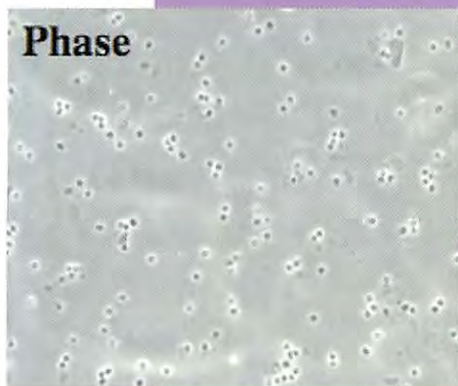


BIOMEDICAL GERONTOLOGY

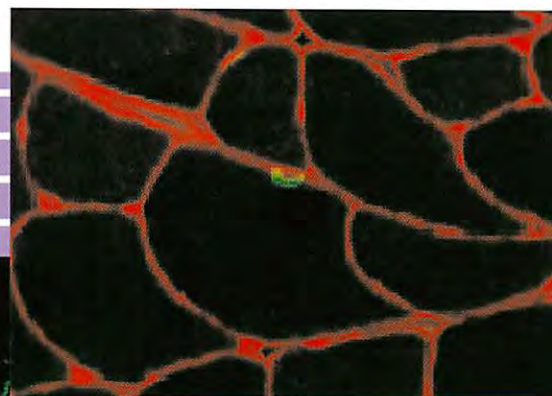
基礎老化研究

- 追悼文 ■ In memoriam of Dr. Sato Tsuneko
Emilio A. Jeckel-Neto
- 総説 ■ ラミンA—その多彩な機能と老化
中村 愛、森澤 拓、戸田 年総
- トピックス ■ 骨格筋重量維持機構と筋衛星細胞
深田宗一郎、山元 弘
- トピックス ■ MUSTag法による超高感度同時多項目測定
芝崎太、森實芳仁、榎坂典子
- 学会報告 ■ 第19回国際老年学会 XIXth IAGG World Congress of International Association of Gerontology and Geriatrics
田中 雅嗣
- 学会報告 ■ 花の都の国際老年学会“XIXth IAGG World Congress of GERONTOLOGY and GERIATRICS”
新海 正
- 学会報告 ■ 第36回国際生理学会世界大会参加記
渡辺 信博
- 随筆 ● 老化研究事始め—本格化したヒト寿命延伸の試み 三井 洋司
- お知らせ ● 日本基礎老化学会第33回大会開催のご案内 磯部 健一

Phase



Pax7



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

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

この雑誌について（投稿される方へ）

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

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

執筆要領

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

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

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

る位置に [] で括って表示する。

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

目 次

追悼文

In memoriam of Dr. Sato Tsuneko Emilio A. Jeckel-Neto..... 1-2

総説

ラミンA—その多彩な機能と老化 中村愛、森澤拓、戸田年総..... 3-11

トピックス

骨格筋重量維持機構と筋衛星細胞 深田宗一郎、山元弘..... 13-15

トピックス

MUSTag法による超高感度同時多項目測定 芝崎太、森實芳仁、槇坂典子..... 17-21

学会報告

第19回国際老年学会 XIXth IAGG World Congress of International Association of Gerontology and Geriatrics

田中雅嗣..... 23-25

学会報告

花の都の国際老年学会 “XIXth IAGG World Congress of GERONTOLOGY and GERIATRICS”

新海正..... 27

学会報告

第36回国際生理学会世界大会参加記 渡辺信博..... 29

随筆

老化研究事始め—本格化したヒト寿命延伸の試み 三井洋司..... 31-32

お知らせ

日本基礎老化学会第33回大会開催のご案内 磯部健一..... 33

CONTENTS

<REVIEW>

A-type lamins—their multiple functions in cells and the key role in aging

Megumi Nakamura, Hiraku Morisawa, Tosifusa Toda

【追悼文】

In memoriam of Dr. Sato Tsuneko

Energy. This is the word that best describe Dr. Sato Tsuneko.

As a Monbusho Kenkyuusei Ryuugakusei, I met Sato-sensei when I started my tenure at the Institute for Medical Science of Aging (Kareiken) of the Aichi Medical University. In the spring of 1990, Dr. Sato was the Director of Kareiken and I had a scholarship to study there for one year under her advice.

Dr. Sato was very kind receiving me in the lab for the first time and we talked about the research that I would be involved in over the following months. Although I had studied the Japanese language for six months at the Osaka University of Foreign Studies, at that time I could barely sustain a real conversation in Japanese. We talked in English about the routine to be done and she introduced me to the Kareiken's people. Then, to my surprise, she said to them all: "This is Jekeru-san from Brazil. He will stay at our Institute as a kenkyuusei and from now on everybody must speak only in Japanese with him". And, to my despair, everyone did just that. During that year, I passed the entrance examinations for the graduate course and stayed at Kareiken until 1995. Of course, due to the circumstances, I became skilful in Japanese and I am very grateful to Dr. Sato because I could defend my Ph.D. thesis in Japanese and discuss it with the professors who comprised the committee.

This situation describes the Sato-sensei's way of doing things: direct, precise, without rhetoric and with a lot of energy. Sometimes, this way of being could confound who met her for the first time or had short contact with her. But after a short period working together, one could realize that she had a very warm heart, despite the first impression of objective and sharp speech.

Somebody once told me that Sato-sensei was one of the first women that achieved the Medical Doctor degree in Nagoya. Before working on aging, she made a career as pathologist and had a sharp eye to detect changes in tissues and cells. Her background in pathology was very important in investigation of aging because one of the most difficult challenges in this area is to differentiate the natural changes that occur as time passes from the changes due to diseases. It was not easy to hold an academic discussion with her if you did not have a good point and solid arguments. And this is very important for a graduate student to learn if one intends to be a scholar.

But the lab's life with Sato-sensei was not only science, papers, gakkais etc. Once a year she spent almost a week preparing a dinner for all the lab staff. She cooked very well and enjoyed (to our delight) to prepare exquisite Japanese dishes and offer us a real go-chiso. Even the sake was very special, from Takayama brewers and other famous places.

I went to a lot of famous restaurants in Japan, but none of them served a menu as elaborate and delicious as those Sato-sensei cooked for us on those remarkable gastronomic nights.

Sato-sensei liked to study Japanese culture and was very happy when she told us about her classes on shuji or the last art museum she visited. With the same enthusiasm, she could talk about a new paper on aging or the last symposium she attended.

This is the way I will always remember her. It was an honor for me to study and research under Sato-sensei's advisement. I pray for her soul to rest in peace.

Emilio A. Jeckel-Neto

Professor

Faculty of Biosciences - Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul

Brazil

【総 説】

ラミンA—その多彩な機能と老化

中村 愛、森澤 拓、戸田 年総
東京都健康長寿医療センター研究所（東京都老人総合研究所）
老化機構研究チーム プロテオーム

要約

ラミンは細胞の核膜を裏打ちする核ラミナの構成成分として発見された。ラミンはラミンA、ラミンB、ラミンCの三つのタイプが知られており、核内因子と相互作用して核の構造形成や遺伝子の複製・発現の制御に重要な役割を果たしている。近年、ラミンA遺伝子の変異がハッチンソン・ギルフォード早老症候群（HGPS）、筋ジストロフィー、ニューロパチーなど多様な疾患を引き起こすことが明らかになった。それらの病態の解析からラミンの新たな機能がわかってきた。本稿ではラミンAに焦点をあて、HGPSの分子メカニズム、ラミンAの正常老化や酸化ストレスとの関わりについて紹介する。

キーワード: lamin A/C, Hutchinson-Gilford progeria syndrome, oxidative stress, proteomics,

はじめに

我々はヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞を用いて酸化ストレス負荷におけるタンパク質の変化をプロテオーム解析により検討してきた(第6節参照)。リン酸化タンパク質を特異的に染色するPro-Q Diamondで二次元電気泳動のゲルを染色したところ、ストレス負荷後のゲルで非常に強く染まってリン酸化が亢進しているタンパク質スポットが見つかった[1]。このスポットは質量分析によりラミンA/Cと同定された。「基礎老化研究あれこれ」[2]ですでに紹介されているが、ラミンA/Cはハッチンソン・ギルフォード早老症候群（HGPS）の原因遺伝子LMNA遺伝子の産物である[3,4]。LMNA遺伝子異常はHGPSの他にも様々な遺伝病を引き起こすことが知られており、核構造や核膜タンパク質の機能の重要性が注目されることとなった。近年、ラミンAの正常な老化過程への関与も明らかにされてきている。本稿ではラミンの構造とHGPS発症の分子メカニズムを概説し、核ラミンの新たな機能を紹介する。

1. ラミンA/C

ラミンA/Cは中間径フィラメントの一種で、核内膜の核質側を裏打ちする核ラミナの構成成分である[5]。ラミンには他にB1、B2があり、それぞれLMNB1、LMNB2遺伝子から合成される[6,7]。これに対し、ラミンAもラミンCも第1番染色体1q21に存在するLMNA遺伝子の産物である。LMNAは12個のエクソンからなり、その

mRNAは骨格筋、心筋、胎盤に多く発現している。mRNAのスプライシングの違いによりラミンA（分子量74 kDa,等電点6.57）とラミンC（分子量65 kDa,等電点6.40）という2つのアイソフォームが産生される。ラミンAは664アミノ酸、ラミンCは572アミノ酸からなり、N末端側の566個のアミノ酸は共通である(図1)[8,9]。ラミンは核膜の構造を安定化し染色体を核膜につなぎとめる役割を果たしている。細胞分裂の際にはリン酸化により核ラミナ構造を可逆的に崩壊させる調節因子として機能している。22番目、390番目と392番目のSer残基のリン酸化が細胞分裂期の核膜崩壊に関わっていることが報告されている[10,11]。

2. ラミノパチー

LMNAの変異はハッチンソン・ギルフォード早老症候群（HGPS）[3,4]、常染色体型Emery-Dreifuss筋ジストロフィー（A-EDMD）[12,13]、近位筋優位の筋障害と心筋症を示す肢帯型筋ジストロフィー1B型（LGMD1B）[14]、家族性拡張型心筋症[15]、Dunnigan型家族性（部分性）リボジストロフィー（FPLD）[16]、軸索ニューロパチー（Charcot-Marie-Tooth病2型）[17]など常染色体優性および劣性の遺伝形式をとる様々な疾患を引き起こすことが知られており、これらの疾患はラミノパチーと総称される[18,19]。ラミノパチーは主に、横紋筋症、リボジストロフィー、末梢神経障害、早老症の4種類に分けることができ、表1に病名とそれらの代表的な変異と主症状をまとめて示した。ヒト遺伝病を生じるラミンAの変異に関しては、現在までに200以上の変異が報告されている。しかしながら、横紋筋症を生じる変異はラミンAのコーディング領域全体にわたっているなど、変異と症状を関連づけるのは困難であった。LMNA欠損

連絡先：〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2

Tel：03-3964-3241 内線3010

Fax：03-3579-4776

E-mail：megumi@tmig.or.jp

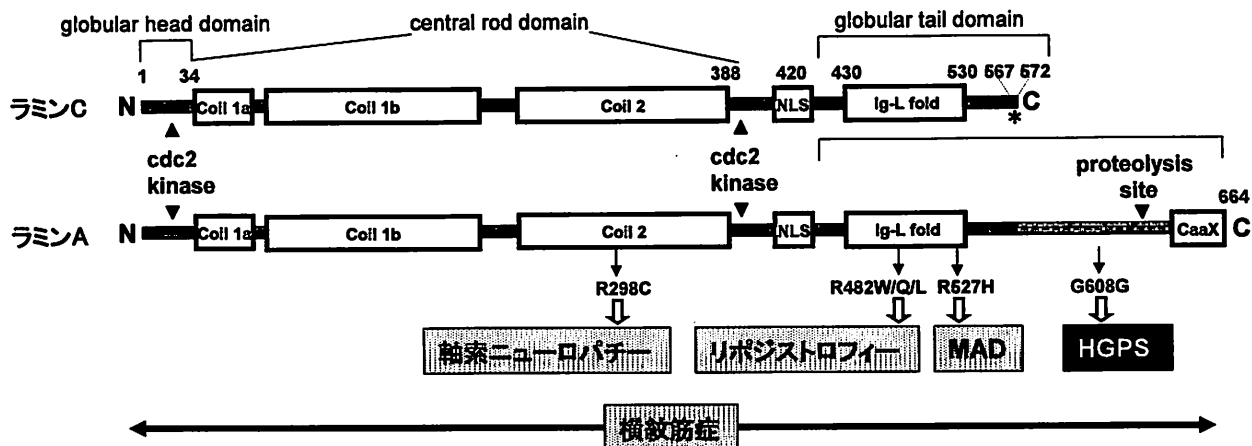


図1 ラミンA/Cのタンパク質構造の模式図

LMNA遺伝子は12個のエクソンから成り、選択的スプライシングによりラミンAとラミンCが生じる。ラミンAはエクソン10の途中から選択的スプライシングが生じ、エクソン11と12を用いて合成される。そのため、ラミンAとラミンCはN末端からほとんどの領域のアミノ酸配列は同じで、567番目から異なり、VSGSRR (図の*部分) がラミンCのC末端固有の配列である。ラミンAはC末端にCaaXモチーフが有り、ここでファルネシル化され、⁶⁶YL⁶⁷でプロテアーゼによる限定分解を受け成熟ラミンAとなる (図2参照)。核移行シグナル (NLS) は420番目のアミノ酸周辺に有り、Ig様の構造 (Ig-L fold) は430~530番目の領域に存在する。細胞分裂の際には22番目と392番目のセリン残基がcdc2 kinaseによってリン酸化される。ラミノパチーの主な変異の部位を示しているが、横紋筋症を生じる変異はラミンAのコーディング領域全体にわたっている。

マウスなどの研究から、ラミンA/C欠損により核の脆弱性が高まり、NF- κ Bシグナルが低下し機械的なストレスを受けやすくなることが筋ジストロフィーなどの発症につながると考えられている[20]。また、脂肪生成には細胞の増殖と分化を調節するretinoblastoma protein (Rb)やsterol regulatory element binding protein 1 (SREBP1)などが関わっているが、LMNA異常によりRbの減少や局在の変化[21]やSREBP1のプロジェリン (第3節参照) との結合による局在の変化[22]が認められ、これらのことがリポジストロフィーの引き金になると考えられている。早老症として知られるウェルナー症候群はWRN遺伝子の変異によるヘリケース異常が主要因とされているが[23]、脂肪萎縮や糖尿病を伴う重症の非典型的ウェルナー症候群ではLMNAの変異も見つかっている[24]。

一方、LMNBの異常によるヒト遺伝病はほとんど知られていなかった。ラミンBが発育に必須でありLMNBの異常が致死的であることを反映しているのかもしれない[25]。最近、LMNB1の重複が常染色体優性白質ジストロフィーの病因となること[26]や、後天性部分性リポジストロフィー患者にLMNB2の変異があること[27]が報告されたが、ラミンBとヒト遺伝病発症との関連についての詳細はまだ明らかになっていない。ラミンは核膜内の様々なタンパク質と相互作用して核の機能を保っているが、それらのタンパク質の異常も多様な遺伝病を引き起こすことが知られており、核膜病と総称されている。エメリンの欠損によるX染色体型Emery-Dreifuss筋ジストロフィー (X-EDMD) [28]、ラミンB受容体をコードするLBRの変異によるPelger-Huët異常[29]やGreenberg骨格異形成[30]、MAN1の変異による骨斑紋症、Buschke-Ollendorff症候群、蠟流骨症[31]などがあり、核膜の破綻がもたらすこれらの病気の分子機構の研究から核膜タンパク質の機能が明らかになりつつある。

3. ハッチンソン・ギルフォード早老症候群の分子メカニズム

HGPSは800万人に一人という極めてまれな常染色体優性の遺伝病であり、早老症の中では最も重篤な症状を呈する。ほとんどのHGPS患者でLMNA遺伝子のエクソン11の608番目のコドンに点変異 (C₁₈₂₄→T) が見つかっている。その結果G608Gのサイレント変異が生じる[3,4]。変異を持つ胎児はほぼ正常に生まれるが生後6~24ヶ月で発達遅滞、脱毛、骨形成異常、強皮症などを示し、通常の5~10倍の速度で老化が進行し、平均13歳で冠動脈疾患や脳卒中によって死に至る。しかし、一般に脳は正常に機能し成長するため認知症等の症状は見られず、体格の急速な老化進行と正常な精神の発達との乖離が著しい。図2に正常なラミンAの成熟過程とHGPSの分子メカニズムを示した。通常、ラミンAはC末端にCAAXモチーフを持つプレラミンとして翻訳合成され、システイン残基のファルネシル化、メタロプロテアーゼ (FACE1, マウスホモログはZmpste24) によるプロセッシングを経て成熟ラミンと成る。HGPSの場合はLMNAの1824番目のCがTに変異しているため異常なスプライシングが生じ、メタロプロテアーゼによる切断部位を含む50アミノ酸を欠損したラミンAが生じる。その結果C末端がファルネシル修飾されたままの異常なラミンA (プロジェリン) が作り出される[32-34]。これが核ラミナへ取り込まれてプレバ形成などの核形態の異常を引き起こされるのである[35]。プロジェリンは細胞分裂時に細胞質や膜へ不溶物となって存在し、染色体分離異常や二核化が生じて細胞分裂が正常に進行しなくなる[36,37]。

拘束性皮膚障害 (Restrictive dermopathy (RD)) や下顎末端異形成症 (Mandibuloacral dysplasia (MAD)) 患者の中にはLMNAの変異が認められない症例が有り、これらはZmpste24の異常によりプロセッシングが起こら

A. ラミンAの成熟過程



B. Hutchinson-Gilford早老症候群(HGPS)

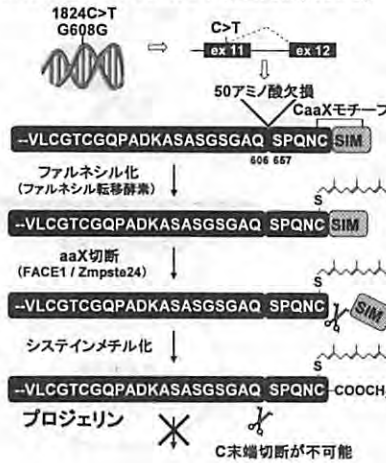


図2 ラミンAの成熟過程とハッチンソン・ギルフォード早老症候群の分子メカニズム (参考文献[63, 64]より改変)

A. ラミンAはC末端にCaaX (C:システイン、a:脂肪族炭化水素を持つアミノ酸、X: どのアミノ酸でも可)モチーフを持つプレラミンとして翻訳合成される。まず、システイン残基がファルネシル化され、3アミノ酸残基 (-aaX)が切断された後メチル化を受け、メタロプロテアーゼFACE1 / Zmpste24によりC末端15アミノ酸が切断されて成熟ラミンとなる。B. HGPSではラミンAの1824番目のCがTに変異することにより、通常には無いmRNAスプライシング部位が生じて、FACE1 / Zmpste24認識部位を含む50アミノ酸を欠損する。そのためプロセッシングが起これず、ファルネシル化されたままのラミン (プロジェリン) が生産される。

ずファルネシル修飾されたままの異常なラミンAが蓄積されHGPSと同様な早老症を呈する[32,38]。

HGPSの発症がプロジェリンの蓄積が引き金になることが明らかになったので、プロジェリンの発現を抑制する試みがなされた。ラミンAのファルネシル修飾を抑えるファルネシル転移酵素の阻害剤 (*rac*-R115777) によりGFP-プロジェリンを導入したHeLa細胞の核の形態異常やヘテロクロマチン異常の回復が認められた[39]。HGPS変異を導入したマウスでもファルネシル転移酵素阻害剤投与により症状が緩和され[40]、治療法として期待されている。また、HGPSのスプライシングを阻害する修飾オリゴヌクレオチドで細胞を処理することにより、核の形態異常やヘテロクロマチンの異常が回復することも明らかにされた[41]。

4. 生理的老化とラミン

しかし、ラミンAが正常な老化においても何らかの役割を担っているかどうかについてはわかっていなかった。2006年、Scaffidi と Misteliは、健康な細胞でもHGPSを引き起こす分子メカニズムが働いていることを報告した[42]。彼らは皮膚線維芽細胞を用いて、高齢者の核ではHGPS患者と同様に形態異常、DNA損傷の増加、ヒストンH3修飾の変化などの欠陥があり、そのような加齢に伴う核の欠陥はラミンAの隠れたスプライシング部位が散発的に使用されることによって誘導されることを明らかにした。またMcClintockらは、新生児から97歳までの150人の非罹患者の皮膚生検の結果、低レベルではあるがあらゆる年齢でHGPSと同様のスプライシングが *in vivo* で起こっており、高齢者の皮膚ではプロジェリンの蓄積が認められることを報告した[43]。プロジェリン陽性の線維芽細胞は若齢者では基底膜・真皮の乳頭層に見られるが、高齢者では陽性細胞が増加しその局在も真皮の網状層に及ぶことが明らかになり、プロジェリンの発現は正常な細胞老化におけるバイオマーカーとなることが示唆された。HGPS患者と非罹患者の皮膚の線維芽細胞を用いた *in vitro* における細胞老化でも、継代後期で

はいずれも lamin A Delta 150 transcript (プロジェリン転写物) の増加が認められている[44]。また、正常な線維芽細胞に少量のプロジェリン発現細胞が存在しそれらが二核化していることが確認され、正常な老化過程でも細胞分裂異常が起きていることが明らかになった[36]。

5. 幹細胞とラミン

HGPS患者では間葉系起源の組織 (骨、心筋、脂肪組織等) が侵されているが[45]、その詳細については不明であった。Scaffidi と Misteli はプロジェリンを過剰発現させた皮膚線維芽細胞でノッチシグナル経路の下流のエフェクターである *HES1*、*HES5*、*HEY1* などの発現が増加していることを見出した[46]。ノッチシグナル経路は幹細胞の分化における主要な制御機構である。そこでHGPSの患者の細胞のノッチシグナル関連因子を調べたところ、*HES1*、*HES5*、*HEY1* などの発現が健康者の細胞に比して多く、ノッチシグナルが活性化されていることがわかった。さらにヒトの間葉系幹細胞にプロジェリンを発現させるとノッチシグナルが活性化し骨細胞や脂肪細胞への分化能に異常を来して組織の機能低下をもたらすことを明らかにした。早老症のモデル動物である *Zmpste24* 欠損マウスでは前述のようにプロセッシングが起これず異常なラミンAが蓄積されて核ラミナの異常が見られる。この *Zmpste24* 欠損マウスにおいても毛包上皮幹細胞の増殖能と分化能の低下が認められ、その変化は核の形態異常と相関し、Wntシグナルの不活性化が認められた[47]。

6. 酸化ストレスとラミン

酸化ストレスは老化の要因の一つである[48,49]。高齢者の認知症やパーキンソン病の一因としても脳内で発生する酸化ストレスの関与が考えられている。特にドパミン神経細胞はドパミン代謝に伴い細胞質内で絶えず活性酸素が作られているために最も酸化ストレスの影響を受けやすい細胞である。我々はドパミン代謝能を持つヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞が6-hydroxydopamine (6-

OHDA) による酸化ストレス負荷を受けるとelongation factor 2、Lamin A/C、heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3、およびT-complex protein 1のリン酸化状態が変化することを見出した[1]。細胞分画により、このラミン A/Cと同定されたスポットは核分画にのみ認められた。抗ラミン A/C抗体を用いたWestern blottingにより、このスポットと他の等電点の異なるPro-Q Diamond陰性スポットが検出され、酸化ストレス負荷によりリン酸化されたスポットへのシフトが生じていることが明らかになった。さらに、酸化ストレス負荷におけるラミンの挙動を、できるだけ生理的な条件下で他の蛋白質との相互作用を保った状態で解析することを試みた[50]。「ブルーネーティブ電気泳動 (BN-PAGE)」法は、非変性条件下で複合体構造を保ったまま蛋白質を分離することが可能であるとされている[51,52]。そこで、6-OHDAによる酸化ストレス負荷後、中性非変性条件下で蛋白質を抽出しBN-PAGEを行った。1-D BN-PAGE後のWestern blottingの結果、ラミン A/C抗体陽性のバンド(300kDa)は酸化ストレス負荷により増加することがわかった。2-D BN/SDS-PAGEによりタンパク質複合体の構成成分を分離させ、タンパク質スポットを切り出しトリプシン消化を行って質量分析による同定を試みた結果、300 kDaバンドの主たる蛋白質はheat shock protein 90(Hsp90)であることが明らかになった。さらにHsp90抗体を用いて1-D BN-PAGE後のWestern blottingを行ったところ、ラミン A/C抗体陽性のバンドはHsp90抗体でも陽性であった。細胞全体のラミン A/Cの発現量の酸化ストレス負荷による顕著な変化は認められず、Hsp90結合型のラミン A/Cがストレス応答により増加することがわかった。このラミンがどのような構造変化を受けているか、またHsp90との相互作用の詳細について現在検討を進めている。

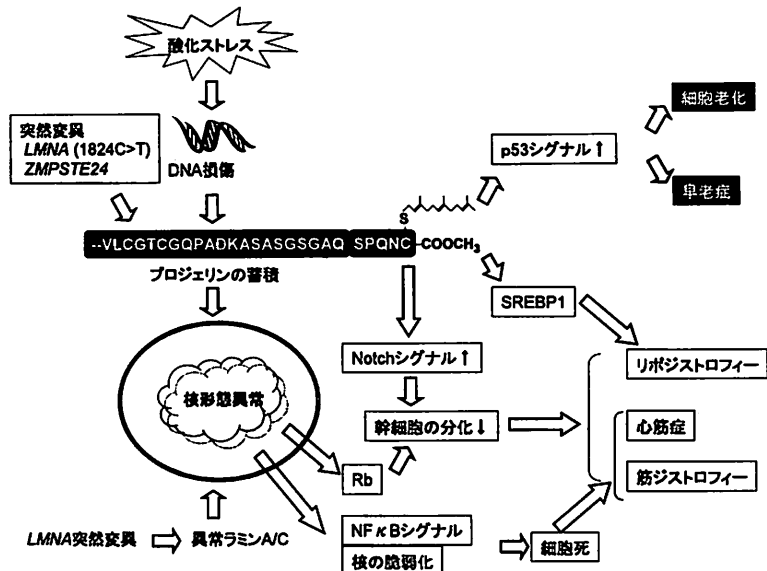


図3 細胞老化および疾患におけるラミンAの関わり

ラット腎臓におけるプロテオミクス解析においても酸化ストレスによりS-チオール化されるタンパク質の一つとしてラミンA/Cが同定されている[53]。

LMNA遺伝子異常を伴うamyotrophic quadriceps syndromeの患者は血液中のチオバルビツール酸反応物質(TBARS)とカルボニル化タンパク質の濃度が健常者に比べて高く、酸化ストレスが亢進していることが示唆された[54]。また、R439CあるいはR482Wのアミノ酸置換による家族性(部分性)リボジストロフィー(FPLD)患者の線維芽細胞では、通常の培養条件下では健常者の細胞と顕著な差は認められなかったが、過酸化水素による酸化ストレス負荷により細胞内ROSが異常に亢進することから、これらの変異が酸化ストレスに対する感受性を高める可能性が示唆された[55]。

p53過剰発現マウスは早老症状を示すことなどからp53タンパク質は老化過程に重要な役割を果たしていることが知られている[56,57]。酸化ストレスによる細胞老化促進機構においてもNAD⁺依存性ヒストン脱アセチル化酵素を介してp53活性が制御されている[58,59]。

表1 ラミノパチー

| 病名(略称) | 遺伝形式 | 原因遺伝子 ²⁾ | 症状 | 文献 |
|------------------------|------|---------------------|-------------------------------------|-------------|
| 横紋筋症 | 優性遺伝 | LMNA | 骨格筋異常、心筋症 | 12 |
| | | | 常染色体型Emery-Dreifuss筋ジストロフィー(A-EDMD) | 13 |
| | | | 拡張型心筋症(DCM) | 15 |
| 肢体型筋ジストロフィー1B型(LGMD1B) | 優性遺伝 | LMNA | 骨格筋異常、心筋症 | 14 |
| リボジストロフィー | 優性遺伝 | LMNA ³⁾ | インスリン抵抗性糖尿病、脂肪萎縮 | 16 |
| | | | Dunnigan型家族性(部分性)リボジストロフィー(FPLD) | (R482W/Q/L) |
| 末梢神経障害 | 優性遺伝 | LMNA | 運動・感覚神経障害 | 17 |
| 早老症 | 優性遺伝 | LMNA | 脱毛、頭部肥大、骨粗鬆症、動脈硬化 | 3, 4 |
| | | | Hutchinson-Gilford早老症(HGPS) | (G808G) |
| 非定型Werner症候群(aWS) | 優性遺伝 | LMNA | 糖尿病、骨粗鬆症、動脈硬化、脂肪萎縮 | 24 |
| 下顎末端異形成症 ¹⁾ | 優性遺伝 | LMNA ⁴⁾ | インスリン抵抗性糖尿病、免疫遅滞、骨形成異常、リボジストロフィー | 62 |
| | | | [mandibuloacral dysplasia (MAD)] | (R527H) |
| 拘束性皮膚障害(RD) | 優性遺伝 | LMNA ⁴⁾ | 皮膚異形成、子宮内胎児死、小顎症 | 32 |
| | | ZMPSTE24 | | |

表1. ラミノパチー

1) MADはリボジストロフィー症状を伴うため、リボジストロフィーの分類に入れることもある。LMNA異常が病因と考えられる病気の中には多様な症状を呈しこれらの混合型とされるものもある。
2) LMNAの変異は代表的なものを示した。横紋筋症を生じる変異はラミンAのコーディング領域全体にわたっており、アミノ酸置換か1アミノ酸の欠失変異が生じていることが多い。
3) FPLDを発症する変異の多くはLMNAのエクソン8領域に集中しており85%は482番目のアルギニンが置換されている。
4) MADおよびRD患者ではLMNA異常が認められない症例がある。その場合、プロセシング酵素を発現するZMPSTE24に変異が生じていてプロジェリンの蓄積が確認された。LMNAとZMPSTE24がともに異常を呈する症例もある。

早老症モデルであるZmptse24欠損マウスではp53シグナル経路が活性化されていることが明らかになった[60]。さらに大腸癌由来のHCT116細胞のプロテオーム解析により、マイトマイシンで細胞内p53を活性化するとラミンA/Cの発現が増加しp53シグナルの標的タンパク質の一つであることもわかった[61]。

おわりに

遺伝情報が集積している核は細胞の要である。核膜は核の構築に必須であり、核・細胞質間の分子輸送、シグナル伝達、遺伝子発現制御、核の高次構造の決定などの機能に関与していることが知られていた。この10年間のラミノパチーの解析から、ラミンAがいかに重要な役割を担っているかがクローズアップされることとなった。現在までに明らかになったラミンAの機能をまとめると以下の通りである。1) 他の核膜タンパク質や細胞骨格タンパク質との相互作用による核構造の物理的な安定化とNF κ Bシグナルによるストレス応答で機械的なストレスに対処する。2) Rbと結合しRb-E2Fによる転写抑制を安定化して細胞分裂を制御する。3) SREBP1を介した脂肪合成を制御する。4) 間葉系幹細胞の分化に関与するノッチシグナル経路を制御する。5) 細胞老化に関わるp53シグナル経路を制御する(図3)。

HGPS患者は世界で50人に満たない。HGPSの分子機構が明らかになり、HGPS診断用遺伝子検査キットが開発され、2008年にファルネシル転移酵素の阻害剤を用いた臨床治験が開始された。HGPSの研究によってごくわずかの不運な人々に福音がもたらされたと思われていたが、HGPS非罹患高齢者でもプロジェリンが作られるというScaffidiとMisteli[42]の画期的な発見により、すべての人々の関心事となった。ラミンAをはじめとする核膜タンパク質が抗老化薬の標的物質としても注目を集めることとなり、老化メカニズムの研究が急展開したのである。もちろんたった一つの遺伝子で老化は語れないが、HGPSの分子メカニズムが老化の謎解きの鍵となったことは間違いない。上述したタンパク質以外にも多くのタンパク質がラミンA/Cと相互作用することが知られているが、それらの詳細やラミンA/C自体の翻訳後修飾などについてはまだ不明な点が多く、今後の研究が期待される。

参考文献

1. Nakamura, M., Yamada, M., Ohsawa, T., Morisawa, H., Nishine, T., Nishimura, O., Toda, T. Phosphoproteomic profiling of human SH-SY5Y neuroblastoma cells during response to 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta* 1763: 977-989, 2006.
2. 白澤卓二 基礎老化研究あれこれ(4) 映画と老化研究. *基礎老化研究*. 29: 53-54, 2005.
3. De Sandre-Giovannoli, A., Bernard, R., Cau, P., Navarro, C., Amiel, J., Boccaccio, I., Lyonnet, S., Stewart, C. L., Munnich, A., Le Mercier, M., Levy, N. Lamin A truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science* 300: 2055, 2003.
4. Eriksson, M., Brown, W. T., Gordon, L. B., Glynn, M. W., Singer, J., Scott, L., Erdos, M. R., Robbins, C. M., Moses, T. Y., Berglund, P., Dutra, A., Pak, E., Durkin, S., Csoka, A. B., Boehnke, M., Glover, T. W., Collins, F. S. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 423: 293-298, 2003.
5. Stuurman, N., Heins, S., Aebi, U. Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. *J. Struct. Biol.* 122:42-66, 1998.
6. Lin, F., Worman, H. J., Structural organization of the human gene (LMNB1) encoding nuclear lamin B1. *Genomics*. 27: 230-236, 1995.
7. Biamonti, G., Giacca, M., Perini, G., Contreas, G., Zentilin, L., Weighardt, F., Guerra, M., Della Valle, G., Saccone, S., Riva, S., Falaschi, A. The gene for a novel human lamin maps at a highly transcribed locus of chromosome 19 which replicates at the onset of S-Phase. *Mol. Cell Biol.* 12: 3499-3506, 1992.
8. Mckee, F.D., Kirschner, M. W., Caput, D. Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. *Nature* 319: 463-468, 1986.
9. Fisher, D. Z., Chaudhary, N., Blobel, G. cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 6450-6454, 1986.
10. Heald, R., Mckee, F. Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell* 61: 579-589, 1990.
11. Peter, M., Nakagawa, J., Doree, M., Labbe, J. C., Nigg, E. A. In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell* 61: 591-602, 1990.
12. Bonne, G., Di Barletta, M. R., Varnous, S., Becane, H. M., Hammouda, E. H., Merlini, L., Muntoni, F., Greenberg, C. R., Gary, F., Urtizberea, J. A., Duboc, D., Fardeau, M., Toniolo, D., Schwartz, K. Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nature Genet.* 21: 285-288, 1999.
13. Raffaele di Barletta, M., Ricci, E., Galluzzi, G., Tonali, P., Mora, M., Morandi, L., Ro-

- morini, A., Voit, T., Orstavik, K. H., Merlini, L., Trevisan, C., Biancalana, V., Housmanowa-Petrusewicz, I., Bione, S., Ricotti, R., Schwartz, K., Bonne, G., Toniolo, D. Different mutations in the LMNA gene cause autosomal dominant and autosomal recessive Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 66: 1407-1412, 2000.
14. Muchir, A., Bonne, G., van der Kooi, A. J., van Meegen, M., Baas, F., Bolhuis, P. A., de Visser, M., Schwartz, K. Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B). *Hum. Molec. Genet.* 9: 1453-1459, 2000.
 15. Fatkin, D., MacRae, C., Sasaki, T., Wolff, M. R., Porcu, M., Frenneaux, M., Atherton, J., Vidaillet, H. J., Jr, Spudich, S., De Girolami, U., Seidman, C. E. Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. *New Eng. J. Med.* 341: 1715-1724, 1999.
 16. Cao, H., Hegele, R. A. Nuclear lamin A/C R482Q mutation in Canadian kindreds with Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum. Molec. Genet.* 9: 109-112, 2000.
 17. De Sandre-Giovannoli, A., Chaouch, M., Kozlov, S., Vallat, J. M., Tazir, M., Kassouri, N., Szepetowski, P., Hammadouche, T., Vandenberghe, A., Stewart, C. L., Grid, D., Levy, N. Homozygous defects in LMNA, encoding lamin A/C nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (Charcot-Marie-Tooth disorder type 2) and mouse. *Am. J. Hum. Genet.* 70: 726-736, 2002.
 18. Broers, J. L. V., Ramaekers, F. C. S., Bonne, G., Ben Yaou, R., Hutchison, C. J. Nuclear Lamins: Laminopathies and their role in premature ageing. *Physiol. Rev.* 86: 967-1008, 2006.
 19. Worman, H. J., Bonne, G. "Laminopathies": a wide spectrum of human diseases. *Exp. Cell Res.* 313: 2121-33, 2007.
 20. Lammerding, J., Schulze, P. C., Takahashi, T., Kozlov, S., Sullivan, T., Kamm, R. D., Stewart, C. L., Lee, R. T. Lamin A/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction. *J. Clin. Invest.* 113: 370-378, 2004.
 21. Johnson, B. R., Nitta, R. T., Frock, R. L., Mounkes, L., Barbie, D. A., Stewart, C. L., Harlow, E., Kennedy, B. K. A-type lamins regulate retinoblastoma protein function by promoting subnuclear localization and preventing proteasomal degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 9677-9682, 2004.
 22. Capanni, C., Mattioli, E., Columbaro, M., Lucarelli, E., Parnaik, V. K., Novelli, G., Wehnert, M., Cenni, V., Maraldi, N. M., Squarzoni, S., Lattanzi, G. Altered pre-lamin A processing is a common mechanism leading to lipodystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 14: 1489-1502, 2005.
 23. Yu, C. E., Oshima, J., Fu, Y. H., Wijsman, E. M., Hisama, F., Alisch, R., Matthews, S., Nakura, J., Miki, T., Ouais, S., Martin, G. M., Mulligan, J., Schellenberg, G. D. Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* 272: 258-62, 1996.
 24. Chen, L., Lee, L., Kudlow, B. A., Dos Santos, H. G., Sletvold, O., Shafeghati, Y., Botha, E. G., Garg, A., Hanson, N. B., Martin, G. M., Mian, I. S., Kennedy, B. K., Oshima, J. LMNA mutations in atypical Werner's syndrome. *Lancet* 362: 440-445, 2003.
 25. Vergnes, L., Peterfy, M., Bergo, M. O., Young, S. G., Reue, K. Lamin B1 is required for mouse development and nuclear integrity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 10428-10433, 2004.
 26. Padiath, Q. S., Saigoh, K., Schiffmann, R., Asahara, H., Yamada, T., Koepfen, A., Hogan, K., Ptaček, L. J., Fu, Y-H. Lamin B1 duplications cause autosomal dominant leukodystrophy. *Nature Genet.* 38: 1114-1123, 2006.
 27. Hegele, R. A., Cao, H., Liu, D. M., Costain, G. A., Charlton-Menys, V., Rodger, N. W., Durrington, P. N. Sequencing of the reannotated LMNB2 gene reveals novel mutations in patients with acquired partial lipodystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 79: 383-389, 2006.
 28. Bione, S., Maestrini, E., Rivella, S., Mancini, M., Regis, S., Romeo, G., Toniolo, D. Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nature Genet.* 8: 323-327, 1994.
 29. Hoffmann, K., Dreger, C. K., Olins, A. L., Olins, D. E., Shultz, L. D., Lucke, B., Karl, H., Kaps, R., Müller, D., Vayá, A., Aznar, J., Ware, R. E., Sotelo Cruz, N., Lindner, T. H., Herrmann, H., Reis, A., Sperling, K. Mutations in the gene encoding the lamin B receptor produce an altered nuclear morphology in granulocytes (Pelger-Huët anomaly). *Nat*

- Genet. 31:410-414, 2002.
30. Waterham, H. R., Koster, J., Mooyer, P., Noort Gv, G., Kelley, R. I., Wilcox, W. R., Wanders, R. J., Hennekam, R. C., Oosterwijk, J. C. Autosomal recessive HEM/Greenberg skeletal dysplasia is caused by 3 beta-hydroxysterol delta 14-reductase deficiency due to mutations in the lamin B receptor gene. *Am. J. Hum. Genet.* 72:1013-1017, 2003.
 31. Hellemans, J., Preobrazhenska, O., Willaert, A., Debeer, P., Verdonk, P. C., Costa, T., Janssens, K., Menten, B., Van Roy, N., Vermeulen, S. J., Savarirayan, R., Van Hul, W., Vanhoenacker, F., Huylebroeck, D., De Paepe, A., Naeyaert, J. M., Vandesompele, J., Speleman, F., Verschueren, K., Coucke, P. J., Mortier, G. R. Loss-of-function mutations in LEMD3 result in osteopoikilosis, Buschke-Ollendorff syndrome and melorheostosis. *Nat Genet.* 36:1213-1218, 2004.
 32. Navarro, C. L., Cadin˜anos, J., De Sandre-Giovannoli, A., Bernard, R., Courier, S., Boccaccio, I., Boyer, A., Kleijer, W. J., Wagner, A., Giuliano, F., Beemer, F. A., Freije, J. M., Caul, P., Hennekam, R. C. M., Lo´pez-Oti˜n, C., Badens, C., Le´vy, N. Loss of ZMPSTE24 (FACE-1) causes autosomal recessive restrictive dermopathy and accumulation of lamin A precursors. *Hum. Mol. Genet.* 14: 1503-1513, 2005.
 33. Bergo, M. O., Gavino, B., Ross, J., Schmidt, W. K., Hong, C., Kendall, L. V., Mohr, A., Meta, M., Genant, H., Jiang, Y., Wisner, E. R., van Bruggen, N., Carano, R. A. D., Michaelis, S., Griffey, S. M., Young, S. G. Zmpste24 deficiency in mice causes spontaneous bone fractures, muscle weakness, and a prelamin A processing defect. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 13049-13054, 2002
 34. Young, S. G., Meta, M., Yang, S. H., Fong, L. G. Prelamin A farnesylation and progeroid syndromes. *J. Biol. Chem.* 281: 39741-39745, 2006.
 35. Goldman, R. D., Shumaker, D. K., Erdos, M. R., Eriksson, M., Goldman, A. E., Gordon, L. B., Gruenbaum, Y., Khuon, S., Mendez, M., Varga, R., Collins, F. S. Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 8963-8968, 2004.
 36. Cao, K., Capell, B. C., Erdos, M. R., Djabali, K., Collins, F. S. A lamin A protein isoform overexpressed in Hutchinson-Gilford progeria syndrome interferes with mitosis in progeria and normal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 4949-4954, 2007.
 37. Dechat, T., Shimi, T., Adam, S. A., Rusinol, A. E., Andres, D. A., Spielmann, H. P., Sinen-sky, M. S., Goldman, R. D. Alterations in mitosis and cell cycle progression caused by a mutant lamin A known to accelerate human aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 4955-4960, 2007.
 38. Agarwal, A. K., Fryns, J. P., Auchus, R. J., Garg, A. Zinc metalloproteinase, ZMPSTE24, is mutated in mandibuloacral dysplasia. *Hum. Mol. Genet.* 12: 1995-2001, 2003.
 39. Mallampalli, M. P., Huyer, G., Bendale, P., Gelb, M. H., Michaelis, S. Inhibiting farnesylation reverses the nuclear morphology defect in a HeLa cell model for Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 14416-14421, 2005.
 40. Yang, S. H., Meta, M., Qiao, X., Frost, D., Bauch, J., Coffinier, C., Majumdar, S., Bergo, M. O., Young, S. G., Fong, L. G. A farnesyl-transferase inhibitor improves disease phenotypes in mice with a Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation. *J. Clin. Invest.* 116: 2115-2121, 2006
 41. Scaffidi, P., Misteli, T. Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nat Med.* 11: 440- 445, 2005.
 42. Scaffidi, P., Misteli, T. Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science* 312: 1059-1063, 2006.
 43. McClintock, D., Ratner, D., Lokuge, M., Owens, D. M., Gordon, L. B., Collins, F. S., Djabali, K. The mutant form of lamin A that causes Hutchinson-Gilford progeria is a biomarker of cellular aging in human skin. *PLoS ONE* 2 (12): e1269, 2007.
 44. Rodriguez, S., Coppedē, F., Sagelius, H., Eriksson, M. Increased expression of the Hutchinson-Gilford progeria syndrome truncated lamin A transcript during cell aging. *Eur. J. Hum. Genet.* 17: 928-937, 2009.
 45. Hennekam, R. C. Hutchinson-Gilford progeria syndrome: Review of the phenotype. *Am. J. Med. Genet. A.* 140: 2603-2624, 2006.
 46. Scaffidi, P., Misteli, T. Lamin A-dependent misregulation of adult stem cells associated with accelerated ageing. *Nat. Cell Biol.* 10: 452-459, 2008.
 47. Espada, J., Varela, I., Flores, I., Ugalde, A.

- P., Cadiñanos, J., Pendás, A. M., Stewart, C. L., Tryggvason, K., Blasco, M. A., Freije, J. M. P., López-Otin, C. Nuclear envelope defects cause stem cell dysfunction in premature-aging mice. *J. Cell Biol.* 181: 27-35, 2008.
48. Butterfield, D. A., Kanski, J. Brain protein oxidation in age-related neuro-degenerative disorders that are associated with aggregated proteins. *Mech. Ageing Dev.* 122: 945-962, 2001.
 49. Harman, D. Free radical theory of Aging: An update. Increasing the functional life span. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1067: 10-21, 2006.
 50. Nakamura, M., Morisawa, H., Imajoh-Ohmi, S., Takamura, C., Fukuda, H., Toda, T. Proteomic analysis of protein complexes in human SH-SY5Y neuroblastoma cells by using blue-native gel electrophoresis: An increase in lamin A/C associated with heat shock protein 90 in response to 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress. *Exp. Gerontol.* 44: 375-382, 2009.
 51. Schägger, H., von Jagow, G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* 199: 223-231, 1991.
 52. Schägger, H., Cramer, W. A., von Jagow, G. Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* 217: 220-230, 1994.
 53. Eaton, P., Jones, M. E., Mcgregor, E., Dunn, M. J., Leeds, N., Byers, H. L., Leung, K., Ward, M. A., Pratt, J. R., Shattock, M. J. Reversible cysteine-targeted oxidation of proteins during renal oxidative stress. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14: S290-S296, 2003.
 54. Charniot, J. C., Bonnefont-Rousselot, D., Marchand, C., Zerhouni, K., Vignat N., Peynet, J., Plotkine, M., Legrand, A., Artigou, J. Y. Oxidative stress implication in a new phenotype of amyotrophic quadriplegic syndrome with cardiac involvement due to lamin A/C mutation. *Free Radic. Res.* 41: 424-431, 2007.
 55. Verstraeten, V. L., Caputo, S., van Steensel, M. A., Duband-Goulet, I., Zinn-Justin, S., Kamps, M., Kuijpers, H. J., Ostlund, C., Worman, H. J., Briedé, J. J., Le Dour, C., Marcelis, C. L., van Geel, M., Steijlen, P. M., van den Wijngaard, A., Ramaekers, F. C., Broers, J. L. The R439C mutation in LMNA causes lamin oligomerization and susceptibility to oxidative stress. *J. Cell Mol. Med.* 13: 959-971, 2009.
 56. Tyner, S. D., Venkatachalam, S., Choi, J., Jones, S., Ghebranious, N., Igelmann, H., Lu, X., Soron, G., Cooper, B., Brayton, C., Hee Park, S., Thompson, T., Karsenty, G., Bradley, A., Donehower, L. A. p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* 415:45-53, 2002.
 57. Maier, B., Gluba, W., Bernier, B., Turner, T., Mohammad, K., Guise, T., Sutherland, A., Thorner, M., Scoble, H. Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53. *Genes Dev.* 18: 306-319, 2004.
 58. Furukawa, A., Tada-Oikawa, S., Kawanishi, S., Oikawa, S. H₂O₂ accelerates cellular senescence by accumulation of acetylated p53 via decrease in the function of SIRT1 by NAD⁺ depletion. *Cell Physiol. Biochem.* 20:45-54, 2007.
 59. 及川伸二、古川純子、村田真理子、川西正祐 酸化ストレスによるDNAやタンパク質の損傷を介した老化促進機構. *基礎老化研究* 33: 9-16, 2009.
 60. Varela, I., Cadiñanos, J., Pendas, A. M., Gutiérrez-Fernández, A., Folgueras, A. R., Sánchez, L. M., Zhou, Z., Rodríguez, F. J., Stewart, C. L., Vega, J. A., Tryggvason, K., Freije, J. M. P., López-Otin, C. Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation. *Nature* 437: 564-568, 2005.
 61. Rahman-Roblick, R., Roblick, U. J., Hellman, U., Conrotto, P., Liu, T., Becker, S., Hirschberg, D., Jörnvall, H., Auer, G., Wiman, K. G. p53 targets identified by protein expression profiling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 5401-5406, 2007.
 62. Novelli, G., Muchir, A., Sangiulo, F., Helbling-Leclerc, A., D'Apice, M. R., Massart, C., Capon, F., Sbraccia, P., Federici, M., Lauro, R., Tudisco, C., Pallotta, R., Scarano, G., Dallapiccola, B., Merlini, L., Bonne, G. Mandibuloacral dysplasia is caused by a mutation in LMNA-encoding lamin A/C. *Am. J. Hum. Genet.* 71: 426-431, 2002.
 63. Mattout, A., Dechat, T., Adam, S. A., Goldman, R. D., Gruenbaum, Y. Nuclear lamins, diseases and aging. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18:335-341, 2006.
 64. Scaffidi, P., Gordon, L., Misteli, T. The cell nucleus and aging: Tantalizing clues and hopeful promises. *PLoS Biology* 3: e395, 2005

A-type lamins--their multiple functions in cells and the key role in aging

Megumi Nakamura, Hiraku Morisawa, Tosifusa Toda

Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology
Research Team for Mechanism of Aging, proteome
35-2, Sakae-cho, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, Japan

Abstract

Nuclear lamins A, C, B1, and B2 are intermediate filament proteins and the major structural proteins of the nuclear lamina, a filamentous meshwork beneath the inner nuclear membrane. Lamin A participates in DNA replication, chromatin organization, nuclear pore arrangement, nuclear growth, and nuclear membranes anchorage. Recently, A-type lamin mutations have been linked to a variety of rare human diseases including Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS), muscular dystrophy, neuropathy, lipodystrophy and cardiomyopathy (termed laminopathies). A series of studies on the *LMNA* mutations and the cellular dysfunctions leading to laminopathies also opened up new horizons in the aging research. In this review, we discuss the molecular mechanism of HGPS and the link between age-related nuclear defects and the normal aging process.

【トピックス】

骨格筋重量維持機構と筋衛星細胞

深田宗一郎、山元 弘

大阪大学大学院薬学研究科 細胞生理学分野

1. はじめに

加齢性筋肉減弱症（サルコペニア）や筋ジストロフィーなどの疾患では進行性の筋重量・筋力低下・筋線維数の減少が見られ、日常生活動作（ADL）が著しく障害される。本来骨格筋は優れた再生能力を備えているが、これら疾患においては筋再生能力の低下が報告されている。特にサルコペニアにおいてはなぜ筋重量や筋再生能力が低下していくのかは明らかでないが、骨格筋再生において中心的な役割を担う骨格筋特異的幹細胞—筋衛星細胞—の数や能力との関係が示唆されている。

2. 筋衛星細胞の優れた自己複製能

筋衛星細胞は骨格筋の基底膜と筋線維の間に存在する単核の細胞で、通常、静止状態を維持している（図1）。骨格筋が傷害を受けると筋衛星細胞は速やかに活性化・増殖しその後互いに融合し、筋管を形成する。つづいて、筋管の成熟や神経支配が誘導されることで筋再生過程は完了する。この筋再生過程においてもう1つ重要なイベントは、次の傷害に应答するために、筋衛星細胞が自己自身を生み出す（自己複製）機構である。実際Collinsらはマウスを用いて筋衛星細胞が自己複製し、次の傷害に应答することを示している [1]。また、LuzらはC57BL/10マウスにピピバカイン（局所麻酔薬の一種で神経系、血管系、筋衛星細胞には傷害を与えることなく筋線維に傷害を与える）を投与して、50回の傷害—再生サイクルを誘導しても、筋線維の太さや、組織像に大きな変化がないことを報告している [2]。これらの実験結果は筋衛星細胞の優れた自己複製能により、繰り返しの筋再生を可能にしていることを示している。

3. 加齢と筋衛星細胞増殖・自己複製能

筋衛星細胞の増殖能が加齢にともない低下することはラットを用いた *in vitro* の実験により報告されていたがその分子機構は不明であった [3]。しかし、近年スタンフォード大学のRandoらのグループは、NotchやWntシグナルが加齢による筋再生能力の低下に関与していると報告している。彼らは「老齢マウスの血漿成分がNotchシグナルの活性化を阻害するため、筋衛星細胞の増殖能が抑制され筋再生能力が低下する」という機構 [4] と「加

齢にともなうWntシグナルの増強が筋衛星細胞を線維芽細胞に分化転換することで筋再生能力が低下する」という機構を提唱している [5]。一方、Zammitらのグループも加齢にともない筋衛星細胞が線維芽細胞などの非筋細胞になる可能性を示唆しているが、若齢・老齢マウスの筋衛星細胞の自己複製能や分化能には違いがないとも報告している [6]。NotchやWntシグナルと筋再生との関わりは不明な点が多く、Randoらの提唱する機構がヒトのサルコペニアにもあてはまるか否かは更なる検討が必要であると思われる。また、これらの実験はすべて生後約二年齢のC57BL/6マウスを用いた実験であるが、C57BL/6はそれほど顕著なサルコペニアを示さない。また慢性的な筋変性—再生を繰り返す、筋ジストロフィーのモデルマウス *mdx* (C57BL/6の垂系統であるC57BL/10が遺伝背景)もヒトの様な筋重量低下を示すことはなく、逆に筋肥大になることが知られている [7]。さらに造血幹細胞の加齢研究もC57BL/6マウスが採用されているが、他の系統に比較してC57BL/6の造血系の老化の特徴は他のマウス系統と異なると言われている [8]。

4. DBA/2と骨格筋重量

われわれはこれまで、筋衛星細胞を中心に骨格筋再生に関する研究を進めて来た [9-13]。その研究過程で、代表的な近交系マウスの繰り返し再生後の筋衛星細胞数・能力の維持、すなわち自己複製能を検討する実験を行った。具体的にはC57BL/6, BALB/c, C3H/HeN, DBA/2マウスに2週間隔で計6回のカルジオトキシン（蛇毒の一種でピピバカイン同様、筋線維膜を特異的に傷害すると考えられている）による骨格筋傷害を与えることで、筋衛星細胞に活発な増殖や自己複製を誘導した。その結果、一度の筋傷害では特に

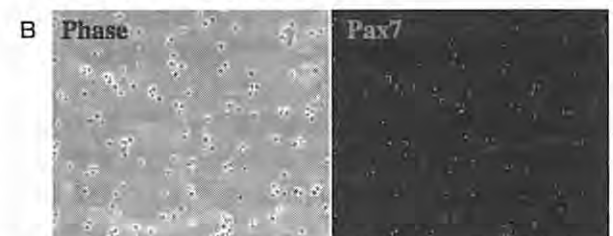


図1（カラー図は表紙に掲載）

A：筋衛星細胞の免疫染色

B：筋衛星細胞を単離直後に筋衛星細胞マーカーであるPax7で染色した

連絡先：〒565-0871

大阪府吹田市山田丘1-6

TEL: 06-6879-8193

FAX: 06-6879-8194

E-mail: fukada@phs.osaka-u.ac.jp

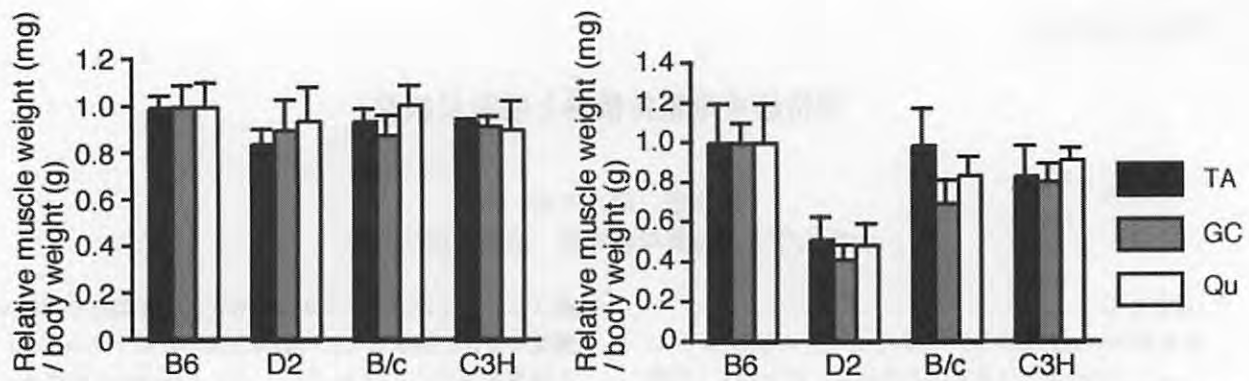


図2 C57BL/6 (B6) の前脛骨筋 (TA)、腓腹筋 (GC)、大腿四頭筋 (Qu) 重量を体重で割った値を1とした時の各種マウスの値。カルジオトキシンを投与していない場合 (左図) は大きな差はないが、カルジオトキシンを2週間隔で6回 (右図) 投与すると DBA/2 (D2) マウスでは顕著な筋重量低下が観察された。

大きな筋再生不全は観察されないが、DBA/2は繰り返し再生後、筋重量が元の約半分になることが明らかとなった (図2)。一方BALB/cやC3H/HeNはDBA/2程の筋重量低下は示さなかったがC57BL/6よりは劣っていた。またC57BL/6とDBA/2マウスのF1マウスを用いた実験からこの筋重量の低下は劣性遺伝であり、また筋重量低下の原因は筋線維数や筋の太さの減少であることもわかった。

つぎにわれわれは、*mdx*マウスの遺伝背景をDBA/2に戻し交配することで筋重量低下が誘導されるか否かを検討した。その結果同腹のコントロールマウスに比較して、DBA/2-*mdx*では慢性的な筋傷害による顕著な筋重量の低下 (大腿四頭筋では雌雄とも約半分) を観察することができた (図3)。非常に興味深いことにDBA/2マウスはC57BL/6マウスと比較して顕著な加齢にともなう骨格筋重量低下を示すことが報告されている [14]。以上のことからDBA/2マウスは慢性的筋傷害・加齢など様々なモデルで筋重量が低下しやすいマウスであることがわかった。

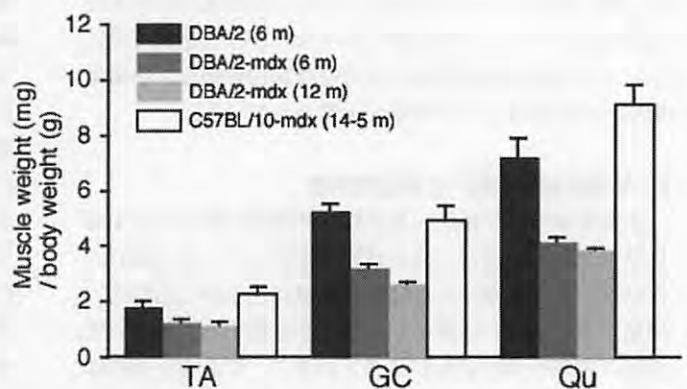


図3 DBA/2、DBA/2-*mdx*及びC57BL/10-*mdx*の筋重量 (mg) /体重 (g) 重

5. DBA/2筋衛星細胞の自己複製能

筋線維の元となる細胞は筋衛星細胞が主であり、筋重量や筋再生能力の低下は筋衛星細胞の数や機能と直接結び付くと考えられる。そこで、C57BL/6マウスとDBA/2間での筋衛星細胞数について検討した。その結果、傷害を与えていない両系統間で筋衛星細胞数に顕著な違いは観察できないが、繰り返し再生を誘導することでDBA/2においては有意な筋衛星細胞数の減少が観察された。この結果はDBA/2の筋衛星細胞の自己複製能力がC57BL/6マウスに比較して劣っていることを示しており、その結果再生過程で作られる筋線維数が減少し、筋重量が著しく低下したと考えられる。

DBA/2とC57BL/6の筋衛星細胞の質的な違いがあるかを調べる目的で、それぞれの筋衛星細胞を単離し、培養後増殖させたところ、BrdUの取り込みやコロニー形成能に違いが見られた。以上の結果はDBA/2とC57BL/6の筋衛星細胞の質的な違いが加齢や慢性的な筋再生での筋重量の違い関与している可能性が考えられる。

6. おわりに

今回われわれは1) 加齢により顕著な筋重量低下を示すDBA/2マウスは慢性的な筋再生でも筋重量が低下していくこと、2) DBA/2の筋衛星細胞はC57BL/6と比べて筋衛星細胞増殖能・自己複製能が弱いことを明らかにした。慢性的な筋変性やサルコペニアで見られる筋重量維持機構と筋衛星細胞機能、特に自己複製機構とは密接な関係があると考えられているがその分子機構はこれまでわかっていない。われわれはDBA/2とC57BL/6の二系統間の研究から今後、筋衛星細胞の質的な違いを反映する遺伝子を同定することで筋衛星細胞の自己複製機構に関わる因子を探索すると同時に、筋衛星細胞を標的としたサルコペニア予防戦略に結びつけたいと考えている。

語句説明

mdx: ジストロフィン遺伝子の異常が原因であるデュシェンヌ型筋ジストロフィーのモデルマウス。

参考文献

- Collins CA, Olsen I, Zammit PS, Heslop L, Petrie A, Partridge TA and Morgan JE. Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell* 122:289-301, 2005.
- Luz MA, Marques MJ and Santo Neto H. Im-

- paired regeneration of dystrophin-deficient muscle fibers is caused by exhaustion of myogenic cells. *Braz J Med Biol Res* 35:691-5, 2002.
3. Schultz E and Lipton BH. Skeletal muscle satellite cells: changes in proliferation potential as a function of age. *Mech Ageing Dev* 20:377-83, 1982.
 4. Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ, Girma ER, Weissman IL and Rando TA. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature*. 433:760-4, 2005.
 5. Brack AS, Conboy MJ, Roy S, Lee M, Kuo CJ, Keller C and Rando TA. Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science* 317:807-10, 2007.
 6. Collins CA, Zammit PS, Ruiz AP, Morgan JE and Partridge TA. A population of myogenic stem cells that survives skeletal muscle aging. *Stem Cells* 25:885-94, 2007
 7. Pastoret C and Sebillé A. mdx mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. *J Neurol Sci* 129:97-105, 1995.
 8. Dykstra B and de Haan G. Hematopoietic stem cell aging and self-renewal. *Cell Tissue Res* 331:91-101, 2008.
 9. Fukada S, Miyagoe-Suzuki Y, Tsukihara H, Yuasa K, Higuchi S, Ono S, Tsujikawa K, Takeda S and Yamamoto H. Muscle regeneration by reconstitution with bone marrow or fetal liver cells from green fluorescent protein-gene transgenic mice. *J Cell Sci* 115:1285-93, 2002.
 10. Fukada S, Higuchi S, Segawa M, Koda K, Yamamoto Y, Tsujikawa K, Kohama Y, Uezumi A, Imamura M, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S and Yamamoto H. Purification and cell-surface marker characterization of quiescent satellite cells from murine skeletal muscle by a novel monoclonal antibody. *Exp Cell Res* 296:245-55, 2004.
 11. Fukada S, Uezumi A, Ikemoto M, Masuda S, Segawa M, Tanimura N, Yamamoto H, Miyagoe-Suzuki Y and Takeda S. Molecular signature of quiescent satellite cells in adult skeletal muscle. *Stem Cells* 25:2448-59, 2007.
 12. Fukada S, Yamamoto Y, Segawa M, Sakamoto K, Nakajima M, Sato M, Morikawa D, Uezumi A, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Tsujikawa K and Yamamoto H. CD90-positive cells, an additional cell population, produce laminin alpha2 upon transplantation to dy(3k)/dy(3k) mice. *Exp Cell Res* 314:193-203, 2008.
 13. Segawa M, Fukada S, Yamamoto Y, Yahagi H, Kanematsu M, Sato M, Ito T, Uezumi A, Hayashi S, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Tsujikawa K and Yamamoto H. Suppression of macrophage functions impairs skeletal muscle regeneration with severe fibrosis. *Exp Cell Res*. 314:3232-44, 2008.
 14. Lionikas A, Blizard DA, Vandenberg DJ, Stout JT, Vogler GP, McClearn GE and Larsson L. Genetic determinants of weight of fast- and slow-twitch skeletal muscles in old mice. *Mamm Genome* 17:615-28, 2006.

【トピックス】

MUSTag法による超高感度同時多項目測定

芝崎 太¹⁾、森實 芳仁¹⁾²⁾、横坂典子²⁾

¹⁾ 東京都臨床医学総合研究所 がん・生活習慣病プロジェクト

〒156-8506 東京都世田谷区上北沢2-1-6

²⁾ シンセラ・テクノロジーズ株式会社

〒113-0021 東京都文京区本駒込4-5-1 白岩ビル1F

キーワード：1) 蛋白バイオマーカー、2) 免疫PCR、3) 遺伝子増幅、4) 多項目測定

1. 始めに

近年、社会的に大きな問題となっている少子高齢化は、将来に様々な問題を生じることが懸念されている。厚生労働省の統計では、現在高齢化が加速されており、2020年には、65歳以上の人口は35.2%になり、3人に1人の割合になると予想されている。このような状態に加え少子化が加わると、労働人口の増加と扶養すべき高齢者の増加により、医療費の増加、特に老人医療費の増加により医療費のさらなる膨張と保険財政の破綻が懸念される。2006年には国民医療費が33兆円を突破し、2008年には34兆円を越えてしまっている(図1)。特に増え続ける癌、糖尿病に加え、脳卒中、心筋梗塞など患者数は減少傾向を見せているもののその後遺症が及ぼす影響は患者のみならず家族にとっても大きな負担になっている。この状況を打破し医療費の削減や患者のQOL向上を実現する為にも、「予防医学」が重要な意味を持つとともに、疾患を早期に診断し、的確な薬効予測に基づく投薬で早期に完治する「早診完治」の確立が重要である。具体的な課題としては、①疾患を予防することによる健康維持増進、②疾患の早期診断・早期治療による迅速な社会復帰、③適切な治療法の提供による患者個人にあった医療の実現を通じて健康寿命の延伸、QOLの向上を図るとともに、④本分野における関連産業の国際競争力強化が挙げられる。

このような診断法の確立を目指す上で最も重要な標的

連絡先：〒156-8506
 東京都世田谷区上北沢2-1-6
 東京都臨床医学総合研究所 がん・生活習慣病プロジェクト
 プロジェクトリーダー 芝崎 太
 Tel：03-5316-3299
 Fax：03-5316-3173
 e-mail：shibasaki-ft@igakuken.or.jp

「高齢者の世紀」の到来と予防医学



図1. 診断を取り巻く現状：高齢化社会の到来

は、遺伝子や蛋白質バイオマーカーである。この中でも疾患のリアルタイムな病態判断は、遺伝子からの最終産物である蛋白質の量比やリン酸化、分解など、その活性化状態の解析を行わない限り不可能であり、また細胞外分泌蛋白質を利用することにより、血清・髄液・関節液などを用いて、アッセイの簡便さ、時間の短縮、安定性などが増し、低コスト化が期待できる。さらには、尿、唾液、涙液、汗、子宮粘液などを用いれば非侵襲的にアッセイが可能となる。

バイオマーカーの探索研究は世界中で活発に行われており、診断のみならず新規薬剤の臨床試験における指標としての期待が高い。しかしながら、これまでSwissProtやLocusLinkなどの蛋白質データベースを分子生物学的に解釈することは一般におこなわれているが、医学的・生理学的な変化に伴って変動する血中濃度との相関性が取れているのはわずか500種類程度しかない[1]。アンダーソンらによると、4つの異なる手法で同定された血漿中のNon-redundantな蛋白質1175個のうち、2つ以上の方法で確認できたのは195個、4つの手法すべてで確認できたのは46個であった[2,3]。バイオマーカー候補を同定した後の検証実験では、網羅的な解析はかなら

ずしも必要ではなく、少数のタンパク質を対象に安価に簡便に多検体をスクリーニングする技術が必要とされる。また、検証実験を促進するためには、信頼できる技術とプロトコルを普及させ、多施設のデータを統合できるような研究環境を構築すること、さらには、厳密に表現型を規定した「良質の試料」を用い、解析方法も迅速かつ再現性の高いものでなければならない。

2. バイオマーカーの実用化について

通常、様々な方法で疾患と相関するバイオマーカーが同定されれば、個々のマーカーをELISA、EIAなどで定量的に検査する。しかしながら、腫瘍マーカーを例にとって見てもわかるように、単一マーカーの特異度、感度は満足できるものではなく早期診断に使うには限界がある。大腸癌ではCEA, CA19-9, CA125, CA72-4, NCC-ST-439, IAP, TPA, ICTPなど多くの診断マーカーが使われるが、早期発見は今もって血便検査に大きく依存しており、これらのマーカーは確定診断された後の治療経過や再発モニタリングに有用である。これまでに見だされてきた多くの蛋白バイオマーカーは、従来の蛋白アッセイ法では感度が悪く、臨床に応用するためには高感度でしかもコストの安い新しい基盤技術が求められている。

これらの問題点を解決する次世代の診断基盤技術の6つの条件を挙げると、①技術は簡便（理解と普及に役立つ）、②超高感度（微量のサンプルや超早期の病態を反映）、③同時多項目測定（3-10個のバイオマーカーの同時測定）、④迅速・簡易（ベッドサイドや診療所などでも簡単に迅速に結果を売ることができる）⑤定量測定（確定診断には重要）、⑥安価（厚労省の保険点数化には製造コストを低く抑えることが必須）、などが上げられる（図2）。

新しい診断技術開発に必要な6つの条件

1. 技術がシンプル(普及に必須)
2. 超高感度(微量サンプル測定や超早期の病態を反映)
3. 同時多項目測定(3-10個のバイオマーカーの同時測定)
4. 迅速・簡易
5. 定量測定
6. 安価



将来には

測定機器が不要で家庭でも検査可能

革新的診断技術の3要素

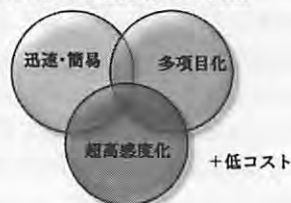


図2. 革新的技術の3要素

特にこの中で、重要な3要素としては、多項目化、超高感度化、迅速・簡易化であろう。また、将来的にOTC(Over-The-Counter)診断薬の普及を考えると、測定機器が必要のないイムノクロマトのような簡易な診断法が重要となる。

私達は、上記のコンセプトのもと、生活習慣病を含む多くの疾患の超早期診断、薬剤の感受性予測、予防的治療法などの「個別化医療」を目指して新たな診断基盤技術の開発を進め、以下述べる超高感度多項目同時診断法(MUSTag: Multiple Simultaneous Tag)の開発に成功した。

3. MUSTag法の原理

MUSTag法は、抗体に特定の長さのオリゴ(オリゴヌクレオチド100- 600 mer)を付加したコード化抗体を用いる蛋白バイオマーカーの検出手法で、複数のバイオマーカーを一斉、迅速に、且つ高感度で定量測定しうる。この基本原理は、免疫PCR(immuno-PCR)法として1992年にSanoらによって報告され[4]、蛍光物質や酵素の代わりに特定の長さ・配列のオリゴDNA鎖を抗体に標識し、PCRを用いて抗原抗体反応のシグナルを増幅することで高感度を得る方法である[5, 6]。免疫PCR(immuno-PCR)の原法では、オリゴDNAと抗体との結合における非効率性と、PCRで増幅するためバックグラウンドが高く、正確な標的蛋白の定量ができないため10年以上実用化に至らなかった経緯がある。私たちは、上記の問題点を克服するため、抗体-DNA間の結合にProtein Gとアビジンの融合タンパク質をアダプターとして用いることで、①結合効率90%以上、②作製時間30分以内、③使用品目をすべてディスプレイ化、④低コストが可能となった(図3)。すでにシンセラ・テクノロジーズ社(<http://www.synthera.co.jp/>)が製造元になりCybergreenを用いてサイトカイン・増殖因子の単項目検出用の1 x 6 Series、また、TaqManプローブ法にて3項目同時に測定可能な3plex検出キットをすでに研究用として販売している。

本MUSTag法は、解析プラットフォームの一つとして、既に広く普及している定量Real-Time PCR(qRT-PCR)やDNA判読装置(Sequencer)を用いることができる。MUSTag法によるアッセイは従来のサンドイッチELISA法と同様のプレート(PMA: Plate MUSTag Assay)や磁気ビーズ(BMA: Bead MUSTag Assay)などの反応系を用いて行う[7]。オリゴDNA鎖にはEcoRI切断部位が挿入されているので、洗浄後、プレート上の抗原と反応したMUSTag化抗体のDNA部分をEcoRIで切断・回収して、qRT-PCRにより検出が可能である。この場合、MUSTag化抗体により抗原抗体反応のシグナルをDNA量に変換し、qRT-PCRで定量性を維持しつつ増幅させることで、従来の酵素標識等を用いた検出法と比較して非常に高い検出感度を再現性良く得ることができる(図4)。現在推奨できる測定法は、単一測定(Singleplex)ではCybergreenなどのインターカラーターを用いて、複数同時測定(Multiplex)ではTaqMan法(蛍光プ

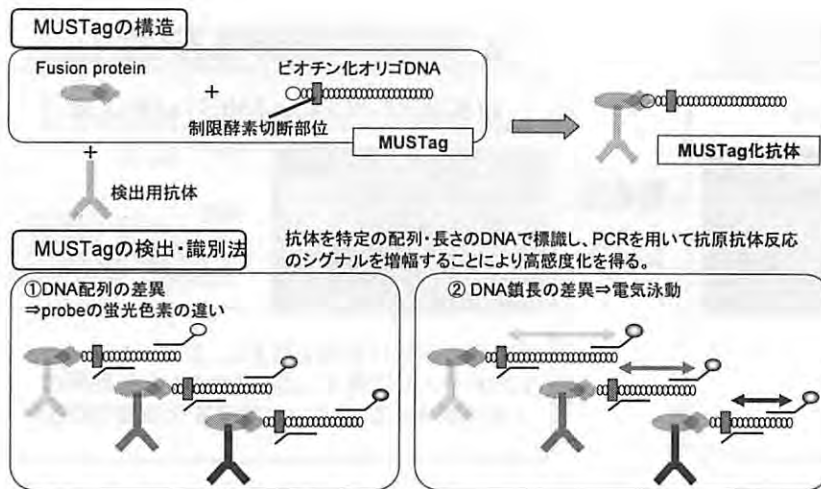


図3. MUSTag の基本原理と蛋白バイオマーカーの測定

抗体をオリゴDNA(100-500bp)で標識し、PCRによって抗原抗体反応のシグナルを増幅させて検出する。MUSTag法ではアダプターにProtein Gとアビジンの融合蛋白質を用いることで標識効率の向上及びロット間差の低減に成功している。また標識するDNAを抗体毎に違えることで、A) DNA配列の差異を蛍光標識プライマー・プローブの色素の違いにより識別する、B) DNAの鎖長の差異を電気泳動により識別する等の方法により、複数の抗原の同時検出が可能になる。

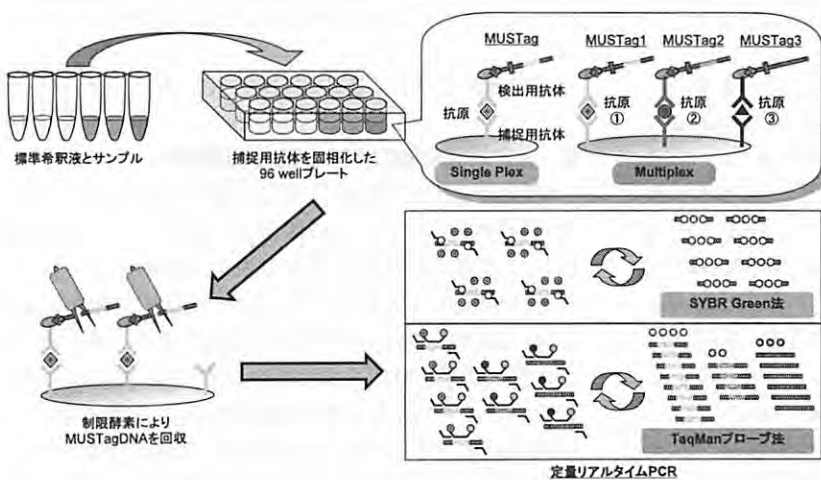


図4. MUSTag同時多項目アッセイの手順

MUSTag法による多項目同時測定を行う場合は、測定対象に対する捕捉用抗体を1ウェル上に複数種類固相化しておき、サンプル中の抗原を同時に捕捉する。MUSTag反応後のリアルタイムPCRによる検出の際に、TaqManプローブの蛍光色素の違いにより各抗原抗体反応を識別する。なお単項目での測定の場合はインターカレーター法を用いることでより簡便に検出を行える。

ローブ法)を用いたqRT-PCRである。各標識DNA鎖に対応するプローブの色素を違えることで、現時点で最大4種類の抗原の同時検出・定量(Stratagene社のMx3005Pの使用を推奨)が可能になった。

4. MUSTag法の感度とELISA法との比較

MUSTagの測定では、血清中や組織中などの蛋白質が標的になり、また、同時測定項目数など、各条件でPCRの条件も異なる可能性はあるが、これまでにMUSTagを用いたPMAやBMAでの感度を測定した。TaqMan法によるqRT-PCRにてR&D Systems社から購入したIL-1 α

| | ELISA | MUSTag | Efficiency |
|------|------------|-------------|------------|
| IL-6 | 19 pg/mL | 0.17 pg/mL | x110 |
| IL-8 | 36 pg/mL | 0.067 pg/mL | x530 |
| EGF | 26 pg/mL | 0.016 pg/mL | x1,700 |
| FGF | 520 pg/mL | 25 pg/mL | x21 |
| HGF | 1100 pg/mL | 45 pg/mL | x24 |
| VEGF | 110 pg/mL | 0.37 pg/mL | x290 |

図5. 培養細胞上清中サイトカイン3 Plex 同時多項目アッセイ

シンセラ社のサイトカイン (IL-6, IL-8, EGF)、および血管新生因子 (bFGF, HGF, VEGF) 3plex検出キットを用いて、正常ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) の培養上清中の各因子の濃度を測定し、MUSTag法による各測定因子のELISA法との感度比較を行った。

のELISAサンドイッチアッセイ用抗体2種類を用いて、BMAにより解析した結果、1ng/mlから最高達成感度 8 fg/mlまで優れた定量性を示し、超高感度域においてもスタンダードを置くことにより定量測定が可能であることが明確になった。ただ、このような超高感度の測定は、使用する抗体の特異性やKd値、また使用する生体サンプルに依存する。

シンセラ社製のサイトカイン (IL-6, IL-8, EGF) および血管新生因子 (bFGF, HGF, VEGF) 3plex検出キットを用いて、正常ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) の培養上清中の各因子の濃度を測定した結果を示す (図5)。まず、比較的感度がよく、従来のELISA法でも頻用されている、IL-6, IL-8, EGFに関して、一定の刺激による正常ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) の培養上清中濃度を測



図6. MUSTag 法による臨床診断薬開発

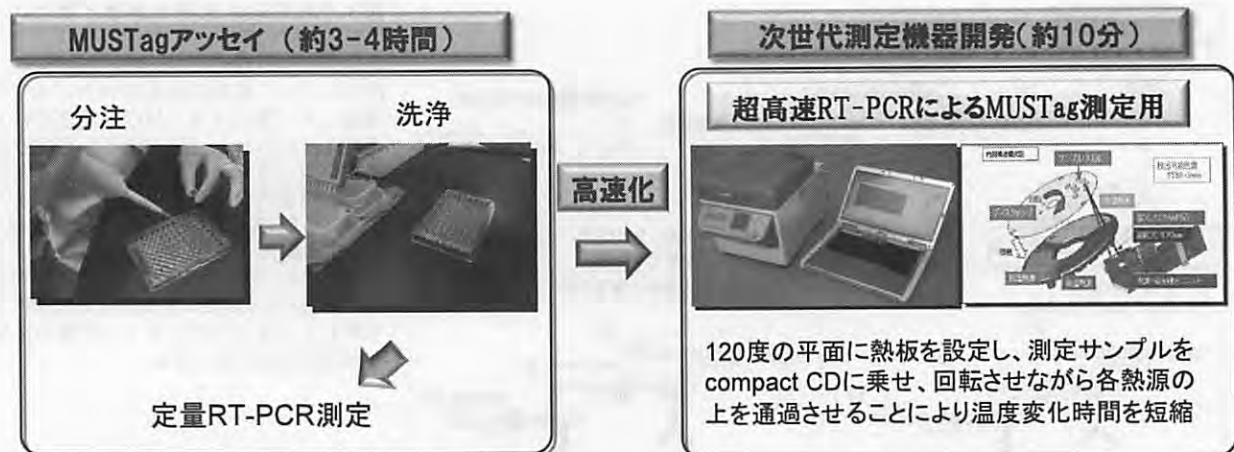


図7. 超高速RT-PCRの開発

平面上に3種類の温度板を配置し、CDにサンプルを乗せ回転させることによって、従来の温度の上げ下げにかかる時間を最小限にした結果、10分以内に50-60サイクルの増幅が可能となった。経時的に測定することによりqRT-PCRも可能であり、また、RNA型ウイルスなど、逆転写酵素を含めた逆転写+遺伝子増幅の定量を行うことができるため、迅速な遺伝子検査法としての応用も期待されている。

定した。従来のELISA法では、培養上清200 μ lを用い、それぞれ最高感度がIL-6 (19 pg/ml)、IL-8 (36pg/ml)、EGF (26 pg/ml)であったが、培養上清の各1 μ lを用いたMUSTag法による3 Plex同時測定では、各サイトカインの最高感度は、それぞれIL-6 (0.17 pg/ml)、IL-8 (0.067pg/ml)、EGF (0.016pg/ml)とそれぞれ110倍、530倍、1,700倍の感度上昇が得られた。一方、ELISA法では因子の検出が不可能だったbFGF、HGF、VEGFの各因子に関しても、測定値が測定可能レンジ内に収まること確認され、培養上清200 μ lを用いることで、0.37pg/mlから45fg/mlの範囲で測定できた(図5)。以上より本MUSTag法を用いることで、①従来測定できなかった因子が測定可能となり、また②使用するサンプルの量が少なく、一回の実験で数10-100項目の測定が可能となった。特に②の利点は、遺伝子改変マウスの血液など、少量の血清しか得られない場合や、マウスを殺さず経時的に観察したい場合などに有利な条件である。

5. MUSTag法の臨床応用

MUSTag法の臨床応用に関しては、これまでに①血清を用いたC型肝炎ウイルスのコア蛋白、②濾紙血から抽出した α -galactosidaseの定量による遺伝病であるFabry病の診断、およびその他Gaucher病、Pompe病の3種類同時診断、③子宮頸部粘液をもちいた子宮頸癌の早期診断、④尿を用いた膀胱癌の治療効果予測、などの開発を進めている。また、その他の疾患として、髄液を用いたアルツハイマー(Alzheimer)病、血清を用いた脳卒中や救急疾患などの早期診断、治療効果予測などの開発も始めている(図6)。これらの結果から、MUSTag法は従来のELISAとほぼ同じく、各種の体液、組織抽出液などほぼすべての臨床サンプルに対応できることが明らかとなっている。特に尿や髄液はサンプル中のアルブミンやグロブリン、その他の挟雑蛋白が少なく、fg/mlレベルの検出が可能である。今後は、パラフィン固定サンプルでのMUSTag法の応用も進めており、多くの臨床疾患の早期診断、治療効果予測、予後判定、多疾患同時診断な

ど応用範囲はおおくなると期待している。

6. 測定時間短縮のための測定機器開発

MUSTag法での測定は、ELISA法に準じた手技と反応後にMUSTagオリゴを制限酵素で切り出し、定量RT-PCRでの測定の順序を経る方法が一般的である。このとき抗原抗体反応系に最低2時間、定量RT-PCRの測定時間に2時間、合計4時間程度が必要となる。癌や痴呆症など検査結果に時間を要してもかまわない場合には問題はないが、感染症など感染現場や外来での測定など、短時間で結果を得る必要がある場合には測定時間が大きな障壁になる。私達はまずPCRの時間短縮を目的に共同開発を行い、100-200 bpの長さのDNAならば10分以内に定量RT-PCR測定が可能な超高速RT-PCRを開発した。この遺伝子増幅機器は従来の方法で用いている温度の上げ下げの時間を短縮させるため、平面の熱板を120度の面積ごとに温度を変える方式をとり、測定サンプルをcompact CDに乗せることにより一回の回転でdenature (95度)、Annealing (55度)、Extension (72度)の熱源の上を通過させ、驚異的な時間短縮に成功した(図7)。これによりMUSTagアッセイの測定時間がほぼ1/2程度に短縮できた。また、遺伝子増幅であるため、MUSTag法の測定だけでなく、感染症に関わるウイルスや細菌の遺伝子検出に大きな威力を発揮する。実際、東京都福祉保健局が進めているインフルエンザ対策の一環として、本超高速PCRを使用した迅速インフルエンザ遺伝子診断への応用を開始し、今秋にはその測定機器として上市予定である。

7. まとめ

これまでに多くのバイオマーカーが発見され、複数種類のタンパク質を同時に、かつ高感度に定量するための診断測定技術の需要が高まってきている。新しく開発されたMUSTag法は、検体の調製法やアッセイの操作手順といった従来のプレート法、ビーズ法でのノウハウをそのまま生かしつつ測定を高感度化・多項目化させること

ができ、これらのニーズを満たしうる基盤技術である。そのため、既存のELISA法を用いた実験系にて即座に活用することが可能であり、基礎研究から臨床応用に至る様々な蛋白質測定において簡易かつ有力なツールになりうると考える。本法は、抗原抗体反応+遺伝子増幅での測定にかかる時間が少なくとも2-4時間で完了するが、感染症などの診断では数10分での測定が必須となる場合がある。このような高速化を目指す開発として、超高速RT-PCRあるいは高速ELISAチップなどにより、全行程15分以内の測定時間が達成できる可能性を考えている。今後、①同時多項目測定、②超高感度、③高速化の3要素を満たすことにより、さらに基礎分野、臨床分野のみならず、創薬、食品などの分野への応用が飛躍的に進むと予想される。

8. 引用文献

1. Mark S et al : Biomedical informatics for proteomics, *Nature*, **422**, 233-237, 2003
2. Anderson, L. et al : High resolution two-dimensional electrophoresis of human plasma proteins, *Pros. Natl. Acad. Sci.* **74**: 5421- 1997
3. Anderson, L et al : The human plasma proteome: A non-redundant list developed by combination of four separate sources *Molecular and Cellular Proteomics* **3**: 311-26, 2004 (<http://www.mcponline.org/>)
4. T. Sano, C. L. Smith, and C. R. Cantor, *Science (New York, N.Y)* **258** (5079), 120 (1992).
5. M. Adler, R. Wacker, and C. M. Niemeyer, *Biochemical and biophysical research communications* **308** (2), 240 (2003).
6. H. Zhang, X. Cheng, M. Richter et al., *Nature medicine* **12** (4), 473 (2006); C. M. Niemeyer, M. Adler, and R. Wacker, *Nature protocols* **2** (8), 1918 (2007).
7. 森實芳仁等、実験医学 クローズアップ実験法 2008年 印刷中

【学会報告】

第19回国際老年学会 XIXth IAGG World Congress of International Association of Gerontology and Geriatrics

田中 雅嗣

東京都健康長寿医療センター研究所・老化制御・健康長寿ゲノム探索

2009年7月5日～9日にパリで開催された第19回世界老年学会に出席した。会議の主題は「長寿・健康・繁栄 (Longevity, Health and Wealth)」であった。以下は、学会報告とは名ばかりの個人的見解の羅列であるので、ご了承願いたい。

パリは10年ぶりであった。前回パリにはイスラエル Tel-Avivにあるワイツマン研究所 (Weizmann Institute) の後に訪問した。応用生化学研究所長と岐阜県国際バイオ研究所長を兼務されていた八木國夫先生に連れられて、モンマルトルの傍らのフランス科学アカデミーのMarianne Grunberg-Manago教授らを訪問した。八木先生は「老化は生理的過程ではなく病気である。従って治療が可能な病態である」と主張され、過酸化脂質が老化過程の主因であると看破された。その八木先生の下で、私は長寿に関連するミトコンドリアゲノム多型の研究を始めていた (*Lancet* 1998;351:186-187)。Marianneさんは、セベロ・オチョア教授 (1959年ノーベル賞受賞) と一緒に仕事をされた生化学者であり、国際生化学連合の会長であった。宮崎アニメ「天空の城ラピュタ」に出てくる海賊の女船長「ドーラ」に似ているが、笑顔の優しい方で、私の解析結果を楽しんで聞いて下さった。久しぶりにパリの町に立って、歴史あふれるフランス科学アカデミーでの思い出が甦った。

さて、国際会議場は地下鉄の駅に直結しているのでアクセスは容易である。私は6日から参加し、8日朝8時からの口頭発表では、Mitochondrial genome haplogroup D4a is enriched in Japanese semi-supercentenariansとして題して、日本人超百寿者で見いだされたミトコンドリアゲノム多型について報告した (Bilal E et al. *PLoS ONE* 2008;3:e2421)。この学会はとても巨大である。コンgresバッグに入っていた抄録集は昔の電話帳のように分厚かったので閉口した。ともかく、社会学、人口学、政治学、経済学などに関連する老年学の広大な領域の発表が行われている。認知症に対する研究体制の国際比較に関するシンポジウム (Alzheimer's disease and related disorders: Cross national comparison of strategic action) に参加した。私自身は、安定同位元素 (^{13}C) で標識した呼吸吸質を使って脳のエネルギー代謝を非侵襲的に測定し、認知症を早期に発見することが可能ではないかと考えている。 β アミロイド蓄積に先行して脳代謝低下が観察されるかどうか、興味のあるところである。講演を聴きながら、軽度認知障害 (MCI) から、アミロイド蓄積、全脳の萎縮に至る過程を追跡するために、高価なFDG-PET検査に代わる安価な評価方法として [^{1-13}C]あるいは [^{2-13}C]pyruvateや [^{1-13}C]acetateを用

いた呼気分析を使えないだろうか、私は夢を描いていた。

7月6日の免疫系老化に関するシンポジウム (Immunosenescence: stage of the art) では、イタリア Bologna大学のClaudio Franceschi教授が「Inflamaging: a unifying theory of aging」と題して高齢者の免疫系の変化を解説し、炎症過程の加齢への関与について報告した。Franceschi教授は、欧州連合 (EU) の支援を受けて進められている「健康な加齢に関する遺伝学研究」 (GE-HA, Genetics of Healthy Aging) の主任研究者である。私はこの研究に関してBolognaを2回訪問したことがある。アメリカ国立癌研究所 (NCI) が2006年に開催したミトコンドリアDNAと癌の疫学に関するワークショップでも彼がヨーロッパからの代表であった (*Cancer Res* 2007;67:437-439)。今回、彼に尋ねると、百寿者の核ゲノム多型の研究に関しては、アメリカ合衆国とヨーロッパの研究者の間で協体制は確立されていないようである。ヨーロッパの百寿者のミトコンドリアゲノムの全塩基配列の分析も進んでいるようであるが、まだ論文発表に至ってはいなかった。

基礎老化分野のシンポジウム Ageing is no longer an unsolved biological problems では Leonard Hayflick, Robin Holliday, Thomas Kirkwood, Steven Austadら錚々たる理論家が揃っていたが、どの講演も哲学的というか、教条主義的と感じられ、楽しめなかった。Tom Kirkwoodは、加齢機構の本質的な複雑性を指摘し、加齢過程に対する包括的解決策を創出するにはシステムバイオロジー的なアプローチが必要であると主張していた。細胞維持に必要なネットワークがどのような損傷を受けているか、どのように制御されているか、その損傷が変性疾患の病態形成においてどのような役割を果たしているか、どのような目標に対して介入が可能であるか、これらを理解することが必要であると述べた。システムバイオロジーの手法ならびにその分析結果といっても、所詮、人間の思考の所産である。本当の解決は先延ばしになってしまうのではないかと危惧された。老化の複雑性の中で思考停止に陥るよりは、単純な老化機構を仮定し、その解明に向けて新しいナイフを研ぎ澄まし、勇気をもって切り込んでいきたいものだと考えた。

第2のシンポジウム Nutrition and brain aging: priming the brain against the ravages of time では、ボストンのJames Josephによるブルーベリーに関する研究、アメリカ国立加齢研究所のDonald Ingramによるラット・マウスにおけるカロリー制限の研究が報告された。我田引水的に単純化すれば、カロリー制限によってミト

コンドリアにおける酸化的リン酸化系を活性化すると長寿が達成されるのである。動物を檻に閉じこめても太らないように餌を制限すれば、糖尿病や癌の発生が抑制される。私は食物が還元ストレスをミトコンドリアに与えると考えようになった。Nick Laneの「温血の起源」(Origin of hot blood)の仮説を手短に紹介しよう。中生代に植物は光合成能力を飛躍的に増大させ、デンプンに富んだ種子を造り出した。しかし動物が本当に欲しいのは炭水化物ではなく蛋白質である。蛋白質が欲しいのに大量の炭水化物を摂取することになったので、草食動物は炭水化物のエネルギーを熱として放出してしまう戦略を取った。これが哺乳類・鳥類における温血性の起源であるという説である (Lane N. The furnace within. *New Scientist* 07 February: 42-45; 2009, <http://www.nick-lane.net/hot%20blood.pdf>)。彼の説に従うと、十分な蛋白摂取量を確保しながら、総カロリー摂取を減少させるのが良いのかもしれない。カロリー制限の専門家の意見では、炭水化物・脂肪・蛋白質の摂取量を全般的に減少させる実験によって寿命延長が観察されたようである。一方、高齢者では蛋白質摂取量の維持は、骨粗鬆症・サルコペニア・虚弱 (frailty) の予防に重要である。炭水化物摂取の制限は、ミトコンドリアへの還元ストレスを軽減し、長寿につながるのかもしれない。草食系男子 vs 肉食系女子は昨年の流行語であるが、肉食動物と草食動物のどちらが長生きか不明である。人類は雑食性であるが、農業によって穀物の大量生産を開始するまで、ヒトの炭水化物摂取量は高くなかったのではないかと私は勝手に推定している。これを理由に、私自身は、バリで肉食と赤ワインを楽しんだが、ポリフェノールよりもアルコールの影響を強く受けてしまったことを反省している。

第3のシンポジウムWhy we age: the modern synthesisでは、Bruce Carnes, Suresh Rattan, Jay Olshanskyらの講演を聴いた。この中で、デンマークのAarhus大学のSuresh Rattan教授の説明は分かりやすかった。彼は、加齢過程を恒常性維持空間の縮小 (shrinkage of homeodynamic space) を捉えていた。若いときには広い恒常性維持空間の中で自由に手足が伸ばせる。しかし高齢になると、心血管系障害、癌、骨粗鬆症、サルコペニアなどによる制約が大きくなり、恒常性維持空間が縮小する。恒常性維持のために色々な要素が生体内で相互作用を及ぼし合いながらネットワークとして機能している。損傷によって分子の異質性が高まると、コンピュータネットワークにおけるハブ機能の停止 (hub failure) やノード機能の停止 (node failure) のように、protein-protein interaction (PPI)の不具合が起こる。これを代償するために、非正規の分子ネットワークが形成される。興味のある方は心不全における遺伝子発現に関する論文 (Camargo et al., *PLoS ONE* 2007;2:e1347, Wu et al., *PLoS One*. 2009;4:e6288)などを参照されたい。後者の論文ではネットワーク分析の結果、心不全におけるJanus family tyrosine kinase-signal transducer and activator of transcription

(Jak-STAT) signaling pathwayとglycogen synthase kinase 3 beta (GSK3B)の重要性が浮かび上がったと報告されている。老化の研究でも今後Wet laboとDry laboの連携が必要であると考えられる。

最後に、フランスのピエール・マリー・キュリー大学のFriguet教授のpeptide methionine sulfoxide reductaseに関する講演が興味深かったので、ここで紹介したい。蛋白質の酸化的損傷は多様である。アミノ酸残基のカルボニル化、アミノ酸のL体からD体への転換、シトルリン化、リジン・ヒスチジン・システインの4-hydroxynonenalによる修飾などが研究対象になっている。一方、蛋白質の表面にあるメチオニン残基もperoxynitrite (ONOO-)の攻撃を受けてmethionine sulfoxideになる。私がmethionine sulfoxideに興味をもったのは前回バリに来た頃である。日本の百寿者に高頻度で見いだされるミトコンドリアDNAのD型ハプログループではmtDNAに塩基置換5178C>Aがある (*Lancet* 1998; 351: 185-186)。この塩基置換は、電子伝達系の入り口に当たるNADH dehydrogenase (複合体I)のsubunit 2 (ND2)にアミノ酸置換Leu237Metをもたらす。メチオニンはイオウを含むアミノ酸であるので、酸化的損傷を受けやすいと予想されるが、ロイシンからメチオニンへのアミノ酸置換を有する人が長寿であるのは逆説的であった。調べてみると、Stadtmanのグループの報告があった (Levine RL et al., Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mech Ageing Dev* 1999;107:323-332)。メチオニンが活性酸素種を除去し、蛋白質自身を守っているという説である。メチオニンが酸化的損傷を受け、メチオニン・スルフォキシドとなるが、これを修復する酵素 (MsrA: peptide methionine sulfoxide reductase A)が存在し、この酵素活性が哺乳類において寿命を制御しているという報告も現れた (Moskovitz et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 12920-12925)。この酵素は細胞質に存在するだけでなく、ミトコンドリアに運び込まれる分子種 (MsrA2: peptide methionine sulfoxide reductase A2)も存在することが明らかになった。Friguet教授らの研究によれば (Cabreiro et al., *Antioxid Redox Signal* 2009; 11: 215-225)、白血球細胞MOLT-4に亜鉛処理を施すと、細胞死の促進、活性酸素種の産生上昇、蛋白質損傷の増大が観察された。亜鉛処理によってメタロチオネインの転写が上昇し、MsrAとMsrB2の酵素活性も上昇した。MsrAとMsrB2を過剰発現させると細胞死の抑制、活性酸素種産生量の低下、蛋白質の酸化的損傷の低下が観察された。一方、高齢者では亜鉛の不足が栄養学的問題である。Friguet教授らのグループによると、高齢者に亜鉛補充療法 (10 mg/日 48日間)を行うと末梢リンパ球におけるプロテアゾームとmethionine sulfoxide reductasesの活性が上昇し酸化的損傷を受けた蛋白質が減少したという。普通の食生活では亜鉛不足は生じないとされるが、亜鉛入りサプリメントを取ってみようかとも考えている。

他の文献をここに掲げる。

Vougier S. et al., Essential role of methionine residues in calmodulin binding to *Bordetella pertussis* adenylate cyclase, as probed by selective oxidation and repair by the peptide methionine sulfoxide reductases. *J Biol Chem* 2004;279:30210-8.

Bartlett RK, et al., Oxidation of Met144 and Met145 in calmodulin blocks calmodulin dependent activation of the plasma membrane Ca-AT-Pase. *Biochemistry* 2003;42:3231-8.

Friguet B et al., Mitochondrial protein quality control: implications in ageing. *Biotechnol J* 2008; 3: 757-64.

Novoselov SV et al., Regulation of selenoproteins and methionine sulfoxide reductases A and B1 by

age, calorie restriction, and dietary selenium in mice. *Antioxid Redox Signal* 2009 Sep 21. [Epub ahead of print].

Kim HY et al., Different catalytic mechanisms in mammalian selenocysteine- and cysteine-containing methionine-R-sulfoxide reductases. *PLoS Biol* 2005 Dec;3:e375. (MsrB1はselenocysteineを含み高い酵素活性を有することを示した)

Kim HY et al., Role of structural and functional elements of mouse methionine-S-sulfoxide reductase in its subcellular distribution. *Biochemistry* 2005; 44: 8059-67.

Luo S et al., Methionine in proteins defends against oxidative stress. *FASEB J* 2009;23:464-72.

【学会報告】

花の都の国際老年学会 “XIXth IAGG World Congress of GERONTOLOGY and GERIATRICS”

新海 正

東京都健康長寿医療センター研究所・老化機構・レドックス

7月のパリといえば「バリエ祭」。パリ市内に入ったとたん、そんな雰囲気が感じられた。シャンゼリゼ通りではプラタナスの緑にトリコロールのフランス国旗が映えている。コンコルド広場には数え切れないほどの観覧席用の折りたたみ椅子が、山のように積み上げられている。そう、今は祭りの準備の真最中なのである。そんな中で、今回の国際老年学会は始まった。そして、「会議で楽しんだ後もパリで遊んでいって」という主催者の配慮も同時に察することができた。

この老年学会は回を重ねるごとに大きくなり、今回は“Longevity, Health and Wealth”という課題のもとに、シンポジウム：253セッション、口演：174セッション、キーノート・レクチャー：6セッション、ポスター展示：2,695演題、フランス語での老年学セミナー：4セッション、さらには関連企業主催のサテライト・シンポジウム：19セッションという莫大な規模の会議であった。なにしろ、おしゃれな肩掛けバックの中に入っていた要旨集の厚さが4.5cm、重さは2kgもあったことからもおわかりいただけると思う(写真参照)。その中で自然科学系の発表はアルツハイマー、認知症、ガン、栄養、肥満とメタボリック・シンドロームといった医療関連型や生活密着型の報告が数多く見られ、老化研究が世界の人々に貢献しているということを改めて感じさせられた。しかし、「基礎老化」に関する演題はシンポジウム、口演、ポスターともに非常に少なく、はからずも現在の老化研究の趨勢を知ることになってしまったが、その中では日本基礎老化学会会員は健闘していたように思う。

バイオロジカル・サイエンスの講演では、老化や寿命に関連する薬剤研究が目についた。既知の物質を薬に用いようとする試みや新規の薬剤開発まで多種多様な成果の報告があったが、その中にはしのぎを削って先陣争いをしているのではないかとと思われるようなものもあり、この分野は数多くの研究者が注目しているということを実感した。また、自分たちで作った薬剤に名前まで付けて、商品化も間近であること匂わせるような研究発表もあり、薬品企業主催の集会などが今回の老年学会の運営の一翼を担っていることも、何となく頷ける気がした。

国際会議が自分の研究の情報発信の場であることは間違いない。しかし、ただ発信しっぱなしでは、中途半端ではないだろうか。もっとその分野をコントロールしていこうという気概も必要であろう。今回の会議ではシンポジウムを企画する日本人研究者が圧倒的に少なかったと聞いている。参加人数では世界の国々の中でも上位を占めているというのにもかかわらず、このような有様である。その点、欧米の研究者達は上手である。ちょっと

した知人にも声をかけて一つのグループを作り、すぐにシンポジウムを立案してしまう。その結果、それ以降その分野では彼らが主導権を握ることになり、情報発信をただけの研究者は残念な思いをするのである。そこで、次回の会議では日本基礎老化学会の会員がシンポジウムを20ほど企画してみたらいかがだろうか。国際会議自体に貢献するだけでなく、日本基礎老化学会の活性化にも繋がると思うのだが。

興味のあるシンポジウムを聞きに行ったところ、会場にいる演者も聴衆もほとんどすべてが知り合いということがあった。同じような研究を進めているのだから、当然といえば当然であるのだが、関係者全員が一堂に会しているという状況にはちょっとびっくりした。あまりにも親しすぎて目新しい情報はそれほど得られなかったが、会議自体は和やかに順調に進み、閉会后そのままパリ市街のレストランまで繰り出すことになってしまった。そこでも延々と議論し、夜もだいぶ更けてからやっとお開きになったわけである。もちろん、次の国際老年学会での再会を約束して。

今年の夏は「円」がだいぶ強かった。両替所で「円」から「ユーロ」へ替えるときにそのことを痛感した。7月のパリは、まさに「大売り出し」のシーズン。恩恵にあずかった人も多かったことだろう。



【学会報告】

第36回国際生理学会世界大会参加記

渡辺 信博

東京都健康長寿医療センター研究所・老化制御・自律神経機能

7月27日から8月1日までの6日間、国立京都国際会館において、第36回国際生理学会（IUPS）世界大会が行われた。このIUPS世界大会は1889年に開催された、生理学分野において最も歴史のある学術集会だそうだ。現在、IUPS世界大会は4年に1回開催されており、いわば生理学者にとってのオリンピックと言えるであろう。小生にとって、初めてのIUPS世界大会への参加であり、自国開催の年に巡り合えたのは、この上ない喜びであった。

会場の国立京都国際会館は、京都駅から地下鉄で約20分の非常に交通の便の良い所に位置していた。京都の賑やかな市街地とそう遠く離れているわけではなかったと思うが、会場の周囲は壮麗な山々と豊かな自然に囲まれ、都会の喧騒とはかけ離れた景色であった。深緑の山々に見とれながら、開会式の会場へと向かった。会場に到着してまず驚いたのは、人の多さである。「さすがは『生理学のオリンピック』だ」と感服した。開会式では、開催地である日本・京都を紹介すべく、日本舞踊に始まり、京都の紹介ビデオが上映された。そして、皇太子さまがご臨席になり、英語でスピーチされた。その時の会場の厳かな空気から、IUPSの歴史を感じ、IUPS世界大会参加へ、より一層身の引き締まる思いがした。

さて、スケジュールはプログラム集（抄録集ではない）のボリューム（A4サイズ、約1.8cm）が物語っているように、生理学のあらゆる分野が網羅されていた。毎日10のセッションが朝から晩まで同時に進行しており、寸暇を惜しむようにランチョン・セミナーとポスターセッションが組み込まれていた。特筆すべき点としては、生理学の基礎研究はもちろんのこと、微小重力を主体とした環境生理学や鍼（acupuncture）の生理学的基礎をテーマにしたワークショップも催され、小生にとっても興味深いセッション・発表の連続であった。さて、私は4日目の午後に設けられていた「Neurobiology & neuroscience:Autonomic nervous system」のポスターセッションにおいて、「Gentle mechanical skin stimulation inhibits the somatocardiac sympathetic C-reflex elicited by excitation of unmyelinated C-afferent fibers」について共著者として発表・討論に参加させていただいた。ポスターを張り終えて間もなく、討論の時間の前から、熱心な研究者の方々が集まりだし、発表者の堀田晴美先生がまず説明を始められ、活発な討論が繰り広げられていた。時間が経つにつれ、ポスター会場に人が集まってきた。ありがたいことに、私たちのポスターにも途切れることなく人が集まって下さり、ついには堀田先生と手分けしてポスターを説明させていただくようになった。気づい

た時には、撤収時間が迫っており、約5時間ほほ休むことなくポスターの前にいたことになる。たくさんの貴重なご意見を頂き、非常に充実したポスターセッションであった。

IUPS世界大会に参加させていただいて、非常に印象的だったことがいくつもあったが、そのうちのいくつかをここに紹介させていただきたい。まずは、ヒトをひとつの個体として調べようという試みが様々な研究者の発表から感じたことである。自然科学の分野においては、機械論的生命観や要素還元主義に基づき、生命体を細分化して研究するのが一般的かと思う。これらの理論に基づく手法は、限られた条件内の現象を調べるのには非常に有効であり、現在存在する自然科学の基礎知識を築いた大きな功績がある。その一方で、実際の生命体が単一のシステムによって営まれていることは皆無で、さまざまなシステムが複雑に相補し合い機能している。そのため、生命体を個体として理解するためには、これまで蓄積してきた知識を統合するという作業が必要なのだと思う。この度のIUPS世界大会においては、まさに今後、知識の統合がますます進んでいくことを感じた。二点目としては、「老化」が生理学の観点からの検討されてきている点である。例えば、ageingをキーワードとして据えてある演題が、ポスター発表を含めて、3000超の演題の中で55題見つかった。もちろん、老化に関係する他のキーワードを据えている演題があることは十分に考えられる。さらには、生理学が膨大な範囲をカバーしている学問であることを鑑みれば、老化研究が生理学の分野でも着実に進められていると言えるだろう。三点目としては、伊藤正男先生が、コンgres・レクチャーの中で、「体性・自律神経反射」について述べられていたことである。私たちの研究室が長年取り組んでいる研究のテーマについてである。自ら取り組んでいる研究テーマについて取り上げていただくのは、いつでも嬉しいものだが、特に著名な先生に由緒ある世界大会で、取り上げていただき、この上ない感激であった。

6日間に渡って開催されたIUPS世界大会（生理学のオリンピック）は大成功のうちに閉会した。たくさんのごことを学ばせていただき、多くのことに感動した6日間であった。小生は、オリンピックたちが次の4年後を目標に向い、ひたむきに競技に取り組み続ける気持ちに共感しつつ、京都をあとにした。

【随 筆】

老化研究事始め－本格化したヒト寿命延伸の試み

三井 洋司

徳島文理大学 香川薬学部

はじめに

前回は、寿命延長の研究が霊長類において実施され、良好な成果をあげつつ有る事を紹介しました。其れは、栄養豊富な低カロリー食を摂る事によってでした。単細胞から霊長類にいたる迄、最大寿命の延長効果がありそうならば、人間において真剣に検討されるのも当然でしょう。

果たして、大きな流れが二つ出来ました。一つは、米国のカロリー制限協会を軸にした一般人による自発的な運動です。二つ目は、米国政府機関のNIA主導による大学病院での大規模な実践研究です。私はJSTの支援を得て、本年2月に米国で実践している大学病院を訪問して、現状と問題点を詳しく調査しました。日本でこうした活動が大きく発展する可能性はあるのでしょうか。一緒に考えてみましょう。

第20話 カロリー制限協会で Fewer Calories, More Life

Calorie Restriction(CR) Societyは、high nutrient、low calorieの食事で、健康長寿を達成しようとする人たちの自発的な会員組織です。

この活動に、Roy Walford抜きには語れません。もう35年以上前になるでしょう。私がNIAに留学中の頃、UCLAの病理学教授だった彼は、免疫学が専門で、リンパ球の刺激応答による増殖寿命が加齢に伴って減少する事を発表しました。Hayflick 博士の細胞老化説に讚美と非難が強かった頃、in vivoで細胞の分裂加齢を実証した事に、私は強い感銘を受けたものです。

そのうえ、彼はCRネズミの個体と細胞の寿命延長を強く主張するようになりました。ベストセラーになったBeyond 120-year Dietを出版したのが1986年です。そしてCRを自分自身で実践し、啓蒙する場がまさにCR Societyなのでした。しかし、彼が否応無くCRを体験したのは、宇宙滞在への関心でした。Biosphere 2と呼ばれる閉鎖エコシステム内で、太陽光を利用し、食料も自給自足を継続する2年間の生活です。彼は医者役割でクルーの一員になりました。しかし誤算によって、biosphere内は著しく食料不足になったため、各メンバーはWalfordの指導で、CRを実践するはめになったのです。其れは、彼がなんとUCLA名誉教授になる65歳頃のadventureです。

彼が79歳、硬化性筋萎縮症で亡くなったのはCR実践者に大きな痛手でした。

食事のレシピーが例示され、自分で栄養カロリー計算が出来るソフトが提供され、仲間とのミーティングや討論の場も提供されるだけでなく、新しい科学的知見や論

文が直ちに伝えられるのは、数千人と言われる実践会員に信頼と安心を与える活動です。その中にヒトCR研究があり、医療チェックをしています。一般的な血液検査だけでなく、T3, Insulin, Cortisol, IGF-1, Albumin, DHEA-S, free Testosterone, HbA1c等、いろいろな加齢マーカーをモニターする事を勧めています。その成果はどうでしょう。

第6回のCR Society は、今年11月20日、21日に 米国アトランタで開かれます。なんと、第62回アメリカ老年学会(GSA)の一部として同時開催されるようになりました。其れは2001年のCR学会以来、初めての事です。学問の裏付けと実践が評価されたとの印象です。

CR Societyは、会員になってCRを実践しようとする人に、CRによるリスクをしっかりと伝えていきます。

すなわち、体重減少に伴って、

- 1) 骨折し易くなる事
- 2) 体脂肪の減少が起り、余剰エネルギーは少なくなる事
- 3) 妊娠の障害と早産がおき易い事
- 4) 力とスタミナの減少がおき易い事
- 5) テストステロンの濃度が低下する事
- 6) 傷の直りが遅くなりそうな事
- 7) そして勿論、お腹がすきやすい事です。

しかし、CRの学会等が開かれると、雑誌記者のインタビューに応じて、参加者の著名人がPR発言しています。「こんなに若々しく、健康的だ」とアピールしている動画を、インターネットで見ることができます。

これに対して、CR効果を大規模調査しているNIAの担当官が皮肉混じりに「あれには、コントロールがないんだよね」と言っていました。

では果たして、NIAプロジェクトはどんなものでしょう。対照群は有るのでしょうか。



当時をしのぶBiosphere2の現在の外観

第21話 米国のNIAは、CALERIEに何を期待するか

CALERIEは、「低カロリー摂取の長期効果に関する複合研究」を意味する単語の頭文字を使った略称です。Calorieと同じ発音なのも、妙案です。

NIAは、25億円を投じて、カロリー制限食の効果を人間で、検証しようとしているのです。

Washington DCのベテスタに有るNIHの拠点内にNIA本部もあります。

そのNIAを訪問し、CALERIE担当者のRomashkan博士にインタビューして、詳しい事情を伺いました。

まず、対象者の年齢は、若すぎる人や高齢者を除いています。女性は20歳から47歳、男性は20歳から50歳迄で、体重比つまりBMIが、22から27.9の間にある比較的、細めから太めの健康人から選んでいます。特に、糖尿病、癌、心臓病、肝臓病、そしてAIDS感染者を、除きます。女性は妊娠の可能性が無い事を避妊で保証します。普段の食事を調査して、そこから、徐々にカロリーを25%減に移行します。正式に参加が決まると試験期間は2年間です。その間、栄養学的なアドバイスを受けたり、定期的に健康度を病院でモニターを受ける事になります。

予期していなかった事が有ります。カロリー制限を続ければ、体重減少以外に、コレステロール値、血圧、体脂肪等の減少があって、糖尿病や心臓血管病のリスクが下がると、説明されます。しかし、動物実験での寿命延長効果は説明されますが、今回の人間でのトライアルでは、最大寿命の延長については、言及されないのです。過剰な期待を抱かせるのを避けたいとの事です。

もう一つ意外だったのは、ボランティアと言っても、完全な無料奉仕では有りませんでした。臨床治験に参加して、2年間を無事完了すれば、およそ50万円が支払われるとの事で、途中で棄権する人が出るのを防ぐ為です。

さて、こうした臨床治験に最終的に参加する人の人数は、トータル250人を予定しています。その内半数はカロリー制限をしない対照群の人で、125人が25%カロリー制限を実施する人です。その仕分けは、2群の統計処理が合理的になるように、病院施設で決めますから、参加者はその決定に従わなくてはなりません。本来はカロリー制限を受けたかった人が正常対照群に仕分けされる場合もでてきますが、落胆しながらも約束を受け入れるようです。

第22話 NIAが要求するしたたかな戦略

NIAがこのプロジェクトを実施するにあたって選択した治験施設は、3つの大学病院です。6ヶ月のパイロット研究で試験的に実施し、問題点把握と実力を示して応募した15個の機関から、選ばれたところです。Clinical Siteの地図に示したように、セントルイスのワシントン大学病院、バトンルーージュのルイジアナ州立大学病院（ペニンソン生物医学センター）、そして、ボストンのタフツ大学病院です。

何と、これらの施設には、NIAが統一した同じプロトコルで、独立に成果を求めています。実施機関の一つが失敗しても、データの統計的な処理が可能となる体制

Map of Clinical Sites



を作っているのです。絶対失敗しないという強い意志の現れでしょう。

しかも、各施設のデータはそこで解析されるのでは有りません。ブラインドで実施、処理されて、データは別の大学（地図に有るように、ダーラムのデューク大学）に設置された「統括センター」に送られるのです。そのセンターでは、プロジェクト推進の責任を負い、全個人をモニターしたデータの蓄積と解析、成果や論文管理、そしてNIAへの報告と協議を担当しているのです。

その中には、プロジェクト参加者の健康状態をモニターした長期にわたる安全性データも含まれています。それはNIAの外部審議機関に送られます。プロジェクトの妥当性と、参加者の安全性を守る為の判断を行う委員会が設置されて、臨床治験のお目付役をしているのです。

もう一つ、NIAが仕組みだ戦略を紹介します。CALERIEの本来の目的はCRに伴う健康増進や疾病減少が有るかどうかを見極める事で、当然に成果の公表が義務つけられています。しかし、参加者の血液サンプルの活用、心理解析、理学的測定などによって、付随的に様々なデータが得られます。それらを研究プロジェクトとして申請させ、特別枠で研究費を支給しているのです。元のCALERIE研究の主幹研究者を論文共著者に入れるという条件を付けたうえです。だから、CRに伴う活発な研究が進行中なのは最もなことです。

今回は、臨床治験を実施している大学病院での奮闘記を、紹介しましょう。

【お知らせ】

日本基礎老化学会第33回大会開催のご案内

会長 磯部 健一（名古屋大学医学部 分子細胞免疫学）

日時：2010年6月17日，18日

会場：名古屋大学東山キャンパス内 野依記念学術交流館

複写される方へ

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

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

Notice about photocopying (In the USA)

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

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

基礎老化研究 第33巻 第4号

平成21年(2009)12月4日

発行者 日本基礎老化学会
〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2
東京都老人総合研究所内
電話 03-3964-3241

編集 編集委員会

印刷所 三陽工業株式会社