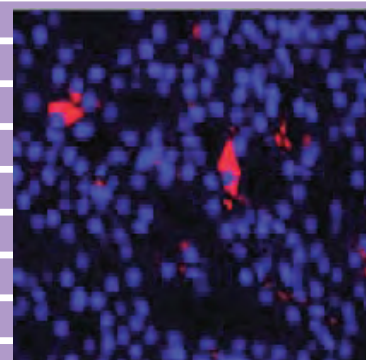
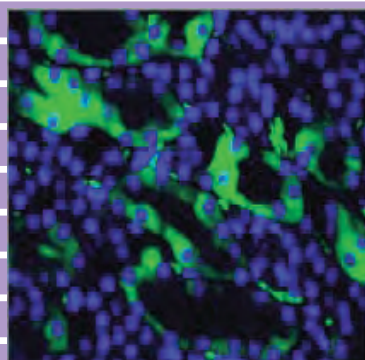
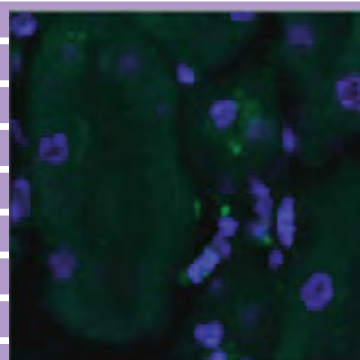


BIOMEDICAL GERONTOLOGY

基礎老化研究

- 総説 ■ **水素分子医学の現状と展望**
大澤 郁朗
- 総説 ■ **老化に伴う腎尿細管障害におけるSirt1-オートファジー経路の役割**
久米 真司、前川 聡、古家 大祐
- 総説 ■ **染色体機能ドメインのキネトコアと細胞老化**
前原 佳代子
- トピックス ■ **生体二光子顕微鏡による脳内微小循環径路の三次元追跡**
正本 和人、川口 拓之、菅野 巖
- トピックス ■ **Sirt1によるAPエンドヌクレアーゼ1脱アセチル化はDNA塩基除去修復活性を調節する**
山盛 徹、Kaikobad Irani
- 学会報告 ■ **第6回国際ローマ映画祭プログラム 「イタリアと日本:高齢者に優しい2つの国」**
田中 雅嗣
- 随筆 ● **老化研究事起こし——老化細胞は高齢者の臓器に実際あるのか?** 三井 洋司
- おしらせ ● **第34回日本基礎老化学会大会のご案内** 白澤 卓二
- 附 ● **基礎老化学会サーキュラー 第88号**



- 編集委員会委員長: 重本 和宏 東京都健康長寿医療センター研究所 老年病研究チーム
〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2
- 編集委員会幹事: 三浦 ゆり 東京都健康長寿医療センター研究所 老化機構研究チーム
〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2
- 編集委員会委員: 内田 さえ 東京都健康長寿医療センター研究所 老化制御研究チーム
〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2
- 島田 厚良 愛知県心身障害者コロニー 発達障害研究所 病理学部
〒480-0392 愛知県春日井市神屋町713-8
- 清水 孝彦 東京都健康長寿医療センター研究所 老化機構研究チーム
〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2
- 樋上 賀一 東京理科大学薬学部生命創薬科学科
〒278-8510 千葉県野田市山崎2641
- 福 典之 東京都健康長寿医療センター研究所 老化制御研究チーム
〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2
-

- Editor-in Chief: Kazuhiro Shigemoto, Research Team for Geriatric Medicine,
Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku,
Tokyo 173-0015, JAPAN
- Managing Editor: Yuri Miura, Research Team for Mechanism of Aging, Tokyo
Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku,
Tokyo 173-0015, JAPAN
- Editors: Sae Uchida, Research Team for Functional Biogerontology, Tokyo
Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku,
Tokyo 173-0015, JAPAN
- Atsuyoshi Shimada, Institute for Developmental Research, Aichi Human
Service Center, 713-8 Kamiya-cho, Kasugai, Aichi 480-0392, JAPAN
- Takahiko Shimizu, Research Team for Mechanism of Aging, Tokyo
Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku,
Tokyo 173-0015, JAPAN
- Yoshikazu Higami, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of
Science, 2641 Yamazaki, Noda-shi, Chiba-ken 278-8510
- Noriyuki Fuku, Research Team for Functional Biogerontology, Tokyo
Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku,
Tokyo 173-0015, JAPAN

この雑誌について（投稿される方へ）

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

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

執筆要領

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

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

1. 巻頭言(展望) 刷り上がり1頁に収まるようにする。本文の長さは1,500字以内(タイトルと氏名を除く)。
2. 総説 一つのテーマについて、専門的知識に基づき、関連する多くの研究論文を総括、解説、評価した、所謂ミニレビュー。和文。
 - 1) 本文の長さ: 図、表も含めて刷り上がりで6ページ(9,600字)程度を基本とする。
 - 2) 題名: 40字以内とし、内容を的確に表したもので、且つ、読者の興味を引くよう工夫する。
 - 3) 要約およびキーワード: 要約およびキーワード(5個以内の英語)を必ず付す。要約は日本語(400字以内)、およびその英訳(200 words 以内)とする。
 - 4) 用語: 本文中の用語はなるべく日本語にする。但し、欧語の方が一般的なもの、解りやすい場合は欧語でよい。外国の人名は原語、地名はカタカナで表記する。

専門術語: それぞれの専門分野の用語集に従う。動植物の学名、遺伝子名などでイタリック体で印刷されるべきものについては、原稿に下線をつけるなどして区別する。

略語: 初出箇所にフル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, 田久保海誉 ヒト組織の加齢に伴うテロメア短縮. *基礎老化研究* 24:72-76, 2000.
- 6) 図、表、写真: そのまま印刷できるものに限る (手書きのもの受け付けない)。文献から引用する場合は、引用を明記すると共に、引用の許可が必要な場合には、著者の責任で許可を取っておくこと (許可証のコピーを原稿と共に提出すること)。白黒またはグレースケールが原則。
- 7) 図、写真にはタイトルと説明文を付ける。
3. トピックス 最近の話題性のある研究及び最近行った自身の研究の紹介。長さは刷り上がり4頁以内 (1,600 - 6,400字)。その他は総説に準じる。但し、要旨は不要である。
 4. 学会報告、海外便り 国内外の学術集会の紹介記事。長さは1,600字以内。留学などで滞在しているまたは過去に滞在していた研究室、訪問した研究施設の見聞の紹介記事。
 5. 書評 最近出版された書籍の紹介。1,600字以内。
 6. 随筆 長さは刷り上がり2頁 (3,200字) 以内。
 7. その他
 8. 原稿の送付およびその他の問い合わせは、下記宛に。(e-mail の使用が望ましい。)
編集委員会委員長: 重本和宏 (kazshige@tmig.or.jp)
または、編集幹事: 三浦ゆり (miura@tmig.or.jp)

目 次

総説

水素分子医学の現状と展望

大澤 郁朗……………1-8

総説

老化に伴う腎尿細管障害におけるSirt1-オートファジー経路の役割

久米 真司、前川 聡、古家 大祐……………9-15

総説

染色体機能ドメインのキネトコアと細胞老化

前原 佳代子……………17-23

トピックス

生体二光子顕微鏡による脳内微小循環径路の三次元追跡

正本 和人、川口 拓之、菅野 巖……………25-28

トピックス

Sirt1によるAPエンドヌクレアーゼ1脱アセチル化はDNA塩基除去修復活性を調節する

山盛 徹、Kaikobad Irani……………29-32

学会報告

第6回国際ローマ映画祭プログラム 「イタリアと日本：高齢者に優しい2つの国」

田中 雅嗣……………33-36

随筆

老化研究事起こし —— 老化細胞は高齢者の臓器に実際あるのか？ 三井 洋司……………37-39

おしらせ

第34回日本基礎老化学会大会のご案内 白澤 卓二……………41-42

附

基礎老化学会サーキュラー 第88号

CONTENTS

<REVIEW>

Molecular hydrogen medicine: Current status and future challenges

Ikuroh Ohsawa……………1-8

<REVIEW>

The role of Sirt1-dependent autophagy in age-associated renal tubular damage

Shinji Kume, Hiroshi Maegawa, Daisuke Koya……………9-15

<REVIEW>

Cellular senescence as a self-defense mechanism against centromere dysfunction

Kayoko Maehara……………17-23

表紙：加齢マウス腎尿細管のLC3 (左) Pimonidazole (中) Bnip3 (右)

詳しい説明は9ページ (総説) を参照

【総 説】

水素分子医学の現状と展望

大澤 郁朗

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・環境老化

要約

この4年間に多様な疾患に対する水素分子 (H_2) の効果が報告されてきた。 H_2 はヒドロキシルラジカルなど毒性の高いラジカルを選択的に還元する。動物モデルにおける水素ガスの吸引は、脳、心臓、肝臓の虚血再灌流 (I/R) 障害を抑制し、心臓や小腸の移植後障害を軽減した。水素溶存点眼薬は網膜のI/R障害を抑制し、水素飽和生理食塩水の静注は心臓、小腸、腎臓のI/R障害を抑制した。さらに H_2 を高濃度に含む水 (水素水) を動物モデルに飲用させたところ、ストレスによる認知機能低下、薬物によるドパミン神経細胞の変性、シスプラチンの腎毒性、慢性移植腎症がそれぞれ改善された。水素水の臨床研究ではLDLと酸化ストレスが抑制されている。また、 H_2 を添加した腎透析の臨床研究では血圧が改善された。体内で容易に拡散し、人に対する安全性も高い H_2 は、酸化ストレスや炎症に関連する多くの疾患で新しい治療法となることが期待される。

キーワード: animal model, clinical trial, gas therapy, hydrogen molecule, oxidative stress

1. はじめに

世界規模での急速な超高齢社会化により、健康長寿の為の疾患予防と治療に関する簡便で効果的な手法の開発が喫緊の課題となっている。筆者らは、2007年に水素分子 (H_2) が毒性の高い活性酸素種/ラジカルを選択的に還元する抗酸化物質として、酸化ストレスから細胞を防御し、脳における虚血・再灌流障害を抑制することを報告した[1]。それ以降、 H_2 を用いた研究は急速に進展し、治療を目的とした医療用ガス研究の中でも最もホットな研究対象となっている。これは、生体において安全性が高く、安価でしかも容易に入手でき、多様な方法で体内に送り込むことができるという H_2 の特色による。

H_2 は常温で気体として存在する無色無味無臭のもっとも軽い可燃性ガスで、地球上にはごく微量しか存在しない。大気中の H_2 濃度は1 ppm以下である。また、酸化還元酵素であるヒドロゲナーゼを持たない高等生物において、 H_2 は生体でなんら反応することの無い不活ガスとして扱われてきた。この為、 H_2 の生体における機能を調べた研究は極めて少ないものであった。

本稿では、この4年ほどの間に60本以上の研究論文が発表され、現在も続々と新しい知見が報告されている水素分子研究の現状を紹介し、今後の研究の展望を述べる。

2. 抗酸化物質としての H_2 の特質

1) 最小気体による活性酸素種/ラジカルとの選択的反応

放射線化学の分野では、水の放射線分解過程で生じるヒドロキシルラジカル ($\cdot OH$) が H_2 によって還元されることが知られている[2]。これは、 $\cdot OH$ がほとんどの無機および有機化合物と非特異的に反応する性質があり、 H_2 もその例外ではない為である。 $\cdot OH$ は生体内でもFenton反応等により恒常的に発生している活性酸素種/ラジカルである。しかし、 $\cdot OH$ を効果的に無毒化する機構が生体内には無く、核酸、蛋白、脂質等あらゆる成分を変性することで、高度な細胞傷害性を示す。一方、 H_2 は*in vitro*の系でスーパーオキシド、過酸化水素、一酸化窒素等の活性の低い安定な活性酸素種/ラジカルとは反応しなかった[1]。生体には、これらを酵素反応などにより無毒化する機構が備わっている。さらにこれらの活性酸素種/ラジカルはシグナル伝達や免疫機構において必要な役割を担っている。この為、過剰な活性酸素種/ラジカルの消去は副作用を伴うことになる。実際にビタミンEなどの抗酸化サプリメントの過剰投与は人の寿命を縮める可能性が指摘されている[3]。 H_2 は、最も細胞傷害性の高い $\cdot OH$ 等の活性酸素種/ラジカルを還元するが、必要な活性酸素種/ラジカルまでも還元することが無い為安全性は高いと考えることができる (図)。

H_2 のもう一つの重要な特徴は、密度の小さな気体であり拡散速度が非常に大きい点である。高分子の間をすり抜け、細孔・薄膜等を容易に透過する。生体成分に対しては水溶性、脂溶性を問わずに拡散することから、あらゆる臓器とそれを構成する細胞の中にまで容易にしかも素早く到達することができる。従って、ミトコンドリア

連絡先: 〒173-0015

東京都板橋区栄町35-2

Tel: 03-3964-3241 ex. 3044

Fax: 03-3579-4776

E-mail: iohsawa@tmig.or.jp

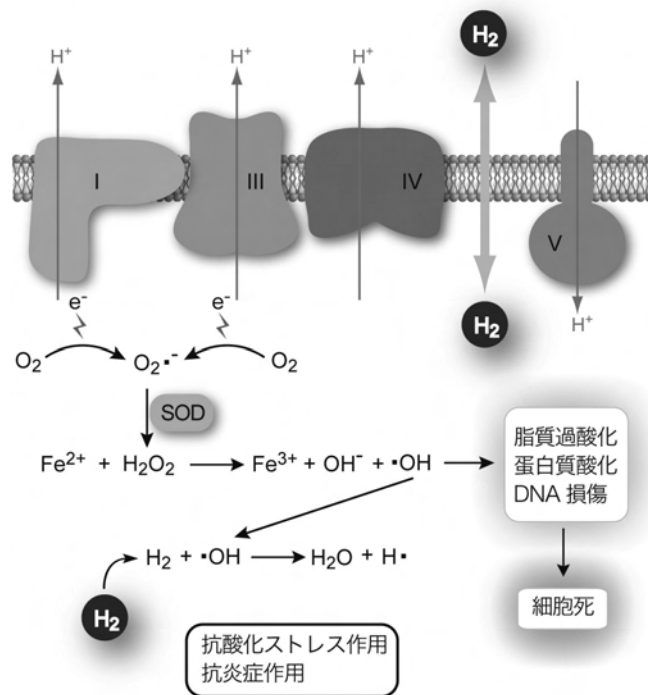


図 ラジカルスカベンジャーとしての水素分子

活性酸素種／ラジカルの主要な産生源であるミトコンドリアでは、呼吸鎖IとIIIから電子がリークし、スーパーオキシドが生じる。SODはこれを過酸化水素に変換するが、Fe²⁺やCu⁺などが存在すると過酸化水素から・OHが生じる。・OHは多様な分子と非特異的に反応し、強い細胞障害性を示す。一方、弱い還元力を持つ水素分子は最小の分子として、細胞外からオルガネラ内まで容易に拡散する。水素分子は生体内分子とほとんど反応することはないが、・OHについてはこれを還元して無毒化する。その為、水素分子によって酸化ストレスや炎症が抑制できるものと考えられる。

等の活性酸素種／ラジカルの発生源で直接作用することが可能である。

人の体内にはH₂が常に一定量存在する。未吸収の炭水化物が大腸に到達すると、腸内細菌群が直ちにこれを分解・代謝し、酸化還元酵素であるヒドロゲナーゼによってH₂が発生する為である。発生したH₂の一部は血流に乗って肺に到達し、ガス交換されることで呼吸として排出される[4]。人での呼吸ガス中に含まれるH₂濃度は個人差が大きいもののおよそ数10 ppm程度である。後述するように、この腸内細菌によるH₂が酸化ストレスを抑制する可能性が示され、さらに体内でのH₂の存在もまたH₂自体の安全性を担保するものである。一方、ビタミン類のような抗酸化物質の大半は食品として常時摂取されているのに対し、人が外部から高濃度H₂を摂取する可能性はほとんどない。従って、高濃度H₂の投与は生体における酸化ストレス防御のまったく新しい手段であると言える。

2) 酸化ストレスによる細胞死の抑制

最初に筆者らは、H₂による酸化ストレス抑制効果を細胞レベルで検証した[1]。常圧での水に対するH₂の溶解度は約0.8 mMである。通常の気体と同じくバブリング等の操作でH₂を培地に溶存させることができるが、培地中の酸素がヘンリーの法則に従って低下する為にそれぞれの溶存ガス濃度を厳密にコントロールしなければならない。また、H₂が容易に拡散する為、外気との接触を避けるように培養器をシールするなどの工夫も必要となる。

Fenton反応により発生させた・OHで神経系のモデルであるPC12細胞に傷害を与える系でも、呼吸鎖複合体IIIの阻害剤であるアンチマイシンAを投与することで生じる酸化ストレスによってPC12細胞に傷害を与える系でも、H₂はそれぞれの細胞死を抑制した[1]。効果は濃度依存的で25 μMでも有意であった。このとき、アンチマイシンA投与30分後に・OHの発生とこれに伴うミトコンドリア膜電位の低下が、また1日後に核酸の酸化損傷マーカーである8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG) および脂質の過酸化を示す4-ヒドロキシノネナール (4-HNE) の蓄積がH₂により抑制された。聴覚上皮の組織片培養を用いたアンチマイシンAによる有毛細胞の酸化ストレス損傷でも同様の結果が報告されている[5]。

また、H₂は放射線による培養細胞死を抑制した[6]。放射線は、・OHなどの活性酸素種／ラジカルを発生させ、酸化ストレスにより細胞を損傷する。この時、酸化ストレス抑制系のスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 活性とグルタチオン (GSH) の放射線による低下がH₂により抑制されていた。

3. H₂による虚血再灌流障害の抑制と臓器移植

1) 水素ガスの吸引による虚血再灌流障害抑制

H₂の医療への応用に向けた研究として、最初に成果を挙げたのは虚血再灌流障害の治療である。虚血により低酸素、低栄養状態に置かれた組織で再び血流が再開されると多様なメカニズムで活性酸素種／ラジカルが発生

する。この時生じる・OHが細胞死を誘導する中心的な役割を担っていると考えられている[7]。

筆者らは、最初にラットの軽度大脳動脈閉塞による90分間の局所的虚血と再灌流後の30分間の計120分間、麻酔ガスに1から4%の水素ガスを混合して吸引させた[1]。この時、動脈血のH₂濃度は数10μMに達する。1日後に脳をスライスして梗塞部位を調べたところ、水素ガスを吸引させることで梗塞体積が顕著に減少していた。また、1週間後の運動障害が水素ガスの吸引で改善され、梗塞部位での4-HNEと8-OHdGの蓄積を指標とした酸化ストレスの増加とミクログリアの活性化を指標とする炎症の増大のいずれもが水素ガスの吸引で抑制されていた。さらに水素ガスの吸引時間を変えることで、虚血から再灌流に切り替わる時点でH₂が存在していることが障害抑制効果を発揮する為に必要であることが判明した。再灌流直後、大量に・OHが発生する時点で、これを還元するH₂が十分に存在することで障害が抑制されるのであろう。新生児ラットの脳虚血後、ボックス内で2%水素ガスを30分から2時間に渡り吸引させる系においても、神経細胞死が抑制されて梗塞領域が縮小することが報告されている[8]。

同様に水素ガスを吸引させることで、肝臓及び心臓でも虚血再灌流障害を抑制することが可能であった。マウス肝臓の門脈三分岐を結紮することで一部を90分間虚血し、180分間再灌流後に肝臓を摘出して障害を評価する系で、1から4%の水素ガスを再灌流の10分前から摘出直前まで吸引させた。その結果、H₂の投与は肝組織の損傷と血中ALT濃度の上昇を抑制した[9]。この研究では、不活化気体のヘリウムをコントロールとして用いても効果がないことを確認している。さらにラットの心臓では、Langendorf灌流モデルで灌流液を窒素ガスおよび水素ガスによりそれぞれ飽和することで無酸素状態に40分間置き、心機能の回復を比較した。この時、水素ガスでは顕著な回復が見られた[10]。冠動脈を30分間結紮した虚血再灌流においても水素ガスの吸引は心筋の梗塞体積を抑制し、心機能が保護された。

2) 他のH₂投与方法による虚血再灌流障害抑制

高眼圧緑内障のモデルとして、眼圧を上げることで眼底の血流を止め(虚血)、再び眼圧を下げて血流を再開する(再灌流)系がある。この系で、筆者らはH₂の大きな拡散速度と浸透力を利用して、H₂を飽和させた生理食塩水(水素溶存点眼薬)の点眼を試みた[11]。ラットに点眼すると硝子体のH₂濃度が速やかに上昇して飽和の約20%に達し、H₂の眼球内への拡散が確認された。このH₂は虚血再灌流直後の網膜における・OH増大を抑制し、網膜神経細胞のアポトーシスと網膜の退縮を抑制することができた。

また、Sunらのグループは新生児ラットの脳虚血直後に5 ml/kgの水素飽和生理食塩水を腹腔内投与することで、水素ガスの吸引と同様に梗塞領域が縮小されることを報告している[12]。さらに彼らは、虚血前5から30分間に5 ml/kgの水素飽和生理食塩水を静注することで、

ラットでの虚血再灌流による心臓[13]、肺[14]、小腸[15, 16]等の障害が抑制できることを示した。他のグループからも水素飽和生理食塩水を1 ml/kg/hの速度で点滴することにより、腎臓の虚血再灌流障害がラットで抑制できることが報告されている[17]。

3) 臓器移植へのH₂の適用

臓器移植では必ず虚血再灌流のプロセスを通ることになる。そこで、Nakaoらのグループを中心にH₂の移植への適用が検討されている。最初に彼らはラットの小腸移植モデルを用いて、ドナーとレシピエントの両方に2%の水素ガスを吸引させることで移植後小腸の機能低下が抑制できることを示した[18]。この時、酸化ストレスマーカーであるマロンジアルデヒド(MDA)の移植後小腸における蓄積が減少し、移植に伴い増加するCCL2、IL-1β、IL-6、TNF-αなどの炎症メディエーターの発現が抑制されていた。さらに心臓移植モデルでは一酸化炭素との相乗効果があることを示し、併用することで低温虚血再灌流障害を効果的に減らすことができる可能性が示された[19]。また、肺移植モデルでも2%の窒素やヘリウムには効果が無いが、2%水素ガスには組織損傷阻害効果があることが明示されている[20]。この系ではMDAや4-HNEの抑制と同時にBcl-2及びBcl-x_Lの発現が増加しており、H₂による細胞死抑制機構を考察する上で興味深い。

4. 高濃度水素水の効果

1) メタボリックシンドロームと水素水

H₂を最も簡単に投与する方法は、水素を高濃度に溶かした水(水素水)を飲用することである。摂取したH₂は体内に取り込まれ、大半は呼気ガスとして体外に排出される。人での呼気ガス中水素濃度のピークは15から30分程度で、1時間後にはほぼ元に戻る。

筆者らはその効果を調べる為、6ヶ月程度でアテローム性動脈硬化症を示すApoE欠損マウスに水素水を飲ませた[21]。アテローム動脈硬化の形成はLDLコレステロールの酸化とこれをマクロファージが取り込む傷害反応によると考えられている[22]。水素水は大動脈でのアテローム形成を抑制した。この時、4-HNEの蓄積が減少しており、水素水による酸化ストレスの抑制が示された。

Kajiyamaらは、水素水を糖尿病患者に1日900 ml、8週間連続投与し、その効果を調べた。H₂の効果を臨床レベルで調べた最初の論文である[23]。水素水の摂取は脂質、糖代謝に好影響をもたらし、インスリン抵抗性関連疾患の発症予防及び進展抑制に有益である可能性が示唆された。また、Nakaoらは水に金属マグネシウムを投入することで水素ガスを発生させ、この水素水をメタボリックシンドローム予備軍の被験者に8週間投与した[24]。その結果、尿中のSOD活性増加とチオバルビツール酸反応性物質(TBARS)の低下が認められ、酸化ストレスが抑制された。

2) 水素水による脳神経機能の障害改善

身体への物理的ストレスは酸化ストレスや炎症を引き起こすことで脳の高次機能に影響を与える。実際に拘束ストレスを長期間与えたマウスは認知記憶障害を示す。このマウスに水素水を与えると記憶障害が改善された[25]。また、Satoらは、ビタミンC 欠乏老化促進マウスに水素水を飲ませた後に脳スライスを作製して低酸素/再酸素負荷を与えた[26]。スーパーオキシド量を測定したところ、水素水投与群では減少傾向が見られた。これは、水素水投与により脳での酸化ストレスが減少したためであろう。また、老化促進マウス (SAMP8) に水素水を与えると認知記憶障害と海馬神経細胞の変性が抑制されることが報告されている[27]。この系でも血清中の抗酸化活性が上昇していた。

現在までに水素水の投与によって最も顕著な改善効果を示したのは、薬物を用いたパーキンソン病のモデル動物である。パーキンソン病の発症機序には、ミトコンドリアの機能異常とそれに伴う酸化ストレスの増大が深く関与している。6-ヒドロキシドパミン (6-OHDA) をラット線条体に投与した系では、水素水によってドパミン作動性神経細胞死と行動異常が抑制された[28]。驚くべきことに6-OHDAによる処置3日後から水素水を与えても顕著な行動異常の抑制が認められた。また、メチルフェニルテトラヒドロピリジン (MPTP) をマウスに投与する系においても水素水は黒質ドパミン作動性神経細胞死を顕著に抑制した[29]。この系では飽和の1/20程度の濃度の水素水を与えても効果があることが示されており、必ずしも飽和濃度の水素水を大量に摂取しなくてもH₂の生理的効果を発揮するには十分である可能性がある。

上記に加え、水素水がモルモットの騒音暴露による難聴を抑制することが報告された[30]。難聴の要因としては、酸化ストレスによる有毛細胞と聴覚神経細胞の変性が挙げられる。

3) 腎機能と水素水

シスプラチンは最も高頻度で 사용되는抗癌剤の一つであるが、副作用として高い腎毒性が知られている。シスプラチン投与マウスを10日間、1%水素ガス下で飼育すると腎機能異常による生存率の低下を抑制できたが、水素水の投与でも同様の保護効果が認められた[31]。一方で、水素水はシスプラチンの抗がん作用を阻害しなかったことから、副作用抑制に向けた水素水の臨床応用の可能性が示された。ラットでもCTを用いたシスプラチン腎毒性の評価法を用いて、水素水の保護効果が検証されている[32]。

さらに水素水は、慢性移植腎症に対してもその抑制効果が報告されている[33]。腎臓を同種移植したラットでは、蛋白尿の増加とクレアチニンクリアランスの低下が進行し予後不良となる。水素水の摂取は炎症と酸化ストレスを抑制し、腎機能が改善され、生存率が上昇した。

4) 多彩な水素水の効果

Itohらは、水素水を投与したマウスにおける受身皮膚アナフィラキシーを指標としたI型アレルギーの抑制効果について報告している[34]。さらに好塩基球細胞をH₂存在下で培養すると抗原刺激による細胞内シグナル伝達全般が低下することから、H₂による活性酸素種/ラジカルの直接的な消去以外の経路がある可能性を論じている。この他、デキストランによる大腸炎、心臓の放射線障害、虚血再灌流による心-腎連関障害についてモデル動物を使った研究が成され、水素水の投与による病態の改善が報告されている[35-37]。

5. 腸内細菌とH₂

1) 腸内細菌による水素ガスの産生

高等生物の細胞がH₂を作り出すことは無い。従って、呼気中に出現する水素ガスは全て腸内細菌に由来する。水素産生菌としては嫌気性細菌である*Eubacterium*、*Clostridium*、*Bacteroides*及び*Fusobacterium*などがある。呼気中水素ガス濃度は、腸内細菌の異常増殖といった腸の状態を反映する試験法として用いられてきた。しかし、このH₂に生理機能があるとはまったく考えられてこなかった。

Suzukiらは、糖尿病の治療薬である α -グリコシダーゼ阻害剤に高血圧と心疾患の抑制効果があることから、その作用機序を考察する過程で副作用である腸内ガスの増加に着目した[38]。実際、 α -グリコシダーゼ阻害剤を投与すると呼気中水素ガス濃度が約30 ppm増加した。これは飽和水素水300 ml飲水後の呼気に排出される水素ガスのピーク値と同じオーダーである。この為、 α -グリコシダーゼ阻害剤の作用機序にH₂が関与しているという仮説が提唱されている。こうした観点から、牛乳やターメリックの摂取が呼気中水素ガス濃度を増加させることが報告されており興味深い[39, 40]。

2) 動物モデルによる検証

Kajiyaらは、腸内細菌が産生するH₂の生理的機能を検証する為にマウスの腸内細菌を殺し、H₂を産生できる大腸菌とできない大腸菌を再び感染させ、コンカナバリンAによる肝障害を比較した[41]。すると水素を産生する大腸菌を保持するマウスの肝障害は軽度なものとなり、水素水投与により肝障害を抑制した結果と同等であった。この論文は、腸内細菌がH₂を介して酸化ストレスを防御している可能性を明示している。

6. 多様なH₂の活用法

現在、H₂の応用は様々な形で広がりを見せている。透析における尿毒症の治療補助としてH₂の投与が試みられた[42]。この研究では、透析液にH₂を拡散させ、被験者の収縮期血圧が有意に減少することが示されている。また、高濃度のH₂を含む眼の洗浄液は、角膜アルカリ外傷の抗酸化治療に効果的であることがマウスモデルで報告された[43]。

水素ガスの吸引効果については、出生時仮死による神

経損傷の治癒に2.1%の水素ガスを含む呼気の投与が効果的であることが豚を用いた実験で示されている[44]。この系では既存の抗酸化剤による有効性が低く、水素ガスによる臨床応用が期待される。さらに、Xieらは、敗血症の抑制効果を報告している[45]。この研究では、腸管穿孔モデルマウスに2%の水素ガスを吸引させることで致死率が減少した。敗血症による臓器損傷には活性化マクロファージから放出されるHMGB1の関与が知られているが、H₂は酸化ストレスと共にHMGB1の産生も抑制している。さらに彼らは、ゼイモザンによる一般的な炎症モデルにおいて水素ガスの吸引が多臓器不全による生存率の低下を抑制することを報告しており[46]、幅広い抗炎症治療に水素ガスの吸引治療が有効である可能性が示唆されており興味深い。

また、水素飽和生理食塩水の静注または腹腔内投与により、ラットのアルギニンによる急性膵炎が緩和されること、マウス腸管内皮の放射線傷害が抑制されること、βアミロイドの側脳室内投与による認知記憶障害の抑制効果などが報告されている[47-49]。

7. おわりに

H₂を医学に応用しようとした先駆的研究が1975年に報告されている。この論文では、扁平上皮がんを有するマウスを2.5%の酸素と97.5%の水素からなる8気圧のガス室に2週間入れ、がんが縮小傾向となることを示している[50]。この研究とは独立に、2001年には0.7 MPaの水素ガスを封入した8気圧のガス室に感染症による肝障害のマウスを入れる系で、抗炎症効果があることも報告されている[51]。しかし、これらの研究はほとんど注目されることは無かった。それは、どちらも高圧の水素ガスによる実験で、容易に再現できないことが一因であろう。

将来のH₂の応用としては、宇宙空間での利用が考えられる[52]。航空機乗務員では放射線による白内障やがんのリスクが高く[53, 54]、また、宇宙線のHZE粒子による中枢神経系の変性が報告されている[55]。従って、適切な放射線防御法無くして長期の宇宙空間滞在は困難である。放射線障害の主因の一つは・OHによる細胞傷害であり、H₂がラジカールスカベンジャーとして働くことで、宇宙での長期滞在が可能になるかもしれない。

現時点でのH₂を用いた研究は、本稿で紹介したように大半が動物モデルである。臨床研究とH₂の作用機序に関する分子レベルの研究はまだわずかしか無い。H₂に極めて多様な疾患治療効果があることは既に疑う余地もない。しかし、既存の治療法を上回る効果を発揮するものでなければ実用化は難しい。H₂が最も効果を発揮する疾患は何か、その為の適切な投与方法と投与量は何かを明確にしていく必要がある。そうでないと、臨床研究をしても曖昧な結果を量産することになる。また、作用機序のさらなる解明が必要である。特に水素水として投与した場合のH₂量は極めて少なく、脳等の臓器で検出することは困難である。しかし、水素水は中枢神経系で多様な疾患抑制作用を示しており、H₂による活性酸素種／ラ

ジカルの還元だけでは説明が困難である。Kawasakiらは、多能性の骨髄ストローマ細胞をH₂存在下で培養すると、酸化ストレスの減少を伴わない細胞老化の抑制が見られることを報告しており興味深い[56]。

健康長寿に向けての水素分子医学の可能性は大きいが、未解明の点が多々ある。一方で水素水は食品として容易に入手可能であり、すでに愛飲している人も多い。筆者らは、安全性も含めてさらなる研究を進めている。

引用文献

1. Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med* 13: 688-694, 2007.
2. Schwarz HA. Determination of some rate constants for the radical processes in the radiation chemistry of water. *J Phys Chem* 66: 255-262, 1962.
3. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL et al. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *JAMA* 297: 842-857, 2007.
4. Perman JA, Modler S, Barr RG et al. Fasting breath hydrogen concentration: normal values and clinical application. *Gastroenterology* 87: 1358-1363, 1984.
5. Kikkawa YS, Nakagawa T, Horie RT et al. Hydrogen protects auditory hair cells from free radicals. *Neuroreport* 20: 689-694, 2009.
6. Qian LR, li BL, Cao F et al. Hydrogen-rich PBS protects cultured human cells from ionizing radiation-induced cellular damage. *Nuclear Technology & Radiation Protection* 25: 23-29, 2010.
7. Chan PH. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* 27: 1124-1129, 1996.
8. Cai JM, Kang ZM, Liu W et al. Hydrogen therapy reduces apoptosis in neonatal hypoxia-ischemia rat model. *Neurosci lett* 441: 167-172, 2008.
9. Fukuda KI, Asoh S, Ishikawa M et al. Inhalation of hydrogen gas suppresses hepatic injury caused by ischemia/reperfusion through reducing oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 361: 670-674, 2007.
10. Hayashida K, Sano M, Ohsawa I et al. Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun* 373: 30-35, 2008.
11. Oharazawa H, Igarashi T, Yokota T et al. Protection of the retina by rapid diffusion of

- hydrogen: administration of hydrogen-loaded eye drops in retinal ischemia-reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:487-492, 2010.
12. Cai JM, Kang ZM, Liu K et al. Neuroprotective effects of hydrogen saline in neonatal hypoxia-ischemia rat model. *Brain Res* 1256: 129-137, 2009.
 13. Sun Q, Kang ZM, Cai JM et al. Hydrogen-rich saline protects myocardium against ischemia/reperfusion injury in rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 234: 1212-1219, 2009.
 14. Mao YF, Zheng XF, Cai JM et al. Hydrogen-rich saline reduces lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 381: 602-605, 2009.
 15. Zheng XF, Mao YF, Cai JM et al. Hydrogen-rich saline protects against intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Free Radical Res* 43: 478-484, 2009.
 16. Chen H, Sun YP, Hu PF et al. The effects of hydrogen-rich saline on the contractile and structural changes of intestine induced by ischemia-reperfusion in rats. *J Surg Res*, in press. doi:10.1016/j.jss.2009.07.045
 17. Shingu C, Koga H, Hagiwara S et al. Hydrogen-rich saline solution attenuates renal ischemia-reperfusion injury. *J Anesth* 24: 569-574, 2010.
 18. Buchholz BM, Kaczorowski DJ, Sugimoto R et al. Hydrogen inhalation ameliorates oxidative stress in transplantation induced intestinal graft injury. *Am J Transplant* 8: 2015-2024, 2008.
 19. Nakao A, Kaczorowski DJ, Wang Y et al. Amelioration of rat cardiac cold ischemia/reperfusion injury with inhaled hydrogen or carbon monoxide, or both. *J Heart Lung Transplant* 29: 544-553, 2010.
 20. Kawamura T, Huang CS, Tochigi N et al. Inhaled hydrogen gas therapy for prevention of lung transplant-induced ischemia/reperfusion injury in rats. *Transplantation* 90: 1344-1351, 2010.
 21. Ohsawa I, Nishimaki K, Yamagata K et al. Consumption of hydrogen water prevents atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 377: 1195-1198, 2008.
 22. Saremi A, Arora R. Vitamin E and cardiovascular disease. *Am J Ther* 17: e56-e65, 2010.
 23. Kajiyama S, Hasegawa G, Asano M et al. Supplementation of hydrogen-rich water improves lipid and glucose metabolism in patients with type 2 diabetes or impaired glucose tolerance. *Nutr Res* 28: 137-143, 2008.
 24. Nakao A, Toyoda Y, Sharma P et al. Effectiveness of hydrogen rich water on antioxidant status of subjects with potential metabolic syndrome-an open label pilot study. *J Clin Biochem Nutr* 46: 140-149, 2010.
 25. Nagata K, Nakashima-Kamimura N, Mikami T et al. Consumption of molecular hydrogen prevents the stress-induced impairments in hippocampus-dependent learning tasks during chronic physical restraint in mice. *Neuropsychopharmacology* 34: 501-508, 2009.
 26. Sato Y, Kajiyama S, Amano A et al. Hydrogen-rich pure water prevents superoxide formation in brain slices of vitamin C-depleted SMP30/GNL knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 375: 346-350, 2008.
 27. Matchett GA, Fathali N, Hasegawa Y et al. Hydrogen gas is ineffective in moderate and severe neonatal hypoxia-ischemia rat models. *Brain Res* 1259: 90-97, 2009.
 28. Fu Y, Ito M, Fujita Y et al. Molecular hydrogen is protective against 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal degeneration in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 453: 81-85, 2009.
 29. Fujita K, Seike T, Yutsudo N et al. Hydrogen in drinking water reduces dopaminergic neuronal loss in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *PLoS ONE*. 4: e7247, 2009.
 30. Lin Y, Kashio A, Sakamoto T et al. Hydrogen in drinking water attenuates noise-induced hearing loss in guinea pigs. *Neurosci Lett* 487: 12-16, 2011.
 31. Nakashima-Kamimura N, Mori T, Ohsawa I et al. Molecular hydrogen alleviates nephrotoxicity induced by an anti-cancer drug cisplatin without compromising anti-tumor activity in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 64: 753-761, 2009.
 32. Kitamura A, Kobayashi S, Matsushita T et al. Experimental verification of protective effect of hydrogen-rich water against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats using dynamic contrast-enhanced CT. *Br J Radiol* 83: 509-514, 2010.
 33. Cardinal JS, Zhan J, Wang Y et al. Oral hydrogen water prevents chronic allograft nephropathy in rats. *Kidney Int* 77: 101-109, 2010.
 34. Itoh T, Fujita Y, Ito M et al. Molecular hydro-

- gen suppresses Fc ϵ RI-mediated signal transduction and prevents degranulation of mast cells. *Biochem Biophys Res Commun* 389: 651-656, 2009.
35. Kajiya M, Silva MJ, Sato K et al. Hydrogen mediates suppression of colon inflammation induced by dextran sodium sulfate. *Biochem Biophys Res Commun* 386: 11-15, 2009.
 36. Qian L, Cao F, Cui J et al. The potential cardioprotective effects of hydrogen in irradiated mice. *J Radiat Res (Tokyo)* 51: 741-747, 2010.
 37. Zhu WJ, Nakayama M, Mori T et al. Intake of water with high levels of dissolved hydrogen (H₂) suppresses ischemia-induced cardio-renal injury in Dahl salt-sensitive rats. *Nephrol Dial Transplant*, in press. doi:10.1093/ndt/gfq727
 38. Suzuki Y, Sano M, Hayashida K et al. Are the effects of α -glucosidase inhibitors on cardiovascular events related to elevated levels of hydrogen gas in the gastrointestinal tract? *FEBS Lett* 583: 2157-2159, 2009.
 39. Shimouchi A, Nose K, Yamaguchi M et al. Breath hydrogen produced by ingestion of commercial hydrogen water and milk. *Biomarker Insights* 4: 27-32, 2009.
 40. Shimouchi A, Nose K, Takaoka M et al. Effect of dietary turmeric on breath hydrogen. *Dig Dis Sci* 54: 1725-1729, 2009.
 41. Kajiya M, Sato K, Silva MJ et al. Hydrogen from intestinal bacteria is protective for Concanavalin A-induced hepatitis. *Biochem Biophys Res Commun* 386: 316-321, 2009.
 42. Nakayama M, Nakano H, Hamada H et al. A novel bioactive haemodialysis system using dissolved dihydrogen (H₂) produced by water electrolysis: a clinical trial. *Nephrol Dial Transplant* 25: 3026-3033, 2010.
 43. Kubota M, Shimmura S, Kubota S et al. Hydrogen and N-acetyl-L-cysteine rescue oxidative stress-induced angiogenesis in a mouse corneal alkali-burn model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, in press. doi:10.1167/iovs.10-6167
 44. Domoki F, Oláh O, Zimmermann A et al. Hydrogen is neuroprotective and preserves cerebrovascular reactivity in asphyxiated newborn pigs. *Pediatr Res* 68: 387-392, 2010.
 45. Xie K, Yu Y, Pei Y et al. Protective effects of hydrogen gas on murine polymicrobial sepsis via reducing oxidative stress and HMGB1 release. *Shock* 34: 90-97, 2010.
 46. Xie K, Yu Y, Zhang Z et al. Hydrogen gas improves survival rate and organ damage in zymosan-induced generalized inflammation model. *Shock* 34: 495-501, 2010.
 47. Qian L, Cao F, Cui J et al. Radioprotective effect of hydrogen in cultured cells and mice. *Free Radical Res* 44: 275-282, 2010.
 48. Chen H, Sun YP, Li Y et al. Hydrogen-rich saline ameliorates the severity of L-arginine-induced acute pancreatitis in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 393: 308-313, 2010.
 49. Li J, Wang C, Zhang JH et al. Hydrogen-rich saline improves memory function in a rat model of amyloid-beta-induced Alzheimer's disease by reduction of oxidative stress. *Brain Res* 1328: 152-161, 2010.
 50. Dole M, Wilson FR, Fife WP. Hyperbaric hydrogen therapy: a possible treatment for cancer. *Science* 190: 152-154, 1975.
 51. Gharib B, Hanna S, Abdallahi OM et al. Anti-inflammatory properties of molecular hydrogen: investigation on parasite-induced liver inflammation. *C R Acad Sci III*, 324: 719-724, 2001.
 52. Schoenfeld MP, Ansari RR, Zakrajsek JF et al. Hydrogen therapy may reduce the risks related to radiation-induced oxidative stress in space flight. *Med Hypotheses* 76: 117-118, 2010.
 53. Jones JA, McCarten M, Manuel K et al. Cataract formation mechanisms and risk in aviation and space crews. *Aviat Space Environ Med* 78: A56-66, 2007.
 54. Barr YR, Bacal K, Jones JA et al. Breast cancer and spaceflight: risk and management. *Aviat Space Environ Med* 78: A26-37, 2007.
 55. Koike Y, Frey MA, Sahiar F et al. Effects of HZE particle on the nigrostriatal dopaminergic system in a future Mars mission. *Acta Astronaut* 56: 367-378, 2005.
 56. Kawasaki H, Guan J, Tamama K. Hydrogen gas treatment prolongs replicative lifespan of bone marrow multipotential stromal cells in vitro while preserving differentiation and paracrine potentials. *Biochem Biophys Res Commun* 397: 608-613, 2010.

Molecular Hydrogen Medicine: Current Status and Future Challenges

Ikuroh Ohsawa

Environmental Gerontology

Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

In these four years, hydrogen molecule (H_2) has been shown to exert beneficial effects in animal models and clinical trials of many diseases. We have previously reported that H_2 selectively reduces hydroxyl radical and peroxynitrite without affecting other reactive oxygen species. Inhalation of hydrogen gas in rodents has been demonstrated to limit the infarct volume of the brain, heart and liver by reducing ischemia/reperfusion (I/R) injury and ameliorate heart and intestinal transplant injuries through its antioxidative actions. H_2 -loaded eye drops have also protected retinal I/R injury, intravenous infusion of hydrogen-rich saline reduced heart, intestinal and kidney I/R injury, and adding H_2 to hemodialysis solutions improved blood pressure control with reduction of inflammatory reactions in a clinical trial. Moreover, consumption of water with dissolved H_2 (hydrogen water) by rodents prevents stress-induced cognitive decline, neurotoxin-induced degeneration of dopaminergic neurons, cisplatin-induced nephrotoxicity, chronic allograft nephropathy, and immediate-type allergic reaction. Clinical trials demonstrated a decrease in low-density lipoprotein and oxidative stress after drinking hydrogen water. H_2 has the potential to easily diffuse into organs and no known toxic effects on the human body. Thus, treatment with H_2 has several potential advantages over current therapies used for oxidative stress- and inflammation-related diseases.

Key words: animal model, clinical trial, gas therapy, hydrogen molecule, oxidative stress

【総 説】

老化に伴う腎尿細管障害におけるSirt1- オートファジー経路の役割

久米真司¹⁾, 前川聡¹⁾, 古家大祐²⁾

¹⁾ 滋賀医科大学・内科学講座・糖尿病腎臓神経内科

²⁾ 金沢医科大学・内科学講座・内分泌代謝制御学

要約

高齢化社会を背景として、慢性腎臓病を有する患者人口が増加している。一方、カロリー制限は様々な生物種において寿命延長をもたらす、哺乳類においては、動脈硬化や悪性疾患、腎病変など、加齢に伴い増加する疾患の発症予防効果を発揮する。そこで、新たな抗老化治療の可能性を見出すために、カロリー制限による抗老化に関わる分子機構の解明が進められてきた。近年、ヒストン脱アセチル化酵素 (Sirt1)、また細胞内浄化機構であるオートファジーが、カロリー制限に伴う寿命延長効果に重要な役割を果たしている事が示された。その後、これらの各臓器における生理的役割が徐々に明らかとされ、様々な疾患に対する治療標的としての可能性が報告されている。我々もSirt1依存的なオートファジー活性調節が、カロリー制限による抗腎老化に必須であることを見出した。そこで本稿では、Sirt1- オートファジー経路の役割を中心に、カロリー制限による腎保護効果に関して概説する。

キーワード：加齢腎、Sirt1、オートファジー、ミトコンドリア、低酸素

1. はじめに

腎臓は老化に伴い組織障害、機能障害を呈する臓器の一つであり、高齢化社会を背景として、慢性腎臓病を有する患者人口が増加している[1,2]。よって、加齢に伴う腎障害の発症機構ならびに抑制機構の解明が望まれている。

ミトコンドリア機能異常に起因した酸化ストレスの増大は、老化に伴う臓器障害の一要因と考えられている[3]。この事実は多くの基礎研究の結果から導き出されているが、実際の臨床の場において、抗酸化薬投与による抗老化効果は十分に示されていない。つまり、酸化ストレスを標的として抗老化を達成するためには、一度産生された酸化ストレスの除去だけでは不十分であり、加齢に伴い生じるミトコンドリア機能異常の発症機構を解明し、酸化ストレスの産生を抑制する新たな治療法を確立しなければならない。

カロリー制限により寿命が延長する。この事実は、1934年に初めてMcCayらの行ったラットを用いた研究結果により示された[4]。その後、カロリー制限と寿命延長、抗老化に関する研究が精力的に進められ、その効果はサル(*rhesus monkey*)といった高等哺乳類においても確

認されるまでになった[5]。さらに、加齢に伴い増加する動脈硬化、悪性疾患、慢性腎臓病などの発生率も、カロリー制限により抑制されることが示されている[6,7]。基礎研究の結果からは、カロリー制限による抗老化、組織保護効果の背景には、酸化ストレスの軽減、ミトコンドリア機能保持が関与している可能性が報告されている[7]。よって、カロリー制限が示す抗酸化ストレス作用、ミトコンドリア保護機構の解明が、抗老化をもたらす新たな治療標的の解明につながるものと考えられる。

インスリンシグナル/IGF-1、各種ホルモン(成長ホルモン、ステロイドホルモン)、forkhead protein family、mTORといった様々な分子機構が、カロリー制限による寿命延長に関わりうる[8]。更に近年、Silent information regulator 2 (mammalian homolog: *Sirt1*)が、カロリー制限による寿命延長に不可欠である抗老化分子として新たに同定された[9]。当初、Sirt1はNAD⁺依存性ヒストン脱アセチル化酵素として同定されたが、その後、この分子はNAD⁺濃度を介した細胞内の代謝センサーとして働き、ヒストン以外の核内転写因子に対する脱アセチル化活性を介し、様々な臓器における代謝制御、ストレス応答をもたらさう事が明らかとなってきた(図1)[10]。一方、カロリー制限とミトコンドリアに関する研究から、ミトコンドリアバイオジェネシスならびにオートファジーといった、ミトコンドリア機能調節機構の異常が、加齢に伴う疾患の発症に関与することも示され始めている[11,12]。このようにカロリー制限に関わる研究から見出されてきた分子、あるいは細胞内分子機構の異常は老化に関わる疾患の原因として注目され、そ

連絡先：〒520-2192

滋賀県大津市瀬田月輪町

滋賀医科大学 内科学講座 糖尿病腎臓神経内科

Tel: 077-548-2222

FAX: 077-543-3858

e-mail: skume@belle.shiga-med.ac.jp

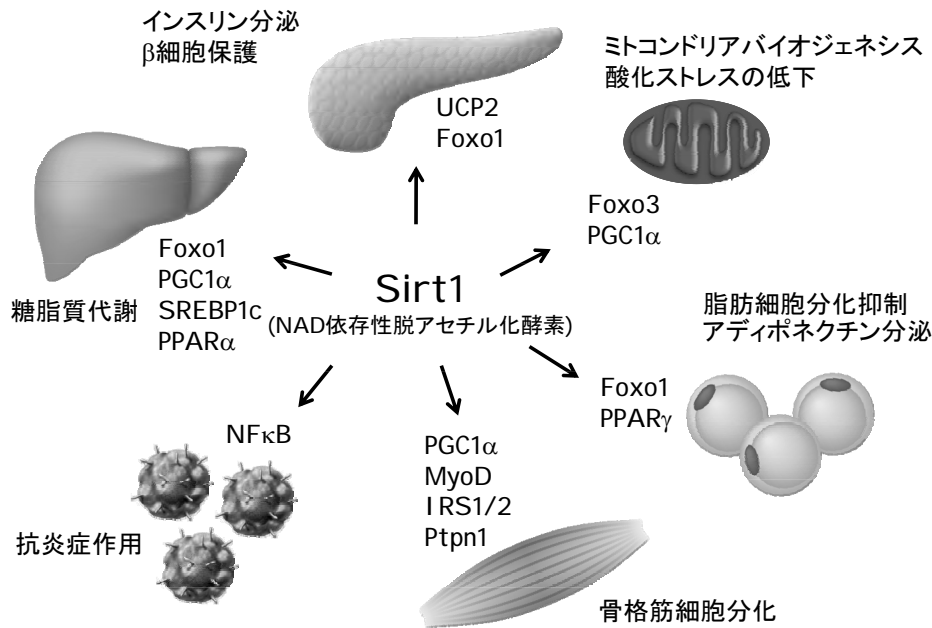


図1. 脱アセチル化活性を介した抗老化分子Sirt1の全身代謝制御の役割：

Sirt1は絶食時における各代謝臓器において、NAD⁺濃度依存性に様々な転写因子の脱アセチル化を介し、全身の糖脂質代謝を制御している。

の活性化による新たな治療標的の解明が進められている。

我々も加齢腎病変に対するカロリー制限の腎保護効果、その分子機構の解明を行った[13]。その結果、加齢に伴う腎での異常ミトコンドリア蓄積には、腎での低酸素状態に対するオートファジー活性の低下が関与し、この異常はカロリー制限により改善されることを見出した。また、それらの分子機構の解明から、抗老化分子Sirt1の活性化を介したオートファジー制御が、カロリー制限による腎保護効果に不可欠であることも明らかとなった。そこで本稿では、Sirt1- オートファジー経路の役割を中心に、カロリー制限による抗老化作用、腎保護効果に関わ

る分子機構に関し概説する。

2. 加齢性腎尿細管病変におけるミトコンドリア異常、酸化ストレス発生機構

加齢(24か月齢)マウスの近位尿細管細胞では、異常ミトコンドリア蓄積を伴う酸化ストレスの増大が認められた(図2、3)。また、酸化ストレスに関連したミトコンドリアDNA変異の頻度と腎機能障害の程度(血清シスタチンCの上昇)は強い正相関を示した(図2)。この結果は、尿細管細胞におけるミトコンドリア機能異常と腎機能障害との強い関連性を示しており、加齢に関連したミトコ

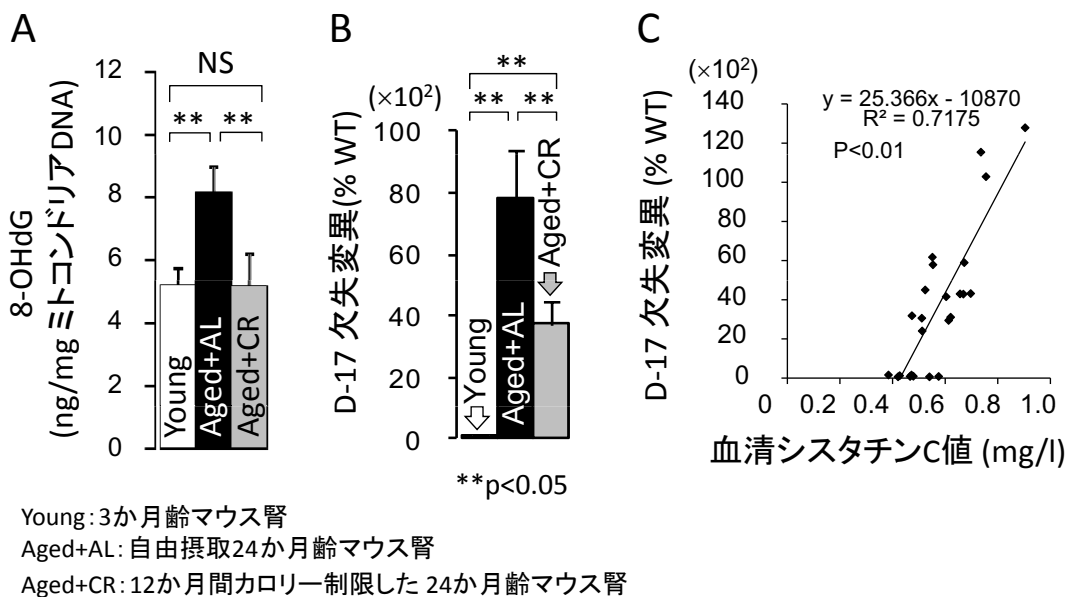


図2. カロリー制限による加齢腎におけるミトコンドリアDNA異常の改善効果：

(A、B) 加齢腎でのミトコンドリアDNAにおける8-OHdG含量ならびに欠変異は有意に増加し、12か月間のカロリー制限により改善する。(C) ミトコンドリア遺伝子変異の頻度と血清シスタチンC値は正相関する。(文献13より改変)

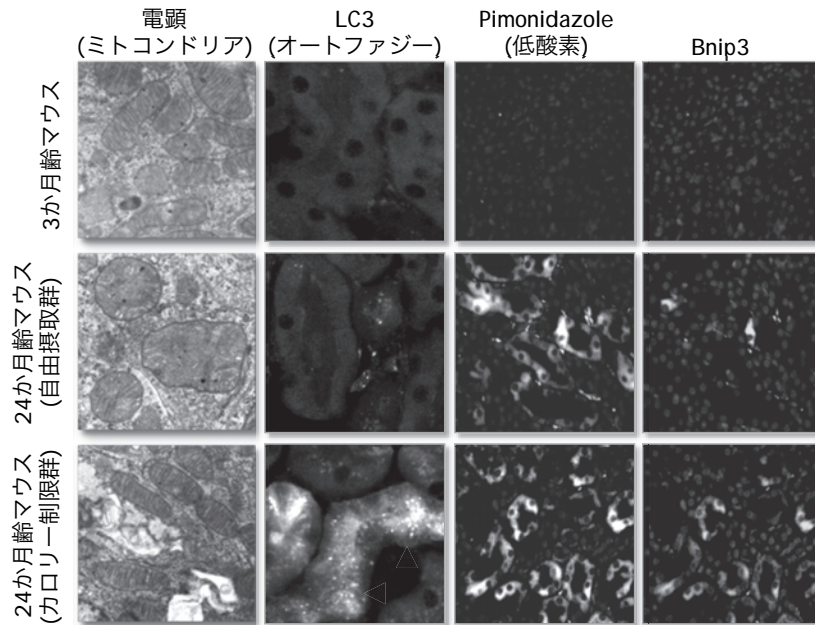


図3.カロリー制限による加齢腎におけるオートファジーの活性化：

若年マウス腎尿細管細胞では低酸素も認めず、ミトコンドリア障害は生じない(上段)。加齢マウス腎尿細管では低酸素状態でのBnip3発現、オートファジー活性が低下し、異常ミトコンドリアが蓄積する(中段)。12か月間のカロリー制限により加齢マウス腎尿細管細胞においても、低酸素状態でのBnip3発現、オートファジー活性は保たれ、ミトコンドリア形態は保持される(下段)。白色点状シグナルはオートファゴゾーム形成を示す。(文献13より改変)

ンドリア異常の是正が、加齢性腎障害の治療標的と成りえる可能性を示すものであった。

「オートファジー」とは細胞内蛋白質やオルガネラの分解機構の一つである。細胞がある種のストレス(アミノ酸飢餓、異常蛋白質・異常オルガネラの蓄積)に晒されると、細胞内にオートファゴソームが形成される。その後、分解標的分子を集積したオートファゴソームはリソソームと融合し標的分子と共に分解される(図4)[14]。このように、オートファジーは飢餓時の細胞内栄養素のリサイクル、ならびに異常蛋白・オルガネラの除去といった細胞内恒常性維持、浄化機構としての役割を担っている。つまり、我々の検討で認めた加齢に伴う異常ミトコンドリア蓄積は、加齢腎における潜在的なオートファジー活性の低下を意味する。飢餓に加え、低酸素もオートファジーを惹起するストレスの一つとして知られ

ている。我々の検討では、加齢腎で低酸素状態が亢進するが、老化した腎尿細管細胞では低酸素刺激に対するオートファジー活性の低下が確認された(図3)。一方、12か月齢からさらに12か月間のカロリー制限(40%制限)を加えたマウスにおいては、腎尿細管細胞での低酸素に対するオートファジー活性が保持され、異常ミトコンドリアの蓄積、腎機能障害は有意に改善を認めた(図3)。これらの結果は、加齢性腎病変の進展機構の解明において、低酸素に対する近位尿細管細胞のストレス応答制御機構、オートファジー調節機構の解明が重要であることを示唆するものであった(図5)。

そこで、オートファジー制御関連分子に関する検討を行った。Bnip3蛋白は低酸素状態でのオートファジー惹起に不可欠な蛋白として知られているが[15]、加齢腎尿細管細胞では、低酸素刺激下でもBnip3発現は有意に低

図4.オートファジー活性化制御機構：

飢餓状態、異常オルガネラの蓄積が生じると、細胞質内オートファジー関連蛋白のカスケード経路の活性化が生じ、オートファゴゾームが形成される。分解物質、オルガネラを含むオートファゴソームはリソソームと融合し(オートリソファゴソーム)、リソソーム酵素で分解される。

下し、カロリー制限を行うことで、この発現量が回復する事が明らかとなった(図4)。この結果は、近位尿細管細胞におけるBnip3発現調節が、加齢性腎病変進展に関わる

分子機構として重要な位置を占めていること示唆していた。

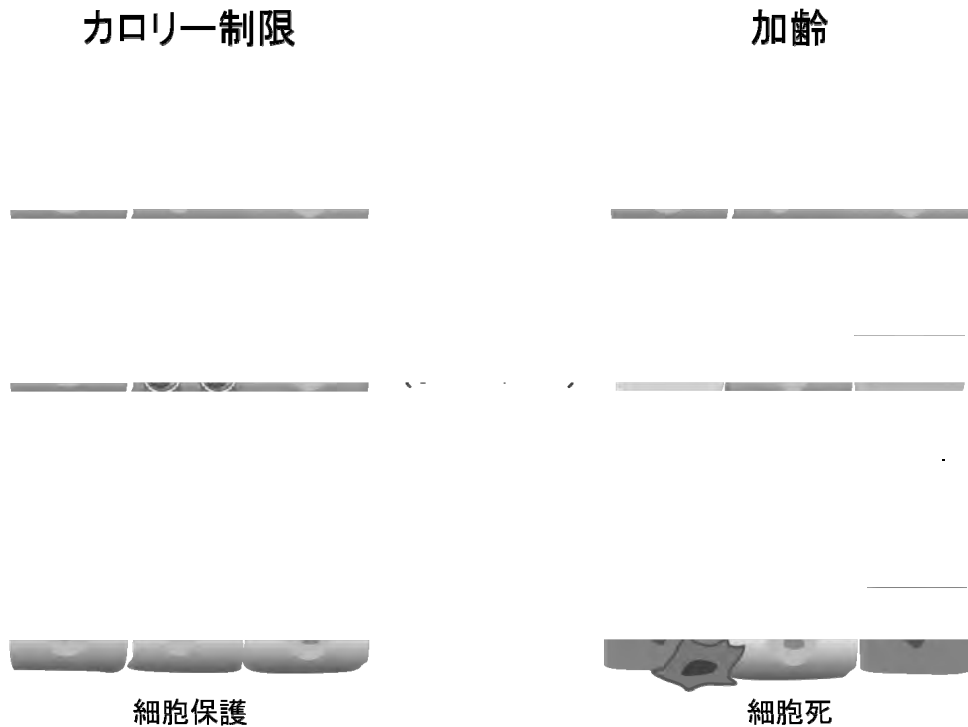


図5. 腎尿細管細胞におけるストレス応答：

低酸素というストレスに対し、尿細管細胞はストレス応答としてオートファジーを惹起するが加齢ではオートファジー活性が低下し、低酸素刺激に対する細胞の脆弱性が亢進する。カロリー制限によりオートファジー活性、ストレス応答が回復する。

3. Sirt1と加齢性腎病変との関わり

加齢に伴う腎病変の進展機構ならびにカロリー制限による抑制機構におけるSirt1の関与を検討した。加齢マウス腎において、Sirt1発現量は有意に減少していた。転写因子FOXO3aはSirt1脱アセチル化活性の基質の一つである[16]。加齢腎において、FOXO3aのアセチル化は亢進しており、発現量のみならずSirt1活性も加齢腎において有意に低下していることが示唆された。一方、Sirt1活性は、12か月間のカロリー制限により、加齢腎という老化臓器においても増強しうることが確認された。

加齢腎で認められたSirt1の発現低下が腎病変に及ぼす影響を検討するため、Sirt1ヘテロ欠損マウスにおける12か月齢での腎病変を検討した。12か月齢のワイルドタイプマウスでは加齢に伴う変化は認めず、Sirt1ヘテロ欠損マウスでは12か月齢という早期から、24か月齢マウスと類似した加齢性腎病変を呈し、尿細管細胞での異常ミトコンドリア蓄積、腎機能障害を認めた(図6)。さらに、Sirt1ヘテロ欠損マウスにカロリー制限を行ったが、加齢に伴うミトコンドリア異常、腎病変は改善されず、カロリー制限による加齢性腎病変の進展抑制効果にはSirt1が不可欠であることが示された(図6)。

また、これらマウス腎尿細管細胞において、異常ミトコンドリア除去機構であるオートファジーの検討を行った結果、Sirt1ヘテロ欠損マウスでは低酸素刺激に対す

るオートファジー活性が低下し、カロリー制限によっても回復を認めなかった(図6)。この結果から、加齢に伴うオートファジー活性低下にSirt1発現の低下が関与し、カロリー制限によるオートファジー活性に回復にSirt1が不可欠であることが示唆された。

4. 低酸素刺激でのオートファジーにおけるSirt1の役割

我々の検討でも示されたように、Bnip3蛋白の発現誘導は低酸素刺激に伴うオートファジー誘導に不可欠である。そこで、Sirt1が腎低酸素状態でのBnip3発現誘導に関与しうるかを検討した。結果、12か月齢のSirt1ヘテロ欠損マウスの腎尿細管細胞において、低酸素に伴うBnip3発現は有意に減少し、その発現低下はカロリー制限によっても回復を認めなかった(図6)。これらの結果は、腎低酸素条件下において、Bnip3発現誘導にSirt1活性が不可欠であることを示している。

低酸素刺激に暴露された腎尿細管細胞において、脱アセチル化酵素Sirt1が如何にBnip3発現を調節し、オートファジーを誘導しうるのかを、培養近位尿細管細胞を用い検討した。結果、腎における転写因子Foxo3aの活性が、インスリンシグナルによるリン酸化とSirt1による脱アセチル化のバランスにより制御されており、その活性化が低酸素条件下でのBnip3発現誘導に必須であるこ

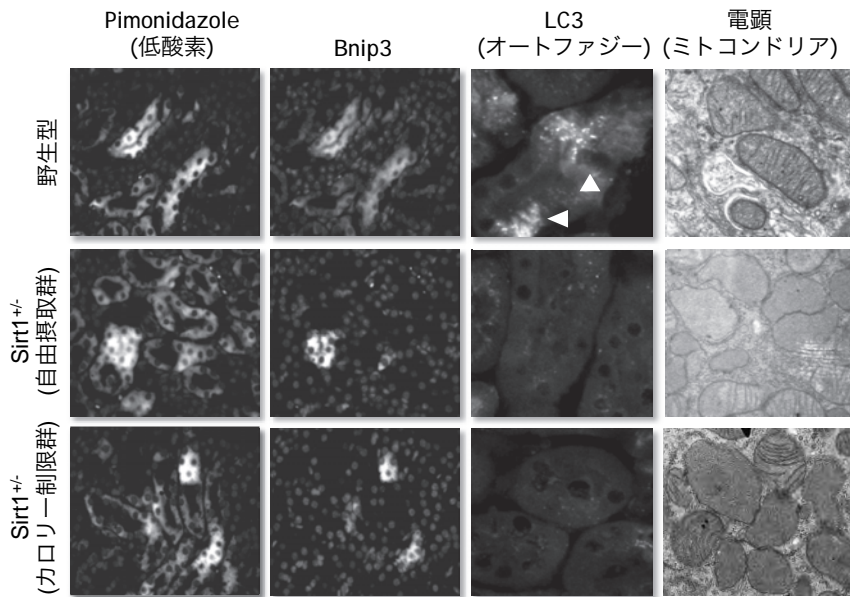


図6.カロリー制限によるオートファジー活性化におけるSirt1の役割：

12か月齢野生型マウス腎尿細管細胞では低酸素に対するBnip3発現オートファジー活性が保持され、ミトコンドリア障害は生じない(上段)。12か月齢Sirt1ヘテロノックアウトマウス(Sirt1^{+/-})腎尿細管では低酸素状態でのBnip3発現、オートファジー活性が低下し、異常ミトコンドリアが蓄積する(中段)。6か月間のカロリー制限によってもSirt1^{+/-}腎尿細管細胞では低酸素状態でのBnip3発現、オートファジー活性は回復しない(下段)。白矢頭：白色点状シグナルはオートファゴソーム形成を示す。(文献13より改変)

とが明らかとなった。加齢で亢進する腎インスリンシグナルの亢進は、Foxo3aのリン酸化(不活性化)をもたらし、Bnip3発現、低酸素条件下でのオートファジーを抑制する。このオートファジー抑制はミトコンドリア酸化ストレスの増大をもたらし、細胞死を誘導する(図7左)。

カロリー制限を行い、インスリンシグナルが抑制され、Sirt1が活性化した状況では、Foxo3aは脱リン酸化、脱アセチル化され、転写活性が増強する。結果、低酸素条件下でのBnip3発現、オートファジー活性が増強し、酸化ストレス軽減に繋がること明らかとなった(図7右)。

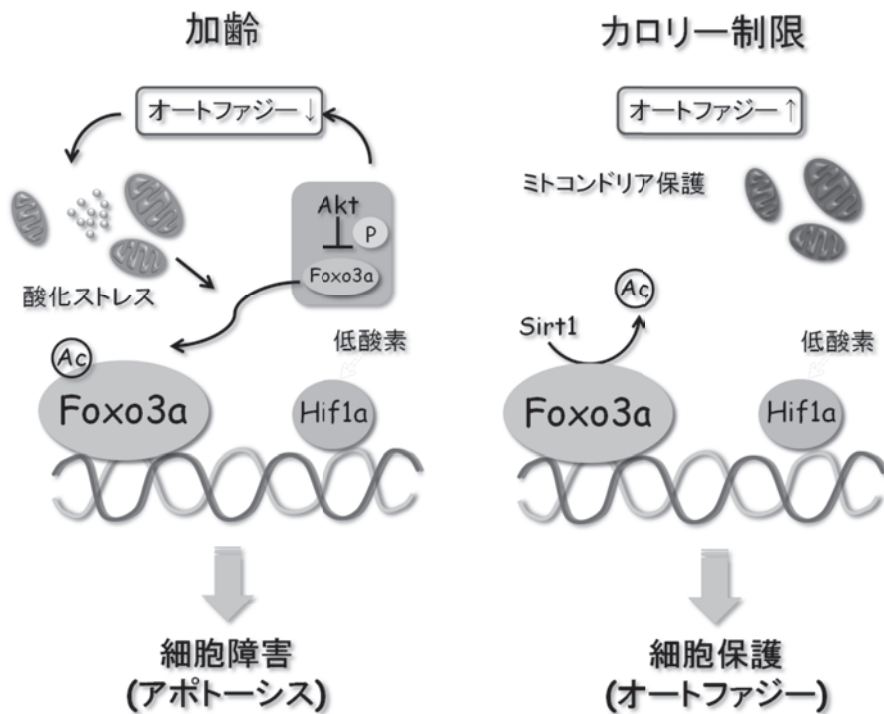


図7.加齢腎におけるオートファジー抑制分子機構(左図)：

過剰なインスリンシグナルは転写因子Foxo3aの核内移行を抑制し、オートファジー活性を抑制する。結果生じた酸化ストレスにより活性化され、アセチル化されたFoxo3aはアポトーシス誘導遺伝子発現を誘導し細胞死をもたらす。

カロリー制限によるオートファジー活性化機構(右図)：

カロリー制限下ではFoxo3aは核内に局在し、Sirt1による脱アセチル化を受け、オートファジー関連遺伝子、細胞周期制御遺伝子の発現を誘導し、細胞修復・保護をもたらす。

5. Sirt1ならびにオートファジーの腎臓におけるその他の役割

近年、Sirt1の腎線維化における役割が明らかとなった[17]。マウスにおける片側尿管結紮(UUO)モデルは腎線維化モデルとして用いられるが、Sirt1ヘテロ欠損マウスにおいてUUOモデルを作成すると、野生型マウスに比べ、有意な線維化ならびにアポトーシスの悪化を示すことが明らかとなっている。

腎臓は低酸素刺激に対し、エリスロポイエチンを産生し赤血球数を調節することで、全身の酸素代謝を制御している。近年、Sirt1がエリスロポイエチン産生に関わる転写因子Hif2aの脱アセチル化を介した活性化をもたらす、低酸素状態でのエリスロポイエチン産生を亢進させる事が報告された[18]。腎臓におけるSirt1は腎臓局所における低酸素に対する尿細管細胞のストレス応答のみならず、エリスロポイエチン産生を介した全身の酸素代謝制御も担っている。

我々の教室の検討では、Sirt1は酸化ストレスによるアポトーシスをp53の脱アセチル化を介し抑制すること[19]、また、サイトカインTGF β によるアポトーシスをsmad7の脱アセチル化を介し抑制することを明らかとしている[20]。メザンギウム細胞のアポトーシスは糸球体疾患の硬化病変の形成に関与している事が示唆されており、その抑制は糸球体硬化病変抑制に寄与する可能性が考えられる。

糸球体上皮細胞では、若年マウスにおいて、すでに恒常的オートファジー活性が認められ、加齢とともにその活性は低下する [21]。この加齢に伴う糸球体上皮細胞におけるオートファジー活性異常は、糸球体上皮細胞の機能異常、数的減少をもたらす、蛋白尿発症に関与する。

6. おわりに

カロリー制限が、加齢や代謝異常に関わる様々な疾患に予防的に働くことは周知の事実であるが、その分子機構は未だ完全に明らかにされたとは言えない。老化に伴う近位尿管細胞におけるオートファジー活性の低下は、ミトコンドリア異常をもたらす、腎障害の進展因子としてはたらく。また、カロリー制限による腎保護効果にはSirt1-オートファジー経路の活性化によるミトコンドリア保護が関与する。これらの結果は、臓器の老化に関わる分子機構の解明に一步近づいたのみならず、Sirt1-オートファジー経路の活性化によるミトコンドリア保護、酸化ストレス産生の減少を標的とした抗老化治療の可能性を示唆している。今後、腎臓のみならず他臓器における検討も必要であるが、Sirt1-オートファジー経路の活性化が、慢性腎臓病を含む老化関連疾患における新たな治療標的となることを期待している。

参考文献

1. Coresh, J., Astor, B.C., Greene, T., et al. Prevalence of chronic kidney disease and decreased kidney function in the adult US

- population: Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Kidney Dis* 41:1-12, 2003.
2. Epstein, M. Aging and the kidney. *J Am Soc Nephrol* 7:1106-1122, 1996.
3. Cutler, R.G. Human longevity and aging: possible role of reactive oxygen species. *Ann N Y Acad Sci* 621:1-28, 1991.
4. McCay CM, Crowell MF. Prolonging the life span. *The scientific Monthly* 39: 405-414, 1934.
5. Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC., et al. Caloric restriction delays disease onset and mortality in Rhesus monkeys. *Science* 325: 201-204, 2009.
6. Weindruch, R., and Sohal, R.S. Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Caloric intake and aging. *N Engl J Med* 337:986-994, 1997.
7. McKiernan SH, Tuen VC, Baldwin K, et al. Adult-onset calorie restriction delays the accumulation of mitochondrial enzyme abnormalities in aging rat kidney tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 292: F1751-60, 2007.
8. Fontana L, Partridge L, Longo VD. Extending healthy life span—from yeast to humans. *Science* 328: 321-326, 2010
9. Lin SJ, Defossez PA, Guarente L. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 289: 2126-2128, 2000.
10. Liang F, Kume S, Koya D. SIRT1 and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol* 5: 367-73, 2009.
11. López-Lluch G, Irujo PM, Navas P, et al. Mitochondrial biogenesis and healthy aging. *Exp Gerontol* 43 :813-9, 2008.
12. Salminen A, Kaarniranta K. Regulation of the aging process by autophagy. *Trends Mol Med* 15 :217-24, 2009
13. Kume S, Uzu T, Horiike K, et al. Calorie restriction enhances cell adaptation to hypoxia through Sirt1-dependent mitochondrial autophagy in mouse aged kidney. *J Clin Invest* 120: 1043-55, 2010.
14. Mizushima, N. Autophagy: process and function. *Genes Dev* 21:2861-2873, 2007.
15. Zhang, H., Bosch-Marce, M., Shimoda, L.A., et al. Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem* 283:10892-10903, 2008.
16. Brunet, A., Sweeney, L.B., Sturgill, J.F., et al. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science*

- 303:2011-2015, 2004.
17. He W, Wang Y, Zhang MZ, et al.: Sirt1 activation protects the mouse renal medulla from oxidative injury. *J Clin Invest* 120: 1056-68, 2010.
 18. Dioum EM, Chen R, Alexander MS, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor 2alpha signaling by the stress-responsive deacetylase sirtuin 1. *Science* 324: 1289-93, 2009.
 19. Kume S, Haneda M, Kanasaki K, et al. Silent information regulator 2 (SIRT1) attenuates oxidative stress-induced mesangial cell apoptosis via p53 deacetylation. *Free Radic Biol Med* 40: 2175-82, 2006.
 20. Kume S, Haneda M, Kanasaki K, et al. SIRT1 inhibits transforming growth factor beta-induced apoptosis in glomerular mesangial cells via Smad7 deacetylation. *J Biol Chem* 282: 151-8, 2007.
 21. Hartleben B, Gödel M, Meyer-Schwesinger C, et al.: *J Clin Invest* 20: 1084-96, 2010.

The role of Sirt1-dependent autophagy in age-associated renal tubular damage

Shinji Kume¹⁾, Hiroshi Maegawa¹⁾, Daisuke Koya²⁾

¹⁾Department of Medicine, Shiga University of Medical Science

²⁾Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Internal Medicine, Kanazawa Medical University

High prevalence of chronic kidney disease in the elderly patients is a health problem worldwide. Calorie restriction (CR) promotes life-span elongation in various species and decreases the incidence of age-associated diseases such as atherosclerosis, cancer and also kidney disease in human subjects. Thus, to identify the molecular mechanism underlying CR-mediated renoprotection may suggest the new therapeutic target for the prevention of chronic kidney diseases in the elderly patients. Based on the results from recent studies aiming to reveal the mechanism underlying CR-mediated life-span elongation in the lower species, both Sirt1 and autophagy have been identified as anti-aging factors. Growing evidences suggest that these factors are involved in the pathogenesis of age-associated and metabolic diseases also in mammals. Also, our recent study has shown the renoprotective role of Sirt1-dependent autophagy in the kidney of aged mouse, which highlighted a new role of the Sirt1-autophagy axis on cellular adaptation to aging process. In this review, we would like to discuss about the role of Sirt1-dependent autophagy on CR-mediated renoprotection against aging.

Key words : aged kidney, Sirt1, autophagy, mitochondria, hypoxia

【総 説】

染色体機能ドメインのキネトコアと細胞老化

前原佳代子

国立成育医療研究センター研究所 周産期病態研究部 胎児発育研究室

要約

*in vitro*で培養された正常細胞は、ある一定回数分裂した後に増殖を止める。この増殖停止を「細胞老化」という。Hayflickらによって報告された複製老化は、染色体複製と分裂を繰り返すことに伴うテロメアの短縮により誘導される。また、活性化がん遺伝子がもたらす過剰な増殖刺激やDNA損傷や酸化ストレスはストレス誘導性老化の引き金になる。最近、均等な染色体分配を保障するキネトコアの異常が、細胞老化を引き起こすことが報告されている。本稿では、マウスやヒトの正常細胞を利用したキネトコア研究から得られた成果を中心に、キネトコアの機能不全と細胞老化の関係を紹介する。

キーワード： CENP-A, kinetochore, p53, SAC, senescence

1. はじめに

細胞老化は、正常細胞の非可逆的な増殖停止 (irreversible growth arrest) と定義され、Hayflickらにより提唱された複製老化 (replicative senescence) [1]と、ストレスによって起きるストレス誘導性細胞老化 (stress-induced senescence; SIS) に分類される。1997年にSerranoらが、活性化がん遺伝子*ras*導入によって正常細胞に過剰な増殖刺激が加わるとSISが誘導されること[2]を報告して以降、酸化ストレス、DNA障害など様々なストレスがSISの誘導に関与することが示された (図1A)。細胞周期研究から、がん抑制の主要な経路であるp16-Rb経路とp53経路が、細胞老化という非可逆的な増殖停止に重要な役割を果たすことが明らかにされている[3-6] (図1B)。また、2003年に成田らによって、老化したヒトの線維芽細胞に特徴的なヘテロクロマチン構造が生じることが報告された[7]。Senescence-associated heterochromatic foci (SAHF) と命名されたヘテロクロマチン構造には、ヘテロクロマチンタンパク質1 (Heterochromatin protein 1; HP1)、トリメチルヒストンH3K9 (H3K9me3)、macroH2A、High-Mobility Group A protein (HMGA) が集積する[7-9]。逆に、リンカーヒストンH1は老化した細胞核から消失する[10]。細胞周期進行に必須な転写因子E2F[11]のターゲット遺伝子のプロモーター領域におけるヘテロクロマチン化による発現低下などエピジェネティックな遺伝子発現制御とあわせて、SAHFが非可逆的な増殖停止の確立・維持

に関与することが示唆され、クロマチン構造に着目した細胞老化の研究が芽生えつつある。

さて、細胞核に納められたゲノム情報は、細胞周期のS期で複製され、M期に凝縮した2本の姉妹染色分体になり、それぞれが娘細胞へ均等に分配される。染色体が分配される時に紡錘体が結合する領域には、DNAと複数のタンパク質からなる高次複合体が形成され、この特殊な構造はキネトコア (kinetochore) (動原体) とよばれている (図2A)。キネトコアが形成されるDNAの領域をセントロメア (centromere) という。真核生物の染色体は、セントロメア、テロメア (telomere)、複製起点の3種類のDNA配列があれば、自律的な染色体として細胞で機能する。染色体末端に位置するテロメアは、末端複製問題 (複製の際に完全に複製できずに1細胞世代に50~100bpずつ短くなる) のため、テロメア長を維持するテロメラーゼ (telomerase) 活性がきわめて低いヒト体細胞では、分裂のたびに短縮する。テロメアの短縮とそれに伴う機能不全が複製老化の内的要因であり、テロメアは有力な老化の生物時計と考えられている[5, 12]。それでは、細胞周期と協調的に進行する染色体分配を制御するキネトコアには、細胞が老化する過程で、その構造や機能になんらかの変化が生じるのであろうか? また、キネトコアへのストレスはSISを誘導するのであろうか? ヒトの細胞を使ったキネトコアの機能解析は、HeLa細胞など不死化・がん化した細胞を利用し、精力的に行われている。これらの研究は、M期の染色体分配におけるキネトコアの役割について多くの知見をもたらしたが、キネトコアの機能や構造の変化が増殖にあたえる影響を解析する目的には適さない。本稿では、ヒト・マウスの正常細胞あるいは個体を用いて行われたキネトコア研究をもとに、キネトコアと細胞老化の関連について解説したい。

連絡先：〒157-8535
東京都世田谷区大蔵2-10-1
TEL: 03-3416-0181
FAX: 03-3417-2864
E-mail: kmaehara@nch.go.jp

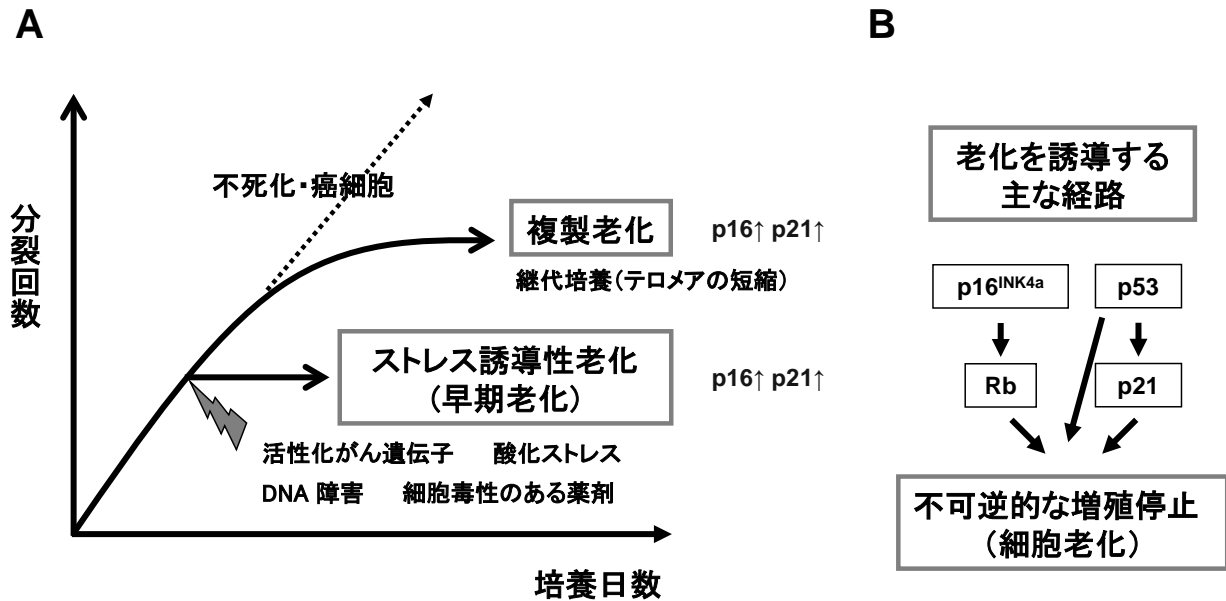


図1 細胞老化

A. 複製老化とストレス誘導性老化(早期老化) B. 老化を誘導する主要な経路 実際にはp16-Rb経路とp53経路はパラレルではなく、クロストークしている。

2. セントロメアに局在するタンパク質

出芽酵母のセントロメアは、CDEI、CDEII、CDEIIIと呼ばれる125bpのDNAから構成され、セントロメア領域はDNAの一次配列によって決まる。ところが、高等脊椎動物のセントロメアDNAは、紡錘体が付着して機能するために必要な共通配列を持たない。そのかわりに、セントロメアに局在するタンパク質は、酵母からヒトまで高度に保存され、それらのなかでもcentromere protein A (CENP-A) というヒストンH3バリエーションがセントロメア特異的なヌクレオソームに含まれ、機能的セントロメアを決定する分子であると考えられている[13] (図2B)。CENP-Aのほかに、CENP-B、CENP-C、hMis12などは細胞周期を通じてセントロメアに局在する構成的セントロメアタンパク質である。CENP-BはDNA結合タンパク質であり、セントロメアを形成する α satelliteとよばれる反復配列に存在する17 bpのCENP-B boxに結合し、セントロメアのヘテロクロマチン構造の維持に関わる[14]。G2期からM期にかけて一過性にセントロメアに局在するタンパク質として、モータータンパク質であるCENP-Eや紡錘体チェックポイント(spindle assembly checkpoint; SAC)タンパク質のMad2、Bub1、BubR1などが挙げられる。細胞分裂時に、紡錘体とキネトコアの結合に不具合が生じると、SACが働き、一時的に細胞周期の進行が停止する[15]。したがって、国内外の多くのグループが、染色体の不安定性・異数体形成、そしてがん化との関連という観点から、キネトコアの機能解析を精力的に行っている。

3. 老化とともに発現が低下するキネトコアタンパク質

Lyらは、若年、中年、老年そしてHutchinson-Gilford

という稀な早老症の皮膚の線維芽細胞を用い、約6000の遺伝子の発現レベルを高密度オリゴヌクレオチドアレイで解析した[16]。若年と中年の比較で、発現レベルに2倍以上の違いを認めた61遺伝子のうち、細胞周期の進行に関わる遺伝子が15個同定された。そのなかには、CENP-A、CENP-F、kinesin-related proteins、mitotic centromere-associated kinesin (MCAK) など染色体分配に関わるものが含まれる。これらの遺伝子発現の低下は、若年と老年、さらに若年と早老症の比較においても共通して認められ、老化とともに、キネトコアの機能不全が生じうることを示唆している。

4. BubR1やRae1/Bub3の低発現マウスは早期に老化する

がん化とSACの関連を解析するために、Mad2、Bub3、BubR1、Bub1などのノックアウトマウスが作成された。Mad2^{-/-}、Bub3^{-/-}、BubR1^{-/-}、Bub1^{-/-}はいずれも胎生致死であるため、heterozygous miceやhypomorphic miceが解析に用いられている。それらのSACタンパク質のなかで、BubR1をコードするBub1bの低発現マウス(Bub1b^{HM})が早期老化の表現型を示すことが報告された[17]。続いてRae1/Bub3 double heterozygous miceも早期に老化することが報告された[18]。これらの研究は、一部のSACタンパク質の低下が、個体老化に関与することを示唆する。Bub1b^{HM}から得たmouse embryonic fibroblasts (MEF)では、野生型から得られたMEFに比べ、p53、p21、p19^{Arf}、p16が高発現している。さらにp16^{-/-}とBub1b^{HM}、あるいはp19^{Arf}とBub1b^{HM}を掛け合わせたマウスの解析から、p16の不活性化がBub1b^{HM}で観察される早期老化の表現型を軽減させることが示された[19]。ヒトの場合、BubR1をコードするBUB1Bの変異は、

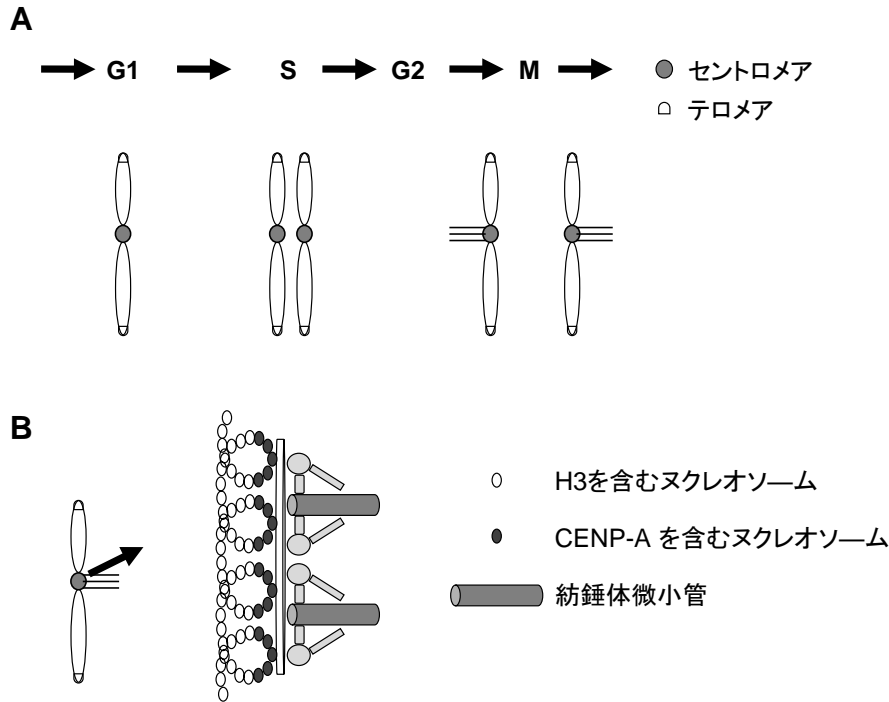


図2 染色体分配を制御するキネトコア

A. 細胞周期（上）と染色体サイクル（下） G2後期からM期にセントロメアDNAに多くのタンパク質がリクルートされ、DNA-タンパク質複合体（キネトコア）が形成される。中心体から伸びてきた紡錘体がキネトコアに付着し、姉妹染色分体が娘細胞に均等分配される。B. キネトコアの拡大図 CENP-Aが機能的セントロメアを決めている。

mosaic variegated aneuploidy (MVA) という疾患を引き起こす[20]。MVAでは、aneuploidy、白内障、発育不全などの症状を認め、SACとがん化の関連を直接示した唯一のヒト疾患であるが、白内障を除く他の老化の表現型は観察されない。*Mad2*、*Bub1*のheterozygous miceやhypomorphic miceは、野生型に比べ、自然発生・発癌物質による腫瘍を生じやすくなるが、明らかな表現型を示さない[21, 22]。Mad2をノックダウンしたヒト正常細胞では、老化の表現型は観察されない（著者ら未発表データ）。その一方で、ヒトの正常細胞で*Bub1*を低下させると速やかに増殖が止まり、老化する[23]。SACは、有糸分裂時にすべての染色体のキネトコアと紡錘体の結合を監視する役割を担い、SACの機能不全は異数体の形成やがん化につながると考えられている。一部のSACタンパク質の低下が個体老化や細胞老化に関与することは興味深い。しかし、先に述べたSACタンパク質の低下による表現型の違いが何に起因するのか、その詳細は明らかでない。

5. 構成的セントロメアタンパク質と細胞老化

著者らは、細胞周期を通じてセントロメアに局在する構成的セントロメアタンパク質に老化に特異的な変化が生じるのではないかと考え、ヒトの複製老化細胞と活性化がん遺伝子*ras*を導入しSISをおこした細胞を主たる材料として解析を行っている。その研究過程で、ヒトの複製老化とSISのセントロメア領域に共通して、1)キネトコア構造の「足場」となるCENP-Aタンパク質の量が顕著に減少する、2)セントロメア領域でのヘテロクロマチン化に重要な役割を果たすCENP-Bが増加する、とい

う変化を見出した[24]（図3）。血清飢餓と接触阻害によって得た静止細胞と老化細胞を比較すると、CENP-A mRNAのレベルはともに低下しているが、CENP-Aタンパク質の量的低下は、老化細胞にのみ認められる。CENP-Aタンパク質は非常に安定であるため、老化した細胞では、転写調節以外にタンパク質の分解などの機構が、その量的低下に関与していることが推測される。

また、CENP-Aタンパク質の量を人為的に減少させると、ヒト正常細胞は老化する（図4）。ところが、CENP-AをノックダウンしたHeLa細胞は、染色体の分配異常を生じながら増殖し続ける。ヒト正常細胞であらかじめp53を不活性化すると、CENP-Aの減少で誘導される細胞老化は観察されず、細胞は増殖する。その結果、分裂前中期の延長や染色体分配異常を示す細胞が増加する。この分裂期の染色体分配の異常は、p16-Rb経路とp53経路が機能していないHeLa細胞でのCENP-Aノックダウンの表現型と似ている。これは、p16-Rb経路とp53経路が機能している正常細胞において、CENP-Aの減少がp53に依存して細胞老化を誘導しうることを意味する。

まとめると、著者らが得た結果は2つのことを意味する。ひとつは、老化した細胞では、構成的セントロメアタンパク質のセントロメア上での構成比率が変化し、セントロメアのヘテロクロマチン化が促進すること（セントロメアの不活性化）、もうひとつは、機能的セントロメアを決定しているCENP-Aの低下というキネトコアの構造・機能に重篤な障害を与えうるストレスは、一部のSACタンパク質の低下と同様に、正常細胞をSISに導くことである。

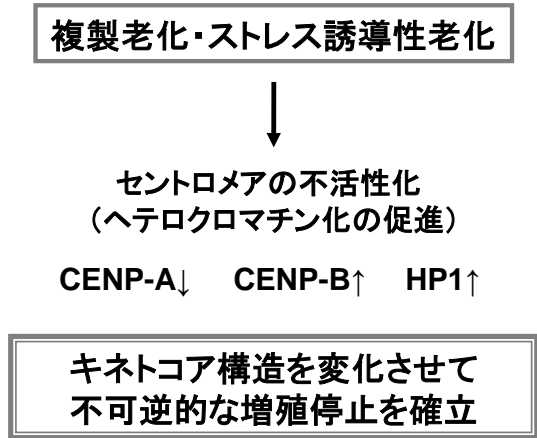


図3 ヒト老化細胞で観察されるセントロメア構造の変化

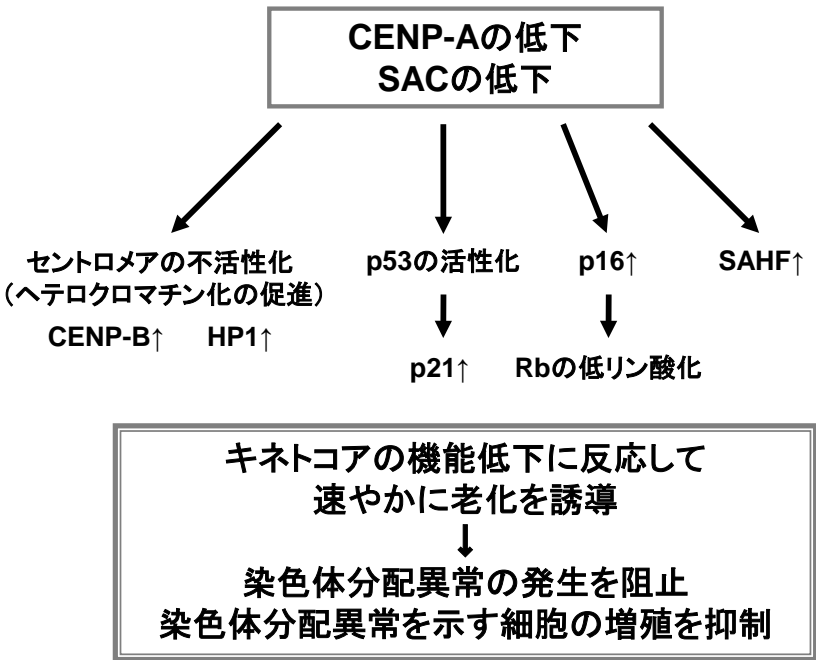


図4 キネトコアの機能の低下は、細胞老化を誘導する

6. セントロメアの不活性化の機構

ヒトの場合、本来セントロメアとして機能していた領域とは異なる場所に、機能的セントロメアが形成されることが稀に起こる。新しく形成された機能的セントロメアは、ネオセントロメア (neocentromere) とよばれ、これまでに19本の染色体上に70個のネオセントロメアが報告されている。ネオセントロメアが形成される時には、もともと機能的セントロメアとして染色体分配の制御に関わった領域は不活性化される。1本の染色体につき1つの機能的セントロメアを維持することで、1本の染色体が2本に引き裂かれることがないように、セントロメアの不活性化が起きると考えられている。線虫は、1本の染色体上に複数の機能的セントロメアを持ち、ヒトとは異なる。

舂本らは、ヒト人工染色体 (human artificial chromosome : HAC) を作成し、新規にセントロメアが形成される機構を精力的に研究している。HACが細胞核内

に取り込まれ、ホストゲノムとは独立して維持される場合、CENP-BとCENP-B boxとよばれるCENP-Bの結合配列が必要であり、その両者がHAC上にCENP-Aをリクルートし、HACはセントロメアの機能を獲得する[25]。また、HACがホストゲノムに挿入された場合、CENP-BがHAC周辺のヒストンH3K9のトリメチル化とDNAのメチル化を増強し、ヘテロクロマチン化を促進するため、新規にセントロメア機能を獲得することなく不活性化される。これらの結果は、CENP-Bには、新規にセントロメアの機能を獲得する作用と、セントロメアを不活性化するという作用があり、環境に応じてその作用が使い分けられていることを示唆する。さらに、HAC周辺のエピゲノム環境を人為的に操作することで、新規のセントロメア機能を獲得したHACを不活性化することができる[26, 27]。例えば、セントロメアはCENP-Aを含むヌクレオソームの間にジメチルヒストンH3K4 (H3K4me2) を含むヌクレオソームが散在しているが、

セントロメアからH3K4me2を消失させると、*a* satellite DNAからの転写が著しく低下し、CENP-AのシャペロンであるHJURP[28, 29]がセントロメアに効率よくリクルートされず、その結果CENP-Aのセントロメアへの取り込みが低下し、徐々にセントロメアが不活性化する [27]。これは染色体がおかれたエピゲノム環境によって、機能的セントロメアが不活性化されうること示している。老化した細胞では、構成的セントロメアタンパク質であるCENP-Aの低下とCENP-Bの増加を認め、CENP-Bの増加とともにHP1タンパク質のセントロメアへの局在が促進される[24] (図3)。細胞の老化においても、CENP-Bや、セントロメア周辺のエピゲノム環境(ヒストン修飾の状態やDNAのメチル化)が、CENP-Aのセントロメアへの取り込み低下やヘテロクロマチン化の促進、そしてセントロメアの不活性化に関与している可能性がある。次世代にゲノム情報を継承する必要がなくなった細胞にとって、染色体分配の足場となるセントロメアの不活性化は、SAHFの形成と同様に、非可逆的増殖停止を確立・維持するための老化に特異的な構造の変化であるかもしれない。

7. SISを誘導するキネトコア機能不全

分裂寿命を持つ正常細胞では、幾つかのSACタンパク質の低下や構成的セントロメアタンパク質CENP-Aの低下は、老化を誘導する(図4)。これは、染色体分配異常の発生を未然に阻止する、あるいは染色体分配の異常を生じた場合でも、異常な細胞の増殖を阻止する、正常細胞に備わった機構であると推察される。キネトコアとともに染色体の分配装置として重要な役割を果たす中心体に局在するタンパク質transforming acidic coiled coil 3 (TACC3)の低下も速やかに老化様の表現型を示すことが報告された[30]。活性化がん遺伝子による異常な増殖刺激によるSISでは、p53の活性化にDNA damage response (DDR) が関与する事が複数のグループから報告されている[31-33]。しかし、CENP-Aをノックダウンした時には、DDRの関与を積極的に肯定する結果は得られていない[24]。活性化がん遺伝子による過剰な増殖刺激(DNA複製ストレス)と染色体分配を制御するキネトコアや中心体へのストレスでは、ともに老化という表現型に至るが、インプット(ストレス)とアウトプット(老化)の間には、異なる因子や経路が介在しているのかもしれない。キネトコアの機能不全が、どのように監視され、老化の主要な誘導経路であるp16-Rbやp53を活性化するのか、今後の研究に期待したい。

8. おわりに

以上、染色体の機能ドメインであるキネトコアと細胞老化・個体老化の関連について概説した。染色体の不安定性に直結するキネトコアへの致命的なストレス(紡錘体付着部の足場を形成する構成的タンパク質の消失や、SACタンパク質の機能不全など)が加わると、正常な細胞では安全装置として速やかに増殖を停止し、老化すると推察される。キネトコアの機能不全が老化を誘導する

詳細な分子メカニズムは、今後の研究によって明らかにされていくと考えられる。また、HACやネオセントロメアの研究からセントロメアの活性化と不活性化に関わる様々な因子が、少しずつ明らかにされてきている。老化で観察されるセントロメアの不活性化にも、これまでに同定された因子が関与しているのか、興味深い課題である。

引用文献

1. Hayflick L, and 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 p16^{INK4a}. *Cell* 88:593-602, 1997.
3. Hara E, Smith R, Parry D, et al. Regulation of p16^{CDKN2} expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol* 16:859-867, 1996.
4. Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, et al. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13742-12747, 1996.
5. Ben-Porath I, and Weinberg RA. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* 37:961-976, 2005.
6. Collado M, Blasco MA, and Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* 130:223-233, 2007.
7. Narita M, Nuñez S, Heard E, et al. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113:703-716, 2003.
8. Zhang R, Poustovoitov MV, Ye X, et al. Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev Cell* 8:19-30, 2005.
9. Narita M, Narita M, Krizhanovskiy V, et al. A novel role for High-Mobility Group A proteins in cellular senescence and heterochromatin formation. *Cell* 126:503-514, 2006.
10. Funayama R, Saito M, Tanobe H, et al. Loss of linker histone H1 in cellular senescence. *J Cell Biol* 175:869-880, 2006.
11. Maehara K, Yamakoshi K, Ohtani N, et al. Reduction of total E2F/DP activity induces senescence-like cell cycle arrest in cancer cells lacking functional pRB and p53. *J Cell Biol* 168:553-560, 2005.
12. Deng Y, Chan SS, and Chang S. Telomere dys-

- function and tumour suppression: the senescence connection. *Nat Rev Cancer* 8:450-458, 2008.
13. Cleveland DW, Mao Y, and Sullivan KF. Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell* 112:407-421, 2003.
 14. Masumoto H, Masukata H, Muro Y, et al. A human centromere antigen (CENP-B) interacts with a short specific sequence in alphoid DNA, a human centromeric satellite. *J Cell Biol* 109:1963-1973, 1989.
 15. Musacchio A, and Salmon ED. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:379-393, 2007.
 16. Ly, DH, Lockhart DJ, Lerner RA, et al. Mitotic misregulation and human aging. *Science* 287:2486-2492, 2000.
 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, Jeganathan KB, Malureanu L, et al. Early aging-associated phenotypes in Bub3/Rae1 haploinsufficient mice. *J Cell Biol* 172:529-540, 2006.
 19. Baker DJ, Perez-Terzic C, Jin F, et al. Opposing roles for p16Ink4a and p19Arf in senescence and ageing caused by BubR1 insufficiency. *Nat Cell Biol* 10:825-836, 2008.
 20. Hanks S, Coleman K, Reid S, et al. Constitutional aneuploidy and cancer predisposition caused by biallelic mutations in *BUB1B*. *Nat Genet* 36:1159-1161, 2004.
 21. Michel LS, Liberal V, Chatterjee A, et al. *MAD2* haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. *Nature* 409:355-359, 2001.
 22. Jeganathan K, Malureanu L, Baker DJ, et al. Bub1 mediates cell death in response to chromosome missegregation and acts to suppress spontaneous tumorigenesis. *J Cell Biol* 179:255-267, 2007.
 23. Gjoerup OV, Wu J, Chandler-Militello D, et al. Surveillance mechanism linking Bub1 loss to the p53 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:8334-8339, 2007.
 24. Maehara K, Takahashi K, and Saitoh S. CENP-A reduction induces a p53-dependent cellular senescence response to protect cells from executing defective mitoses. *Mol Cell Biol* 30:2090-2104, 2010.
 25. Okada T, Ohzeki J, Nakano M, et al. CENP-B controls centromere formation depending on the chromatin context. *Cell* 131:1287-1300, 2007.
 26. Nakano M, Cardinale S, Noskov VN, et al. Inactivation of a human kinetochore by specific targeting of chromatin modifiers. *Dev Cell* 14:507-522, 2008.
 27. Bergmann JH, Rodríguez MG, MC Martins N, et al. Epigenetic engineering shows H3K4me2 is required for HJURP targeting and CENP-A assembly on a synthetic human kinetochore. *EMBO J advance online publication* doi:10.1038/emboj.2010.329
 28. Foltz DR, Jansen LE, Bailey AO, et al. Centromere-specific assembly of CENP-A nucleosomes is mediated by HJURP. *Cell* 137:472-484, 2009.
 29. Dunleavy EM, Roche D, Tagami H, et al. HJURP is a cell-cycle-dependent maintenance and deposition factor of CENP-A at centromeres. *Cell* 137:485-497, 2009.
 30. Schmidt S, Schneider L, Essmann F, et al. The centrosomal protein TACC3 controls paclitaxel sensitivity by modulating a premature senescence program. *Oncogene* 29:6184-6192, 2010.
 31. Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 444:633-637, 2006.
 32. Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, et al. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 444:638-642, 2006.
 33. Mallette FA, Gaumont-Leclerc MF, and Ferbeyre G. The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes Dev* 21:43-48, 2007.

Cellular senescence as a self-defense mechanism against centromere dysfunction

Kayoko Maehara

National Research Institute for Child Health and Development

Cellular senescence is an irreversible growth arrest and is presumed to be a natural barrier to tumor development. Like telomere shortening, certain defects in chromosome integrity can trigger senescence. Kinetochores are multi-protein complexes formed on a specialized region of each chromosome, designated the centromere. Kinetochores function is essential for the faithful segregation of chromosomes during mitosis and meiosis. Recent studies have demonstrated that primary cells appear to induce cellular senescence in response to fatal kinetochore dysfunction in circumstances under which some of key centromere proteins and/or the spindle assembly checkpoint (SAC) proteins are not functioning properly. These observations suggest that, like telomeres, kinetochores may also play a crucial role in regulating commitment to the senescent state.

Keywords: CENP-A, kinetochore, p53, SAC, senescence

【トピックス】

生体二光子顕微鏡による脳内微小循環径路の三次元追跡

正本 和人^{1,2} 川口 拓之² 菅野 巖²

¹電気通信大学先端領域教育研究センター

²放射線医学総合研究所分子イメージング研究センター

1. はじめに

本稿では、マウス大脳皮質における実質微小血管ネットワーク構造の可視化手法について概説し、さらに得られた構造画像の3次元解析法について紹介する。二光子顕微鏡によって取得した立体構造画像を基に脳実質内の微小血管が動脈から静脈までどのような径路で連結しているのか、その径路長と空間分布について定量化したので紹介したい。

2. 実験方法

1) 実験動物の準備

実験にはオスのC57BL/6マウス(8週齢)を用いた。イソフルレン麻酔下で頭皮を切除し、体性感覚野を覆う左頭骨(径3.5 mm)を除去し、カバーガラスによってclosed cranial windowを作製した[1]。さらに開頭部位の周辺頭骨に顕微鏡ステージに固定するための自家製のアルミ製治具を装着した[2]。手術後、麻酔から覚醒したマウスを水と餌を自由に摂取可能な通常の飼育ケージで約一週間経過観察した後、二光子顕微鏡による観察実験を行った。

2) 脳微小血管構造の可視化

マウスはイソフルレン麻酔下で顕微鏡ステージに固定した。体温を維持し、血圧と心拍を非観血式自動血圧測定装置(BP-98A, ソフトロン)によってモニターした。顕微鏡観察の直前にsulforhodamine 101 (8 mM in saline, MP Biomedicals)を投与(8 ml/kg, i.p.)し、血しょう成分を蛍光標識した。大脳皮質における血管構造の可視化には二光子顕微鏡(TCS-SP5MP, Leica Microsystems)を用いた[3]。励起波長は900 nmで610/75 nmのバンドパスフィルタによって蛍光を検出した。XY平面における画像サイズ1024 x 1024 ピクセル、ピクセルサイズ0.45 μm/pixelの条件で、大脳皮質の深さ方向(z方向)に5 μm間隔で深さ800 μmから表層まで撮像した。得られた画像は画像解析ソフト(Volocality, Improvion, PerkinElmer)によって3次元再構成し、血管径、血管長、及び分岐の位置と数を計測した。

3) 血液循環径路の探索

脳表において広視野で撮像した血

管画像と比較し、各分岐血管と親血管との連結を基に動脈及び静脈の識別を行った。動脈血管は主に中大脳動脈(Middle cerebral artery)に連結し、静脈血管は上矢状静脈洞(Superior sagittal sinus)に至る。次に、それぞれ深さ方向に連続する画像から実質に連絡する細動脈(終末細動脈)及び細静脈を同定し、一つの体積画像において脳表と連絡する細動脈・細静脈それぞれn個に識別番号を与えた(細動脈:A1, A2...An, 細静脈:V1, V2...Vn)。脳表動脈から分岐し実質に垂直に連絡する終末細動脈において、そこから実質内で分岐する血管の径と分岐点の脳表からの深さを計測した。さらに各分岐点から静脈方向へ血管を追跡し、脳表に連絡する細静脈に至るまでの径路を探索した。分岐点において複数の径路が存在する場合は最も短い距離の径路を選択した。同様の作業を終末細動脈から実質内で分岐した各微小血管に対して行い、径路が同定可能であった分岐血管に対して径路長と分岐数を求めた。径路探索中に画像範囲から飛び出した血管は、解析対象から除外した。

3. 結果及び考察

1) 微小血管ネットワーク構造の可視化

図1にマウス大脳皮質において取得した微小血管の二光子顕微鏡画像の一例を示す。表層から深さ800 μmまで任意の深さで取得したXY平面画像を示す。表層から概ね深さ600 μmまでは画像のコントラストも良く、毛細血管の連結など鮮明な血管の形態画像が得られた。本結果から血管の検出が可能な最大深度は約800 μmであり、600 μmより深部においては血管径の定量的な計測が困難であることがわかる。図1において画像の中央付近に2本の細動脈と1本の細静脈が深さ方向に垂直に走行している。皮質表面から垂直に連絡する細動脈にはほ

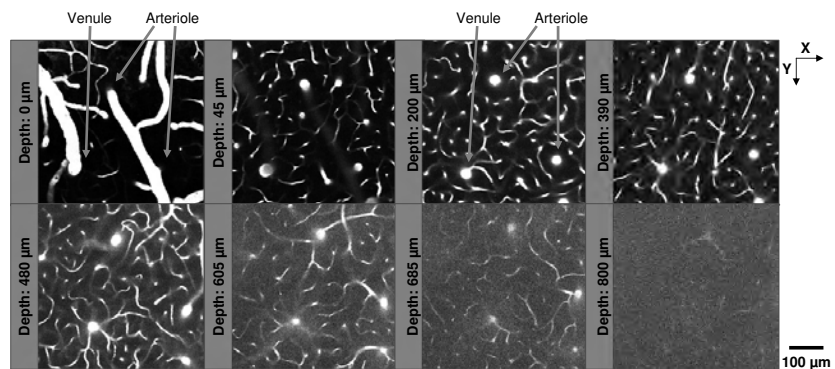


図1 二光子顕微鏡による微小血管形態画像の取得例(マウス大脳皮質深さ0~800μm)

とんど分岐がみられず、血管周囲は毛細血管の少ない領域があった。一方、皮質に垂直に連絡する細静脈には多くの毛細血管が連絡するという特徴的な形態が確認された。さらに取得した二光子顕微鏡画像のXY平面 (図2A) 及びXZ平面 (図2B) への投影画像の一例を示す。深さ方向 (Z方向) の血管分布や微小血管間の連結部位などが高解像度で捉えられている様子がわかる。

2) 実質内血液循環経路の定量化

終末細動脈から細静脈に至る実質内の血液循環経路の探索を行った結果を図3に示す。図3 (左) に対象血管の

脳表における分布パターン例を示す。0.5 mm角の画像中に実質内に垂直に連絡する3本の細動脈 (A1~A3: 内径12~26 μm) 及び9本の細静脈 (V1~V9: 内径5.7~36 μm) が観察された。図中には脳表から実質内に潜る部位における血管断面の内径と対応する血管番号を示した。さらに3本の細動脈の実質内で観察された分岐パターンを図3 (右) に示す。脳表での血管内径が比較的大きい細動脈A1及び A2では表層付近での分岐は観察されず、それぞれ深さ382 μm 及び 493 μm で最初に分岐が確認された。一方、脳表での血管径が12 μm と比較的小さい細動脈A3では、表層下40 μm から500 μm まで計

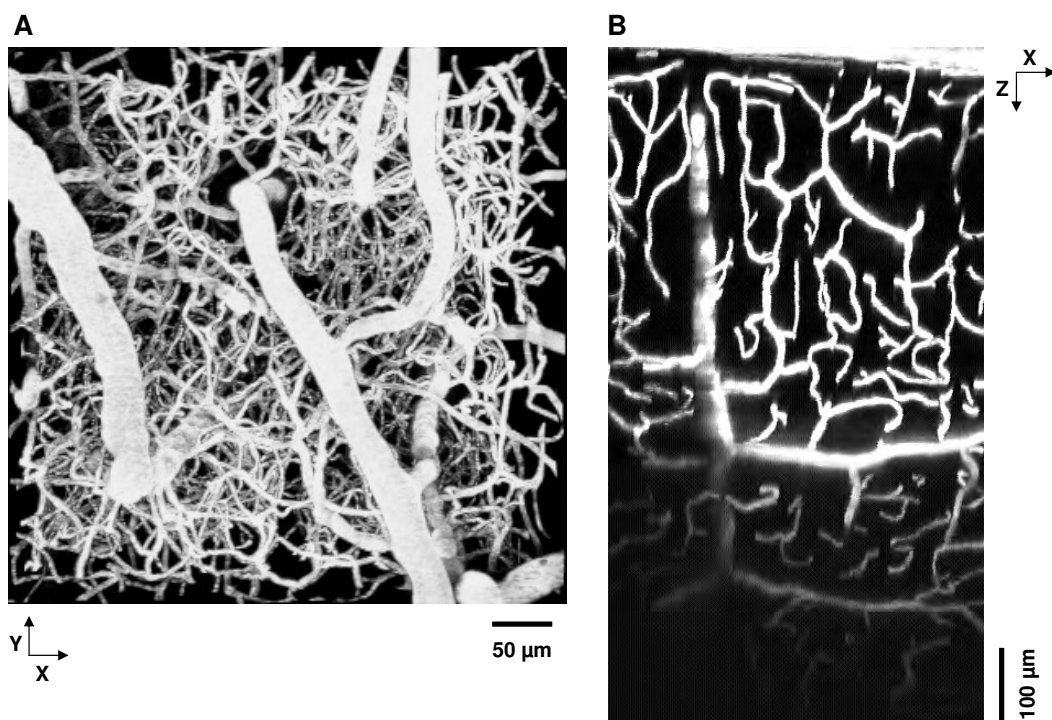


図2 大脳皮質微小血管ネットワークのXY平面 (A) 及びXZ平面 (B) への投影画像例 (A, Bは別個体画像。XZ投影画像はステップサイズ1 μm によって取得)

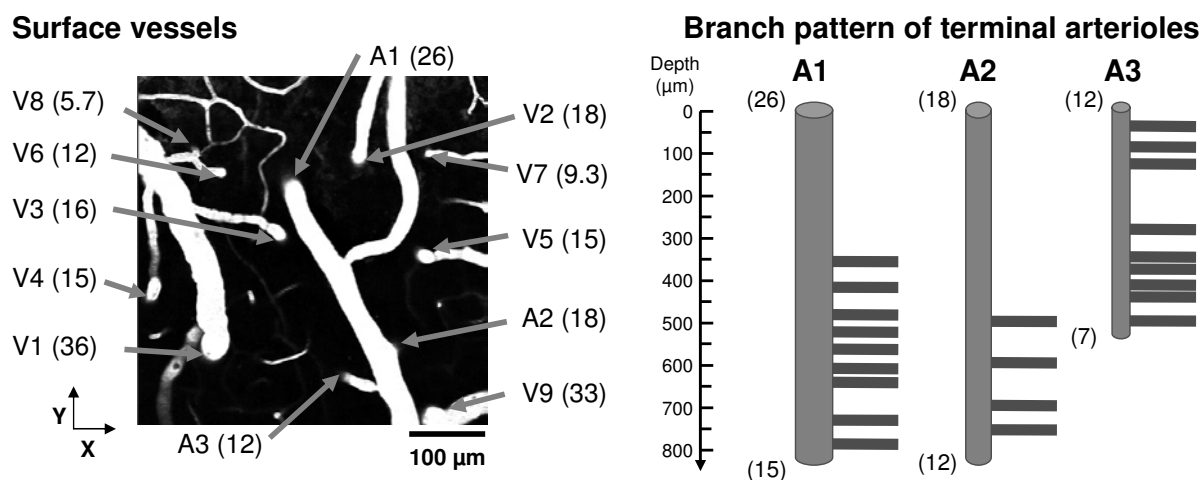


図3 大脳皮質における血管分布パターン

左図：脳表から実質に連絡する細動脈 (A) 及び細静脈 (V) の分布と実質内への連絡部位での血管径 (括弧内)

右図：終末細動脈の実質内での分岐点と分岐数を表す。括弧内の数値は実質起始部と最深部における終末細動脈の血管径を示す

9つの分岐が確認された。

これらの終末細動脈 (A1~A3) の分岐点から脳表に連絡する細静脈までの経路を追跡した結果を図4に示す。横軸に終末細動脈における実質内での分岐点の深さを示し、縦軸に脳表細動脈から脳表細静脈に至る経路長 (図4A)、及び終末細動脈(A1~A3)の分岐点から脳表に戻る細静脈 (V1~V9) への合流地点までの経路長 (図4B) を示した。脳表細動脈から脳表細静脈に至る経路のうち最も短い経路長は405 μm であった。また経路長は終末細動脈の皮質入り口での内径に依存し、A1, A2, A3それぞれ平均で1295, 1523, 522 μm の経路長で脳表静脈に連絡していることがわかった。また、終末細動脈からの分岐点の深さに依存して血液の循環経路が線形的に長くなる傾向が得られた (図4A)。このとき、最小二乗法によって求めた近似直線の切片は440 μm であった。この切片の値は終末細動脈と細静脈とを連絡する毛細血管領域の平均経路長を示すと考えられる。実際に、実質毛細血管領域における平均の経路長は 390 ± 120 μm であり (図4B)、近似直線の切片とよく一致した。またこのときの平均分岐数は 6.8 ± 1.9 回であったことから、実質毛細血管一本の平均長さは約60 μm であると求められた。

4. おわりに

本研究では、マウス大脳皮質における微小血管形態の3次元イメージング及び実質内微小循環経路の定量的評価法について紹介した。二光子顕微鏡イメージングによって取得した微小血管ネットワークの立体構造を基に、脳実質内の終末細動脈から細静脈に至る毛細血管領域の経路長と分岐数を示した。一般的に微小血管の数密度は単位組織体積あたりに血液が組織と接する表面積を表す。一方、本研究で示した経路長は単位血流量あたりに血液が組織と接する時間を反映する。このように血管密度と経路長はいずれも血液と組織との間の物質交換あるいは

物質輸送を決定する重要なパラメーターである。しかし、これまでに脳実質の微小循環領域における経路長を生体内で定量的に評価した報告はなかった。

一方で、加齢に伴い脳血流や脳血管反応性が低下することはPETやMRIを用いた各種イメージング法によって示されている[4-7]。脳血流の低下は脳実質組織に必要な栄養・成長因子やホルモンの輸送を低下させると考えられる。ラットを用いた動物実験では、加齢に伴い脳表動脈の吻合及び脳実質に潜り込む終末細動脈の数が減少し、このことが脳血流低下の主要な要因であることが示唆されている[8]。しかし、加齢に伴う脳実質の毛細血管密度の変化に関しては一定の見解が得られていない[9]。また、脳虚血やアルツハイマー病のモデル動物を使った実験では、脳実質内の毛細血管密度の低下がその後の神経変性と密接に関係することや血管形成の促進による微小循環動態の改善が神経機能の維持回復に有効である可能性などが議論されている[10-13]。本研究で示した脳実質の微小血管ネットワークに関する定量的評価法は、脳微小循環と老化あるいは各種脳神経疾患との因果関係の解明、及びこれら疾患における治療法の確立において極めて有効であると考えられる。今後、PETやMRIなどのマクロで測定された脳血流量と、本研究で示したミクロな微小循環経路や血管密度との対応関係を明らかにし、老化や各種脳神経疾患における脳微小循環動態及び実質組織への物質輸送の3次元空間での全貌を明らかにしていきたい。

謝辞

本研究の遂行においてお世話になりました電気通信大学情報理工学部 山田幸生教授に感謝いたします。また頭部開窓法の作製において、ご指導を頂きました慶應義塾大学医学部 鈴木則宏教授、富田 裕 講師に感謝いたします。本研究の一部は、科学技術振興調整費の支援によって行われました。

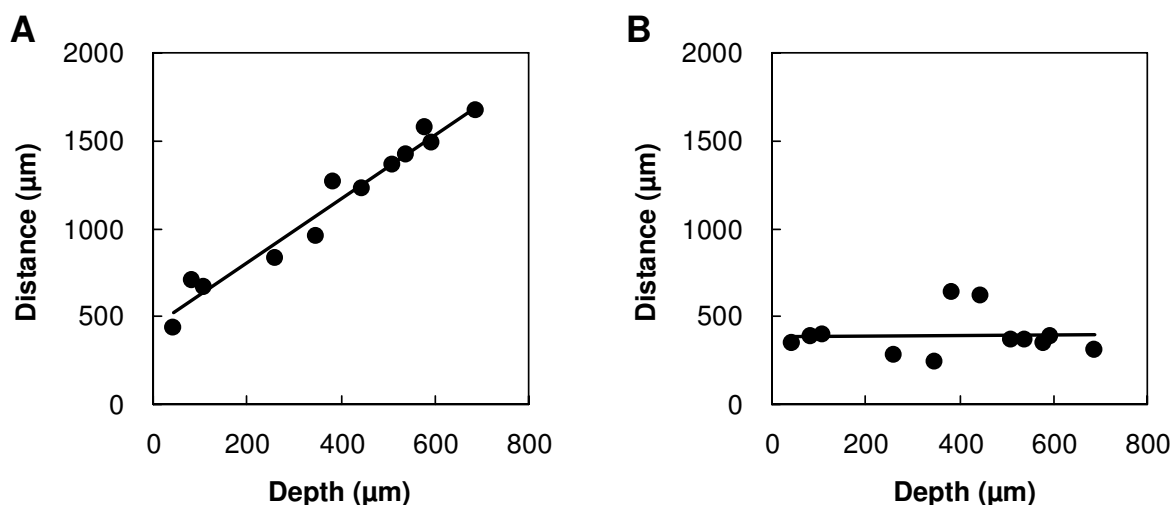


図4 終末細動脈の分岐深さ (X軸) と動静脈間の経路長との関係 (A)。実質内における終末細動脈分岐点から脳表に連絡する細静脈との合流地点までの経路長 (B)。

引用文献

1. Tomita Y, Kubis N, Calando Y, Tran Dinh A, Méric P, Seylaz J and Pinard E. Long-term in vivo investigation of mouse cerebral microcirculation by fluorescence confocal microscopy in the area of focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:858-867, 2005.
2. Takuwa H, Autio J, Nakayama H, Matsuura T, Obata T, Okada E, Masamoto K and Kanno I. Reproducibility and variance of a stimulation-induced hemodynamic response in barrel cortex of awake behaving mice. *Brain Res* 1369:103-111, 2011.
3. Masamoto K, Obata T and Kanno I. Intracortical microcirculatory change induced by anesthesia in rat somatosensory cortex. *Adv Exp Med Biol* 662:57-62, 2010.
4. Melamed E, Lavy S, Bentin S, Cooper G and Rinot Y. Reduction in regional cerebral blood flow during normal aging in man. *Stroke* 11:31-35, 1980.
5. Martin AJ, Friston KJ, Colebatch JG and Frackowiak RS. Decreases in regional cerebral blood flow with normal aging. *J Cereb Blood Flow Metab* 11:684-689, 1991.
6. Ito H, Kanno I, Ibaraki M and Hatazawa J. Effect of aging on cerebral vascular response to Paco₂ changes in humans as measured by positron emission tomography. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:997-1003, 2002.
7. Ances BM, Liang CL, Leontiev O, Perthen JE, Fleisher AS, Lansing AE and Buxton RB. Effects of aging on cerebral blood flow, oxygen metabolism, and blood oxygenation level dependent responses to visual stimulation. *Hum Brain Mapp* 30:1120-1132, 2009.
8. Sonntag WE, Lynch CD, Cooney PT and Hutchins PM. Decreases in cerebral microvasculature with age are associated with the decline in growth hormone and insulin-like growth factor 1. *Endocrinology* 138:3515-3520, 1997.
9. Riddle DR, Sonntag WE and Lichtenwalner RJ. Microvascular plasticity in aging. *Ageing Res Rev* 2:149-168, 2003.
10. Whitaker VR, Cui L, Miller S, Yu SP and Wei L. Whisker stimulation enhances angiogenesis in the barrel cortex following focal ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:57-68, 2007.
11. Meyer EP, Ulmann-Schuler A, Staufenbiel M and Krucker T. Altered morphology and 3D architecture of brain vasculature in a mouse model for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:3587-3592, 2008.
12. Iadecola C, Park L and Capone C. Threats to the mind: aging, amyloid, and hypertension. *Stroke* 40:S40-44, 2009.
13. Navaratna D, Guo S, Arai K and Lo EH. Mechanisms and targets for angiogenic therapy after stroke. *Cell Adh Migr* 3:216-223, 2009.

【トピックス】

Sirt1によるAPエンドヌクレアーゼ1脱アセチル化はDNA塩基除去修復活性を調節する

山盛 徹¹、Kaikobad Irani²

¹北海道大学大学院獣医学研究科放射線学教室

²Cardiovascular Institute, University of Pittsburgh Medical Center

1. はじめに

酵母や線虫において、Sirtuinファミリータンパク質が個体の寿命を調節することが明らかにされて以来、本ファミリータンパク質に対する注目が集まっている。Sirtuinファミリータンパク質は基本的にNAD⁺依存性脱アセチル化酵素であり、タンパク質中のアセチル化リジン残基からアセチル基を外すことがその主たる酵素活性である[1, 2]。哺乳類においては、Sirt1~7と名付けられた7種類のSirtuinタンパク質が存在する。これら哺乳類Sirtuinは局在や基質となるタンパク質が異なることにより、それぞれ異なった生物学的機能を示す。現在のところ、酵母のSirtuinであるSir2にもっとも近縁な哺乳類オルソログであるSirt1について特に活発な研究が行われており、多くの知見が蓄積されてきている。その結果、Sirt1は細胞分化、エネルギー代謝、アポトーシス、ストレス抵抗性などのさまざまな局面で重要な役割を果たしていることが明らかとなり、DNA損傷修復もその一つであることが現在示唆されている[1-4]。

DNAは放射線、紫外線、化学物質、活性酸素等による侵襲に常に曝されている。これらの侵襲により生じたDNA損傷は、DNA修復機構により修復されることで遺伝子突然変異から免れている。突然変異の蓄積は細胞のがん化をもたらすため、DNA修復能の維持は生体にとって非常に重要であるが、加齢によりDNA修復能が低下することが報告されている[5]。また、現在までに知られている遺伝性早老症の原因遺伝子として、DNA損傷修復に関わるWRN、ATM、CSA/B等が同定されており、DNA損傷修復と老化・寿命調節との強い関連性が示唆されている。さまざまな種類のDNA損傷のうち、塩基の酸化やアルキル化により生じる塩基損傷は最も高頻度に生じるDNA損傷であり、塩基除去修復(base excision repair: BER)経路は、これらの塩基損傷を修復するために細胞に備わっているDNA修復機構である。

塩基除去修復と哺乳類Sirtuinとの関連については、その一つであるSirt6が塩基除去修復に関与していることが報告されている[6]ものの、Sirt1についてはこれま

で検討されていなかった。一方、塩基除去修復経路を構成するさまざまなタンパク質がアセチル化修飾を受けることがこれまでに報告されている[7-9]。我々は、その一つであるAPエンドヌクレアーゼ1 (APE1)のアセチル化制御に着目して研究を行い、Sirt1がAPE1の脱アセチル化を介して細胞内塩基除去修復活性を調節するという事を最近報告した[10]。本稿では、その知見について概説する。

2. Sirt1とAPE1は相互作用する

はじめに、Sirt1とAPE1の関係について調べるため、APE1とSirt1の相互作用の有無について検討を行った。HEK293細胞に両タンパク質を発現し、共免疫沈降法にて相互作用を検討したところ、Sirt1とAPE1の共沈が検出された(図1)。このSirt1とAPE1の共沈は内因性のタンパク質の間でも観察されたことから、Sirt1とAPE1は細胞内で相互作用していることが明らかとなった。また、免疫染色によりSirt1およびAPE1の分布を観察したところ、両タンパク質とも主に核に局在していることが見出された。

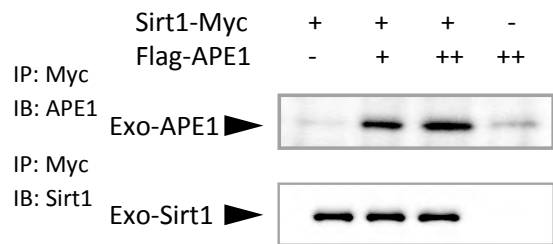


図1. Sirt1とAPE1の相互作用

HEK293細胞にSirt1ならびにAPE1を発現させ、共免疫沈降法により相互作用を検出した。

3. Sirt1はAPE1を脱アセチル化する

APE1がアセチル化酵素であるp300によりアセチル化を受けることが既に報告されていたことから[11]、APE1がSirt1の基質として脱アセチル化をうけるかどうかを次に検討した。in vitroでのSirt1による脱アセチル化の検討のため、組換えAPE1タンパク質をp300によりアセチル化した後Sirt1と反応させ、そのアセチル化レベルをイムノプロットにより評価した(図2)。その結果、p300の処理によりAPE1のアセチル化レベルは上昇し、Sirt1およびその補酵素であるNAD⁺との反応により減少した。さらに、この反応にSirt1阻害剤であるニコチン

連絡先：〒060-0818
北海道札幌市北区北18条西9丁目
北海道大学大学院獣医学研究科放射線学教室
Tel: 011-706-5236
Fax: 011-706-7373
E-mail: yamamorit@vetmed.hokudai.ac.jp

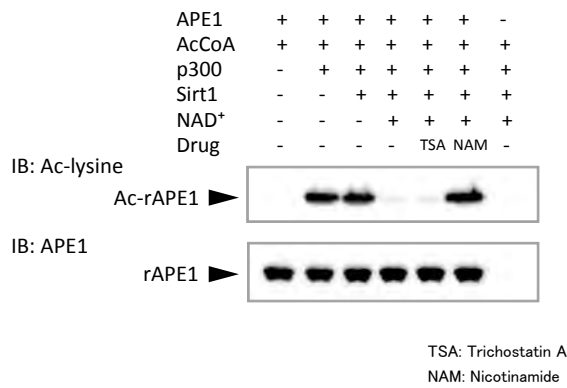


図2. Sirt1によるAPE1の脱アセチル化

p300ならびにSirt1と反応後における組換えAPE1タンパク質のアセチル化レベルをイムノブロットにより評価した。

アミドを加えると、Sirt1によるアセチル化レベルの減少が抑制された。一方、class I・IIのヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤であるトリコスタチンAはこれを抑制しなかった。この結果から、APE1はSirt1によってアセチル化レベルの調節をうけることが明らかとなった。

また、HEK293細胞において、Sirt1阻害剤ならびにSirt1 siRNAの処理により細胞内APE1アセチル化レベルが上昇したことから、Sirt1によるAPE1の脱アセチル化は細胞内でも起こっていることが示唆された。

4. Sirt1はgenotoxic stressによる細胞死から細胞を防護する

次に、genotoxic stress下におけるAPE1アセチル化の変化を調べるため、DNAアルキル化剤であるmethyl methanesulfonate (MMS)の影響を観察した。HeLa細胞を500 μM MMSで処理後、APE1アセチル化レベルの変化を経時的に観察したところ、APE1アセチル化はMMS処理後4時間でピークに達し、その後12時間まで減少した。このgenotoxic stress後のAPE1アセチル化に対するSirt1の寄与を調べるため、Sirt1をsiRNAによりノックダウンした際のAPE1アセチル化をコントロールsiRNAと比較した(図3)。その結果、コントロールと比較しSirt1 siRNAを処理した細胞では、MMSによるAPE1アセチル化が増強されていた。Sirt1阻害剤である

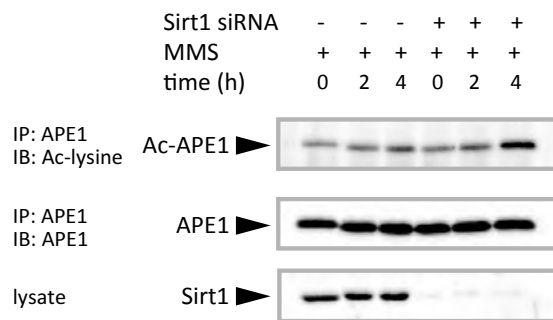


図3. HeLa細胞におけるMMS処理後のAPE1アセチル化の検出

APE1アセチル化におけるSirt1 siRNAの効果を検討した。HeLa細胞にコントロールないしSirt1 siRNAを処理後、500 μM methyl methanesulfonate (MMS)で一定時間刺激し、その際のAPE1アセチル化レベルを検出した。

ニコチンアミド処理もまた同様の効果をもたらすことが観察されたことから、Sirt1がgenotoxic stressによるAPE1アセチル化を抑制的に調節していることが示唆された。

さらに、genotoxic stress後の細胞死に対するAPE1およびSirt1の役割を調べるため、HeLa細胞においてそれぞれのタンパク質をsiRNAによりノックダウンし、MMSにより引き起こされるアポトーシスを評価したところ、APE1およびSirt1のノックダウンは共にMMSによるアポトーシスの亢進を引き起こした(図4A, B)。このことは、APE1のみならずSirt1もまたgenotoxic stressに対する防御機構に参与していることを示唆している。MMSによりアルキル化されたDNAはAPE1を介した塩基除去修復経路により修復される。そこで、塩基除去修復に対するSirt1の寄与を調べるため、APE1またはSirt1をノックダウンしたHeLa細胞の細胞内DNAにおける脱塩基部位(APサイト)形成をコントロールsiRNA処理細胞と比較した(図4C)。すべての条件においてMMSはAPサイト数を増加させたが、APE1および

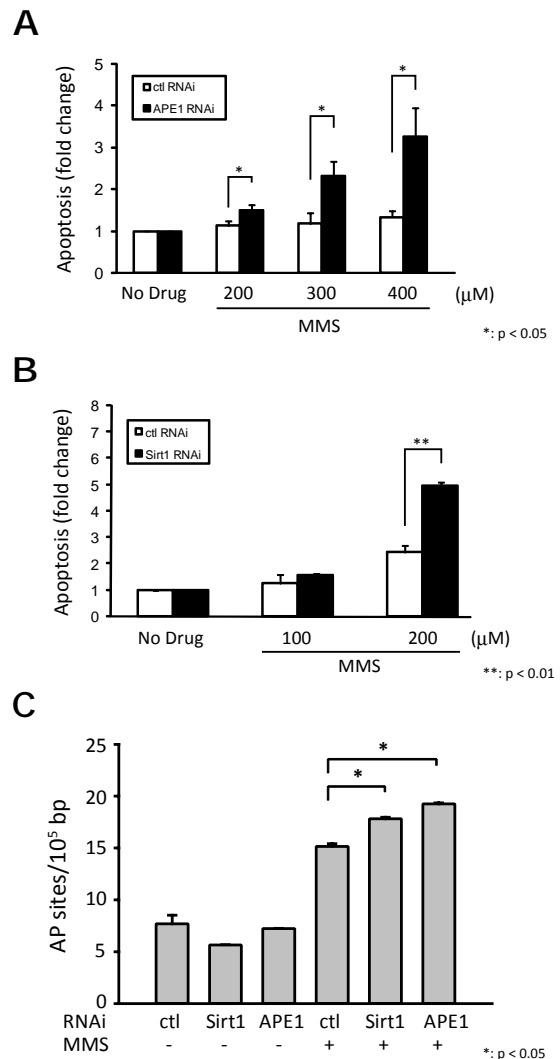


図4. MMS誘発アポトーシス(A, B)ならびに脱塩基部位形成(C)に対するAPE1またはSirt1 siRNAの効果

APE1アセチル化におけるSirt1 siRNAの効果を検討した。HeLa細胞に各種siRNAを処理後MMS刺激を行い、引き起こされるアポトーシスならびに脱塩基部位量を検出した。

Sirt1をノックダウンした細胞ではコントロールと比べて、その数が増大していた。APE1は塩基除去修復に直接関与するタンパク質であるため、当然であると言える一方、この結果はSirt1が塩基除去修復に関与していることを強く示唆するものである。

5. Sirt1はAPE1とXRCC1との相互作用を促進し、APエンドヌクレアーゼ活性を亢進する

次に、Sirt1による塩基除去修復活性の調節とAPE1脱アセチル化がどのように関連しているかを明らかにすることを試みた。X-ray repair cross-complementing 1 (XRCC1)は、APE1を含む様々な塩基除去修復関連タンパク質と相互作用し、それらのタンパク質相互作用の足場となることで塩基除去修復を促進する[12]。XRCC1はAPE1のN末端と相互作用し、塩基除去修復を促進することが報告されていることから[13]、筆者らはAPE1のアセチル化がAPE1とXRCC1との相互作用を調節するのではないかと考え、これについて検証を行った。

HeLa細胞においてXRCC1を免疫沈降した際にAPE1の共沈が認められ、XRCC1とAPE1が相互作用することが示唆された。この相互作用はSirt1阻害剤ニコチンアミドにより減弱し、Sirt1活性化剤レズベラトロールにより逆に増強されたことから、Sirt1活性がXRCC1とAPE1との相互作用を調節していることが示唆された(図5A)。このことは、レズベラトロールによるXRCC1-APE1相互作用の増強が、Sirt1 siRNAの処理により見られなくなったことから支持された。

次に、XRCC1免疫沈降物を用いてAPエンドヌクレアーゼ活性を測定したところ、コントロールと比較しニコチンアミド処理したサンプルではAPエンドヌクレアーゼ活性は減弱し、レズベラトロール処理したサンプルでは活性の上昇が観察された(図5B)。さらに、XRCC1免疫沈降物中のAPエンドヌクレアーゼ活性は

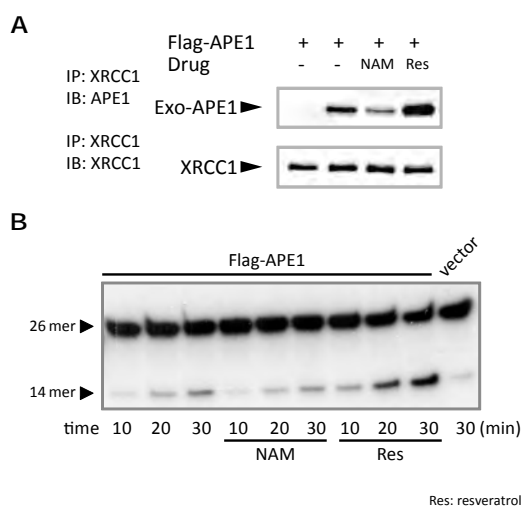


図5. XRCC1免疫複合体を用いた解析

(A) HeLa細胞におけるAPE1-XRCC1相互作用に対するニコチンアミドおよびレズベラトロールの効果

(B) HeLa細胞由来XRCC1免疫複合体におけるAPエンドヌクレアーゼ活性に対するニコチンアミドおよびレズベラトロールの効果

Sirt1 siRNAにより減弱したことから、Sirt1は細胞内においてAPE1とXRCC1との相互作用を調節することにより、細胞内APエンドヌクレアーゼ活性に影響を与えていることが示唆された。

6. おわりに

本研究において、①APE1がSirt1による脱アセチル化の標的であること、②genotoxic stressはAPE1のアセチル化を亢進し、Sirt1はこれを抑制すること、③genotoxic stress後の細胞死および塩基除去修復にSirt1が関与していること、④Sirt1はAPE1とXRCC1の相互作用を調節し、これによって細胞内APエンドヌクレアーゼ活性を調節していること、が示唆された。近年の研究によりSirt1がゲノム安定性の維持に関与していることを示すさまざまな知見が得られており[14, 15]、本研究で得られた結果もまたそれに一致するものであるといえる。本研究において、Sirt1とAPE1との相互作用やSirt1によるAPE1の脱アセチル化は細胞がストレス下でない状態でも観察され、さらにgenotoxic stress下ではSirt1の阻害によりアセチル化レベルがさらに増大したことから、Sirt1はAPE1に恒常的に結合し、APE1を脱アセチル化することでDNA修復活性の維持に寄与していることが考えられる。今回我々はSirt1によるAPE1の脱アセチル化に注目して研究を行ったが、塩基除去修復を構成する他のタンパク質の働きにSirt1が関与しているかどうかについては今後の検討課題である。

はじめに述べたように、Sirt1により制御される生理機能は非常に多岐にわたることが明らかになりつつあり、DNA修復能もその一つであることがわかってきた。DNA修復能と老化・寿命調節との関連性は以前より指摘されていたが、近年Sirtuinタンパク質がこの過程に関与することが明らかになってきたことにより、この関連性への理解がさらに進むものと思われる。今後、Sirtuinタンパク質の下流で個々の過程がどのように調節されているのか、あるいはSirtuin機能が時間・空間的にどのように調節されるのか、それがDNA修復能をはじめとした個々の生理機能にどのように影響するのか、といった点が明らかになることで、Sirtuinの老化・寿命に与える影響についての理解が深まるものと思われる。

参考文献

- [1] Haigis MC and Sinclair DA. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu Rev Pathol* 5:253-295; 2010.
- [2] Michan S and Sinclair DA. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J* 404:1-13; 2007.
- [3] Yuan Z, Zhang X, Sengupta N, et al. SIRT1 regulates the function of the Nijmegen breakage syndrome protein. *Mol Cell* 27:149-162; 2007.
- [4] Fan W and Luo J. SIRT1 regulates UV-induced DNA repair through deacetylating XPA.

- Mol Cell 39:247-258; 2010.
- [5] Vijg J. The role of DNA damage and repair in aging: new approaches to an old problem. *Mech Ageing Dev* 129:498-502; 2008.
 - [6] Mostoslavsky R, Chua KF, Lombard DB, et al. Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell* 124:315-329; 2006.
 - [7] Bhakat KK, Mokkapati SK, Boldogh I, et al. Acetylation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by p300 and its role in 8-oxoguanine repair in vivo. *Mol Cell Biol* 26:1654-1665; 2006.
 - [8] Tini M, Benecke A, Um SJ, et al. Association of CBP/p300 acetylase and thymine DNA glycosylase links DNA repair and transcription. *Mol Cell* 9:265-277; 2002.
 - [9] Hasan S, El-Andaloussi N, Hardeland U, et al. Acetylation regulates the DNA end-trimming activity of DNA polymerase beta. *Mol Cell* 10:1213-1222; 2002.
 - [10] Yamamori T, DeRicco J, Naqvi A, et al. SIRT1 deacetylates APE1 and regulates cellular base excision repair. *Nucleic Acids Res* 38:832-845; 2010.
 - [11] Bhakat KK, Izumi T, Yang SH, et al. Role of acetylated human AP-endonuclease (APE1/Ref-1) in regulation of the parathyroid hormone gene. *EMBO J* 22:6299-6309; 2003.
 - [12] Caldecott KW. XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair (Amst)* 2:955-969; 2003.
 - [13] Vidal AE, Boiteux S, Hickson ID, et al. XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions. *EMBO J* 20:6530-6539; 2001.
 - [14] Oberdoerffer P, Michan S, McVay M, et al. SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging. *Cell* 135:907-918; 2008.
 - [15] Wang RH, Sengupta K, Li C, et al. Impaired DNA damage response, genome instability, and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice. *Cancer Cell* 14:312-323; 2008.

【学会報告】

第6回国際ローマ映画祭プログラム

「イタリアと日本：高齢者に優しい2つの国」

田中 雅嗣

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・健康長寿ゲノム探索

夏のある朝、イタリア・ボローニャ大学のClaudio Francheschi教授から電話がかかってきた。国際ローマ映画祭で黒澤明監督生誕100年を記念して日本特集を行う。「イタリアと日本：高齢者に優しい2つの国」と題してプログラムを組むので、講演を依頼したいとのことであった。Francheschi教授は、実験病理学が専門で、高齢者の免疫系の研究を行っている。ヨーロッパ連合の予算を獲得してGenomics for Healthy Aging (GEHA) projectを組織している (<http://www.geha.unibo.it>)。GEHAコンソーシアムにはヨーロッパの11カ国の25研究室と中国が参加している。GEHA研究では5300組の高齢同胞と2650人の若年対照群を集めており、ヒトを対象とした長寿研究として最大規模である。私は2004年にGEHA projectが開始された頃から、2回ボローニャ大学を訪問し、ミトコンドリアDNA解析について討議した。今回も国際ローマ映画祭の後に、ボローニャ大学で「ミトコンドリア・デイ」と題したシンポジウムが開催され、イタリアのミトコンドリア研究者と交流することができた。

「イタリアと日本：高齢者に優しい2つの国」では、最初にイタリアの映画評論家が日本とイタリアの映画から、高齢者の登場するシーンを抽出して、解説した。日本映画で取り上げられたのは小津安二郎監督の「東京物語」であった。笠知衆の扮する義父が、戦争で夫を亡くした嫁（原節子）に再婚を勧めるシーンであった。この映画は、年老いた両親の一世一代の東京旅行を通じて、家族の絆、夫婦と子供、老いと死、人間の一生、それらを冷徹な視線で描いた作品である（Wikipedia）。他の映画のシーンが上映された後に、Francheschi教授と私が、長寿を達成するためにどんなことができるかをイタリア語と英語でそれぞれ討論し、同時通訳を介して聴衆との質疑応答を行った。以下に掲げる英文は、サブプログラムのパンフレット用に用意した短文である。

その要点をここに記す。ES細胞やiPS細胞ではミトコンドリアゲノムの遺伝子発現が抑制されている。ミトコンドリアからのROS産生が上昇すると、細胞分化が誘導され、分化万能性が失われる。私の仮説は、組織幹細胞において加齢と共にミトコンドリアからのROS産生が上昇し、それによって自己複製能が失われ、免疫系・神経系・運動器系の臓器・組織の予備能が低下し、これが個体老化をもたらすというものである。

なぜ女性と男性の間で10%の寿命差があるかを考える。

東京都健康長寿医療センターの新井富生病理診断部長の総説（マイクロキメリズム - 女性の体内に存在するY染色体について考える - 病理と臨床2010年11月号）によると、男児を出産した経験のある女性の臓器や癌組織にY染色体が検出されるという。胎児と母親は胎盤を介して細胞の交流がある。これをmaternal microchimerism（母系マイクロキメリズム）と呼ぶ。Y染色体は男児に由来することが明確であるので定量的分析が可能であるが、女兒を妊娠している間にもマイクロキメリズムが生じている。マイクロキメリズムはSLEや慢性関節リウマチなどの自己免疫疾患の頻度が女性において高いことを説明する。また、白血病などの造血器腫瘍の治療の一環として骨髄幹細胞移植を実施する場合に、母親と子供の移植において組織適合性白血球抗原（HLA）の一致度が多少低くても、拒絶反応が起こりにくい。この現象もマイクロキメリズムによって母親と子供の間で免疫学的寛容が成立しているためと説明されている。

一方、長寿の女性を調べると40歳ないし45歳以上で出産経験をもつ人が多いという疫学研究結果がある。私が考えた仮説は、母親が胎児から新鮮な幹細胞の供給を30歳ないし40歳に受けると、寿命が延長するというものである。成人になっても骨髄幹細胞は末梢血中に流れている。出産時に胎盤から採取される臍帯血には造血幹細胞が多量に含まれている。男性の組織幹細胞の寿命が90歳で尽きるのに対して、女性は妊娠時に胎児から供給された幹細胞のブースター効果によって100歳まで生存できる。ネットを調べてみると、自らの長寿や若返りを目指して妊娠し、胎児から幹細胞の供給を受けた後に、中絶してしまうという恐ろしい可能性も指摘されていた。

男性は、妊娠することが今のところ不可能であるので、自分の組織幹細胞を痛めつけないように喫煙や禁酒など節制に務めなくてはならない。ローマでの講演の終わりに、草食男子やイクメンなど、若い日本人男性の傾向を紹介してお茶を濁した。他に「夫の寿命は妻の寿命に依存するので、奥さんを大切にすべきだ」など、いくつかの論点も英文で記したので、ご一読いただければ、幸いである。

Longevity in Japan: Why number one for women and number five for men?

Masashi Tanaka

Department of Longevity and Health

Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

In this talk, I will introduce the results of our genetic analysis of the mitochondrial genome of Japanese centenarians. I will also present my personal view on the possible avenues for attaining longevity, focusing especially on lifespan extension of Japanese men. I have to apologize for my biased opinions, because I am a male researcher mainly studying the mitochondrial genome variations that are transmitted through the maternal line.

Mitochondria

Mitochondria are the intracellular power plants providing almost all of the energy necessary for cellular activity. Mitochondria are furnaces combusting hydrogen extracted from nutrients with oxygen taken up by respiration. Mitochondria are the major sites producing reactive oxygen species, which molecules can attack proteins, lipids, and DNA. Thus, we can speculate that mitochondria are tightly linked with the ageing process.

Mitochondrial genome

The mitochondrial genome is a small circular DNA of 16,569 base pairs compared with the human nuclear genome of 3 giga base pairs. Each mitochondrion carries several copies of mitochondrial DNA. The amount of messenger RNA transcribed from the mitochondrial genome is about one-third of the total RNA of cells. This genome is highly polymorphic among individuals, because the evolutionary rate of mtDNA is 10-20 times higher than that of the nuclear DNA. We can hypothesize that functional differences in the mitochondrial genome among human individuals contribute to their susceptibility to various age-related metabolic diseases, such as type 2 diabetes and metabolic syndrome.

Longevity-associated mitochondrial haplogroups

In 1998, we reported that Japanese centenarians are enriched in mitochondrial haplogroup D and that this haplogroup confers resistance to various age-related diseases. In 1999, Prof. Franceschi's group at the University of Bologna reported haplogroup J to be associated with longevity in Ital-

ian centenarians. Recently we demonstrated that subhaplogroup D4a is abundant in Japanese semi-supercentenarians (age over 105 years). Haplogroup D is characterized by an amino acid replacement (leucine 237 to methionine in ND2) in complex I of the respiratory chain; whereas subhaplogroup D4a is represented by an amino acid replacement (isoleucine 78 to threonine in Cytb) in complex III of the respiratory chain. These polymorphisms are supposed to be linked with the antioxidant effect or stabilization of the mitochondrial enzymes. Both haplogroup D and subhaplogroup D4a are specific to Asians, whereas haplogroup J is specific to Europeans. Thus different targets should be selected for prediction of longevity in Japan and Italy.

How to live long?

If you are male, my answer is: Marry a Japanese lady! The average lifespan of Japanese women is 86.44 years, which is the longest among all of the countries in the world. Widowers live fewer years than men who live together with their wives. So one could say that wives are life-savers for their husbands. Men's lifespan is dependent on the longevity of their wives. For women to live with aged husbands may be too stressful, and women can enjoy the single lifestyle after their husbands have passed away. Thus, 'grief care' would be more important for widowers than for widows. In contrast, widows live longer than women who live together with their husbands. The average lifespan of Japanese men is 79.59 years, which is only the 5th place among the world's countries. If you are female, to marry a Japanese gentlemen can be a good choice for a long life!

Box 1. Lifespan of women and men in the world's top countries

Female		Male	
Japan	86.44	Qatar	81.0
Hong Kong	86.1	Hong Kong	79.8
France	84.5	Iceland	79.7
		Switzerland	79.7
		Japan	79.59

Female-male lifespan difference

In many countries, the average lifespan of men is about 90% of that of women. Although this fact has been mainly attributed to biological differences between men and women, sociological fac-

tors also contribute to the lifespan differences between men and women. The lifespan of women is close to that of men in the Middle-East and South Asian countries, where the status of women in society should be improved. The lifespan of men is far below that of women in the previous communist countries, where suicide rates of men are high because of drastic negative changes in the economy. To prolong the lifespan of Japanese men, we should re-activate the Japanese economy and create support systems for depressed citizens, especially the men.

Characteristics of Japanese centenarians

The percentage of disabled centenarians is higher for females than for males. This fact is interpreted to mean that many female centenarians are survivors of cerebrovascular diseases, myocardial infarction, or other diseases; whereas males do not generally survive these disorders. This phenomenon is consistent with the psychological profiles of centenarians. Japanese male centenarians are nervous about their health and frequently visit clinics for health checkups. For both females and males, Japanese centenarians are less corporative (independent or going their own way). For one's longevity, it may be a wise personal policy to ascribe psychological stresses not to oneself but to others.

Longevity of women and importance of type of cuisine

Menstruation is associated with the monthly loss of iron from the body. Free iron in the cells is a source of reactive oxygen species, which attack cellular components, such as lipids, proteins and DNA. Furthermore, estrogen (female hormone) is believed to protect women against oxidative stress. These facts may contribute to the greater longevity of the female.

Most Japanese cuisine utilizes various kinds of soybean products, such as 'miso' (soy paste), 'shoyu' (soy source), and 'natto' (fermented soybeans), which contain soybean isoflavones having antioxidant and estrogen-like effects. Also, both Japanese and Italian cuisines are characterized by the frequent use of seafood, which contain polyunsaturated fatty acids. Furthermore, by decreasing salt intake and preventing hypertension, we have successfully suppressed the incidence of death from cerebral hemorrhage. I believe that we Japanese should further increase the intake of fruits and vegetables as in the case of the Mediterr-

anean people.

Microchimerism and tissue stem cells

It has been reported that women who give birth after 40 years of age live longer than women who do not. This longevity effect is, at least in part, explained by genetic factors, including mitochondrial genome polymorphisms, because the brothers of those long-lived women live longer than other men. In connection with this observation, I am now interested in microchimerism. Mothers and fetuses exchange each others cells. We can detect the cells from fetuses in the body of mothers, although the number of such cells is small. For one's longevity, it is important to maintain stem cells that are continuously providing somatic cells in each tissue. The tissue stem cells donated from the fetus may contribute to the longevity of the mother. Unfortunately, it is impossible for men to enjoy this possible benefit from the fetus, so we should find another way for the male to get a boost from stem cells.

How can we promote healthy longevity of Japanese men?

Traditionally Japanese men have been supposed to devote themselves to their work. Japanese baby boomers have to learn a new style of life from the newer generations. After retirement from their job, many Japanese company-first men, who had enjoyed a high position in the hierarchy within companies, find it difficult to join their local communities. Especially for men, to maintain active interaction with local societies in later life is a prerequisite for longevity. Thus we should introduce some type of re-education system to convert company-first men to community-connected men.

Herbivore men vs. carnivore women

I am not so pessimistic, because new types of Japanese men are emerging. In 2005 the Japanese author Maki Fukasawa coined the expression 'so-shoku danshi' vs. 'niku-shoku joshi', which literally means 'herbivore men' vs. 'carnivore women.' 'Herbivore men' are interested in their fashion and uninterested in earning or spending much money. Another type is 'iku-men' (nursing men), who are males actively involved in the care of children. Both 'herbivore men' and 'iku-men' seem to refuse to be too masculine. These new types of Japanese men may be expected to enjoy greater longevity in the future.

Conclusions

Japan is an aging aged country. Although both biology and genetics are important to understand the mechanism of longevity, we should also keep a keen eye on the various sociological and psychological aspects of aging. I believe that stimulation of our lives by close interaction with our partners is a key facet for longevity.

【随 筆】

老化研究事起こし——老化細胞は高齢者の臓器に実際あるのか？

三井 洋司

徳島文理大学 香川薬学部

はじめに

今迄の事始めシリーズ、30話において、老化・寿命の制御にまつわる現状を広く、若い人向けに発信しましたが、新しい視点に気付かされたと言う人も、また、物足りなく思った人もいたでしょう。そして細胞の老化を基盤に考える私と異なる見解の人は、大いなる反論をしたいと思った事でしょう。

それら反論も想定して、これから老化・寿命の研究をどのように進めようか 一緒に考えてみませんか？

老化研究の事起こしです。

そのために今回は先ず、老化細胞についてなるべく認識を共有するところから始めて、個体の老化をどのように考えるかを提起し、その過程で、今後の研究課題を随時、検討していきましょう。

第1話 老化を先行主導するのは？

老化の研究をするにあたって、老化細胞をどう考えるかは、最も基本的なことです。

生体が老化すると言っても、生体内に老化細胞なんて無いと思っている人もいますでしょう。「高齢者において、代謝系、神経内分泌系、ホメオスタシスに関わる制御システムが劣化してきて、機能破綻に向かっている臓器群は認めるけど、特定に老化した細胞は居ないのでは？」との意見を、優秀な研究者から聞きます。その場合、「老化した個体の体細胞は全て老化細胞」なのでしょうが？それとも、「さまざまな偶然の障害因子によって機能が衰え、細胞死に陥る直前の傷害細胞が老化細胞」ということでしょうか？また「調節系臓器に先ず機能不全が生じて、それこそが、個々の細胞へ障害をもたらす」と考えるのでしょうか？

私の理解では、老化細胞についてもっと明確なイメージを描けます。体細胞が老化して、寿命に達するには、広義の遺伝子プログラムが原理として働き、しかも、それを補うべき幹細胞からの再生系も衰えます。だから臓器内の細胞群も数が減るか、機能に欠陥が生じて、臓器、器官系の劣化が起こるのです。当然、この器官系の劣化は、他臓器の細胞群にも影響を与えますから、シグナルのネット間で相互に老化の影響が波及し、その効果は加速されて、結局、個体寿命に至ると考えます。

上記二つの論争点は、「生体調節系の老化」と「細胞の老化」で、どちらが先行した主要原因なのかということですが、40年ほど前になりますが、個体は一個の細胞を起源に発生、成長する事実を強く意識し、その働きを発揮させる遺伝子と環境が寿命を決める鍵だと考えたからこそ、細胞老化のプログラム説で研究に邁進しました。当時、

老化研究のために自ら開発したTIG-1細胞から、今や本研究室では、不死化を達成したIMT細胞、更には、人工多能性幹細胞、hiPSCさえ創製できました。

マウスに至っては1個の線維芽細胞から個体まで作出できたとの報告もあるのです。細胞は万能だとの感じですが、こうして、細胞を軸にヒト個体の老化を考える視点に、ますます確信が湧きます。

さて、そういったからには、老化細胞とは何かについて、もっと明瞭に述べる責任がありそうです。

第2話 老化細胞って、なんですか？

「事初め」で解説したように、end replication problemがありますから、線状DNAは複製ごとにテロメア反復配列の短縮を起こします。それをクロックとして、細胞は一定回数の分裂後に、増殖停止してしまいます。それが典型的な老化細胞で、テロメア短縮依存性の老化……①と言われます。平均して8Kb程度のテロメアを残したまま分裂停止しますが、それは、がん化など異常細胞になる前の予防機構と考えられています。その折には、シグナルとしてp53蛋白の発現が高まりますから、分裂停止できなければ、細胞死への誘導もあり得ることです。もう一つの重要なシグナルは、CdKのインヒビターとして働くp16 (INK4a) の発現亢進です。このp16は、細胞周期に依存せず、老化細胞特有に発現誘導されるのです。テロメアの機能障害は広い意味でDNA傷害ですが、この場合、テロメア末端でのヒストンH2にリン酸化の起こるのが特徴で、テロメアに結合した γ H2AXが指標になります。

さて、がん化を防ぐ機構として細胞老化があると述べましたが、若い細胞においても、がん遺伝子が発動すると老化が急速に誘導されることが注目されています。これは第2の老化細胞で、oncogene-induced senescence ……②と呼ばれます。例えば、活性化rasを若い細胞に導入すると、増殖がずっと盛んになるかと言えばそうではなく、テロメア反復が充分長いまま、急速に分裂停止します。この際は、p53が誘導されており、また、テロメアとは独立に、DNA傷害シグナルの γ H2AX塊が核内に多数観察されます。②の老化については、がん遺伝子だけでなく、特定の増殖因子への暴露、あるいは、DNAへの傷害因子 (DNA stressor) でも、起こるようです。

mutagenはDNA傷害因子ですが、テロメア領域に多数ある塩基のGがターゲットになると、テロメア短縮も、より急速に起こります。同様に、強い酸化ストレスは、テロメアの短縮を加速します。それに加えてDNA傷害誘導の急速な第2の細胞老化をもたらすと考えられます。

それで、テロメアの短縮度は、細胞の分裂回数だけでなく、酸化ストレスへの暴露の程度を反映すると言う見解も出ています。

上に述べたテロメアの限界短縮に依存しない第2の細胞老化の発見は、大変重要です。人間に比べて、テロメアの長さが大変長いまま、細胞老化と個体老化が早く進む近交系マウスの現象や、DNA stressorによる急速な細胞老化も、これで良く説明されるからです。

一方、従来から老化細胞のマーカーとして使われているのが SA β Gal (老化関連ベータガラクトシダーゼ) の活性です。至適領域が中性の β Galで、それを持つ細胞は分裂寿命が末期になるにつれて、出現頻度が上がることで知られています。前記①、②の老化細胞との関連は不明ですが、これは傷害を受けた分裂停止細胞ではないかというあいまいな印象です。ただ、第3の老化細胞指標としてこれも実用的に有力です。

第3話 生体内に老化細胞はあるでしょうか？

上記の老化細胞は、主にインビトロで、詳細な因果解析がなされました。そして、分子レベルで、指標が同定され、免疫染色、蛍光発色、定量化などが検討されたのです。その指標を用いて、動物、人間の組織における老化細胞の存在が明らかになってきました。

特に、前がん状態の組織を解析すると、老化細胞が多数見つかったのは、注目に値します。例えば、がん遺伝子の*BRAF*の変異患者にできた皮膚の良性腫瘍とか、*NF1*の変異患者 (Ras活性が亢進する) における神経線維芽腫のなかに、老化細胞が認められています。ヒト前立腺の良性腫瘍内にも見つかります。これらは、テロメア短縮による①の老化細胞と、がん遺伝子活動による②の老化細胞の両方が含まれるに違いありません。その腫瘍細胞が悪性化すると腫瘍内に不死化細胞が出現するわけですが、それはテロメラーゼ遺伝子の発現誘導、またはALTと呼ばれるホモログスリコンビネーションのどちらかによって、テロメア長の維持機構を獲得しています。

腫瘍が悪性化する前は老化しつつある腫瘍細胞が大部分と言うわけなのです。

その意味では、がん細胞に老化を誘導する戦略は、治療に向けて有効に違いありません。その場合、テロメラーゼのインヒビターは別の視点から、もう既知の戦略です。むしろ、老化に本質的なp16や同じ遺伝子locusの*ARF* (p53を誘導する) の発現を誘導する物質を、がん治療薬として探索したらどうでしょう。事起こしの一部です。

一方、正常組織でも老化細胞が見つかります。

老化したメラノ細胞が高齢動物で増えること、テロメラーゼ欠損マウスの肝臓で、老化細胞 (SA β Galを指標に) が大量に増えることが見出されています。また、核内にみられる γ H2AXのfociを指標にしても、高齢のマウスやサルを生体組織内に、老化細胞の増加が見出されます。ヒト動脈の血管にも、高齢者では、テロメア短縮の進んだ、寿命の短い老化細胞が見られます。また、加

齢に伴って、ヒトの皮膚や腎臓でp16の発現上昇が認められます。このように高齢者の臓器に、老化細胞が増えてくることを、実感できることです。

ところで、個体の老化にとって更に重要なことは、組織幹細胞に老化と枯渇が有るか否かです。つまり老化した体細胞を補う再生系が、補給を続けられるか否かです。

実際、高齢者における造血幹細胞の再生能力の衰えは、貧血をまねいており、皮膚表皮幹細胞の衰えは、薄い皮膚を、そして、メラニン色素幹細胞の供給不足は、白髪をまねいているようです。高齢になると、組織幹細胞においても、細胞老化指標であるp16の発現が上昇してきますが、これは、造血幹細胞系、神経前駆細胞などにおける再生能力の衰えと関係しているのでしょうか。こうした知見から言えることは、これら幹細胞に見られるテロメラーゼ活性は、テロメア短縮による細胞老化を防ぐ事が出来ないほど、不十分であり、機能細胞を供給し続けられないということです。

これらに関連して、特に注目しておきたいことがあります。

Gonzalezらによって作成された*mTert* (テロメラーゼ遺伝子) 過剰発現マウスを解析すると、がんが発生しなかったマウス個体では、対照に比べてその寿命は大きく延長していたとの報告があります。本研究室では既に*hTert*をヒト血管内皮細胞に導入して、寿命延長細胞や不死化細胞株を作製しました。それを動脈硬化モデルマウスの血管に移植して、内膜肥厚を防ぐことが出来る事を示しました。また、p53の下流にあるp21遺伝子を取り除けば、テロメラーゼ欠損マウスの寿命を延長できるとの報告があります。

こうして、細胞老化を遅延する戦略は、がん化を回避できさえすれば、個体の寿命延長を期待できると、示されたのではないのでしょうか？

ところで、まだ気になることが有ります。

老化細胞とは、決して若返らない細胞でしょうか？

事起こし①です。

広く認められているStrehlerの個体老化の定義によれば、個体の老化は不可逆的な過程です。どなたも今はそれを認めるでしょう。しかし細胞レベルではどうなのでしょう。

いわゆる分裂寿命に達する老化細胞は、機構が分かる前から、不可逆な過程と考えられています。テロメア短縮が一方的に進むわけで、テロメラーゼの活性誘導が無ければ、当然でしょう。

一方、解析が進んだ分子機序からいって、老化細胞にも2つのタイプがあると指摘する人もいます。つまり、p53とp16の両方の亢進が関わる分裂停止は不可逆的であるが、p53単独が関わる分裂停止は、可逆的だということです。これが前記の老化細胞①と②を示すかは不明です。

20年以上も前の共同研究に成りますが、SV40 virus

を老化しきった細胞に感染させると、DNAの複製は一時的に誘導されるのですが、分裂は再開しませんでした。しかし、老化細胞①、②でも、テロメラーゼやDNA修復系遺伝子の活性化等によって、分裂再開はあり得ないのでしょうか。

個体寿命の延長に期待も寄せられます。試せますよね？

関連しますが、別の視点から疑問があります。生体内で分裂停止の細胞は、老化細胞と関連はないのでしょうか？

事起こし②です。

生体内には分裂終了細胞 terminally differentiated cellと言われる細胞群があります。G₀期にある細胞です。胎児期に分裂、増殖を重ねて、充分量の細胞を用意した心筋細胞とか神経細胞がそうだとされます。いずれも、成人に至って、その喪失や機能異常が、現実の老年病や寿命と関連すると、云う人もいます。この細胞は、分裂を決して再開しないのでしょうか。一方、テロメア短縮の限界に達して分裂停止した①の老化細胞と、テロメア長以外に果たしてどんな違いが有るのでしょうか？更に、テロメア長を維持した②の老化細胞とは、DNA傷害の程度に大きなちがいが有るだけでしょうか？

老化個体に由来する細胞から、或は増殖を殆どしないリンパ球からも、iPS細胞を樹立出来たとの報告はありますが、老化細胞やG₀期細胞だとの確かな証拠は有りません。

いわゆる分裂終了細胞も、epigeneticな変化だけで分化するならば、その分化を変更させて、分裂再開できないのでしょうか？ 試せますよね？

一方、細胞周期を一時的に停止した静止期細胞、quiescent cellもあります。気にしていることは、組織幹細胞が、長期に分裂寿命を維持するためにquiescent cellをどのように維持するかです。

事起こし③

組織の幹細胞は分裂したとき、幹細胞のままの自己再生と前駆細胞に向かう分化とを起こします。体細胞として働く機能細胞を供給するために、分裂して前駆細胞を作りだします。ただ、むやみに分裂すると分裂寿命に陥りますので、なるべくquiescent cellの状態にいて、待機するのが良策です。quiescent cellとは、いわゆるG₁ arrest細胞です。G₀期細胞との違いは、それとちがって、CdKを一定量発現し続けて、S期に素早く入る事が出来ることでしょう。ただ、老化細胞（ふざけて言えばG₀細胞）との違いも重要なのに、不明点があります。

一方で、大量出血で貧血気味なら、幹細胞は盛んに分裂して前駆細胞を作るでしょう。

しかし、何かの折、幹細胞の枯渇を招く不必要な血球産生は決してしないのでしょうか？ 制御のシグナルは、何でしょうか？

高齢末期において其れは、特に重要です。幹細胞がquiescent cellを保持する方向と、分裂してsenescent cellに向かう方向の分岐点で、適宜、制御できないのでしょうか。細胞の分化、老化、再生の中身を極めておく必要が有ります。まずは、in vitroで検討を。

これは、あなたの寿命を左右する分岐点です。試せますよね？

次回もこんな怖い言葉で、迫れば幸い。お楽しみに。

【お知らせ】

第34回日本基礎老化学会大会のご案内

この度、第34回日本基礎老化学会大会の大会長を仰せつかり、2011年6月15日(水)～17日(金)、京王プラザホテル・スペースセブン(東京都)にて同学会を開催する運びとなりました。今年は、第27回日本老年学会総会(<http://www2.convention.co.jp/jgs2011>)の分科会として開催され、日本老年医学会、日本老年社会学会、日本老年歯科医学会、日本老年精神医学会、日本ケアマネジメント学会、日本老年看護学会とともに、7学会合同で開催されます。

日本基礎老化学会は、遺伝子や細胞レベルから老化のメカニズムを研究する基礎老化学の振興と学術交流を目的として、毎年6月に総会を開催していますが、本大会は「基礎老化とアンチエイジングの接点」をテーマに、基礎老化学の今後の方向性に関して討論するとともに、専門家を招聘、先端研究の知見を紹介し、学術交流を図りたいと考えています。韓国から基礎老化研究者を招聘し、日韓合同シンポジウムも計画しています。

1日目は、第27回日本老年学会総会の合同プログラム開催日として、特別講演が2つ、合同パネルディスカッション「介護予防：現状・課題と新たな方向」、合同シンポジウムとして「健やかな長寿社会へ向けての老年学会の取り組み」が開催され、各分科会からの代表者により、活発な意見交換がされる予定です。

また、合同ポスターも例年通り開催され、基礎老化学会からは認知症基礎部門へ4演題提出する予定です。奮って演題のご応募をお願いします。

2日目からは各分科会に分かれての学会となりますが、一般演題(口演)、ランチョンセミナー、また、メインイベントの日韓合同シンポジウムを開催いたします。その後、会場をスペースセブンへと移動し、ポスターセッションを開催、夕方には、日韓合同懇親会を開催いたします。こちらも是非ご予定ください。

3日目は、引き続き一般演題(口演)、ランチョンセミナーとシンポジウム「脳機能と健康食品(仮)」を開催します。

今年は、7学会の合同大会となり、学会会場が4つ(京王プラザホテル・ハイアットリージェンシー東京・NSスカイカンファレンス・スペースセブン)にわかれます。限られたスペースでの開催になりますので、展示・ポスタースペースや休憩スペース、講演会場など、参加者の皆様には移動や会場の狭さなどでご不便をおかけする点もあるかと思いますが、合同学会ならではの他学会会員の方々との交流、新しい発見もあるかと思えます。皆様のご参加、心よりお待ちしております。

第34回日本基礎老化学会大会プログラム(予定)

※プログラムの時間は今後変更になる可能性があります。15日の合同プログラムについては、第27回日本老年学会総会(<http://www2.convention.co.jp/jgs2011>)HPをご覧ください。

6月15日(水)

- AM：開会挨拶、合同シンポジウム「健やかな長寿社会へ向けての老年学会の取り組み」
合同特別講演
- PM：合同ランチョンセミナー
合同パネルディスカッション「介護予防：現状・課題と新たな方向性」
優秀ポスター表彰、合同懇親会

6月16日(木)

- AM：開会挨拶、一般演題(口演)、評議員会
- PM：ランチョンセミナー、一般演題(口演)、日韓合同シンポジウム
ポスターセッション、懇親会

6月17日(金)

- AM：一般演題(口演)
- PM：シンポジウム「脳機能と健康食品(仮)」、総会・若手奨励賞発表・閉会挨拶

演題募集中(締め切り：2011年2月28日(月曜日)) [予定]

学会HPにリンクされています、「抄録登録フォーム」と「抄録入力フォーム」(Wordファイル)をダウンロードしていただき、必要事項を記載の上、第34回大会事務局(34jsbg@mediproduce.jp)にお送りください。

ご入力いただいたデータがそのままプログラム抄録集に記載されますので、送付前に入力内容を再度御確認いただくことをお勧め致します。

34回大会会長 白澤 卓二

第34回日本基礎老化学会大会

参加登録のご案内

第34回大会の参加費は、老年7学会参加費と同額12,000円となります。本学会会員で、事前登録をされる方のみ、会員特別価格として10,000円で参加が可能です。

<事前登録学会参加費>

正会員：10,000円（当日登録：12,000円）

学生会員：4,000円（当日登録：5,000円）

学会HPにリンクされております登録用紙に必要な事項をご記入の上、第34回大会事務局（34jsbg@mediproduce.jp）までお送りいただき、以下の口座へお振り込みをお願いします。お振り込みが確認できた時点で、参加登録完了となり、参加証をお送りいたします（学会参加証の事前郵送は会期1か月前を予定しています）。

なお、基礎老化学会の年会費が未納の方は事前にお納めください。年会費が未納のままですと非会員扱いになり、参加費は12,000円となりますのでご注意ください。

【振込先】

三井住友銀行 青山支店

口座番号：普通口座 7004520

口座名義：第34回日本基礎老化学会大会 大会長 白澤 卓二

(タ イ フンジ ユウオンカイニホンキョウガク ヲカイタイカイ タイカイチヨウ シラフククジ)

お振込みの際に、必ず「申込者名」が分かるようにしてください。施設名でお振り込みの場合、申込者の確認が取れず、参加登録を受付することができませんのでご注意ください。

参加登録・事前振込みは6月8日（水）までをお願いいたします。

【大会事務局連絡先】

第34回日本基礎老化学会大会 事務局 担当：皆川 幸代

〒107-0062 東京都港区南青山4-1-12-203

Tel：03-5775-2075 Fax：03-5775-2076 E-mail：34jsbg@mediproduce.jp

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35巻 第1号

平成23年(2011)2月8日

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

編集 編集委員会

印刷所 三陽工業株式会社