

第 38 回日本基礎老化学会大会
発表抄録

基調講演

7 学会合同シンポジウム 5
基礎老化シンポジウム

教育講演

ランチョンセミナー

日韓合同シンポジウム

日本老年医学会発表演題

日本基礎老化学会発表演題

**The 38th Annual Meeting of the Japan Society
for Biomedical Gerontology**

ABSTRACTS

【基調講演】

k-1

高齢社会における基礎研究の意義

遠藤 玉夫 東京都健康長寿医療センター研究所



日本は世界でも有数の少子高齢社会である。少し数字を上げてみると、今後高齢化と少子化の進行によって人口構造が激変することが良く分かる。65歳以上を高齢者として定義すると、一昨年（2013年）すでに25%に達した高齢化率は、2030年には30%を超え、2055年には40%になると予測されている。一方で、14歳以下の子供は、2030年には1,115万人（10%）、そして2055年には725万人（8%）になると推計されている。こうした人口構成の激変に伴い、医療費、介護費、年金給付費など社会保障費が今後大幅に増大することが予想され、早急な取組みが必要となっている。

老化に伴う身体機能の低下は、ヒトにとってごく日常的な現象である。しかしながらその機能低下の程度は個体差があり、この差異は老化の特徴のひとつである。老化には個体差があるという背景もあり、老化プロセスには複雑な生命現象が絡み合っていると考えられる。現在ヒトの老化機構を説明するために、遺伝因子と環境因子の二つの因子が互いに関連しており、それぞれの観点からの説明が試みられている。ヒトは遺伝学的に均一ではないことから、線虫、ハエ、マウスなどのモデル動物を用いた分子遺伝学的研究が行われ、寿命に関連する遺伝子が多数明らかにされてきた。また、ヒトにおいて病的な老化を引き起こす遺伝子の単離・同定も進んだ。その結果、老化や寿命について遺伝子を介して分子レベルで議論することが可能になった。

基礎老化学は、分子、細胞、組織、個体、と様々な階層で、「老化」という難題に取り組んで解答を得ようとしている。基礎老化研究の推進によって得られる成果は、老化のプロセスの理解を深めるだけでなく、医学・生物学における様々な領域、たとえば遺伝学、代謝学、細胞情報学、神経科学、食品学などにインパクトを与えるものである。高齢社会における基礎研究の意義について議論したい。

【7学会合同シンポジウム5】

1

あらためて「健康寿命」とは

石崎 達郎 東京都健康長寿医療センター研究所



平成 25 年 4 月に開始された「健康日本 21」は、健康寿命の延伸を目標としている。健康寿命の定義や算出方法を今一度確認しておくことは、健康寿命延伸の手立てを検討する上で有用である。そこで、本シンポジウムの露払いとして健康寿命を概説する。

人口集団の健康指標として平均余命 (life expectancy) が広く用いられている。平均余命とは、ある年齢の人が平均あと何年生きていられるかを示したものであり、特に、0 歳の平均余命は平均寿命 (life expectancy at birth) と呼ばれている。平均余命では生存期間の“質”が考慮されていない。生命の質を考慮した質調整余命 (quality-adjusted life years) の一つに健康余命 (healthy life expectancy) が含まれ、これは、平均してあと何年健康でいられるかを示している。

健康をどう定義するかによって、いろいろな健康寿命を推計できる。代表的なものは、ADL が自立している状態を健康とするもので、active life expectancy (Katz, New Engl J Med 1983; Kai, Asia-Pac J Public Health 1991)、disability-free life expectancy と呼ばれている。また、認知機能に注目した dementia-free life expectancy (Sauvaget, Gerontology 1998) も報告されている。

健康日本 21 で用いられている健康寿命は、日常生活に制限のない状態を健康とし、介護保険制度の中で判定された「要介護 2～5」の状態を不健康 (要介護) としていることから、この健康寿命は、身体機能と認知機能の両面が反映されている。従って、健康寿命の延伸のためには、身体機能における自立度の維持と共に、認知機能の維持 (認知症予防) に関する取り組みが必要となる。

「健康日本 21」の平成 34 年度までの目標は、「平均寿命の増加分を上回る健康寿命の増加」であり、これは Fries の罹患期間の短縮仮説 (compression of morbidity hypothesis) に基づいている (Fries, Lancet 1989)。先述のとおり、わが国の健康寿命は介護保険制度の要介護認定結果を 2 次利用して算出されていることから、今後、要介護認定の方法が変更されるようなことがあると「健康」の基準は現在のものと異なってしまい、推計された健康寿命の比較可能性が脅かされる恐れがある。健康政策の成果を同じ基準で継続的に評価可能とするためには、国民全体における身体機能や認知機能の状況を、経時的に把握する衛生統計の完備が求められる。

- 1) Kai I, Ohi G, Kobayashi Y, Ishizaki T, Hisata M, Kiuchi M. Quality of life: a possible health index for the elderly. Asia-Pac J Public Health 1991; 5: 221-227.
- 2) 石崎達郎、甲斐一郎、小林廉毅。Katz 法による活動的平均余命の推定：佐久市コホート研究の結果より。厚生指標 1999; 46: 23-27.
- 3) Ishizaki T, Kai I, Kobayashi Y, Imanaka Y. Functional transitions and active life expectancy for older Japanese living in a community. Arch Gerontol Geriatr 2002; 35: 107-120.

【7学会合同シンポジウム 5】

2

身体機能の自立をめざした地域の運動実践と その裏付けの意味

植木 章三 大阪体育大学 教育学部



1人ひとりの高齢者の特性に応じた適切な強度と頻度、種類の運動が繰り返し行われれば、何らかの効果を実感する高齢者は少なくない。実際に、高齢者を対象にした多くの介入研究によって、歩行機能やバランス能力、筋力といったパフォーマンスの向上が報告されている。さらに最近では、運動が認知機能低下を予防する可能性に注目が集まっている。しかし、運動を日常生活に定着させることは容易なことではなく、特に、体力が低い高齢者ほど難しくなる。そこで、より多くの地域高齢者に運動実践してもらうために、広く地域に実践の機会を設ける必要があることと、専門指導の人材確保に限界があることから、リーダーとなる住民に知識や技術の研修を行うリーダー養成事業が全国で展開されている。こうしたリーダーの多くは地域高齢者自身であり、習得した運動プログラムの伝達に加えて、地域の交流をはかるサロン活動として実施されている場合も少なくない。すなわち、運動が交流のきっかけとして大きな効果をもたらしている。交流のきっかけとしての要素が強まると、楽しく安全に実施できることで満足し、医学的な効果が明確である必要性があまり求められなくなる。しかし、今後は若年期から様々なキャリアを有し、各分野で活躍した多くの人材が高齢期を向かえるので、これまで以上に運動の効果におけるエビデンスの有無、さらにはその効果をもたらされるメカニズムといった、「より深く知る欲求」が出てきても不思議ではない。高齢者への運動プログラムの提供する内容は、①安全に楽しめる運動プログラムをより多く提供する、②効果が期待されている運動プログラムを選定・提供し、その効果を評価する、③効果が確認されている運動プログラムを選定・提供し、提供者が運動を日常的に実施できるのか評価するというように変わっていくと考えられる。つまり、科学的な検証が行われ、しかも実現可能性が高い運動プログラムが追求されるのである。そのもたらされる効果の裏付けとなるメカニズムが次々と示され、理解されることになれば、実施者の運動に対する意識付けはさらに強化されるだろう。

1) 運動をつくり、広める、地域高齢者の運動のあり方。老年社会科学 34 (1) : 64-70, 2012.

2) ボランティアによる高齢者への運動普及。体育の科学 64 (12) : 863-867, 2014.

3) 高齢者主体の介護予防のまちづくり。学術の動向 20 (1) : 65-69, 2015.

【7学会合同シンポジウム5】

3

散歩と脳血流との関係についての基礎研究

堀田 晴美 東京都健康長寿医療センター研究所
老化脳神経科学研究チーム 自律神経機能研究



最近の疫学研究により、老化に伴う認知機能低下を防ぐために日常の歩行が有益であることが示された。しかし、その基本的なメカニズムはよく分かっていない。そこで我々は、この問題と関連した神経生理学的メカニズムを明らかにする目的で動物を用いて研究を行った。

アルツハイマー型認知症では、大脳皮質や海馬において血流が減少する。これらの脳領域は前脳基底部からコリン作動性線維を受ける。我々は、前脳基底部のコリン作動性神経核の刺激が大脳皮質や海馬においてアセチルコリンを放出させ、それによって脳実質内動脈の拡張と神経成長因子分泌増加をもたらし、脳血管閉塞による神経細胞死を防ぐことを明らかにした。このように前脳基底部コリン作動系の活性化は脳の健康に有益らしい。我々は、歩行がこのコリン作動系を賦活し血流を増大させることを、海馬血流と血圧を測定しながら成熟および高齢ラットをトレッドミルで歩かせる実験から示した。浅麻酔ラットでは、自発運動時の筋活動に先行して前脳基底部の神経活動が増大し、大脳皮質血流が増加する。また、麻酔下のラットの皮膚をブラッシングする刺激で、前脳基底部において血液酸素化レベル信号（神経賦活の指標とされる）が増加し、大脳皮質において血流だけでなく神経成長因子分泌も増加することを明らかにした。以上の実験から前脳基底部は、運動の中枢指令と、末梢からの体性感覚情報の両方向から賦活されることがわかってきた。

アルツハイマー型認知症では、コリン作動性ニューロン数が著しく減少するため、主な抗認知症薬は、アセチルコリンの分解損失を防ぐことでアセチルコリンを増大させることに向けられる。しかし、正常な高齢者においてはコリン作動性ニューロンの大多数が残存する。従って、毎日の歩行や体性感覚刺激によってコリン作動系を活性化し、コリン作動性ニューロン損失とその結果生じる認知症を予防できるのかもしれない。

Hotta et al. (2014) Non-noxious skin stimulation activates the nucleus basalis of Meynert and promotes NGF secretion in the parietal cortex via nicotinic ACh receptors. *J Physiol Sci* 64: 253-260.

【7学会合同シンポジウム 5】

4

認知機能低下の早期発見と維持・向上

—社会活動による低下抑制の可能性—

鈴木 宏幸 東京都健康長寿医療センター研究所



健康長寿の対極とも言える要介護状態に至る主な原因として、脳血管疾患（18.5%）、認知症（15.8%）、高齢による衰弱（13.4%）が挙げられている（平成 25 年国民生活基礎調査）。年代別に見ると 75 歳以上では認知症（17.9%）が最も多く、健康寿命の延伸を目指す上で認知機能低下への対策が重要な取り組みの一つとなることは自明である。

軽度認知障害（MCI）は基本的な生活は自立しているものの認知機能が年齢相応よりも低下した状態であり、認知症の前駆段階として着目される。重要な点は、MCI は健常と認知症をゆらいでいる状態であり、MCI を早期に発見し、低下を抑制する適切な取り組みを行うことで、認知機能を維持・向上する余地が残されていることである。

認知機能は構成概念であり、記憶機能や注意・実行機能、言語機能など多領域から成り立っている。適切な評価には脳画像や生理指標に加えて認知機能検査のような行動指標が重要となる。しかし、認知機能には個人差があるだけでなく加齢に伴い多様に変化するため、適切な評価は容易ではない。このような困難の克服を目指し、多様な認知機能検査の開発と認知機能低下に関連する要因の解明が進められている。

認知機能の低下抑制に関連する要因においては社会活動が着目されている。社会とのつながりが多様であるほどに認知機能低下者の割合は低く、他者との良好なコミュニケーションが豊富であるほどに認知症の発生率は低い。このような知見を踏まえ、我々の研究チームでは、絵本の読み聞かせによる社会貢献・社会参加型の介入プログラムを展開している。その結果、3年以上の活動継続は言語機能の維持・向上に貢献することが示された。また、認知機能訓練に特化したプログラムを作成・検証したところ、記憶機能、注意・実行機能において介入効果がみられ、本プログラムによる認知機能の向上が示唆された。少子高齢化の進展が止まらないわが国においては、社会貢献性を持つような社会活動による健康寿命延伸の取り組みは重要なアプローチといえる。

Suzuki, et. al. Cognitive intervention through a training program for picture book reading in community-dwelling older adults: a randomized controlled trial. BMC Geriatr. 2014 Nov 21;14:122. doi: 10.1186/1471-2318-14-122.

【7学会合同シンポジウム 5】

5

サルコペニアのメカニズム解明とその対策

－骨格筋幹細胞からのアプローチ－

町田 修一 順天堂大学大学院 スポーツ健康科学研究科



ヒトが生涯にわたって健康で自立した生活を営むためには、日常動作の基盤となる筋肉量を維持することが必要不可欠である。しかしながら、筋肉量は加齢に伴い低下することが知られている。この加齢性の筋肉減弱症（サルコペニア）は、ADL（日常生活動作）やQOL（生活の質）を低下させるのみならず、基礎代謝の低下から生活習慣病に罹りやすくなるおそれがある。2014年には4人に1人が65歳以上の本格的な高齢社会を迎えた本邦において、ゆとりと豊かさに満ちた社会を実現するためには、ひとりひとりが高齢になっても自由で自立した生活を営めることが鍵となる。しかし、サルコペニアの発症機序の詳細については十分に解明されていないのが現状である。したがって、今後予測される寝たきりや生活習慣病の罹患者の増加を抑制するために、サルコペニア発症のメカニズムを解明し、それに基づいた予防・改善方法の開発が望まれる。

骨格筋は筋線維の集合体である。筋線維は、その収縮特性から速筋線維と遅筋線維に分類される。加齢性の筋萎縮の場合、速筋線維に選択的な萎縮が認められるのが特徴である。また、加齢性の筋萎縮は、単に筋線維の萎縮だけにとどまらず、筋線維数が減少すること、さらに筋肉内の脂肪蓄積が認められることが特徴である。骨格筋は本来、再生能力の高い組織である。しかし、加齢に伴いその再生能力は失われていくことが知られている。その要因として、筋再生に重要な役割を担う骨格筋組織幹細胞である筋サテライト細胞の機能と筋サテライト細胞を取り巻く細胞外環境が加齢に伴い変化することが考えられている。今回のシンポジウムでは、サルコペニアのメカニズムを解明するために、ヒトのサルコペニアと類似した骨格筋の表現型を示す加齢実験動物から単離した筋サテライト細胞に関する研究成果について紹介する。また、運動や不活動、さらに性差が筋サテライト細胞の諸機能に及ぼす影響について報告する。

- 1) Machida S, Peake P, Sarcopenia – significance and possible mechanisms. In: Ohira Y, (ed) Muscle Cell Physiology, Osaka University Press, Osaka, pp. 121-136, 2009.
- 2) 町田修一、黒坂光寿, サルコペニア－研究の現状と臨床への応用－、老年医学 48: 169-176, 2010.

【基礎老化シンポジウム】

S-1

ω 3脂肪酸の分子栄養学

有田 誠 理化学研究所統合生命医科学研究センター、
横浜市立大学大学院生命医科学研究科、JST さきがけ



栄養素であり、膜リン脂質や中性脂肪の構成成分でもある脂肪酸は、生物において必須である。脂肪酸には多くの種類があり、飽和と不飽和、さらに不飽和度の高い多価不飽和脂肪酸などに大別される。また、多価不飽和脂肪酸の中でも分子内の二重結合の位置により ω 3系、 ω 6系の脂肪酸が存在しており、これらは哺乳動物の体内において相互変換されることはなく、代謝的に質の異なる脂肪酸である。このように質の異なる脂肪酸が生体内で特徴的な分布を示し、それぞれに特異な代謝を受け、さらにその代謝は互いに影響し合うことで、様々な生理機能や病態に影響を及ぼすと考えられている。

エイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) に代表される ω 3系多価不飽和脂肪酸には、抗炎症作用や心血管保護作用、抗がん作用などがあることが知られている。しかしながらこれらの脂肪酸がなぜ体によいのか、分子レベルの解明は遅れている。そこで本研究では、EPA や DHA など ω 3脂肪酸の代謝および生理機能を分子レベルで解明することを目的としている。 ω 3脂肪酸は主にアラキドン酸代謝系と競合することで炎症を抑制すると考えられてきたが、最近新たに ω 3脂肪酸から生成する抗炎症性代謝物が見いだされ、その生理機能が注目されている。このような背景のもと、我々はアラキドン酸および ω 3脂肪酸由来の代謝物を包括的に捉える目的で、LC-MS/MSを用いた脂肪酸代謝物の包括的メタボローム解析システムを確立した。また、 ω 3脂肪酸を合成出来るように遺伝子改変した、 ω 3脂肪酸合成酵素 (*fat-1*) トランスジェニックマウスを導入している。この*fat-1* トランスジェニックマウスは、炎症性疾患やがんに対して強い抵抗性を示し、これまで栄養学的な解析しかなされてこなかった ω 3脂肪酸の生理機能に対して遺伝学的な根拠を与え、かつ分子レベルでの解析が可能になった。これらを用いて、 ω 3脂肪酸の抗炎症作用に関わる代謝経路および新規メディエーターの同定を目指した研究について紹介する。

- 1) Endo J. et al. *J Exp Med* 211, 1673-1687 (2014)
- 2) Kubota T. et al. *FASEB J* 28, 586-593 (2014)
- 3) Arita M. (review) *J Biochem* 152, 313-319 (2012)

【基礎老化シンポジウム】

S-2

糖代謝からみた老化機構 —長寿シグナルを追い求めて—

山内 敏正、門脇 孝 東京大学大学院医学系研究科
糖尿病・代謝内科



高脂肪食や運動不足等による肥満・内臓脂肪蓄積の増加に伴って糖尿病が増加し続けている。糖尿病は、慢性腎不全による人工透析導入、視力障害、下肢切断等の生活の質を著しく低下させる原因となるのみならず、心血管疾患や癌等のリスクを高め、寿命短縮の大きな原因にもなっている。肥満がインスリン抵抗性を惹起して糖尿病を発症・増悪させる分子メカニズムを解明して、原因に基づいた予防・治療法を開発することが健康長寿にとって、極めて重要と考えられる。

我々は肥満に伴って脂肪細胞から分泌されるアディポネクチン (Ad) が低下することが、肥満に伴う糖尿病や動脈硬化の発症・増悪の主因であること、その補充が治療法となり得ることを示した (1, 2)。改善効果のメカニズムを解明する過程で、Ad の受容体 AdipoR1 と AdipoR2 を同定した (3, 4)。AdipoR1 は骨格筋等において AMPK/SIRT1 を活性化する等して PGC-1 α 活性を高め、ミトコンドリアを正に制御して、糖・脂質代謝を改善させ、筋持久力を増加させる等、運動模倣効果を発揮することを示した (5)。また AdipoR2 は肝臓等において、PPAR α を活性化し、脂肪酸燃焼の促進、抗炎症作用、酸化ストレス低減作用を発揮して、インスリン抵抗性、脂肪肝を改善させることを報告した (4)。AMPK/SIRT1 やミトコンドリアを増加させ、酸化ストレスを低減させることは抗老化作用に直結し、実際に Ad の過剰発現は健康長寿を実現させるのに対し、AdipoR の欠損は寿命を短縮させた (6)。AdipoR を活性化することが長寿シグナルとなって健康長寿を期待することが出来るため、その方法を追い求めた。AdipoR 作動薬として得られた AdipoRon をマウスに内服させると、適度な運動同様、肥満に伴うインスリン抵抗性・筋の持久力低下を改善させ、短くなった寿命を延長させた (6)。

AdipoR 作動薬は生活習慣病に対する根本的治療法となるのみならず、長寿シグナルによる抗老化作用も相まって、健康長寿の実現に貢献することが出来ると期待される。

- (1) *Nat Med* 7: 941-946, 2001.
- (2) *Nat Med* 8: 1288-1295, 2002.
- (3) *Nature* 423: 762-769, 2003.
- (4) *Nat Med* 13: 332-339, 2007.
- (5) *Nature* 464: 1313-1319, 2010.
- (6) *Nature* 503: 493-499, 2013.

【基礎老化シンポジウム】

S-3

糖鎖、特に分岐型N-型糖鎖の生理的病態的役割

谷口 直之 理化学研究所グローバル研究クラスター
システム糖鎖生物学研究グループ



糖鎖は、ご存知の通り多彩な働きを持ち、タンパク質のほぼ70%以上は糖鎖が付加されており多くの病気の発症機構に関わっている。我々はこれまで主にN-結合型糖タンパク質糖鎖の分岐を合成する酵素（糖転移酵素）の分離精製、さらには、その遺伝子（糖鎖遺伝子）のクローニングを行い、それらの生理的病態的な役割を研究してきた。対象としてきた疾患はいずれも老化とも密接にかかわっている。本シンポジウムではそのうち、Alzheimer病にかかわる GnT-III、および COPD（慢性閉塞性肺疾患）にかかわる Fut8 の糖鎖遺伝子を中心にお話させていただく。

GnT-III はこれまで癌細胞の転移などでは E-カドヘリンやインテグリンに付加する産物のバイセクト糖鎖が善玉として作用すると思えてきたが、

Alzheimer病では、BACE1 にこの糖鎖が付加するとむしろ悪玉となり、付加を除くことによりアミロイドβの蓄積が抑制されることが明らかになった。現在 GnT-III を抑制する物質の創薬としての可能性を探っている。

Fut8 はこの産物である Core fucose が、がんのバイオマーカーに利用されている。また、これを欠損させることにより抗体医薬で重要な ADCC 活性が著しく増大することから重要な糖鎖である。我々はこの遺伝子を欠損させることにより肺気腫になることから COPD に注目して研究を行っている。COPD は喫煙のほか、PM2.5 などの環境因子、遺伝素因などが危険因子であるが老化や骨粗鬆症なども関与し、生活習慣病の一つである。我が国では 520 万人の潜在患者がいるにもかかわらず治療を受けている人はわずか 22 万人といわれている。ウイルスや細菌による感染で増悪が繰り返され死に至ることがあり、増悪を抑えることが重要である。このための糖鎖に依存した創薬の可能性についても述べさせていただく。本研究の一部は学術振興会基盤研究および医薬基盤研究所先駆的医薬品・医療機器研究発掘支援事業の援助を受けた。

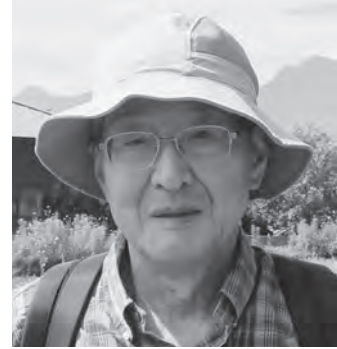
- 1) Wang X, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005. 102 (44) : 15791-6.
- 2) Kobayashi S, et al. Am J Respir Cell Mol Biol. 2013. 49 (6) : 971-7.
- 3) Kizuka Y et al. EMBO Mol Med. 2015. 7 (2) : 175-89

【教育講演】

E-1

老化メカニズム研究の半世紀： タンパク質と酸化ストレス説を巡って

後藤 佐多良 順天堂大学大学院・
スポーツ健康医科学研究所



フリーラジカル説の父 Denham Harman 博士が昨年 11 月亡くなった（「基礎老化研究」本号の追悼文参照）。この機会に同説に関連する個人的な研究史について触れたい。

大学院に進学して、恩師水野傳一先生から「君は老化の研究をやり給え」と言われたのは 50 年前（1965 年）のことである。日本基礎老化学会の前身の研究会発足の 12 年前だった。老化研究に無知な若者は頭に浮かんだメチニコフについて書かれたものを読んだ。留学後赴任した大学で本格的に老化を勉強し、研究に取り組んだ。その頃には日本基礎老化学会も設立され、老化の基礎研究を看板に掲げる研究室も出てきた。

当初からタンパク質が生体恒常性維持の基本にあるに違いないと考えていたが、当時老化は脂質や DNA の変化との関連の方が重視されていた。一緒に赴任した森望君（現・長崎大学医学部）が老化のエラーカタストロフ説に基いてタンパク質合成忠実度（デコーディング）を研究、高橋良哉君（現・東邦大学薬学部）が tRNA のアミノ酸チャージングの正確さの研究を行った。そこから異常酵素、引き続いてタンパク質翻訳後修飾、中でも酸化修飾の研究を進めることになった。フリーラジカル説の勉強をした。老化とタンパク質酸化修飾の研究を行っていた NIH の Earl Stadtman らを追って、カルボニル化タンパク質の免疫学的検出法を開発した（中村明宏君、現・京都府立医大）。Igor Kurochkin 君（現・Bioinformatics inst, Singapore）が酸化タンパク質分解酵素としてのインスリン分解酵素（IDE）を発見、それが β アミロイドを分解することを見出した。加齢に伴う異常酵素の蓄積、酸化修飾の亢進の考えに基いて食餌制限の抗老化作用メカニズムの研究も行った。異常タンパク質蓄積の原因を探る目的で代謝回転、タンパク質分解の加齢変化の研究をした（石神昭人君、現・健康長寿医療センター研究所）。Zsolt Radak 君（現・Hungarian Univ Sport Sci）が加わってからは運動の抗老化作用と酸化ストレスについて研究した。以前から温めていた考えを進めて、生まれたのが抗老化運動ホルミシスの考えである。ホルミシス（環境適応）は抗老化戦略を進める上で重要だと考えている。

- 1) 後藤佐多良：老化機構をタンパク質から探る。ファルマシア 35:901-903, 1999
- 2) Goto S: Biological mechanisms of aging: A historical and critical overview. In: Aging Mechanisms: Longevity, Metabolism and Brain Aging, eds. Mori N, Jung IM, Springer, 2015, in press

【教育講演】

E-2

免疫と老化、及び免疫力の定量的測定について

廣川 勝昱 株式会社健康ライフサイエンス代表取締役
東京医科歯科大学名誉教授
中野総合病院病理部



老化は遺伝子、分子、細胞、組織、個体など、対象とするレベルにより、見えるものが異なってくる。免疫系はどのレベルでも解析可能であるが、3つの重要な点がある。第一はその機能不全がいろいろな病気の発生に関わること、第二は免疫機能の総体的なレベルを測定することが可能であること、そして第三は、その機能を回復することもある程度可能なことである。

日本人の三大死因は癌、動脈硬化症（心疾患、脳動脈硬化症）、感染症であるが、そのいずれも、免疫機能不全・異常が背景にある⁽¹⁾。

免疫系は多数のサブシステムや機能の異なる細胞から構成されているので、その老化過程は細胞の種類やシステムにより異なる。しかし、その中で、加齢変化の顕著なものは、胸腺を中心としたT細胞からなる獲得免疫系である⁽²⁾。

T細胞系の加齢変化は胸腺のT細胞を分化誘導する能力の変化から始まり、それはマウスでは生後1週以内、ヒトでも3歳以内に始まる。その胸腺の生後早期から始まる機能変化は、新生児（仔）期に高い成長ホルモン（GH）が生後急速に低下することに起因する。GHやその受容体がないDwarf animalや侏儒症の人では、免疫系の発達は遅れるが、意外と長命である。興味ある事は、癌の発生が少なく、糖尿病が少ないことである。逆にGHが高値のトランスジェニックマウスでは胸腺は大きい、短命である。つまり、GHと胸腺に依存する免疫系はTrade-offの関係にあるらしい⁽³⁾。

病気の発生の背景には、免疫機能のレベル（免疫力）の低下が関連しているが、その低下の始まりや程度は個人差が大きい。従って、健康の維持を図るには、年齢とは関係なく、自分の免疫力を知り、コントロールすることが必要となる。我々は免疫力を誰でも解るように定量的に測定評価する方法を開発した⁽⁴⁾。健康人の免疫力を見ると、免疫力の加齢変化は男性の方が女性に比べて早い。この加齢変化の差が寿命の差と関連している可能性がある⁽⁵⁾。

大腸癌の疑いのある多数の人について免疫力の追跡調査を行った。その結果、癌患者では健康人に比べて免疫力の低下が明らかで、その低下の始まりは、癌の発生早期から起こっている。また、がん患者について免疫力を経時的に測定してみると、がんの治癒や再発と関連して、免疫力のレベルが変動し、免疫力の測定はがん患者の予後を見るのに有用である⁽⁶⁾。

健康診断では異常のない健康人でも体調不良の訴えがある。その訴えと免疫力との関連性を見ると、疲れ易いと訴えている人では、免疫力の低下がある事が多い。免疫力を高いレベルに保つことは健康維持に必要なことであり、免疫力の定量的測定が健康維持や病気の進行程度を見る上で、役立つと考えている。

また、いろいろな薬品、食品、サプリメント類について、ボランティアに服用してもらい、その前後の免疫力のレベルを見ることにより、それらの免疫系への影響や効果を明らかにすることが出来る^(4,8,9)。

- 1) 廣川勝昱 加齢と免疫－メカニズム、評価と回復 お茶の水医学雑誌 2013、61:17-35。
- 2) Hirokawa K et al. Immunity and Aging. In Principle and Practice of Geriatric Medicine (Eds. Pathy MSJ, Sinclair AJ, Morley JE). John Wiley & Sons. Ltd. 2006. pp.19-36.
- 3) Hirokawa K et al. Trade off situation between thymus and growth hormone. International Symposium. The challenges of biological research on aging in the 21th century: from cells to clinics. 2014 Nov.2-4. In Montreal.
- 4) 廣川勝昱 免疫機能の客観的評価判定とその機能回復について。2012. ILSI 129:5-17
- 5) Hirokawa K et al. Slower immune system aging in women versus men in Japanese population. Immunity & Ageing 2013 10:19
- 6) Hirokawa K et al. Decline of T cell-related immune functions in cancer patients and an attempt to restore them through infusion of activated autologous T cells. Mech.Ageing Develop. 2009 130:86-91
- 7) 廣川勝昱 病気につよくなる免疫力アップの生活術。家の光協会 2008
- 8) 健康ライフサイエンスホームページ <http://www.h-ls.jp>

【教育講演】

E-3

公然の科学論争を恐れるな 前途ある研究者へ向けて

三井 洋司 国際科学振興財団 バイオ研究所
徳島文理大学（出向先）



序 老化研究は、私の生きた加齢史に沿って、軸を貫きながらも重点を移動してきた。

若い研究者は、道を迷いながら歩むものである。仮説提示と実証実験、その修正と再実証、そうした繰り返しこそが、科学真理の解明に貢献する。しかもその過程には、科学論争が必須である。論争は、個人的な喧嘩では決してない。信頼できる相手との、真理解明への建設的な再構築の作業である。しかし、今の若い人は、公然と科学論争することを忌み、避ける傾向がないだろうか？ メッセージを届けたい。大いに論争し、議論を沸かせよと。

ヒト体細胞の分裂老化について、筆者は自分の実験結果を確信し、研究生活 40 年間、一度も確信がぶれたことは無い。本学会の黎明期に続く、長きにおいて、それを老化研究の有力な手がかりとして、熱中する人だけでなく、むしろ、全くのアーティファクトとして、強くパッシングする人にも、多く出会った。内外の学会権威によるそうしたエピソードを、紹介できるだろう。

細胞の分裂時計は、テロメアの短縮度と理解されて以来、細胞老化への多様な機序も、解明されてきた。そして、生体内における細胞の分裂加齢や老化細胞の存在が実証され、転機を迎えた。しかし、それを疑う人もいる。論争の要を感じる。

一方、体細胞の不死化や、多能性幹細胞化の成功は、細胞の若返りだけでなく、その細胞移植による個体老化の遅延を実現できるとの期待を昂らせる。こうした背景で、老化研究は今や、全く新時代に突入した。体細胞を epigenetic に、任意段階の分化（または幹細胞化）状態に至らせるのが、可能となれば、老化細胞の除去や、細胞移植の技術と相まって、個体の若返りは、細胞レベルから実現できるだろう。論争が必要である。

Hum. Cell, 24 (2011) , pp. 96-103, Cell Biol. Int., 36 (2012) , pp. 519-527, Cell Biol. Int. Rep., 21 (2014) , pp. 17-24, Biochem Biophys Res Commun. 2014 Oct 24 ; 453 (3) : 668-73.

【ランチョンセミナー・教育講演】

E-4

Harmony in Aging Research: Biology of Aging for Human Aging

Sang Chul Park Well Aging Research Center,
Samsung Advanced Institute of
Technology



With rapid global population aging, it is natural to pay more attention on human aging than ever before. Thousands of messages are rushing in to inform on aging and longevity not only from the scientific world but also from social communities. However, complexity and disconnectedness of information on aging raise much confusion and lead to frustration in establishing the solution for the imminent aging issues. The most serious reason for these problems would be the huge gap between researches on biology of aging and human aging, both of which have been traditionally separately pursued. Since the major purpose of biology of aging research is directed to solve the issues of human aging, it is in priority to build up the tight links and cross-talks between biology of aging and human aging. Though the works of biology of aging have already elucidated many beautiful and essential natures of aging, but it can be confessed that they are mainly adhered to biology itself. While studies on human aging have opened many mysteries of aging and longevity, but they are way from biology of aging. To illustrate, the rapid increase in human life span in the last century cannot be explained simply in terms of biology of aging, but a spectrum of social, environmental and technological variables should be taken into consideration. Thereby, it is the time to develop the strategy how to balance and collaborate between researches on biology of aging and human aging. Biology of aging works should not neglect the human aging issues including huge problems of human being and human society in different cultural and ecological environments, which are still being changed. This kind of the integrative and interactive approach of aging researches will definitely contribute to solve the aging issues with a greater efficiency. Furthermore, it should be reminded that the environmental changes including modern technological revolution could influence heavily on biology of aging and human aging. Therefore, it becomes necessary to design the integrative harmony between biology of aging and human aging researches.

【日韓合同シンポジウム】

JKS-1

Role of Snf3/Rgt2 glucose sensors and Mth1/Std1 mediators under caloric restriction in *S. cerevisiae*

Kyung-Mi Choi, Cheol-Koo Lee

Division of Biotechnology, College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Republic of Korea

Down-regulation of intracellular nutrient signal pathways was proposed to be a primary mechanism of caloric restriction (CR)-mediated lifespan extension. However, the link between lifespan and glucose sensors in the plasma membrane was poorly understood in yeast. Herein, a mutant that lacked glucose sensors (*snf3 Δ rgt2 Δ*) had impaired glucose fermentation, showed decreased chronological lifespan (CLS), and reduced CLS extension by CR. The mutant also had reduced mitochondrial efficiency, as inferred by increased mitochondrial superoxide and decreased ATP levels. Mth1 and Std1, which are downstream effectors of the Snf3/Rgt2 pathway, were required for viability through mitochondrial function but not fermentative metabolism.

JKS-2

Pleiotropic roles for neuropeptide Y in life

Isao Shimokawa

Department of Pathology, Nagasaki University School of Medicine and Graduate School of Biomedical Sciences

Neuropeptide Y (Npy) is the most potent orexigenic peptide expressing in the hypothalamus. Augmented Npy signaling causes obesity and related disorders in middle-aged animals. Our study indicated that Npy deficiency reduced white adipose tissue (WAT) mass and ameliorated the aging-related metabolic disorders in mice. An in vitro study confirmed inhibition of lipolysis whereas enhancement of lipogenesis by Npy in 3T3-L1 cells. These findings suggest that antagonism of Npy is a promising target for drug development to prevent obesity-related disorders. Dietary restriction (DR) is known to extend lifespan and inhibit aging-related disorders. DR also reduces the WAT mass and enhances insulin sensitivity, ameliorating the aging-related metabolic disorders. DR, however, elevates the expression of Npy in the hypothalamus. In Npy-null mice, the life-extending effect of DR was minimized, indicating the necessity of Npy in the effect of DR. Npy-null mice displayed lowered food efficiency and fat mass compared to the WT mice, in the DR condition. These are similar to the condition of unintentional weight loss in old animals. Our findings suggest pleiotropic roles for Npy according to life stages.

JKS-3

Skin Aging and Its Application for Bio-Cosmetics

Dong Wook Shin, Ph.D

Amorepacific Corporation R&D Center

Skin is the representative tissue to easily recognize the aging process in our body. The aging process in the skin can be classified into the photoaging by ultraviolet and intrinsic aging. If the skin undergoes the aging process, the synthesis of collagen, the most important component in the skin, is increased, and normal collagen is degraded by MMP1. This phenomenon eventually causes the formation of wrinkle and the reduction of skin elasticity. Recently, studies on new age-related proteins or new therapeutic agents for solving the skin aging are required to retard or prevent the skin aging process.

Here I will introduce our research achievements for anti-aging and development processes for anti-aging bio-cosmetics.

JKS-4

The effects of gut homeostasis and microbe on aging in *Drosophila*

hin-Hae Lee¹, Hye-Yeon Lee¹, Woong Seo¹, and Kyung-Jin Min^{1*}

¹Department of Biological Sciences, Inha University, Incheon 402-751, Republic of Korea
These authors are contributed equally.

*Corresponding author: Kyung-Jin Min (minkj@inha.ac.kr)

Intestinal microbes that live in a symbiotic relationship with their hosts are well known to affect host fitness such as metabolism, obesity, and inflammation. However, studies on the effects of intestinal microbes on host lifespan and aging are limited. In this study, we investigated the effects and mechanisms of intestinal microbes on host lifespan using *Drosophila melanogaster* as a powerful model animal to study host-microbes interaction. We generated axenic flies by dechoriation of eggs with sodium hypochlorite, and measured its lifespan. The lifespan of flies was decreased under axenic condition, and it was additionally decreased by the oral ingestion of the extracts of guts from old flies, indicating that the microbes in the gut of old flies affect host lifespan. To identify endogenous bacteria affecting host lifespan, adult flies were subjected to oral ingestion of individual species of microbes. Furthermore, to determine the underlying mechanisms of intestinal bacteria on lifespan, we measured the lifespan of fly exhibiting intestinal barrier dysfunction. Taken together, our study highlights the importance of intestinal bacteria as one of the determinant of host lifespan.

Key Words : Intestinal microbe, gut homeostasis, *Drosophila melanogaster*

JKS-5

Aging and anti-aging studies using Senescence-accelerated mice (SAM)

Keiichi Higuchi

Department of Aging Biology, Institute of Pathogenesis and Preventive Medicine, Shinshu University Graduate School of Medicine

The Senescence-accelerated mouse (SAM) strains provide a unique model system for the study of the aging process in higher organisms. The SAM strains were developed in 1981 and have been used in many studies of aging, age related diseases and anti-aging treatments. The SAM strains include the accelerated senescence-prone SAMP series (SAMP1, SAMP6, SAMP8 and SAMP10) and the accelerated senescence-resistant SAMR series (SAMR1 which serve as a control for the SAMP strains). The SAMP strains grow normally, but they show early signs of aging and their life spans are shorter than SAMR1. Molecular genetic characterization of the SAM strains revealed that they might be a group of recombinant inbred strains involving the AKR/J strain and an unknown strain developed by accidental outbreeding. SAMP strains spontaneously manifested various age-related patho-biological phenotypes that were often characteristic enough to differentiate the strains. The hyperoxidative status may incur accelerated senescence in SAMP strains. We have revealed significantly delayed senescence in SAMP1 mice given supplementation with reduced form of coenzyme Q10. Activation of mitochondrial function by the induction of Sirtuin genes and PGC-1 α may protect against the progression of aging and the symptoms of age-related diseases in SAMP1 mice.

Keywords : Senescence-accelerated Mouse, Oxidative stress, CoQ10

JKS-6

Promotion of fat synthesis by SREBP and MDT-15 ameliorates toxic effects of glucose on *C. elegans* lifespan

Seung-Jae Lee

Department of Life Sciences, IBIO, and ITCE, Pohang University of Science and Technology, Pohang, Kyungbuk, South Korea

Glucose-rich diet shortens lifespan in various organisms. However, it remains largely unknown how the metabolic processes of glucose-rich diet play causal roles in decreasing lifespan. Here, we show that sterol regulatory element-binding protein (SREBP) and mediator 15 (MDT-15) transcription factors prevent life-shortening effects of glucose-rich diet by promoting fat synthesis in *C. elegans*. We find that dietary glucose activates SREBP and MDT-15, which in turn increase the levels of key enzymes for unsaturated fatty acid (UFA) synthesis. Activation of SREBP/MDT-15 is necessary and sufficient for alleviating the life-shortening effect of glucose-rich diet. We further show that excessive saturated fatty acids exacerbate the life-decreasing effects of glucose on lifespan. Thus, accelerated glucose-to-UFA metabolic flow by the activation of SREBP/MDT-15 appears to moderate glucose toxicity. Our study may help designing strategies against elevated levels of blood glucose and free fatty acids that lead to glucolipotoxicity in diabetic patients.

JKS-7

New insights into cellular prion protein functions: prion signaling and pathophysiology

Eun-Kyoung Choi

Department of Biomedical Gerontology & Ilsong Institute of Life Science, Hallym University

The cellular prion protein (PrP^C), a highly conserved GPI-anchored membrane protein, into a protease-K-resistant and infective form (generally termed PrP^{Sc}) is mainly responsible for transmissible spongiform encephalopathies, characterized by neuronal degeneration and progressive loss of basic brain functions. Although PrP^C is detected in a variety of tissues, the complete repertoire of its functions has not been fully determined. Here, we investigated the regulatory mechanism of the PrP^C in RhoA-mediated neuritogenesis using in vitro and in vivo systems. We found that PrP^C induced RhoA inactivation along with increasing ERK and RhoA phosphorylation. Interestingly, the induction of RhoA inactivation is through the interaction of PrP^C with RhoA and RhoGDI, and PrP^C enhanced the interaction between RhoA and p190RhoGAP. These data suggest that PrP^C contributes to the RhoA-mediated neuritogenesis through the interaction with RhoA and its inactivation and that the pathogenic mutation of PrP^C triggers the RhoA-mediated signaling pathway, which in turn develops prion-related neurodegeneration [This work was supported by grants from NRF-2013R1A1A2007071, NRF-2011-619-E0001 and HRF-S-51].

JKS-8

Senescence and its implication in papillary thyroid carcinogenesis

Yeong Hwa Kim¹, Yong Won Choi¹, Jeonghun Lee², Euy Young Soh², Jang Hee Kim³, Tae Jun Park¹

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, Ajou University School of Medicine

²Department of Surgery, Ajou University School of Medicine

³Department of Pathology, Ajou University School of Medicine

B-RafV600E oncogene mutation occurs most commonly in papillary thyroid carcinoma (PTC) and is associated with tumor initiation. However, a genetic modification by B-RafV600E in thyrocytes results in oncogene-induced senescence (OIS). We observed down-regulation of p-Erk1/2 and up-regulation of dual specific phosphatase 6 (DUSP6) in the PTC with B-RafV600E mutation. DUSP6 overexpression in vitro induced Erk1/2 dephosphorylation and inhibited B-RafV600E-induced senescence in thyrocytes. Although DUSP6 protein was degraded by B-RafV600E-induced reactive oxygen species (ROS), thyroid-stimulating hormone (TSH) stabilized DUSP6 protein by increasing Mn superoxide dismutase expression and inhibited B-RafV600E-induced senescence. Furthermore, we also found that OIS was found in margin of papillary thyroid carcinoma invasive region. Senescent thyrocytes expressed matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), IL-6, and have a high invasive activity. We conclude that B-RafV600E induced OIS might involve in PTC invasion which would be a new insight into OIS in papillary thyroid carcinogenesis..

Key Words : B-RafV600E, Oncogene induced senescence, Papillary thyroid carcinoma

JKS-9

Repair of ischemic injury by pluripotent stem cell derived endothelial cells without teratoma formation through selective photosensitivity

Seung-Ju Cho¹, So-Yeon Kim¹, Ho-Chang Jeong¹, Hyung-Min Chung², Sung-Hwan Moon^{2*}, and Hyuk-Jin Cha^{2*}

¹ College of Natural Sciences, Dept. of Life Sciences, Sogang University, Seoul, Korea. ² Dep. of Medicine, School of Medicine, Konkuk University, Seoul, Korea.

The risk of teratoma formation owing to residual undifferentiated pluripotent stem cells (PSCs) is one of serious concern in PSC-based therapies. Small molecules toxic to PSCs, which can selectively deplete undifferentiated PSCs, have been developed to reduce the risk of teratoma formation. However, despite their high efficacies, such chemical-based approaches may carry unexpected toxicities on specific differentiated cell types. We aimed to develop a novel type of suicide gene using KillerRed (KR), an artificial photosensitizer protein, to selectively induce phototoxicity using visible light with no chemical treatment for cell death induction. Murine PSCs (mPSCs) where KR expression was exclusively expressed while pluripotency is maintained (KR-mPSCs) were eliminated by a single exposure to visible light by production of reactive oxygen species (ROS). Due to this highly selective phototoxicity in KR-mPSCs, visual light exposure successfully inhibited teratoma formation. In particular, endothelial cells derived from KR-mPSCs remained fully functional *in vitro* and *in vivo* regardless of light exposure. This 'proof of concept' study suggests that a genetic approach in which KR is expressed in a tightly controlled manner would be a viable 'chemical-free' strategy to inhibit teratoma formation for future safe PSC-based therapies toward number of ischemic diseases.

JKS-11

A role of yeast Rad2p in lifespan and mutagenesis regulation by cell cycle and actin dynamics regulation

Sung-Keun Lee

College of Medicine, Inha University, Korea

The xeroderma pigmentosum group G (XPG) gene encodes an essential element in nucleotide excision repair (NER). Mutations in the human XPG gene cause Cockayne syndrome (CS) and xeroderma pigmentosum (XP). By applying genetic and biochemical approaches, we have analyzed the role of *RAD2*, the *Saccharomyces cerevisiae* counterpart of XPG, in the unknown cellular functions. Rad2p interaction with PCNA through its PCNA-binding domain plays a role in UV-induced mutagenesis. Our results provide evidences indicating that the Rad2p-PCNA interaction might be responsible for mutagenesis control in the general NER pathway.

In addition we characterized the mutational phenotypes of *RAD2* C-terminal deletion, which resembles the XPG mutation found in XPG/CS cells. *RAD2* C-terminal deletion caused cell growth arrest, the cell cycle stalling, a defective alpha-factor response, shortened lifespan, cell polarity defect, and misregulated actin-dynamics after DNA damage. These results provide insights into the role of *RAD2* in post-UV irradiation cell cycle regulation and actin assembly, which may be an underlying cause of XPG/CS.

Key Words : *S. cerevisiae*, *XPG/RAD2*, Cockayne syndrome

JKS-10

Role of cellular senescence in lung aging

Masataka Sugimoto

Laboratory of Cell Biology, National Center for Geriatrics and Gerontology, Japan

Senescent cells accumulate in many tissues as animals age, however, little is known about their physiological roles of tissue aging. To investigate the role of cellular senescence, we generated model mouse in which senescent cells can be ablated using toxin receptor cell-knockout system. These mice express luciferase and toxin receptor under upon senescence, thereby enabling the detection and elimination of senescent cells *in vivo*. Luciferase activity was detected in lung and adipose tissues within 12 month of age, which well-correlates with the increase in endogenous senescent cell markers.

Lung aging is characterized by increased lung compliance, which is attributed to the progressive loss of elastic fibers in the tissue. Elimination of senescent cells from lung tissue in aged animals significantly restored the lung compliance with concomitant increase in the elastin fibers. Additionally, microarray analysis revealed that the elimination of senescent cells reversed the expression of many aging-associated genes in the lung. Together, these results suggest that aging-associated lung phenotypes are, at least in part, attributed to the senescent cell accumulation in the lung, which can be reversibly recovered by inhibiting the function of senescent cells.

Key Words : Senescence, Lung

JKS-12

Comparative analysis of miRNA expression profiles in young and old myoblast

Kwang-Pyo Lee, Ph.D.

Aging Research Institute, Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology

Adult skeletal muscle degenerates progressively, losing mass (sarcopenia) over time, which leads to physical disability and age-related disease such as diabetes, cardiovascular disorders and hypertension. It's a well-known fact that the number of adult muscle stem cells was decreased and its ability to repair diminished during muscle aging process. Functional decline of aged muscle stem cells was thus one of the major factors to provoke sarcopenia. To determine the role of miRNAs in decreased myogenic capability of old myoblasts, we analyzed miRNA expression profiles in young and old myoblasts using next-generation sequencing (NGS). Among 118 mature miRNAs that showed significant changes (>2-fold) between young and old myoblasts, 47 miRNAs were significantly ($P < 0.05$) upregulated and 71 miRNAs downregulated in old myoblasts. Several reports revealed that TGF- β signaling inhibit muscle differentiation, resulting in delayed muscle regeneration in old mice. Of interests, we found that protein levels of Smad4, one of TGF- β signaling effectors, are up-regulated in old myoblasts. We showed that knockdown of Smad4 significantly reversed the delayed muscle differentiation of old myoblasts. To understand the biological significance of age-regulated miRNAs in impaired myogenesis during muscle aging, we used the target prediction tools to predict the putative regulatory miRNAs of Smad4. As a result, we found that miR-B directly binds 3' UTR of Smad4 mRNA and thereby promotes differentiation and regeneration of old skeletal muscle. These results suggest that miR-B, one of the down-regulated miRNAs in old myoblasts, plays a crucial role in maintenance of myogenic capability of muscle stem/progenitor cells during muscle aging.

JKS-13

Inflammatory stimuli induce inhibitory S-nitrosylation of SIRT1 to increase acetylation and activation of p53 and p65.

Shohei Shinozaki

Arteriosclerosis and Vascular Biology, Tokyo Medical and Dental University Graduate School

Blocking effects of nitric oxide on SIRT1 protein could disrupt inflammation associated with diabetes, atherosclerosis, Parkinson's disease. We found that the action of the signaling molecule nitric oxide on the regulatory protein SIRT1 is required for the induction of inflammation and cell death in cellular and animal models of several aging-related disorders. Since different pathological mechanisms have been identified for diseases like type 2 diabetes, atherosclerosis and Parkinson's disease, it has been assumed that therapeutic strategies for those conditions should also differ. In contrast, our findings identified nitric oxide-mediated inactivation of SIRT1 – believed to be a longevity gene – as a hub of the inflammatory spiral common to many aging-related diseases, clarifying a new preventive molecular target. SIRT1 is known to suppress the activity of both NF- κ B and p53, and since its dysregulation has been associated with models of several aging-related conditions. We revealed that S-nitrosylation inactivates SIRT1 by interfering with the protein's ability to bind zinc, which in turn increases the activation of p53 and of a protein subunit of NF- κ B in vitro. Additional experiments pinpointed the S-nitrosylation of SIRT1 as a critical point in the chain of events leading from nitric oxide expression to cellular damage and death.

JKS-14

Identification of a novel senescence inducer, SENT1 that converts p53-induced cell cycle arrest into senescence by interacting with nuclear pore protein Nup62

Deug Y. Shin

Department of Microbiology, Dankook University College of Medicine

The p53 tumor suppressor can induce various fail-safe programs such as cell cycle arrest, apoptosis, and senescence, but the mechanisms determining cell fate upon p53 activation are poorly understood. Several small-molecule activators of p53 have been developed, including Nutlin-3, but their therapeutic potential is limited by the fact that they induce reversible cell cycle arrest in most cancer cell types. This study demonstrates a cloning and identification of a novel gene SENT1 that converts a p53-induced cell cycle arrest into senescence. Tumor cells re-entered into the cell cycle after growth arrest upon treatment with Nutlin-3 or infection with a p53-encoding adenovirus; however, SENT1-expressing cells did not re-enter into the cell cycle after removal of Nutlin-3a, entering into irreversible growth arrest without affecting expression of p53 and p21. We further found that SENT1 interacted with Nup62, which is a plug protein of nuclear pore complex. While enforced expression of Nup62 resulted in the significant suppression in SENT1-mediated senescence, Nup62 knockdown, like SENT1 expression, led to the induction of senescence upon Nutlin-3 treatment, indicating that SENT1 interacts with and negatively regulates Nup62. Recent studies have suggested that WT p53-induced phosphatase (Wip1) and phosphoprotein phosphatase catalytic subunit (PP4) are required to re-enter into the cell cycle from DNA damage-induced arrest. Nuclear translocation of PP4, but not Wip1, was inhibited by SENT1 expression or Nup62 knockdown, indicating that Nup62 is required for nuclear translocation of PP4, but SENT1 inhibited through interacting with Nup62. Therefore, these results suggest that SENT1 converts p53-induced cell cycle arrest into senescence through inhibiting Nup62-mediated PP4 nuclear translocation.

【日本老年医学会発表演題】 口頭発表

OE-4

脂肪組織の老化関連 T 細胞は肥満に伴う脂肪組織の炎症を負に制御する

○新村 健
兵庫医科大学総合診療科

【目的】加齢に伴う個体の免疫機能の変化は、免疫老化と呼ばれ、老化関連疾患と密接に関連している。糖尿病は老化関連疾患の一つであり、一方、糖尿病状態は老化を促進すると推測されている。本研究では、老化した免疫細胞集団である老化関連 T 細胞が糖尿病の発症に関与するか、糖尿病状態が老化関連 T 細胞を誘導して個体の老化を加速しているかを明らかにすることを目的とした。

【方法】8 週齢の若年マウスと 100 週齢の加齢マウス、高脂肪食負荷による食事性肥満マウスと通常食摂取対照マウスに oGTT、ITT を行い耐糖能とインスリン抵抗性を評価した。それぞれのマウスより脂肪組織を摘出し、脂肪組織の PD-1 陽性記憶型 T 細胞の数、割合を FACS で解析した。さらに抗 PD-1 抗体治療により老化関連 T 細胞の除去した場合の、耐糖能とインスリン抵抗性への影響を検討した。

【結果】加齢マウスでは若年マウスに比べ耐糖能低下とインスリン抵抗性が認められた。加齢マウスの脾臓細胞と脂肪組織では老化関連 T 細胞の割合が増加していた。食事性肥満マウスでもインスリン抵抗性が認められ、脂肪組織においてマクロファージ増加に先行し、老化関連 T 細胞の増加を認めた。加齢マウス、食事性肥満マウスにおいて老化関連 T 細胞の除去により、耐糖能異常とインスリン抵抗性は改善し、脂肪組織においては、マクロファージの減少並びにその M1 から M2 への極性の変化、制御性 T 細胞の増加が認められた。

OJ-6

レスベラトロール (RES) は骨芽細胞におけるプロスタグランジン F2 α (PGF2 α) によるオステオプロテジェリン (OPG) 産生を抑制する

○徳田 治彦¹、谷川 隆久¹、原田 敦²、新飯田 俊平³
¹国立長寿医療研究センター臨床検査部、²整形外科、³バイオバンク

【目的】高齢社会において骨粗鬆症対策の重要性は論を待たない。RES は赤ワイン等に豊富に含まれる天然ポリフェノールであり、抗酸化・抗炎症作用を有し健康長寿に資すると考えられている。RES の作用の一部はサーチュイン 1 (SIRT1) を介することが知られているが、その詳細は明らかではない。一方、OPG は骨芽細胞により産生され、receptor activator of nuclear factor κ B (RANK) /RANK ligand 系の抑制を介して、破骨細胞による骨吸収を制御する生理活性物質として知られている。既に私共は骨芽細胞培養系において、PGF2 α が p44/p42 mitogen-activated protein kinase (MAPK)、p38 MAPK および SAPK/JNK を活性化することを報告している。今回は、PGF2 α による OPG 産生および RES の作用について検討した。

【方法】マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞を 10% FCS を含む α -MEM 培地で 5 日間培養した後、培地を 0.3% FCS を含む α -MEM とし 48 時間後実験に供した。細胞を RES、SIRT1 の活性化物質である SRT1720、p44/p42 MAPK 阻害剤である PD98059、p38 MAPK 阻害剤である SB203580 および SAPK/JNK 阻害剤である SP600125 による前処置の後、PGF2 α で刺激した。培地中の OPG を ELISA 法にて、細胞内の OPG mRNA レベルを RT-PCR 法にて、p44/p42 MAPK、p38 MAPK および SAPK/JNK のリン酸化を Western blot 法にて解析した。

【結果】RES は PGF2 α 刺激による OPG 遊離および OPG mRNA レベルを抑制した。SIRT1 は PGF2 α による OPG 遊離を抑制した。PD98059、SB203580、SP600125 は PGF2 α による OPG 産生を抑制した。RES および SIRT1 は PGF2 α による p44/p42 MAPK、p38 MAPK および SAPK/JNK のリン酸化を抑制した。【結論】骨芽細胞において、RES は p44/p42 MAPK、p38 MAPK および SAPK/JNK の活性化を阻害し、PGF2 α による OPG 産生を抑制することが強く示唆された。

OE-7

Alzheimer 病モデルマウスおよび患者脳における Tau-Tubulin-kinase1 (TTBK1) による軸索変性について

○浅井宏英
ボストン大学神経薬理学

【目的】TTBK1 は casein kinase スーパーファミリーに属し、その遺伝子多型は 2 つのコフォートスタディーで高齢発症 AD にリンクしている。我々は既に TTBK1 トランスジェニックマウスを作製し、月齢依存的なタウのリン酸化および認知機能低下がその主たる表現型であることを報告している。今回我々は TTBK1 がタウや collapsin response mediator protein-2 (CRMP2) などの微小管関連タンパクの機能維持および軸索伸長に関与するかを検討した。さらに高齢 AD 患者脳において、TTBK1 の発現パターンおよび CRMP2 の病的リン酸化に変化がみられるかも検討した。

【方法】TTBK1 トランスジェニックマウスに Tg2576 アミロイドマウス (APP) を交配し、タウおよび CRMP2 の病的リン酸化および軸索変性を生化学的、組織病理学的に検討した。また高齢 AD 患者脳にて Braak stage 間で TTBK1 の発現に変化がみられるかも検討した。

【結果】APP/TTBK1 ダブルトランスジェニックマウスにおいて著しい軸索変性が認められ、タウや CRMP2 の蓄積が嗅内皮質の神経細胞体および海馬歯状回で見られた。患者脳染色でも TTBK1 は病期とともに過剰発現しており、TTBK1 の発現と相関して CRMP2 の病的リン酸化も見られた。

【結論】これらより TTBK1 の過剰発現がアルツハイマー病における嗅内皮質や海馬での軸索変性に強く関与している可能性が示唆された。

OJ-8

マウスの加齢性筋力低下を評価する新規握力測定法の有用性

○竹下ひかり、山本浩一、樂木宏実
大阪大学大学院医学系研究科 老年・腎臓内科学

【目的】実験動物を用いたサルコペニア研究では筋力の変化を鋭敏に検出する手法が求められる。特に速筋成分の筋力を反映する握力はサルコペニア研究において重要な指標であるが、従来の方法では検査間の変動が大きく筋力を正確に反映しない問題が存在する。一方、筋力検査法として広く用いられるトレッドミル検査は実験動物の性質に依存し個体間の変動が非常に大きい問題がある。またトレッドミル検査での走行距離は遅筋成分を反映する持久力の指標であると考えられる。我々はマウスにおける従来の握力測定法を改変しサルコペニア研究における有用性を検討している。今回の検討では改変した握力測定法を従来の方法やトレッドミルテストと比較する。【方法】6 ヶ月齢のオス C57BL6 マウス 8 匹に対し、従来の握力測定法と改変した握力測定法を各 6 回/日で 6 日間施行した。疲労の影響を除外するため従来法と改変法の施行順は毎日入れ替えた。検査間変動は各マウスの一日における 6 回検査値の標準偏差 (SD) と平均値 (Ave) から SD/Ave として算出し、日間変動は各マウス一日平均測定値の 6 日間の SD/Ave として算出した。トレッドミル検査は 5 日間の馴化の後、6 日目より 6 日間試験を施行した。【結果】従来法と改変法での握力値は有意な相関を認めた。改変法での握力平均値は 6 日間通して従来法の握力平均値に比し有意に高値であった。全マウス握力の日間変動と 6 日間平均検査間変動は改変法で従来法に比し有意に低値であった。トレッドミル検査での走行距離は従来法、改変法の握力値のいずれとも相関を認めなかった。トレッドミル検査の日間変動はいずれの握力測定法より高値であった。【結論】改変した握力測定法での測定値は従来法よりも高値で検査間のバラつきが少なかった。また握力はトレッドミル検査での走行距離と異なり、速筋成分の筋力を反映する、より正確な指標であることが示唆された。

OJ-10

PDE3 阻害剤シロスタゾールの cAMP・PPAR γ /HGF 系を介した血流改善・骨格筋再生機構の解明

○谷山 義明¹, 眞田 文博¹, 大津 礼¹, 杉本 研², 山本 浩一², 樂木 宏実², 森下 竜一¹
¹大阪大学医学部臨床遺伝子治療学, ²大阪大学医学部・老年・腎臓内科

【目的】高齢化に伴い全身の動脈硬化は進行する。代表的な動脈硬化疾患である閉塞性動脈硬化症 (ASO) の治療薬として PDE3 阻害剤シロスタゾール (CLZ) にはアスピリン (ASP) にはない間歇性跛行の改善効果が複数の大規模臨床試験で証明されている。しかし、そのメカニズムは不明であった。CLZ による虚血下肢機能改善メカニズムの解明を本研究の目的とする。

【方法】CLZ あるいは、ASP をマウスに服用させてマウスの動脈における HGF 分泌量を比較した。マウス ASO モデルを作製し、その後下肢血流を経時的に測定し 1 ヶ月後に下肢筋肉内の血管数、下肢血流を比較した。さらに、下肢骨格筋細胞の再生された数を比較検討した。また、血管系培養細胞にて HGF の作用を検討した。

【結果】CLZ 投与にて動脈の平滑筋細胞で HGF が著明に分泌されており ASP では変化がないことを確認した。さらに、CLZ が培養平滑筋細胞で PPAR γ を介する系と cAMP を介する系で HGF を上昇させ、内皮細胞の eNOS のリン酸化を誘導すること、また ROS のある状況で EGF 受容体をユビキチン-プロテアソーム系で分解しての内皮細胞や EPC の老化抑制を確認した。一方、マウス ASO モデルにおいては CLZ 投与群において、下肢血流、下肢血管数、再生骨格筋細胞は有意に増加していたが、HGF 中和抗体を加えることによってこれらの作用は消去され、ASP 群にはこのような作用はなかった。

【結論】アスピリンにはないシロスタゾールの閉塞性動脈硬化症の間歇性跛行の改善作用の機序として、平滑筋細胞由来の cAMP・PPAR γ /HGF 系が内皮細胞に作用し機能的な血管新生を誘導すること、Pax7 陽性の骨格筋幹細胞に作用して筋肉の再生誘導することが示唆された。

OJ-16

様々な月齢のマウスを用いたバンコマイシンによる薬剤性腎障害の加齢変化

○瀧川 正紀¹, 森 淑子¹, 石神 昭人²

¹東京都健康長寿医療センター薬剤科, ²東京都健康長寿医療センター研究所分子老化制御

【目的】高齢者はバンコマイシン (VCM) による薬剤性腎障害を発症しやすいが、その発症機序は不明である。本研究では、高齢者の VCM による薬剤性腎障害の発症機序を解明するため、様々な月齢のマウスを用いて VCM による薬剤性腎障害を生化学的、病理学的に検討した。

【方法】東京都健康長寿医療センター研究所動物施設で飼育した 1、3、6、12、24 か月齢の雄マウス (C57BL/6NCR) を 5 匹ずつ、VCM を 3 日間投与する群 (3 日投与群) と 14 日間投与する群 (14 日投与群) に分けた。VCM は 1 日 1 回、400 mg/kg を腹腔内投与した。3 日間および 14 日間投与後、採血、腎臓、肝臓を摘出した。血液は生化学検査、腎臓と肝臓は HE 染色、PAS 染色、PAM 染色、AZAN 染色による病理学的解析を行った。【結果】生化学的解析では、3 日投与群の血漿クレアチニン、尿素窒素は、1、3、6、12 か月齢に比べて 24 か月齢で有意に上昇した ($P < 0.05$)。14 日投与群では、1、3、6 か月齢に比べて 12 か月齢で有意に上昇した ($P < 0.05$)。AST、ALT は各群で有意差は無かった。腎臓の病理解析により、3 日投与群では全ての月齢の腎臓で内腔が拡張、脱落した尿管、間質の浮腫が認められた。14 日投与群では、同様の所見に加え、腎組織の線維化が認められた。また、14 日投与群では、1、3、6 か月齢の腎臓で円柱中に炎症細胞の浸潤が認められたが、12、24 か月齢では軽度であった。肝臓の病理解析では、各群で顕著な差は無かった。

【結論】VCM 投与により腎障害を発症し、その程度は 12 か月齢以降で悪化することがわかった。腎臓の病理学的解析では、1、3、6 か月齢と 12、24 か月齢では、投与期間により所見が異なることが明らかとなった。また、月齢の違いによる肝臓への影響は少なかった。これらの結果より、高齢マウスでは、ヒトと同様に VCM による薬剤性腎障害を発症しやすく、その程度も酷いと考えられる。

OJ-12

選択的エストロゲン調節薬 (SERM) は閉経モデルマウスにおける血管老化および動脈硬化の進展を抑制する

○宮内 孝浩, 池田 義之, 岩林 正明, 佐々木 雄一, 赤崎 雄一, 宮田 昌明, 大石 充鹿
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科心臓血管・高血圧内

【目的】女性は閉経後に血管の老化や動脈硬化が進展し、心血管イベントが増大することが知られているが、その機序はまだ不明な点が多い。本研究は、その機序を明らかにし、治療法を検討することを目的としている。

【方法】易動脈硬化発症モデルマウスである雌 ApoE ノックアウトマウスを用いた。12 週齢時に卵巣摘除群と sham 手術群を作成。12 週間後に大動脈を摘出し、血管老化を Senescence-associated beta-galactosidase (SA- β Gal) 染色やアセチル (Ac)-p53・p21・PAI-1 蛋白発現にて、動脈硬化を Oil Red O 染色にて各々比較検討した。また、卵巣摘除後に、選択的エストロゲン調整薬 (SERM) を投与した群と同量の溶媒を投与したコントロール群の 2 群を作成し、同様の検討を行った。

【結果】卵巣摘除群では sham 群と比較し血管老化および動脈硬化が進展した (SA- β Gal: 8.6 ± 1.6 vs $15.8 \pm 3.8\%$, $p < 0.05$, Ac-p53: 1.2 ± 0.3 vs 2.3 ± 0.3 , $p < 0.05$, p21: 1.2 ± 0.4 vs 2.1 ± 0.3 , $p < 0.05$, PAI-1: 1.0 ± 0.2 vs 1.8 ± 0.3 , $p < 0.05$, Atherosclerosis: 14.8 ± 3.6 vs $26.8 \pm 2.9\%$, $p < 0.05$)。卵巣摘除群では sham 群と比較し抗老化因子 Sirt1 発現や血管内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) の活性が低下した (Sirt1: 1.0 ± 0.2 vs 0.5 ± 0.3 , $p < 0.05$, p-eNOS/eNOS: 1.0 ± 0.1 vs 0.6 ± 0.1 , $p < 0.05$)。SERM 投与により Sirt1 発現および eNOS 活性が上昇し、血管老化や動脈硬化の進展が抑制された。この SERM による抗血管老化・抗動脈硬化効果は、eNOS 阻害薬の L-NAME 投与や、Sirt1 阻害薬の Sirtinol 投与により消失した。また、eNOS 阻害では SERM による Sirt1 発現亢進効果が消失した。

【結論】SERM は卵巣摘除による eNOS 活性低下に伴う Sirt1 発現低下を介した血管老化および動脈硬化進展を回復させる。

OJ-20

血管構成細胞における核一細胞質間輸送の加齢変化の検討

○岩井 邦充, 奥野 太寿生, 姫野 太郎, 森田 卓朗, 矢野 浩, 入谷 敦, 大黒 正志, 森本 茂人
金沢医科大学高齢医学科

【目的】細胞質から核内への情報伝達蛋白の輸送 (核移行)、および核内から細胞質への mRNA の輸送は、それぞれ特定の輸送因子 (蛋白) に結合し核膜孔を通過することで行われる。輸送の加齢による変化の詳細は解明されていない。本研究では血管平滑筋細胞、内皮細胞における輸送蛋白の発現と局在の加齢変化とともに、輸送の加齢変化も例を挙げて検討した。

【方法】ラット・マウス大動脈組織と培養平滑筋細胞において、核移行を担う蛋白 importin α , β 、および核から細胞質への排出を担う蛋白 Tpr に対する免疫組織化学とウエスタンブロットを施行、加齢による発現変化を追跡した。培養平滑筋細胞において、炎症性サイトカイン刺激後に p65 の免疫細胞化学を指標にして活性化 NF κ B の核移行の加齢変化を検討した。また、Tpr mRNA を siRNA によりノックダウンし、P21 発現検索と β ガラクトシダーゼ染色を施行した。

【結果】ラット・マウス胸部大動脈壁では中膜平滑筋細胞および内皮細胞の核に各 importin と Tpr の免疫原性を認めた。加齢により、importin $\alpha 1$, $\beta 1$ は増加、 $\alpha 2$ は変化せず、Tpr は減少傾向を示した。importin $\alpha 1$, $\beta 1$ の免疫原性は中膜各層で不均一であった。培養ラット平滑筋細胞に対し TNF α あるいは IL-1 β 刺激により NF κ B が核移行したが、この程度は高齢ラット由来細胞ほど増強した。また、培養平滑筋細胞において Tpr mRNA をノックダウンすると、P21 発現が増強、 β ガラクトシダーゼ染色性を認めた。

【結論】加齢によって、血管構成細胞の核輸送を担う蛋白群の発現量と分布は変化し、NF κ B の核移行程度も変化し、加齢による炎症惹起性変化の一因になることが示唆された。また Tpr は老化に関与することが示唆された。

OJ-22

加齢に伴う動脈硬化形成過程におけるマクロファージでの脱ユビキチン化酵素 CYLD (cylindromatosis) の病態生理学的役割の検討

○今泉 友希¹、鷹見 洋一¹、中神 啓徳²、山本 浩一¹、樂木 宏実¹
¹大阪大学大学院医学系研究科 老年・腎臓内科、²大阪大学大学院 健康発達医学

【目的】 老化に伴う動脈硬化は最も重要な予後規定要因であり、慢性炎症が多分に寄与するため、その制御分子は健康長寿延伸に繋がる治療標的となり得る。我々は家族性円柱腫症の原因遺伝子 CYLD が血管において NF- κ B 経路におけるアダプター分子 TRAF2 を脱ユビキチン化し、急性炎症による血管リモデリングを抑制することを報告してきた。本研究では血管における慢性炎症で中心的な役割を担うマクロファージ (M ϕ) において CYLD が加齢性に低下することに着眼し、loss-of-function の解析により CYLD が老化に伴う動脈硬化進展に寄与する可能性を検討した。

【方法】 M ϕ の cell line である RAW264.7 において siRNA を用いて CYLD をノックダウンし酸化 LDL を添加し、その取り込みを oil red O 染色を用いて評価した。更に CYLD ノックアウトマウスの腹腔 M ϕ または siRNA により CYLD をノックダウンした RAW264.7 に TNF- α または酸化 LDL を添加し、リアルタイム PCR により M ϕ における炎症性分子及び脂質代謝に関わる遺伝子の発現変化を検討した。

【結果】 CYLD ノックアウトマウスの腹腔 M ϕ に TNF- α を添加すると野生型に比し、炎症性分子 TNF- α や IL-1 β 、MCP-1 の有意な発現上昇を認めた。また、CYLD をノックダウンした RAW264.7 に酸化 LDL を添加するとコントロールに比し、酸化 LDL の有意な取り込みの増加が認められた。更に脂質代謝関連分子の発現を検討するとシヤペロン分子である FABP4 の増加と共に、炎症性分子 TNF- α や IL-1 β 、MCP-1 の発現上昇、スカベンジャー受容体である CD36 や LOX-1、SR-A の発現上昇、コレステロールエステル合成酵素である ACAT1 の上昇が認められた。

【結論】 以上の結果より M ϕ における CYLD の低下が加齢性の炎症に伴う粥種形成やその不安定化に関与している可能性が示唆された。

OJ-26

オートファジー関連物質 Beclin 1 の頸動脈硬化病変での発現—第二報—

○馬原 孝彦¹、山川 仁子¹、高田 祐輔¹、伊藤 昭三²、羽生 春夫¹
¹東京医大高齢診療科、²新渡戸文化短大臨床検査学科

【目的】 頸動脈プラーク安定化には、病期ごとの相反する機序での介入が必要とされる。オートファジーの関与としてはオートファゴソーム増加が報告されており、マクロファージ細胞死を予防することでプラークが安定すると推測されている。しかし細胞死を起こしたマクロファージはオートファジーにより分解することで安定化すると推測できる。よって頸動脈プラークの病期ごとのオートファジー制御 (活性化または抑制) が必要となろう。そのためにオートファジー関連物質の発現様式の検討が重要である。Beclin 1 はオートファジー実行に関与する。昨年度の本学会にてヒト頸動脈プラークでの Beclin-1 発現について報告した。今回は例数を追加し、また Beclin-1 発現細胞の同定を蛍光二重染色で行った。またヒト主幹脳動脈における Beclin 1 の発現についての検討も追加した。【方法】 頸動脈内膜剥離術施行 14 例 (東京医大脳神経外科) の頸動脈プラークおよび剖検 7 例の主幹脳動脈標本を用いた。組織染色として HE・EVG・Masson Trichrome 染色を行った。免疫組織化学として抗 Beclin-1 蛋白を一次抗体とし A B C 法にて D A B 染色とした (共同研究者: 都医学研究所脳病理形態: 内原俊記)。細胞成分の同定のためマクロファージのマーカーとして抗フェリチン抗体を用い蛍光免疫二重染色を施行し共焦点レーザー顕微鏡にて局在を検討した。

【結果】 主幹脳動脈全例で肥厚内膜内の泡沫細胞を含めた細胞の細胞質を中心に Beclin-1 の発現を認めたが頸動脈プラークでの発現よりは軽度であった。蛍光免疫二重染色では抗フェリチン抗体陽性細胞の一部で Beclin 1 の陽性像を認めた。

【結論】 主幹脳動脈の泡沫細胞で頸動脈プラークと同様に Beclin 1 の発現を認めた。頸動脈プラークでの Beclin 1 発現がマクロファージで行われていることを確認した。

OJ-24

運動介入が老化促進モデルマウスのサルコペニアに及ぼす影響

○井上 愛子¹、葛谷 雅文¹、成 憲武²、黄 哲³、佐々木 健⁴、胡麗娜⁵、姜海英¹、木村 薫¹、小笠原 真雄¹
¹名古屋大学院医・地域在宅医療学・老年科学、²名古屋大学未来社会創造機構、³産業医科大学、⁴浜松医科大学、⁵日本学術振興会

【目的】 老化促進モデルマウス (SAMP10) を用いてエクササイズによる加齢性筋肉量および筋力低下の予防効果を検討した。

【方法】 【方法】 SAMP10/Ta Slc、8 週齢を運動介入群 (25 週齢に運動を開始、4 ヶ月間運動を継続) と非運動介入 (対照) 群に分け比較検討した。40 週齢にて両側の下腿腓腹筋とヒラメ筋を摘出し、比較した。【結果】 【結果】 持久力は対照群で加齢に伴って徐々に低下したが、運動介入群では持久力の有意な増加を認めた。対照群に比べ、運動介入群において筋湿重量体重比 (ヒラメ筋と腓腹筋) の改善を認めた。一方、平均単一筋細胞面積は腓腹筋において運動介入群で有意な低下を認めた。運動介入群の握力体重比は、一旦下がるものの回復を示したが、対照群において改善は認められなかった。運動介入群では、両骨格筋においてユビキチンリガーゼ (Atrogen, MuRF) とアポトーシス誘導因子 (caspase-9) 発現が低下する一方、Akt, ERK-1/2, mTOR, FoxO-1, FoxO-3 のリン酸化、insulin receptor substrate-1 や抗アポトーシスタンパク因子 (Bcl-2, Bcl-XL) 発現亢進とミトコンドリア機能改善が認められた。

【結論】 【考察】 運動介入により、筋タンパク質の分解系を抑制し、ミトコンドリア機能を改善し、サルコペニアを予防できる可能性が示唆された。

OJ-28

ストレス老化シグナルによる解糖系ユビキチン化制御とその病態意義

○三河 拓己¹、近藤 祥司²

¹京都大学 医学部附属病院、²京都大学 医学部附属病院 高齢者医療ユニット

【目的】 癌細胞の特性の一つに、解糖系代謝の亢進があり、Warburg 効果と呼ばれている。従来、Warburg 効果は癌細胞の低酸素環境に対する適応戦略と考えられてきたが、通常酸素環境下でも癌培養細胞では解糖系亢進維持され、低酸素適応だけでは説明できない謎が残った。最近注目されるもう一つの癌細胞の特性に、細胞老化抑制がある。正常細胞の分裂寿命は有限である一方、癌細胞は老化しない。また、様々なストレスが細胞老化誘導することが明らかとなり、細胞老化は癌化に対する防御機構として働くことが判明しつつある。しかし、Warburg 効果と細胞老化の分子連関は必ずしも明らかでない。本研究は PGAM の分子制御による細胞老化機構の解明を目指す。

【方法】 分子生物学的手法を用いて、ストレス老化誘導時の PGAM 制御機構の解析を行った。

【結果】 当研究室では、MEF 細胞におけるストレス細胞老化抑制因子のスクリーニングにより、解糖系酵素 PGAM を同定した。(近藤他 Cancer Res 2005)。これより癌抑制機構としての PGAM を介した老化制御機構の存在と、その機構破綻による細胞癌化の可能性が示唆された。さらに PGAM 制御機構を詳細に検討し、(1) PGAM が DNA 損傷や発癌ストレス依存的にユビキチン分解を受け、(2) これらのストレスによる PGAM ユビキチン化には、Pak1 によるリン酸化修飾が必要であること、(3) さらにユビキチン化修飾酵素 Mdm2 を同定した。PGAM をユビキチン化できない Mdm2 変異はある条件では oncogenic であることも見出した。

【結論】 PGAM 分解・不活性化による細胞老化誘導とその分子機構が、Warburg 効果とストレス老化シグナル抵抗性を結ぶ分子接点として明らかになった (三河他, J Cell Biol. 2014, 三河他, J Cytol Histol. 2014, 三河他, CSTI. 2014, 津坂他, Gene to Cell. 2014)。

【日本老年医学会発表演題】ポスター発表

P-68

ApoB48 受容体発現制御メカニズムの解析

○吉田 和馬、篠崎 昇平、下門 顕太郎
東京医科歯科大学大学院 血流制御内科学

【目的】 ApoB48 受容体は、単球やマクロファージなどの細胞に存在しており、高トリグリセリドの病的状態では、動脈硬化惹起に働くと考えられているが、その制御因子や生体内での詳細な機能についてはあまり知られていない。そこで、動脈硬化に関連する因子としてマクロファージのフェノタイプによる影響に着目し、ApoB48 受容体発現量との関連を調べるとともに、高脂血症モデルマウスである ApoE-ko マウスを用いて、生体内での ApoB48 受容体の機能を調べた。

【方法】 炎症性/抗炎症性サイトカインを用いて RAW264.7 細胞を M1/M2 マクロファージに誘導して ApoB48 受容体の発現量の変化を調べた。また、ApoE-KO マウスを用いて、高脂血症状態での ApoB48 受容体の発現量と単核球の泡沫化を調べた。

【結果】 フェノタイプの差異は ApoB48 受容体発現量に影響を及ぼさなかった。これまでの報告どおり、血中にカイロミクロンや VLDL レムナントを多く含む ApoE-KO マウスでは、ApoB48 受容体 mRNA 発現量が野生型と比べて増加傾向にあった。しかしながら、末梢血中に泡沫化した細胞は見られなかった。

【結論】 異なるフェノタイプのマクロファージでは、ApoB48 受容体発現量が増加すると仮定したが、受容体の発現量に変化はなかった。したがって、ApoB48 受容体は構成的に発現し、サイトカイン等の影響を受けにくい受容体と考えられる。また、ApoE-ko マウスでは、ApoB48 受容体の発現量が増え脂質の取り込みが増加していると予想されるが、泡沫化した細胞は見られなかった。リンパ球を欠損した SCID マウスが高脂血症を呈するという報告や、HIV 感染者の合併症として高トリグリセリド血症が生じるという報告があることから、細胞内に取り込まれたカイロミクロンは速やかに代謝・分解されることが考えられる。

Keywords : ApoB48 受容体、高脂血症モデルマウス、マクロファージ

P-70

空間認知機能障害と海馬歯状回神経機構

○新郷明子¹⁾、鬼頭昭三²⁾、小林哲郎¹⁾、村勢敏郎¹⁾
¹⁾ 冲中記念成人病研究所研究部神経科学部門、²⁾ 茅ヶ崎徳洲会クリニック

【目的】 脳室内ストレプトゾトシン注入ラット (STZ-3V ラット) “脳の糖尿病” ラットはアルツハイマー病のモデルとしての意味を持つ。このラットの海馬歯状回顆粒細胞層 dendrite の spine density の立場から、このモデルの初期病変とその病因的意義を探索することを目的とした。

【方法】 STZ-3V ラットについてモリス水迷路による行動科学的検査、海馬での関連物質免疫組織化学的検査とともに海馬歯状回顆粒細胞層の個々のニューロン樹状突起の spine density を算定した。これらの結果を STZ-3V ラットの脳室内にインスリン注射をした前後で比較した。

【結果】 STZ-3V ラットでは空間認知機能の低下が顕著であり、インスリン分解酵素、インスリン受容体、AKT の低下、アミロイドβ蛋白の上昇がみられ、インスリン注射によって回復した。perforant pathway からの興奮性入力場としての spine density は、すべての spine class で減少を示した。インスリンによる density の回復は見られなかった。

【結論】 “脳の糖尿病” ラットの空間認知機能障害の一次的变化は脳内インスリン・シグナリングの異常に起因する海馬への入力障害である。

Keywords : 空間認知機能、インスリン・シグナリング、海馬

P-69

S-ニトロソ化を介したメタボリックシンドローム発症メカニズムの解明

○青柳 奏美、篠崎 昇平、下門 顕太郎
東京医科歯科大学大学院 血流制御内科学

【目的】 生活習慣病などの様々な疾患に慢性炎症が深く関わっていると考えられている。近年、炎症によって誘導された一酸化窒素合成酵素 (iNOS) によって合成される一酸化窒素 (NO) がタンパク質の S-ニトロソ化を起こすことが明らかとなった。今回、炎症とメタボリックシンドローム発症のつながりを明らかにするために以下の実験を行った。

【方法】 脂肪細胞に分化させてから 10 日目の 3T3-L1 細胞を用い、NOR5 (NO ドナー) を作用させ、アディポネクチンの遺伝子発現量を定量 RT-PCR で測定した。同様に、アディポネクチンの発現に関与する転写因子についても測定を行った。また、抗酸化物質であるスルフォラファン (SFN) を作用させ、アディポネクチンの発現を測定した。

【結果】 NO によってアディポネクチンの遺伝子発現は低下した。Klf5, Klf9, Sp1 は有意に増加し、PPAR γ 、Klf15 は発現が有意に低下した。また、PPAR γ の S-ニトロソ化は有意に増えていた。SFN を作用させると、24 時間作用させた場合にはアディポネクチンの発現に有意差はなかったが、48 時間以降では発現の増加がみられた。

【結論】 PPAR γ の発現は PPAR γ そのものによって誘導されることが知られており、PPAR γ の S-ニトロソ化による転写活性の低下が、アディポネクチンおよび PPAR γ の遺伝子発現量の低下を起こしたと考えられる。アディポネクチン産生低下の原因として、1) PPAR γ の S-ニトロソ化による転写活性の低下、2) Klf15 発現量の低下あるいは 3) Sp1, Egr1, Klf5, Klf9 の質的変化 (S-ニトロソ化) の可能性が考えられる。また、脱ニトロソ化を促進する物質として着目した SFN は、アディポネクチンの遺伝子発現を誘導した。現在、Sp1, Egr-1, Klf5, Klf9 の S-ニトロソ化および、SFN の脱ニトロソ化作用について検討している。

Keywords : 一酸化窒素 (NO)、S-ニトロソ化、アディポネクチン

【日本基礎老化学会発表演題】 合同ポスター

合 P3-1 (OJ-27)

神経老化における神経変性疾患と選択的オートファジー

○松本 弦、森 望
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科

晩期発症性神経変性疾患の発症と進行は神経老化が密接に関与していると考えられている。多くの神経変性疾患では、不溶性のタンパク質封入体に変性神経細胞に共通して観察されることから、神経細胞の老化がタンパク質分解機構に影響することで異常タンパク質が蓄積すると考えられるが、その分子機構については全く分かっていない。

我々は神経細胞において凝集タンパク質を分解する細胞内システムである選択的オートファジーに注目し、異常タンパク質の選択的オートファジーによる分解機構について調べた。その結果、p62/SQSTM1 のセリン 403 がリン酸化されることにより制御されていることを明らかにした (Matsumoto, Mol. Cell, 2011)。今回、この S403 リン酸化が選択的オートファジーの一般的な制御を担っていることを報告する。S403 のリン酸化は、Parkin 依存性 mitophagy の過程においても重要な役割を担っており、ユビキチン化されたミトコンドリアをオートファゴソームで包む過程に必須であることがわかった。これらの結果から、p62 のリン酸化状態を制御することで、神経変性疾患などにおける異常たんぱく質や傷害ミトコンドリアの分解を促進させることができる可能性が示唆された。現在、神経老化が p62 のリン酸化におよぼす影響について解析をすすめている。

合 P3-3 (OJ-4)

骨細胞における Mn-SOD の骨リモデリング制御機構

○清水孝彦¹、小林慶司^{1,2}、野尻英俊²、白澤卓二²、金子和夫²、
横手幸太郎¹
¹千葉大学・院医、²順天堂大学・院医

【背景】Mn-SOD (*Sod2*) はミトコンドリア酸化還元バランス維持に重要な役割を果たす。近年、骨細胞が骨代謝の調節細胞として注目されているが、骨細胞における *Sod2* の生理的役割は明らかにされていない。本研究は、骨代謝制御における骨細胞での *Sod2* の役割を明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】骨細胞特異的 Dmp1-Cre マウスを *Sod2* flox マウスと交配し、骨細胞特異的 *Sod2* 欠損マウス (*Sod2* cKO) を作製した。*Sod2* cKO 骨由来の骨細胞は有意なミトコンドリア活性酸素量の増加を認めた。また *Sod2* cKO マウス大腿骨の骨量を測定したところ、加齢依存的に顕著な骨量減少を認めた。組織学的解析では、*Sod2* cKO 皮質骨で骨細胞が消失した empty lacunae の割合が有意に増加し、かつ骨細管構造の不整と骨細管数の減少が認められた。興味深いことにヒト老齢骨の骨細胞構造と酷似していた。また *Sod2* cKO 骨は、骨形成低下と骨吸収亢進という骨リモデリング異常を認めた。骨髄細胞を除去した骨組織での骨関連遺伝子発現を調べたところ、*Sod2* cKO 骨で骨形成抑制因子 Sclerostin と骨吸収促進因子 RANKL 発現がいずれも顕著に増加し、骨量減少を裏付けた。初代骨芽細胞を用いた細胞実験では、長期培養による骨細胞分化時に石灰化結節形成の有意な抑制が認められ、骨形成細胞での機能低下を示した。

【考察】以上の結果から、*Sod2* cKO マウスは、骨細胞でのミトコンドリア酸化還元バランスの破綻による骨細管ネットワーク不全により、骨形成・骨吸収の不均衡に伴う骨量減少を引き起こした。SOD2 は骨細胞の骨細管ネットワークを介した骨リモデリング制御に重要な役割を担う事が判明した。

Keywords : SOD2, osteocyte, bone remodeling

合 P3-2

高齢女性の夜間頻尿に対する軽微な皮膚刺激の効果についての検討

○渡辺信博¹、飯村佳織^{1,2}、榎永浩一³、宮崎彰吾^{1,2,4}、金憲経⁵、箱谷豊³、
堀田晴美¹
¹都健康長寿研・自律神経、²帝京平成大院・健康科学研究科、³都健康長寿センター・泌尿器科、⁴帝京平成大・ヒューマンケア学部、
⁵都健康長寿研・自立促進と介護予防

【背景と目的】夜間頻尿を抱える人の割合は、加齢と共に増加する。夜間頻尿の病因のひとつに、過活動膀胱などの膀胱蓄尿障害がある。我々は、麻酔ラットにおいて、ローラーによる会陰部への軽い皮膚刺激が、膀胱の排尿収縮頻度を低下させること、その効果はローラーの素材に依存することを見出した。そこで今回、高齢者の夜間頻尿に対する軽微な皮膚刺激の効果を検討した。【方法】夜間頻尿 (夜間排尿回数2回以上) を有する 79 歳以上の高齢女性を対象とした。有効性が期待される弾性ポリマー製の柔らかいローラー (実ローラー) およびその対照刺激として、麻酔ラットの排尿収縮に影響を与えないポリスチレン製の硬いローラー (偽ローラー) を用い、無作為二重盲検交差試験を行った。各ローラーを用いた皮膚刺激は、就寝前に会陰部に対して参加者自身が 1 分間行った。介入前および介入中それぞれ 3 日間の夜間排尿回数を排尿日誌で記録した。過活動膀胱の有無を、過活動膀胱症状質問票で評価した。【結果】22 名が全調査日程を完了した。過活動膀胱を有する参加者 (9 名) の平均夜間排尿回数は、介入前 3.5 回だった。偽ローラー使用時は 3.4 回であったのに対して、実ローラー使用時は 2.8 回で、有意に少なかった。一方、過活動膀胱を有さない参加者の平均夜間排尿回数は、実・偽各ローラー使用時で有意な差はなかった。【結論】柔らかいローラーを用いた軽微な皮膚刺激は、過活動膀胱による夜間頻尿を緩和しうることが示唆された。

Keywords : 夜間頻尿、過活動膀胱、皮膚刺激

【日本基礎老化学会発表演題】一般ポスター

P-1 (OJ-9)

老化促進モデルマウスを用いた加齢に伴う肥満細胞造血の変動についての検討

○壺井 功¹、原田智紀¹、内藤美智子¹、原 弘之¹、平林容子²、菅野 純²、相澤 信¹

¹ 日本大学医学部・機能形態学、² 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部

【目的】加齢に伴い免疫機能は低下する。肥満細胞は免疫機構において重要な役割を果たすがその加齢変化については十分な検討がなされていない。今回我々は老化促進モデルマウス (SAMP1) を用いて加齢に伴う肥満細胞造血の変化について検討した。

【方法】若齢 (8-12 週齢) および加齢 (30-36 週齢) SAMP1 マウスに 5-FU を投与し、骨髄抑制後の骨髄における肥満細胞前駆細胞数の回復過程と肥満細胞造血を制御するサイトカインの遺伝子発現の変動を比較検討した。

【結果】5-FU 投与後若齢マウスでは骨髄中の肥満細胞前駆細胞数は投与前の 122% に回復するが、加齢マウスでは投与前の 64% までしか回復しなかった。肥満細胞造血は骨髄間質細胞より産生される肥満細胞造血促進因子の SCF と抑制因子の TGF- β により制御されることから SCF/TGF- β 比率は促進と抑制制御バランスの良い指標となる。5-FU 投与後 SCF/TGF- β 比率は若齢および加齢マウスにおいてともに増加するが、若齢マウスでは増加がその後も継続したのに対し、加齢マウスでは急速に減少した。5-FU 投与後の肥満細胞前駆細胞数の S 期の割合は肥満細胞造血の促進的制御の程度を反映するよい指標となる。5-FU 投与後若齢マウスでは骨髄中の肥満細胞前駆細胞数の S 期の割合は投与前の 205% に増加するのに対し、加齢マウスでは投与前の 47% までしか回復しなかった。

【結語】加齢に伴い肥満細胞造血は低下し、その原因は骨髄間質細胞の加齢に伴う機能低下によることが示唆された。

P-3 (OJ-19)

アシュワガンダ葉抽出物は脳由来細胞において酸化ストレスを抑え分化を誘導する

○ Sunil Kaul¹, Navjot Shah², Jay Prakash³, Renu Wadhwa⁴

¹⁻⁴ Cell Proliferation Research Group and DBT-AIST International Laboratory for Advanced Biomedicine (DAILAB)

Ashwagandha, a traditional Indian herb, has been known for its variety of therapeutic activities. We earlier demonstrated anticancer activities in the alcoholic and water extracts of the leaves that were mediated by activation of tumor suppressor functions and oxidative stress in cancer cells. Low doses of these extracts were shown to possess neuroprotective activities in *in vitro* and *in vivo* assays. We used cultured glioblastoma and neuroblastoma cells to examine the effect of extracts (alcoholic and water) as well as their bioactive components for neuroprotective activities against oxidative stress. Various biochemical and imaging assays on the marker proteins of glial and neuronal cells were performed along with their survival profiles in control, stressed and recovered conditions. We found that the extracts and the purified component, withanone, when used at a low dose, protected the glial and neuronal cells from oxidative as well as glutamate insult, and induced their differentiation *per se*. Furthermore, the combinations of extracts and active component were highly potent, endorsing the therapeutic merit of the combinational approach. The study implied that Ashwagandha leaf-derived bioactive compounds have neuroprotective potential and may serve as supplement for brain health in aging society.

P-2

ストレスシャペロンであるモータリンの点突然変異はパーキンソン病の病理の一因となる

○ Renu Wadhwa¹, Jihoon Ryu², Nishant Saxena³, Anupama Chaudhary⁴, Sunil Kaul¹⁻⁵
¹⁻⁵ Cell Proliferation Research Group and DBT-AIST International Laboratory for Advanced Biomedicine (DAILAB)

Mortalin, a member of heat shock protein 70 family of stress chaperones, is enriched in cancer and has been shown to possess pro-proliferative and anti-apoptosis functions. An allelic form of mouse mortalin (mot-1) that differs by two amino acids, M618V and G624R in the carboxy-terminus substrate-binding domain, and induced cellular senescence in NIH 3T3 cells, has been reported. Furthermore, genome sequencing of mortalin from Parkinson's (PD) patients identified two missense mutants, R126W and P509S. In the present study, we investigated the significance of these mutations in survival, proliferation and oxidative stress tolerance in human cells. Using mot-1 and mot-2 recombinant proteins and specific antibodies, we performed screening to find their binding proteins, and identified ribosomal protein L-7 (RPL-7) and elongation factor-1 alpha (EF-1 α) that differentially bind to mot-1 and mot-2, respectively. We demonstrate that mot-1, R126W or P509S mutant (i) lacks mot-2 functions involved in carcinogenesis such as, p53 inactivation and hTERT/hnRNP-K activation, (ii) causes increased level of endogenous oxidative stress, (iii) results in decreased tolerance of cells to exogenous oxidative stress and (iv) shows differential binding and impact on the RPL-7 and EF-1 α proteins. These factors may mediate the transformation of longevity/pro-proliferative function of mot-2 to premature aging/anti-proliferative effect of mutants, and hence have significance in cellular aging, PD pathology and prognosis.

P-4

アシュワガンダの葉派生ウィザノライド：細胞毒性対細胞保護

○ A. Chaudhary¹, C. Huang², J. Prakash³, S. Kaul⁴ and R. Wadhwa⁵

¹ Department of Biotechnology Mutlanimal Modi Collage 201204, Ghaziabad, U.P. ²⁻⁵ Cell Proliferation Research Group & DBT-AIST International Laboratory for Advanced Biomedicine, National Institute of Advanced Industrial Science & Technology (AIST), Central 4, Tsukuba, Ibaraki 305-8562 Japan

Withaferin A (Wi-A) and Withanone (Wi-N) are key withanolides in Ashwagandha (*Withania somnifera*), a tropical herb of great medicinal value. We have earlier shown Wi-A and Wi-N possess cyto-toxicity for a variety of cancer cells that is mediated by activation of p53 tumor-suppressor and oxidative stress pathways (1-3). Methylation of several organic heterocyclic compounds has been shown to augment stability and hence therapeutic potency (4). In view of this information, we aimed to characterize anticancer potency of methoxy-Withaferin A (mWi-A; substituted by a β -methoxy group at position 3). We found that whereas Wi-A caused strong growth arrest/apoptosis and inhibited migration of cancer cells, mWi-A failed in inducing such effects even at 5 fold higher doses. Molecular docking, bioinformatics and molecular analysis of target proteins and pathways supported the observed phenotypes. Furthermore, we found that similar to Wi-N (5), mWi-A was non-toxic to normal human cells both in the short-term treatment and long-term serial passaging of cultures. Intriguingly, they offered protection to the cells challenged with oxidative stress. Taken together, the study demonstrated that the natural withanolides possess wide therapeutic value that is tightly controlled by their structure.

P-5

機能喪失型スクリーニングによる細胞増殖のノンコーディングレギュレーターとなる miRNA-335 の同定

Ling Li,^{1,2} Yue Yu,^{1,2} Ran Gao,¹ Zhenya Zhang,^{1,2} Sunil Kaul,¹
Renu Wadhwa¹

¹National Institute of Advanced Industrial Science & Technology (AIST), Tsukuba, Japan; ²Graduate School of Life & Environmental Sciences, University of Tsukuba, Japan

MicroRNAs (miRNAs) are a class of small non-coding molecules, about 21-25 nucleotides in length, that downregulate gene expression by multiple ways, including mRNA degradation and translational block. Many studies have shown that miRNAs are involved in different biological processes, including regulation of differentiation, stress, disease pathologies and apoptosis. Here, we report an identification of miR-335 as one of the miRNAs upregulated in cells that escaped 5 AZA-dC induced senescence in human osteocarcinoma (U2OS) cells. In order to characterize the functional significance of miR-335 in escape of senescence, we undertook its overexpression analyses in a variety of cancer cells. We found that miR-335 causes growth arrest of cells accounting for their escape from 5AZA-dC induced senescence. By expression analysis of the putative target genes and their 3' UTR reporters, we determined that miR-335 targets CARF protein that plays essential role in cell survival and imposes two-way control on cell proliferation capacity. The data suggests that miR-335 is an important noncoding regulator of cell survival capacity, response to stress and drug treatment.

P-7

ヒト老衰コホート集団での健康寿命の生物学的考察 (ATP 量・代謝エネルギーの閾値効果)

○須田 斎

東海大学大学院生物科学研究科

老化・寿命に遺伝的要因や環境的要因ばかりでなく、第3の要素として「確率論的要因」も大きな寄与を果たしている。筆者は、その第3の要因を含む「寿命方程式」を導き、その妥当性を究極のモデル生物（線虫 *C. elegans*）を用いて実証してきた。

そして最近、寿命方程式に含まれる1つのパラメータ *biodemographic aging* の開始時期 (t_0) が、個体1匹あたりの ATP 量あるいはミオシン II の遺伝子発現量の変動量（ノイズ）が突然増加する時期と極めて高い相関があることを見出した（文献1）。あるいは、代謝エネルギーの閾値とも高い相関があることを示した。そこで、もし老衰でのみ死亡した日本人コホート集団系に対する生存曲線が作成でき、その生存曲線に対して寿命方程式を用いて解析し曲線回帰が高い精度で行うことができたならば、分析された統計的な結果に対して生物学的な解釈を行なうことができるものと期待される（文献2）。

実際に解析に用いたヒト老衰コホート集団の基となる生データは、厚生労働省が公開している人口動態統計サイト「e-Stat」から取得した。そして2010表5-15性・年齢別にみた年次推移死亡数(1950-2010)「老衰のみ」から、縦断的研究方法として1つの後ろ向きコホート集団を確立し生存曲線を作成した。この曲線を寿命方程式で精密に分析したところ、3成分から構成されていることがわかった。

【文献】

- (1) Hitoshi Suda, Noise-driven onset time of *biodemographic aging*. *Exp. Gerontol.* **48** (2013) 845-851.
- (2) Hitoshi Suda, Biophysical and biological meanings of healthspan from *C. elegans* cohort. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **452** (2014) 36-41.

P-6

CARF 誘発性の成長停止または悪性形質転換は、野生型 p53 の存在に依存する

○RS. Kalra¹, S. Kaul² and R. Wadhwa³

^{1,3}Cell proliferation Research Group and DBT-AIST International Laboratory for Advanced Biomedicine, National Institute of Advanced Industrial Science & Technology (AIST), Tsukuba- 305-8562, JAPAN

CARF (Collaborator of ARF) is an ARF-interacting protein that has been shown to activate ARF-p53-p21 tumor suppressor signaling and regulate growth arrest in human cells during replicative or stress induced premature senescence.^{1,4} CARF silencing caused apoptosis implying that it is an essential protein for cell survival.³ Overexpression of CARF in normal and cancer cells harboring wild type p53 function induced their growth arrest.³ Furthermore, we found that level of CARF expression determined the fate of cells to growth arrest or malignant transformation by fine-tuning of DNA damage response involving damage-signaling and -responding proteins. We reported that super-high level of expression of CARF resulted in negative regulation of p53, driven by HDM2 feedback circuit and transcriptional upregulation of CHK2. These resulted in abrogation of CARF-induced growth arrest and triggered their malignant transformation.⁵ Consistent with these findings, p53 deficient cells were found to escape CARF-induced growth arrest, and instead showed increase in malignant characteristics that was mediated by transcriptional repression of p21^{WAF1}, a critical mediator of growth arrest.⁶ Taken together, the present study demonstrated that (i) wild type p53 is essential for CARF induced growth arrest and (ii) CARF imposes a two-way regulation of cell proliferation by multiple pathways.

P-8

タンパク質の穏やかな合成制限は老化を抑制する

○高氏 裕貴¹、和田 卓巳¹、武田 あすか¹、工藤 生¹、三木 健輔^{1,2}、藤井 道彦¹、鮎澤 大^{1,2}

¹横浜市大生命ナノシステム、²イチバンライフ（株）

【背景と目的】細胞老化は個体老化の要因の一つであると考えられている。我々は、細胞老化は任意の細胞系において、種々の方法によって誘導されることを報告している。細胞系によって老化形質は多様であるが、DNA複製の遅延と細胞膨張は共通して観察される。これらの特徴から我々は、細胞老化の不均増殖モデルを提唱している。細胞障害によるDNA複製の遅延が高分子の不均増殖を引き起こし、細胞膨張と核膨張を経て、ヘテロクロマチンが崩壊する機構である。今回、不均増殖を是正することにより、細胞および個体レベルでの老化現象を解消できることを報告する。

【方法と結果】HeLa細胞とヒト正常線維芽細胞TIG-7において、さまざまな老化誘導剤を用いて細胞老化を誘導した。このとき、低濃度の細胞質タンパク質合成阻害剤を投与すると、細胞の肥大化・扁平化といった老化形態や老化特異的β-ガラクトシダーゼ活性が抑制され、細胞はほぼ正常に増殖した。また、低濃度の細胞質タンパク質合成阻害剤の投与は、TIG-7細胞の寿命を顕著に延長した。驚くべきことに、増殖を停止した老化細胞に低濃度の細胞質タンパク質合成阻害剤を投与すると増殖が再開した。さらに、低濃度の細胞質タンパク質合成阻害剤の投与は、線虫*C. elegans*の平均寿命と最大寿命を延長した。以上のことから、過剰なタンパク質が老化を誘導する主要な要因であり、タンパク質合成制限は細胞および個体レベルで老化を抑制する。

P-9

マウス F 型 ApoA-II の C 末配列は AApoAII アミロイド線維の活性末端に結合して線維形成・伸長を阻害する

○澤下仁子^{1,2}、矢崎正英¹、樋口京一^{2,1}

¹信州大学学術研究院 バイオメディカル研究所 神経難病学部門

²信州大学大学院 医学系研究科 加齢生物学教室

【目的】 これまでに、マウス老化 (AApoAII) アミロイドーシスの関連タンパク質 ApoA-II のアミロイド線維形成コア領域にアミノ酸置換を持つ F 型 ApoA-II マウスは AApoAII アミロイドーシスを発症せず、また、F 型 ApoA-II の C 末配列の合成ペプチドが線維形成・伸長を阻害し、マウスに対しても発症軽減作用を有することを見いだしてきた (第 32,33,36 回大会)。本研究では、F 型 ApoA-II の C 末配列の線維形成・伸長阻害メカニズムを解析した。【方法】 ApoA-II の線維形成コア領域の合成ペプチドを用い、1) アミロイド線維の分解作用と 2) 線維伸長阻害作用の有無をチオフラビン T 法で、また、3) 線維との相互作用部位の解析を免疫電顕法で行った。【結果・考察】 1) 共存させた C 末ペプチドの種類とは無関係に、時間の経過とともにアミロイド線維は分解した。2) 予め F 型 ApoA-II の C 末ペプチドと線維を反応させておくと、高発症マウスの C 型 ApoA-II の合成ペプチドによる線維伸長が抑制された。3) F 型 ApoA-II の C 末ペプチドは線維末端に結合し、線維の中間部分には存在しなかった。これらの結果から、F 型 ApoA-II の C 末配列部分はアミロイド線維の分解には影響を与えず、線維の活性末端に結合して線維のさらなる伸長を阻害する作用メカニズムが考えられた (Sawashita et al. PNAS¹ 15)。

Keywords : マウス、老化 (AApoAII) アミロイドーシス、アミロイド線維形成・伸長阻害メカニズム

P-11

老化に伴う認知機能低下に対する
ホスホジエステラーゼ 3 阻害剤 cilostazol の効果

○柳井修一・新崎智子・遠藤昌吾

東京都健康長寿医療センター研究所 老化脳神経科学研究チーム

cAMP 系は、記憶・学習を始めとする様々な生理機能に重要な役割を果たす。cAMP はホスホジエステラーゼ (Phosphodiesterase, PDE) により分解され、その生理機能は終結する。従って、PDE 阻害剤は細胞内 cAMP 濃度を上昇・維持させ、cAMP 系の生理機能を増強すると考えられる。我々は PDE3 の選択的阻害剤である cilostazol が若齢マウスの記憶を向上させることを報告してきたが、老齢マウスを対象とした報告は少ない。本研究では記憶障害が認められる 23 ヶ月の老齢 C57BL/6J マウスを用い、一般行動解析を含む詳細な行動解析を行った。cilostazol (0, 0.3, 1.5%) は混餌投与とし、半数の被験体には認知機能が低下し始める 13 ヶ月齢から 10 ヶ月間、残り半数の被験体には 22 ヶ月齢から 1 ヶ月間自由摂食で与えた。23 ヶ月齢で空間記憶を評価する物体探索課題と Morris 水迷路課題を行ったところ、1 ヶ月投与では物体探索課題のみにおいて、10 ヶ月投与では両方の課題において cilostazol 1.5% 投与群の成績が他の 2 群と比較して有意に改善することが示された。24 時間活動量及びオープンフィールドを用いた一般行動解析の結果、活動量や不安様行動に cilostazol 投与の効果は認められなかった。これらの結果は、cilostazol は目立った行動学的副作用をもたらさず、老化に伴う認知機能の低下を予防する効果を持つことを示唆している。

Keywords : 記憶、学習 ; cilostazol ; ホスホジエステラーゼ

P-10 (OJ-5)

小動物用 X 線 CT を用いた矮小ラットの体脂肪および骨の加齢変化の測定

○佐々木徹^{1,2}、新海正^{3,2}、田原正一^{4,2}、倉本和直²、金子孝夫²、近藤昊⁵

¹北里大学医療衛生、²都健康長寿医療センター、³芝浦工業大学システム理工、⁴都健康安全研究センター、⁵人間科学大学

先に自然発症矮小ラット (SDR) が酸化ストレス抵抗性と長寿であることを示した。成長ホルモン (GH) 分泌不全性低身長症では肥満、骨形成の低下を示すことが知られている。しかし、GH 欠乏において皮下と内臓脂肪量のどちらが優位に増加するか、体脂肪と骨量と構造の加齢変化は明らかにされていない。

本研究は SDR とその対照である Sprague Dawley ラット (SD) の皮下、内臓脂肪量、骨量と構造の加齢変化を、X 線 CT (ラシータ LCT-100) を用い同一の動物で検討した。

小型小動物用 X 線 CT 装置でラットの皮下、内臓脂肪、骨量と構造の加齢変化を解析することができた。矮小ラット SDR は脂肪肥満を呈した。その肥満は皮下脂肪を主体とし、内臓脂肪にはよらないことがわかった。SDR の内臓、皮下脂肪量はいずれも加齢に伴って増加したが、SD では内臓脂肪の増加が優位であった。SDR の脛骨断面面積は SD に比べて半分以下であった。特に海綿骨の著減 (骨梁を主体) を特徴とする骨体積の低下が認められた。一方、SDR の皮質骨断面面積は比較的維持された。SDR の海綿骨 (骨梁) 断面面積は加齢に伴い僅かに増加する傾向を示した。骨密度については、SDR、SD 間で顕著な差は認められなかった。SDR において骨梁の著しい減少は全骨、海綿骨の骨密度の変化として評価されなかった。その理由は、骨梁を構成する元素が低い X 線吸収率を持つためであると考えられた。

P-12 (OJ-33)

脳の老化促進における社会心理的ストレスの関与ならびにその予防

○海野けい子^{1,3}、住吉晃²、野中博意²、原文音¹、井口和明¹、井之上浩一¹、宮崎康人¹、豊岡利正¹、川島隆太²、林美智子⁴、中村順行⁴

¹静岡県立大学・薬学部、²東北大学・加齢医学研究所、³静岡県立大学大学院・茶学総合講座

【目的】 老化促進の重要な要因の一つとして、長期にわたるストレスの負荷がある。本研究では社会心理的ストレスによる脳の老化促進の機構を明らかにすることを目的とし、脳の形態的变化ならびに生化学的变化について検討した。また抗ストレス作用物質として、緑茶に含まれるテアニンの有効性を検討した。

【方法】 雄マウス間の縄張り意識を利用した対面飼育により、マウスに社会心理的ストレスを負荷した。マウスは、加齢に伴う脳の萎縮が認められている老化促進モデルマウス (SAMP10) を用いた。脳の萎縮については、動物用高磁場 MRI 装置を用いて観察した。

【結果及び考察】 対面飼育条件下で社会心理的ストレスが負荷された場合 SAMP10 マウスは、大脳の萎縮および学習能低下が促進されることをこれまでに見いだしている。脳の形態変化を *ex vivo* による MRI 測定により調べた結果、対面飼育期間に従い脳の萎縮が進行し、白質に比べ灰白質で顕著に萎縮することが明らかとなった。また萎縮が顕著であった海馬について、シナプス関連タンパク質を比較した結果、プレシナプスのマーカーであるシナプトフィジンは変化が認められなかったが、ポストシナプスのマーカーである PSD95 は有意に減少していた。一方、テアニンを摂取していたマウスでは脳萎縮は認められなかった。また、抑制性の神経伝達物質である GABA の増加が認められた。これらのことから、長期のストレスにより神経細胞が傷害を受け脳の萎縮が進行するが、テアニンは脳内の GABA レベルを上昇させることによりストレスによる傷害を抑制していることが示唆された。

Keywords : Brain, Atrophy, Psychosocial stress

P-13 (OE-1)

飽和脂肪酸（パルミチン酸）による腎臓早期老化：小胞体ストレスによる造血ホルモン産生制御機能の破綻

○稲城 玲子¹, Thitinin Anusonvongchai¹, 鈴木 教郎², 山本 雅之³, 南学 正臣²
¹東京大学医学系研究科 CKD 病態生理学, ²腎臓・内分泌内科, ³東北大学医学系研究科

【目的】慢性腎臓病（CKD）は腎臓早期老化病変（虚血、線維化）を呈し、近年の高齢化社会においては成人 8 人に 1 人が罹患する国民病である。その急増要因として高齢化による腎臓加齢や栄養・代謝不良による慢性炎症が注目されている。本研究では慢性炎症誘導物質である飽和脂肪酸（パルミチン酸）が CKD 進行要因である腎性貧血、つまり造血ホルモン（エリスロポエチン、EPO）産生制御機構の破綻に関与し、腎臓早期老化を加速させる可能性を検討した。【方法】1. EPO 産生株化細胞（HepG2）を BSA 結合パルミチン酸（PAL）存在下で培養し、低酸素応答性 EPO 産生能の変動を検討。2. 正常マウス、腎 EPO 産生細胞（REP）を tdTomato で標識（EPO-Cre）した、あるいは EPO 産生を可視化した（EPO-GFP）マウスに PAL を 11 日間投与し（1 μ mol/i.p 毎）、REP 細胞の EPO 産生能を BSA 投与対照群と比較。3. 虚血・小胞体ストレスシグナル（UPR）分子変動を蛍光免疫染色や real-time PCR にて検討。【結果】PAL は 1) HepG2 内に脂肪蓄積、UPR 活性化による小胞体ストレス惹起、それに伴い虚血応答性 EPO 産生を抑制し、2) REP 細胞においても UPR 活性化（tdTomato + ATF4 陽性細胞数の増加）を引き起こし、それに反比例して腎 EPO 産生能（tdTomato + EPO-GFP 陽性細胞）や血清 EPO 値を低下させた（ $p < 0.01$ ）。【結論】パルミチン酸は小胞体ストレスを介して REP 細胞の虚血応答性の EPO 産生機構を破綻させ、腎性貧血、ひいては CKD（腎臓早期老化）を進展させる可能性を見いだした。これらの成果は、脂質異常症や慢性炎症が CKD の独立した危険因子であり、生命予後不良因子でもあるという既知の臨床研究成果と一致し、脂質異常症、それに伴う慢性炎症が高齢化社会における CKD 治療戦略の標的として重要であることが示唆された。

Keywords : パルミチン酸、エリスロポエチン、小胞体ストレス

P-15 (OE-2)

Donor age reflects the replicative lifespan of human fibroblasts in culture

Kazuhiro Kaji^{1,2}, Eiji Naru¹ and Naotoshi Kanda³
¹Research and Development Division, KOSE Corporation, Tokyo
²Nihon Pharmaceutical University, Saitama, ³Tokyo University of Agriculture and Technology, Tokyo

Human fibroblasts, which have a finite lifespan in cultures, have been widely used as a model system for cellular aging, and frequently used as one model of human aging. But whether cellular aging contributes to organismal aging has been controversial. To reinvestigate this question, we cultured human fibroblasts from the skin of one individual volunteer collected at different ages. Over a period of 31 years (donor age 36 years to 67 years), we obtained skin cells five times at appropriate intervals, and established eleven fibroblast lines. These human fibroblasts have presented evidence for a correlation between donor age and proliferative lifespan *in vitro*. This result parallels the fact that telomeric DNA size cultured fibroblasts decrease with the increase in donor age. These cell lines had a normal diploid human chromosome constitution and will be useful in studies of human biology including aging.

P-14 (OE-6)

老齢ラットにおいて鍼刺激が大脳皮質アセチルコリン放出に及ぼす影響

○内田さえ、鍵谷方子
東京都健康長寿医療センター研究所・老化脳神経科学研究チーム、自律神経機能

【背景と目的】大脳皮質に放出されるアセチルコリン（ACh）は認知機能を担う重要な伝達物質である。我々はこれまでに、鍼を含む皮膚や筋への刺激（体性感覚刺激）が大脳皮質 ACh 放出を高めることを成熟ラットで報告した。本研究では約 3 年齢の老齢ラットを用いて、鍼刺激が大脳皮質 ACh 放出に及ぼす影響を調べ、成熟ラットでの反応と比較した。

【方法】老齢（30-37 ヶ月齢）の Wistar 系ラットを用いた。麻酔下、人工呼吸下で右頭頂葉の細胞外液 ACh 濃度をマイクロダイアリシス法と HPLC-ECD 法を用いて測定した。右側の前肢足趾に鍼灸針を深さ約 5mm 刺入し、1Hz で左右に回転させる刺激を 3 分間加えた。

【結果】老齢ラットにおいて安静時の大脳皮質 ACh 放出量は 65 ± 12 fmol/3min であり、成熟ラットでの値（ 58 ± 14 fmol/3min）との間に差は認められなかった。老齢ラットにおいて、前肢足趾の鍼刺激は大脳皮質 ACh 放出を有意に上昇させた。大脳皮質 ACh 放出量は、鍼刺激中に 84 ± 6 fmol/3min に達し、刺激後 3 分の間に元に回復した。この老齢ラットでの ACh 放出増加反応の大きさは、成熟ラットでの反応（刺激中 128 ± 16 fmol/3min）と比較して減弱していた。

【結論と考察】約 3 年齢の老齢ラットでは、成熟ラットより少ないものの依然として鍼刺激による体性感覚刺激が大脳皮質 ACh 放出を増加させることが明らかとなった。大脳皮質 ACh は主にマイネルト核（NBM）から大脳皮質に投射するコリン作動性神経に由来する。従って、老齢ラットにおける鍼刺激による大脳皮質 ACh 放出の増加は NBM コリン作動性神経の賦活に起因すると考えられる。この結果は、加齢に伴う認知機能の低下の予防に、鍼などの体性感覚刺激が有効であることを示唆する。

Keywords : acupuncture; cortical acetylcholine release, aging

P-16 (OJ-13)

培養細胞を用いた還元型コエンザイム Q10 の抗老化メカニズムの解明

○徐 哲¹、霍 佳¹、澤下仁子^{1,2}、森 政之^{1,2}、樋口京一^{1,2}

¹信州大学大学院医学系研究科疾患予防医学系加齢生物学

²信州大学学術研究院先端領域融合研究群バイオメディカル研究所

【背景・目的】還元型コエンザイム Q10（CoQH₂）の継続補給は、老化促進モデルマウス SAMPI の促進老化を抑制した。また、CoQH₂ は酸化ストレスの抑制のほかに、SIRT1 や PGC-1 α を介したミトコンドリア機能を改善した（*Tian et al Antioxid Redox Signal 2014*）。本研究では、SAMPI と対照マウス（SAMR1）の胎仔由来繊維芽細胞（MEF）、脂肪細胞に分化誘導可能なマウス繊維芽細胞株（3T3L1）とヒト肝癌由来細胞株（HepG2）を用い、CoQH₂ の抗老化作用とそのメカニズムを解析した。【方法】1) MEF 実験 CoQH₂ 添加時の細胞老化マーカー（SA- β -gal）を測定した。2) 3T3L1 実験 脂肪細胞への分化前後に CoQH₂ を添加し、細胞内脂肪量を評価した。3) HepG2 実験 パラコート（PQ）による細胞傷害時の CoQH₂ の効果を検討した。CoQH₂ 添加時の Sirt1、Pgc1 α 等の遺伝子発現量、cAMP 量やホスホジエステラーゼ（PDE、cAMP 分解酵素）の遺伝子発現量を測定した。【結果・考察】1) MEF では時間の経過に伴って細胞老化マーカーの上昇がみられたが、CoQH₂ はこの上昇を抑制した。2) CoQH₂ は 3T3L1 の脂肪細胞への分化を抑制し、分化後の脂肪量を減少させた。3) PQ は HepG2 の p16^{INK4a} 遺伝子発現量を増加させ、Sirt1、Pgc1 α や Sod2 の遺伝子発現量を減少させたが、CoQH₂ によって改善した。この効果は、ニコチンアミド（SIRT1 活性阻害剤）共存時には抑制された。また、CoQH₂ は細胞内 cAMP 量を増加させ、PDE4 の遺伝子発現量やタンパク質量を減少させた。以上の結果から、CoQH₂ は PDE4 発現抑制を介して cAMP 量を増加させ、Sirt1 やミトコンドリア機能関連因子の機能を増強し、老化を抑制するメカニズムが示唆された。

Keywords : 還元型コエンザイム Q10、酸化ストレス、脂質代謝

P-17 (OJ-14)

六君子湯のカロリー制限模倣効果に関する解析

○王梓¹、大畑佳久¹、熊谷真帆¹、芹澤慎一郎¹、千葉卓哉^{1,2}
¹早稲田大・人科院・基礎老化学、²早稲田大・応用脳科学研究所

我々はこれまでに、摂食を促進するニューロペプチド Y (neuropeptide Y; NPY) の発現がカロリー制限 (Calorie Restriction; CR) によって亢進すること、および NPY KO マウスに CR を行っても、自由摂食 (Ad Libitum; AL) 群と比較して寿命延長効果などが認められないことを報告してきた。したがって、NPY の発現を亢進させる薬剤が CR の効果を模倣、増幅する可能性が示唆される。本研究では、グレリンを介して NPY 発現亢進作用をもつ漢方薬、六君子湯 (リックンシトウ) に着目し、CR と六君子湯投与を組み合わせたことでより強い抗老化効果をもつかを解析した。17-19 週齢の C57BL/6 マウスをもちいて CR は隔日給餌で行い、CR 六君子湯投与なし群 (CR (-)), CR 六君子湯投与あり群 (CR (+)) に分け、餌は高脂肪食 (HFD-60) を与え 16 週間飼育した。一部のマウスはドキシソルビン投与による酸化ストレスを与えた後に屠殺し、肝臓を採取して遺伝子およびタンパク質発現を解析した。両群の間に体重、摂食量、ドキシソルビン投与による体重減少率に有意差は認められなかった。しかし、抗酸化能に関連する遺伝子 (*Gstp2*) や、酸化傷害のマーカータンパク質 (4-hydroxynonenal, nitrotyrosine) の発現に有意差が認められた。したがって、NPY の発現を亢進させることは抗酸化能を活性化させる可能性がある。現在、他の臓器における解析と通常食 AL 群に六君子湯投与を加えた実験の解析を行っており、その結果もあわせて報告する。

P-19 (OJ-29)

II 型糖尿病は老年性エンドサイトーシス障害の増悪を介して A β 病理を加速化する

○木村展之¹、岡林佐知²、下澤洋浩³、保富康宏³、柳澤勝彦¹
¹国立長寿医療研究センター・アルツハイマー病研究部、²予防衛生協会、³医薬基盤研究所・霊長類医学研究センター

アルツハイマー病 (AD) 患者の脳組織には老人斑と神経原線維変化という二大病変が形成されるが、老人斑の主要構成因子である β アミロイド蛋白 (A β) の脳内蓄積が AD 発症に大きく関与すると考えられている。近年の疫学調査により、II 型糖尿病は高年期における AD の発症リスクを増大させることが明らかとなったが、そのメカニズムについては未だ不明な部分が多い。我々はこれまで、ヒトに近縁な霊長類であるカニクイザルを用いて老化に伴う AD 病態の進行メカニズムについて検索を行ってきた。カニクイザルは AD の二大病変が老年性に再現されるのみならず、A β のアミノ酸配列がヒトと 100% 同一という特徴を有している。そこで本研究では II 型糖尿病を自然発症したカニクイザルの脳組織を用いて、糖尿病が老人斑等の AD 病変形成にもたらす影響について病理学的に解析を行った。通常、カニクイザルの脳組織では少なくとも 20 歳以上の高齢個体において老人斑の形成が確認されるが、糖尿病発症個体では 20 歳未満時においても老人斑の形成が確認され、老齢期にはより強い脳血管アミロイド症の存在が確認された。また、糖尿病発症個体の脳内では A β 凝集のシード分子である GMI ガングリオシド結合型 A β (GA β) の著しい増加が確認された。我々は過去の検索により、老化に伴う神経細胞のエンドサイトーシス障害が GA β の形成を促進することを明らかにしている。そこで、脳内のエンドサイトーシス系について検索を行ったところ、糖尿病発症個体の脳内では明らかに老年性エンドサイトーシス障害が増悪していた。これらの結果から、糖尿病は脳内におけるエンドサイトーシス障害の増悪を介して GA β の形成 (= A β の凝集) を促進させ、A β 病理を加速化することで AD 発症リスクを高めている可能性が示唆された。

Keywords: アルツハイマー病、II 型糖尿病、カニクイザル

P-18 (OJ-2)

GADD34 works to suppress obesity-induced metabolic disease including type 2 diabetes and NASH – 2

○西尾尚美、磯部健一
名古屋大学大学院 医学系研究科

高齢化に伴い、肥満から発症する様々な疾患が西欧諸国で大きな問題になっているが、我が国でも近年増加傾向にあり、その発症メカニズムの解明が急がれている。私たちは GADD34 遺伝子欠損マウス (GADD34KO) が老化に伴い、肥満となり、脂肪肝、糖尿病を発症することを昨年報告した。今年度はそのメカニズムをより詳細に解析したので報告する。

【結果】

- (1) インスリンシグナル伝達系の変化: GADD34KO マウス、WT マウスにインスリンを静注し、経時的にインスリンシグナル伝達系を western blot で測定した。GADD34-deficient マウスは WT マウスに対して p-Akt 等のインスリンシグナルが亢進していた。
- (2) 高脂肪食: GADD34KO マウスは高脂肪食で WT マウスに比べて高度肥満になり、インスリンシグナルは低下した。脂肪蓄積に伴うインスリン抵抗性は免疫系細胞の浸潤に伴う、TNF- α によるインスリンシグナルの抑制であった。
- (3) パルミテートによる TLR を介したインスリンシグナル伝達系の抑制: 飽和脂肪酸パルミテートは TLR シグナル伝達系を亢進して、JNK を活性化し、インスリンシグナル伝達系を抑制した。この抑制活性は GADD34KO マウス肝臓に強く現れた。

【考察】

GADD34 は若齢マウスではインスリンシグナルを抑制する方向で働いていた。ところが、高脂肪食を与えると、インスリンシグナルが逆転し、GADD34KO マウスはインスリンシグナル伝達系が低下した。現在、GADD34 がインスリンシグナルのどの段階に作用しているかを検索中である。

P-20

X線結晶構造解析から明らかになった protein-aging による抗体の機能低下機構

○林田直樹¹、横山英志²、野口修治³
¹山口大学大学院医学系研究科医化学分野、²静岡県立大学薬学研究院生命物理化学教室、³静岡県立大学薬学研究院創剤工学研究室

Isoaspartate (isoAsp) は、タンパク質中の Asn が、生理的条件下において酵素の媒介なしに isoAsp を生成する特徴的な化学修飾である。isoAsp の生成は、生体内や冷所で保存された抗体医薬においても検出されているが、リガンドとの結合の低下の報告がほとんどである。従って、isoAsp の生成を防ぐことは医薬品開発においても重要である。しかし、isoAsp の生成がタンパク質の機能低下を引き起こす機構はほぼ未解明である。我々は、損傷 DNA を認識する抗体 64M-5 の解析を行う途中で isoAsp の生成を発見し、その生成によって 64M-5 抗体のリガンドへの結合定数が 20 分の 1 まで低下することを見出した。今回我々は、立体構造解析によってこの結合低下の機構を明らかにしたので、その結果を発表する。

isoAsp は、抗体のリガンド認識に重要な 6 つの CDR のうち、L1 の Asn 28L で起きていた。CDR L1 の構造は大きく変化し、正常構造ではリガンドのリン酸基と His27dL の間にあった相互作用が失われていた。このことが結合定数の低下をもたらしたと考えられる。リガンドと結合していない isoAsp 28L を有する抗体では、His27dL がリガンドとは全く反対側を向いており、isoAsp の生成が CDR L1 の構造を大きく変化させたと思われる。

本研究は、タンパク質における isoAsp の生成によって機能低下が起こることを立体構造の面から明確に示した初めての例である。ペータアミロイドなどでも isoAsp の生成は起きており、isoAsp の生成を防ぐことは、アルツハイマー病の治療薬の開発等に寄与するかもしれない。

P-21 (OJ-30)

マウス線条体におけるナトリウム電流の年齢依存的変化

○井上律子、三浦正巳

東京都健康長寿医療センター研究所・老化脳神経科学研究チーム

電位依存性 Na⁺ チャネル β サブユニットは Na⁺ チャネルの活性を修飾し、細胞接着や神経突起伸張を調整する多機能な分子である。そのうち $\beta 4$ は線条体黒質路を中心とする大脳基底核に豊富に存在し、ハンチントン病のモデルマウス脳では低下していくことが知られている。線条体における $\beta 4$ の生理的役割は明らかではなかったが、我々は線条体投射ニューロンの興奮性に $\beta 4$ が影響することを最近明らかにした (Miyazaki, Inoue et al. 2014)。 $\beta 4$ は電位依存性 Na⁺ チャネルのオープンチャネルブロッカーとして働き、活動電位発生後、再分極にともなってリサージェント電流という過性の内向き電流を発生させる。 $\beta 4$ が欠損するとリサージェント電流が減少し、線条体投射ニューロンの繰り返し発火の頻度が減る等の影響が起き、正常な膜の興奮性が阻害されることを示した。また、マウス脳における $\beta 4$ の発現は生後 1-7 日の間に始まり、生後 21 日で成体レベルの発現量に達する。本研究では $\beta 4$ 発現量と Na⁺ 電流の関連を明らかにするため、生後 3-29 日齢のマウス線条体投射ニューロンの電気生理記録を行った。Na⁺ 電流として有名な一過性内向き電流に加え、リサージェント電流、持続性 Na⁺ 電流をパッチクランプ法によって測定し、その生後変化を調べた。さらに線条体黒質路の伝導速度に $\beta 4$ が影響を及ぼすかどうかを検討するため、多点平面電極 (MEA) で伝導速度を計測した。黒質線条体路が判別できるトランスジェニックマウスの生後 32 週齢のコントロールと $\beta 4$ 欠損マウス (ダブルトランスジェニックマウス) を用いて比較した。これまでの研究で明らかとなった線条体における $\beta 4$ の電気生理学的機能と合わせて報告する。

P-23 (OJ-3)

運動による肥満ラットの肝臓 S-ニトロソ化 Akt の減少はインスリン抵抗性の改善に關与する

○都築孝允¹、篠崎昇平²、中本英子¹、金木正夫³、後藤佐多良¹、下門顕太郎²、小林裕幸³、内藤久士¹

¹ 順天堂大学、² 東京医科歯科大学、³ ハーバード大学医学部、⁴ 筑波大学付属病院

運動はインスリン抵抗性を軽減することが知られているが、そのメカニズムについては未だ明らかではない。我々は以前、肥満に伴う肝臓のインスリン抵抗性において、誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) が重要な役割を担うことを示した。そこで本研究では、自発運動が肝臓の iNOS 発現および糖代謝の主要なタンパク質における S-ニトロソ化を減少させることでインスリン抵抗性を防ぐという仮説を検証した。

2 型糖尿病モデル動物である Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラット 21 匹と、同系統で非糖尿病である Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) ラット 18 匹を無作為に安静群または 20 週間自発走を行う運動群に分類した。

OLETF において、自発運動により空腹時血糖値およびインスリン抵抗性指数 (HOMA-IR) が有意に低下した。加えて、OLETF ラットの肝臓において、運動により iNOS mRNA 量が有意に減少した。また、運動は安静群の OLETF ラットで増加していた肝臓の S-ニトロソ化 Akt レベルを LETO ラットで観察されるレベルまで有意に減少させた。肝 TG 含有量および脂質合成に關与する遺伝子発現 (*Srebp-1*, *Scd-1*) についても同様に、OLETF において自発運動により有意に低下した。

これらの知見は、自発運動が肝臓の iNOS 発現および糖代謝におけるシグナル伝達経路の主要な分子である Akt の S-ニトロソ化を抑制することで、インスリン抵抗性を改善するという我々の仮説を支持する。

P-22 (OJ-18)

Lactobacillus gasser SBT2055 による線虫の寿命延長メカニズムの解析

○中川久子¹、小島英史²、山下舞重²、守屋智博²、浮辺健²、馬場一信¹、猪村帝¹、宮崎忠昭¹

¹ 北海道大学 遺伝子病制御研究所 プロバイオティクス・イムノロジー研究部門、² 雪印メグミルク株式会社 ミルクサイエンス研究所

Lactobacillus gasser SBT2055 (LG2055) は、整腸作用、免疫機能活性化や内臓脂肪蓄積抑制作用などを示すことが報告されており、感染症や免疫疾患などの疾病予防への有用性が期待されている。これまでに我々は、LG2055 を摂取させると線虫 *Caenorhabditis elegans* の寿命が延長すること、*skn-1* 等の酸化ストレス関連遺伝子の発現が亢進することを報告した。本検討では LG2055 摂取による SOD 活性および GSH 量への影響と *skn-1* の発現部位を解析した。SOD 活性と GSH 量は加齢とともに低下することが報告されており、線虫においても通常食である OP50 を摂取した群では、日齢とともに低下した。一方 LG2055 を摂取した線虫では加齢に伴う低下は有意に抑制されていた。*skn-1* はヒト *nrf-2* のオルソログであり、線虫では 3 つの isoform がある。これらのうち、神経のみに発現している *skn-1b* と消化管にのみ発現する *skn-1c* はそれぞれで特異的に機能することが報告されている。そこで我々は *skn-1b::GFP*、*skn-1c::GFP* 変異線虫を用いて LG2055 摂取による発現変化を調べた。その結果、*skn-1c* の発現が LG2055 摂取群で亢進していた。これらのことから LG2055 は消化管に作用し、加齢による酸化ストレス抵抗性の低下を抑制している可能性が示唆された。

Keywords : *L. gasser*, oxidative stress, longevity, *skn-1*

P-24

老化動物の育成と飼育環境の検討

○野田 義博¹、前川 尚子^{1,2}、時間 真治^{1,2}、武藤 大樹^{1,2}、宮澤 優衣^{1,2}、高橋 洋子^{1,2}、遠藤 玉夫¹

¹ 東京都健康長寿医療センター実験動物施設、² (株) ケーエーシー

東京都健康長寿医療センターは高齢者の健康長寿増進、老化のメカニズム解明と制御、加齢性疾患の治療および予防法の開発などを研究テーマとする研究機関である。実験動物施設では、基礎老化研究のコントロールとなる老化動物を育成、供給することを使命とし、1979 年より現在に至るまで、マウス (C57BL/6NcrSlc, C57BL/6J)、ラット (Wistar, F344/DuCrjCrlj) について老化動物の育成事業を推進している。その育成方法は、生産業者から 4 週齢より導入 (Wistar は自家繁殖による近交系を作製、維持) し、生涯飼育することによって老齢化させる。育成した老化動物は在庫数をデータベース化し、所内へ向けて供給している。その実績としてマウスと Fischer ラットで 140 ロット、Wistar ラットで 71 世代の老化動物を育成、供給し、老年学および老年医学研究の推進に重要な役割を担ってきた。

本研究において、各動物の平均寿命はマウスでは、C57BL/6Ncr で雄 826 日、雌 766 日を示した。ラットでは、Wistar で雄 810 日、雌 927 日、Fischer で雄 859 日、雌 946 日を示し、Fischer が雌雄共に長寿命であった。さらに、隔日絶食による制限給餌下で育成した Fischer について体重増加および平均寿命をこれらと比較したところ、雄で 1032 日まで平均寿命を延長させることができた。当センターは 2013 年 5 月に新施設へ移行したことにより、動物の飼育環境は従来とは大きく変化した。飼育環境の変化が老化動物育成における体重増加および寿命に与える影響についても観察を続けている。

Keywords : 寿命、マウス、ラット

P-25

Lrp4 は神経筋シナプスの維持に重要である ～神経筋シナプスの病態モデルの作成～

○森秀一¹、本橋紀夫¹、高嶋留美¹、重本和宏¹

¹ 東京都健康長寿医療センター研究所・老年病態研究チーム・運動器医学

【目的】 加齢に伴って神経筋シナプスの形態は大きく変化する。複雑なシナプスの構造を維持することは筋量・筋力の維持に必須であることから、神経筋シナプスの維持能力低下による形態変化がサルコペニアの発症に重要な影響を及ぼしている可能性が高い。成体の神経筋シナプスの維持機構を解明するため、シナプス形成に必須の分子である Lrp4 (LDL receptor-related protein 4) の役割を検討した。

【目的】 Lrp4 ノックアウトマウスは致死となるため、補体成分欠損マウスに Lrp4 タンパクを抗原として免疫注射し、自己抗体の産生を介した Lrp4 の機能抑制モデルを作成した。2～3 回免疫後に筋電図を測定し、その後筋を採取して神経筋シナプスの形態解析を行った。

【結果】 Lrp4 の免疫によって、マウスの体重減少と筋力低下が認められた。また、反復神経刺激による筋活動電位の漸減反応が認められ、神経と筋の刺激伝達が抑制されて筋が易疲労状態であると示された。神経筋シナプスの形態解析では、運動神経終末と縮小と AChR 凝集の消失が認められた。また、マウスから採取した抗 Lrp4 血清は MuSK (muscle-specific kinase) の活性化を抑制した。

【考察】 Lrp4 は MuSK と同様に神経筋シナプスの構造維持に必須の分子であり、その機能抑制は筋機能の低下を引き起こすことが示された。本研究モデルは、免疫複合体の形成によって活性化される補体系がシナプス構造を非特異的に破壊する可能性を排除しているため、筋萎縮・筋力低下のメカニズムを解明する上で有用である。

Keywords : 神経筋シナプス, Lrp4, AChR

P-27 (OE-3)

肥満時の脂肪組織におけるリソソーム機能障害とオートファジーに与える影響

○水之江雄平¹、須藤結香¹、平岡秀規¹、沖田直之²、樋上賀一¹

¹ 東京理科大学薬学研究所 分子病理・代謝学（樋上）研究室

² 公益財団法人付属佐々木研究所

オートファジーは自己のタンパク質や細胞内小器官を分解することで細胞の恒常性を維持する機構であり、その機能異常は癌、神経変性疾患、代謝性疾患などの発症に関連する。当研究室では肥満マウスの脂肪組織 (WAT) と分化肥大化した脂肪細胞においてオートファゴソーム (AP) が蓄積すること、一方、カロリー制限ではオートファジーが亢進することを見出した。そこで本研究では肥満の WAT におけるオートファジー障害の原因を探索するため、オートファジー分解に重要なリソソーム機能に着目し研究を行った。カテプシンはリソソームに含まれる代表的なプロテアーゼであり、その活性はリソソームの酸性 pH 環境下で前駆体から活性型になること (maturation) で維持されている。肥満マウスの WAT では、カテプシン L の maturation 異常が認められるとともに、その活性が優位に低下していた。一方、カテプシン B は活性型が増加し、活性も増加していた。分化した脂肪細胞にカテプシン L 阻害剤を処理するとカテプシン L の活性は低下し、同時にカテプシン B の活性が増加した。このことから肥満の WAT でみられたカテプシン B の変化はカテプシン L 低下の代償的なものであることが推測される。リソソーム機能障害を引き起こす要因としては肥満で増加した酸化ストレス (ROS) が考えられる。それゆえ、抗酸化剤 N-acetylcysteine (NAC) を肥満マウスに投与した。その結果、活性型カテプシン L の低下が顕著に改善し、カテプシン B の活性も低下した。以上から、肥満マウスの WAT では、肥満により増加した ROS がリソソーム機能に障害を与え、ひいてはオートファジー機能に障害を及ぼすと考えられた。

P-26 (OE-9)

老化シグナルによる解糖系酵素 PGAM の転写後制御機構

○近藤祥司¹、三河拓己¹

¹ 京大・医

解糖系制御機構として、低酸素応答以外にも、通常酸素下のメカニズムが注目されつつある。我々や他のグループは、解糖系酵素 PGAM の老化や癌化における生理的効果に注目し、報告してきた。昨年、我々は、ストレス老化シグナルにより、PGAM のリン酸化依存的ユビキチン化が Mdm2 により誘導され、老化が進む事、逆に PGAM 安定化により老化が抑制され発癌に働く事を報告した (三河他 JCB 2014)。今回、我々は、PGAM と Mdm2 はアポトーシスにおいても連関する事、さらに PGAM がサーチュインにより脱アセチル化による制御を受け、癌細胞増殖を負に制御する事、を見出したので、報告する。(三河他 J Cyto Histo 2014) (津坂他 GtC 2014)

P-28

Parental dietary restriction affects offspring fitness in *Drosophila melanogaster*

Bora Lee, Chan-Mi Park, Eun-Ji Lee, and Kyung-Jin Min

Department of Biological Sciences, Inha University, Incheon 402-751, Republic of Korea

Dietary restriction (DR) has been found to increase the longevity and stress resistance in a wide array of eukaryotic species and it has been known that individuals fed on a DR diet typically reduce or completely shut down reproduction. Despite this connection, little is known about the role of parental diet on their offspring fitness. Adult flies were exposed to a full diet or a DR diet. We then measured the pupation/eclosion frequency, stress resistance, body weight, and longevity in the offspring of these parental flies. Compared to control flies, flies held on a DR diet were more likely to develop from eggs to pupae, and from pupae into adults. Offspring of DR-fed flies showed an increase in resistance to oxidative stress. Parental DR increased offspring body weight. Parental diet also seemed to affect the longevity of offspring. Female offspring of DR-fed flies tended to outlive offspring of flies held on a full diet. The effect of parental diet on male offspring was less consistent. This study suggests that the impact of DR can extend beyond exposed individual to their offspring, and should be considered in both theoretical and empirical studies of senescence.

Key words : Dietary restriction, Parental effects, *Drosophila melanogaster*

P-29

Korean red ginseng extract (KRGE) extends the lifespan of fruit fly through DR-like mechanism

Hye-Yeon Lee¹, Shin-Hae Lee¹, Mira Yu¹, Ah Yoon¹, and Kyung-Jin Min^{1*}

¹Department of Biological Sciences, Inha University, Incheon 402-751, Republic of Korea.

These authors are contributed equally.

*Corresponding author: Kyung-Jin Min (minkj@inha.ac.kr)

Red ginseng (*Panax ginseng*), traditionally used as remarkable medicine in eastern countries, is produced by steaming of the root followed by drying from Korea ginseng. Many studies indicated that Korean red ginseng (KRG) has anti-inflammatory and anti-oxidative effects and enhances immune function of the human body. Despite these effects are related with longevity of organisms, there are a few studies about effects on lifespan. Korea red ginseng extract (KRGE) increased the lifespan of flies when flies are fed at 10, 25, and 100 μ g/mL doses. In addition, KRGE-treated flies did not show a reduction of feeding rate and fecundity. In addition, KRGE-treated flies were not accompanied by reduction in locomotion and development. KRGE did not affect thermal resistance or starvation resistance, but increased resistance to oxidative stress. Furthermore, the lifespan of KRGE-treated flies were not further extended by dietary restriction and increased the expression of Sir2 suggesting that KRGE may acts like dietary restriction-like mechanism. We conclude that KRGE increases the lifespan of flies, possibly by DR-related pathway. Korean red ginseng can be used as worthy anti-aging and prolongevity supplements.

Key Words : Korean red ginseng extract, *Drosophila melanogaster*, Dietary restriction

P-31

The effects of parental age on fitness of offspring in *Drosophila melanogaster*

Woong Seo and Kyung-Jin Min

Department of Biological Sciences, Inha University, Incheon 402-751, Republic of Korea

Maternal age is known to be negatively correlated with the lifespan of offspring in various animal models including yeast, rotifers, and flies, and possibly in humans. However, the combined effects of maternal and parental age on offspring lifespan are relatively unknown. Thus, we examined the physiological effects of parental age on offspring fitness using Canton-S strain of *Drosophila melanogaster*. We found that the lifespan of offsprings from old father and old mother is significantly increased compared with their counterparts. This longevity effect of parental age was not due to the reduction of feeding rate or reproduction capacity. In addition, the offsprings from the old parents showed increased resistance to oxidative stress, but decreased resistance to starvation stress. When mating preference of offspring from various aged parents are measured, the mating preference of offspring was not affected by parental age. These results suggest that the maternal and paternal age affects physiological fitness of offsprings.

Key words : Parental age, Second generation, *Drosophila melanogaster*

P-30

Syringaresinol from *panax ginseng* berry extend the lifespan of *Drosophila*

Shin-Hae Lee, Hye-Yeon Lee, and Kyung-Jin Min

Department of Biological Sciences, Inha University, Incheon 402-751, Republic of Korea.

Syringaresinol (SYR), a lignin found in several plants, was well known to have several pharmacological functions and activate SIRT1 expression leading to delayed cellular senescence. Since the activation of SIRT1 was related with organismal lifespan, we investigated the effect of syringaresinol on the lifespan and physiology in *Drosophila melanogaster*. Supplementation of 0.5 μ M SYR extended the mean lifespan of flies by about 13%, and this benefit of SYR on longevity was not caused by changes in physiology such as feeding amount and reproductive activity. In addition, supplementation of SYR improved the resistance to oxidative stress and reduced the body weight and triglyceride accumulation. Furthermore, SYR did not further extend the lifespan of flies fed dietary restricted diet and flies mutated on the *sirtuin* and *forkhead box O* (FOXO) gene, suggesting that the longevity effect of SYR was related with the dietary restriction and the activation of sirtuin and FOXO. Coincided with, FOXO was translocated from cytoplasm to nucleus of adult abdominal fat body by the supplement of SYR. Taken together, our data demonstrated that SYR extend lifespan, which is mediated by the activation of Sirtuin-FOXO signaling.

Key Words : Syringaresinol, lifespan, *Drosophila melanogaster*

P-32

Aronia berry extends the lifespan and reduces oxidative damage in *Drosophila melanogaster*

Ah Yoon, Hye-Yeon Lee, and Kyung-Jin Min

Department of Biological Sciences, Inha University, Incheon 402-751, Republic of Korea

Aronia berry (*Aronia melanocarpa*) is rich in polyphenolic pigment compounds like anthocyanin, well known reactive oxygen species (ROS) scavenger. The accumulation of ROS is related to cell damage and aging. Nevertheless ROS is tightly related to lifespan, there is no trial to test the longevity effect of aronia berry in animal model. In this study, we investigated the lifespan extension effect and anti-oxidative effect of aronia berry using *Drosophila melanogaster*. We measured the lifespan, resistance to stresses, expression levels of SOD genes, GSH/GSSG ratio and expression levels of GstD1-GFP in *Drosophila melanogaster*. We observed that aronia berry extract increased the mean lifespan by 10% and decreased mortality at 5 μ g/ml. In addition, aronia berry extract increased the resistance to oxidative stress in female flies, and decreased the mRNA levels of SOD1 and SOD2, GSH/GSSG ratio and the levels of GstD1-GFP. These findings indicate that aronia berry increases the lifespan and decreases ROS level in fruit fly. Aronia berry can be used as worthy anti-aging and prolongevity supplements.

Keyword : Aronia berry, longevity, *Drosophila melanogaster*

P-33 (OJ-21)

ヒト大動脈中膜の老化プロテオミクス

○津元裕樹¹、岩本真知子¹、兼平 茜²、副島友莉恵²、新井富生¹、濱松晶彦³、遠藤玉夫¹、沢辺元司²、三浦ゆり¹
¹都健康長寿研、²東医歯大、³都監察医務院

動脈硬化のひとつである「加齢性中膜変性症」は、梗塞などの閉塞性合併症を伴わないため、粥状硬化症に比べて研究が著しく遅れている。しかし、加齢により生理的に発生し、大動脈解離、大動脈瘤、うっ血性心不全など重篤な症状を引き起こすことから、その病態を解明することはきわめて重要である。そこで本研究では、若齢、中齢、高齢群の大動脈中膜のプロテオミクスを行い、加齢に伴い変動するタンパク質について明らかにすることを目的とした。

病理診断の確定した若齢者3例(20代)、中齢者5例(50-60代)、高齢者4例(80代-100歳)の大動脈中膜からタンパク質を抽出し、蛍光二次元電気泳動法およびiTRAQ試薬を用いた安定同位体標識法による比較解析を行った。その結果、平滑筋収縮関連タンパク質のアクチンが減少し、アクチン結合タンパク質、トロポミオシン、ミオシンなどが増加、アクチンの脱重合関連タンパク質が減少することが明らかになった。これらは、アクチンの減少による平滑筋機能低下を補うために、その他のタンパク質が平滑筋収縮能を促進させる変化を起こしたものと考えられる。また、酸化ストレス関連タンパク質である extracellular SOD、glutathione S-transferase、thioredoxin などが増加することが明らかになり、加齢により大動脈組織が酸化ストレスにさらされている可能性が示唆された。

Keywords : 大動脈中膜、老化、プロテオミクス

P-35

Dysregulation of the Bmi-1/p16^{Ink4a} pathway provokes an aging-associated decline of submandibular gland function

○Kimi Yamakoshi¹, Satoshi Katano¹, Mayu Iida¹, Hiromi Kimura¹, Atsushi Okuma², Madoka Ikemoto-Uezumi³, Naoko Ohtani⁴, Eiji Hara², Mitsuo Maruyama¹
¹Dep. of Mech. of Aging, Res. Inst. of NCGG, ²Div. of Cancer Biol., The Cancer Inst. of JFCR, ³Dep. of Regen. Med., Res. Inst. of NCGG, ⁴Dep. of Appl. Biol. Sci., Fac. of Sci. and Tech., Tokyo Univ. of Sci.

Bmi-1 prevents stem cell aging, at least partly, by blocking expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16^{Ink4a}. Therefore, dysregulation of the Bmi-1/p16^{Ink4a} pathway is considered key to the loss of tissue homeostasis and development of associated degenerative diseases during aging. However, because Bmi-1 knockout (KO) mice die shortly after birth, it is difficult to determine exactly where and when dysregulation of the Bmi-1/p16^{Ink4a} pathway occurs during aging *in vivo*. Using real-time *in vivo* imaging of p16^{Ink4a} expression in Bmi-1-KO mice, we uncovered a novel function of the Bmi-1/p16^{Ink4a} pathway in controlling homeostasis of the submandibular glands (SMGs), which secrete saliva into the oral cavity. This pathway is dysregulated during aging *in vivo*, leading to induction of p16^{Ink4a} expression and subsequent declined SMG function. These findings will advance our understanding of the molecular mechanisms underlying the aging-related decline of SMG function and associated salivary gland hypofunction, which is particularly problematic among the elderly.

Keywords : Bmi-1/p16^{Ink4a} pathway, knockout mice

P-34

骨格筋幹細胞における維持機構の解明

○本橋 紀夫¹、朝倉 淳²、森 秀一¹、高嶋 留美¹、重本 和宏¹
¹東京都健康長寿医療センター研究所 老年病態研究チーム 運動器医学
²ミネソタ大学医学部 幹細胞研究所

【背景・目的】骨格筋は、各種運動や筋疾患による損傷・壊死に対し著しい再生能力を有しているが、その中心的役割を果たしているのが筋衛星細胞である。通常静止状態にあるが、筋傷害によって活性及び増殖し、その後傷害を受けた筋線維と融合し筋再生は完了する。一部の活性化筋衛星細胞は、自己複製し再び静止状態に戻る。筋再生能は、加齢と共に低下する事が知られるが、その原因として筋衛星細胞数の減少及び機能低下が報告されてきた。しかし、筋衛星細胞がどのように維持されているかは未だ明らかではない。以前、我々はMyoDが筋衛星細胞の自己複製を制御する因子である事を報告した。更にMyoDの下流に存在する細胞周期抑制因子p21が筋衛星細胞の自己複製に重要な働きをしている可能性を見出した。そこで本研究では、筋衛星細胞の自己複製機構をp21に着目して解明することを目的とした。【方法】p21 KO マウス骨格筋を用いて筋衛星細胞の解析を行った。さらに野生型及びp21 KO 骨格筋から筋衛星細胞を単離・培養及び移植し、*in vivo* 及び *in vitro* において筋衛星細胞の自己複製能を検討した。【結果】p21 KO 筋線維は野生型に比べ、より多くの Pax7 陽性筋衛星細胞を有した。更にp21KO 筋芽細胞は野生型に比べ、より多くの Pax7 陽性 MyoD 陰性リザーブ細胞 (*in vitro* 実験系で筋衛星細胞に相当する細胞) を産生した。p21KO 筋芽細胞は、免疫不全マウス骨格筋に移植後、野生型筋芽細胞に比べ、より多くの筋衛星細胞を産生した。【結論】筋衛星細胞においてp21は筋分化及び自己複製を制御する事を見出した。p21の発現は、老化した筋衛星細胞において上昇している事が報告されている。すなわち、加齢による筋衛星細胞の機能低下および数の減少は、p21の発現上昇が原因である可能性が示唆される。

P-36

clk-1 トランスジェニックマウスにおける筋ミトコンドリア機能低下と寿命延長

○高橋由美¹、野田義博²、大澤郁朗¹、白澤卓二³、高橋和秀¹
東京都健康長寿医療センター研究所 (¹ 生体環境応答、² 実験動物施設)、³ 順天堂大学大学院、加齢制御医学講座

clk-1 遺伝子は、ミトコンドリア呼吸鎖において電子運搬体として働くコエンザイム Q (CoQ) の合成酵素のひとつをコードしている。clk-1 遺伝子の機能が突然変異により失われると線虫では寿命が延長することが報告されており、少なくとも線虫では clk-1 遺伝子は寿命関連遺伝子とされている。ところが、clk-1 遺伝子が哺乳動物においても寿命を制御しているかは、clk-1 欠損マウスが胎生致死であるため明らかではなかった。そこで我々は clk-1 欠損マウスにマウス clk-1 を遺伝子導入することにより胎生致死をレスキューし、CoQ レベルの低い Tg96 マウスを作成した (Nakai et al. 2004)。寿命解析には多数の個体が必要なため、本研究では、Tg96 マウスに多産系統である ICR マウスを交配し (Tg96/I マウス) 寿命を解析した。その結果、Tg96/I マウスは雌雄共に野生型マウスに比べ平均寿命および最大寿命が延長することを見出した。予想に反し Tg96/I マウスの肝臓、下肢骨格筋における CoQ 量は野生型マウスと同レベルであったが、Tg96/I マウスは雌雄共に野生型マウスに比べ身体が小さく、活動期である暗期の全身酸素消費が野生型マウスに比べ有意に低下していた。また Tg96/I マウスは、大腿四頭筋など 5 種類の下肢骨格筋の重量も野生型マウスに比べ有意に小さく、筋ミトコンドリアにおける酸素消費量および ATP 量が雌雄共に野生型マウスに比べ有意に少なかった。これらの結果から、clk-1 欠損マウスへの clk-1 遺伝子導入およびその後の交配が、CoQ レベルの低下を伴わないミトコンドリアの機能低下、個体レベルにおける代謝低下と小型化、さらに個体寿命の延長を誘導したと考えられる。

Keywords : clk-1 遺伝子、ミトコンドリア、コエンザイム Q (CoQ)

P-37 (OJ-7)

線虫 *C. elegans* の MXL-3 転写因子の酸化ストレス応答

○高橋航大¹、安田佳代²、石井恭正¹、笹川昇³、石井直明¹

¹東海大学医学部基礎医学系分子生命科学、²東海大学伊勢原キャンパス生命科学統合支援センター、³東海大学工学部生命化学科

【背景と目的】

転写因子 MXL-3 は、通常環境下ではリソソームに局在する脂肪分解酵素の発現を抑制しているが、飢餓状態では MXL-3 の働きが抑制され、リソソームに局在する脂肪分解酵素の抑制が外されることで、リポファジーが誘導され、その結果、脂肪の分解が促進することが報告されている。また、MXL-3 は酸化ストレス応答に関与する転写因子 SKN-1 と結合するという報告があり、酸化ストレス応答に関与する可能性が示唆されている。

我々は、線虫 *C. elegans* の耐性幼虫期に放射線を照射すると、mxl-3 遺伝子の発現量が増加し、正常発生復帰後の寿命が延長することを見出している。放射線は生体内で水と反応して活性酸素を発生させることが知られており、本研究では MXL-3 の酸化ストレスへの関わりを調べた。

【方法と結果】

線虫 *C. elegans* の野生株を、生体内に活性酸素を過剰に発生させるパラコートに曝露させ、mxl-3 の発現量を qPCR で確認したところ、4 時間以上曝露させたもので mxl-3 の発現上昇が認められた。mxl-3 遺伝子が欠損した線虫 *C. elegans* の変異体を用いて、90% 酸素曝露下で寿命測定を行ったところ、野生株に比べて寿命短縮効果が顕著に現れた。さらに、パラコートを寒天培地に添加して飼育すると野生株と比較して生存率が低下した。

【考察】

通常環境下での mxl-3 変異体は長寿となることが報告されている。一方、高酸化ストレス下で野生株の mxl-3 の発現量が上昇し、mxl-3 変異体が短寿命を示すことから、MXL-3 は大気中のような低い酸化ストレスには関与せず、強い酸化ストレスに対してのみ応答している可能性が示唆された。

Keywords: 線虫、Mxl-3、酸化ストレス

P-39 (OE-5)

免疫老化関連遺伝子 Zizimin2 は辺縁帯 B 細胞の形成に関与する

○松田剛典、築瀬正伍、丸山光生

国立長寿医療研究センター 研究所 老化機構研究部

我々はこれまでに Zizimin2 (Ziz2, Dock11) をクローニングし、それが Cdc42 に対するグアニンヌクレオチド交換因子であるという事、さらに、フィロディアの形成を促進する事を示した。また、その発現パターンが免疫組織特異的である事や Cdc42 が B 細胞の分化ならびに免疫応答に関与する事から、Ziz2 が B 細胞の分化ならびに免疫応答に関与するのではないかと考えた。さらに、免疫組織における Ziz2 の発現量が加齢に伴って低下するという事が判明した為、Ziz2 が免疫老化のメカニズムにも関与するのではないかと考えられた。しかし、Ziz2 に対する *in vivo* における機能解析はこれまでに行われていなかった。そこで我々は、Ziz2 を介した免疫老化のメカニズムに迫る為、Ziz2 遺伝子欠失 (KO) マウスを作製し、B 細胞の分化や免疫応答における Ziz2 の関与を調べた。

その結果、Ziz2 KO マウスでは、野生型あるいはファミリー遺伝子の Zizimin3 (Ziz3; Dock10) KO マウスに比べて辺縁帯 B 細胞が減少していた。さらに、B 細胞特異的な Ziz2 KO マウスでも辺縁帯 B 細胞が減少した事から、辺縁帯 B 細胞の形成には B 細胞内での Ziz2 の発現が必要だと考えられた。そこで、さらに詳細に形態について解析したところ、CD169 陽性の辺縁帯メタロフィリックマクロファージ (MMM) の外側に位置する CD1d 陽性の辺縁帯 B 細胞の領域が KO マウスにおいて狭くなっている事、加えて、Ziz2 KO マウス内に存在する MMM の形態が WT マウス内のそれと比べて変化していることを見出した。

これらの事から、我々は、Ziz2 が辺縁帯 B 細胞の形成/局在、さらに、MMM の形態に関与すると考えている。今後はこれら KO マウスを用いた種々の抗原に対する免疫応答の解析を含めて、高齢者における感染症への罹り易さの理由の一部に Ziz2 を介した辺縁帯 B 細胞の減少が寄与するか否かについても明らかにしていきたい。

Keywords: 辺縁帯、B 細胞、Zizimin2

P-38

ゲフィチニブ副作用の水素水による効果的抑制

○大城樹実^{1,2}、鈴木徹也^{1,2}、寺崎泰弘³、渡名喜梢^{1,4}、池谷真澄¹、高橋真由美¹、川口英夫²、服部成介⁴、大澤郁朗¹

¹都健康長寿研・生体環境応答、²東洋大・生命科学、³日本医大・解析人体病理、⁴北里大・薬

EGFR チロシンキナーゼ選択的阻害薬ゲフィチニブ (イレッサ) は非小細胞肺癌で顕著な腫瘍縮小効果を示すが、急性肺障害など死に至る重篤な副作用が知られる。そこで、高濃度水素分子含有水 (水素水) によるゲフィチニブの副作用抑制効果を検証した。

生後 7 週齢雌マウスにナフタレン 200 mg/kg を単回腹腔内投与し、ゲフィチニブを 200 mg/kg/day で連日経口投与した。水素水もしくはコントロール水 (水素再脱気水) は自由飲用させた。結果、1 週間以内に生じるナフタレンとゲフィチニブの併用による急激な体重低下と生存率の低下が水素水摂取で有意に抑制された。また、BALF 中の細胞数や CCL2、IL-6 の増加、肺組織の単球・マクロファージや T 細胞の増加がいずれも水素水の摂取で顕著に抑制された。一方、水素分子がゲフィチニブの薬効に影響しないことは、ヌードマウスに移植したヒト肺癌細胞のゲフィチニブによる増殖抑制を水素水が阻害しないことで確認した。細胞培養系でも同様の結果を得ている。

水素水はゲフィチニブの薬効を阻害することなく副作用を抑制したことから早期の臨床応用が期待される。現在、水素水による抑制機構を探るため、投与開始直後の酸化ストレスと炎症マーカーの変動を解析中。

Keywords: 肺、抗がん剤、炎症

P-40

マウス免疫老化関連遺伝子 Zizimin2 のプロモーター領域における機能的解析

○鄒岑^{1,2}、松田剛典²、岩下雄二²、杉本昌隆³、丸山光生^{1,2}

¹名古屋大学大学院医学系研究科老化基礎科学、²国立長寿医療研究センター研究所老化機構研究部、³国立長寿医療研究センター研究所老化細胞研究プロジェクトチーム

私達は、マウス脾臓 B 細胞において T 細胞依存性抗原で活性化される遺伝子として Zizimin2 (Ziz2; Dock11) を単離した。その発現特異性が、脾臓や胸腺などの免疫組織において限定されることから、Ziz2 は免疫応答関連遺伝子と考えられた。Ziz2 は、主要な GTP 加水分解酵素の一つである Cdc42 を活性化させるグアニンヌクレオチド交換因子としての機能を有し、糸状仮足の形成を誘導する。また、高齢マウスでは、T 細胞依存的な抗原刺激の前後において Ziz2 遺伝子の発現が若齢マウスに比べて低下していた為、Ziz2 は免疫老化とも関連していると考えられた。しかし、なぜ加齢とともに Ziz2 の転写レベルが下がるのかはよく解っていなかった。そこで我々は、ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いてマウス Ziz2 遺伝子のプロモーター/エンハンサー領域を調べ、転写制御領域の解析を行った。

UCSC ウェブサイトを用いて予想したマウス (C57BL/6) ゲノム中に存在する転写制御候補領域 (転写開始点より 1.9 または 0.8 kb 上流までの領域; それぞれ、ZX1 または ZX2) を PCR で増幅し、pGL3-basic の NotI と XhoI サイトに挿入した。そして、個々のベクター (あるいは、pGL3-basic のみ) を、Ziz2 遺伝子が発現している NIH-3T3 細胞株と RAW264.7 細胞株に導入し、レポーター遺伝子の活性を解析した。

その結果、解析した候補領域 (ZX1 と ZX2) がどちらの細胞株においても有意なプロモーター活性を有していること、より短い候補領域を含む ZX2 は ZX1 より高い転写活性を示すことが判明した。今後は、ZX1 から ZX2 までの領域に転写抑制領域が含まれる可能性を含め、ZX1、ZX2 の欠失変異体等を作製しマウス Ziz2 遺伝子発現機構の cis 制御因子を明らかにしていく予定である。

Keywords: 免疫老化、転写調節、GTPase

P-41

心臓由来幹細胞の老化に伴う特性変化

○板倉陽子¹、肥田直子^{1,2}、豊田雅士¹

¹地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター研究所・老年病態研究チーム、
²慶應義塾大学医学部産婦人科

間葉系由来の幹細胞には医療応用への様々な可能性が多く存在するが、その細胞特性はまだまだ不明な点も多い。高齢者医療において患者への負担を考慮し、安全で効率の良い治療は不可欠である。そのためにも、臓器移植に頼らない細胞移植療法における移植細胞の特性評価は急務である。

本研究では、移植細胞の対象となり得る様々な間葉系組織から取得した細胞(初代培養細胞および市販細胞)の表面マーカーを比較すると同時に、継代に伴う老化における特性変化を解析した。

高齢心疾患患者の心臓から取得した幹細胞、骨髄および羊膜由来幹細胞の細胞表面マーカーをフローサイトメトリーにより解析したところ、一般的な間葉系幹細胞マーカーであるCD抗原の発現を認めた。これらの細胞と市販の心臓由来細胞に発現するCD抗原は類似していた。また、各細胞の増殖・継代過程において間葉系幹細胞マーカーを観察し、特定のCD抗原に対する反応性の減少を認めた。一方、これらのCD抗原を発現する細胞表面の糖鎖を解析し、網羅的な糖鎖プロファイルを取得して、その変化について解析を進めている。

今後は、こうして得られた糖鎖のデータを基に、各細胞の分化特性との相関について検討し、移植に最適な細胞選択の指標として評価を実施する。

Keywords : 心臓、間葉系幹細胞、糖鎖

P-42 (OJ-11)

Klotho マウス肺で見られる糖タンパク質の局在変化の解析

○赤阪一萬谷啓子、萬谷博、遠藤玉夫
東京都健康長寿医療センター研究所・分子機構

挿入突然変異により α -Klotho を欠損させたマウス(Klotho マウス)は生後3~4週齢頃から骨粗鬆症や動脈硬化、肺気腫、皮膚の萎縮などヒトの老化過程においてよく見られる多彩な症状を示し始め、8~10週齢で死亡する。出生時から4週齢にかけては正常であることから、成長障害ではなく老化関連疾患のモデルマウスとして利用されている。また、 α -Klotho のトランスジェニックマウスでは寿命が20~30パーセント長くなる。以上のことから α -Klotho は老化を制御する因子と考えられている。

α -Klotho はI型膜タンパク質であり、その発現は腎尿管、脳脈絡膜、副甲状腺などに限局している。しかし、肺や骨などの α -Klotho の発現の見られない組織でもKlotho マウスでは異常が認められることが報告されている。これは、ADAMなどのプロテアーゼによってプロセッシングを受けた分泌型 α -Klotho の存在によるものと考えられる。

α -Klotho は糖分解酵素にホモロジーを持つことから、糖との関連が示唆されていた。そこで、Klotho マウスの臓器における糖の発現を網羅的に解析したところ、肺においてある特定の糖鎖を持つタンパク質の局在が変化していることを見出した。そこで、この糖鎖の構造を解析し、野生型とKlotho マウスで比較した。また、前述のとおりKlotho マウスの肺では肺気腫の症状が認められることから、この糖鎖と α -Klotho、肺気腫の関連について解析した。

Keywords : α -Klotho、糖鎖、肺気腫

P-43

マウスの臓器、血漿におけるビタミンEの加齢変化

○高橋経太^{1,2}、下門顕太郎²、河野望³、新井洋由³、石神昭人¹

¹東京都健康長寿医療センター研究所分子老化制御、
²東京医科歯科大学血流制御内科学、³東京大学大学院薬学研究所

ビタミンE(VE, α -トコフェロール)は脂溶性の抗酸化物質である。本研究では、マウスの臓器、血漿におけるVEの加齢変化について調べた。一晚絶食した3, 6, 12, 18, 24ヵ月齢のC57BL/6NCr雄マウスから、様々な臓器及び血漿を採取してVE及びトリグリセリド(TG)を測定した。臓器中のVEはTGで標準化した。また、VEの細胞内輸送に関与する α -tocopherol transfer protein(α TTP)、VEの代謝に係わるcytochrome P450 4f14(Cyp4f14)及び肝臓からのVEの放出を担うATP-binding cassette A1(ABCA1)の遺伝子発現やタンパク質量の加齢変化も調べた。その結果、血漿VE濃度に有意な加齢変化は見られなかった。また、肝臓でのVE量は6ヵ月から24ヵ月齢の間に有意な加齢変化は認められなかった。一方、精巢上体周囲脂肪のVE量は6ヵ月齢以降24ヵ月齢まで急激に増加した。肝臓での α TTPタンパク質量は3ヵ月齢以降12ヵ月齢まで増加し、それ以降24ヵ月齢まで減少した。しかし、 α TTPの遺伝子発現に有意な加齢変化は認められなかった。また、ABCA1の遺伝子発現は6ヵ月から24ヵ月齢の間に有意な加齢変化は認められなかった。一方、Cyp4f14の遺伝子発現量は12ヵ月齢以降24ヵ月齢まで有意に減少した。これらの結果は、VEの複雑な代謝、加齢変化を示唆している。

Keywords : aging, vitamin E, α -tocopherol transfer protein

P-44 (OE-8)

アミロイド β の「毒性コンホマー」を標的とした受動免疫療法はアルツハイマー病モデルの神経症状を改善する

○泉尾直孝¹、村上一馬²、徳田隆彦³、久米利明⁴、赤池昭紀^{4,5}、
白澤卓二⁶、横手幸太郎¹、入江一浩²、清水孝彦¹

¹千葉大院・医、²京都大院・農、³京都府医大院・医、
⁴京都大院・薬、⁵名古屋大院・創薬、⁶順天堂大院・医

【Introduction】Amyloid β (A β)は、アルツハイマー病(AD)の病態形成に重要であり、特にA β 42は高い凝集能および強力な神経毒性を示す。A β 42は様々な立体構造を有するが、病態形成と密接に関連する立体構造は不明であった。これまで我々は、22-23位においてターン構造を有するコンホマーが高い凝集能および神経毒性を示すことを明らかにし、A β 42の「毒性コンホマー」と名付けた。本研究では、A β 42の毒性コンホマーのAD治療および診断における標的としての有用性について検討した。

【Methods and results】毒性コンホマーに対する特異抗体を作製するため、22-23位においてターン構造を形成しやすい変異A β 断片(E22P-A β 10-35)をマウスに免疫した。得られたクローンのうち、野生型A β 42および22-23位においてターン構造を形成しやすい変異体E22P-A β 42など)強く反応し、ターン構造を形成しにくい変異体E22V-A β 42など)反応しにくいものを選別し、以前報告したIIA1抗体に比べて毒性コンホマーに対する選択性の高い立体構造特異抗体(24B3)を新たに得た。24B3抗体を用いた免疫組織化学染色を行ったところ、IIA1抗体とは異なりAD患者およびADモデルマウス(変異型PS2, Tg2576)老人斑に対する反応性はきわめて低かった。一方、24B3抗体をADモデルマウスに3ヵ月間投与すると、老人斑には影響を与えずに神経症状の改善を示した。さらに、A β のN末端を認識する82E1抗体と24B3抗体を組み合わせたsandwich ELISAの構築により、AD患者の脳脊髄液中の毒性コンホマー量が増加傾向を示すことが明らかとなった。【Conclusion】A β 42の毒性コンホマーは、ADの病態形成に重要であり、その除去は有効な治療戦略であることが示唆される。

Keywords : Amyloid β (A β)、立体構造特異的抗体、病態形成

P-45

テロメア短縮の2相性（若年期の急速短縮と中高年期の緩徐な短縮）からヒト老化プロセスを再考する

○石川直、仲村賢一、泉山七生貴、相田順子、田久保海苔
東京都健康長寿医療センター研究所老年病理学研究チーム

【背景】 昨年の本学会で私達は、肝臓における加齢/老化変化が若齢～中年成人（30歳代）で起こり、生体肝移植の予後に影響を与えることを報告した。最近、移植肝の免疫寛容には年齢因子が重要で35歳より若い供与者由来肝が有意に高いことを明らかにした。中年期までの老化機構の解明が重要視される。これまで、テロメア短縮は幼少期に大きく、成人期では緩徐であることが報告されてきたが思春期から中年期にかけてのテロメア長動態の多くは未解明のまま残されている。【材料】 東京都健康長寿医療センター、日赤医療センターで剖検された材料。【方法】 1) テロメア長計測：①サザンブロット法による Terminal restriction fragment length (TRFL)、②セントロメアシグナルを内部標準、TIG-1 (34PDL) 細胞を外部標準とする組織 Q-FISH 法により、Normalized Telomere Centromere Ratio を算出。2) 統計解析：テロメア長と年齢の相関を回帰解析。【結果】 TRFL 解析：肝臓（191例 0～101歳）～30歳、心臓（530例、0～104歳）、下垂体（63例、0～100歳）腎臓（137例、0～101歳）ではいずれも 20～30歳、に変異点を有する2相性の回帰線が得られた。Q-FISH 解析：脾臓 $\alpha \cdot \beta$ 細胞（104例、0～100歳）20歳に変異点を有する2相性の回帰線が得られた。また、Q-FISH 解析からは新生児期～若齢者の諸臓器で認められる著明に長いテロメアを有する細胞が中年期以降の諸臓器ではほぼ失われる。【結論】 全身臓器におけるテロメア長の急速な短縮は若齢～中年成人（30歳代）までに起こり、中年期から以降は緩徐となる。また、若齢期のテロメア短縮は特に長いテロメアを有する細胞の消失が特徴あることが判明した。今後若年から中年のテロメア短縮の動態と加齢/老化変化の関連の解明が求められる。

Keywords：テロメア、老化プロセス

P-47

探索的データ分析を用いたマウスの行動解

○安齋朋洋、小西智一
秋田県立大学生物資源科学研究所

これまで、動物の行動を解析する方法は様々なものがあった。観測者がリアルタイムでマウスの行動を記録する方法から、赤外線ビームや専用のカメラを用いて記録する方法まで、観察の方法も多様なら、その解析方法もまた多様である。しかし、老化の進行やそれに関連する行動について、再現よく敏感に解析する方法が求められていた。

私達の研究室では、市販のデジタルカメラで行動を記録し、フリーソフトである R で解析する、半自動の方法を開発している。この方法は、高価な観測装置・解析ソフトを使用しないで、観察者の労力を減らす事ができる。ここでは、その方法についての妥当性の検証について報告する。

これまでのパーキンソン病の研究から、L-dopa を投与したマウスが登攀行動をとることが知られていて、これはクライミングテストで確認されていた。この状態のマウスでオープンフィールドでの運動を記録・解析したところ、探索行動が増えることが確認された。たとえば動画を肉眼で観察しても、こうした効果はわからないが、行動を数値化してパラメトリックに解析することで差が検出できるようになったものと考えられる。この方法を使えば、(登攀などの著しい) 副作用のない薬剤をスクリーニングできるものと期待している。

Keywords：マウス、行動解析

P-46

シトルリン化タンパク質特異的モノクローナル抗体の確立

○加賀美弥生¹⁾、増富裕文¹⁾、Choi Eun-Kyoung²⁾、Kim Yong-Sun²⁾、丸山直記¹⁾、石神昭人¹⁾

¹⁾ 東京都健康長寿医療センター研究所 分子老化制御

²⁾ Hsong Institute of Life Science, Hallym University

翻訳後修飾のひとつであるタンパク質のシトルリン化は、酵素ペプチジルアルギニンデアミナーゼ (PAD) により、ペプチド中のアルギニン残基をシトルリンに変換する酵素修飾である。タンパク質シトルリン化は、表皮の角化や遺伝子発現調節など重要な生理機能を有する。一方、アルツハイマー病の脳ではシトルリン化タンパク質や PAD が正常脳に比べて多く存在し、病態との関連が示唆されている。本研究では、シトルリン化タンパク質を網羅的かつ特異的に検出するためのモノクローナル抗体を作製し、その特異性を解析した。

PAD によりシトルリン化したヒストンを化学修飾し、マウスに免疫した。得られた5クローンの抗化学修飾シトルリンモノクローナル抗体 (AMC-mAb) の感度と特異性を、マウス死後直後、30分、60分、120分の脳を用いて検討した。AMC-mAb のいくつかのクローンでは、死後30分以降のマウス脳からシトルリン化タンパク質を検出できた。また、経過時間に応じて増加する傾向も認めた。免疫組織化学染色では、海馬および大脳皮質で AMC-mAb に反応性の高い細胞と領域が見られた。このように、シトルリン化タンパク質を網羅的かつ特異的に検出するモノクローナル抗体を確立できた。

Keywords：タンパク質シトルリン化、翻訳後修飾、ペプチジルアルギニンデアミナーゼ

P-48

ヒトアストロサイトーマ細胞株 U-251MG 細胞での cAMP による PADs 誘導、及びシトルリン化タンパク質の増加

○増富裕文^{1,2)}、Choi Eun-Kyoung³⁾、Kim Yong-Sun³⁾、下門顕太郎²⁾、石神昭人¹⁾

¹⁾ 東京都健康長寿医療センター研究所 分子老化制御、²⁾ 東京医科歯科大学 血流制御内科学、³⁾ Hsong Institute of Life Science, Hallym University

シトルリン化タンパク質は、カルシウム (Ca^{2+}) 依存性の酵素、ペプチジルアルギニンデアミナーゼ (PADs) によりタンパク質中のアルギニン残基がシトルリン残基に変換されたタンパク質の総称である。これまでに、アルツハイマー病 (AD) 患者の脳でシトルリン化タンパク質の異常な蓄積を報告してきた。本研究では、ヒトアストロサイトーマ細胞株 U-251MG 細胞を用いて、PADs の発現、及び dibutyryl cAMP (dbcAMP) による PADs の発現誘導を検討した。

U-251MG 細胞では、PAD2 及び PAD3 の遺伝子発現が認められた。また、dbcAMP の濃度依存的及び時間依存的に PAD2 及び PAD3 の mRNA 発現量、タンパク質量が増加した。PAD2 及び PAD3 の発現増加に伴い、シトルリン化タンパク質も増加した。また、シトルリン化されるタンパク質として、グリア線維性酸性タンパク質 (GFAP) を同定した。我々は以前に、AD 患者の脳でシトルリン化 GFAP の蓄積も明らかにしている。これらの結果は、アストロサイトーマでの PADs によるシトルリン化タンパク質及びシトルリン化 GFAP の増加が AD の発症に間接的に関与する可能性が示唆される。

Keywords：Alzheimer's disease, peptidylarginine deiminase, citrullinated proteins

P-49 (OJ-15)

水素水はリポ多糖 (LPS) によって誘起されるエンドトキシンショックに対し予防効果を発揮する

池谷真澄¹、大城樹実^{1,2}、柴田茉貴^{1,2}、高橋真由美¹、川口英夫²、大澤郁朗¹
¹ 都健康長寿研・生体環境応答、² 東洋大・生命科学

水素分子 (H₂) が生体内において抗酸化・抗炎症作用を発揮し、様々な疾病の症状改善に寄与するということが、これまでに 300 以上の論文による治療効果、臨床報告によって成されてきた。しかし、H₂ の作用機序には不明な点が多く、また H₂ の適切な投与は未だ明らかになっていない。グラム陰性菌の細胞壁に由来するリポ多糖 (LPS) は体内に多量に存在すると炎症性サイトカインが多量に産生されエンドトキシンショックを引き起こすことが知られている。致死量の LPS を投与したマウスはエンドトキシンショックによる敗血症を引き起こし、数日で死に至ることが知られている。今回、この敗血症モデルマウスを用い、高濃度 H₂ 含有水 (水素水) の効果を検討した。LPS 投与 3 日前から投与後 3 日まで水素水をマウスに飲ませ続けると、生存率が改善し回復に向かうことが明らかになった。また、LPS 投与前だけ水素水を飲用させ LPS 投与後は純水を飲ませたマウスの生存率も、LPS 投与前から LPS 投与後にかけて純水を飲ませ続けたマウスに比べて症状が改善したことから炎症に対する予防効果も発揮すると考えられ、臨床における H₂ 投与方法確立に向けて新たな知見を示した。現在、水素水による予防機構を明らかにするため、酸化ストレスと炎症マーカーの変動を解析中である。

Key words : LPS, 水素水, 炎症

P-51

ヒト血管内皮細胞における老化関連タンパク質の同定

○ 佐々木紀彦、豊田雅士
東京都健康長寿医療センター研究所老年病態研究チーム
血管医学研究

血管内皮細胞は、血管の最内層に存在し、血管運動神経性緊張の制御、血球の輸送、血栓形成、透過性、増殖、生存性および免疫といった多くの生理的機能に重要な役割を果たしている。これまでの研究により、加齢や老化に伴った血管疾患の進展には血管内皮機能の低下が関わりとされている。細胞表面には、複合糖質として糖鎖が発現しており、糖鎖は、細胞表面マーカーとしての役割を担っているだけでなく、様々な細胞機能にも関わっていることが知られている。近年の報告によれば、血管内皮細胞の表面糖鎖が内皮の生理機能に関わっていることが明らかにされてきている。しかしながら、加齢や老化との関連で、ヒト血管内皮細胞における糖鎖の役割についてはほとんど明らかにされていない。そこで、我々は、ヒト血管内皮細胞の加齢や老化過程において、糖鎖発現解析を行い、糖鎖質の一群をなす糖タンパク質の発現が老化と関連して変化することを見出した。さらに、糖タンパク質の発現変化が老化に伴う内皮機能の低下に関わることを示唆するデータが得られたので報告する。

Keywords : 細胞老化 / ヒト血管内皮細胞 / ガングリオシド

P-50 (OJ-23)

SMP30 を欠損した *Lepr^{db/db}* マウスは small dense LDL が高く脂肪肝になる

○ 近藤嘉高¹、長谷川剛二²、千丸貴史²、福井道明³、中村直登²、丸山直記³、尾林博^{2,4}、石神昭人³
¹ 東邦大・理、² 京都府立医大・内分泌・代謝内科学、³ 都健康長寿医療センター研・分子老化制御、⁴ 生体応答情報科学研究所

加齢指標タンパク質 30 (SMP30) は、加齢に伴い減少するタンパク質であり、抗酸化作用および抗アポトーシス作用を有する。本研究では、非アルコール性脂肪肝 (NAFLD) における SMP30 の関与を明らかにするため、SMP30 ノックアウトマウスと *Lepr^{db/db}* マウスを交配して *Lepr^{db/db}Smp30^{0/0}* マウスを作製し、脂質代謝を解析した。

オスの 8 週齢 *Lepr^{db/db}Smp30^{0/0}* マウスを通常食 (340 kcal/100 g, 脂肪 5.6%) で 16 週間飼育した後、解剖した。血漿脂質およびリポタンパク質は HPLC 法を用いて、肝臓における脂質代謝関連遺伝子の発現はリアルタイム PCR 法で、小胞体ストレス指標はウエスタンブロット法により解析した。また、ホルマリン固定した肝臓切片を用いて、ヘマトキシリン・エオジン染色および抗 4-ヒドロキシノネナール抗体による免疫組織化学染色を行った。

Lepr^{db/db}Smp30^{0/0} マウスの肝臓における SMP30 発現量およびタンパク質量は、*Lepr^{db/db}Smp30^{+/+}* マウスに比べて少なかった。*Lepr^{db/db}Smp30^{0/0}* マウスは、*Lepr^{db/db}Smp30^{+/+}* マウスに比べて、1) small dense LDL コレステロールの高値および HDL コレステロールの低値、2) 多数の炎症細胞の浸潤および強い酸化ストレスを伴う脂肪肝、3) 脂肪酸の酸化 (PPAR α) およびリポタンパク質の取り込み (LDL および VLDL) に関する遺伝子の低発現、*CD36* の高発現、4) 小胞体ストレスの亢進が認められた。

本研究により、SMP30 は NAFLD と密接に関連することが明らかとなった。SMP30 は、NAFLD の治療標的となる可能性が示唆される。

Keywords : NAFLD, oxidative stress, senescence marker protein-30

P-52

Cas/HEF1 associated signal transducer 過剰発現による神経細胞死と Rap1A 活性化

○ 五味不二也、内田洋子
東京都健康長寿医療センター研究所 記憶神経

β -アミロイド (A β) はアルツハイマー病の原因物質である。しかし、A β 毒性の分子機構はまだ明らかではない。網羅的遺伝子解析により、A β によって発現誘導される遺伝子群のなかに Cas/HEF1 associated signal transducer (Chat) を見いだした。Chat は SH2 領域、a guanine nucleotide exchange factor for Ras like small GTPases (GEF) 様領域を持ちいろいろな分子と結合する。

Northern hybridization により Chat の発現変化の確認をしたところ培養ニューロンで A β 添加により 2.8 倍増加していた。

この遺伝子に Myc-tag をつけ培養神経細胞に強制発現させたところ、このタンパク質を発現している細胞では神経細胞死が誘導されていた。C 末側の Cas 結合領域を欠いたタンパク質を強制発現させると細胞死の誘導はせず、かえって神経細胞死を抑制していた。

Chat C 末側に結合する p 130Cas や NEDD9 を Chat と共発現させると神経細胞死は抑制された。

Chat C 末側に存在する GEF 様領域に注目し、Chat による細胞死への small G protein の効果を検討した。Dominant negative Rap1A を Chat とともに発現させると細胞死は抑制され、constitutively active Rap1A は Chat の発現なしでも細胞死を誘導した。Rap1A の活性化が Chat の下流で働いていると考えられる。

Keywords : Cas/HEF1 associated signal transducer (Chat)、 β アミロイド、神経細胞死

P-53 (OJ-1)

糖転移酵素異常による筋疾患モデルマウスの筋病理解析

○井上貴美子^{1,2}、山田健之¹、萬谷博¹、赤阪-萬谷啓子¹、
櫻井洋子¹、遠藤玉夫¹

¹都健康長寿医療セ・老化機構、²東京理科大学・基礎工学研究科

筋質膜のジストロフィン-糖タンパク質複合体 (DGC) は、筋膜の安定性や維持に重要とされる。DGC を構成する α -ジストログリカンには O-マンノース (Man) 型糖鎖が修飾されており、DGC と細胞外マトリクス分子との結合に必要である。O-Man 型糖鎖の生合成に関わる糖転移酵素の多くが先天性筋ジストロフィー症の原因遺伝子産物であることから、O-Man 型糖鎖が筋の機能や維持に重要であることが示されている。O-Man 型糖鎖はタンパク質の Ser / Thr に Man を介して結合する糖鎖であり、O-Man 転移酵素 (POMT1-POMT2 複合体) により生合成が開始される。POMT1 および POMT2 は先天性筋ジストロフィー症である Walker-Warburg 症候群の原因遺伝子であり、O-Man 型糖鎖不全が発症要因であると考えられている。

我々は、O-Man 型糖鎖の機能と筋疾患の病態の解明を目的として、O-Man 型糖鎖異常を呈する遺伝子改変マウスの作製・解析を行っている。今回は POMT1 欠損マウスの筋病理解析について報告する。

POMT1 完全欠損マウスは胎生致死であるため、ヒト骨格筋アクチン (HAS)-Cre を用いて骨格筋特異的な POMT1 欠損マウスを作製した。健常型および欠損型マウスの四肢より骨格筋を採取し、新鮮凍結切片を作製して色素免疫染色法により筋病理を解析した。

7 ヶ月齢マウスの欠損型では健常型に比較して、筋繊維の配列や大きさが不均一となり、中心核と再生途上筋の顕著な増加が認められ、筋再生の亢進が示唆された。一方、基底膜や質膜の傷害は観察されなかった。本解析から、O-Man 型糖鎖不全が筋病変の原因となることが明らかとなった。現在、筋病変および再生亢進のメカニズムを検討するため、運動負荷や加齢による影響を解析している。

Keywords : 糖転移酵素、筋疾患

P-55

Mdm20 による mTORC2 を介した Akt のリン酸化制御と老化への関与について

○安田邦彦、森望

長崎大学医学部 神経形態学 (解剖学第一)

神経細胞は生体内において最も長寿な細胞のひとつであり、その恒常性の維持が長寿をもたらす根幹の一つとなる。しかしながら、神経細胞は長寿命であるが故に老化に伴い細胞内機能が低下し、細胞内に不要かつ不良なタンパク質の蓄積を引き起こすと考えられている。実際アルツハイマー病などの神経変性疾患では加齢と相関して神経細胞に異常タンパク質が蓄積する。一方で、老化においてカロリー制限は寿命を延ばし、インスリンシグナル (IGF-PI3K-Akt シグナル) がその中心的な役割を担っていることが明らかになってきた。またエネルギー代謝やアミノ酸飢餓によって mTOR シグナルが惹起されることから mTOR も老化を制御する因子として注目をされている。我々は最近 N-アセチル転移酵素の補助サブユニットである Mdm20 が Akt のリン酸化を制御することでその下流でオートファジー誘導を介して、ポリグルタミンの凝集形成に影響を及ぼすことを報告した。その後の解析により Mdm20 は mTOR と Rictor から構成される mTORC2 の活性を Rictor の発現量を介して制御することを明らかにした。mTORC2 は Akt をリン酸化することからこれまでの結果は Mdm20-mTORC2-Akt のシグナル系の存在を示唆している。Akt の下流にはタウのリン酸化を担う GSK3 β や寿命制御因子である FOXO タンパク質があり、老化や神経変性疾患と密接な関係が報告されている。Mdm20 は GSK3 β や FOXO の活性も変化させることから、現在 Mdm20 による mTORC2 活性化機構及び老化現象について検討中である。

Keywords : Mdm20, mTORC2, Akt, FOXO, Autophagy

P-54

高グルコース間歇刺激による血管内皮細胞の老化機序について

○前田守彦、林登志雄、葛谷雅文

名古屋大学大学院医学系研究科 老年科学

【目的】我々は以前より糖尿病性血管内皮機能障害の一因である高グルコースが細胞老化を示す事を報告してきた。更に食後高血糖モデルである間歇性高グルコース刺激が細胞老化を促進し、その機序が持続性高グルコース刺激による機序と異なる可能性を見出した。本研究にて間歇性高グルコース刺激の細胞老化機序を更に検討した。【方法】ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用い、高グルコース (22mM) を持続性又は間歇性 (毎回 2 時間、2 回/日) に 3 日間刺激し細胞老化への影響を調べた。老化指標には SA- β -galactosidase (SA- β -gal) 活性を用いた。細胞老化の原因として telomerase 活性、telomere 長や活性酸素種 (ROS) を調べ、内皮機能障害を内皮型 NO 合成酵素 (eNOS) 等に検討した。更に DNA 損傷 (AP site), p53, p21 及び p16^{ink4a} の発現を確認した。【結果及び考察】高グルコース間歇刺激は通常グルコース刺激及び高グルコース持続刺激に比べ、SA- β -gal 活性及び細胞内活性酸素 (O₂⁻) を有意に上昇させた。telomerase 活性は持続性刺激では大きく低下したが間歇刺激では有意に低下しなかった。間歇刺激誘導老化では ROS の影響 (Stress induced senescence) が示唆された。活性酸素産生酵素: NADPHoxidase の主要サブユニット p22^{phox} の発現が間歇刺激で大きく上昇し、p22^{phox} の発現を siRNA にて抑制すると、SA- β -gal 及び ROS 活性が持続性刺激下と同程度にまで低下した。加えて間歇刺激にて DNA 損傷が有意に増加し、p22^{phox} の siRNA により DNA 損傷が減少した事より ROS の有意な影響が示唆された。間歇刺激は p53 発現を変化させなかったが、p16^{ink4a} 発現は有意に上昇した事より、高グルコース間歇刺激にて産生された ROS が p16^{ink4a} 経路を介し細胞老化を促進する可能性が示唆された。

Keywords : Cellular senescence, Intermittent glucose, ROS

P-56 (OE-10)

二種類の細胞老化における長鎖非コード RNA のトランスクリプトーム解析

○岩下雄二¹、石澤和也¹、杉本昌隆²、丸山光生¹

国立長寿医療研究センター研究所、¹老化機構研究部、²老化細胞研究プロジェクトチーム

老化によって、我々の組織機能は生涯を通じて段階的に低下する。細胞老化は不可逆的な細胞増殖の停止と定義され、障害を受けて潜在的に癌になる細胞の伝播を防ぐが、老化した細胞の集積は組織機能の完全性を失わせ、老化の原因の一つになりうる点で個体老化との関連が注目されている。細胞老化には、継代培養の繰り返しによって生じる複製老化 (replicative senescence) に加えて、酸化ストレス、DNA 障害、がん遺伝子の活性化などによっても誘導される premature senescence がある。一方で、最近になって、数多くの長鎖非コード RNA が同定され、クロマチン修飾や細胞の運命決定などの多くの生命現象に機能していると報告された。しかしながら、大幅な細胞の運命変化でもある細胞老化と長鎖非コード RNA の関係はまだよく分かっていない。そこで本発表では、長鎖非コード RNA の細胞老化における役割を明らかにするために、マウス胚性線維芽細胞を 3T3 プロトコルによって継代培養して生じた replicative senescence と、恒常的に活性化した RAS 変異体を導入して生じた premature senescence について、Agilent SurePrint G3 Mouse GE 8x60K Microarray を用いて数万のタンパク質をコードする遺伝子と長鎖非コード RNA のトランスクリプトームを測定した。その結果、多数の長鎖非コード RNA がこれら 2 種類の細胞老化において特異的に発現変化していることを明らかにした。遺伝子発現変化の特徴は遺伝子セット単位でも比較し、既知の医学・生物学的に特徴のある細胞状態のトランスクリプトームとの関連を解析した。現在、細胞老化特異的に発現している長鎖非コード RNA が、それぞれの細胞老化において制御的な役割を果たしているか検証している。

Keywords : 細胞老化、長鎖非コード RNA、トランスクリプトーム

P-57

細胞老化関連遺伝子 マウス TARSH/Abi3bp のプロモーター領域の解析

○石澤和也^{1,3}、岩下雄二¹、松田剛典¹、杉本昌隆²、丸山光生^{1,3}
国立長寿医療研究センター研究所¹ 老化機構研究部、² 老化細胞研究プロジェクトチーム、³ 名古屋大学大学院医学系研究科 老化基礎科学

ヒトは加齢に伴い筋量や免疫力などの生理機能が低下し、サルコペニアや癌などの様々な老化関連疾病を引き起こす。一方、細胞老化は、不可逆的な細胞増殖の停止として定義され、こうした個体老化や癌の抑制との関連が近年注目されている。Target of NESH-SH3 (TARSH) は、マウス胚性繊維芽細胞の複製老化に伴い発現が上昇する、細胞老化関連遺伝子として私達が見出した。TARSH は正常肺で高発現しているが、細胞増殖が盛んであるヒト肺癌組織では、その発現は著しく低下している。また、細胞増殖が抑制される血清飢餓や接触阻害の条件下では、TARSH の発現は上昇することもこれまでに報告してきた。これらのことから、TARSH の発現は細胞増殖活性と負の相関があり、癌化の抑制に関連していると考えられる。本発表では、TARSH 遺伝子の血清飢餓や接触阻害に応答する発現制御機構の解明を目的に、転写活性と関連のあるヒストン修飾情報から TARSH 遺伝子のプロモーター領域を同定した。転写開始点より上流 0.6 kb と、第 1 エクソンの下流 1.5 kb をそれぞれ含むルシフェラーゼレポーターベクターを作成し、これらの領域における TARSH 遺伝子の転写制御能を NIH-3T3 細胞を用いて解析した。その結果、どちらの領域もルシフェラーゼ活性を上昇させたことから、今回同定した領域は、TARSH 遺伝子の転写を促進すると考えている。しかし、これらの領域内には、これまでに血清飢餓や、接触阻害に応答する領域は同定できておらず、現在、更に詳細な領域の検証を行っている。今後、種々の細胞株や発現組織等を用いた TARSH 遺伝子の発現制御機構を解明していくことで、老化に関連した発癌の基礎的な分子レベルでの仕組みの理解に寄与できると考えている。

Keywords : TARSH、細胞老化、転写

P-59

加齢に伴い骨格筋で発現変動する microRNA の同定

○藤田泰典¹、小島俊男²、川上恭司郎¹、伊藤雅史¹
¹ 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、
² 豊橋技術科学大学・健康支援センター

MicroRNA (miRNA) は、転写後レベルで遺伝子発現を制御する低分子ノンコーディング RNA の一種であり、様々な細胞機能に関与することが知られている。骨格筋の発生・再生の制御に関わる miRNA は報告されているが、骨格筋の加齢性変化と miRNA の関係については十分に明らかにされていない。そこで、加齢に伴い骨格筋で発現変化を示す miRNA を同定するために、老齢および若齢ラットの骨格筋の miRNA マイクロアレイ解析を実施した。その結果、加齢に伴い長指伸筋およびヒラメ筋で発現変化を示す miRNA をそれぞれ 9 種類、4 種類同定した。これらの中から顕著に発現変化を示す 5 種類の miRNA を選抜し、定量 RT-PCR を行った結果、加齢により長指伸筋およびヒラメ筋で miR-34a、miR-29b、miR-21 の発現が増加し、miR-196a の発現が低下していた。さらに、老齢・若齢マウスの長指伸筋およびヒラメ筋で検証した結果、miR-34a、miR-29b、miR-196a はラットと同様の発現変化を示した。次に、miR-196a の標的遺伝子である転写因子 Foxo1 のタンパクレベルを調べた結果、若齢と比較して老齢マウスの長指伸筋およびヒラメ筋では、Foxo1 タンパクが増加していた。さらに、骨格筋細胞における miR-196a の役割を明らかにするために、マウス C2C12 筋芽細胞に miR-196a の前駆体を導入したところ、Foxo1 タンパクが減少し、H₂O₂ 処理により惹起される細胞死が促進された。これらの結果から、老齢ラット・マウスの骨格筋では、miR-196a の発現が低下し、Foxo1 タンパクの発現が上昇することにより、加齢に伴い増大する酸化ストレスに適応している可能性が示唆された。

Keywords : 加齢、骨格筋、microRNA

P-58 (OJ-17)

トレハロースによる新規細胞防御メカニズム

○渡邊秀行¹、水之江雄平^{1,2}、名取大輝¹、沖田直之^{2,3}、須藤結香^{1,2}、樋上賀一^{1,2}
¹ 東京理科大学薬学部分子病理代謝学研究室、² 総合研究機構トランスレシヨナルリサーチセンター、³ (公財) 佐々木研究所

【目的・方法】 CR による抗老化・寿命延伸効果の詳細な分子メカニズムは明らかになっていないものの、オートファジーの亢進が重要である可能性が示唆されている。また、二糖類であるトレハロースは寿命延伸効果やオートファジー促進作用およびメタボリックシンドロームの予防効果などが報告されている。しかし、その詳細な分子メカニズムは不明である。我々はトレハロースが CR 模倣薬物となりうるのかを明らかにする目的で、マウス肝細胞 Hepa1-6 ならびにマウス胎児線維芽細胞 MEFs を用いて、トレハロースがオートファジーに及ぼす影響およびその作用メカニズムを解析し、種々の対照糖類と比較した。

【結果・考察】 トレハロースは、オートファジーを亢進し、同時に濃度依存的に LC3-II タンパク質量、p62 の mRNA・タンパク質発現を上昇させた。また、Atg5 欠損 MEFs ではオートファジー非依存的に p62 タンパク質発現を上昇させた。そこで p62 により活性化される Keap1-Nrf2 経路に着目した。トレハロースはリン酸化 p62 タンパク質発現を上昇させ、Nrf2 の核内移行を促進した。また、その下流の抗酸化・解毒因子の mRNA 発現を上昇させた。一方、スクロースなどの対照糖類では、この効果は見られなかった。以上より、トレハロースはオートファジー誘導作用と p62 タンパク質発現を介した抗酸化因子発現作用を有しており、CR 模倣薬物となりうる可能性が示唆された。今後はトレハロースが細胞内酸化還元バランスに及ぼす影響を解析するとともに、より活性の高いトレハロース類縁体化合物を探索する予定である。

Keywords : トレハロース、オートファジー

P-60

ヒトミトコンドリア機能関連遺伝子群プロモーター活性測定による抗老化薬物の探索

○内海文彰¹、井上賀央里¹、星野幸平¹、田沼靖一²
東京理科大学・薬学部・¹ 遺伝子制御学、² 生化学

【目的】 近年、ミトコンドリアが老化制御に関わるという報告がなされている。ミトコンドリア機能に関与するタンパク質のほとんどは核内 DNA にコードされているが、それら遺伝子発現の調節メカニズムは明らかにされていない。そこで本研究では、ヒト細胞における種々のヒトミトコンドリア機能関連遺伝子プロモーター活性測定システムの確立を主たる目的とした。本システムは、遺伝子発現レベルでミトコンドリア機能を高める効果のある抗老化薬物の探索に応用可能である。

【方法・結果】 重複 GGAA モチーフを含み、プロモーター領域を共有して head-head 結合したパートナー遺伝子を持つヒトミトコンドリア関連遺伝子 5' - 上流領域約 500-bp をクローニングし、ルシフェラーゼ (Luc) 発現ベクターを作製した。これらの Luc レポータープラスミドを多検体 DEAE-デキストラン法によってヒト HeLa S3 培養細胞にトランスフェクションし、Luc アッセイを行ってそれぞれプロモーター活性を簡便に、また再現性、感度ともに良好に測定できるシステムを確立した。

【考察】 現在、抗老化作用の期待できる薬物としてレスベラトロール、2-デオキシグルコース、そしてポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼ阻害剤である 3-アミノベンズアミドを HeLa S3 細胞培地に添加した場合について、各遺伝子プロモーターの応答、さらにそれぞれの遺伝子転写産物の量的変動について検討しており、結果を併せて報告する。

Keywords : GGAA、mitochondria、resveratrol、2-deoxy-D-glucose

P-61

メタボロームアプローチによるヒト血液メタボライト解析

○近藤祥司¹、ロマネス・ハレツキス²、トマス・プラスカル²、村上逸雄¹、江部正弘²、柳田充弘²
¹京大医、²沖縄科学技術大学院大学

高齢社会の到来とともに、寝たきりや脆弱な人々フレイルが増加する一方、健康長寿な方々も存在するという高齢者の2極化が拡大しつつあり、高齢者医療をより複雑にしている。我々は、血液メタボローム解析による高齢者の代謝特性解明を目指した。沖縄科学技術大学院大学の柳田充弘教授、ロマネス・ハレツキ博士との共同研究によりマスマスベクトロメトリーによる、ヒト血液サンプルでの低分子物質の検討を行い、数千のピークの内、最終同定できる低分子代謝物質に関しては半定量的計測が可能であることが判明した(今後、メタボロームと呼ぶ)。その基盤データをもとに、まず、柳田研究室でノウハウのある酵母とヒト血液のメタボローム比較を行った。驚いたことに、代謝メタボライトの多くに共通性が見られた一方で、これまでヒト血液では報告の無かったメタボライトを幾つか検出した(ロマネス・ハレツキ他 Molecular BioSystems 2014)。さらに、ヒト若年群(平均20歳代)と高齢群(平均80歳代)の血液メタボローム比較を現在検討中である。詳細な解析の結果、ヒト血液メタボライトは、大きく3つに分類できることが判明した。すなわち、①個人差の少ないもの、②高齢者と若年群で明確な差があるもの、③個人差の大きなもの、の3つである。このような高齢者特有のメタボライトは、年齢以外に、食生活、生活様式、健康状態、環境要因などを反映すると推測される。

Keywords: メタボローム、ヒト、分裂酵母

P-63

百寿者における全エクソーム領域関連解析:長寿に関連する機能的多型の探索

○谷澤薫平^{1,2}、新井康通³、広瀬信義³、村松正明⁴、沢辺元司⁵、下方浩史⁶、森聖二郎⁷、新井富生⁸、田中雅嗣⁹
¹早大・スポーツ科学、²学振、³慶大・百寿総合研究セ、⁴東京医歯大・分子疫学、⁵東京医歯大・分子病態検査、⁶名古屋学芸大・健康・栄養研、都健康長寿医療セ、⁷臨床研究推進セ、⁸病理診断、⁹臨床検査

ヒトの寿命は遺伝の影響を受けるが、長寿を規定する遺伝子多型はほとんど明らかとされていない。本研究の目的は、百寿者を対象とした全エクソーム領域関連解析(exome-wide association study: EWAS)を行い、長寿と強く関連する機能的多型(非同義置換)および、それらが存在する遺伝子群を同定することであった。対象は100歳以上の男女455名および100歳以下のコントロール4419名とした。一塩基多型(SNP)の解析は、HumanExome BeadChip(ver.1.1または1.2)を用いて行い、非同義置換を含む約24万個のSNPを網羅的に解析した。クオリティーコントロールおよび非同義置換以外のSNPの除外を行い、最終的に100歳以上の男女448名とコントロール4204名を対象として、21740個のSNPについて関連解析を行った。性別を調整変数としたロジスティック解析により、各SNPにおけるアレル頻度を百寿者とコントロール間で比較した結果、*CLEC3B* p.G106S多型と長寿との間に最も強い関連が認められた($P=5.43 \times 10^{-6}$, OR=1.46)。次いで、*APOE* p.R176C ($P=4.78 \times 10^{-5}$, OR=1.78) および *GRB14* p.L225S 多型 ($P=5.75 \times 10^{-5}$, OR=2.12) と長寿との間に強い関連が認められた。しかしながら、Bonferroni補正後の有意水準($P=2.30 \times 10^{-6}$)を満たすSNPは検出されなかった。さらに、KEGG Pathwayを参照データベースとし、百寿者とコントロール間の比較において有意確率が0.05未満のSNPを用いたenrichment analysisを行った結果、細胞外マトリックスに関与する遺伝子群において、百寿者とコントロール群間でアレル頻度に差があるSNPが多いことが明らかとなった($P=1.39 \times 10^{-3}$)。以上の結果より、長寿と強く関連する機能的多型は同定されなかったが、細胞外マトリックスに関与する遺伝子群の機能的多型が長寿と関連する可能性が示唆された。

Keywords: 百寿者、EWAS、機能的多型

P-62 (OJ-25)

脂肪細胞におけるWWP1の機能解明

○今野竜太郎¹、田川亮真¹、星野駿介¹、沖田直之^{2,3}、須藤結香^{1,2}、樋上賀一^{1,2}
¹東京理科大学大学院 分子病理・代謝学研究室、²総合研究機構トランスレーショナルリサーチセンター、³(公財)佐々木研究所

【目的】

WWP1は標的タンパク質の分解や移行に関わるE3ユビキチンリガーゼであり、がんや神経疾患への関与が知られている。当研究室では、WWP1の発現が肥満症の脂肪組織選択的かつp53依存的に増加することを見出した。また、WWP1をノックダウン(KD)した前駆脂肪細胞では脂肪細胞への分化が初期段階から促進することを明らかにした。本研究では肥満症におけるWWP1の機能解明を目的とし、WWP1のKDが脂肪細胞の初期分化を促進するメカニズムを解析した。

【方法・結果・考察】

WWP1 KD株では、分化誘導前からPPAR γ 1の発現が増加していた。また、興味深いことにWWP1 KD株を分化誘導せずに16日間維持したところ、脂肪細胞分化関連因子の発現が増加した。そのため、我々はWWP1 KDによる初期段階の分化促進がPPAR γ 1によるものであると予想した。PPAR γ 1を過剰発現させた前駆細胞株を作製し、脂肪細胞の分化に与える影響を解析した。その結果、WWP1 KD株と同様に、分化が亢進し、分化誘導を行わずとも脂肪細胞分化関連因子の発現が増加した。以上より、WWP1はPPAR γ 1を介して脂肪細胞への分化を制御する可能性が示唆された。

Keywords: WWP1、PPAR γ 1、脂肪細胞、

P-64 (OJ-32)

代謝型グルタミン酸受容体タイプ1の加齢変化 - [¹¹C]ITMM-PETを用いた検討

○坂田宗之¹、豊原潤¹、我妻慧¹、石橋賢士¹、石井賢二¹、張明榮²、石渡喜一¹
¹東京都健康長寿医療センター・神経画像研究チーム、²放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター

目的:小脳に多く存在する代謝型グルタミン酸受容体タイプ1(mGluR1)は運動制御に必須であり、小脳の障害により引き起こされる歩行障害や言語障害に関連するとされている。本研究では、mGluR1に特異的に結合する[¹¹C]ITMMを用い、PET計測によってヒト脳内におけるmGluR1の加齢変化について検討した。

方法:高齢群(男性12名女性11名、70 \pm 7歳)と若年群(男性8名女性6名、26 \pm 3歳)の健常ボランティアに、[¹¹C]ITMMを用いた90分PET計測を行った。(投与放射能:556 \pm 77 MBq、投与薬物量:9.5 \pm 6.5 nmol)。計測中、動脈採血および代謝分析を行い、入力関数を得た。小脳を対象領域、後頭葉を参照領域の候補とし、コンパートメントモデルおよびLoganグラフ解析(LGA)にて総分布体積(V_T)を、参照領域を用いたLGAにて分布体積比(DVR)を求めた。

結果:2組織(2T)コンパートメントモデルでは安定した V_T が推定できなかった。1TコンパートメントモデルとLGAによってそれぞれ推定された V_T はよく一致した($V_T(1T)=0.96 \times V_T(LGA)-0.02$, $R^2=1.00$)。小脳(若年:3.0 \pm 0.4、高齢:3.6 \pm 0.5)および後頭葉(若年:0.65 \pm 0.08、高齢:0.73 \pm 0.09)の V_T 、および小脳のDVR(若年:3.4 \pm 0.3、高齢:3.7 \pm 0.2)全てにおいて、高齢群が若年群より有意に高く、性差は認められなかった(two-way ANOVA; $p < 0.01$)。

考察・結論:高齢群における小脳における[¹¹C]ITMM結合の増加は、受容体密度の上昇以外に、[¹¹C]ITMM結合と拮抗する内因性グルタミン酸濃度の低下、タンパク質結合率の低下に伴う[¹¹C]ITMM遊離画分の増加の可能性も考えられた。

Keywords: 代謝型グルタミン酸受容体タイプ1、[¹¹C]ITMM-PET

P-65

運動とカロリー制限はマウス老化 (AApoAII) アミロイドーシスの発症を軽減する

○李琳¹、澤下仁子^{1,2}、劉穎業¹、丁欣¹、楊沐¹、徐哲¹、森政之^{1,2}、樋口京一^{1,2}
¹信州大学大学院 医学系研究科 疾患予防医学系 加齢生物学、
²信州大学学術研究院 先鋭領域融合群 バイオメディカル研究所

【目的】 マウス老化 (AApoAII) アミロイドーシスでは、加齢に伴って形成したアミロイド線維 (AApoAII) が全身の臓器に沈着する。また、AApoAII 投与によって発症が誘発される。本研究では、AApoAII アミロイドーシスに対する運動とカロリー制限の効果を解析した。

【方法】 2ヶ月齢 R1.P1-Apoa2 マウスに AApoAII を投与した。トレッドミルを用い、最大速度の 30% と 70% の速度で 3 分間ずつの走行を繰り返す運動 (30 分/日、4 日/週、IT 群)、定速運動 (50 分/日、5 日/週、UT 群)、あるいはカロリー制限 (自由摂餌群の 60%、CR 群) を実施した。16 週間後、代謝指標 (体重、空腹時血糖値、ブドウ糖負荷耐性 (IGTT)、心拍数、血圧、血漿 HDL—コレステロール (HDL-Cho)) を測定した。また、アミロイド線維の沈着程度 (AI) を評価した。

【結果・考察】 非運動群と比較して、IT 群も UT 群も AUC は有意に低値で、HDL-Cho は有意に高値だった。また、AI も非運動群より低値で、特に肝臓、脾臓、胃 (UT 群) で低沈着が顕著だった。一方、自由摂餌群よりも CR 群の方が HDL-Cho は有意に高値だった。また、CR 群は AI も低値で、特に心臓、肝臓と脾臓の沈着度の低値が顕著だった。以上の結果から、運動やカロリー制限は AApoAII 線維の沈着を抑制することが示唆された。今後は、運動やカロリー制限によるアミロイド線維沈着抑制メカニズムを解析する必要がある。

キーワード：マウス老化アミロイドーシス、運動、カロリー制限

P-67

SIRT1 は細胞老化において DNA 損傷誘導性炎症応答を抑制する

早川智久¹、岩井美佳¹、丸山光生²、丸山和佳子¹、○本山 昇¹
¹国立長寿医療研究センター・加齢健康脳科学、²国立長寿医療研究センター・老化機構

細胞老化は、テロメア短縮による分裂寿命に加えて、DNA 損傷、がん遺伝子の活性化など種々のストレスによって誘導される。老化細胞は、加齢とともに増加することから、個体老化を誘導すると考えられてきた。恒久的細胞周期の停止のみならず、老化細胞は細胞老化関連分泌表現型 (SASP) といわれる炎症性サイトカインやケモカインなどの液性生理活性因子の分泌が増強する特徴を有している。SASP 因子は、近隣や周辺の細胞に作用し、微小環境に影響を及ぼすので、SASP は細胞老化と加齢に伴う組織の機能低下、個体老化および老年性疾患を結びつける重要な現象と考えられている。

SIRT1 は、NAD⁺ 依存性タンパク質脱アセチル化酵素で、DNA 損傷にตอบสนองしてクロマチン構造やタンパク質修飾を介して遺伝子の発現を制御する。また SIRT1 は、種々の老年性疾患に対して保護作用があることが報告されている。そこで私たちは、DNA 損傷によって誘導される老化細胞の SASP 因子の発現における SIRT1 の役割について検討した。SIRT1 は、SASP 因子のプロモータ領域の脱アセチル化を介して SASP 因子の発現を抑制していることを明らかにした。また、細胞周期抑制因子を介したメカニズムによっても SASP 因子の発現を制御していることを見出した。

Keywords : SIRT1、SASP、DNA 損傷

P-66 (OJ-31)

ヒト血清中のアミロイドβ分解活性の性状解析

○三河隆太^{1,2}、奥野海良人¹、吉見立也²、滝川修^{1,2}
¹(独) 国立長寿医療研究センターラジオアイソトープ管理室、² 同認知症先進医療開発センター治療探索研究部・リード分子探索研究室、³ 名大・院・医学系研究科・総合医学・老化基礎科学

【目的】 アルツハイマー病脳ではアミロイドβペプチド (Aβ) の凝集体である老人斑の蓄積に加え、80% 以上の高い頻度で脳微小血管周囲に Aβ凝集体の沈着が生じる。この脳アミロイド血管症 (cerebral amyloid angiopathy: CAA) 発症の分子機序は不明である。脳微小血管構成細胞である血管内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトが Aβ 産生能を有することから、これら血管構成細胞における Aβ 代謝障害が、CAA 発症の原因である可能性が高い。我々は血管内皮細胞の Aβ 産生調節機構を解析中に、ヒト血清中に Aβ 分解活性 (blood Aβ degrading activity: BADA) を見出した。本研究目的は BADA を精製純化し、その生化学的性状を解明することにより、CAA の病態解明や予防・治療法の開発に資することにある。

【方法】 BADA は Aβ40 あるいは ¹²⁵I-Aβ40 を使用して測定した。BADA の精製純化は DEAE イオンクロマトグラフィー、カラム等電点電気泳動、ゲル濾過およびハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーなどを組み合わせることにより試みた。蛋白は精製純化された段階でトリプシン処理後 LC/MS で同定する。

【結果】 現在上記精製手法の最適条件の検討中であり未だ化学的純度は不十分であるが、BADA はゲル濾過から分子量が約 200 kDa の単一ピークとして溶出されること、IEF から等電点が pH4.7 の酸性蛋白であることを明らかにした。IEF が夾雑血清蛋白 (アルブミン等) の除去に特に有効であった。

【考察】 ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーで活性が増大したことから BADA には低活性型と高活性型が存在していると考えられる。正常な脳微小血管では高活性型が速やかに Aβ をクリアランスする。しかし AD 脳微小血管では BADA が機能せず Aβ が沈着することから、脳微小血管壁で産生される Aβ クリアランスにおいて BADA が重要な役割を担っているのではないかと推察される。

Keywords : Aβ 分解活性、脳アミロイド血管症