

# BIOMEDICAL GERONTOLOGY

## 基礎老化研究

### 特集企画 「モデル生物」

特集企画

総説

総説

総説

総説

総説

学会報告 ●

学会報告 ●

「モデル生物」

長寿齧歯類ハダカデバネズミを用いた老化研究

三浦 恭子

老化研究におけるコモンマーモセットの可能性

佐々木 えりか

人為的な生殖技術を用いたカニクイザルの作出

下澤 律浩

新規アルツハイマー病モデルマウス -加齢性感覚器障害とアルツハイマー病との関連-

津田 玲生

細胞老化研究の新展開 -老化細胞は新たな創薬標的となるか-

三河 隆太、杉本 昌隆

The 5<sup>th</sup> Asian Society for Aging Research Symposium 2017報告記

清水 孝彦

ADPD 2017

木村 展之



編集委員会委員長： 清水 孝彦 千葉大学大学院医学研究院 先進加齢医学  
〒260-8670 千葉市中央区亥鼻1-8-1

編集委員会委員： 石井 恭正 東海大学 医学部 分子生命科学  
〒259-1193 神奈川県伊勢原市下糟屋143

木村 展之 国立長寿医療研究センター 認知症先進医療開発センター  
アルツハイマー病研究部 病因遺伝子研究室  
〒474-8511 愛知県大府市森岡町7-430

下田 修義 国立長寿医療研究センター 再生再建医学研究部  
〒474-8511 愛知県大府市森岡町7-430

福井 浩二 芝浦工業大学 システム理工学部 生命科学科 分子細胞生物学研究室  
〒337-8570 さいたま市見沼区深作 307

渡辺 信博 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  
〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2

---

Editor-in Chief: Takahiko Shimizu, Department of Advanced Aging Medicine,  
Chiba University Graduate School of Medicine,  
1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8670, JAPAN

Editors: Takamasa Ishii, Department of Molecular Life Science  
Tokai University School of Medicine,  
143 Shimokasuya, Isehara, Kanagawa 259-1193, JAPAN

Nobuyuki Kimura, Section of Cell Biology and Pathology  
Department of Alzheimer's Disease Research, Center for Development  
of Advanced Medicine for Dementia,  
National Center for Geriatrics and Gerontology,  
7-430, Morioka, Obu, Aichi 474-8511, JAPAN

Nobuyoshi Shimoda, Department of Regenerative Medicine,  
National Center for Geriatrics and Gerontology,  
7-430, Morioka, Obu, Aichi 474-8511, JAPAN

Koji Fukui, Molecular Cell Biology Laboratory, Division of Bioscience and  
Engineering, Shibaura Institute of Technology,  
Fukasaku 307, Minuma-ku, Saitama, 337-8570, JAPAN

Nobuhiro Watanabe, Aging Neuroscience Research Team  
Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology  
35-2 Sakaecho, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, JAPAN

## 基礎老化学会会員の皆さん

本年2月に行われた理事選挙において以下の会員が理事に選ばれた事を報告いたします。

日本基礎老化学会選挙管理委員会  
内田 さえ、新海 正

---

**新理事名簿** (50音順、数字は所属区；任期は2017年4月1日から2019年3月31日まで)

|       |   |                       |
|-------|---|-----------------------|
| 石井 恭正 | 2 | (東海大学)                |
| 遠藤 昌吾 | 2 | (庶務理事 都健康長寿医療センター研究所) |
| 遠藤 玉夫 | 2 | (都健康長寿医療センター研究所)      |
| 近藤 祥司 | 4 | (京都大学)                |
| 清水 孝彦 | 2 | (編集理事 千葉大学)           |
| 下川 功  | 5 | (理事長 長崎大学)            |
| 重本 和宏 | 2 | (都健康長寿医療センター研究所)      |
| 杉本 昌隆 | 3 | (国立長寿医療研究センター研究所)     |
| 樋口 京一 | 3 | (信州大学)                |
| 細川 昌則 | 4 | (京都光華女子大学)            |
| 堀田 晴美 | 2 | (会計理事 都健康長寿医療センター研究所) |
| 森 望   | 5 | (長崎大学)                |
| 山下 均  | 3 | (理事長推薦、中部大学)          |

### 大会理事

- 丸山 光生 (任期 2018年3月31日まで、国立長寿医療研究センター研究所)  
樋上 賀一 (任期 2019年3月31日まで、東京理科大学)  
石神 昭人 (任期 2020年3月31日まで、都健康長寿医療センター研究所)
-

## 【日本基礎老化学会賛助会員一覧】

下記の諸団体が賛助会員として本学会を支えています。

賛助会員は随時募集しております。事務局にお問い合わせください。

あなたの会社も老化研究を支えてみませんか？入会をお待ちしています。

### 賛助会員

合同会社 オータニ

小林製薬 中央研究所 研究部

重岡胃腸科外科医院

日本水産株式会社

(株) ファンケル総合研究所

ココロカ株式会社

(株) 明治 研究本部

Medical information network

医療法人 裕和会

(50音順)

# 高電位の威力

電圧のみをかける「交流高圧電界」で、身体全体を包み込むようにして治療を。

## 1/fゆらぎの可能性

1/fゆらぎの原理を電位治療に応用(特許取得:特許番号4179625号)。

カラダだけでなく、ココロにもやすらぎと癒しを。

「レガシス プラス」は、厚生労働省により登録された認証機関から管理医療機器クラスIIの医療機器として認証を得ています。  
医療機器認証番号:218AGBZX00077000



LEGACIS

**LEGACIS** 低周波・電位・温熱組合せ家庭用医療機器

ココロカ株式会社はアスリートの健康管理をサポートします。



COCOROCA

ココロカ株式会社 <http://www.cocoroca.co.jp/>

〒140-0001 東京都品川区北品川4-7-35 御殿山トラストタワー11F

お客様センター: 03-6711-9305 FAX: 03-6711-9325 受付時間: 月~金 9:30~18:00 (土・日・祝日・弊社特別休業日を除く)

## この雑誌について（投稿される方へ）

「基礎老化研究」(Biomedical Gerontology) は、日本基礎老化学会の会誌で、年3回:1月(1号)、5月(2号)、9月(3号)に発行される。大会号は、大会時に別冊号として発刊する。内容は、本学会員より投稿された、または、本学会員及び編集委員会より依頼を受けた者からの巻頭言、総説(老化理論を含む)、トピックス、原著論文、随筆、書評、その他で構成される。但し、3号には基礎老化学会シンポジウムの抄録も掲載される。会員は簡易冊子体の配布を受け、かつ無料でオンライン版が学会HPで閲覧できる。

## 投 稿 規 定

1. 全ての原稿の採用については、編集委員会で決定する。総説、トピックス、及び原著論文については、編集委員または編集委員会で依頼した審査委員による査読を行う。
2. 著者による校正は、初校時に1回行う。その際に投稿内容の大幅な追加や変更は認めないものとする。
3. 本誌に掲載された記事の著作権は、日本基礎老化学会に帰属する。但し、自身の著作を使用する場合には、本学会に断り無く自由に使用できる。
4. 目次、総説の要旨、およびトピックスの題目は日本基礎老化学会のホームページに掲載される。発行後2年経過した総説、トピックス等はインターネット上に無料で公開される。
5. 総説、トピックス、および原著論文の著者には、該当PDFファイルを無料で進呈する。別刷り希望の場合は有料(実費)となるので、投稿・原稿提出時にその旨連絡すること。
6. 原稿の執筆に際しては、本誌の執筆要領に従うこと。

## 執 筆 要 領

原稿は全てワードプロセッサを使用し、横書きで作成する(原稿はデジタルファイルで提出する)。1) 第1頁には、原稿の表題、著者名、所属機関、所在地を和文と英文で、また、電話番号、FAX番号、E-mailアドレスを記載する。著者が複数の場合は、連絡先の著者を明記する。2) 第2頁にも初めに、表題、氏名を書き、その後に本文を書く。3) 本文に節を設ける場合、1.、2.、3.、・・・を付けて節を示す。以下の項目は1)、2)、3)・・・、a)、b)、c)・・・とする。また、イタリック体、ギリシャ文字、記号が正しく出力されていることに注意する。原稿はテキストファイルまたはMSワードファイル等で作成したデジタルファイルで提出する(欧語・数字は半角を用いる)。同時に提出する図・表および写真は、PDF、PPT、TIFF、JPEG形式等のデジタルファイルで提出する。オンライン版はカラー図も受け付ける。冊子体への印刷は原則、白黒またはグレースケールで行うが、カラー希望の場合は著者の負担とする。図表の挿入部位は本文中に示す。尚、本誌1ページは約1,600字に相当する。図の大きさを考慮して、全体の長さを調節すること。原稿(デジタルファイル)はE-mailに添付して送付するか、USB記憶媒体等で送ることができる。コンピュータファイルについては、印刷所あるいは編集委員会で対応できない場合は、著者に協力を求めることがある。

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

る位置に [ ] で括って表示する。

1. Shimokawa I, Komatsu T, Hayashi N, *et al.* The life-extending effect of dietary restriction requires Foxo3 in mice. *Aging Cell* 14 : 707-709, 2015.
  2. Roth GS, Ingram DK and Cutler RG. Primate models for dietary restriction research. In: *Biological Effects of Dietary Restriction*, edited by Fishbein L. Berlin : Wiley, 1991, p. 193-204.
  3. 仲村賢一, 下村-泉山七生貴, 田久保海誉 ヒト組織の加齢に伴うテロメア短縮. *基礎老化研究* 24 : 72-76, 2000.
- 6) 図、表、写真：そのまま印刷できるものに限る（手書きのものは受け付けない）。文献から引用する場合は、引用を明記すると共に、引用の許可が必要な場合には、著者の責任で許可を取っておくこと（許可証のコピーを原稿と共に提出すること）。白黒またはグレースケールが原則だが、オンライン版はカラー図も受け付ける。
- 7) 図、写真にはタイトルと説明文を付ける。
3. トピックス 最近の話題性のある研究（または雑誌記事）の紹介。長さは刷り上がり4頁以内（1,600 - 6,400字）。その他は総説に準じる。但し、要旨は不要である。
  4. 原著論文 基礎老化研究に関連するオリジナル性の高い研究論文。他誌で公表された内容は受け付けない。内容は、要約、目的、方法、結果、考察、引用文献、図表、およびその説明文からなる。その他は総説に準じる。
  5. 学会報告、海外便り 国内外の学術集会の紹介記事。長さは1,600字以内。留学などで滞在しているまたは過去に滞在していた研究室、訪問した研究施設の見聞の紹介記事。
  6. 書評 最近出版された書籍の紹介。1,600字以内。
  7. 原稿の送付およびその他の問い合わせ、下記宛てに e-mail で。

編集委員会：editor@jsbmg.jp

## 目 次

|   |       |
|---|-------|
| 特集企画「モデル生物」   | 1     |
| 総説  |       |
| 長寿齧歯類ハダカデバネズミを用いた老化研究   |       |
| 三浦 恭子   | 3-8   |
| 総説  |       |
| 老化研究におけるコモンマーモセットの可能性   |       |
| 佐々木 えりか   | 9-15  |
| 総説  |       |
| 人為的な生殖技術を用いたカニクイザルの作出   |       |
| 下澤 律浩   | 17-22 |
| 総説  |       |
| 新規アルツハイマー病モデルマウス  |       |
| －加齢性感覚器障害とアルツハイマー病との関連－   |       |
| 津田 玲生   | 23-30 |
| 総説  |       |
| 細胞老化研究の新展開－老化細胞は新たな創薬標的となるか－  |       |
| 三河 隆太、杉本 昌隆   | 31-37 |
| 学会報告  |       |
| The 5 <sup>th</sup> Asian Society for Aging Research Symposium 2017 報告記 |       |
| 清水 孝彦   | 39-40 |
| 学会報告  |       |
| ADPD 2017   |       |
| 木村 展之   | 41-42 |

---

表紙図の説明：ハダカデバネズミ。写真で見るとインパクトがある外見であるが、実際に見ると意外と小さく、動きがコミカルで愛らしい。(3-8 ページの総説を参照)。

【特集企画】

「モデル生物」

従来の老化研究のモデル生物といえばまず頭に浮かぶのが、分子遺伝学的研究が発展している酵母、線虫、ショウジョウバエ、マウスというビッグ4だろう。それらを利用して、各生物にみられる多様な老化の表現型や寿命の背景に存在するかもしれない、進化的に保存された老化の分子メカニズムが、寿命という共通の評価基準に基づき探索された。そしてその試みは現在広く認知されている、インスリン・シグナル伝達系、広義にはエネルギー代謝の寿命への影響の発見へと結実した。しかし近年、エネルギー代謝とは疎遠に見える分子の欠損や余剰でも寿命の伸び縮みが起こることが相次いで報告され、ビッグ4とその寿命を指標とした老化研究の難しさや限界が感じられる。今後の老化研究には、新たなモデル生物も加えて、それぞれで明瞭な老化表現型や疾患について、そこに至る過程（加齢変化）をモダンなテクノロジーを駆使して探索し、その加齢変化の老化表現型や疾患に与える影響を評価していくという地道な手法が必要ではないか。それぞれのモデル生物が示す多様な老化表現型をレトログレードに深掘りしていく過程で、いつの日か、それらの底に共通して流れる「保存された老化メカニズム」という地下水脈に掘当たることを期待するわけである。今回執筆をお願いした先生方のうち、三浦先生、杉本先生、津田先生はそのアプローチをげっ歯類ですでに実践しており、佐々木先生、下澤先生は霊長類でそのような利用ができるように奮闘されている。企画通り、老化研究の新たな方向性を示す特集となった。執筆して下さった先生方に改めてお礼申し上げます。

編集委員

木村 展之

下田 修義

【総説】

## 長寿齧歯類ハダカデバネズミを用いた老化研究

三浦 恭子

北海道大学 遺伝子病制御研究所 動物機能医科学研究室

### 要約

ハダカデバネズミ（デバ）はアフリカの地下に生息する齧歯類であり、アリやハチに類似した分業制の集団社会を形成することが知られている。驚くべきことに、デバの寿命はマウスの約 10 倍の約 30 年と非常に長く、さらに飼育下でほとんど腫瘍形成が見られないことが知られている。デバの長寿・がん化耐性のメカニズムを研究することで、将来的には、ヒトにおいて新たな老化・がん化予防薬の開発につながる可能性が考えられる。我々は 2010 年からデバの老化耐性・がん化耐性・社会性のメカニズムについて研究を進めている。最近、デバから iPS 細胞を樹立し解析を行った結果、デバ iPS 細胞が種特異的に腫瘍化耐性をもつことを見出した。またその分子機構として、がん抑制遺伝子 ARF の種特異的な活性化、またがん遺伝子 ERAS の種特異的な機能欠失型変異を同定した。本総説では、デバ研究領域における最近の進展を概説する。

キーワード：naked mole-rat, *heterocephalus glaber*, iPS cell, longevity, cancer

### 1. はじめに

近年急速に高齢化社会が進展し、日本の総人口に占める 65 才以上人口の割合は、26.7% となっている（平成 28 年版高齢社会白書より）。医学の発展によりヒトの平均寿命は延びているが、心疾患・脳機能の低下・血管疾患・がんなど様々な老化関連疾患により、健康を維持したまま天寿を全うすることは困難であるのが現状である。これからの国の発展のためには、「健康長寿社会」の実現、即ち、高齢者が老化関連疾患にかからず、健康な状態を維持しながら長生きする方法を見出していくことが重要と考えられる。この目的を達成するために、現在、マウスや線虫など様々なモデル動物を用いて、老化や老化関連疾患に関する研究が活発に進められている。加えて、近年の次世代シーケンサーやゲノム編集技術の発展により、今まであまり研究されてこなかった「長寿動物種」が研究対象として注目を集めている。他種より際立って

寿命が長い動物種においては、通常より長期間にわたって生体を老化から防衛する機構が特異的に発達していると考えられる。そのような動物種を研究対象とすることにより、より積極的に「老化を予防する」方法を新たに同定することが可能と考えられる。この観点から我々は、長寿齧歯類であるハダカデバネズミに着目し、現在のところ日本で唯一のハダカデバネズミ飼育機関として研究を行っている。

### 2. ハダカデバネズミ（デバ）とは

ハダカデバネズミ（裸出歯鼠, naked mole-rat, *heterocephalus glaber*) [1] は、その名の通り、裸で出歯の齧歯類である（実は感覚毛と呼ばれる毛がまばらに生えている）（図 1）。野生下ではエチオピア・ケニア・ソマリアの地下にトンネルからなる巣を形成して集団で生息する。眼は小さく退化し、わずかに光を感じられる程度である。名前の由来である大きな門歯は口唇の前側に生えており、口を閉じて剥き出しになっている。この発達した門歯で土を掘り、トンネルを形成する。トンネルの全長は長いものでは数 km にもおよぶ。地下トンネルは酸素があまり入らないため、場所によっては約 7% O<sub>2</sub> の低酸素環境となっている。デバはこの低酸素環境に適応した齧歯類であり、酸素消費量はマウスの 3 分

連絡先：三浦恭子 〒 060-0815

札幌市北区北 15 条西 7 丁目

TEL：011-706-6053（内線 6053）

FAX：011-706-6053

E-mail：miura@igm.hokudai.ac.jp



図1. ハダカデバネズミ

写真で見るとインパクトがある外見であるが、実際に見ると意外と小さく、動きがコミカルで愛らしい。社会性をもつデバは鳴き声が18種類以上あり、飼育室内は、ピュウピュウ、ピヨピヨとデバたちが鳴き交わす声で賑やかである。怒るとブップッという声を出す。

の2程度、さらにヘモグロビンの酸素親和性が高いことが報告されている [2]。実験室での飼育は通常酸素下で行い、飼育室は特殊な管理装置により温度30度・湿度60%に厳密に制御されている。この温度・湿度を一定に保つことがデバの飼育を行う際には極めて重要である。なぜなら、デバは体温を維持する機能が発達しておらず、外温性（いわゆる変温性）の動物であり、さらに皮膚が乾燥するとストレスで衰弱して死亡することもあるためである。飼育ケージはマウスとは異なり、4-20個程度のアクリルの箱をアクリルのトンネルで連結した、野生での地下のトンネルを模したケージで飼育している（図2）。自然下ではイモなどの根茎を食べており、実験室ではサツマイモ・ジャガイモ・ニンジン・リンゴ・バナナ・オートミールなどを与える。現在、上野動物園、埼玉こども動物自然公園、円山動物園など、日本全国のいくつかの動物園において、デバを観察することが可能である。



図2. ハダカデバネズミ飼育室

4-20個程度のアクリルの箱をアクリルのトンネルで連結したもので、集団で飼育する。飼育室の中は温度30度・湿度60%に保たれており、蒸し暑い。

### 3. デバの真社会性

デバは、哺乳類では極めて珍しく、「真社会性」とよばれる分業制の社会を形成する（図3）[1]。真社会性とは、二世以上が共存し、繁殖する個体とその繁殖を手伝う不妊個体集団からなる社会形態のことであり、昆虫のアリやハチなどでよく見られる。一方哺乳類では、現在のところデバと近縁のダマラランドデバネズミにおいてしか真社会性は確認されていない。数十から数百匹の個体からなる1つのハダカデバネズミのコロニーにおいて、繁殖を行うのは1匹の女王と1-3匹の王のみである。なぜか王になった雄はどんどん痩せて数年で死亡する観察事例が数多く報告されており、我々の飼育しているコロニーにおいても、時々薄っぺらに痩せて衰弱した王が観察される。王が衰弱・死亡する原因はよく分かっていないが、一説では、交尾のストレスが大きいと考えられている。繁殖に携わらない他の個体は雌雄ともに性成熟が抑えられ、ワーカーや兵隊として巣内の仕事に携わる。ワーカーは穴掘り、砂運び、餌集め、仔の世話などを行い、体の大きな個体は兵隊としてデバの天敵であるヘビへの攻撃を担う。しかし、うまく撃退出来るときもあるが、残念ながら食べられてしまうことも多い。その場合も、結果として他の個体が捕食されるのを防ぐことになるため、兵隊は別名「犠牲者」とも呼ばれる。

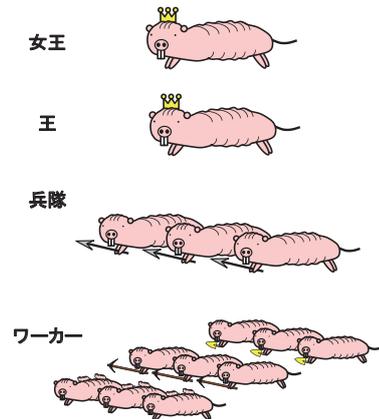


図3. ハダカデバネズミの真社会性

研究室で飼育している場合でも、穴掘りや餌運び、上位の個体と下位の個体間のコミュニケーションなど、様々な行動を観察することができる。

このように分業化した集団社会を形成することで、デバは全長数キロにも及ぶ大きなトンネルからなるコロニーを形成し、サバンナの広い領域に点在する餌となる根茎を効率良く探索・収集することができる。また、デバが生息する地下の環境は餌が豊富ではないため、女王のみが繁殖することによって急激な個体数の増加を抑制し、結果として資源の枯渇を防いでいるのではないかと考えられている。デバの特異な社会性の発達と個体の長寿化の間に、何らかの進化的な関連がある可能性もあり、興味深い。我々は現在、個体が貴重であるため脳の組織学的解析は行っていないが、MRI（核磁気共鳴画像法）を用いたハダカデバネズミCT（コンピュータ断層

撮影)・MRI 三次元脳アトラスの作製を完了している [3]。

#### 4. デバの長寿命とがん化耐性

デバは、マウスとほぼ同等のサイズながら、30 歳を超える生存個体が確認されている異例の長寿動物 (平均生存期間 28 年) であり、さらに生存期間の 8 割の期間は、老化の兆候 (活動量・繁殖能力・心臓拡張機能・血管機能の低下等) を示さず加齢に伴う死亡率の上昇も認められない。28 歳を超える超高齢個体では筋肉量の低下やリポフスチンの沈着などの加齢性変化が認められるものの、飼育下で観察された 800 個体のデバにおいて自発的な腫瘍形成は確認されていない [4]。近年、動物園で数例の前癌病変や良性腫瘍の発生が観察されており、さらに特定の繁殖ペア由来の個体群において悪性腫瘍の発生が報告されたことから [5] [6]、まったくがん化しないというわけではないようだが、少なくともがんに極めてなりにくいのは確かである。これらの性質はコロニー内の役割に関わらず全個体で認められる。2000 年代に、デバが老化およびがんなどの老化関連疾患に対し顕著な抵抗性を持つことが見いだされ、「老化・がん化抑制法」の開発のための新たなモデル動物として着目されるようになった。

##### 1) テロメアと DNA の安定性

近年、デバを含む様々な平均寿命の齧歯類においてテロメラーゼ活性が調べられたが、活性の高さは寿命の長さではなく体の大きさに逆相関し、またテロメア長については、寿命や体の大きさは相関がないことが報告されている [7] [8]。2011 年にデバのゲノム解読が完了し、老化耐性・がん化耐性に関わる遺伝子のいくつかにおける種特異的な配列変化が報告された [9]。そのうち、テロメラーゼコンプレックスの 1 つである TERF1 において、ヒトでテロメアとの結合に必要とされているアミノ酸に種特異的な変異が存在することが判明した。また、4 歳齢と 20 歳齢のデバのトランスクリプトームを調べたところ、テロメア逆転写酵素である TERT の加齢による発現量変化が生じていなかった。これらのことから、デバではテロメア維持機構が異なる可能性があり、その長寿とがん化耐性に寄与しているかもしれない。さらに近年、テロメアの保護に関わる TIN2 や DNA 修復に関わる CEBPG のコピー数の増加報告されており [10]、デバではテロメアおよびゲノムの integrity を保つ機構が発達している可能性がある。

##### 2) 酸化ストレスとタンパク質の安定性

デバ個体での酸化ストレスレベルについて解析が行われたが、意外なことに、若い個体においてもマウスと同等のレベルの脂質過酸化・タンパク質カルボニル化・DNA 酸化ダメージが認められ、単純な抗酸化活性の増加が寿命延長をもたらしているわけではないと考えられる [11]。一方で、若い個体 (2 年齢) および高齢の個体 (24 年齢以上) をマウスの若い個体 (6 カ月齢) および高齢個体 (28 カ月齢) と比較したところ、デバでは高齢になってもタンパク質の構造の安定性の変化や、タンパ

ク質の酸化ダメージ・ユビキチン化の増大が起きないことが報告されている [12]。また、デバではプロテアソーム活性に関わる Nrf2 シグナル伝達系の活性増加が見られ [13]、さらにヒトやマウスと異なりリボソーム RNA に切断部位を持つこと、タンパク質合成の正確性が高いことが報告されている [14]。リボソーム RNA に切断部位が存在することと翻訳の精度の関係性は不明であるが、これらの研究からタンパク質の安定性に加え、異常タンパク質の除去機構、タンパク質合成の正確性が老化耐性・長寿に関与している可能性がある。

##### 3) 細胞老化

正常細胞は、細胞周期が進行する際に DNA 損傷などの修復不可能な異常が生じると、細胞老化が引き起こされて細胞の増殖が不可逆的に停止する。このことから、細胞老化はがん抑制機構として機能していると考えられる。しかし、老化細胞は生体内に長期間存在し続け、炎症反応を引き起こす SASP (senescence-associated secretory phenotype) 因子を分泌する。これにより周囲の細胞が損傷を受け、がん化を引き起こす可能性が生じてくる。近年、細胞老化の誘導に重要なサイクリン依存性キナーゼ阻害因子の一つである Inhibitor of cyclin-dependent kinase 4a (Ink4a) 遺伝子のプロモーター下流に、薬剤誘導性にアポトーシスを誘導する遺伝子をつないだトランスジェニックマウスを用いて、積極的に老化細胞を除去したところ、個体の老化が減弱されることが示された [15,16]。現在我々は、デバ線維芽細胞に細胞老化を誘導した際、ヒトやマウスと異なり細胞死が引き起こされることを見出しており、個体の老化耐性との関係性について詳細に解析を進めている (河村ら、投稿準備中)。

##### 4) 実験的がん化誘導への抵抗性

デバのがん化耐性について、その線維芽細胞を遺伝子導入により形質転換誘導することでがん化耐性機構を解明しようとする研究が行われた。その結果、デバ線維芽細胞はマウスと異なり、恒常活性化 Ras と SV40 ラージ T 抗原の導入だけでは、免疫不全マウスへの移植時に腫瘍を形成せず、ヒトテロメア逆転写酵素である hTERT を同時に入れた場合にのみマウスと同様に腫瘍を形成することが報告されている。逆にこの細胞をデバ個体に移植した場合に腫瘍形成するかどうか、また、デバ個体に発がん剤を投与した場合の応答性などは現在も不明であり、今後の解析が必要である。

##### 5) 早期接触阻害と高分子量ヒアルロン酸

接触阻害は、正常細胞が高密度になって互いに接触すると細胞周期が停止し増殖が抑制される現象であり、がん抑制機構のひとつと考えられている。デバ線維芽細胞はヒトやマウスと異なり、より低い細胞密度で早期に接触阻害を示すことが報告され [17]、さらに、この早期接触阻害に、デバで高発現している高分子量ヒアルロン酸が関わっていることが報告された [18]。デバ細胞から培地中に分泌される高分子量ヒアルロン酸を酵素で分

解すると、細胞は早期接触阻害を起こさなくなった。次にデバ細胞においてヒアルロン酸合成酵素をノックダウンあるいはヒアルロン酸分解酵素を過剰発現させると、本来ならば腫瘍化しない前述の恒常活性化 Ras と SV40 ラージ T 抗原の導入で、移植後に腫瘍を形成するようになった。ただ、この高分子量ヒアルロン酸を他種に発現させた場合にがん化耐性を獲得するかはいまだ未解明であり、今後の進展が待たれる。

## 6) INK4/ARF 遺伝子座の特殊性

INK4/ Alternative reading frame (ARF) 遺伝子領域は前述の INK4a と同じ INK4 ファミリーに属する INK4b、INK4a および ARF という 3 つの代表的ながん抑制・老化関連遺伝子をコードしている。近年、デバでは種特異的に INK4a と INK4b のハイブリッドアイソフォームがつくられており、INK4a や INK4b と同様にストレス刺激によって発現上昇が見られ、細胞周期抑制機能を持っていることが示された [19]。また、前述のゲノム解読および我々の解析結果から、デバの INK4a と ARF 遺伝子には早期終止コドンが存在し、マウスやヒトと比較してアミノ酸配列が短くなっていることが判明した [9,20]。これらの変化により遺伝子機能に影響を及ぼすことが想定されているが、がん化耐性・老化耐性における役割はまだ未解明である。

## 7) デバ iPS 細胞の腫瘍化耐性

人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells, iPS 細胞) は、体細胞に数種類の遺伝子を導入することで初期化された多能性幹細胞である [21]。我々は最近、デバから iPS 細胞を作製し解析を行ったところ、デバ種特異的な腫瘍化耐性機構を見出した [22]。まず、デバの皮膚線維芽細胞に、レトロウイルスを用いて Oct4、Sox2、Klf4、cMyc の 4 因子を遺伝子導入したところ、iPS 細胞のコロニーを得ることができた。デバ iPS 細胞は培養下での多分化能を持つにも関わらず、未分化状態で生体に移植しても、他の動物の iPS 細胞のように腫瘍 (奇形腫) を形成せず [23,24]、腫瘍化耐性を示した。造腫瘍性を持つマウスやヒトの iPS 細胞では、2 つのがん抑制遺伝子 INK4a と ARF の発現が強く抑制されている。しかしながらデバ iPS 細胞では、INK4a の発現は抑制されている一方、ARF の発現は活性化状態が保たれていた。また、マウス ES 細胞の造腫瘍性を正に制御するがん遺伝子 ES cell expressed Ras (ERAS) [25] の配列を解析したところ、デバの ERAS には他の動物では認められない 4 塩基の挿入が存在し、ERAS タンパクの機能不全をもたらすフレームシフト変異が生じていた。ノックダウン・強制発現実験の結果、これらの 2 つの遺伝子の種特異性によって、デバ iPS 細胞の腫瘍化耐性が制御されていることが明らかとなった (図 4)。

次に我々は、初期化ストレス下で活性化した ARF を人工的に抑制したところ、興味深いことにマウスとは対照的に、デバ細胞は増殖を停止し、初期化された細胞が出現しなくなった。解析の結果、ARF が抑制されたデ

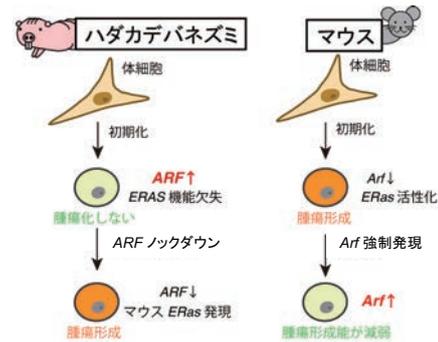


図 4. デバ iPS 細胞の腫瘍化耐性

ハダカデバネズミ iPS 細胞は ARF の活性化と ERAS の機能欠失により腫瘍を形成しない。マウス iPS 細胞に ARF を強制発現させると腫瘍形成能が減弱する。

JST プレスリリースより改変 (<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20160510/>)

バ細胞では、種特異的に、がん抑制機構の一つである「細胞老化」が引き起こされていた。我々はこの現象を、デバ細胞の腫瘍化耐性機構のひとつとして「ASIS: ARF suppression-induced senescence (ARF 抑制時細胞老化)」と名付けた。デバでは、初期化ストレス下で ARF が抑制されると細胞老化が誘導されて細胞が増殖を停止するため、対照的に ARF の発現が維持された増殖能をもつ細胞がコロニーを形成し、ARF 活性化型の腫瘍化耐性 iPS 細胞として選択されたと考えられた。

マウスやヒトなどの哺乳類の細胞では、初期化やがん化のストレスを受けると、防御機構として ARF が活性化され、その破綻の結果として腫瘍を形成する能力をもつ細胞が出現する。一方で、デバでは、第一段階として ARF が活性化されるだけではなく、さらに、一旦活性化された ARF が抑制されてしまう状況下において、第二段階として ASIS が機能し、二重の防御機構で初期化やがん化を抑制すると考えられた (図 5)。

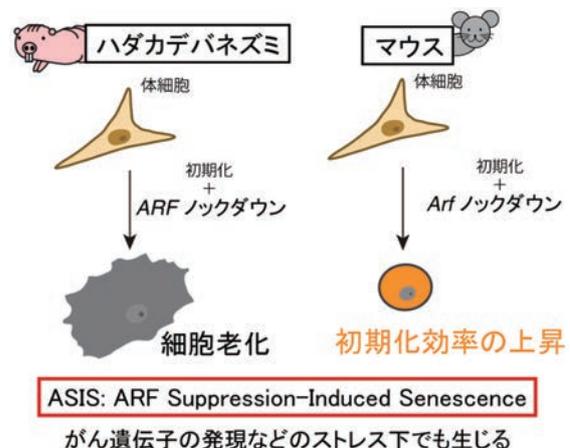


図 5. デバ特異的な腫瘍化耐性機構 (ASIS)

デバ線維芽細胞は活性化していた ARF が抑制されるとデバ特有の細胞老化を起こし、細胞増殖を停止する。

JST プレスリリースより改変 (<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20160510/>)

## 5. おわりに 新規モデル動物の有効性と注意点

デバが老化耐性・がん化耐性を持つことが分かってから十数年が経ち、老化・がん化に関与する可能性がある遺伝子・メカニズムが色々と提唱されてきている。しかし気をつけなければならないのは、種間比較から見いだされた種特異的な配列変化などの違いが、実際の機能と相関するとは限らないことである。例えば、hair growth associated (HR) の変異がデバの無毛の原因であることが示唆されていたが、多くの齧歯類のHRの配列を比較した結果、この変異はダマラランドデバネズミやモルモットなど有毛の近縁種に広く認められ、機能と相関するというより、むしろ系統特異的な変化であることが明らかとなっている。また、デバのゲノム配列の解明時に、低酸素応答において極めて重要な hypoxia-induced factor 1a (HIF1a) に変異があり、分解が抑制されている可能性が示唆されていたが [9]、我々が調べた限りでは、現在のところ、デバのHIF1aがマウスよりも安定化されているという証拠は得られていない(岡ら、未発表データ)。次世代シーケンサーなどの大規模解析により非モデル動物の解析は飛躍的な発展を遂げつつあるが、見つけられた種特異性が、真に機能的に重要であるか否かについては、細胞・個体を用いた慎重な検証が必要である。遺伝子の配列や発現解析のみならず、どれが真にデバの種特異的な耐性機構を担っているのか、個体・細胞レベルでの「堅い」解析が望まれる。発生工学的手法の開発・遺伝子改変デバの作出も、今後重要な課題となってくるであろう。近年、デバのみならず、Blind mole rat, プラントホオヒゲコウモリ, ホッキョククジラなどの長寿動物や、非常に短命な turquoise killifish が注目され、解析が始まっている。今後、老化分野のみならず、今まで研究対象とすることが難しかった多くの「おもしろい」有用な特徴を持つ動物を用いた「非モデル実験動物医学」が、10～20年で飛躍的に発展していくと期待される。

- 1 Jarvis JU. Eusociality in a mammal: cooperative breeding in naked mole-rat colonies. *Science* (80-) 1981;212:571-573.
- 2 Johansen K, Lykkeboe G, Weber RE, et al. Blood respiratory properties in the naked mole rat *Heterocephalus glaber*, a mammal of low body temperature. *Respir Physiol* 1976;28:303-314.
- 3 Seki F, Hikishima K, Nambu S, et al. Multidimensional MRI-CT atlas of the naked mole-rat brain (*Heterocephalus glaber*). *Front Neuroanat* 2013;7:45.
- 4 Buffenstein R. Negligible senescence in the longest living rodent, the naked mole-rat: Insights from a successfully aging species. *J Comp Physiol B Biochem Syst Environ Physiol* 2008;178:439-445.
- 5 Delaney M a, Nagy L, Kinsel MJ, et al. Spontaneous histologic lesions of the adult naked mole rat (*Heterocephalus glaber*): a retrospective survey of lesions in a zoo population. *Vet Pathol* 2013;50:607-621.
- 6 Delaney MA, Ward JM, Walsh TF, et al. Initial Case Reports of Cancer in Naked Mole-rats (*Heterocephalus glaber*). *Vet Pathol* 2016.
- 7 Gorbunova V, Bozzella MJ, Seluanov A. Rodents for comparative aging studies: from mice to beavers. *Age* 2008;30:111-119.
- 8 Seluanov A, Hine C, Bozzella M, et al. Distinct tumor suppressor mechanisms evolve in rodent species that differ in size and lifespan. *Aging Cell* 2008;7:813-823.
- 9 Kim EB, Fang X, Fushan AA, et al. Genome sequencing reveals insights into physiology and longevity of the naked mole rat. *Nature* 2011;479:223-227.
- 10 MacRae SL, Zhang Q, Lemetre C, et al. Comparative analysis of genome maintenance genes in naked mole rat, mouse, and human. *Aging Cell* 2015;1-4.
- 11 Andziak B, O'Connor TP, Qi W, et al. High oxidative damage levels in the longest-living rodent, the naked mole-rat. *Aging Cell* 2006;5:463-471.
- 12 Perez VI, Buffenstein R, Masamsetti V, et al. Protein stability and resistance to oxidative stress are determinants of longevity in the longest-living rodent, the naked mole-rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:3059-3064.
- 13 Lewis KN, Wason E, Edrey YH, et al. Regulation of Nrf2 signaling and longevity in naturally long-lived rodents. *Proc Natl Acad Sci* 2015;112:201417566.
- 14 Azpurua J, Ke Z, Chen IX, et al. Naked mole-rat has increased translational fidelity compared with the mouse, as well as a unique 28S ribosomal RNA cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:17350-17355.
- 15 Baker DJ, Wijshake T, Tchkonja T, et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 2011;479:232-236.
- 16 Baker DJ, Childs BG, Durik M, et al. Naturally occurring p16 Ink4a -positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* 2016;530:184-189.
- 17 Seluanov A, Hine C, Azpurua J, et al. Hypersensitivity to contact inhibition provides a clue to cancer resistance of naked mole-rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:19352-19357.
- 18 Tian X, Azpurua J, Hine C, et al. High-molecular-mass hyaluronan mediates the cancer resistance of the naked mole rat. *Nature* 2013;499:346-349.
- 19 Tian X, Azpurua J, Ke Z, et al. INK4 locus of the tumor-resistant rodent, the naked mole rat, expresses a functional p15/p16 hybrid isoform. *Proc Natl Acad Sci* 2015;112:1053-1058.

- 20 Miyawaki S, Kawamura Y, Hachiya T, et al. Molecular cloning and characterization of the INK4a and ARF genes in naked mole-rat 2015;35:42–50.
- 21 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 2006;126:663–676.
- 22 Miyawaki S, Kawamura Y, Oiwa Y, et al. Tumour resistance in induced pluripotent stem cells derived from naked mole-rats. Nat Commun 2016;7:11471.
- 23 Miura K, Okada Y, Aoi T, et al. Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. Nat Biotechnol 2009;27:743–745.
- 24 Okano H, Nakamura M, Yoshida K, et al. Steps toward safe cell therapy using induced pluripotent stem cells. Circ Res 2013;112:523–533.
- 25 Takahashi K, Mitsui K, Yamanaka S. Role of ERas in promoting tumour-like properties in mouse embryonic stem cells. Nature 2003;423:541–545.

## Aging Research using the long-lived rodent, naked mole-rat.

Kyoko Miura

Hokkaido University, Institute for Genetic Medicine, Biomedical Animal Research Laboratory  
Kita-15 Nishi-7, Kita-Ku, Sapporo, 060-0815, Japan

### Abstract

Naked mole-rat (NMR) is a subterranean mammal native to Africa. NMR lives in an underground colony averaging 60-80 individuals, including a single breeding "queen", one-to-three "king" and many sterile subordinates. Surprisingly, NMRs live up to around 30 years, 10 times longer than mice, and captured colonies almost never show tumor formation. Understanding these animals' anti-cancer and longevity mechanisms may lead to advances in human treatments in the future. From 2010, we have studied the mechanisms of longevity, cancer-resistance and sociality of NMR. Recently, we generated NMR-induced pluripotent stem cells (NMR-iPSCs) and found that NMR-iPSCs do not exhibit teratoma-forming tumorigenicity due to the species-specific activation of tumor-suppressor alternative reading frame (ARF) and a disruption mutation of the oncogene ES cell-expressed Ras (ERAS). Here, I review the recent progress in the NMR research field.

**Keywords** : naked mole-rat, *heterocephalus glaber*, iPSC cell, longevity, cancer

【総説】

## 老化研究におけるコモンマーモセットの可能性

佐々木 えりか

公益財団法人 実験動物中央研究所 マーモセット研究部

### 要約

霊長類の実験動物は、様々な疾患に対する新規治療法、新薬開発における前臨床研究モデルとして用いられている。なかでもコモンマーモセットは小型の霊長類で、ヒトに似た生物学的、行動学的特徴を持ちつつ、高い繁殖力、扱いやすさなど実験動物に適した特徴をもつユニークな動物である。コモンマーモセットの疾患モデルは、薬物誘導性、外科的手法、遺伝子改変などにより作製することが可能であり、げっ歯類ではヒトの病態を再現する事が困難な精神・神経疾患研究のモデルとして良く用いられている。近年は、iPS細胞を用いた再生医療の前臨床にも用いられるようになってきている。そこで本稿では、コモンマーモセットのモデルとしての特徴とこれまでに開発されてきたコモンマーモセットの疾患モデル動物作製法などを紹介しつつ基礎老化研究におけるモデルとしての今後可能性について考察する。

### 1. はじめに

霊長類のモデル動物は、遺伝的、生理学的、解剖学的にヒトに近い基礎研究のみならず、新薬、新規治療法開発における有効性・安全性を検証する前臨床研究に用いられている。霊長類のモデル動物としては、アカゲザル、カニクイザル、コモンマーモセット (*Callithrix jacchus* : 以下マーモセット) などがある。霊長類は、真猿類と原猿類に分類され、更に真猿類は、旧世界ザル、新世界ザルに分類される。新世界ザルは、約2600～2700万年前に旧世界ザルから分岐し、亜熱帯環境に適応した結果、旧世界ザルのマカク属とは異なる様々な生物学的特徴を持つようになったと考えられている[1]。また、旧世界ザルは、約2300万年前に、オナガザル上科とヒト上科に分岐した。現在世界的に、ヒト上科の霊長類は、侵襲的な医学研究には使用しない方向に進んでいる(図1)。本稿では、我々がモデル動物としての開発を行なっているマーモセットについて紹介する。

### 2. マーモセットの生物学的特徴と実験動物としての有用性

マーモセットは、体長(頭胴長)約20cm、体重が約350g～500gとラット程度の体の大きさで、耳の周りに白い毛ブサを持ち、尻尾は縞模様で約25cmと頭胴長よりも長いという特徴を持つ(図2)。またマーモセットのオスとメスは体格や外貌にはほぼ違いは認められない。

マーモセットの原産地はブラジル北東沿海部であるが、マーモセットは好奇心が強く、環境適応力が高いため、近年はペットとして飼育されていたマーモセットが逃げたり、捨てられたりして野生環境下で繁殖しブラジル南部まで生息域が広がっている。欧米では、霊長類を用いた動物実験が困難であると考えられているが、実際には霊長類以外に代替できない研究では霊長類の実験動物の使用が認められている。実際に実験動物としてのマーモセットのコロニーは、イギリス、ドイツ、オランダ、スイス、フランス、アメリカなどの欧米諸国に存在している。PubMedで“marmoset”と検索すると1919年に最初の論文が発表されているが、その筆者は野口英世先生で、黄熱病の病原体と誤認されていたレプトスピラ菌の感染実験の報告である[2]。ただし実際に用いられているのは、ノドジロオマキザルというサルである。マーモセットが実験動物として本格的に使用されるようになるのは1960年代になってからである。我が国では、1980年代に英国からマーモセットを輸入し、現在国内で入手可能なマーモセットの大部分はこれらのマーモ

連絡先：佐々木えりか 〒210-0821

神奈川県川崎市川崎区殿町3-25-12

TEL：044-201-8545

FAX：044-201-8541

E-mail：esasaki@ciea.or.jp

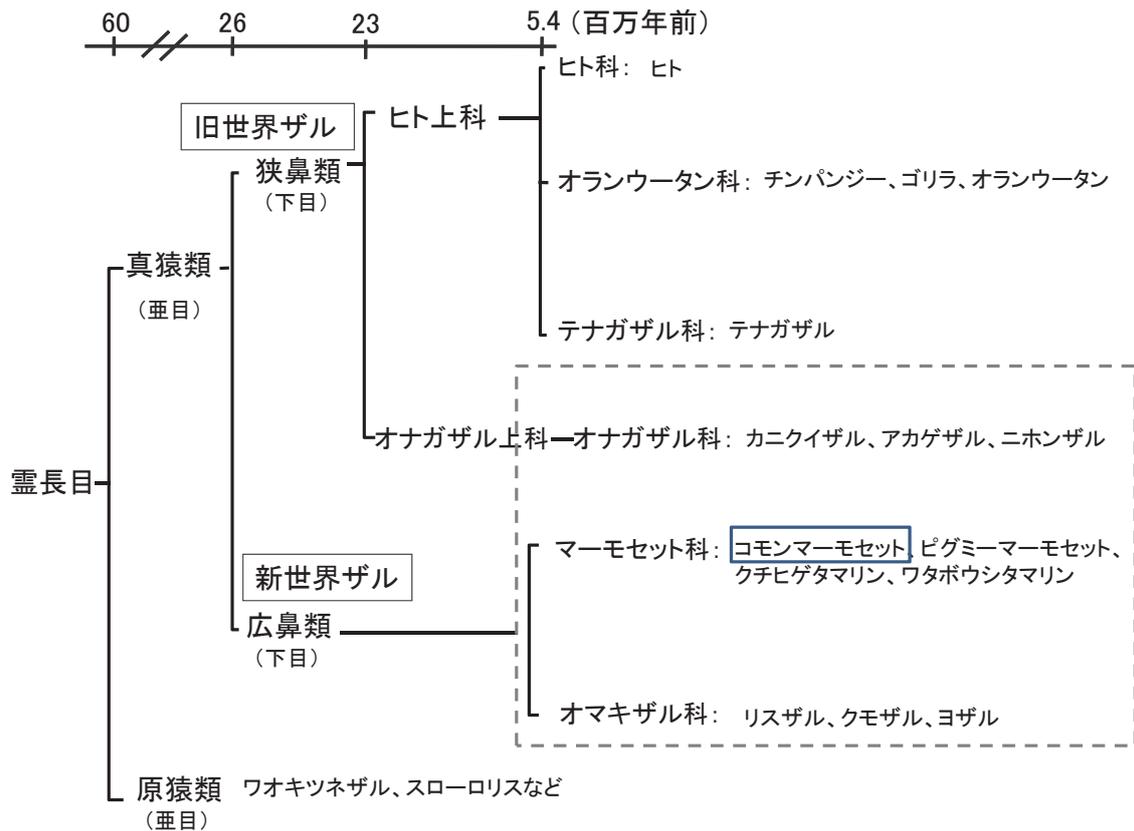


図 1



図 2

セットの子孫である。

マーモセットは小型であるため飼育や実験での取扱いが比較的容易であるが、その一方で小型のためマーモセットの推定全血量は 21 ml しかなく、反復採血が必要となる薬動態試験や毒物動態学試験に向かないとされてきた。また、これまで小動物用の手術道具や研究用デバイスが少なく、多様な疾病のモデルを作製し、その解析を行なうというニーズに充分対応できていなかった。しかしながら近年マウスでも、できるだけ非侵襲的の手法を用いた動物実験を行なう事が推奨されるようになり、小動物用の様々な手術道具、研究用デバイスが開発され、これらをマーモセットにも流用可能となってきた。また少量の血液での生化学血清検査も可能となり、マーモセットでも薬動態試験や毒物動態学試験も可能となっている。実際に、欧州では世界 2 位、3 位の大手製薬会社

がマーモセットを用いた安全性試験で承認された医薬品が複数存在する。

更に近年では、マーモセットが小型であることが逆にメリットとなる場合もある。胚性幹 (ES) 細胞、人工多能性幹 (iPS) 細胞を用いた再生医療の開発では、臨床研究開始前にげっ歯類および非げっ歯類を用いた有効性・安全性を検証する前臨床研究が必要となるが、大量の分化細胞を準備することが困難である場合が多い。膝島移植を例にすると、マーモセットであればマウスに必要な移植細胞数の約 15 倍、マカクザルの場合は約 600 倍必要であると言われている。マウスに必要な移植細胞数の約 15 倍であれば、大量培養用の機材を準備しなくても ES 細胞・iPS 細胞から分化誘導した膝島を準備することは可能な範囲内であろう。同様に新薬開発においても、少量の薬物で有効性・安全性の検証が可能である。

マーモセットは、他の霊長類と比較すると高い繁殖効率を持つことが知られている。マーモセットは、通年繁殖であり、メスの性周期は、約 28 日である。表 1 に示すように、オスは約生後 1 年、メスは約 1 年半で性成熟に達し (マカクザルは 3 ~ 5 年)、妊娠期間は約 145 日である。マーモセットは通常、双仔、三つ仔を出産し、出産後約 2 週間で次の妊娠が成立し、年に 2 回出生するため、一頭のメスから年間 4 ~ 6 頭の新生仔が得られる。この性成熟の早さ、産仔数の多さは、実験動物として安定供給を実現するために重要であると共に、遺伝子改変モデル作製に適した特徴でもある。マーモセットでは月経出血は認められず、したがって閉経もないため生涯を

表1 マウス、マーモセット、マカクザルにおける繁殖学的特徴の比較

| 動物種       | マウス    | マーモセット   | マカクザル    |
|-----------|--------|----------|----------|
| 性成熟       | 8週     | 1年       | 3~4年     |
| 産仔数/回     | 6~8匹   | 2~3匹     | 1頭       |
| 妊娠期間      | 20日    | 145~148日 | 175~180日 |
| 分娩間隔      | 20~28日 | 154~157日 | 約550日    |
| 年間産仔数     | 36~48匹 | 4~6匹     | <1匹      |
| 生涯分娩回数    | 5~6産   | 20~30産   | 10~12産   |
| 生涯産仔数(概算) | 36~48匹 | 40~80匹   | 10~12匹   |

通じて妊娠、出産が可能である。国内でマーモセットを販売している日本クレア株式会社では、16.8歳で34回の出産で合計72頭の新生仔を産んだという記録がある[3]。この高い繁殖能力により、マーモセットは霊長類でありながら実験群およびコントロール群それぞれに性別・年齢・体重を揃えた個体を複数等用いた実験を反復して行うことが比較的容易となっている。また同腹仔は、子宮内で胎盤が融合し臍帯を通して血液（おそらく造血幹細胞）が交換されるため血液キメラとなり、この血球は、ほぼ一生同腹仔の体内で産生されるため、同腹仔同士は組織移植が可能である[4,5]。

マーモセットはラット程度の大きさであるが、脳はラットの3~4倍の体積があり、前頭前野、運動野および運動前野が発達している。更にマウスでは認められない弓状束、鉤状束、下縦束、上縦束、下前頭後頭束などの連合繊維が存在するなどヒトの脳と共通の構造、機能を多く兼ね備えており、行動学的にもマカクザルよりもヒトに似ている点が多くあり、脳科学研究のモデルとしての利用が最も多い[6-9]。また前述したように小型のマーモセットは、多能性幹細胞を用いた再生医療の前臨床研究に適しているため、糖尿病、緑内障、肝障害などの疾病研究にも用いられている。

### 3. 解析ツールの開発状況

動物実験は、モデル動物の生理学的状態を解析するための解析ツールが欠かせない。

特に近年はモデルの解析、モデル動物の作製には、ゲノム情報が必須であるが、米国のWashington University St. Louis School of Medicine Genome Sequencing Centerから報告されたマーモセットのゲノム情報に加え、残されていた未読の部分について我々の研究チームがマーモセットゲノム情報のアップデートとして報告した[10,11]。また主要臓器の完全長cDNAライブラリーが作製されており、17,232 contigに対応する約247,000クローンのESTクローンが理化学研究所バイオリソースセンターより提供されている[12]。さらに、マーモセットの薬物代謝の特徴を明かにするためシトクロームP450の解析も進んでおり、薬理学研究における有用性の開発も進められている[13]。

マーモセットの細胞表面抗原はヒトの抗体に交差す

るものが多く、市販のヒト細胞膜表面抗原に対する抗体との交差性を調べた文献が幾つか発表されている[14-16]。しかしながら、CD34、CD45、c-Kitなどヒトの抗体と交差性を示さないマーモセットの細胞表面抗原も存在し、これらに対する抗体の作製も行われている[17,18]。

### 4. マーモセットを用いた老化研究モデルの可能性

#### 1) マーモセットの老化について

現在、基礎老化研究のモデルとしてのマーモセット有用性は、まだまだ未知数であるが、前述したように比較的発達した脳を持つため、老化に関連する脳神経疾患のモデルとしては、しばしば用いられている。マーモセットの寿命は、飼育条件下で平均7~8年で、長寿の個体では16~21年の生存も報告されるなど、平均寿命は飼育環境にも大きく左右される[3,19-21]。Abbottは、8歳から老齢マーモセットと定義している[22]。これは霊長類の中では比較的、寿命が短い方であり、アカゲザルの寿命は約40年、カニクイザルの寿命は約25年と言われている。しかしながら平均寿命が2年程度のマウスと比べれば、ヒトに似た老化が観察されることが期待される。

実際、米国New England Primate Centerにおいて2004年~2009年に飼育されていた6歳以下のマーモセットの死因は、精神的な外傷、腸炎、敗血症と細菌性感染症が主であるのに対し、6歳以降の死因の主なもの、腫瘍、慢性腎不全、アミロイドーシス、糖尿病であった[21]。また米国のSouthwest National Primate Research Centerの2002年~2011年の調査では、6才以下のマーモセットの死因は、過敏性大腸炎、アミロイドーシス、壊死性大腸炎であったのに対し、6才以上では、過敏性大腸病、腎炎、心筋症とアミロイド症と報告されている[19]。一方、日本で飼育されているマーモセットでは、慢性腎不全、糖尿病などは認められていないが、飼育条件などの違いによるものと考えられる。

また老齢マーモセットの脳では自然発症的に、脳血管へのアミロイド沈着や $\beta$ -アミロイドプラークなどが認められるが、神経原繊維変性は認められていない[23,24]。これまでマーモセット脳内に $\beta$ -アミロイドを含む脳ホモジェネートを注入したアルツハイマーモデル

作製なども試みられているが、やはり神経原繊維変性は認められていない [23-25]。

## 2) モデル作製について

### a) パーキンソン病モデル

老化に関連する疾患の一つとしてパーキンソン病が挙げられるが、パーキンソン病は、ドーパミン産生神経の変性によりドーパミンの産生が減少して、ふるえ、不働、筋硬直、姿勢保持障害、無表情などの症状を呈する疾患である。多くは、弧発性であるが、家族性のものもあり、多くの原因遺伝子も特定されている。マウスでは、様々な遺伝子改変によるパーキンソン病モデルが作製されており、パーキンソン病様の運動機能障害は認められているが、ドーパミン神経の変性は認められていないため、よりヒトに近い霊長類を用いたパーキンソン病モデルが求められている [26]。マーモセットでは、6-hydroxydopamine (6-OHDA) もしくは 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine (MPTP) を投与する薬剤誘導モデルが作製されており、薬効試験などに用いられている。いずれの方法も、自発運動の低下（無動の指標）、振戦などパーキンソン病の特徴的な症候が認められる。6-OHDA は、活性酸素の産生により 6-OHDA が自己酸化することにより神経変性が生じると考えられている。一方、1980 年代にドーパミン神経毒として発見された MPTP は、血液脳関門を通過してモノアミン酸化酵素 B によって 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) へ酸化され、ドーパミントランスポータを介して黒質線条体のドーパミン神経へ取り込まれ、ミトコンドリア電子伝達系酵素複合体 I の活性が阻害されることにより、ATP 産生能が低下して神経細胞死が生じると考えられている [27, 28]。6-OHDA によるモデル作製は定位脳手術が必要なものに対し、MPTP は腹腔内、皮下投与などでモデルの作製が可能である [26, 29]。Hikishima らは、MPTP 投与によるマーモセットパーキンソン病モデルは、多数のマーモセット脳の MRI 画像から作製された標準脳とモデルマーモセットの脳画像を比較することによって、黒質の体積が減少していることを示した [30]。近年、パーキンソン病患者でも同様の検査を行っており、今後 MPTP モデルを用いた前臨床研究に有用な技術と期待される。

これらの薬物誘導性モデルは、パーキンソン様の症候の再現に有用であるが、薬物誘導によって急激にドーパミン神経を変性させてしまうため、パーキンソン病の患者で認められるゆっくりとした病態の進行、パーキンソン病の発症原因と考えられているレヴィ小体の形成などについては再現されない。そこで Kirik らは、変異遺伝子が家族性パーキンソン病の原因遺伝子の一つとなる  $\alpha$ -synuclein 遺伝子を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを用いて、マーモセットの脳の黒質における  $\alpha$ -synuclein の片側性の過剰発現モデルを作製した。その結果、野生型遺伝子および変異遺伝子のいずれもウイルスベクターの注入が行われた半脳の黒質緻密部のドー

パミン神経細胞内の  $\alpha$ -synuclein の封入体の形成と細胞数減少および線条体のドーパミン神経繊維の減少が示された。また運動機能障害は、ウイルスベクター投与後の 6 週間後から認められ 16 週間続き、MPTP 投与モデルよりも症候の発症が遅いこと、 $\alpha$ -synuclein の封入体が認められたことからパーキンソン病患者の運動機能障害を発症する前の症候に近いことが示唆されている。

一方、人為的に作製したモデルではないが、Kobayashi らは、6 歳のマーモセットの嗅球において、 $\alpha$ -synuclein の凝集体が形成されていることを見いだした [31]。近年ヒトのパーキンソン病の超初期では嗅球が障害され嗅覚障害が報告されており、マーモセットでも同様の加齢による変化を示唆しているのではないかと考察している。

### b) 遺伝子改変モデル

2009 年に我々の研究グループは、マーモセットの受精卵にレンチウイルスベクターを用いて GFP 遺伝子を導入し、GFP の発現が認められた胚のみを仮親の子宮に移植することで 5 頭の遺伝子改変マーモセット産仔を得、更に 5 頭中 4 頭が様々な体細胞で GFP が発現すること、次世代の個体にも導入遺伝子が伝達し、機能することを示した [32]。また、同様に CMV プロモータもしくはシナプシンプロモータの下流に、緑色蛍光タンパク (EGFP)、カルモジュリン (CaM)、ミオシン軽鎖フラグメント (M13) を遺伝子工学的に結合させたカルシウムインジケータである GCaMP を連結したレンチウイルスベクター導入したトランスジェニックマーモセットの作製も報告されている [33]。GCaMP は細胞内のカルシウム濃度の変化を可視化するタンパク質であり、このマーモセット生体内の神経細胞の活動を 2 光子顕微鏡で観察可能にするもので、脳の高次機能を構築している神経回路を理解するために有用であると期待されている。このレンチウイルスベクターによるトランスジェニックマーモセット作製法は、安定して作出効率が高いこと、安定して導入遺伝子が伝達することから、今後、老化研究に有用なモデル作出にも貢献できると考える。

遺伝子改変マウスモデルでは、標的遺伝子ノックアウト・ノックインモデルが多く用いられている。標的遺伝子ノックアウト・ノックインモデルの作製には、ホストの胚盤胞期の受精卵に注入するとホスト胚と生殖系キメラ形成する能力を持つ ES 細胞もしくは iPS 細胞（以下、両者を併せて多能性幹細胞と略す）胞が必要となる [34]。しかしながらマウス、ラット以外の動物種では、キメラ形成能を持つ多能性幹細胞は樹立されていない。このキメラ形成能を持つ多能性幹細胞は、naïve 型多能性幹細胞と呼ばれている。マーモセットにおいても ES 細胞、iPS 細胞のいずれも樹立が複数報告されている [35-40]。しかしながらこれらの多能性幹細胞は、キメラ形成能を持たない。その理由としてキメラ形成能を持つマウス ES 細胞は、着床前の胚盤葉上層細胞と同様の性質を持つが、マウス、ラット以外の動物種の多能性幹細胞は、着床後の胚盤葉上層細胞と類似の性質を持つため、着床

前の胚盤葉上層細胞に生着できずにキメラとならないと考えられている。実際にマウスの着床後胚から胚盤葉上層細胞由来の幹細胞 (EpiSC) を樹立すると、3 胚葉へ分化する能力はもつもののキメラ形成能を持たないことが報告されている [41-43]。実際この EpiSC の細胞学的性質である未分化維持に必要な FGF シグナルや単一細胞への乖離に耐性がないこと、X 染色体の不活化などは、マーモセットのみならずヒトの多能性幹細胞とよく似ている [44, 45]。現在、多くの幹細胞研究者がヒトを含む霊長類の naïve 型の多能性幹細胞の樹立に向けて研究を行なっているが、実際に生殖系キメラ形成能を持ち、マウスのように標的遺伝子ノックアウト・ノックインモデルの作製が可能な多能性幹細胞はまだ樹立されていない。そのため、トランスジェニックマーモセット作製法は確立されたものの標的遺伝子ノックアウト・ノックインモデルの作製は作製できていなかった。

このような状況を打開したのがゲノム編集技術である。ゲノム編集によるモデル動物作製では、受精卵の遺伝子を直接破壊することにより、キメラマウスのように次世代の子孫を得なくても、第 1 世代の個体で標的遺伝子ノックアウトの解析が可能というメリットがある。一方で、2 細胞期以降の受精卵でゲノム編集がなされると、ノックアウトされた標的遺伝子と野生型の遺伝子の混在 (モザイク状態) により、目的の表現型を示さなくなる可能性もある。実際、2014 年に、カニクイザルやアカゲサルの受精卵にゲノム編集を行った標的遺伝子ノックアウトサルの作製が報告されているが、これらのサルはモザイク状態であるため目的の表現型が示されていない [46, 47]。霊長類の場合、繁殖効率が良いマーモセットでも次世代を得るためには、性成熟までの期間と妊娠期間を含めて約 2 年半かかるため、始祖世代でモザイクを回避して表現型を呈する個体を得ることが重要である。そこで我々は、マーモセットの受精卵をゲノム編集することで標的遺伝子ノックアウトマーモセットの作製が可能か、さらにモザイク状態となるかどうかを検証するシステムを確立した。

具体的には、インターロイキン 2 受容体共通  $\gamma$  鎖 (IL-2rg) 遺伝子を標的とした人工ヌクレアーゼ HiFi-Zinc Finger Nuclease (HiFi-ZFN)、eHiFi-ZFN および platinum Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALEN) を受精卵に注入し、8 細胞期程度まで培養して各割球に分離した後、割球毎にゲノム改変の有無および改変遺伝子の配列解析を行うことにより、個々の受精卵内のモザイク率を明らかにする方法である。この方法によって目的遺伝子である IL2 受容体共通  $\gamma$  鎖遺伝子をノックアウトし、免疫不全マーモセットを得る事に成功した [48]。この方法は Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / CRISPR-associated 9 (CRISPR/Cas9) にも応用可能である。

## おわりに

マーモセットモデルの基礎老化研究への有用性は、まだまだ未知数な点が多いが、薬物誘導性、外科的手法などのモデル作製法に加え、遺伝子改変モデルの作製も可能となっており、工夫次第で老化研究モデルとして新たな展開が期待される。現在、マーモセット脳的全容解明を目指す「革新的技術による霊長類の神経回路機能全容解明プロジェクト」において、マーモセットの各発達段階の構造マップおよび機能マップの作製が行なわれており、脳の老化研究を行なう上での基盤となるであろう。新規ユーザーがいきなりマーモセット個体を扱うことはハードルが高いかもしれないが、現在、国内の様々なマーモセット研究ネットワークを通じて、組織サンプル、培養細胞、cDNA クローンなどが入手可能なので、是非、利用していただきたい。

## 引用文献

1. Mansfield, K., Marmoset models commonly used in biomedical research. *Comp Med* 53: 383-92, 2003.
2. Noguchi, H., Etiology of Yellow Fever : Iii. Symptomatology and Pathological Findings in Animals Experimentally Infected. *J Exp Med* 29: 585-96, 1919.
3. Nishijima, K., et al., Life span of common marmoset (*Callithrix jacchus*) at CLEA Japan breeding colony. *Biogerontology* 13: 439-43, 2012.
4. Yaguchi, M., et al., Transplantation of dendritic cells promotes functional recovery from spinal cord injury in common marmoset. *Neurosci Res* 2009.
5. Picus, J., W.R. Aldrich, and N.L. Letvin, A naturally occurring bone-marrow-chimeric primate. I. Integrity of its immune system. *Transplantation* 39: 297-303, 1985.
6. Mitchell, J.F. and D.A. Leopold, The marmoset monkey as a model for visual neuroscience. *Neurosci Res* 93: 20-46, 2015.
7. Chaplin, T.A., et al., A conserved pattern of differential expansion of cortical areas in simian primates. *J Neurosci* 33: 15120-5, 2013.
8. Bendor, D. and X. Wang, The neuronal representation of pitch in primate auditory cortex. *Nature* 436: 1161-5, 2005.
9. Robbins, T.W. and A.C. Roberts, Differential regulation of fronto-executive function by the monoamines and acetylcholine. *Cereb Cortex* 17 Suppl 1: i151-60, 2007.
10. Sato, K., et al., Resequencing of the common marmoset genome improves genome assemblies and gene-coding sequence analysis. *Sci Rep* 5: 16894, 2015.
11. Consortium, M.G.S.a.A., The common marmoset genome provides insight into primate biology and

- evolution. *Nat Genet* 46: 850-7, 2014.
12. Tatsumoto, S., et al., Development and Characterization of cDNA Resources for the Common Marmoset: One of the Experimental Primate Models. *DNA Research* 20: 255-262, 2013.
  13. Uno, Y., S. Uehara, and H. Yamazaki, Utility of non-human primates in drug development: Comparison of non-human primate and human drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes. *Biochemical Pharmacology* In Press 2016.
  14. Brok, H.P., et al., An extensive monoclonal antibody panel for the phenotyping of leukocyte subsets in the common marmoset and the cotton-top tamarin. *Cytometry* 45: 294-303, 2001.
  15. Neubert, R., et al., Cross-reactivity of antihuman monoclonal antibodies with cell surface receptors in the common marmoset. *Life Sci* 58: 317-24, 1996.
  16. Riecke, K., et al., Cross-reactivity of antibodies on thymic epithelial cells from humans and marmosets by flow-cytometry. *J Med Primatol* 29: 343-9, 2000.
  17. Izawa, K., et al., Hematopoietic activity of common marmoset CD34 cells isolated by a novel monoclonal antibody MA24. *Exp Hematol* 32: 843-51, 2004.
  18. Kametani, Y., et al., Development of monoclonal antibodies for analyzing immune and hematopoietic systems of common marmoset. *Exp Hematol* 37: 1318-1329, 2009.
  19. Ross, C.N., et al., Aging Phenotypes of Common Marmosets (*Callithrix jacchus*). *J Aging Res* 2012: 567143, 2012.
  20. Salmon, A.B., Moving toward 'common' use of the marmoset as a non-human primate aging model. *Pathobiol Aging Age Relat Dis* 6: 32758, 2016.
  21. Tardif, S.D., et al., The marmoset as a model of aging and age-related diseases. *ILAR J* 52: 54-65, 2011.
  22. Abbott, D.H., et al., Aspects of common marmoset basic biology and life history important for biomedical research. *Comp Med* 53: 339-50, 2003.
  23. Maclean, C.J., et al., Naturally occurring and experimentally induced beta-amyloid deposits in the brains of marmosets (*Callithrix jacchus*). *J Neural Transm (Vienna)* 107: 799-814, 2000.
  24. Palazzi, X., R. Switzer, and C. George, Natural occurrence of amyloid-Abeta deposits in the brain of young common marmosets (*Callithrix jacchus*): a morphological and immunohistochemical evaluation. *Vet Pathol* 43: 777-9, 2006.
  25. Baker, H.F., et al., Experimental induction of beta-amyloid plaques and cerebral angiopathy in primates. *Ann N Y Acad Sci* 695: 228-31, 1993.
  26. Eslamboli, A., Marmoset monkey models of Parkinson's disease: which model, when and why? *Brain Res Bull* 68: 140-9, 2005.
  27. Davis, G.C., et al., Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res* 1: 249-54, 1979.
  28. Langston, J.W., et al., Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219: 979-80, 1983.
  29. Yun, J.W., J.B. Ahn, and B.C. Kang, Modeling Parkinson's disease in the common marmoset (*Callithrix jacchus*): overview of models, methods, and animal care. *Lab Anim Res* 31: 155-65, 2015.
  30. Hikishima, K., et al., Voxel-based morphometry of the marmoset brain: In vivo detection of volume loss in the substantia nigra of the MPTP-treated Parkinson's disease model. *Neuroscience* 300: 585-92, 2015.
  31. Kobayashi, R., et al., alpha-Synuclein aggregation in the olfactory bulb of middle-aged common marmoset. *Neurosci Res* 106: 55-61, 2016.
  32. Sasaki, E., et al., Generation of transgenic non-human primates with germline transmission. *Nature* 459: 523-7, 2009.
  33. Park, J.E., et al., Generation of transgenic marmosets expressing genetically encoded calcium indicators. *Sci Rep* 6: 34931, 2016.
  34. Zijlstra, M., et al., Germ-line transmission of a disrupted beta 2-microglobulin gene produced by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature* 342: 435-8, 1989.
  35. Debowski, K., et al., Non-viral generation of marmoset monkey iPS cells by a six-factor-in-one-vector approach. *PLoS One* 10: e0118424, 2015.
  36. Muller, T., et al., A novel embryonic stem cell line derived from the common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) exhibiting germ cell-like characteristics. *Human Reproduction* 24: 1359-1372, 2009.
  37. Hanazawa, K., et al., Minimally invasive transabdominal collection of preimplantation embryos from the common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Theriogenology* 78: 811-816, 2012.
  38. Sasaki, E., et al., Establishment of novel embryonic stem cell lines derived from the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Stem Cells* 23: 1304-13, 2005.
  39. Tomioka, I., et al., Generating induced pluripotent stem cells from common marmoset (*Callithrix jacchus*) fetal liver cells using defined factors, including Lin28. *Genes Cells* 15: 959-69, 2010.
  40. Thomson, J.A., et al., Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biol Reprod* 55: 254-9, 1996.

41. Tesar, P.J., et al., New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 448: 196-9, 2007.
42. Brons, I.G., et al., Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 448: 191-5, 2007.
43. Guo, G., et al., Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. *Development* 136: 1063-9, 2009.
44. Rossant, J., Stem cells and early lineage development. *Cell* 132: 527-31, 2008.
45. Nichols, J. and A. Smith, Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* 4: 487-92, 2009.
46. Liu, H., et al., TALEN-mediated gene mutagenesis in rhesus and cynomolgus monkeys. *Cell Stem Cell* 14: 323-8, 2014.
47. Niu, Y., et al., Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell* 156: 836-43, 2014.
48. Sato, K., et al., Generation of a Nonhuman Primate Model of Severe Combined Immunodeficiency Using Highly Efficient Genome Editing. *Cell Stem Cell* 19: 127-38, 2016.

## Marmoset, disease model, genetic modification,

Erika Sasaki

Central Institute for Experimental Animals    Department of Marmoset Research

### Abstract

Non-human primates offer excellent, precise preclinical study systems for assessing the safety and efficacy of new therapies and drugs. The common marmoset (*Callithrix jacchus*) is a useful experimental animal in biomedical research because of its similarity to humans, high reproductive efficiency, and easy handling. Currently, to produce disease model common marmosets, drug inducible, surgical methods and genetically modified models are available for not only brain and neuronal disease but also in regenerative medicine using iPS cells. In this chapter, biological features of the common marmoset and several established disease models using marmosets will be introduced to consider as a new model for biomedical gerontology.

【総説】

人為的な生殖技術を用いたカニクイザルの作出

下澤 律浩

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 霊長類医科学研究センター

要約

ヒトと同じ霊長類に属するカニクイザルは、長寿な実験動物である。古くからワクチン検定や感染症研究に用いられていたカニクイザルは、様々な医科学研究に利用されるようになった。高齢カニクイザルにおいては、老人斑と神経原線維変化が確認されるなど老化研究にも用いられている。霊長類医科学研究センターでは大規模な室内繁殖が行われているが、交尾の不成立や微生物感染などの理由により繁殖できないこともある。そこで、人為的な生殖技術を利用したカニクイザルの作出が期待される。一方、近年ではゲノム編集技術により、家畜を含めた多くの動物種で遺伝子改変個体が作出されている。カニクイザルにおいても、人為的な生殖技術に遺伝子改変技術を応用することで疾患モデルの効率的な作出が身近に感じられるようになった。本稿では、このようなカニクイザルを人為的に作出する技術に関して紹介する。

キーワード：cynomolgus monkey, long-lived laboratory animal, indoor breeding, genetically modified animals, reproductive technology

はじめに

ヒトと同じ霊長類に属するカニクイザルは狭鼻類のマカク属に分類され、ニホンザルやアカゲザルと同じ仲間である(図1)。マカク属は長寿であること、単胎妊娠であること、月経があることなど他の実験動物が持たないヒトに非常に近い特徴を持つ。さらに、ニホンザルやアカゲザルは季節繁殖であるが、カニクイザルはヒトと同じように通年繁殖である。また、やや小型で扱いやすい点も特徴の一つである。霊長類医科学研究センター(以下、霊長類センター)のカニクイザルの中には、最長で43才7ヶ月まで生存した個体(およそ3倍がヒトの年齢に相当する)がいたことが示すように、非常に長寿な動物種である。なお霊長類センターにおける、雌における出産の最高齢は25才、雄における雌を妊娠させた最高齢は25才である。

実験に用いられるカニクイザルは繁殖により生産され、供給される必要がある。しかし、交尾の不成立や排卵時期の不一致などの場合、妊娠は成立しない。加えて、

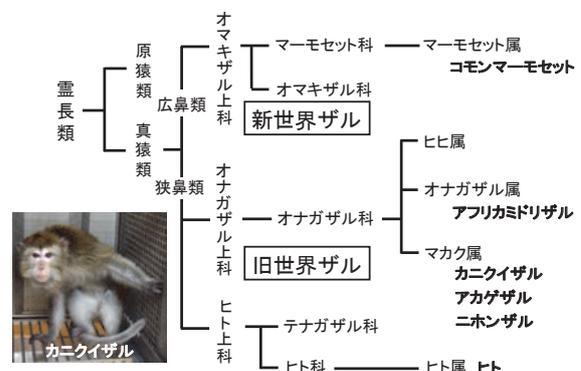


図1. 霊長類の系統樹  
写真は霊長類医科学研究センターで飼育されているオスのカニクイザル

配偶子形成や受精などに何らかの問題がある場合も自然繁殖できない。そこで例えば、ホルモン投与により卵を採取し、精子をその卵細胞質中に直接注入する顕微授精を行うことで作出した受精卵を胚移植し、個体を作出する必要がある。また、近年の疾患モデル研究には遺伝子改変された実験動物が多く利用されているが、この遺伝子改変には上述したように作出した受精卵への遺伝子改変操作が必須となる。カニクイザルの作出には人為的な生殖技術である発生・生殖工学技術が必要であり、その

連絡先：下澤律浩 〒 305-0843  
茨城県つくば市八幡台 1-1  
TEL：029-837-2121  
FAX：029-837-0218  
E-mail：shimo@nibiohn.go.jp

効率化のためにこれら技術のレベルを高める必要がある。

### 霊長類医学研究センターのカニクイザル

霊長類センターは1978年に国立予防衛生研究所（現在の国立感染症研究所）の筑波支所として設立された。主な目的は、カニクイザルを輸入に頼ることなく高品質な実験動物として生産し、ワクチンの国家検定や感染症研究用に供給することであった。これらカニクイザルは、当センターの設立時にマレーシア、インドネシアおよびフィリピンから導入された個体を起源にし、産地毎に区別された家系管理が行われ、40年近くに渡り大規模室内繁殖を続けている。遺伝的統御としての家系管理は、遺伝性疾患の遺伝子解析や一部の病原体に対する感受性を示す遺伝子保有率の違いの解明などに貢献している[1,2,3]。さらに微生物統御として、ヒトや各種研究などに害を及ぼす複数のウイルス、細菌、寄生虫などを排除したSPFコロニーの構築が進められている[4,5]。

このようなカニクイザルにおいては自然発生的な疾患を持つ個体が存在し、それらの中には遺伝性疾患も確認されている。例として、黄斑変性疾患[1]、拡張型心筋症[6]、糖尿病[7]、子宮内膜症、高脂血症などが挙げられ、疾患の解析や治療などの研究に利用されている。また、排卵時期に行われる雌雄1対1の同居方式による室内繁殖の特徴を生かして、胎齢が明確な妊娠個体あるいは胎児も研究に用いられている。このような自然発生的疾患だけでなく、個々の研究に適した疾患モデルも人為的な処置を施すことで積極的に作出し、研究に利用されている。カニクイザルはヒトに近く、長寿な実験動物であるという特徴を利用した長寿科学研究や脳神経疾患研究などにおいては、認知・行動解析を行う場合に報酬として餌が得られる指迷路学習装置や食物回収試験などが霊長類センターで考案され、利用されている。

### カニクイザルを用いた老化研究

長寿であるカニクイザルでは、アルツハイマー病の二大病変である老人斑と神経原線維変化が確認されている。老人斑に見られるアミロイド $\beta$ タンパク質(A $\beta$ )において、カニクイザルとヒトでは100%同一のアミノ酸配列である[8]。老人斑が確認されるカニクイザルの脳組織では、A $\beta$ やアミロイド前駆体タンパク質が蓄積することや肥大化したエンドソームにそれらの蓄積などが報告されている[9-11]。また、老齢カニクイザルでは、主に嗅内皮質や近傍の側頭葉領域においてGallyas染色陽性の神経原線維変化が生じている。しかし、典型的な神経原線維変化は非常に少なく、多くが4リピートTauからなるpretangle（繊維性の凝集に至っていない状態）であることやアストロサイトやオリゴデンドロサイトにTau病変が確認されたことから、進行性核上性麻痺に近いことが最近報告された[12]。

当センターのカニクイザルは繁殖していることから、高齢になるまで単に同居を経験するだけでなく、子育てなどの経験を経た状況でも維持され、ヒトの自然な老化

に沿った状況にあるとも考えられる。また、全飼育個体は体調管理を目的に血液検査や体重測定などの定期的な検査を受けており、長期の成長過程に伴う変化を調べることが可能である。このような検査にて糖尿病が発覚する個体もあり、このような個体では正常な個体と比較して、老人斑形成が加速していることも確認されている[7]。このようなカニクイザルでは、ヒトの老化に伴う疾患に関連した研究への貢献が今後増すものと考えられる。

### カニクイザルの発生工学技術

自然発生的疾患あるいは疾患誘発モデルを確実に作り出す手段として遺伝子改変技術の応用を挙げることができる。この遺伝子改変を行うためには、卵子が必要となる。マウスにおいては、精子が無くても卵子があれば、体細胞あるいは多能性幹細胞を用いた核移植技術を利用することでクローン個体が作出可能であり、このような細胞が遺伝子改変されていれば、遺伝子改変個体が作出できる[13]。しかしマウスでもその成功率は数~10%程であることから、効率の悪さをカバーするために多数の卵子を使用することで、より多くのクローンを作出できる。また、体外受精などの発生工学技術を単に個体の増産に応用する際にも、多数の卵子を使用することで多くの個体を作出できる。このような場合、卵子、特に成熟卵を準備するために、ホルモン投与により卵巣内に存在する多くの未成熟卵の発育を促進し、成熟を誘導する必要がある。

発生工学技術が確立されているマウスにおいては、体外受精で作出された受精卵を仮親に移植することで産仔が得られることは広く知られている。一般的に、精子は安楽殺した雄の精巣上体から大量に採取可能である。一方卵子においては、eCGおよびhCGの性腺刺激ホルモンを投与することで、卵巣内にある多量の未成熟卵の発育および排卵を刺激し、安楽殺後に成熟卵を採取することとなる。これらのことをカニクイザルに当てはめた場合、安楽殺や成熟卵の誘導に違いがある。精子の採取については、非侵襲的に電気刺激により射出された精液から回収する。卵子の採取を目的に安楽殺することは、育成年月や貴重な実験動物であることを考慮するとカニクイザルにおいてはそぐわない。基本的に単胎妊娠動物であるカニクイザルは、通常の排卵が1個であることも影響しているのか、多数の良質な成熟卵を得ることは容易ではない。

そこで筆者は、カニクイザルの発生工学を始めるに当たって、成熟卵の採取に関する研究に着手した。一般的にカニクイザルでは、月経出血確認時に内在性の性腺刺激ホルモンの放出を抑制するためにGnRHアゴニストを投与してからFSHを8-9日間に一日2回の投与を行い、卵子の発育を刺激する。そして、卵子の成熟を誘導するためにhCGを投与し、その27-38時間後に卵胞液を吸引し、卵子を採取する[14,15]。また卵管に成熟卵が排卵されるマウスと異なり、カニクイザルでは卵胞から卵を採取するが、その中には巨大な核を持つ未性熟な

卵核胞期から減数分裂が再開して卵核胞の崩壊を経て、第一極体を持つ成熟卵である第2減数分裂中（M-II）期までのものが含まれる（図2）。筆者らは成熟卵の効果的な採取を目的に、性腺刺激ホルモンの種類およびその投与方法について図3 Aのような比較を行った。使用したFSHおよびeCGはそれぞれヒト尿および妊馬血清に由来するホルモン製剤であり、これらは卵子の発育を刺激する。特にFSHについては、半減期が短いことからFSHについて徐放的な感作を期待して、グリセリンを含む溶媒に溶解し、a法およびb法のように投与日に1回のみ投与した。c法のeCGは半減期が長いので、生理食塩水に溶解し、2日間隔で投与した。その結果、得られた平均採取卵子数（それぞれ31個、21個および18個）および成熟卵であるM-II期卵の平均数（それぞれ12個、10個および7個）に関して投与方法間に有意差は見られなかった[16]。現在は、採卵数および成熟卵数が最も優れていたa法を基本とし、FSHにリコンビナント製剤を利用するに至っている。

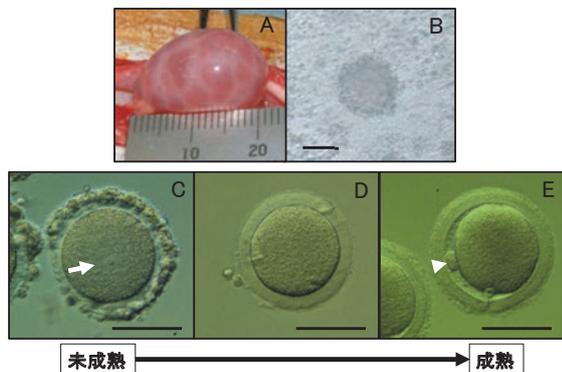


図2. カニクイザルにおける卵胞から採取された卵子  
A. 採卵時の卵巣。多くの発達した卵胞が確認できる。  
B. 採卵直後の卵丘細胞に囲まれた卵子。  
C-E. Cは大きな核（卵核胞、矢印）を持つ未成熟な卵核胞期卵で、成熟が再開すると核膜が崩壊し（卵核胞崩壊期、D）、第一極体（矢頭）を放出し成熟卵（E）となる。これらの卵子が混在して採卵されることが多い。  
Bar=100μm

上記のような処置により採取した成熟卵から個体を形成させるためには、精子と受精させる必要がある。体外受精によって、多くのサル類で受精卵が作出されている[17,18]が、得られる成熟卵が決して多くないことや未成熟卵も多く含まれることがある。そのため、筆者はカニクイザルの受精卵を作出する手段として顕微授精法を採用している（図4）。また、未受精卵も体外培養後に第一極体を放出した成熟卵となり、それに対して随時顕微授精が可能である。顕微授精を行うことで、胚盤胞へ発生することを確認しているが、その培養方法についても検討を行っている。胚の基礎培地として、10%牛血清を含むConnaught Medical Research Laboratories-1066溶液を基礎培地として、バッファローラット肝臓（BRL）細胞やマウス胎児線維芽（MEF）細胞の単層上で培

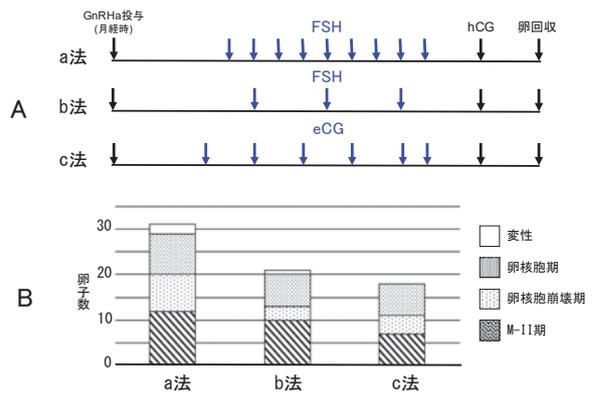


図3. 卵胞発育刺激法の検討

#### A. 卵胞発育刺激法

全てにおいて、月経確認時にGnRH agonistを投与し、その2～3週間後からFSH（aおよびb法）あるいはeCG（c法）を投与し、卵胞発育を刺激した。卵胞発育刺激後にhCGの投与により卵の成熟を誘導し、その36-38時間後に卵を回収した。a法はFSHを24時間毎に計9回投与した。b法はより簡便にできないかを調べるために、3回分の投与量を1回にまとめて投与した。c法はeCGを48時間毎に計5回投与し、さらにその24時間に1回投与した。

#### B. 卵胞発育刺激法の結果

a法、b法およびc法はそれぞれ7頭、5頭および8頭のカニクイザルを使用した平均の卵子数の結果を示す。各投与間に有意差は認められなかったが、採取された平均の卵子数および成熟卵数においてa法が比較的が多かった。

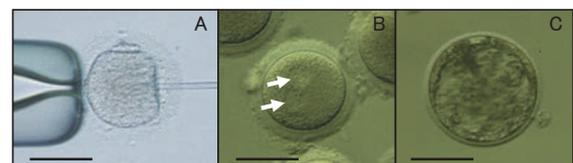


図4. 顕微授精法による受精卵の作出

A. 顕微授精。成熟卵に精子を注入しているところ。  
B. 前核期受精卵。精子および卵子に由来する前核（矢印）が形成される。  
C. 胚盤胞。細胞が集まって濃く見えるところが、内部細胞塊と言われ、胎児になる部分。  
Bar=100μm

養した。前核期の受精卵から胚盤胞への発生率は、基礎培地のみで16.7%（5/30）、BRL細胞で37.5%（6/16）およびMEF細胞で24.1%（13/54）と有意差は見られなかったが、BRL細胞を用いた時に発生率について高い傾向が見られた。

顕微授精卵の胚盤胞への発生が確認できたことから、さらにその先への発生能を調べる必要がある。そこで、まずES細胞が樹立できるか否かを調べた。ES細胞は将来胎児本体を形成する胚盤胞の内部細胞塊に由来する。ES細胞が樹立できれば、体外で作出し、培養した受精卵はより質のよいものと考えられる。先に述べたように、BRL細胞の単層上で培養した受精卵の胚盤

胞への発生率は最も高かったが、ES細胞は樹立できなかった。しかしながら、MEF細胞を用いた培養の場合は、13個の胚盤胞から4個(30.8%)のES細胞の樹立に成功した。BRL細胞を用いるよりもMEF細胞を利用した場合にES細胞の樹立が可能であったことから、MEF細胞は受精卵の発生能を支持するものと考えられた。ES細胞の樹立、さらに個体への発生能を考えた時、単に胚盤胞への高い発生率のみでは、用いた培養系がその先への発生能を保証することができないことを示唆する。ES細胞の樹立については、カニクイザルだけでなく、Vero細胞(腎臓上皮細胞)で有名なアフリカミドリザルにおいてもMEF細胞を用いた場合にES細胞の樹立に成功している[19,20]。次のステップが産仔の作出となる。しかし、産仔を得るためには借り腹となる雌個体を準備し、胚移植をする必要がある。このため、霊長類センターで室内繁殖しているカニクイザルの繁殖・生殖生理学的な側面からの理解を深める必要があった。

### カニクイザルの繁殖特性

発生工学技術の基礎となる良質且つ多くの成熟卵を採取する方法に対する取り組みについて紹介した。個体を作成するためには、借り腹となる母体のより良い選別方法について調べる必要があったことと、当センターにおける妊娠率が決して高いものでは無かったことから、排卵時期と年齢に関して調べた。その結果、10才以下の雌では、15才以上の雌と比べ、月経出血が確認された日から排卵までの日数の幅が短いこと、および妊娠率も高いことが判明した。排卵は血中エストラジオールおよびプロゲステロンの濃度を測定することで判定している(図5)。このことは、借り腹となる雌の候補として、10才以下の雌を利用した方がよいことを示唆する。

以上の検討の積み重ねにより、顕微授精によって得られた受精卵を雌の卵管内に移植することで産仔を得ることに成功した。単に配偶子や受精卵を人為的に操作してカニクイザルを作成するだけでなく、今後はこのような技術を遺伝子改変やその維持に応用する必要があると考えている。カニクイザルやアカゲザルなどのマカク属サ

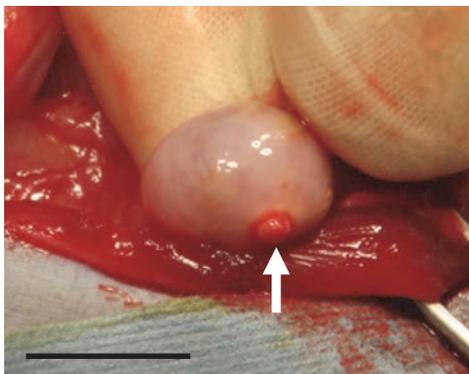


図5. 排卵直後の卵巣

血中のエストラジオールおよびプロゲステロンを測定し、それぞれ急激な減少および上昇すると排卵が生じる。矢印は排卵箇所を示す。Bar=1cm

ル類において、外来遺伝子が導入されたトランスジェニックザルの作出が報告され[21-23]、さらにゲノム編集技術により特定の遺伝子を壊した遺伝子改変ザルの作出が報告されている[24-26]。このようにサル類に対する遺伝子改変は、ヒト疾患モデルの作出を可能にすることから、遺伝子改変個体を使用した生物・医学研究が活発になることが予想される。遺伝子改変個体の作出も重要であるが、その維持も重要となる。マウスにおいても遺伝子改変により自然繁殖が難しいことも散見され、その維持が問題となる例もある。そこで、カニクイザルにおいてもそのような時に何らかの対処が必要となる。

カニクイザルにおいては、雌雄の同居により必ずしも産仔が得られるとは限らない。同居後、雌から採取した陰拭い液の中に精子が確認できず、交尾が成立していないことがある。これは遺伝子改変個体が作出できた時に、自然交配での維持ができないといった大きな障害となる。また、交尾できないような疾患や微生物感染のために同居不可ということも想定される。これらの問題を解決するために、配偶子や受精卵の体外操作などの発生工学技術だけでなく、生殖工学技術も必要となる。上述のように発生工学技術はホルモン投与、採卵、採精、受精卵の作出、胚移植など多くの過程を経るため煩雑で、個体への負荷や手間がかかる技術である。そこで、それら負荷や手間を減らす手段の一つとして、人工授精の利用が考えられる。これはウシなどの家畜などで広く利用されている一例である。カニクイザルにおける人工授精は技術的に確立されたものになっておらず、人工繁殖には利用されていない。これをカニクイザルの自然交配に代わる繁殖技術として取り入れる価値は非常に高い。しかし、カニクイザルやアカゲザルなどの子宮頸管は蛇行した構造になっていることから、子宮内にカテーテル等を挿入することが難しい[27-29]。貴重な遺伝子改変個体が作出された際に、その増産や維持にも人工授精を利用するために、カニクイザルにおける人工授精技術の確立に向けた検討を現在行っている。

### おわりに

マウスにおけるES細胞は、受精卵と組み合わせて作出されるキメラ個体においては生殖細胞を含めた全ての細胞へ分化する能力を持つ。このような能力を持つES細胞はマウス・ラットでしか樹立されていない。ES細胞とは、①自己複製能、②無限増殖能、③生殖細胞への寄与を含めたキメラ形成能を持つものと定義されている。このような3つの定義を全て持つマウスと同じ性質を持つES細胞はヒトを含めた全ての霊長類で樹立されていない。ただし、③の生殖細胞を除く三胚葉の細胞への分化が確認され、再生医療への応用も期待されたことから、ヒトやサル類の霊長類においては、ES細胞と一般的に言われている。上述した著者らが樹立したカニクイザルのES細胞も生殖細胞への分化が確認できていないことから、今後はこの点について明らかにしたいと考えている。しかし、カニクイザルの性成熟は3~5年と長いことから、キメラ形成能の確認に代わり得る方法を

開発することが現実的かもしれない。

霊長類センターのカニクイザルは、外部研究者が利用可能なバイオリソースとして開放されている。カニクイザルを含めた実験用サル類に最適化した共同利用施設として、霊長類医学実験施設および霊長類感染症実験施設が霊長類センターには付設されている。前者では遺伝子治療、高次脳神経、長寿科学研究などの医学研究、後者ではインフルエンザ、結核、エイズ、プリオンなどのBSL2およびBSL3感染実験などが行われている。齧歯類では寿命が2-3年と非常に短いことから、ヒトのモデルとしては限界のある研究分野、特に老化研究において老人斑と神経原線維変化が確認されるカニクイザルの利用は今後ますます重要なものになると考えられ、繁殖による個体の生産およびサル類研究に特化された施設の整備は、各種研究に無くてはならないものである。

#### 引用文献

1. Umeda S, Ayyagari R, Allikmets R, et al. Early-onset macular degeneration with drusen in a cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) pedigree: exclusion of 13 candidate genes and loci. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 683-691, 2005.
2. Higashino A, Sakate R, Kameoka Y, et al. Whole-genome sequencing and analysis of the Malaysian cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*) genome. *Genome Biol* 13: R58, 2012.
3. Saito A, Kono K, Nomaguchi M, et al. Geographical, genetic and functional diversity of antiretroviral host factor TRIMCyp in cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*). *J Gen Virol* 93: 594-602, 2012.
4. Fujimoto K, Takano J, Nrita T, et al. Simian betaretrovirus infection in a colony of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Comp Med* 60: 51-53, 2010.
5. Yasutomi Y. Establishment of specific pathogen-free macaque colonies in Tsukuba Primate Research Center of Japan for AIDS research. *Vaccine* 28 Suppl 2: B75-77, 2010.
6. 揚山直英. 霊長類における循環器疾患モデルの紹介, 心電図, 33: 5087-5094, 2013.
7. Okabayashi S, Shimozawa N, Yasutomi Y, et al. Diabetes mellitus accelerates A $\beta$  pathology in brain accompanied by enhanced GAB $\beta$  generation in nonhuman primates. *PLoS ONE* 10: e0117362, 2015.
8. Podlisny MB, Tolan DR, Selkoe DJ. Homology of the amyloid beta protein precursor in monkey and human supports a primate model for beta amyloidosis in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 138: 1423-1435, 1991.
9. Kimura N, Yanagisawa K, Terao K, et al. Age-related changes of intracellular A $\beta$  in cynomolgus monkey brains. *Neuropathol Appl Neurobiol* 31: 170-180, 2005.
10. Kimura N, Inoue M, Okabayashi S, et al. Dynein dysfunction induces endocytic pathology accompanied by an increase in Rab GTPases: a potential mechanism underlying age-dependent endocytic dysfunction. *J Biol Chem* 284: 31291-31302, 2009.
11. Kimura N, Samura E, Suzuki K, et al. Dynein Dysfunction Disrupts Retromer Trafficking via Endosomal Accumulation of Retromer-Related Proteins: The Concomitant Disturbance in Multi-Endosomal Trafficking Pathways is Required for The Alteration in APP Metabolism. *Am J Pathol* 186: 1952-66, 2016.
12. Uchihara T, Endo K, Kondo H, et al. Tau pathology in aged cynomolgus monkeys is progressive supranuclear palsy/corticobasal degeneration-but not Alzheimer disease-like -Ultrastructural mapping of tau by EDX-. *Acta Neuropathol Comm* 4: 118, 2016.
13. Shimozawa N, Ono Y, Muguruma K, et al. Direct production of gene-targeted mice from ES cells by nuclear transfer and gene transmission to their progeny. *Exp Anim* 51: 375-381, 2002.
14. Zelinski-Wooten MB, Hutchison JS, Hess DL, et al. Follicle-stimulating hormone alone supports follicle growth and oocyte development in gonadotrophin-releasing hormone antagonist-treated monkeys. *Hum Reprod* 10: 1658-1666, 1995.
15. Mitalipov SM, Yeoman RR, Kuo H-C, et al. Monozygotic twinning in rhesus monkeys by manipulation of in vitro derived embryos. *Biol Reprod* 66: 1449-1455, 2002.
16. Shimozawa N, Okada H, Hatori M, et al. Comparison of follicular growth stimulation methods for collecting mature oocytes from cynomolgus and African green monkeys. *Theriogenology* 67: 1143-1149, 2007.
17. Bavister BD, Boatman DE, Collins K, et al. Birth of rhesus monkey infant after in vitro fertilization and nonsurgical embryo transfer. *PNAS* 81: 2218-2222, 1984.
18. Balmaceda JP, Pool TB, Arana JB, et al. Successful *in vitro* fertilization and embryo transfer in cynomolgus monkeys. *Fertil Steril* 42: 791-795, 1984.
19. Shimozawa N, Nakamura S, Takahashi I, et al. Characterization of a novel embryonic stem cell line from an intracytoplasmic sperm injection-derived blastocyst in the African green monkey. *Reproduction* 139: 565-573, 2010.
20. Hatori M, Shimozawa N, Yasmin L, et al. Role of retinoic acid and fibroblast growth factor 2 in

- neural differentiation from cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) embryonic stem cells. *Comp Med* 64: 140-147, 2014.
21. Chan AW, Chong KY, Martinovich C, et al. Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes. *Science* 291: 309-312, 2001.
  22. Yang SH, Cheng PH, Banta H, et al. Towards a transgenic model of Huntington's disease in a non-human primate. *Nature* 453: 921-924, 2008.
  23. Liu Z, Li X, Zhang JT, et al. Autism-like behaviours and germline transmission in transgenic monkeys overexpressing MeCP2. *Nature* 530: 98-102, 2016.
  24. Niu Y, Shen B, Cui Y, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell* 156: 836-843, 2014.
  25. Liu H, Chen Y, Niu Y, et al. TALEN-mediated gene mutagenesis in rhesus and cynomolgus monkeys. *Cell Stem Cell* 14: 323-328, 2014.
  26. Liu Z, Zhou X, Zhu Y, et al. Generation of a monkey with MECP2 mutations by TALEN-based gene targeting. *Neurosci Bull* 30: 381-386, 2014.
  27. Tarantal AF, VandeVoort CA, Overstreet JW. Intrauterine insemination with ultrasound guidance in the long-tailed macaque (*Macaca fascicularis*). *J Med Primatol* 19: 447-453, 1990.
  28. Gabriel Sánchez-Partida L, Maginnis G, Dominko T, et al. Live rhesus offspring by artificial insemination using fresh sperm and cryopreserved sperm. *Biol Reprod* 63: 1092-1097, 2000.
  29. Koyama S, Fukuda K, Watanabe S, et al. Development of a new device for artificial insemination in cynomolgus macaques. *J Reprod Dev* 62: 527-529, 2016.

## Reproductive technologies for artificial production of cynomolgus monkeys

Nobuhiro Shimozawa

Tsukuba Primate Research Center, National Institutes of Biomedical Innovation Health and Nutrition

### Abstract

The cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*), which, like humans, belongs to the order Primates, is a long-lived laboratory animal. Cynomolgus monkeys have been used for testing of vaccines for official approval and infectious disease research for a long time and came to be used for various medical research studies. In aged cynomolgus monkeys that are also used for research on aging, senile plaques and neurofibrillary tangles were confirmed. Large-scale indoor breeding has been conducted in the Tsukuba Primate Research Center. However, the species may not propagate because of copulative failure or microbial infection. Therefore, use of reproductive technologies is expected. On the other hand, many animal species, including domestic animals, have been produced recently through genetic modification with a genome-editing technology. In cynomolgus monkeys, effective production of a disease model by applying the technology to the reproductive technologies is greatly expected. This review discusses reproductive technologies for production of cynomolgus monkeys.

**Keywords** : cynomolgus monkey, long-lived laboratory animal, indoor breeding, genetically modified animals, reproductive technology

【総説】

## 新規アルツハイマー病モデルマウス

### －加齢性感覚器障害とアルツハイマー病との関連－

津田 玲生

国立長寿医療研究センター、認知症先進医療開発センター

#### 要約

現在、我が国は4人に1人が65歳以上という超高齢社会に突入していることから、高齢者に頻発する認知症や加齢性感覚器障害が社会的な問題になってきている。国内の認知症患者は2050年には1400万人に達すると見られているが、このうちアルツハイマー病（AD）が占める割合は全体の約6割くらいだと云われている。一方、加齢性感覚器障害の代表的な疾患である老人性難聴は、75歳以上の有病率が7割近くになると見積られている。これら高齢者疾患に対する治療薬の開発は、多くの研究機関の努力にも関わらず、これまでのところ成功していない。ADや老人性難聴の発症には時間がかかり、疾患を定量的に判定できる創薬開発に資するモデルシステムが不足していることが要因の一つとして考えられる。筆者らは加齢性感覚器障害とADとの共通点に着目することにより、アミロイドβによる毒性効果を経時的かつ定量的に判定できる新規マウスモデルの確立に成功した。本総説ではモデルマウスを用いたAD研究を解説すると共に、新規ADモデルマウスを用いた治療薬開発の可能性について考えてみたい。

キーワード：Alzheimer's disease, Amyloid-beta, Tau, age-related hearing defect, transgenic mouse

#### 1. はじめに

アルツハイマー病（Alzheimer's disease: AD）は、神経細胞の変性に起因した脳の萎縮を特徴とし、老人斑（Senile Plaques）および神経原線維変化（NFTs）といった組織化学的な特徴を有する精神疾患として1906年にドイツの医師、アロイス・アルツハイマー博士により最初に報告された疾患である [1]。疾患患者の約90%が65歳以上になって発症する孤発性AD（Sporadic AD）であるが、65歳以前に発症する家族性AD（Familial AD: FAD）の症例も多く報告されている [2]。このFADの原因因子を解析する過程で、1990年代の前半にAPP, PSEN1/2といった主要な原因因子が次々にクローニングされている [3, 4]。この中で、APPは発症の中心的な役割を持つと予想され、世界中で作用メカニズ

ムの解析が進められている。APPの機能調節に関する詳細はここでは省略するが、重要な点はAPPが複数の酵素群により切断を受け、神経毒性効果を有するアミロイドβ（Aβ）が産生されてくることである（図1A）。APPの発見から20年以上が経過している現在までに、ヒトAPPをマウス脳神経で過剰発現する、ADモデルマウスが世界中で作製され、AD研究に用いられている。これらAPPを発現するモデルマウスは記憶・学習障害を判定できることから、これまでAD研究における中心的な役割を担ってきたが、創薬開発という観点から眺めた場合、問題点も多く含んでいる。AD治療薬開発のためには、ADに伴う神経機能低下を定量的に判定できるシステムの開発が必須であると思われる。これまで筆者らは、高齢者に特有な疾患である、ADと加齢性感覚器障害との共通性に着目し、聴覚器がAβの毒性を判定するのに有用な系を提供してくれる可能性を見いだしてきた [5]。本総説では創薬モデルとしてのADモデルマウスについて従来型のモデルの特徴を中心に述べ、筆者らが最近開発した「創薬開発に特化した新規ADモデルマウス」についても解説したい。

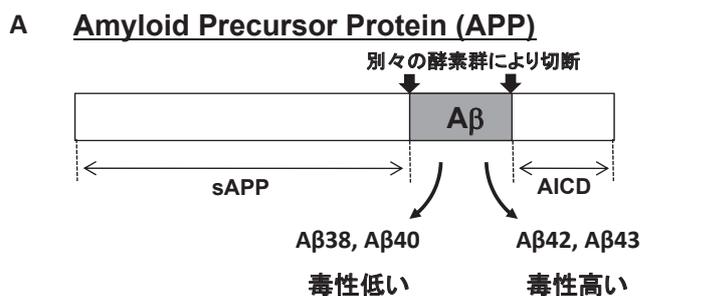
連絡先：津田玲生 〒474-8511

愛知県大府市森岡町7丁目430番地

TEL：0562-46-2311（内線7523）

FAX：0562-46-3157

E-mail：ltsuda@ncgg.go.jp



**B 代表的なAPPマウスおよび創薬開発から見た問題点**

**代表的なAPPマウス**

- ・ *Tg2576, APP23, PDAPP, J20* (過剰発現系)
- ・ *APP<sup>NL-F-KI</sup>* (ノックインマウス) “次世代型APPマウス”

**創薬開発から見たAPPマウスの問題点**

- ・発症に時間がかかる(～1年)
- ・表現型の測定に時間がかかる
- ・定量的な解析が困難
- ・個体差が大きい
- ・神経変性が見られない
- ・コストがかかる(～5万円/1匹)

図1 APPの構造および創薬開発から見たAPPマウスの問題点

- A. APPの構造および各種Aβの産生。sAPP=切断により生じる、分泌型のアミロイド前駆体タンパク質種。AICD=APPの細胞内ドメイン。
- B. 代表的なAPPマウスおよび創薬開発から見たAPPマウスの問題点

**2. アルツハイマー病の発症**

ADの発症にはアミロイドβ (Aβ) と呼ばれる40程のアミノ酸から構成されるペプチドが重要な役割を持つという、「アミロイド仮説」が提唱されている [6]。Aβは前駆蛋白質であるAPPから切断されてくることが知られているが、APPからAβの産生に関する詳細な分子機構に関しては日本人研究者の貢献度も多く、これに関しては総説等を参照していただきたい [7]。APPから産生されてくるAβは切断様式によりAβ38からAβ49まで幾つかの様式が発現していて、神経細胞の毒性についてはAβ42あるいはAβ43が強い神経毒性効果を示し、Aβ38やAβ40は比較的毒性が低いと考えられている (図1A) [8]。Aβペプチドの特徴としては自己凝集性が高くβシートを形成することにより5～10個から構成されるオリゴマーから、繊維状の界面活性剤に対する不溶性な凝集体を形成することが予想され、このAβペプチドの性質がADの神経毒性効果に反映していると考えられている [9]。発症に伴うAβ産生の特徴としては、発症前あるいは発症初期には毒性が低いAβ40が中心に発現していたのが、後期にはAβ42の発現レベルが上昇してくることが観察されており、Aβ42/Aβ40の比率上昇が発症と密接な関係にあることが示されている [10]。これまで述べてきたように、AβのC末端に関しては多様性が報告されているが、N末端は

比較的均一だと考えられていた。しかし、1995年に理研の西道らはAD患者において老人斑に存在するAβのサブタイプとしてN末端の2アミノ酸残基が切断され、最N末端になったグルタミン酸 (E) が環状化 (pE化) されたAβN3pEが存在していることを報告した [11]。AβN3pEはAβよりも毒性が高いと考えられ、最近ではAβによる神経変性誘導の主な作用因子として考えられている [12]。

APP, PSEN1/2と共にADの発症と密接に関係している因子として、Tau (ヒトMAPT) がある。Tauは微少管結合蛋白質として知られ、リン酸化されたフォームがADに伴うNFTの主要構成因子であることが示されている [13]。ADの発症におけるTauの役割に関しては多くの研究報告があるが、Tauの共通した特徴としては、Aβとの共存下でTauのリン酸化が亢進すると同時に神経毒性効果が増強されることが観察されている [14]。さらに、AD患者ではNFTの出現する場所と神経変性が生じる脳の領域との間に相関が見られることから、ADに伴う神経細胞死の誘導に関わっていると考えられている [15]。

ADのリスク因子としては、高齢 (あるいは加齢)、女性、遺伝的背景、教育歴、高血圧、糖尿病、喫煙、脂質異常等が知られ、このうち「加齢はADの最大のリスク因子」だと云われているが、加齢がADの発症にどの

ように関わっているのかは、あまり解っていない。通常の老化でも加齢に伴い認知機能の低下は観察されるが、ADでは認知機能の低下が急速に進行するのが特徴として挙げられる。正常老齢マウスを用いた研究から、Aβの産生自体にはあまり変化が見られないが、Aβの分解酵素であるネプリライシンの発現レベルが加齢に伴って減少することが報告されている [16]。この他、加齢とADの関係として注目されるのは、オートファジーとの関係である。オートファジーは神経細胞の機能調節でも重要な役割を持つと考えられ、ADの発症に伴うオートファジーの機能低下が観察されている [17]。ショウジョウバエを用いた研究から、加齢に伴ったオートファジー関連遺伝子の発現レベルの低下がAβによる神経毒性効果の発現に関わっている可能性が示唆されている [18]。

### 3. 従来のADモデルマウス—APPマウス

1995年GamesらはヒトAPPをPDGFβプロモーター下で発現させたトランスジェニックマウスに関する報告を行った [19]。その後、多く研究室で類似のトランスジェニックマウス (Tgマウス) が多数作製されて研究されている。これらは基本的にAPPを脳内で過剰発現していることから、“APPマウス”と呼ばれている (図1B)。このAPPマウスではAβの沈着による老人斑の形成や行動試験による記憶・学習障害も観察できることからADの発症メカニズムの解析に有用な系を提供できることが示される一方で、APPの過剰発現による影響が懸念されていた。そこで、2014年に斉藤らは“次世代型のAPPマウス”と呼ばれるTgマウスに関する研究を報告した (図1B) [20]。これはマウスAPP遺伝子座に“ヒト化”マウスAPPをノックイン (KI) で導入したもので、APPの発現レベルが定常レベルであることから、過剰発現による“異常な”状況が避けられる利点があると云われている [20]。

AD治療薬の開発を行う場合、臨床試験に移行する前にはAPPマウスに投与して、記憶・学習障害の改善を調べるのが一般的である。これまで述べてきたように、APPマウスはADの病態の少なくとも一部を反映していると考えられ、発症メカニズムの解明に寄与してきているが、創薬開発という観点からは、いくつか問題点が挙げられる (図1B)。まず、APPマウスの表現型である記憶・学習障害が見られるまでには1年近くの長い時間がかかることが、薬剤検定系としては適していない。さらに、この記憶・学習障害の判定にはモーリス水迷路試験やY迷路試験といった行動試験を伴うことも問題点として考えられる [21]。行動試験は長い測定時間を要すると同時に、マウスのコンディションや環境要因等の僅かな変化も結果に影響し、個体間のバラツキも大きいことから、薬効の定量的な判定が必要な創薬開発には適していない。2000年から2012までの間にADモデルマウスによる薬剤検定をクリアして臨床試験にまで辿り着いたAD治療薬候補は244種類あると云われているが、この中で認可された、いわゆる「勝ち組の薬剤」はたった1種類しかない (しかも、疾患の進行は抑制で

きない、「症候改善薬」と呼ばれる薬剤のみ)、という事実は「創薬開発に資するマウスモデルの欠如」ということと無関係ではないと思われる。さらに、APPマウスの問題点の一つとして、神経変性が観察できないことも挙げられる。APPマウスで神経変性が生じない要因の一つとしては、pE化Aβの産生量が少ないことが原因だと思われている。このことを支持するデータとしては、神経変性が見られないAPPマウスと神経変性が見られるAPP/PSEN1マウス (ヒトAPPとPSEN1を同時に脳で過剰発現させたマウス) を比較した場合、APPマウスではpE化Aβの産生量が極端に低いことが報告されている [22]。AβからpE化Aβが生じるまでにはヒトの場合10年近く時間がかかると云われているが、マウスの寿命は2~3年なので、APPマウスではpE化Aβ産生までの時間が足りないのではないかと考えられている。いずれにせよ、創薬開発に資するマウスモデルとしては、Aβによる神経毒性効果を短時間で定量的にモニターできる解析系の開発が求められている。

### 4. 加齢性感覚器障害とアルツハイマー病の発症との関係

筆者らは加齢性感覚器障害と認知症の共通性に注目することにより、創薬開発に資するマウスADモデルを作製した [5]。詳しいデータに関しては後述するが、ここでは認知症と加齢性感覚器障害との関係について考えてみたい。加齢性感覚器障害とは嗅覚、視覚、聴覚等の感覚が加齢に伴って機能低下することで、多くの高齢者が罹患していると考えられている。以下のように、最近の調査で加齢性感覚器障害と認知症の発症との間には相関関係があることが解ってきている。匂いの認知低下は、認知症になって現れる最初の症状の一つだと云われていたが、調査の結果、嗅覚障害はADやパーキンソン病等の加齢性神経変性疾患の初期段階で現れることが確認されている [23, 24]。視覚異常に関しても、AD疾患との相関性が示唆されている。加齢性の聴覚異常症である加齢性黄斑変性症 (AMD) の発症とADの発症との間には正の相関があることが報告されている [25]。聴覚と認知症との関係に関しては、米国での39~90歳の男女693人を対象とした18年間における難聴と認知症に関する追跡調査の結果、軽度の難聴のあるヒトで2倍程度、中程度の場合は3倍、高度の場合は5倍近い率で認知症に罹患していることが示されている [26]。この調査では、60歳以上の被験者の場合、認知症リスクの36%超えが難聴と関連し、聴力が10デシベル低下するごとに、認知症リスクが1.27倍上昇することが示されている。さらに、最近の報告から、難聴とAD発症との間に明確な関連性があることが確認されている [27]。興味深いことに加齢に伴った難聴の発症には騒音暴露の他に、高齢 (加齢)、高血圧、喫煙、糖尿病、脂質異常といったAD場合と共通したリスク因子が挙げられている [28]。このように、分子メカニズムはまだ明らかになってはいないが、ADの発症と加齢性感覚器障害の発症との間には密接な関係があることが示唆されている。

## 5. 創薬開発に資する新規 AD モデルマウスの確立

感覚細胞と神経細胞は進化の過程で分岐したものと考えられ、両者に共通した調節機構が多く存在していることが解っている [29]。実際、内耳有毛細胞と神経細胞には機能や構造に関して多くの共通する部分が見られる (図 2)。内耳有毛細胞は axon を有してはいないものの、音による刺激を電気信号に変換すると特徴を有し、その信号はシナプス結合を介して聴神経に伝えられている [30]。有毛細胞-聴神経系で働いている分子についても、NMDA 受容体や AMPA 受容体、あるいは各種イオンチャネルに至るまで類似した分子が働くなど、共通した部分が多く見られる。これらの事実を踏まえ、筆者らは聴覚細胞に AB を発現させることにより、神経細胞と同じように加齢に伴って聴覚細胞の機能が低下するのではないかと考えた [5]。そこで、感覚細胞で機能する *Math1* の minimal enhancer (*Math1<sup>E</sup>*) 制御下で FAD 変異である Arctic 変異 (E22G) を有する Aβ42

(Aβ42<sup>Arc</sup>) を分泌シグナル (rat pre-proenkephalin シグナルペプチド) につないだものを発現する Tg マウス (*Math1<sup>E</sup>>Aβ42<sup>Arc</sup>*) を作製した (図 3 A)。生化学的な解析の結果、この Tg マウスの内耳では非常に低いレベルで AB が発現していることが確かめられた [5]。さらに、免疫電子顕微鏡法により局在を調べた結果、AB が聴覚細胞である有毛細胞の細胞膜上にクラスターで存在することが確認できた。そこで、この Tg マウスに関して聴性脳幹反応 (auditory brainstem response: ABR) と呼ばれる電気生理学的な解析手法を用いて聴力を測定した。その結果、non-Tg と比較した場合、この Tg マウスは 8kHz や 16kHz という音域の刺激に関しては異常を示さないのに対して、それより高い 32kHz という超高音域の刺激に対しては、生後 4 ヶ月以降で有意に閾値が上昇する (つまり聴力が低下する) ことが確かめられた (図 3 B, C)。

ここで音の受容に関して、簡単に説明したい。蝸牛内で音を受容する有毛細胞は、音の入り口付近 (basal 側) から頭頂部 (apical 側) にかけて、基底膜 (basement membrane) という構造の上に規則正しく並んでいる。音の刺激によりまず基底膜が共振する結果、その上の有毛細胞が活性化されるしくみになっている。基底膜は basal 側から apical 側にかけて太さや堅さが徐々に変化していることから、共振する基底膜の場所が周波数により異なっている結果、周波数に対応して異なる有毛細胞が活性化される。つまり、高音域の刺激では basal 側にある有毛細胞が活性化し、それより低音域になるにつれ、より apical 側の有毛細胞が活性化するしくみになっている。高音域を担当する有毛細胞は、加齢に伴って機

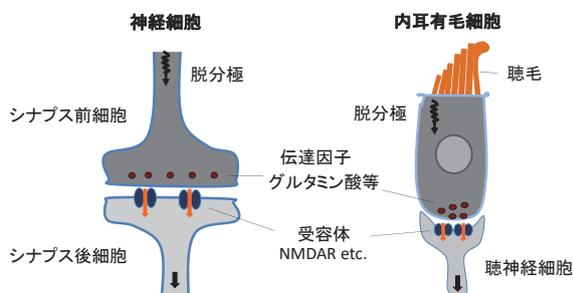


図 2 神経細胞と内耳有毛細胞との共通点

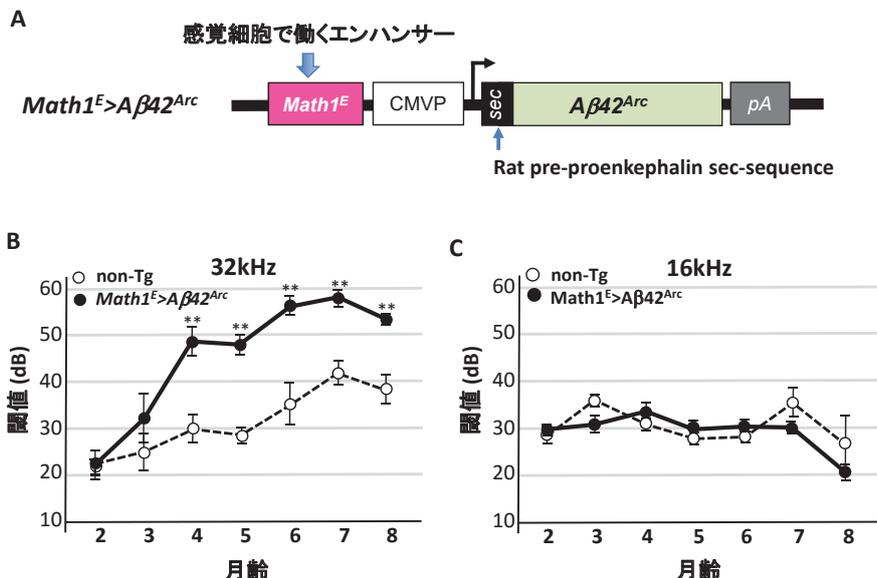


図 3 新規 AD モデルマウスの表現型

A. 家族性 AD 変異 (E22G; Arc) を有する Aβ42 の内耳有毛細胞での発現系。Math1<sup>E</sup>=Math1 minimal enhancer, sec= rat pre-proenkephalin secretion signal.

B. 生後 2 ヶ月から 8 ヶ月までの ABR の閾値変化 (32kHz)。コントロール (non-Tg) と比較して、Tg (*Math1<sup>E</sup>>Aβ42<sup>Arc</sup>*) では生後 4 ヶ月で有意に閾値が上昇した。\*\*=p<0.01

C. 生後 2 ヶ月から 8 ヶ月までの ABR の閾値変化 (16kHz)。コントロールと Tg で差は見られなかった。

※文献 (5)、図 4 を改変。

能低下するばかりではなく、変性して脱落し易いことが解っている。そこで、有毛細胞を染色できる蛍光標識 falloidin で蝸牛を観察したところ、Tg マウスでは生後 6 ヶ月齢で高音域を受容する有毛細胞、つまり basal 側の有毛細胞が変性を起こしていることが確認できた[5]。ただし、聴力低下は生後 4 ヶ月から見られることから、Tg マウスでは有毛細胞の機能低下が先に生じ、これに続いて変性が起こると思われる。

この新規システムは AD の病態をどれくらい反映しているかに関しては未知の部分もまだ多いが、そのことを確かめるため Tau との相互作用を調べることにした。前に述べたように、Tau は Aβ と並んで AD の発症に重要な機能を持つと考えられ、Aβ との共発現により神経細胞に対する毒性が増強されることが解っている。そこで、ヒト Tau (2N4R) を内耳有毛細胞で発現する Tg マウス ( $Math1^E>Tau$ ) を作製し、聴力を測定した。その結果、Tau 単独では聴力の低下は生じないが、Tau と Aβ<sup>Arc</sup> を同時に発現できるダブル Tg マウス ( $Math1^E>Tau+Aβ42^{Arc}$ ) では、32kHz の刺激に対して生後 2 ヶ月で有意に閾値が上昇することが観察された (図 4 A, B, C)。さらに驚くべき事に、8kHz という低音域刺激に対しても 2 ヶ月齢で既に聴力低下が確認された (図 4 D)。以上のように、神経細胞と同様に内耳有毛細胞でも Aβ42 と Tau が同時に発現することにより著しく機能阻害が引き起こされることが確かめられたことから、本システムは AD の発症メカニズムの少なくとも

一部は反映している可能性が示唆される [5]。

この新規モデルマウスの特徴である、加齢に伴って超高音域 (32kHz <) の音の受容が阻害されるという表現型について、もう少し詳しく考えてみたい。マウスにおける 32kHz の超高音域刺激はヒトでは 17kHz 程度の高さの刺激に相当し、モスキートサウンドと呼ばれている。モスキートサウンドに対する音の受容は加齢に伴って著しく低下し、20 代後半では殆ど聞こえなくなると云われている。先程、述べたように AD の最大のリスク因子が加齢であることを踏まえると、新規マウスモデルにおける超高音域受容の障害は、AD の発症と何らかの相関を有することが予想される。一方、マウス難聴モデルを用いた研究から、加齢に伴って高音域刺激に対する受容が低下するメカニズムとして、内耳有毛細胞におけるシナプスの数や機能が加齢に伴い減少するというモデルが提唱されている [31]。Aβ によるシナプス機能の低下は、AD の発症においても重要な役割を持つと云われていることから、新規マウスモデルにおけるシナプスの機能低下を予想している。

## 6. 新規 AD モデルマウスを用いたアルツハイマー病治療薬の開発研究

APP マウスと比較した新規マウスモデルの特徴としては、内耳有毛細胞の機能を直接モニターしていることから、行動試験のような環境要因等の影響が極力抑えられることである。また、聴覚測定では定量的な解析が可

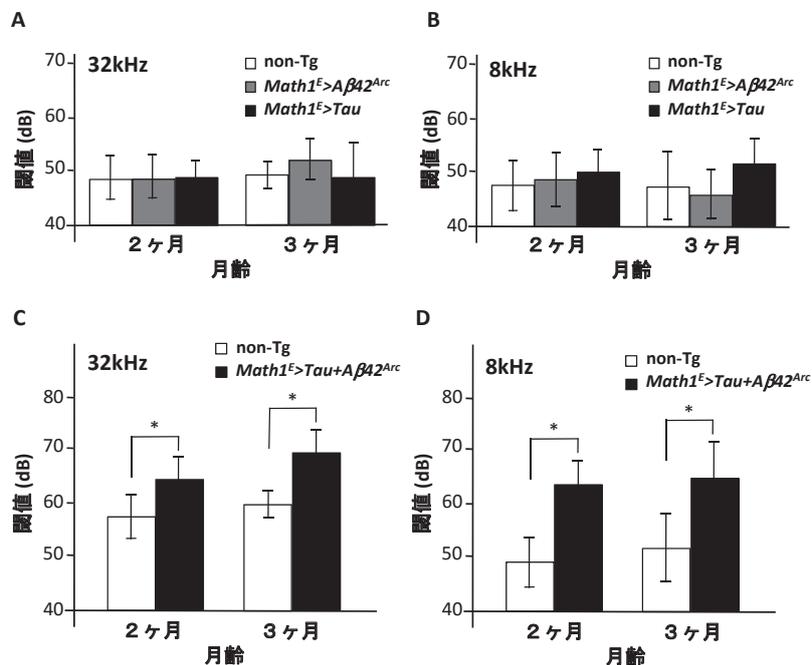


図4 内耳有毛細胞の機能低下における Aβ と Tau との相乗効果

A., B. 内耳有毛細胞に Aβ42<sup>Arc</sup> あるいは Tau を発現させ、32kHz (A) あるいは 8kHz (B) の刺激に対する閾値を確定した。コントロール (non-Tg) と比較して Aβ42<sup>Arc</sup> あるいは Tau の発現により、生後 2 ヶ月および 3 ヶ月の ABR の閾値に変化は無かった。

C., D. 内耳有毛細胞に Aβ42<sup>Arc</sup> と Tau を同時に発現させ ( $Math1^E>Tau+Aβ42^{Arc}$ )、32kHz (C) あるいは 8kHz (D) の刺激に対する閾値を確定した。コントロールと比較して生後 2 ヶ月および 3 ヶ月の ABR の閾値が著しく上昇 (聴覚が低下) した。\* = p < 0.05

※文献 (5)、図 6 を改変。

能なので、Aβによる毒性効果を経時的かつ定量的にモニターできることも利点の一つだと思われ、薬剤検定系として有用であることが期待されている。現在筆者らは、この新規マウスモデルを用いて、AD治療薬の検定を開始している。具体的に筆者らが実際に行っている薬剤検定を紹介したい。新規マウスモデルにおける聴覚異常は生後4ヶ月で生じることから、生後2ヶ月齢から薬剤投与を開始し、2ヶ月後（生後4ヶ月齢）の聴力をABRにより測定している。溶媒だけを投与した群と薬剤投与群との聴力の低下（閾値の上昇）を比較することにより、薬効が判定できると思われる。この新規モデルマウスの問題点としては、当然のことながらADの最大の特徴である記憶・学習障害に関しては判定することができないことである。この点に関しては、APPマウスと併用することにより解決できると考えている。ある薬剤の効果を判定する場合、新規ADモデルマウスを用いて短い時間で定量的な検定を行い、最終的にAPPマウスを用いて記憶・学習障害に対する効果を判定すれば、確実に薬効を有するAD治療薬に行き着く事ができると考えている。

## 7. おわりに

以上のように、ADを研究するためのマウスモデルが多く作製されている。今回は紹介できなかったが、マウスだけではなく、ゼブラフィッシュ、線虫、ショウジョウバエといったモデル動物でもADの解析モデルが確立され、発症メカニズム解析から治療薬の開発研究までが行われている。今後は、これらのモデルとマウスモデルを組み合わせるにより、遅れているAD治療薬の開発が少しでも前に進んでいくことを願っている。

## 引用文献

1. Terry RD, and Davies P. Dementia of the Alzheimer type. *Ann Rev Neurosci* 3: 77-95, 1980.
2. Cacace R, Sleegers K, Van Broeckhoven C. Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. *Alzheimer's & Dementia* 12: 733-748, 2016.
3. Hardy J, and Allsop D. Amyloid deposition as the central event on the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 12: 383-388, 1991.
4. Kovacs DM, Fausett HJ, Page KJ, *et al.* Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells. *Nat Med*, 2, 224-229, 1996.
5. Omata Y, Tharasegaran S, Lim YM. Expression of amyloid-β in mouse cochlear hair cells causes an early-onset auditory defect in high-frequency sound perception. *Aging* 8: 427-439, 2016.
6. Hardy JA, and Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256: 184-185, 1992.
7. De Strooper B, Iwatsubo T, Wolfe MS. Presenilins and γ-secretase: structure, function, and role in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2: a006304, 2012.
8. Matsumura N, Takami M, Okochi M, *et al.* γ-Secretase associated with lipid rafts: multiple interactive pathways in the stepwise processing of β-carboxyl-terminal fragment. *J Biol Chem* 289: 5109-5121, 2014.
9. Haass C, and Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 101-112, 1992.
10. Kumar-Singh A, Theuns J, Van Broeck B, *et al.* Mean age-of-onset of familial Alzheimer disease caused by presenilin mutations correlates with both increased Aβ42 and decreased Aβ40. *Hum Mutat* 27: 686-695, 2006.
11. Saido TC, Iwatsubo T, Mann DM, *et al.* Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, Aβeta N3 (pE), in senile plaques. *Neuron* 14: 457-466, 1995.
12. Breyhan H, Wirths O, Duan K, *et al.* APP/PS1KI bigenic mice develop early synaptic deficits and hippocampus atrophy. *Acta Neuropathol* 117: 677-685, 2009.
13. Kondo J, Honda T, Mori H, *et al.* The carboxyl third of tau is tightly bound to paired helical filaments. *Neuron*, 1: 827-834, 1988.
14. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82: 239-259, 1991.
15. Busciglio J, Lorenzo A, Yeh J, *et al.* Beta-amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron* 14: 879-888, 1995.
16. Iwata N, Takai Y, Fukami S, *et al.* Region-specific reduction of Aβeta-degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse hippocampus upon aging. *J Neurosci Res* 70: 493-500, 2002.
17. Pickford F, Masliah E, Britschgi M, *et al.* The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice. *J Clin Invest* 118: 2190-2199, 2008.
18. Omata Y, Lim YM, Akao Y, *et al.* Age-induced reduction of autophagy-related gene expression is associated with onset of Alzheimer's disease. *Am J Neurodegener Dis* 3: 134-142, 2014.
19. Games D, Adams D, Alessandrini R, *et al.* Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F β-amyloid precursor protein. *Nature* 373: 523-527, 1995.
20. Saito T, Matsuba Y, Mihira N, *et al.* Single APP

- knock-in mouse models of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 17: 661–663, 2014.
21. Webster SJ, Bachstetter AD, Nelson PT, *et al.* Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Front Genet* 5: 88, 2014.
  22. Wu G, Miler RA, Connolly B, *et al.* Pyroglutamate-modified amyloid- $\beta$  protein demonstrates similar properties in an Alzheimer's disease familial mutant knock-in mouse and Alzheimer's disease brain. *Neurodegener Dis* 14: 53–66, 2014.
  23. Wilson RS, Schneider JA, Aenold SE, *et al.* Olfactory identification and incidence of mild cognitive impairment in older age. *Arch Gen Psychiatry* 64: 802–808, 2007.
  24. Baba T, Kikuchi A, Hirayama K, *et al.* Severe olfactory dysfunction is a prodromal symptom of dementia associated with Parkinson's disease: a 3 year longitudinal study. *Brain* 135: 161–169, 2012.
  25. Sivak JM. The aging eye: common degenerative mechanisms between the Alzheimer's brain and retinal disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54: 871–880, 2013.
  26. Lin FR, Metter EJ, O'Brien RJ, *et al.* Hearing loss and incident dementia. *Arch Neurol* 68: 214–220, 2011.
  27. Zheng Y, Fan S, Liao W, Fang W, Xiao S, Liu J. Hearing impairment and risk of Alzheimer's disease: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Neurol Sci* 38: 233–239, 2017.
  28. Yamasoba T, Lin FR, Someya S, *et al.* Current concepts in age-related hearing loss: epidemiology and mechanistic pathways. *Hear Res* 303: 30–38, 2013.
  29. Travis M, and Paukin MG. Predation and the origin of neurones. *Brain Behav Evol* 84: 246–261, 2014.
  30. Fettiplace R, Hackney CM. The sensory and motor roles of auditory hair cells. *Nat Rev Neurosci* 7: 19–29, 2006.
  31. Sergeyenko Y, Lall K, Liberman MC, *et al.* Age-related cochlear synaptopathy: an early-onset contributor to auditory functional decline. *J Neurosci* 33: 13686–13694, 2013.

略語

- AD : Alzheimer's disease  
 FAD : familial Alzheimer's disease  
 APP : Amyloid precursor protein  
 PSEN1/2 : presenilin 1 and presenilin 2  
 A $\beta$  : Amyloid-beta  
 pE : pyroglutamate  
 NFTs : neurofibrillary tangles  
 MAPT : microtubule associated protein tau  
 PDGF $\beta$  : platelet-derived growth factor beta  
 AMD : age-related macular degeneration  
 NMDA : N-methyl-D-aspartate  
 AMPA : DL- $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-pro-  
 pionic acid  
 ABR : auditory brainstem response

## Establishment of new mouse model for the study of Alzheimer's disease

Leo Tsuda

National Center for Geriatrics and Gerontology, Center for Development of Advanced Medicine  
 for Dementia

### Abstract

Growing numbers of evidence have shown that the defect of sensory system is highly correlated with the age-related neurodegenerative diseases including Alzheimer's disease (AD). Those raise the possibility that the sensory cells contain some commonalities with neuron, and provide a tool to access AD. The sensory system, especially auditory system, has advantages that can easily measure their dysfunction over time by electrophysiological way. To establish a new mouse AD model that takes benefits of auditory system, we

produced transgenic mouse, which express amyloid-beta ( $A\beta$ ), a causative element for AD, in mouse auditory hair cells. Electrophysiological assessment indicated that those mice showed hearing impairment specifically against high frequency sounds stimulation ( $>32$  kHz) at 4 month from birth. Furthermore, hair cells loss at the basal region of the cochlear seem to be involved in the hearing defect against high frequency sound stimulation, those of which are easily hampered with age. Interestingly, over expression of MAPT (human Tau), which is another player for AD formation, synergistically enhanced  $A\beta$ -inducing hearing defects. These results suggest that our new system might reflect, if not all, some aspect of AD progression, and compensate for the traditional AD mouse model to monitor the effect (s) of  $A\beta$ -induced neuronal dysfunction.

**Keywords :** Alzheimer's disease, Amyloid-beta, Tau, age-related hearing defect, transgenic mouse

【総説】

## 細胞老化研究の新展開 – 老化細胞は新たな創薬標的となるか –

三河 隆太<sup>1</sup>、杉本 昌隆<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>国立長寿医療研究センター研究所 老化機構研究部 免疫研究室

<sup>2</sup>名古屋大学大学院医学研究科 老化基礎科学

### 要約

哺乳動物細胞の分裂回数が有限であることを示す“Hayflick limit”が発見されてから半世紀以上たった今、細胞老化研究に再び大きなブレイクスルーが得られようとしている。哺乳動物において、細胞老化は癌に対する防御機構として極めて重要な役割を持つことが古くから知られていた。一方、細胞老化が個体の老化に関与するのかわについては不明であった。しかしながら近年のSASP (senescence-associated secretory phenotype) の発見から、細胞老化研究は大きく発展し、老化研究の分野でその重要性が改めて認識された。本稿では、最近発表された細胞老化除去マウスから得られた知見をもとに、組織機能の加齢性変化や疾患に細胞老化が及ぼす影響について概説し、さらに細胞老化を標的とした創薬の可能性について紹介する。

キーワード：Senescence, Aging, Mouse model, Senolytic drug

### 1. はじめに

哺乳動物の正常体細胞を試験管内で培養すると、ある程度の分裂を繰り返した後、やがて恒久的な増殖停止状態に陥る。この現象は「細胞老化 (cellular senescence または replicative senescence という)」と呼ばれ、50年以上も前に Hayflick らによって発見された [1]。細胞老化の生理的な役割については長い間不明であったが、1990年代の分子遺伝学・分子生物学の爆発的な発展により、細胞老化には p53 や pRB をはじめとした複数の重要な癌抑制タンパク質が重要な役割を持ち、生体内で細胞老化が極めて重要な癌抑制機構として機能することが明らかになった [2]。

一方、細胞老化を起こした細胞 (本稿では老化細胞と呼ぶ) は、加齢とともに様々な組織中で観察されることが20年以上も前に報告されていたが [3]、組織の加齢性変化 (aging) との関与については懐疑的であった。当時、細胞老化は細胞周期チェックポイント機構の活性化により増殖を停止しただけの細胞と捉えられており、老齢個体の組織中に観察される老化細胞の割合は低い

め (2% 程度)、周辺の大多数の細胞は正常な機能を保持し、組織機能にはさほど影響はないと考えられた。しかしながら、老化細胞からは炎症性サイトカインやマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) を含む様々な生理活性物質が分泌され、周辺の正常細胞の機能に影響を与えることが近年見出された [4]。このような老化細胞特異的な分泌表現型は SASP (senescence-associated secretory phenotype) と名付けられ、SASP を介した細胞非自律的な老化細胞の機能が、加齢に伴う生体機能の変化や加齢性疾患の発症に関与すると現在では考えられている [5]。

### 2. 細胞老化の制御機構

細胞老化が起きるまでの期間 (分裂寿命) は細胞種によって異なり、さら同じ細胞であっても DNA ダメージや癌遺伝子の導入など、細胞にとってストレスとなる要素が多い時には分裂寿命は短くなる。したがって、分裂寿命は細胞固有のストレスに対する寛容性 (tolerance) により規定されるものと考えられる。

細胞老化を引き起こすストレスシグナルは、最終的に pRB、p53 の2つの癌抑制タンパク質へと伝達される。そしてこれらの癌抑制タンパク質へとストレスシグナルを伝達する中継点となるのが *CDKN2A* 遺伝子座である (図1)。*CDKN2A* 遺伝子座には異なる2つの癌抑制タンパク質 p16<sup>INK4a</sup>、p19<sup>ARF</sup> (ヒトでは p14<sup>ARF</sup>) が重複してコードされている (INK4: inhibitor of CDK4/6, ARF:

連絡先：杉本昌隆 〒474-8511

愛知県大府市盛岡町 7-430

TEL：0562-46-2311 (代表)

FAX：0562-44-6591

E-mail：msugimot@ncgg.go.jp

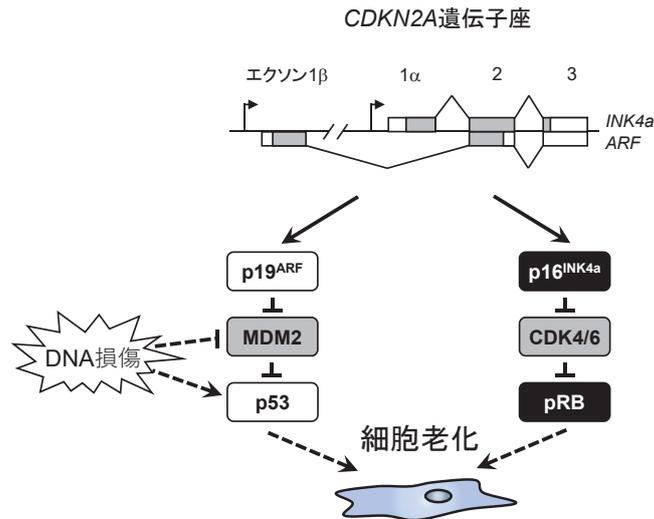


図1. 細胞老化の制御機構

alternative reading frame)。両者はそれぞれ独自の第1エクソンから転写されるが、共通した第2、第3エクソンへとスプライスされる。しかしながら共通部分では翻訳の際に読み枠がずれるため、アミノ酸配列に相同性は見られない。p16<sup>INK4a</sup>、p19<sup>ARF</sup>はそれぞれpRBとp53の活性を負に調節するCDK4/6、Mdm2タンパク質に直接結合してそれらの働きを阻害することで、間接的にpRBとp53を活性化し、細胞周期の進行を止める [6]。ヒトにおいてARFタンパク質は細胞老化時に発現が変化しないことから、ヒト細胞の細胞老化には直接関与しないと考えられている [7]。しかしARFノックアウト (KO) マウスの細胞は分裂寿命を持たず、生後半年以内にはほぼ100%癌を発症するのに対し [8]、*INK4a* KOマウスは癌や細胞老化に関しては軽度な表現型しか示さないことなどから [9, 10]、マウスの細胞分裂寿命の制御においてはARF-p53経路の方がINK4a-RB経路よりも重要な役割を持っていると考えられる。生体組織においても、*CDKN2A* 遺伝子の発現は加齢に伴って上昇し、老化細胞の蓄積を反映するバイオマーカーとなる [11, 12]。しかし*CDKN2A* 遺伝子座の発現制御機構は複雑であり、大規模なクロマチン構造の変化を伴うと考えられているが、その全貌については明らかにはなっていない [13]。一方SASPに関しては、上記の*CDKN2A* 遺伝子による細胞周期制御機構とは別に、恒常的なDNAダメージシグナルによる転写因子NF-κBの活性化を介する [14]。

### 3. 老化細胞除去マウス

細胞老化が個体老化に関わる可能性については昔から議論されてきた。早期老化症患者由来の細胞は、健康人のものと比べて分裂寿命が著しく短く [15]、またp53の活性が恒常的に高いマウスでは、幹細胞の細胞老化とともに様々な老化様表現型が観察される [16]。さらに近年のSASPの発見は、細胞老化と組織老化の関連を強く示唆するものとなった。では、細胞老化が少なくと

も部分的に組織老化の原因になり得るとして、逆に老齢個体の組織から老化細胞を選択的に排除することにより組織機能を回復させること、つまり‘若返り’は可能であろうか？この問いに答えるべく、我々のグループを含め最近3つの老化細胞除去トランスジェニック (Tg) マウスが発表された。以下に、これらマウスの特性と、得られた知見について紹介する。

#### 1) INK-ATTAC (apoptosis through targeted activation of caspase) マウス

生体から老化細胞を除去可能なマウスとして最初に報告されたのが、Mayo Clinicのvan Deursenのグループが作製したINK-ATTACマウスである。このTgマウスは、外来遺伝子として*INK4a*のプロモーター制御下でFKBP-Caspase8融合タンパク質とGFPを発現する (図2)。したがって外来遺伝子が発現した老化細胞では、FK506アナログの投与によりCaspase8が活性化され、選択的にアポトーシスが誘導される。

紡錘体チェックポイント因子BubR1の機能低下型変異マウスでは、染色体の不安定化により細胞老化の亢進と様々な老化症状が早期から観察されることが以前に同じグループから報告されていたが [17]、INK-ATTACのシステムを使用して老化細胞を選択的に排除すると、BubR1機能低下型変異マウスで見られた老化様の症状が緩和・遅延されることが示された [18]。当然のことながらこの論文が出た時には、これらBubR1機能低下型変異マウスで観察される老化様の表現型が、本当に老化を反映したものであるのかについては議論があった。しかし2016年にvan Deursenらは、マウスが自然に老化 (遺伝子の改変で誘導されるものではなく) したときに見られる症状のうち少なくとも白内障、心肥大、腎糸球体硬化などは、INK-ATTACにより老化細胞を排除することにより緩和もしくは発症が遅延されることを報告した [19]。それぞれの組織の加齢性変化に細胞老化がどのような機構を介して関与するのかについては、今

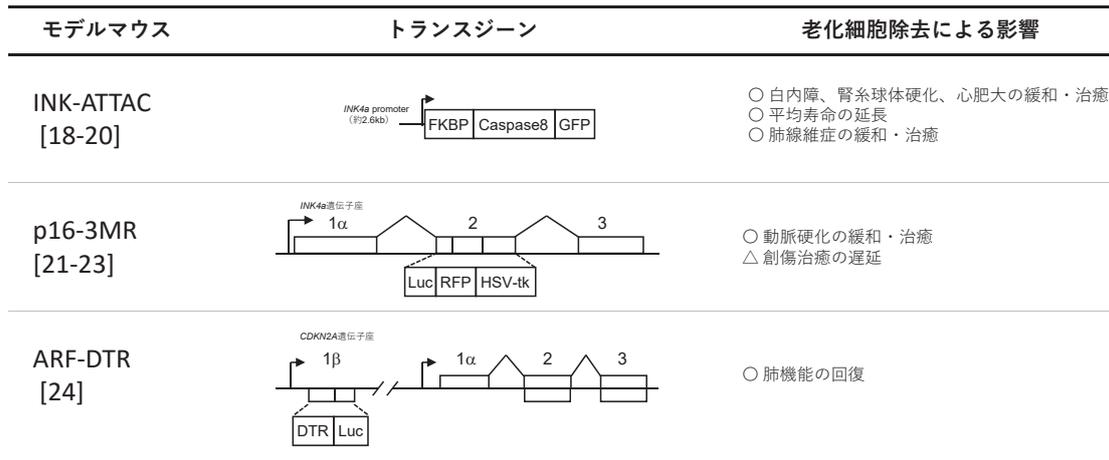


図2. 老化細胞除去マウス

後のさらなる解析で明らかにされるものと期待されるが、この論文ではさらに驚くべきことに、老化細胞を排除することによりマウスの平均寿命が延長可能であることが記述されている（C57BL/6-129Sv-FVB ミックス系統を用いた解析では最大寿命も延長されることが示されている）。

また2017年には、Mayo Clinicの別のグループがINK-ATTACマウスを用い、プレオマイシン投与による特発性肺線維症（IPF）モデルにおいて、老化細胞を排除することにより疾患を緩和することが可能であることを報告した[20]。細胞老化マーカーの発現はヒトIPF患者の病変部位で増加するが、因果関係については不明であった。IPFモデルであるプレオマイシン誘導性のマウス肺線維症において細胞老化は亢進し、様々なSASP因子の発現も増加する。このIPFモデルにおいては、老化細胞の排除を行うことにより、疾患を食い止めることが可能であることが示されている。このことから少なくともIPFの治療においては老化細胞が有効な標的となることが期待され、実際に論文では後述するsenolytic薬の有効性について検証を行っている。

これまでにINK-ATTACマウスからは多くの知見が得られている。しかし、INK-ATTACマウスでは外来遺伝子を発現するために使用したのは、わずか2.6kbのINK4aプロモーター領域であり（図2）、前述したようにCDKN2A遺伝子の発現はクロマチンレベルの大規模な構造変化を伴うと考えられているため、このマウスで本当に老化細胞だけの排除の影響を見ているのかについては慎重に調べる必要があるであろう。また、実験で使用するC57BL/6マウスは半数以上が癌を発症するが[21]、老化細胞除去マウスでは老化細胞と同時に癌細胞も生体から排除されることが期待されるため、寿命への影響の評価については注意して解釈する必要がある。

## 2) p16-3MRマウス

2014年にBuck研究所のCampisiらのグループは、INK4遺伝子座にルシフェラーゼ、RFPおよびHSV-TK

（ヘルペス単純ウイルスチミジンキナーゼ）を挿入した人工染色体を外来遺伝子として保持するTgマウスを発表した[22]。このマウスはINK-ATTACマウスと異なり、外来遺伝子発現のためにINK4a遺伝子座を完全に含む人工染色体を使用している（図2）。したがって内在性の遺伝子座に近い形で、外来遺伝子の発現制御が行われることが期待できる。p16-3MRマウスでは、老化細胞がHSV-TKの発現により、ガンシクロビル（GCV）に対して感受性を示すようになる。GCVはHSV-TKによりリン酸化されるとDNA合成を阻害する。老化細胞は細胞周期から逸脱しており、ゲノムDNAの複製を行っていないため効果がないのではとも考えられるが、論文で著者らは、GCVがゲノムDNAに複製とは独立して行われるミトコンドリアの複製を阻害することにより、老化細胞特異的な毒性を示すと主張している。

Campisiらはこのマウスを用いた最初の報告において、皮膚創傷治癒過程における細胞老化の役割に関する解析を行った[22]。皮膚損傷部位では筋線維芽細胞と呼ばれる収縮性の細胞の働きにより、傷口が閉じる。損傷部位では細胞老化が誘導されるが、p16-3MRマウスで老化細胞を排除すると創傷治癒が遅延することが示されている。したがって老化細胞は創傷治癒過程においては、傷口を効率よく修復するという生体にとって有益な機能を持つことになる。論文ではその機構として、老化細胞の細胞自律的な機能（細胞老化誘導による創傷部位の線維化の抑制）、および細胞非自律的な機能（老化細胞から分泌される血小板由来成長因子AAによる筋線維芽細胞の分化誘導）の両方が貢献していることが示唆されている。

2016年には、van DeursenとCampisiのグループの共同研究により、p16-3MRマウスとINK-ATTACマウスを用いて、アテローム性動脈硬化の発症・進行に細胞老化が関与することが報告された[23]。病変部位の肥厚（プラーク）には細胞老化マーカーの発現が認められるが、この報告では病変部位の老化細胞から分泌されたMMP-12/13（老化細胞からは複数のMMPが分泌され

るが [24]、動脈硬化病変部位では特に MMP-12/13 の発現が高い) が、プラークの不安定化 (破裂しやすくなる) を促進し得ることが示され、老化細胞が動脈硬化においても有効な治療標的となり得ることが強く示唆されている。またこの論文においても、後述の senolytic 薬を用いた検証が実際に行われている。

さらに 2017 年に Campisi のグループは、p16-3MR を用いた研究により癌の化学療法によって生じる細胞老化が予後に影響を大きく与える可能性について報告した [25]。抗癌剤などの細胞障害性薬剤は、細胞老化をしばしば誘導することが知られている [26]。Campisi らは論文中において、老化細胞を排除すると抗癌剤によって低下した身体機能・生理機能が回復すること、さらに癌の再発・転移が抑制されることを記述している。これらの知見から、抗癌剤治療と同時に老化細胞を抑制するような処置を行うことにより、抗癌剤の副作用を低減可能であることが期待できる。

### 3) ARF-DTR マウス

上記の老化細胞除去マウスとは別に、筆者の研究グループは独自に老化細胞除去 Tg マウスを樹立した [27]。このマウス (ARF-DTR マウス) は、p16-3MR マウスよりも広範囲の *CDKN2A* 遺伝子座を完全に含む人工染色体をトランスジーンとして保持し、トランスジーン中の *ARF* 遺伝子の第一エクソンをジフテリア毒素受容体 (DTR) 遺伝子とルシフェラーゼ遺伝子の発現ユニットに置換してあるため、外来遺伝子の発現は *ARF* 遺伝子の発現に依存する (図 2)。マウスの細胞はヒト細胞と異なりジフテリア毒素 (DT) に耐性を持つが、DTR を発現させることにより、ヒト細胞同様に DT に感受性を持たせることが可能である。受容体を介して細胞内に侵入した DT は、ペプチド鎖伸長因子を ADP リボシル化することによりタンパク質の合成を阻害し、その結果細胞死が誘導される。このシステム (TRECK: toxin receptor-mediated cell knockout) は、マウスで特定の細胞を排除するために多くのマウスモデルで使われている [28, 29]。ARF-DTR マウスでは、老化細胞が DT に対して感受性を持つようになるため、DT を投与することにより生体内から老化細胞を特異的に排除可能であることが期待される。

ARF-DTR マウスにおいてルシフェラーゼ発光シグナルは、加齢に従って肺や脂肪組織で老化細胞の蓄積を反映して顕著に増加する [27]。老齢 ARF-DTR マウスに DT を投与すると、肺組織では速やかにルシフェラーゼ発光シグナルと内在性の細胞老化マーカーの発現低下が見られたことから、ARF-DTR マウスでは肺組織から老化細胞は排除可能であることが確認された。ヒトやマウスの肺組織は、加齢に伴って弾性線維の減少とともに顕著な組織弾性の低下 (コンプライアンスの増加) が見られる [30, 31]。しかしながら ARF-DTR マウスにおいて、老化細胞を肺組織から排除すると、弾性線維の回復ともに組織全体の弾性も顕著な回復が認められ、肺組織の加齢性変化には細胞老化が深く関与していることが強く示

唆された。また興味深いことに、肺組織の遺伝子発現を網羅的に解析したところ、加齢に伴って見られる遺伝子発現の変化の半分以上が老化細胞依存的事であることが明らかになった。肺組織中の老化細胞の数は非常に少ないことから、老化細胞はおそらく SASP を介して細胞非自律的に組織中の正常 (細胞老化を起していない) 細胞の遺伝子発現に大きく影響を与えると考えられる。

老化細胞の細胞非自律的な機能が、組織の加齢性変化に関与するというのは、おそらく他の組織でも同様であると推測される。しかしながら、ARF-DTR マウスではすべての臓器で内在性 *ARF* の発現を外来遺伝子が模倣できていないため、このマウスを利用して解析できる組織は限られている。このシステムをさらに活用するためには、他の臓器でも老化細胞の検出と排除が可能な ARF-DTR Tg マウスラインを選定する必要がある。

### 4. 老化細胞を標的とした創薬の可能性

上述の Tg マウスから得られた知見は、多くの場合 (創傷治癒の例もあるので、すべてではない) において生体から老化細胞を排除することが有益であることを示唆している。細胞老化自体は生体にとって潜在的に危険な細胞を排除するために不可欠である。したがって最も理想的なのは、細胞老化が正常に起こり、その後速やかに生体から排除されることであるとも考えられる。では Tg マウスから得られた知見を将来的にヒトへ応用することを見据え、外来遺伝子に頼らずに薬学的アプローチにより、老化細胞を生体から特異的に排除することは可能だろうか?

老化細胞を標的とした薬剤という概念は、多くの研究者が昔から考えていたが、この数年間で実際に複数のグループが老化細胞特異的に細胞死を誘導する senolytic 薬 (Senolytic は *seno* + *lysis*, *seno* は *senescence* の意) についての報告を行っている。Mayo Clinic の Kirkland のグループは、老化細胞では PI3K や Bcl-2 など特定の経路の活性が亢進し、これらに生存を依存するようになることを見出した [32]。この特性を利用し、既に抗癌剤として使用されているチロシンキナーゼ阻害剤 dasatinib とフラボノイドの一種で PI3 キナーゼを含む複数のキナーゼ活性を阻害する作用を持つ quercetin を併用することにより、マウスの体内から老化した細胞を排除し、早期老化症の表現型を呈する *Ercc1* 変異マウスにおいて心機能の回復がみられること、また老齢マウスや動脈硬化モデルマウスにおいては血管運動機能障害が緩和することが確認されている [33]。

また Kirkland のグループは、抗アポトーシス活性を持つ Bcl-2 ファミリータンパク質の阻害剤も、senolytic 薬として有効であることを報告している [34, 35]。ABT-263 に関してはこれまでに既に複数のグループが老化細胞排除の効果を確認しており、Zhou のグループはマウス体内で老化細胞を排除することにより造血幹細胞や筋幹細胞の活性を回復させることに成功し [36]、上述の Campisi と van Deursen のグループは p16-3MR マウスで観察された老化細胞排除による動脈硬化の治癒

効果が、ABT-263の投与により同様に観察されることを報告している [23]。

さらに piperlongumine (PL) と呼ばれるアルカロイドも senolytic 薬として有効である可能性が報告されている [37]。PL はグルタチオン S-トランスフェラーゼ等を阻害することにより活性酸素種を亢進させ、細胞死を誘導すると考えられる。

上記のように、これまでに複数の薬剤が senolytic 薬として有効であることが示唆されている。しかしながら、実際にこれらの薬剤を senolytic 薬としてヒトへ応用するためには、まだ多くの壁を乗り越えなければならないであろう。Dasanitib/querctetin、および ABT-263 は、老化した細胞以外にも影響を及ぼし、ABT-263 は造血系細胞などでは毒性を示すこともわかっている [38, 39]。また肺線維症モデルにおける老化線維芽細胞においては、ABT-263 は効果がなく、dasanitib/querctetin が有効であるなど、細胞種によって senolytic 薬に対する感受性も異なることも報告されている [20]。Senolytic 薬の開発は未だ発展途上であり、その効果やメカニズムに関しては慎重に調べる必要がある。しかし、細胞老化が少なくとも一部の加齢性疾患の発症に寄与していることについて疑いはなく、今後、より副作用が少なくかつ効果の高い senolytic 薬の開発が待たれる。

## 5. 参考文献

1. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp.Cell Res.* 25 : 585-621, 1961.
2. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, *et al.* Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88 : 593-602, 1997.
3. Dimri GP, Lee X, Basile G, *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92 : 9363-9367, 1995.
4. Coppe JP, Patil CK, Rodier F, *et al.* Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS.Biol.* 6 : 2853-2868, 2008.
5. Munoz-Espin D, Serrano M, Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature reviews. Molecular cell biology* 15 : 482-496, 2014.
6. Sherr CJ, The INK4a/ARF network in tumour suppression, *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2 : 731-737, 2001.
7. Brookes S, Rowe J, Ruas M, *et al.* INK4a-deficient human diploid fibroblasts are resistant to RAS-induced senescence. *EMBO J.* 21 : 2936-2945, 2002.
8. Kamijo T, Zindy F, Roussel MF, *et al.* Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* 91 : 649-659, 1997.
9. Sharpless NE, Bardeesy N, Lee KH, *et al.* Loss of p16Ink4a with retention of p19Arf predisposes mice to tumorigenesis. *Nature* 413 : 86-91, 2001.
10. Krimpenfort P, Quon KC, Mooi WJ, *et al.* Loss of p16Ink4a confers susceptibility to metastatic melanoma in mice. *Nature* 413 : 83-86, 2001.
11. Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, *et al.* Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J.Clin.Invest.* 114 : 1299-1307, 2004.
12. Yamakoshi K, Takahashi A, Hirota F, *et al.* Real-time in vivo imaging of p16Ink4a reveals cross talk with p53. *J Cell Biol.* 186 : 393-407, 2009.
13. Hirose A, Ishihara K, Tokunaga K, *et al.* Quantitative assessment of higher-order chromatin structure of the INK4/ARF locus in human senescent cells. *Aging Cell* 11 : 553-556, 2012.
14. Rodier F, Coppe JP, Patil CK, *et al.* Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat.Cell Biol.* 11 : 973-979, 2009.
15. Goldstein S. Lifespan of cultured cells in progeria. *Lancet* 1 : 424, 1969.
16. Tyner SD, Venkatachalam S, Choi J, *et al.* p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* 415 : 45-53, 2002.
17. Baker DJ, Jeganathan KB, Cameron JD, *et al.* BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice. *Nat Genet.* 36 : 744-749, 2004.
18. Baker DJ, Wijshake T, Tchkonja T, *et al.* Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 479 : 232-236, 2011.
19. Baker DJ, Childs BG, Durik M, *et al.* Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* 530 : 184-189, 2016.
20. Schafer MJ, White TA, Iijima K, *et al.* Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nat Commun.* 8 : 14532, 2017.
21. Matheu A, Maraver A, Klatt P, *et al.* Delayed ageing through damage protection by the Arf/p53 pathway. *Nature* 448 : 375-379, 2007.
22. Demaria M, Ohtani N, Youssef SA, *et al.* An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Developmental cell* 31 : 722-733, 2014.
23. Childs BG, Baker DJ, Wijshake T, *et al.* Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis. *Science* 354 : 472-477, 2016.
24. Coppe JP, Patil CK, Rodier F, *et al.* A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on

- physiological oxygen. PLoS.One 5 : e9188, 2010.
25. Demaria M, O'Leary MN, Chang J, *et al.* Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse. *Cancer Discov.* 7 : 165-176, 2017.
  26. Schmitt CA, Senescence, apoptosis and therapy-cutting the lifelines of cancer. *Nat Rev Cancer* 3 : 286-295, 2003.
  27. Hashimoto M, Asai A, Kawagishi H, *et al.* Elimination of p19ARF-expressing cells enhances pulmonary function in mice. *JCI Insight* 1 : e87732, 2016.
  28. Furukawa N, Saito M, Hakoshima T, *et al.* A diphtheria toxin receptor deficient in epidermal growth factor-like biological activity. *Journal of biochemistry* 140 : 831-841, 2006.
  29. Saito M, Iwawaki T, Taya C, *et al.* Diphtheria toxin receptor-mediated conditional and targeted cell ablation in transgenic mice. *Nature biotechnology* 19 : 746-750, 2001.
  30. Verbeke EK, Cauberghs M, Mertens I, *et al.* The senile lung. Comparison with normal and emphysematous lungs. 2. Functional aspects. *Chest* 101 : 800-809, 1992.
  31. Bozanich EM, Collins RA, Thamrin C, *et al.* Developmental changes in airway and tissue mechanics in mice. *Journal of applied physiology* 99 : 108-113, 2005.
  32. Zhu Y, Tchkonina T, Pirtskhalava T, *et al.* The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell* 14 : 644-658, 2016.
  33. Roos CM, Zhang B, Palmer AK, *et al.* Chronic senolytic treatment alleviates established vasomotor dysfunction in aged or atherosclerotic mice. *Aging Cell* 15 : 973-977, 2016.
  34. Zhu Y, Tchkonina T, Fuhrmann-Stroissnigg H, *et al.* Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. *Aging Cell* 15 : 428-435, 2016.
  35. Zhu Y, Doornebal EJ, Pirtskhalava T, *et al.* New agents that target senescent cells: the flavone, fisetin, and the BCL-XL inhibitors, A1331852 and A1155463. *Aging (Albany NY)*, 2017.
  36. Chang J, Wang Y, Shao L, *et al.* Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med.* 22: 78-83, 2015.
  37. Wang Y, Chang J, Liu X, *et al.* Discovery of piperlongumine as a potential novel lead for the development of senolytic agents, *Aging (Albany NY)* 8 : 2915-2926, 2016.
  38. Wilson WH, O'Connor OA, Czuczman MS, *et al.* Navitoclax, a targeted high-affinity inhibitor of BCL-2, in lymphoid malignancies: a phase 1 dose-escalation study of safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and antitumour activity. *Lancet Oncol.* 11 : 1149-1159, 2010.
  39. Schoenwaelder SM, Jarman KE, Gardiner EE, *et al.* Bcl-xL-inhibitory BH3 mimetics can induce a transient thrombocytopenia that undermines the hemostatic function of platelets. *Blood* 118 : 1663-1674, 2011.

# Senescent cell ablation and senolytic drugs

Ryuta Mikawa<sup>1</sup>, Masataka Sugimoto<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Section of Immunology, National Center for Geriatrics and Gerontology

<sup>2</sup>Department of Aging Research, Nagoya University Graduate School of Medicine

## Abstract

More than half century has passed since cellular senescence was discovered, and it's now making a breakthrough in the aging research. While there is no doubt that cellular senescence has critical and essential roles in tumor suppression in mammal, its involvement in tissue aging has been obscure. Discovery of cell non-autonomous function of senescent cells through SASP (senescence-associated secretory phenotype) as unveiled the roles of cellular senescence in the tissue aging, and increasing evidences now suggest that cellular senescence underlies in aging and aging-associated pathologies. In this review, we describe recent advances in cellular senescence by senescent cell ablation mouse models as well as the drugs targeting senescent cells, namely, senolytic drugs.

【学会報告】

The 5<sup>th</sup> Asian Society for Aging Research Symposium 2017 報告記

清水 孝彦

千葉大学大学院医学研究院

雪の残る3月初旬(3/2-3/4)の札幌で、Asian Society for Aging Research Symposiumが開催されました。本シンポジウムは、長崎大学の下川先生、University of SeoulのEun Seoung Hwang先生、The University of Hong KongのZhongjun Zhou先生の3名が組織するシンポジウムで、2年毎に持ち回りで開催され、今回が第5回です。副題がMolecular basis for regulation of ageing and diseaseで、日本、韓国、中国、台湾、米国から約50名が参加し、Keynote lecture 2題、7 sessionに分かれてoral発表24題、ポスター発表9題の発表がありました。2年前の北京大会から参加した筆者は2回目の参加で、小規模ながらも大変レベルが高く、一流誌に掲載された内容ばかりで、かつ非常に活発な討論が行われる会であったことが、強く印象に残りました。

個人的に印象に残った発表を幾つか紹介します。Keynote lecture1は長崎大の小野悠介先生で、骨格筋幹細胞であるサテライト細胞研究で日本をリードする若手研究者です。3年前に基礎老化若手奨励賞(39-1号掲載)を受賞されましたので、記憶にあると思います。細胞の極性を制御するPAR complex, Crumbs complex, 及びScribble complexの3複合体に着目し、それらを構成する遺伝子のサテライト細胞特異的のノックアウトマウスを多数作出され、個体レベルと細胞レベルで骨格筋の恒常性について未発表の研究成果を数多く発表されました。また、Keynote lecture2は2017年1月にWashington Universityの今井研究室から長寿研に赴任された佐藤亜希子先生でした。Sirt1に着目し、視床下部特異的Sirt1トランスジェニックマウスが個体寿命の延長に加えて、睡眠の質を向上することを報告されました。分子機構の一端として、共役転写因子NX5.1の脱アセチル化制御を介して、下流のorexin receptor 2遺伝子の発現を調節し、ノンレム睡眠時間を延長すること示されました。Sirt1の多彩な機能を紹介するとともに、脳視床下部が寿命のみならず睡眠の質も制御することを力説されました。

一般演題で、興味深い講演を紹介します。台湾国立Yang-Ming大のTsai先生は、ミトコンドリア外膜に局在するCISD2を欠損させると早期老化を示し、逆に過剰発現すると個体老化を延長することを報告しました。ミトコンドリア外膜の1タンパク質の量が寿命に影響する内容に大変驚きました。現在は、CISD2の発現を高めるboosterを生薬からスクリーニングし、有望な素材

を同定されたと紹介しています。近い将来に薬剤やサプリメントして、入手できる日が来るかもしれません。6月に名古屋で開催される老年合同学会でも招待講演されますので、会員の先生方も是非、拝聴頂けたらと思います。また米国Baylor医科大学のWang先生は、線虫の寿命を腸内細菌の代謝物CA(済みません、正式物質名をメモし忘れました)が延長する成果を発表されました。腸内細菌に関する研究が飛躍的に増大する中、老化や寿命制御にも腸内細菌によって産生された代謝物が直接的に役割を担っていることが示され、大きなインパクトがありました。さらに韓国国立Chonnam大学のCho先生は、2年間近の老齢マウスにバクテリアの繊毛タンパク質FragellinとPspAタンパク質の融合タンパク質を経鼻免疫したところ、個体寿命が延長したという、ビックリする報告です。彼女らは、FragellinがTLR5に結合する特性から、TLR5に結合するアミノ酸を2箇所変更した変異型Fragellin/PspA融合タンパク質を免疫しても寿命延長効果が消失する結果をもとに、TLR5依存性の寿命制御機構を新規の寿命シグナルとして提唱していました。ただ、謎の現象として、Fragellinタンパク質、またはPspAタンパク質単独の経鼻免疫では、寿命延長作用が認められないことです。融合タンパク質に特異的に認められる活性のメカニズム解明が、新しい寿命シグナルの認知度を高めていくと期待されます。4つ目は中国科学アカデミーのLiu博士の発表で、遺伝子編集技術を駆使して、ヒトES細胞やmesenchymal stem cell(MSC)の遺伝性疾患モデルを作成して、一流誌に掲載を続けています。特筆すべきは、WRN早老症のモデル細胞として、相同組み替え法で、WRN遺伝子欠失ES細胞を樹立したことです。HGPSと同様に核構造の変化とヘテロクマチン領域の減少が早老症で共通の現象であることを示し、ひいては核構造変化が老化のドライバーとして働くことを提唱しています。

国内からは、先述の先生方に加えて、長寿研の丸山光生先生、京都大学の近藤祥司先生、東海大学の石井恭正先生、都健康長寿研の石神昭人先生が参加され、研究成果を発表されました。次会は、2018年4月に韓国・済州島で開催されることがアナウンスされました。アジア地域のAging研究の最先端を知ることができる貴重なシンポジウムですので、機会があれば会員の皆様も参加することをお勧めします。

最後に、長崎大学の下川先生が主催されたにも係わら

ず、札幌でシンポジウムが開催されました。遠方にもかかわらず下川研究室の先生方やスタッフの皆様のご準備

や心遣いに感謝申し上げ、本報告記を締めたいと思います。



**Asian Society for Aging Research  
Symposium 2017**  
*Molecular basis for regulation of aging and disease*



Organizing committee:  
Zhongjun Zhou (The University of Hongkong)  
Eun Seoung Hwang (University of Seoul)  
Isao Shimokawa (Nagasaki University)



**March 2-5, 2017  
At Sapporo Grand Hotel**



【学会報告】

ADPD 2017

木村 展之

国立長寿医療研究センター 認知症先進医療開発センター  
アルツハイマー病研究部 病因遺伝子研究室

3月29日から4月2日にかけて、2年に一度開催される国際アルツハイマー病・パーキンソン病学会 (ADPD) がオーストリアの首都ウィーンで開催されました。私は2005年の大会から同学会に参加しているのですが、回を重ねるごとに参加者数が増加し続けており、今回も3000人を超える研究者が世界中から集いました。臨床系の研究発表はもちろん行われますが、どちらかと言えば基礎研究者が多数参加する(即ち基礎研究の発表が多い)学会ですので、アルツハイマー病の基礎研究をしている人間にとっては重要な学会の1つです。

以下、今学会における興味深い報告をいくつか紹介させていただきます。

やはり今回、ひととき大きな注目を集めていたのは神経原線維変化の原因蛋白である Tau に関する研究発表だったように感じられます。プレナリーレクチャーで 사용되는大会場でシンポジウムセッションが行われたことから、注目度の大きさが見て取れると思います。Diamond (Univ. Texas) らのグループは、アルツハイマー病のみならず様々なタウオパチー (Tau 病理を主体とする神経変性疾患の総称) に由来する Tau 凝集体をマウス脳組織に注入したところ、凝集体によって脳内における伝搬様式も異なるのみならず、脳の注入部位によっても Tau 病理が定着するところとそうではないところがあるという報告をしていました。私個人は、Tau 凝集体の伝搬云々よりもむしろ、注入された Tau 凝集体が定着する脳領域と定着しない脳領域の違いに大きな興味を抱きました。私を含む基礎研究者は概して、脳神経系があたかも1種類の神経細胞で構成されているかのような錯覚に陥りがちですが、脳領域によって神経細胞の“質”は明らかに違うわけですから、領域ごとにおける神経細胞やグリア細胞の性質や機能的特徴をもっと明らかにすることが必要なかもしれないと深く反省しつつ、発表を聞いておりました。Columbia Univ. の Duff らは、アルツハイマー病患者の神経細胞においてプロテアソームの分解機能が低下していることに着目し、ポストシナプスにおけるプロテアソームの分解機能を賦活化することで、プレシナプスから伝搬してきた Tau 病理の拡大を食い止めることができるのではないかという治療戦略に基づいた発表を行っておりました。G 蛋白質共役受容体に結合する PACAP という物質を rTg4510 という遺伝子改変マウスに投与すると、cAMP-PKA シグナルを介してポストシナプスにおけるプロテアソームの

活性化が促され、ポストシナプスにおける Tau レベルが綺麗に減少しておりました。ただ、1つ疑問に思ったのは、凝集した Tau が果たしてプロテアソームのポアを通過できるのかという点です。発表中のスライドでも、westernblot で示された Tau のバンドは全長モノマーの位置でしたので、おそらく凝集体ではなくモノマーの分解を亢進させることで、新たな凝集体の形成を阻害しているのかなという印象を受けました。とはいえ、細胞が本来有する分解機能を賦活化して病態進行を抑制するという戦略自体は、極めて理論的かつ現実的ではないかと思えます。また、Society for Neuroscience 2016 の報告期でも紹介した Mandelkow (DZNE, Germany) のグループは、前回同様、樹状突起でも Tau が存在していることを改めて紹介し、FISH 法を用いた解析によって、全体の約 10% 程度の Tau が樹状突起に局在していることを報告しておりました。

一方、これまでのアルツハイマー病研究における花形であった B アミロイド蛋白 (Aβ) に関する研究発表は非常にトーンダウンしており、過去に発表された内容の焼き直しといった感がぬぐえない状況でした。失敗した数多くの臨床試験データから都合の良い結果だけを抽出し、自分たちの仮説が間違っていないということを力説されている姿をみると、同じ基礎研究者として少し悲しくなりました。また、近年の遺伝子関連解析で新たに発見された TREM2 に関するセッションも多数の参加者が集まっていたようですが、こちらは逆にアルツハイマー病を治療するという本来の目的から外れて、あくまでも TREM2 という因子に関する分子生物学的実験成果のオンパレードになっており、1990年代後半から2000年代初頭にかけての Presenilin フィーバー再現かといったような騒ぎになっていました。

総括しますと、アルツハイマー病の治療・予防法開発に向けた基礎研究は袋小路に入ってしまったかのような状況でした。先述しましたが、どこかで聞いたことのあるような話を再び発表している研究者も多くいたことから、先の見えないトンネルの中で皆必死にさがっているのだと思います。私自身も、もっと本質的な部分でアルツハイマー病の克服に貢献することができるよう、より一層の努力をしたいと強く感じた5日間となりました。



## 【編集後記】

「モデル生物」という内容で各先生に総説を依頼したあと心配したのが、これまでいわれてきた老化原因なるものを珍しい生き物でも調べてみました、おしまい、という内容の原稿を目にすることであった。しかしそれは杞憂であった。本特集を読むと、二人の女性リーダーを含む、若い研究者達が苦勞して新たな老化モデル生物の立ち上げを行ったこと、あるいはマウスで非常にユニークな系を老化や疾患理解のために開発したことがよくわかる。大御所ののれん分け的研究ではない。いよいよこれから本格的に始動をする、というワクワク感がある。読者の中に、本特集がこれらのパイオニアワークスにプレイヤーとして参加する、あるいは共同研究のきっかけとなった、という人が現れれば嬉しい。

編集委員

木村 展之

下田 修義

## 複写される方へ

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

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

## Notice about photocopying(In the USA)

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

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

## 基礎老化研究 第41号 第2号

平成29年(2017) 5月31日

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

編集 編集委員会

印刷所 コロニー印刷



日本基礎老化学会

Japan Society for Biomedical Gerontology