

【対談5】

老化の細胞モデル；その挑戦と限界を探る

三井 洋司、森 望、磯部 健一



はじめに

今回は、老化の生物モデルで霊長類の活用まで議論しました。

そして気になる疑問も出ました。動物の進化につれて、分裂細胞群の分裂寿命と最終分化細胞群の老化・死の両方、しかも再生系の幹細胞も包含するようになった我々人間の老化です。

多くの生化学的知見は、全部の平均値がでます。その意義は、限定されます。それぞれを区別した細胞モデルと解析が必要ではないでしょうか？ 各々の細胞モデルを要素と捉えて、それらを統合した際に、個体全体の老化が、見えてくるのか 興味深いですね。

まず、非分裂細胞の老化については、経日老化とか代謝老化と言われます。そのモデルに、分裂酵母を増殖の confluent 状態において、解析する方法も有りますが、何か違う気がします。

そこで、進化の視点も持って、マウスの神経細胞を培養系で長期に維持して、老化研究に挑戦している長崎大学の森 望先生に、お尋ねしてスタートしましょう。

三井-1.1

非分裂細胞の老化研究としていろんなモデルがあり得る中で、森先生は、マウスの神経細胞を長期培養して、その生体分子の経日変化を解析していますが、人間の細胞に比べて 再現性が高い材料は得られますね。マウス神経細胞のメリット、デメリットを教えてください。

森-1

マウスの利便性はすでに実験動物モデルとして確立されていて、いつでも必要な時に必要な数の動物が入手できることでしょう。妊娠マウスも日付を特定して、妊娠何日目、すなわち E16、E18、E20 など、特定時の動物の入手が可能で、これが最大のメリットかと思えます。私たちの研究室では基本的に隔週の水曜日を培養日として、基本的には E18 胎児の海馬神経の初代培養を実施しています。ただし、現在はラットが主体となっています。使用している培地の組成の関係がどうか、まだ不明の点もありますが、マウスよりもラットの神経細胞のほうが、現在の条

件では元気に育ちます。あえていえば、こちらへんがデメリットかもしれません。

-1.2

典型的な非分裂細胞として、心筋細胞、骨格筋細胞もあげられますが、どちらも、生体から単一細胞に分離する際、致命的な傷害を受けるので、問題が生じます。お使いの神経細胞では、樹状突起などの修復が完了した時を 老化・変化のスタートラインと出来るのですね？

森-2

神経細胞の場合も「成体」からの神経培養は技術的に無理があります。ニューロンの培養は、技術的に「胎児」の脳か「新生児」の脳からしかできません。老化の研究をしていると、本当は若齢動物と老齢動物の脳からニューロンを培養して比較研究したい、と思うものですが、それができません。したがって、私たちはこのように初代培養神経を長期間培養することで、何か神経の老化の様相がみえないだろうか、そんなことを考えてみたわけです。そこで「胎児」の脳からの培養をしています。この場合は、神経はまだ「未熟」な状態ですので、突起は未発達です。まだ分裂をしている細胞もありますし、ニューロンやグリアの前駆細胞もたくさんあります。しかし、培養期間の経過にともない、それら未分化細胞はニューロンなりグリアに成熟して行って、インビトロなりの細胞ネットワークを形成することになります。そして、このネットワークはおよそ3週間から4週間ほどで完成します。シナプスが形成されるステージです。私たちはこのステージ、すなわち、培養を始めて1ヶ月の時点培養神経細胞の老化研究の「スタートライン」と考えています。

-1.3

基礎老化の学会発表では、一定期間毎に計画した細胞分離を行い、1年以上の極めて長期な培養を続けた結果、老化神経細胞の出現の様相を分子レベルで確認していますね。少し説明頂けますか？

森-3

培養1ヶ月で神経細胞は「成熟」状態になります。

2-3ヶ月はまだ十分活潑な成熟神経と考えられます。しかし、4-5ヶ月ころから多少「老化」の様相を示しはじめます。細胞の老化マーカーであるSAbGが増加し始めます。6-8ヶ月ころになりますとリポフスチンの発現もはっきりしてきます。神経突起をみると互いにふとい束をつくるような状況、私たちはこれを『バンドリング』とっていますが、神経変性疾患の組織像でみえるのと同じような「変性」様の形態がみえてきます。

- 1.4

神経細胞の老化を培養系で再現する考えは、老化の誘導原因をどう考えるかに関わります。分裂老化の場合は、60回前後の分裂を、培養系では短期間に誘導、再現できるので、培養系に大きなメリットがあります。神経細胞の老化では、遺伝子プログラムの発現なのか、代謝の時間的な進行なのか、細胞内外からの傷害因子なのかに応じて、それを加速したり、軽減したりできますね。どのように考えますか？

森-4

そこが非常に重要なポイントで、私たちもそのところを明らかにしたいと考えているのですが、まだ研究が完結したわけではありません。まだまだ悪銭苦闘している段階で、私たちはまだ明確な答えをもちあわせていません。その点を理解いただいた上で、現在、私たちが考えていることを少し述べてみたいと思います。

まず、神経細胞の老化はプログラムされているか？

それに関してはノーだと思います。若いステージで神経細胞が分裂できなくなる、つまり神経の最終分化と分裂終了が連動している。それは確かで、そこは完全にプログラムされています。しかし、その後、人間の場合は80年以上、マウスでも3年ほども同じ細胞として「維持」され続けます。その過程がすべてプログラム主導で動くとは考えにくいと思われます。

では、代謝の時間的進行が大きく影響するか？

それはそのとおりだと思います。非分裂ですから分裂細胞のようなりセットがおこらない、代謝物が残存しやすい、すなわち老廃物もたまる。今、神経の老化研究では多くの人が蛋白質の老廃物代謝の障害について調べています。いわゆるUPS系やオートファジー系で凝集蛋白を除去する、あるいはより早く蛋白質の変性の初期のコンフォメーション変化をとらえて処理する、その活性がいかに保たれるか、あるいは劣化していくのか、その研究が非常に熱をおびています。私たちの研究も今、そこに焦点があります。

また、細胞内外からの障害因子が影響するかどうか？ これも重要な点です。私たちのインビトロ培養系はニューロンだけの培養系ではありません。ニュー

ロンとグリアの混合培養系です。すべての神経細胞はグリアの細胞層の上につねに生着しています。どうも、グリアなしでは生きられないのです。私たちは、今、神経細胞はインビトロでおよそ1年生きることがわかっていますが、それはひょっとするとグリアの老化に依存している可能性があります。分裂性のグリアにはいわゆる「細胞寿命」がたぶんあるでしょう。そのグリアのシートがphase IIIになったとしたら、もう周辺の神経細胞をサポートすることができない、その結果として神経細胞の老化が規定されてしまう、その可能性はあります。私たちの研究もその点を明確にしなければならないと考えているところ です。

- 1.5

重要な指摘がありましたね。分裂終了性の神経細胞が、分裂性のグリア細胞無しには生きられないと云う事、そして分裂寿命に近くなったグリア細胞の老化を受けて、神経細胞の老性変化が顕われる可能性、これらは極めて注目すべき視点です。

実は、ヒト細胞の分裂老化が培養系でモデルとして成立するのに、老化の再現を極端に短期化できるのが最大のメリットです。in vivoでは分裂が断続的に起こり、細胞老化に何十年もの時間が掛かりますが、in vitroではフル回転の分裂、DNA複製を誘導できますから、その場合2ヶ月余で、老化細胞ができて来ます。私がヒト神経細胞の専門家の協力を受けて、培養系での神経細胞老化を再現しようとした40年前、この期間短縮が不可能と思い知って、諦めた経緯があります。

混合培養系では、グリアが短期間に分裂老化して、神経細胞の老性変化も短縮化できるとすれば、大いに納得です。マウスでもin vivoの3年を待たずに、短期間で神経細胞の老化を誘導できるわけです。炎症性分子を活発に放出するようになった(SASP)老化グリア細胞を作製して、神経細胞への効果を、実証できそうですね。

では、最後に進化からの視点をお聞かせください。

ボルボックスでは、体細胞が一定数増殖後、分裂停止して、生殖細胞を放出した後、しばらくして細胞死が起こり、やがて個体死が来ます。

これは、体細胞の分裂寿命、停止、細胞死、個体死の原点にあたるかなーと思って私は今、注目しています。これらの現象に関与する遺伝子の、生物種間での共通性から、分裂終了細胞群の起源とモデルとしての有用性を確認したいですね。進化的には、どのように考えますか

森-5

神経の老化とボルボックスの老化との接点は私にはわかりませんが、神経系の進化的起原は、明確に「動物」の起原に一致します。筋肉系と神経系は同時

進化しています。原始的には神経は筋肉の奴隷です。見方によっては、神経は筋肉を操っているように見えますが、逆にいえば、神経は筋肉を操るといふ呪縛から逃れることは長くできなかったのです。脳の中で、脳幹部、いわゆる下位脳はボディーコントロールセンターとして機能しますが、これが筋肉制御の奴隷です。骨格筋と内臓筋を「支配」しますが、そこから逃れられないのです。

ところが、進化的に、神経がこの「呪縛」から逸脱した瞬間があります。神経が筋肉を操るのではなく、神経が神経を操る、そうになったのが、いわゆる上位脳、海馬もそうですし、大脳新皮質もそうです。では、下位脳の神経細胞と上位脳の神経細胞、つまり、ターゲットが筋肉の場合とターゲットが神経の場合で神経遺伝子の発現になにか違いがあるのか？ それについてはまだわかりませんが、脳領域ごとのプロテオミクスなどから何かかみえてくるかもしれません。

一方、神経系と筋肉系の進化の起原については、「多細胞化」とも関連しますが、リン酸化シグナル系の進化が関係していると思われまます。単細胞生物や植物では酵素などの蛋白質の活性化制御はほとんどがセリン・スレオニンのリン酸化系ですが、動物はとくに細胞表層の受容体システムでチロシンリン酸化を多用します。私たちが長らく研究している Shc 系の分子は、このチロシンリン酸化システムのアダプター蛋白質なのですが、その起原も動物進化の根源的などころにあります。

ですから、Shc は神経の初期進化にも密接に関わっていると思っておりますが、これが神経老化にも強くかわるのかどうか、それはまだまだ研究途上といったところではあります。

- 1.6

神経が、筋肉制御の奴隷とは、なるほどの感です。神経の障害により徐々に筋肉細胞の働きが衰える ALS の患者さんにも、応用できそうですね。その意志さえあれば、微弱になった神経活動を超感覚で変換して受け、骨格筋肉に伝え、衰えた筋力もロボット支援で強化すれば、神経細胞へのフィードバックが可能でしょう。例えれば、惚れ抜いた娘から、生き甲斐をもらえれば、老いた身体も、一時は若返りかな？

単細胞生物の立襟鞭毛中や多細胞になったボルボックスは、動物の起源として注目ですね。運動に関わる Actin 系ともシグナルリンクするアダプター Shc (N-Shc) が、動物の起源から、保存されている印象で、興味が尽きませんね。

三井-2

それでは次に、分裂細胞における“老化の細胞モデル”を考えましょう。その一つは Hayflick 教授が提唱した“ヒト体細胞の分裂老化 (Replicative

senescence)”です。これは繊維芽細胞だけでなく、血管内皮細胞、平滑筋細胞、肝細胞、リンパ球など多彩な細胞で実証されています。この培養系で得られた分裂老化の様々な知見が、生体内での細胞老化とどの点で共通性を持ち、それを利用して個体老化へどのように介入できるかが、今後の焦点でしょう。対談1での誤解、不足点を補う為にも、細胞老化のうち、分裂加齢について、要点だけを私の理解でまとめさせていただきます。

- (1) 真核生物に進化し、環状から直鎖状となった DNA 鎖は、複製毎に DNA 末端 (telomere) の短縮化が起こるのは、必然であり、その短縮は分裂時計とも言え、一種のプログラムであろう。
- (2) 但し、テロメラーゼ複合体の活性が 癌細胞の大部分、幹細胞、生殖細胞、増殖活性化状態で発現する。癌幹細胞のようにそれが充分高いと、テロメア長が再延長され、不死化状態が維持される。
- (3) 幹細胞でのテロメラーゼ活性は、生物種に応じて、微妙に調整されているようだ。ヒト成人 (組織) 幹細胞は、活性が充分でなく、テロメア短縮が起こり、有限寿命であり、下等生物では、万能細胞的にも働き、幹細胞の再生が優位である。
- (4) 細胞の分裂停止に至るいわゆる細胞老化には、このテロメア短縮による必然的な分裂加齢に加えて、テロメア短縮非依存性の傷害性の細胞老化が有る。どちらも共通して、DNA へのストレス傷害が、DNA Damage Response (DDR) を誘起する。
- (5) 前者の必然性は、テロメア末端の G loop 構造へのストレスから、DDR の発動が誘起されて、細胞周期の制御システムである RB-p21 系と p53 - p16 系にシグナルが伝達して、増殖が停止する。異常増殖 (がん化) の抑制系として進化したと思われる。
- (6) 一方、傷害性の細胞老化では、酸化ストレス、電離放射線、oncogene 活性化、発がん剤などにより、共通して (テロメアを含む) DNA 構造への傷害 (主に 2 重鎖切断、DDB) が生じ、DDR が誘起されて、テロメア短縮の危機が生じる以前に分裂停止する。
- (7) 最終分化に伴って分裂停止した細胞は、epigenetic な変化であり、幹細胞への再生 (脱分化) 能を保有すると考えられるが、老化細胞が若返りを起こし得るかを含めて、分化との厳密な区別は、未だ未解明で有る。
- (8) 培養系で解明された老化細胞の指標として p16. p53, γ H2AX, SA- β Gal, SASP, SAHF などが知られる。生理的老化、病的老化したマウス個体内においても、そうした指標を示す老化細胞の増加が認められる。

- (9) 個体内の老化細胞を除去する試みで、改善効果も報告されたが、本格的な指標の確定と除去法の確立が必須である。
- (10) もう一方で、幹細胞による再生系の永続的な維持は、老化の制御に極めて重視すべき事である。

三井-3

さて、上述したように、幹細胞はそれら細胞老化と細胞死を補う再生系として、極めて重要な役割がありますね。老化個体のマウス iPS 細胞の確立と分化誘導に成功して、意欲的にこの問題を考えている名古屋大学の磯部先生に、伺って行きましょう。

- 3. 1

iPSC 由来の個体を造って比較する研究迄、視野に入っているので、ヒト iPS でなくマウス iPS を使われる理由は、理解しています。それでも、ヒト細胞とマウス細胞で、大きな違いも有りますね。先ず基本的な事を、教えて下さい。

実験動物マウスでは、体細胞でテロメア長がヒトより極めて長く、テロメラーゼ活性も陽性である事を、経験しています。

お使いの C57BL も、そうですか？ その点、純系でなく、野生で生息するマウスでは、情報有りますか？ 更に、不死化の頻度が極めて高い事、其れで居て、分裂寿命は短いとも、引用されたりします。分裂毎のテロメア短縮度が大きいのでしょうか？ それらの関わり含めて、教えて下さい。

磯部-1

マウスは確かにテロメア長はヒトに比べて長いです。それでいて、マウス MEF は培養ですぐに細胞老化がきて、その後、増殖が低下します。しかし、培養を続けると、また増殖期に入れます。この時、癌化したと考えるヒトが多いと思います。先生の言われる不死化に相当します。私は違う考えをもっています。それは、骨髓細胞を GM-CSF で培養した系があるからです。すなわち、骨髓なり MEF を生体から取ってきますと、stem cells だけでなく、分化した細胞が多く含まれます。この細胞が死に絶えるのがヘイフリックのいう分裂寿命です。実際には stem cells はここでは死なない。もちろん stem cells を維持するファクターが存在することが必要ですが。私たちは GM-CSF で維持できる単球系の stem cells を樹立しました (PLOS ONE 2013)。この細胞は GM-CSF を抜くと死んでしまいますし。色々なタイプのマクロファージに分化可能ですから、少なくとも分化できない癌ではないと思います。MEF が不死化するのははじめに取ってきた MEF の中から、FBS に含まれる何か増殖因子依存性の stem cells が増えてくるからだと考えています。もちろん、in vitro で培養していますと、DNA 変異した細胞も現れると思いますから、もし、癌遺伝子が活性化されたら癌化も起こります。

- 3. 2

マウスの老化個体から iPS 細胞を樹立され、それを老化 iPS 細胞とも、名付けていますが、個体老化には、いろいろな段階に老化した細胞が混在します。iPS 化の効率が大変低いですから、老化した細胞からの iPS 細胞とは 限りませんね。例えば、幹細胞から分化したばかりで、増殖能の高い幼弱細胞で、iPS ができ易くないですか？ 何か情報はあるでしょうか？

磯部-2

そもそも、老化マウスには組織に stem cells があると思います。その組織 stem cells が iPS 細胞になったと考えています。T 細胞からも iPS 細胞ができていますが、T 細胞の集団の中にも stem cells があります。遺伝子は既に組み換えられていますが、その段階の stem cells です。なぜなら、私たちがインフルエンザに感染すると、インフルエンザ蛋白に反応する T 細胞クローンが増殖するからです。私たちが一旦 GM-CSF で短期培養してから iPS 細胞を作成した時効率が上がったのは stem cells を濃縮したからだと考えています。

- 3. 3

これは、生体内で老化した細胞とは、どんな細胞なのかの定義、把握にも関わりますね。その意味で、p16 や p53 の発現亢進、 γ H2AX の出現、SA- β Gal 陽性、SASP 亢進など、いくつか考えられます。どのような指標が 老化細胞の同定に有効とっていますか？ それを組み合わせ、老化個体からの老化細胞に由来する iPS 細胞を 造れませんか？

磯部-3

私たちは 1999 年 p53 遺伝子欠損マウスで免疫応答をもみたことがあります (Ohkusu-Tsukada et al, 1999 J. Immunology)。そのとき、p53 欠損マウスは抗原をうつと、免疫細胞のクローン増殖がはやいことに驚きました。MEF も不死化がはやくすぐにどんどん増殖します。ところが、早く免疫老化がきてしまう。Stem cells が枯渇してしまうのか。その後実験していませんが、山中教授が p53 遺伝子欠損マウスから iPS 細胞が効率よくできることを報告した時、やはりと思いました。p16 遺伝子欠損マウスも iPS 細胞ができやすいことが報告されています。

- 3. 4

今迄にマウス iPS を分化誘導して、移植用の細胞群を造りましたね。最初の iPS 状態とその分裂終了体細胞に置けるテロメラーゼ活性は生体内同様に、高いのですか、又、その間のテロメア短縮や、最終テロメア長は、どうなっていますか？ 分化だから、老化指標は全く現れませんか？

磯部-4

iPS細胞を分化させた場合、MEFを分化させると、組織のstem cellsができます。例えば、マクロファージに分化させ、GM-CSFでずっと維持可能です。ところが、老化マウスから作成したiPS細胞を分化させると、しばらくは増殖しますが結構早く増殖がとまってしまいます。テロメア長は残念ながら見ていません。

-3.5

結局、老化と分化の違いを分子レベルで、どのように把握していますか？ 分化は、後戻りできると云うのが、iPS化の考えですね。老化した細胞は、不可逆だとの、印象を持っているけど、違う可能性もあるから、それを実証しようと計画しているのでしょうか？ 秘めた御考えは？

磯部-5

私は、老化個体にも組織の様々な段階の幹細胞が残っていると考えています。C57BL/6の心臓の老化を見た時に確かにミトコンドリアが丸くなったり、DNAが短くなったり、テロメアが短くなったりしています(Exp. Gerontol. 2003)。それはおおくが、分裂細胞だからです。その中に組織幹細胞がいて、それがiPS細胞になると思っています。

-3.6

視点は変わりますが、生体内の幹細胞では、自己複製能と細胞分化能の比率が、組織の再生や再性能の保持に関わるので、老化の制御に極めて重要と考えています。その比率制御を解明する意味で、マウス細胞含めて、有用な実験モデルは、何でしょうか？ プラナリア、ヒドラ、などの下等生物も候補でしょうが、御考え有れば、教えて下さい。

磯部-6

私は専門外ですのでプラナリア等をあまり知りません。少なくともマウスでは造血幹細胞の研究が最も進んでいると思います。しかし、血液免疫系は全身を見なければならぬので、筋幹細胞や、脂肪幹細胞、あるいは皮膚幹細胞と創傷治癒モデルがいいのかもしれませんが。ただし、老化マウスの実験は時間とお金がかかりまし、組織には様々な細胞が含まれていますので、単純化することと、お金がなくても実験が可能ということで、やはり下等動物がいいと思います。

-3.7

マウス細胞の解析から、組織幹細胞がiPS化するのだと云う新しい視点で、御考えですね。謎がいく

つか解けた気がします。今迄、どんな細胞がiPS化されるか、不明でした。細胞老化が、そのバリアーになる事は、確認されていますが。実際に、幹細胞を標識しておいて、組織細胞に混入し、その標識幹細胞が高い効率でiPS化される事を、実証できそうですね。

又、老化個体中の組織幹細胞は、すでに細胞老化しているとの予備実験おありですが、iPS化が、分化を逆戻りさせるのに、こうした細胞老化の逆戻りはできないと云う見方ですね。

私は単純化すると、分化をEpigeneticな変化、老化をtelomereを含めたgenome傷害への応答と考えています。そしてマウスはその傷害がヒトより多いので、テロメアが長くても分裂停止が速いというのも、一つの考えでしょうか。

磯部-7

3.1に回答して述べましたが、組織の多くの細胞は分化した細胞です。一部に幹細胞がいて、この幹細胞は老化個体でもまだ分化能を十分持っている可能性があります。老化細胞から作成したiPS細胞も様々な組織細胞に分化できます。私たちは老化iPS細胞を組織幹細胞に分化させて、個体に移植する実験をしました。

3.4に対し答えましたが、単球系の組織幹細胞に老化iPS細胞を分化させ、GM-CSFで培養しますと、若いマウスから作成したiPS細胞に比べ長く増殖させることができませんでした。老化細胞から作成したiPS細胞はクロマチンレベルでもほぼresetされていたのに単球に分化させると、老化の形質が現れた。この理由は今はわかりません。また、老化マウスから作成したiPSからキメラマウスを作成した実験が途中になっていますが、組織によってはほぼ若返っています。ICRマウスの受精卵とでキメラマウスを作成しましたから、毛髪の色は簡単にiPS由来かどうかわかります。黒いiPS由来(B6)毛髪が1年以上みられましたから、毛髪は4年ほど生きたこととなります。老化マウス単球から作成しましたから単球へ分化したときだけ老化形質が現れるのかもしれませんが。いづれにしろ、実験は中断したままです。それでもこの実験から私たちは老化しても十分若返る幹細胞を持っている可能性をつかんでいます。

おわりに

今回の対談で、分裂細胞、分列終了細胞、そして組織幹細胞の個体老化への関わりが挑戦的な研究に依って、浮かび上がったようですね。同時に、多くの解決すべき課題も、見えて来て、有意義でした。

動物種に応じて、その分裂細胞の寿命、幹細胞の

比率、分裂終了細胞や細胞死の割合など、大きく違います。それらの組織内でのネットワークと調節機序も、異なるでしょう。動物の寿命や老化の多様性は、それらを総合的に見極めなければならないのです。

さて、未解明な課題は多々有るとしても、上述したように既に個体老化、寿命への介入が始まってい

ます。次回この問題に切り込めるかどうか楽しみに。

対談内容に対して読者からのコメント、主張を歓迎します。

編集委員なり、私（三井）に御寄せください。反映します。