラーで分子レベルにまで機構解明が進んでいるのは、24時間周期のサーカディアンリズム(概日リズム)である[22]。ウルトラディアンリズム(縮日リズム)は24時間より短い周期のリズムで、知名度は低いものの多くの重要な生命現象に関係している。たとえば、数時間周期のホルモン分泌、90分周期のレムノンレム睡眠、数十ミリ秒周期の心臓の拍動、数時間周期の細胞分裂やタンパク合成など非常に多岐にわたっている。しかしその調節機構についてはサーカディアンリズムに比べ解析が遅れている。

*clk-1*欠損マウスは胎生致死である為、リズムの解析を行うのは不可能かに思われた。致死直前のE10.5の*clk-1*^{+/+}および*clk-1*^{+/-}マウス胎児由来細胞は無血清培地で生存可能であるが、*clk-1*^{-/-}マウス胎児由来の細胞は生体内と同様E10.5を超えて生存することは出来なかった[18]。しかし我々は10%牛胎児血清を培地に添加するこ

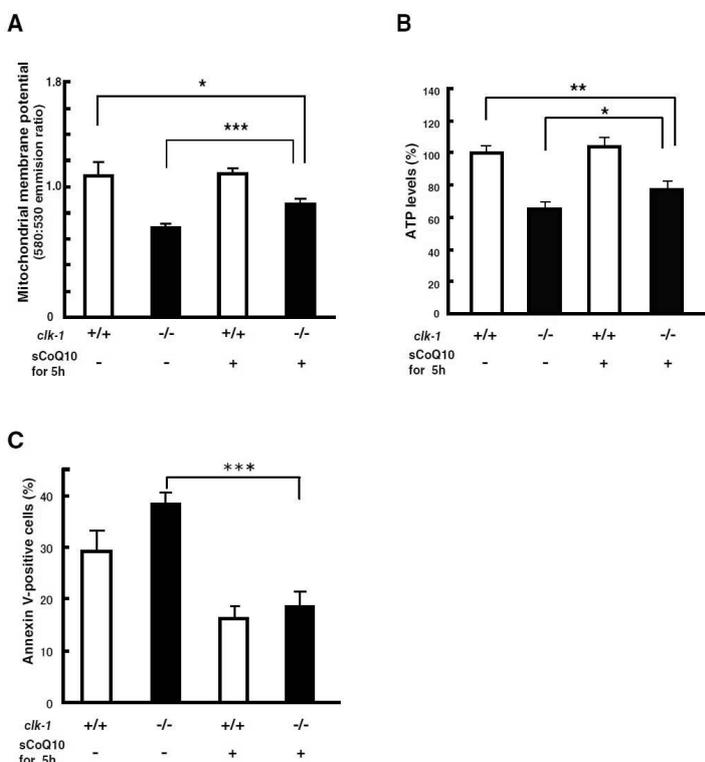


図4: ミトコンドリア機能とアポトーシスに対するCoQの効果

マウス胎児由来の解離細胞を25 μM CoQ₁₀添加無血清培地で5時間培養した。CoQ₁₀添加により*clk-1*欠損マウスのミトコンドリア機能が有意に回復し、アポトーシスの誘導が抑制された。

(Takahashi et al., 2008からの引用)

とにより *clk-1*^{-/-} マウス由来の細胞の培養を可能とし細胞を生存させることに成功した。そこでこの培養系を用いて胎児由来の細胞および心臓におけるリズム解析を行い、*clk-1* 遺伝子が哺乳動物においてもウルトラディアンリズムの制御に関与しているか検討した。

胎児を酵素処理して細胞を解離し、細胞培養した結果、*clk-1*^{-/-} 細胞は *clk-1*^{+/+} や *clk-1*^{+/-} 細胞に比べゆっくり増殖することがわかった。この *clk-1*^{-/-} 細胞における増殖遅延がウルトラディアンリズムの1つである細胞分裂速度の遅れによるものか、あるいはより多くの細胞が死ぬ事により見かけ上増殖に遅れが見られるのかを明らかにする為、単位時間当たりのBrdUの取り込みとTUNEL ELISA法によるアポトーシスの発生頻度を調べた。その結果、*clk-1*^{-/-} 細胞では *clk-1*^{+/+} 細胞や *clk-1*^{+/-} に比べ細胞分裂速度が半分以下であると共アポトーシスの発生頻度は4倍以上であった。従って、*clk-1*^{-/-} 細胞の増殖遅延は細胞分裂の遅延と細胞死の増加との合算によることが明らかとなった。

次にもう1つのウルトラディアンリズムである心臓の拍動リズムを解析した。胎児の心臓を酵素処理して細胞培養した所、*clk-1*^{+/+} マウスや *clk-1*^{+/-} マウスの心筋細胞が1分間に約150回拍動したのに対し *clk-1*^{-/-} マウスの心筋細胞は約1/3のゆっくりとしたリズムで拍動していた。*clk-1*^{-/-} マウス心臓の拍動リズムの遅れは胎児由来の心臓をまるごと器官培養することでも確認された。以上の結果から、マウスにおいても *clk-1* 遺伝子の欠損によりウルトラディアンリズム-細胞分裂速度と心臓の拍動-が遅延することが明らかとなった。

次にウルトラディアンリズムの制御にCoQが関与しているかを調べる目的で、培地にCoQ₁₀を添加し胎児解離細胞の増殖に対する効果を調べた。*clk-1*^{-/-} 細胞の見かけ上の増殖は25 μM CoQ₁₀により *clk-1*^{+/+} 細胞と同等のレベルに回復した。この時、外来性CoQの添加は *clk-1*^{-/-} 細胞の増殖速度を *clk-1*^{+/+} 細胞レベルに回復させるとともにアポトーシス頻度を有意に減少させた。さらに心臓の拍動に対するCoQの効果を検討したところ、培養心筋細胞に対しては50 μM、器官培養した心臓に対しては150 μM CoQ₁₀により拍動リズムが完全に回復した。

CoQにはいろいろな作用があることが報告されているが、最も重要な機能としてATPを産生するためのミトコンドリア電子伝達系における電子の運搬が挙げられる。そこで、リズム遅延に対するCoQの効果がミトコンドリア機能を介しているのかを検討した。ミトコンドリア膜電位を調べるため、培養7日目の細胞をJC-1染色した。その結果CoQ₁₀の添加により *clk-1*^{-/-} 細胞のミトコンドリア膜電位が有意に上昇した。さらに4日間器官培養した心臓のATP量をルシフェラーゼ法により測定したところ、CoQ₁₀添加により *clk-1*^{-/-} マウスの心臓のATP産生量は有意に増加することがわかった。

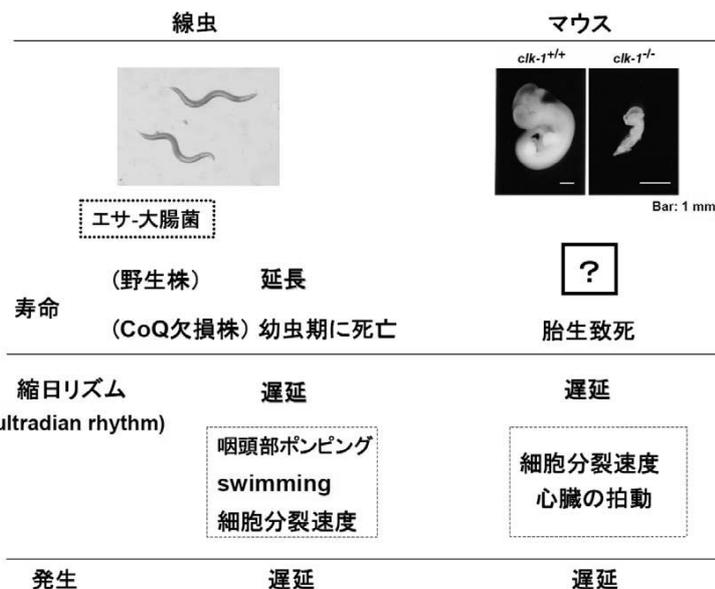


図5: *clk-1* 変異線虫と *clk-1* 欠損マウスの表現型の比較

clk-1 欠損マウスは線虫同様、発生とウルトラディアンリズムの遅延が認められた。線虫、マウスともにCoQがないと胎生致死になることからCoQは初期発生に必須であることがわかった。成長後、マウスにおいてもCoQが少ないと寿命が延命するかは *clk-1*^{-/-} Tgマウスの寿命解析により明らかになるであろう。(文献 [1] [7] [18] [21] および未発表データ)

以上の結果から、線虫同様、哺乳動物においても *clk-1* 遺伝子の欠損によりウルトラディアンリズムが遅延することが明らかとなった。またこのリズム遅延がCoQ₁₀添加により回復することから、少なくとも細胞分裂及び心臓の拍動のウルトラディアンリズムの制御にCoQがミトコンドリア機能を介して関与していることが強く示唆された。

4) まとめ

clk-1 欠損マウスを用いた機能解析の結果、リズム遅延を伴う長寿変異体線虫の原因遺伝子 *clk-1* は、哺乳動物においてもウルトラディアンリズムの制御に関与していることが明らかとなった (図5)。 *clk-1* 変異線虫においてウルトラディアンリズムが遅延するメカニズムはまだ明らかにはなっていない。しかし一つの可能性としてCoQを合成できないが、エサとして取り入れた外来のCoQで生育している線虫では代謝が低下し、その結果様々な運動リズムの遅延が引き起こされるのではないかと考えられている[23]。昔から代謝速度あるいはウルトラディアンリズムの1つである心臓の拍動リズムと寿命とは反比例することが知られている[24,25]。すなわち寿命と代謝およびウルトラディアンリズムとの制御には共通のメカニズムが関与している可能性が示唆される。従って種を超えてリズム制御に関与している *clk-1* 遺伝子は、この共通のメカニズム解明に迫ることが可能な重要な遺伝子であると考えられる。

また哺乳動物においても線虫同様[26] *clk-1* 遺伝子の欠損によりマウスが胎生致死となることから、*clk-1* 遺伝子あるいは *clk-1* 遺伝子産物により合成されるCoQは線虫およびマウスの初期発生に必須であることが明らかとなった。寿命に関係する遺伝子の中で若齢においては生

存にとって不可欠な機能を果たすが、繁殖後はむしろ生存力を低下させるよう作用する多面発現的 (pleiotrophic) な遺伝子の存在が指摘されている [27,28]。clk-1 遺伝子はまさに pleiotrophic な遺伝子であることが線虫において示唆された。では線虫同様哺乳動物においても、成長後 clk-1 遺伝子あるいは CoQ がいない方が長寿となるのであろうか？ 今後の研究が待たれるところである。

3. clk-1 遺伝子と老化

老化仮説の中で、現在最も注目されている仮説のひとつにフリーラジカル仮説 (酸化傷害仮説) がある [29]。フリーラジカル (活性酸素) は正常な代謝の副産物として発生し、DNA、タンパク質、脂質などの生体高分子物質に酸化傷害を与え、酸化傷害の蓄積により細胞機能が低下して老化が進行すると考えられている。細胞内における活性酸素の最大の発生源はミトコンドリア内膜に存在する CoQ であり [30,31]、ミトコンドリア内の 0.4~4% の酸素が、電子伝達時に漏出した電子と結合し活性酸素になると試算されている [32,33]。ミトコンドリアでの呼吸が盛んになるほど、電子の漏れも増え、活性酸素の発生も増加し、老化が加速すると考えられる。clk-1 の遺伝子産物は CoQ の合成酵素であることから clk-1 変異線虫が長寿であるのは clk-1 変異線虫のミトコンドリアでは代謝が低く活性酸素の発生が低下しているのではないかと示唆されている [34]。実際 clk-1 変異線虫に存在する外来性 CoQ₈ の量は野生型線虫で合成される CoQ₉ の量よりはるかに少なく [35]、clk-1 変異線虫の単離ミトコンドリアの解析から呼吸鎖複合体 I から III への電子伝達速度は 70~80% 低下し、酸化傷害も低下しているとの報告がある [36]。一方、clk-1 変異線虫では野生型に比べ代謝関連および抗酸化酵素群の遺伝子発現が亢進し、ミトコンドリアの生合成が増加していることが判明した [34]。これらの変化は酵母や哺乳動物の細胞でミトコンドリア機能不全により呼吸が阻害された時に見られる 'retrograde response' とよく似たパターン [37] であると指摘された。またミトコンドリア生合成の増加はカロリー制限 (CR) により寿命が延長する場合にも報告されている [38-40]。従って、clk-1 変異体と CR とにおいては共通のメカニズムで寿命が延長している可能性があり [41]、両者ともに、必要なエネルギーを確保するためにミトコンドリア生合成の増加という補償作用が働き、最終的に寿命延長に繋がると予想されるが、詳細なメカニズムについては今後の解析を待たねばならない。

前述のように、clk-1^{+/-}マウスでは CLK-1 タンパクが clk-1^{+/+}マウスの半分しか合成できないにも拘らず、CoQ量は clk-1^{+/+}マウスと同程度確認された。また clk-1^{+/-}マウス胎児由来細胞の分裂速度、心拍数および成体マウスのミトコンドリア呼吸活性 (未発表データ) も clk-1^{+/+}マウスと変わらなかった。これらの結果から clk-1^{+/-}マウスが clk-1^{+/+}マウスと同じ表現型を示すのは CLK-1 タンパクの減少にも拘らず CoQ 合成量は clk-1^{+/+}マウスと変わらないためではないかと考えた。そこで、clk-1^{-/-}マウスに clk-1 遺伝子をトランスジーン (Tg) し

てレスキューした clk-1^{-/-}Tg マウスの中で、野生型マウスに比べ CoQ の合成量が少ないラインを用いて解析を行った結果、clk-1^{-/-}Tg マウスの腎臓から単離したミトコンドリアでは呼吸酵素活性および 2 種類の活性酸素種の発生が低下していた [42]。これらの結果は生体リズムの調節、ミトコンドリアの呼吸機能および活性酸素の発生は CLK-1 タンパク量よりも CoQ 量に依存していることを示唆している。

一方寿命に関して、Hekimi らのグループは CoQ 量が clk-1^{+/-}マウスと clk-1^{+/+}マウスで差がないにも拘らず、clk-1^{+/-}マウスの方がより長寿であるとの報告をしている [43]。この結果から彼らは、CLK-1 タンパクに CoQ 合成以外の機能が存在する可能性と、CoQ 量ではなく CLK-1 タンパク自体が寿命制御に関与している可能性を指摘している [44]。

今後 clk-1^{+/-}マウスおよび clk-1^{-/-}Tg マウスの寿命解析およびミトコンドリア機能、代謝速度、活性酸素の発生量をさらに調べることにより哺乳動物の老化制御における clk-1 遺伝子、CLK-1 タンパク、CoQ あるいは活性酸素の関与を明らかにしていきたい。

引用文献

- [1] Wong, A., Boutis, P. and Hekimi, S. (1995). Mutations in the clk-1 gene of *Caenorhabditis elegans* affect developmental and behavioral timing. *Genetics* 139, 1247-59.
- [2] Wolkow, C.A., Kimura, K.D., Lee, M.S. and Ruvkun, G. (2000). Regulation of *C. elegans* life-span by insulinlike signaling in the nervous system. *Science* 290, 147-50.
- [3] Lakowski, B. and Hekimi, S. (1996). Determination of life-span in *Caenorhabditis elegans* by four clock genes. *Science* 272, 1010-3.
- [4] Marbois, B.N. and Clarke, C.F. (1996). The COQ7 gene encodes a protein in *saccharomyces cerevisiae* necessary for ubiquinone biosynthesis. *J Biol Chem* 271, 2995-3004.
- [5] Miyadera, H. et al. (2001). Altered quinone biosynthesis in the long-lived clk-1 mutants of *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 276, 7713-6.
- [6] Jonassen, T., Proft, M., Randez-Gil, F., Schultz, J.R., Marbois, B.N., Entian, K.D. and Clarke, C.F. (1998). Yeast Clk-1 homologue (Coq7/Cat5) is a mitochondrial protein in coenzyme Q synthesis. *J Biol Chem* 273, 3351-7.
- [7] Jonassen, T., Larsen, P.L. and Clarke, C.F. (2001). A dietary source of coenzyme Q is essential for growth of long-lived *Caenorhabditis elegans* clk-1 mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 421-6.
- [8] Ernster, L. and Dallner, G. (1995). Biochemical, physiological and medical aspects of

- ubiquinone function. *Biochim Biophys Acta* 1271, 195-204.
- [9] Turunen, M., Olsson, J. and Dallner, G. (2004). Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim Biophys Acta* 1660, 171-99.
- [10] Crane, F.L., Hatefi, Y., Lester, R.L. and Widmer, C. (1957). Isolation of a quinone from beef heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 25, 220-1.
- [11] Ewbank, J.J., Barnes, T.M., Lakowski, B., Lussier, M., Bussey, H. and Hekimi, S. (1997). Structural and functional conservation of the *Caenorhabditis elegans* timing gene *clk-1*. *Science* 275, 980-3.
- [12] Asaumi, S., Kuroyanagi, H., Seki, N. and Shirasawa, T. (1999). Orthologues of the *Caenorhabditis elegans* longevity gene *clk-1* in mouse and human. *Genomics* 58, 293-301.
- [13] Vajo, Z., King, L.M., Jonassen, T., Wilkin, D.J., Ho, N., Munnich, A., Clarke, C.F. and Francomano, C.A. (1999). Conservation of the *Caenorhabditis elegans* timing gene *clk-1* from yeast to human: a gene required for ubiquinone biosynthesis with potential implications for aging. *Mamm Genome* 10, 1000-4.
- [14] Jonassen, T., Marbois, B.N., Kim, L., Chin, A., Xia, Y.R., Lusic, A.J. and Clarke, C.F. (1996). Isolation and sequencing of the rat *Coq7* gene and the mapping of mouse *Coq7* to chromosome 7. *Arch Biochem Biophys* 330, 285-9.
- [15] Rea, S. (2001). CLK-1/Coq7p is a DMQ monooxygenase and a new member of the di-iron carboxylate protein family. *FEBS Lett* 509, 389-94.
- [16] Stenmark, P., Grunler, J., Mattsson, J., Sindelar, P.J., Nordlund, P. and Berthold, D.A. (2001). A new member of the family of di-iron carboxylate proteins. *Coq7 (clk-1)*, a membrane-bound hydroxylase involved in ubiquinone biosynthesis. *J Biol Chem* 276, 33297-300.
- [17] Takahashi, M. et al. (2001). Mouse *coq7/clk-1* orthologue rescued slowed rhythmic behavior and extended life span of *clk-1* longevity mutant in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun* 286, 534-40.
- [18] Nakai, D. et al. (2001). Mouse homologue of *coq7/clk-1*, longevity gene in *Caenorhabditis elegans*, is essential for coenzyme Q synthesis, maintenance of mitochondrial integrity, and neurogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 289, 463-71.
- [19] Levavasseur, F., Miyadera, H., Sirois, J., Tremblay, M.L., Kita, K., Shoubridge, E. and Hekimi, S. (2001). Ubiquinone is necessary for mouse embryonic development but is not essential for mitochondrial respiration. *J Biol Chem* 276, 46160-4.
- [20] Davenport, R.J. (2001). Clocked Out: Mice missing *clk-1* die young (Mitochondrial respiration). *Science's SAGE KE* 2001, 38.
- [21] Takahashi, M., Shimizu, T., Moriizumi, E. and Shirasawa, T. (2008). *Clk-1* deficiency induces apoptosis associated with mitochondrial dysfunction in mouse embryos. *Mech Ageing Dev* 129, 291-8.
- [22] Reppert, S.M. and Weaver, D.R. (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418, 935-41.
- [23] Anson, R.M. and Hansford, R.G. (2004). Mitochondrial influence on aging rate in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 3, 29-34.
- [24] Cutler, R.G. (1982). Longevity is determined by specific genes: testing the hypothesis. *Testing the theories of aging*, 25-114.
- [25] Zhang, G.Q. and Zhang, W. (2009). Heart rate, lifespan, and mortality risk. *Ageing Res Rev* 8, 52-60.
- [26] Larsen, P.L. and Clarke, C.F. (2002). Extension of life-span in *Caenorhabditis elegans* by a diet lacking coenzyme Q. *Science* 295, 120-3.
- [27] Williams, G.C. (1957). Pleiotrophy, Natural Selection and the Evolution of Senescence. *Evolution* 11, 398-411.
- [28] Kirkwood, T.B. (2002). Evolution of ageing. *Mech Ageing Dev* 123, 737-45.
- [29] Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11, 298-300.
- [30] Ambrosio, G. et al. (1993). Evidence that mitochondrial respiration is a source of potentially toxic oxygen free radicals in intact rabbit hearts subjected to ischemia and reflow. *J Biol Chem* 268, 18532-41.
- [31] Kudin, A.P., Bimpong-Buta, N.Y., Vielhaber, S., Elger, C.E. and Kunz, W.S. (2004). Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *J Biol Chem* 279, 4127-35.
- [32] Giulivi, C., Boveris, A. and Cadenas, E. (1995). Hydroxyl radical generation during mitochondrial electron transfer and the formation of 8-hydroxydesoxyguanosine in mitochondrial DNA. *Arch Biochem Biophys* 316, 909-16.
- [33] Guduz, T.I., Tserng, K.Y. and Hoppel, C.L. (1997). Direct inhibition of mitochondrial respi-

- ratory chain complex III by cell-permeable ceramide. *J Biol Chem* 272, 24154-8.
- [34] Cristina, D., Cary, M., Lunceford, A., Clarke, C. and Kenyon, C. (2009). A regulated response to impaired respiration slows behavioral rates and increases lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* 5, e1000450.
- [35] Jonassen, T., Marbois, B.N., Faull, K.F., Clarke, C.F. and Larsen, P.L. (2002). Development and fertility in *Caenorhabditis elegans* *clk-1* mutants depend upon transport of dietary coenzyme Q8 to mitochondria. *J Biol Chem* 277, 45020-7.
- [36] Kayser, E.B., Sedensky, M.M., Morgan, P.G. and Hoppel, C.L. (2004). Mitochondrial oxidative phosphorylation is defective in the long-lived mutant *clk-1*. *J Biol Chem* 279, 54479-86.
- [37] Butow, R.A. and Avadhani, N.G. (2004). Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Mol Cell* 14, 1-15.
- [38] Drew, B., Phaneuf, S., Dirks, A., Selman, C., Gredilla, R., Lezza, A., Barja, G. and Leeuwenburgh, C. (2003). Effects of aging and caloric restriction on mitochondrial energy production in gastrocnemius muscle and heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284, R474-80.
- [39] Nisoli, E. et al. (2005). Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science* 310, 314-7.
- [40] Lopez-Lluch, G. et al. (2006). Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1768-73.
- [41] Stepanyan, Z., Hughes, B., Cliche, D.O., Camp, D. and Hekimi, S. (2006). Genetic and molecular characterization of CLK-1/mCLK1, a conserved determinant of the rate of aging. *Exp Gerontol*
- [42] Nakai, D., Shimizu, T., Nojiri, H., Uchiyama, S., Koike, H., Takahashi, M., Hirokawa, K. and Shirasawa, T. (2004). *coq7/clk-1* regulates mitochondrial respiration and the generation of reactive oxygen species via coenzyme Q. *Aging Cell* 3, 273-81.
- [43] Liu, X., Jiang, N., Hughes, B., Bigras, E., Shoubridge, E. and Hekimi, S. (2005). Evolutionary conservation of the *clk-1*-dependent mechanism of longevity: loss of *mclk1* increases cellular fitness and lifespan in mice. *Genes Dev* 19, 2424-34.
- [44] Lapointe, J. and Hekimi, S. (2008). Early mitochondrial dysfunction in long-lived *Mclk1*^{+/-} mice. *J Biol Chem* 283, 26217-27.

“ Functions of the gerontogene *clk-1* in mammals ”

Mayumi Takahashi and Takuji Shirasawa*
Aging Regulation Section

Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

*Department of Aging Control Medicine, Juntendo University Graduate School of Medicine

The *clk-1* gene has been initially identified as a responsible gene for a long-lived mutant of nematode *C. elegans*. Loss of function in the mutated *clk-1* gene causes delays in development and behavioral ultradian rhythm, and extended lifespan in the mutant nematode. Gene product of *clk-1* is a synthetic enzyme of ubiquinone/coenzyme Q (CoQ) that is an electron transporter in mitochondrial respiratory chain. Since CoQ drives the ATP synthesis and serves as the major source of the reactive oxygen species at the same time, it is thought to be involved in regulation of senescence. We show here the induction of mitochondrial-mediated apoptosis and delay in ultradian rhythm in *clk-1*-deficient mice we established. Involvement of the *clk-1* gene in regulation of mammalian senescence will be discussed.

Keywords: *clk-1*, coenzyme Q, mitochondria, apoptosis, ultradian rhythm

【トピックス】

老化と再生—老化マウスからiPS細胞の樹立

磯部 健一、Zhao Cheng、伊藤佐知子、西尾 直美
名古屋大学医学部 免疫学

生物は発生から老化まで不可逆的に進行するのは当たり前のことと思われてきました。ところが、最近の発生工学の驚くべき進歩でこれらの常識が覆ろうとしています。すでにドーリーの誕生からこのことがスタートしています。その後、クローンマウス、クローン牛と多くの種で、既に分化が進んだ体細胞も人為的にリセット可能であることが証明されました。これらの技術は人に応用されることがクローン人間の誕生ということで倫理的に禁止されました。すでにマウスではES細胞から遺伝子改変マウスが盛んに作成され生物学医学研究になくはない実験手段になっています。そこで、ES細胞を人為的に望んだ細胞、組織に分化させ、再生医療に利用しようとする研究が多くおこなわれるようになりました。ところが、これも大きな倫理的問題に直面しました。すなわち、受精卵がないとES細胞は作成できないのです。また、他人のES細胞は移植には免疫抑制剤を使わざるを得ないという医学的問題もあります。そのような時期にiPS細胞が体細胞から得られるという発見は大きな衝撃を与えました。とりわけOct3/4, Sox2, Klf4 およびc-Mycといった4転写因子の遺伝子移入のみで多能性幹細胞が得られるという発見は発生学、分子生物学の常識に挑戦する事実を提供しました。発生学では細胞の周りの環境、細胞間相互作用が次々におこり、組織ができあがっていく、それに伴い特定の遺伝子が発現する。ところが、ある特定の転写因子は順序だった発生、分化を飛び越えてしまう。そればかりか発生を逆戻りさせてしまうのです。現実の環境中では細胞は細胞膜で囲まれていて、レセプターを介してシグナルが転写因子に伝わり、遺伝子が発現し、できた蛋白が、また、他のレセプター、シグナル伝達分子に影響を与えるといった分子間相互作用や、細胞間相互作用で発生が進み、細胞の機能が発現されます。これまで、老化研究では、遺伝子と環境要因が老化を誘導すること、その遺伝子の探索と環境要因の探索が行われてきました。多くの研究者は“老化を促進したり抑制する遺伝子として、Sir2, Daf-2, TOR等様々な背景遺伝子があり、その欠損株は寿命に影響を与える。様々な環境ストレスによる活性酸素あるいは細胞内で発生する活性酸素が細胞内の蛋白、遺伝子、脂質を障害し、その蓄積が細胞老化、組織老化、個体老化につながる。”というように理解していると思われます。すると、老化個体の細胞は多くの傷を持っていることになります。果たして老化個体からiPS細胞が作成可能でしょうか？また、もし、作製できたらそのiPS細胞は正常な組織細胞に分

化可能でしょうか？老化マウスから作成したiPSは分化させるとすぐに老化細胞になるのでしょうか？私たちはこれらの疑問に答えるために老化マウスからiPS細胞を樹立する実験に着手しました。今回はES細胞から骨格筋、軟骨、骨細胞への分化の研究、iPS細胞から胸腺上皮細胞への分化の研究、そして最後に老化マウスからiPS細胞の作成とその分化の研究を紹介します。

1) ES細胞から骨格筋、軟骨、骨への分化—高齢者の歩行機能障害の克服をめざして

私たちはLacZ陽性 ES細胞を2次元培養で中胚葉系細胞に分化させ、それを機能障害を作成したマウスに移植することにしました。

まず、ES細胞をコラーゲン上で10% Fetal Caif Serum (FCS)存在下に5日間培養しました。そして、細胞を抗体で染色し、セルソーターで中胚葉系細胞を分別し、あらかじめ挫減させたヌードマウスの筋肉内に注射しました。4週後注射部位の筋肉組織から組織標本をつくり、LacZ陽性細胞を検索しました。すると、LacZ陽性細胞が組織にみられました。他のマーカー染色から筋サテライト細胞であることが判明しました(1)。これは骨格筋の幹細胞ですから自立的増殖が可能です(図1)。

次に、FCSを除いた状態で bone morphogenetic protein 4 (BMP-4)を添加し、TypeIVコラーゲン上で培養しました。これも同様に、中胚葉組織をセルソーターで分離し、ヌードマウスの挫減させた骨格筋に注射しました。するとなんと今度は軟骨細胞が増殖してきました。ところが、骨髄内に注射すると、骨芽細胞が増殖してきました(図2)。

私たちはさらにシャーレ内で、骨格筋、軟骨、骨細胞まで分化させることに成功しました(2)。将来、臨床で

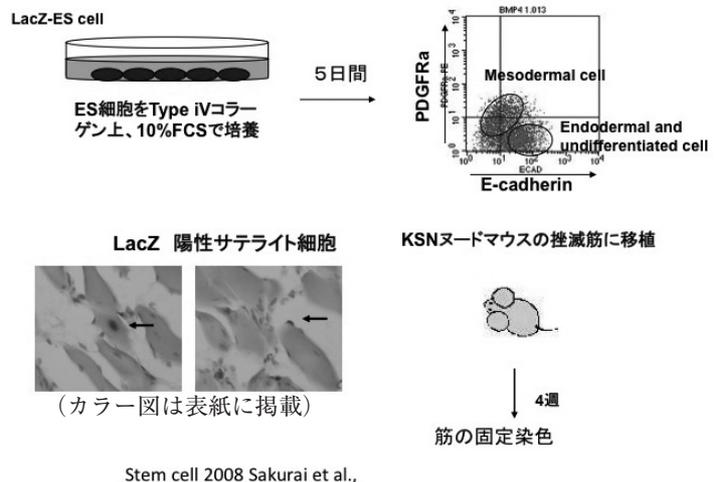


図1 ES細胞から筋肉の分化

Stem cell 2008 Sakurai et al.,

使用できるように血清なしの培養にしました。

2) iPS細胞から胸腺上皮細胞への分化

老化すると、人を含めほ乳類は免疫機能が低下してきます。免疫機能の低下は主にT細胞機能の低下です。特にT細胞の発生の場である胸腺上皮細胞の活性酸素による機能低下によることが判明しています(3, 4)。私たちはiPS細胞を胸腺上皮細胞に分化させることを計画しました。無血清培地での分化を試み、かなり難しい実験でしたが、培養内に加える因子を変化させることでFoxN1陽性の胸腺上皮様細胞への分化に成功しました(図3)。しかし生体内に移植してT細胞が発生することはまだ確かめていません(5)。

3) 老化マウスからのiPS細胞の樹立

山中らがiPS細胞を樹立してから世界中でこの分野の研究が始まり、次々に新しい発見が報道されています(6, 7)。私たちは老化マウスからiPSを作成することを試みました。マウスでは通常胎児繊維芽細胞からiPS細胞がつくられます。もちろん、生体からも、人体の各組織からもiPS作成の報告が相次いでいます。私たちは、C57BL/6マウス繊維芽細胞からiPS細胞作成までは順調に進みました。ところが老化マウスの繊維芽細胞からiPSを作成しようと試みましたがなかなかうまくいきません。通常iPS細胞作成は4因子を遺伝子移入してから2週間以上かかります。それまで細胞が生存することが必要です。私たちは老化マウスの骨髄をGranulocyte Macrophage colony-stimulating Factor (GM-CSF)で培養し、細胞が勢いよく増殖しているのを確認して、4因子を遺伝子移入しました。すると、通常の数倍の1ヶ月ごろに数個のコロニーが現れました。私たちはそれから2クローンを樹立し、Nanog, Oct-4の遺伝子発現を確かめました(図4)。

この細胞をC57BL/6の背中に注射すると、1ヶ月後に腫瘍が現れ、H&E染色と、免疫染色で3胚葉に分化していることがわかりました。現在作成したiPS細胞をマクロファージ、血管内皮細胞、心筋細胞、神経細胞に分化させる研究が進んでいます。もちろん、キメラマウス作成でiPS細胞が組み込まれた子が誕生すること、100%近いキメラを作成できたならそのマウスがどれだけ生存できるかが最も重要な研究です。

謝辞

桜井英俊、稲見裕太等の実験データを使用しました。文献に名前をあげます。この研究は文科省科学研究費、GCOEの一部の研究費を使用しました。

文献

- 1) Sakurai H, Okawa Y, Inami Y, Nishio N, Isobe K. Paraxial mesodermal progenitors derived from mouse embryonic stem cells contribute to mus-

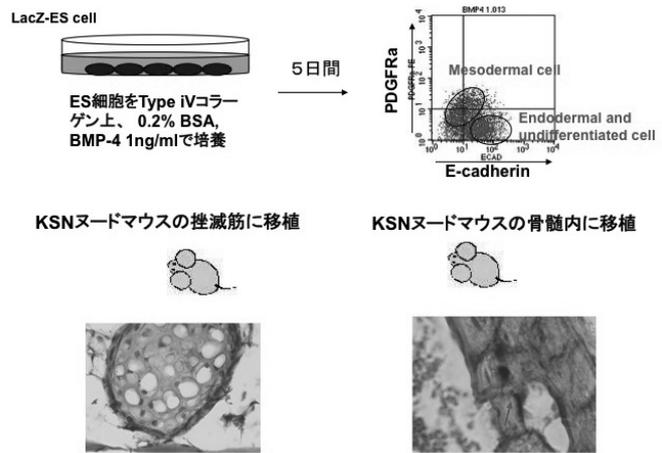


図2 ES細胞から軟骨、骨への分化

T細胞の老化はその発生の場である胸腺上皮細胞の老化による。

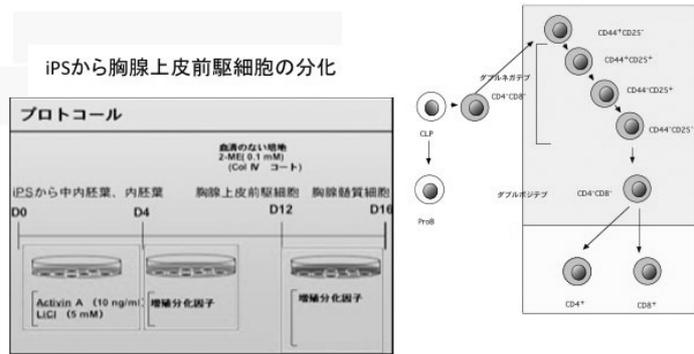


図3 無血清培地による胸腺上皮細胞への分化

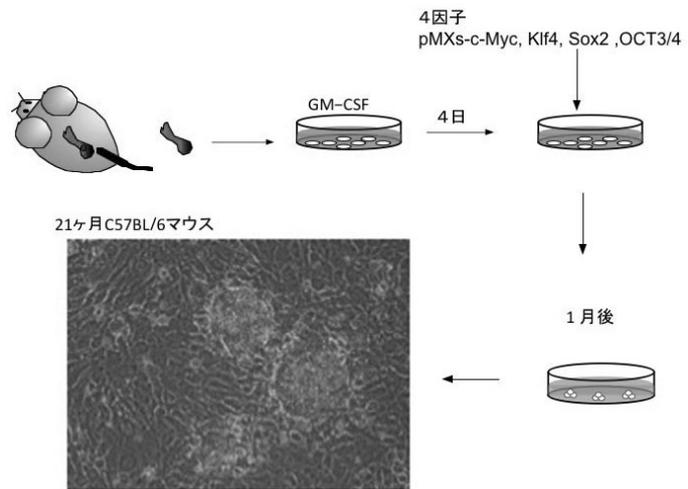


図4

cle regeneration via differentiation into muscle satellite cells. Stem Cells. 2008 Jul;26(7):1865-73.

- 2) Sakurai H, Inami Y, Tamamura Y, Yoshikai T, Sehara-Fujisawa A, Isobe K. Bidirectional induction toward paraxial mesodermal derivatives from mouse ES cells in chemically

- defined medium.
Stem Cell Res. 2009 Sep-Nov;3(2-3):157-69.
- 3) 磯部健一；免疫系の加齢変化；新老年学 2010年
 - 4) Uddin MN, Nishio N, Ito S, Suzuki H, Isobe K. Toxic effects of D-galactose on thymus and spleen that resemble aging. J Immunotoxicol. 2010 Jul-Sep;7(3):165-73.
 - 5) Inami Y, Yoshikai T, Ito S, Nishio N, Suzuki H, Sakurai H, Isobe KI. Differentiation of induced pluripotent stem cells to thymic epithelial cells by phenotype. Immunol Cell Biol. 2010 in press
 - 6) Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell. 2006 Aug 25;126(4):663-76.
 - 7) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell. 2007 Nov 30;131(5):861-72.

【学会報告】

“2010 Spring Conference of the Korean Society for Gerontology and 10th Korea-Japan Gerontologist Joint Meeting”に参加して

遠藤 昌吾

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

本集会は2010年6月30日から7月2日の3日間にわたって、韓国大田（テジョン、DaeJeon）広域市にあるKRIBB(Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology)において行われた。

大田広域市は韓国の中央部に位置し、人口約150万人の韓国第5位の都市である。1973年に研究学園団地として指定された大徳研究団地には韓国科学技術院（KAIST, Korea Advanced Institute of Science and Technology）などの国立研究所やサムソン、LGなどの民間研究所が多数ある。私は見る機会がなかったが、韓国初のノーベル賞受賞者の銅像を設置するために“台座”のみが既に用意されているという。韓国の人々が科学に寄せる大きな期待を感じる。日本における筑波学園都市構想と類似の都市構想であるが、異なるのは、大田市には韓国の首都機能の一部（政府の11の機関）が移転されている事であろうか。1993年には科学EXPOが大田市において開催され、2004年には日本の新幹線にあたるKTX(Korea Train eXpress)が開通した。筆者は、大田ーソウル間の1時間弱、KTXの300km/h走行を期待してデジタルの速度計を見ていた。最高速度は304km/h、300km/hを越えていた時間は3分40秒間であった。

韓国の老化学会集会は春と秋に年2回開かれ、今回、春の集会に合わせて日韓老化研究者ジョイント集会が開かれた。このジョイント集会は日本と韓国で交互に開かれており、次回は2011年の日本基礎老化学会の折に開かれる予定である。

今回の集会参加者は150人ほど、小さいが活気にあふれる集会だった。本年6月中旬に開催された日本基礎老化学会と比較すると、韓国の集会参加者の平均年齢はは

るかに低く、韓国の老化研究者の若い層の厚さを感じた。30題ほどのポスターから優秀ポスターが3題選ばれ、若い研究者たちが賞状と金一封をはにかみながら受け取っていた。集会の口頭発表は日韓ジョイント集会があてられた。日本からは、東海大学の石井直明団長のもと、講演者として（発表順、以下敬称略）、石井孝昌（東海大学）、森望（長崎大学）、下川功（長崎大学）、遠藤昌吾（都老人研）、田中雅嗣（都老人研）、小松利光（長崎大学）、川上恭司郎（順天堂大学）、丸山光生（国立長寿研）、森秀一（都老人研）が、そして、ポスター発表で宮沢正樹（東海大学）が参加した。

日本基礎老化学会がそうであるように、研究発表は多岐にわたり、モデルも線虫からヒトまで、研究内容は酸化ストレス、栄養、カロリー制限、認知機能など多様であった。韓国の若い研究者の英語そして質問への対応は口頭、ポスター発表とも見事であり、よく訓練されていた。口頭発表では留学帰りの研究者たちが多い事もこのことに寄与していたと思う。

今回は、ジョイント集会が10回目を迎える節目にあたり、後藤佐多良先生（欠席）、Dr. Byung-Pal Yuに対して、永年の日韓老化研究交流への尽力を讃える表彰が行われた。後藤先生やDr. Yuをはじめとする研究者たちが築き上げた日韓交流という貴重な財産に心から感謝するとともに、この財産を着実に増やそうという気持ちを胸に、帰途についた。

世界の2大“超”老化大国、日本と韓国が協力し老化研究を先導していくことは、この分野の研究にとってきわめて重要である。来年日本でされるジョイント集会で韓国の研究者たちに会い、議論するのが楽しみである。

【学会報告】

10th Korea-Japan Gerontologist Joint Meetingに参加して

森 秀一

東京都健康長寿医療センター研究所・老年病研究チーム・運動器医学

Korea-Japan Gerontologist Joint Meetingが2010 Spring Conference of the Korean Society for Gerontologyに連動して、2010年7月1日に韓国の大邱市のKRIBB（韓国生命工学研究院）において開催された。2001年から日本と韓国で交互に開催されている学会も、今年で10回目の節目を迎えるとのことである。今回、私は幸運にもその節目の本学会に参加し発表する機会を頂いた。私は日本側からの参加者10数名の中でもかなりの若手であり、多くの先輩研究者を前にして恐縮ではあるが、本稿では学会の様子を簡単に紹介する。

学会が開催されたDaejeonは、Seoulから韓国版新幹線であるKTX（Korean Train Express）に乗って約2時間の場所にある。93年に科学国際博覧会が開催されており、今回学会が開催されたKRIBBの他にもKAIST（韓国科学技術院）やETRI（韓国電子通信研究院）など政府・民間の研究所が100以上も集中しており、韓国の科学技術都市として知られている。私が数年前まで生活していた茨城・つくば市も似たような性格を持つ都市であるが、Daejeonは韓国でも5番目の大都市とのことであり、規模の上では格上であると感じた。

学会はKRIBBにある一つのホールで行われたが、会場内には大学院生と思われる若い方たちが多く参加していたのが印象に残った。1日のみの学会であったが、朝9時から夕方6時まで5つのセッション（I：Cellular response to oxidative stress, II：Aging research using transgenic animals, III：Nutritional and metabolic aging, IV：Caloric (or dietary) restriction and life span, V：Cell, tissue and body aging）に21の口頭発表が生まれ、さらに昼食の後には26編のポスター発表が入っており非常に濃密なものであった。韓国の現在の高齢化率は約1割程度であり、2割を超える日本と比較すると低い値ではあるが、約40年後には3割を超えると予想されており日本に匹敵する高齢化社会を迎えると考えられている。また、年長者を敬う儒教の思想も広く根付いているため、韓国社会にとって老年学・老化学というのは非常に関心の高い研究分野になりつつあるのかもしれない。口頭発表の持ち時間は20分

であったが、前述した関心の高さからか発表後の質疑応答が活発に行われたために時間超過することも度々あった。しかし、最終的にはほぼ予定時刻通りに学会が終了するところはchairpersonのファインプレーであろう。

私はセッションVのCell, tissue and body agingで発表した。最後から2番目の発表であり、海外での口頭発表が初めてという自分にとっては待たされる緊張はあまり良いものではなかった。私たちの研究チームでは老化による筋萎縮（サルコペニア）を対象として研究を進めている。私の発表は、サルコペニアは体内環境の変化、筋や運動神経自身の変化だけで生じるのではなく、神経筋シナプスを介した維持システムの変化によっても誘導されるという新たな概念を提唱するものであった。自身の英語能力の貧弱さもあり、可能な限りシンプルなスライドと説明を心掛けたつもりだったが、参加者にどの程度内容を理解してもらえるか不安があった。しかし、発表後の質疑応答だけでなく、学会終了後に別会場で行われた懇親会においても参加者の方から発表内容に関しての質問・感想を頂くことができ、非常にうれしく感じた。また、韓国側のByung Pal Yu先生が私を含め全ての発表者に対して的確な質問やアドバイスを送っていたのも印象的であった。私が発表した神経筋シナプスは他の内容と比較してやや応用的な面もあり異質な感じもしたが、最近になって、加齢による神経筋シナプスの形態変化に酸化ストレスやカロリー制限が大いに関わっていることが報告されてきている。これらの詳細なメカニズムは未だ不明であり、今後も学会で他領域の知見を取り入れていく必要があることを実感した。

わずか1日のみの学会であったが、振り返るとかなり充実した内容であり、私にとって大変貴重な経験となった。日本と韓国の老化研究を発展させるためだけでなく、自身の英語でのプレゼン能力を鍛えるためにもこのような交流は必要であり、積極的に参加していくべきであると感じた。やはり「習うより、慣れる！」ということかもしれない。最後に、今回の学会でこのような機会を設けて頂いた先生方に心から感謝の意を表したい。

【随 筆】

老化研究事始め－化学物質で寿命延長の時代なのか？

三井 洋司

徳島文理大学 香川薬学部

はじめに

科学的なエビデンスをもって、人間の健康寿命を延長しようとする試みが、米国で、NIA主導によるCALERIE（発音はCalorie と同一）研究として、実践されている様子を報告してきました。前回には、同様なプロジェクトの立ち上げについて、科学的には日本人を対象に行う必要性を指摘するとともに、日本での人材養成や研究体制で改善すべき問題点も、浮き彫りにしました。しかし、これは本当に全国民レベルで現実的に実施出来て、有益な結果を生むのでしょうか？ そこで今回は、カロリー制限食にネガティブな面が有るのだろうか、あるとしたら、その代替法は何だろうか。考えてみましょう。

第28話 良い事尽くめかーカロリー制限食

米国でのCALERIEプロジェクトに、有償ボランティアとして参加しているのはどんな人でしょうか。政府はそもそも何を期待しているのでしょうか？

米国で大変困っているのは、異常に肥満になった人が急速に増加して、医療費が膨大化している事です。米国人に聞くと、裕福な人が飽食で肥満になるのかと言えば、決してそうではないようです。米国では生き延びる為の食べ物だけは不自由しないと言うのです。其れが反ってあだになるのか、偏食でカロリー過剰の人が低所得層にも大勢、増加するのです。今度の有償ボランティアも、やはり健康的にやせたいと言う動機が多いのは、否めません。Calerie研究では、現状のBMI値がいくつであろうと一律に25%のカロリー減少を進めています。しかし、BMI値28の米国人がカロリー制限した結果をBMI値22の日本人にも適用出来るとのエビデンスを出せるのでしょうか。肥満対策への広報データが取れば、米政府の対応としては成功でしょうが。スマートな(?)我々はどう判断しましょう。

また、米国の大学病院での実施をつぶさに見て分かりますが、カロリー制限食を継続して確実に実行するのは、病院側と患者側の双方に大変な負担がかかることを実感しました。当人、家族につらい状況になるような食習慣の改善は、容易な事では有りません。果たしてそれを全国的に広く普及させるのは、現実的に可能なのでしょうか？ 何世代にもわたる長期の食育運動を必要とするでしょう。明らかに有害と分かっている喫煙や深酒でさえやめられない人が多い中、食べ物への執着は断ちがたいものがあるようです。

其れにもまして気になるのはカロリー制限による健康への二次効果です。成人病や癌への罹患率は統計的には

減少すると予想されますが、米国カロリー制限協会でも慎重対応しているように、免疫能、生殖能、筋力、骨量などが減少する恐れがあります。遅く生きるという訳にはいかないのでしょうか。しかもマウス実験からの試算では、65才以上の人がその後カロリー制限を一生継続けたとしても、平均寿命の伸びは2年にも満たないと言われます。苦勞の割には報われないと、やる気をそがれます。

それでは、普通の食事を続けながら、ビタミン剤を毎日摂るような安易さで、化学物質を摂取して、カロリー制限と同じ寿命延長効果が得られるとしたらどうでしょう。そんな期待が高まっています。

29話 サーチュイン活性化のうそ、ほんと

カロリー制限がどのような機序で寿命延長を起こすかについて、最終結論にいたっていないようですが、sirtuin遺伝子に注目が集まっています。

酵母や線虫において、寿命の延長に関わる遺伝子としてSIR2（哺乳類でのホモログは、SIRT1）が同定されました。これはNAD依存性の脱アセチル化酵素ですから、ヒストンの場合はリジン残基からアセチル基が外されれば、当該部位遺伝子の転写活性が変更します。しかもカロリー制限食によって、このSIRT1が活性化される事がわかってきたのです。そのため、SIRT1たんぱく酵素の活性化を指標に、寿命延長物質を探索する気になったのも、自然のなりゆきでした。その結果、赤ワイン等にふくまれるレスベラトロールも、酵母の寿命延長とSIRT1 活性化の両方を引き起こす事が報告されて、科学界だけでなく、世間をも大いに沸かせました。哺乳類ではマウスでの寿命延長効果が報告され、レスベラトロールの抗酸化作用も、強く注目されました。

私が米国でのCALERIE実施プログラムを調査している最中も、病院内の研究スタッフが「レスベラトロールを摂取すれば良いのよね」と、盛り上がっていました。こうした流れは加速されて、in vitroでSIRT1 の活性化を指標に多くの低分子化学物質がスクリーニングされたのです。サーチュインの著名な科学者である Howitz と Sinclair が、ベンチャー企業Sirtrisを設立しました。成人疾病の予防やアンチエイジングを期待出来る化学物質を発見できると謳って、その株価はウナギ登りでした。そして700億円の巨額で大手製薬会社、グラクソに売り渡され、臨床試験も進められているところです。

しかし今年3月末、くすぶり続けていた疑念が、Nature誌からついに公表されました。多くの世間の人は、数日早い「エイプリルフール」と思ったほどでしょう。そ

もそも、SIRT1の活性を測定する系にミスがあり、特異性が欠けている為、レスバトロールには、SIRT1を活性化する働きは、実際には無かったということです。しかも、マウス個体での寿命延長効果もアーティファクトの結果であって、レスバトロールで寿命は延長しないと言う結論です。

最も基盤となるデータ、アッセイ系に間違いがあった今、其の評価に基づいて合成されたいろいろな低分子化合物に、寿命延長効果は偶然でしか期待出来ません。ですからスッキリ仕切り直しとはなりますが、アッセイ系の再確立と、SIRT1以外のターゲットをもとに、カロリー制限食に代わる低分子化合物の探索は、今後も続けられる事でしょう。

ところで、カロリー制限食での新しい視点を紹介します。寿命延長と生殖力がトレードオフになっているのは、本当にどうにも成らないのでしょうか？

ショウジョウバエも餌のタンパク量を減らせば寿命延長と子の生産力低下が起きますが、そこに必須アミノ酸すべてを追加すれば、子の生産力は増加しますが、一方寿命が短縮します。ところが、必須アミノ酸のうちメチオニンについては、それを単独で添加すると、寿命を短縮せず、しかも子の生産量をあげることが出来ると言うのです。人間でも何かのアミノ酸を適切なバランスで摂取すれば、生殖能力を下げずに寿命を延長できるのでしょうか。検討が待たれます。これも、低分子化合物による寿命制御の一例になります。

一方、米国、NIAは、寿命介入実験プログラムを始めました。寿命延長効果を期待出来るいろいろな化合物について、臨床試験に移る前に、マウスを使って真剣な検討が始まっていますので、紹介しましょう。

第30話 本格的な寿命介入テストに、交雑マウスを！

実験動物を使って得られた再現性に優れた結果でも、人間に適用出来ない事は、しばしば経験する事です。どうしてでしょう。実は、実験結果の正確度を高める（データのばらつきをなくす）為、マウスでは特定の純系を使いますが、それが落とし穴になります。系統のちがいで異なった結果を生むことがかなり有るのです。特に寿命のようにマルチファクターが影響する場合は、それが顕著です。例えば、特定の腫瘍の発生を抑える物質は、結果として平均寿命を延長します。しかし、マウスに発症する悪性腫瘍の種類と頻度、時期は、系統によって大いに違いますから、系統間で異なる結論になります。もちろん癌だけでなく、血圧、脂質代謝、血管系、神経内分泌系、免疫系などの系統間の違いは、化学物質の効果に大きく影響します。これでは、一つの純系マウスでの結果から、人の臨床試験に進む訳には行きません。

今迄にも、マウスの寿命を延ばすと報告された化合物は少なくありませんが、問題視されたのは、そうした背景にもよるのです。これを回避するにはどうしたら良いのでしょうか。異なった純系同士を掛け合わせてその交雑系F1を実験に使うことです。今回はさらに、そのCB6F1と、全く別系統同士から作ったC3D2F1との間で

生まれるF1群を、実験に供しているのです。言わば大きく異なる4つの民族の血を引く兄弟群をモデルにしたようなものです。遺伝子組成は多様性に富み、一匹として同じものは無いでしょう。プログラムの特徴はこれだけでは有りません。NIAに実験の詳細な提案を行う研究者はsponsorと呼ばれ、実験を行うのは別の機関です。しかもすべて、ジャクソン研究所、ミシガン大学、テキサス大学の3施設が責任もって、同一プロトコルで実施されるのです。実験ミスが生じた機関のデータは排除し、全データをプールして、sponsorとの共同研究として発表します。解析項目も寿命だけでなく、寿命後期の免疫機能、自発運動、眼レンズ混濁を見るよう義務付けています。

ところで、NIAは、寿命に影響する低分子化合物として、実証を想定している物があります。それは、医薬品、栄養因子、食物、ダイエットサプリメント、植物エキス、酸化還元剤、キレート剤、ホルモン、アミノ酸、ペプチドなどです。こうしたリスト中で、寿命延長に効果のありそうな物質について、実証プロトコルの提案を、求めているわけです。それもなるべく容易な摂取法が望まれています。

これ迄に提案は有ったのでしょうか？ 食べ物に混ぜる方法で、既に16種類の化合物が実証研究中です。添加量や投与時期を変えた試験も別に8例有ります。

この中で、既に、寿命延長に有効との結論が出た化合物が有ります。それは、抗炎症作用、抗血栓作用、(そして抗酸化作用)を持つアスピリンです。もう一つ、抗炎症作用や抗酸化作用を持つポリフェノールのNDGF(マソプロコルともいう)も、雄マウスの平均寿命を伸ばします。雌マウスでは代謝が雄と異なり、有効濃度に達しないことが無効の原因と考察しています(人間ではそれらの代謝に男女差が無いそうです)。また、マウスの最大寿命は延長しないようだと分析しています。

別シリーズの実験からは、臨床では、移植時の免疫抑制剤としても使われるラパマイシンが大変注目されています。TOR経路の阻害によって、線虫、酵母等の寿命を延長出来ますが、mTORシグナルを抑制する事でも知られているラパマイシンがマウスの寿命を延長するのかが、試されたのです。ラパマイシンを餌に混ぜて投与すると、雄、雌のマウスにおいて、平均寿命、最大寿命共に延長すると結論づけられました。しかも、寿命後期に投与を始めても、その効果は明らかだということです。老化の機構を制御することとがん発症を抑えることが作用機構だろうと分析しています。進行中の別の研究では、寿命を延ばすラパマイシンの最適濃度を決めようとしています。

こうした信頼性の高い実験系ですから、検討結果を早く知りたいところです。臨床治験に応募するボランティアが、殺到するかも知れませんね。

化学物質による最大寿命の延長が、現実的になりそうなののでしょうか。

おわりに

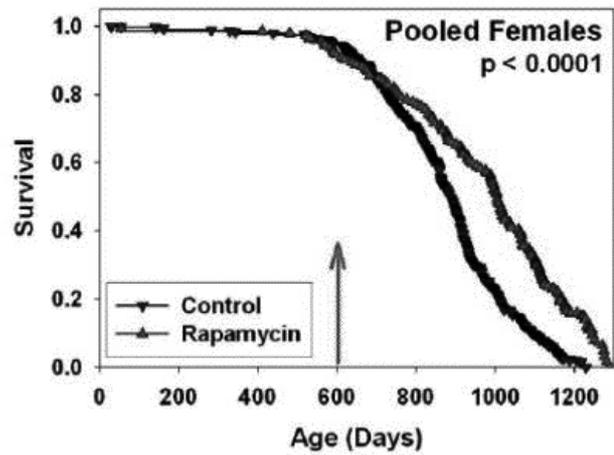
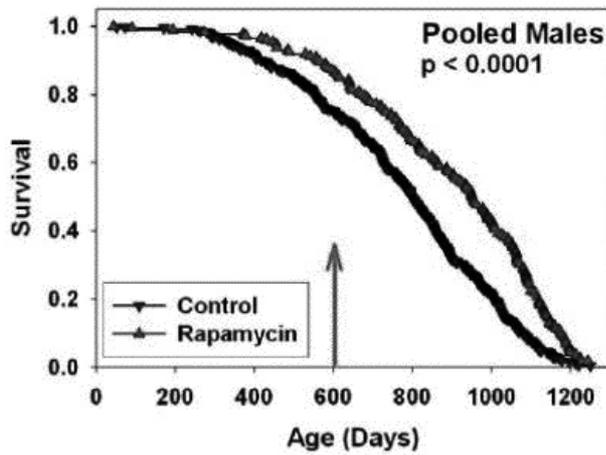
さて、この30話をもって一通りのストーリーを話し終えました。老化研究の事始めとしてははじめになります。実は老化に関する私の最初の論文は Pro N.A.S vol73, 3584-3588, 1976に発表した The relationship between in vitro cellular aging and in vivo human aging です。

35年前からの宿題を意識して、細胞老化を基盤とし、老化の諸説も踏まえながら、改めて、個体全体の老化、寿命をとらえ直して見たいと思います。

次回は **老化研究事起こし** で **高齢者に老化細胞は実際に有るのか!**

お楽しみに。

ラパマイシンによるマウスの生残率への効果



Nature. 2009 July 16; 460(7253): 392- 395.

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4号

平成22年（2010）11月4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