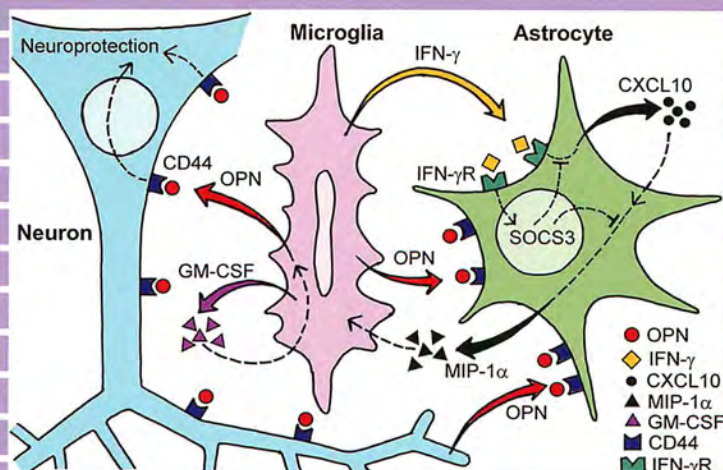


BIOMEDICAL GERONTOLOGY

基礎老化研究

- 総説 | アルツハイマー病の発症機構と食物ワクチン
石浦 章一
- 総説 | 細胞の生存・増殖・分化の制御と細胞接着由来シグナル
伊豫田 拓也、深井 文雄
- 総説 | 脳と免疫系の相互作用という観点から老化促進モデルマウスをとらえる
島田 厚良、石井 さなえ
- トピックス | マイクロアレイを使って老化トランスクリプトームのアトラスを作成するために
小西 智一
- トピックス | X線により生じるヒドロキシルラジカルの量とその分布の解析
松本 謙一郎
- 随筆 ● 老化研究事起こし——アンチ・エイジングは、すべて幻か？ 三井 洋司
- おしらせ ● 第35回日本基礎老化学会大会のご案内 高橋 良哉
- 附 ● 基礎老化学会サーキュラー 第92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 千葉大学大学院医学研究院 先進加齢医学講座
〒260-8670 千葉市中央区亥鼻1-8-1
- 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
-

BIOMEDICAL GERONTOLOGY

Vol. 36 No. 1 2012

Official Journal of The Japan Society for Biomedical Gerontology

- 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, Department of Advanced Aging Medicine, Chiba
University Graduate School of Medicine, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku Chiba
260-8670, JAPAN
- Yoshikazu Higami, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of
Science, 2641 Yamazaki, Noda-shi, Chiba 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。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

アルツハイマー病の発症機構と食物ワクチン

石浦 章一.....1-4

総説

細胞の生存・増殖・分化の制御と細胞接着由来シグナル

伊豫田 拓也、深井 文雄.....5-12

総説

脳と免疫系の相互作用という観点から老化促進モデルマウスをとらえる

島田 厚良、石井 さなえ.....13-20

トピックス

マイクロアレイを使って老化トランスクリプトームのアトラスを作成するために

小西 智一.....21-27

トピックス

X線により生じるヒドロキシルラジカルの量とその分布の解析

松本 謙一郎.....29-32

随筆

老化研究事起こし--- アンチ・エイジングは、すべて幻か？

三井 洋司.....33-34

おしらせ

第35回日本基礎老化学会大会のご案内

高橋 良哉.....35

附

基礎老化学会サーキュラー 第92号

CONTENTS

<REVIEW>

Effect of rice-expressed amyloid β protein in the Tg2576 Alzheimer's disease transgenic mouse model

Shoichi Ishiura.....1-4

<REVIEW>

Regulation of Cell Survival, Proliferation, and Differentiation through the β 1-integrin signaling

Takuya Iyoda and Fumio Fukai.....5-12

<REVIEW>

Senescence-accelerated mouse (SAM) revisited from the viewpoint of brain-immune interaction

Atsuyoshi Shimada and Sanae Hasegawa-Ishii.....13-20

表紙：損傷後のマウス海馬に見られるサイトカインを介したグリア・ニューロン間ネットワーク

詳しい説明は13ページ（総説）を参照

【総 説】

アルツハイマー病の発症機構と食物ワクチン

石浦 章一

東京大学・大学院総合文化研究科

要約

アルツハイマー病の根本治療には、セクレターゼ阻害剤やワクチンがある。本研究では、これらを比較したところ、ワクチン治療の方が効果が高いことが明らかとなった。しかも、経口ワクチンの方が皮下注射より副作用が少ないことがわかり、米にアミロイドβタンパク質を発現させる手法が、将来的に希望を持てるワクチンであることが判明した。

キーワード：アルツハイマー病、アミロイドβタンパク質、経口ワクチン、植物

1. はじめに

21世紀に入り、我が国の平均寿命が延びてきた。これに伴い、認知症（アルツハイマー病、前頭側頭型認知症、等）が急増しており、介護や治療など国の医療負担の面でも大きな問題となっている。中でもアルツハイマー病

は、寿命が延びるとリスクが大きくなる病気で、治療法の確立に対する社会の要請は非常に大きなものがある。

表1は、日本人の年齢構成を大まかに調べた予測である。これによれば、2050年には日本の総人口の4割が65歳以上の高齢者になり、認知症が一番の社会問題になると予想されている。その中でも一番多いのがアルツハイマー病である。この予防や治療は何よりも必要なことであり、しかも簡便で安価なものが求められている。現在のところ、以下の発症メカニズムから予測されるセクレターゼ阻害剤とワクチンが治療の大きな選択肢になっている。

表1 日本人の年齢構造の推移

西暦	0-14歳	15-64歳 (A)	65歳以上 (B)	B/A
1990	18.2%	69.5%	12.0%	5.8
2010	13.4%	66.1%	20.7%	2.8
2030	9.7%	58.5%	31.8%	1.8
2050	8.6%	51.8%	39.6%	1.3

2. アルツハイマー病発症機構とBACE1阻害

アルツハイマー病は脳に老人斑が蓄積する病気で、アミロイド前駆体タンパク質(APP)に由来するアミロイドβタンパク質(Aβ)と呼ばれるペプチドの脳内沈着が神経細胞死を引き起こすことが原因であることは、最近の研究ではほぼ確定した(図1) [1,2]。すなわち、APPがβおよびγセクレターゼによって切断されるという異常なプロテオリシスによってAβが作られる。しかも、家族性アルツハイマー病の責任遺伝子が、APP(基質)、プレセニリン1(酵素)、プレセニリン2(酵素)であることがわかり、すべてこの経路の成分であることも、上記

仮説を強固なものにしている。

APPのプロテオリシスに関係するのがα、β、γの3種類のセクレターゼであり、これにAβ分解酵素ネプリライシンを加えた各種プロテアーゼ機能の解明がアルツハイマー病征服の一番の標的となっている。前駆体APPの大部分はαセクレターゼによって切断され、N末端側の大断片は細胞外に分泌される。この反応はフォールボールエステルによって活性化されることが分かっており、私たちは10年来この研究に取り組み、ADAM9、ADAM10、ADAM17、ADAM19という4種類の酵素がαセクレターゼ反応に関与することを世界で初めて証明した[3]。

一方、βセクレターゼ(BACE1)はAβ産生の最初の

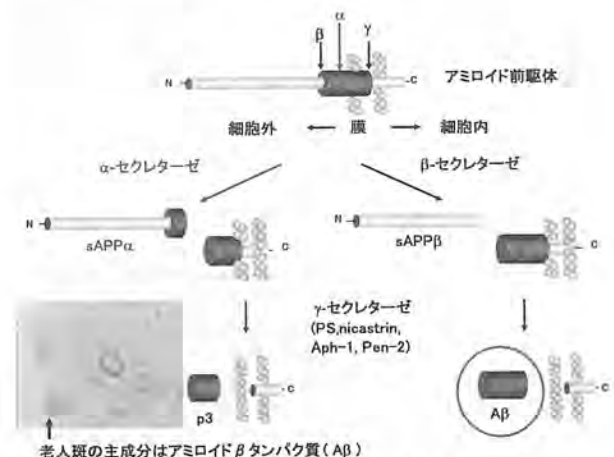


図1 アミロイドβタンパク質の生成機構
アミロイドβタンパク質は、右のような経路で合成される。

連絡先：〒153-8902
東京都目黒区駒場3-8-1
Tel: 03-5454-6739
Fax: 03-5454-6739
E-mail: cishiura@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

段階を触媒する酵素であり、この阻害剤の開発はBACE1の細胞内機能を明らかにする上にも、またアルツハイマー病の治療にも役立つものと考えられる。私は京都薬科大学の木曾良明教授（現・長浜バイオ大学教授）、理化学研究所西道隆臣チームリーダーとの共同研究で種々のβセクレターゼ阻害剤を開発し、新規化合物KMI-429をトランスジェニックマウスTg2576の脳室に注入する実験を行った。注入後、時間をおいて脳を摘出し、ELISA法にてAβの量を測定したところ、トランスジェニックマウス脳内のAβの減少を認めた（約30%低下）。また同様に、正常マウス脳内のAβ量も同程度に低下することが分かった[4]。

このBACE1は奇妙な性質を持っている。正常型APP並びにSweden型家族性変異を持つAPPを安定過剰発現させたヒトSH-SY5Y細胞では、Aβ産生は明らかに後者の方が多。これらの細胞にBACE1阻害剤を添加してAβ産生を調べたところ、50%阻害に要する阻害剤の濃度が約10倍異なることが分かった。すなわち阻害剤は、正常型BACE1の方を1%の低濃度で阻害することが明らかになったのである。このことは、家族性変異を持つと薬の効きが10倍悪いということを示す（図2）。

この原因を明らかにするために、APPのプロセッシングを詳細に検討した。一般に、Aβはエンドサイトーシスの途中で産生されると考えられている。そこで、正常型および家族性変異を持つAPPに遺伝子変異を追加（Y687A）、分泌経路から細胞膜に輸送されるが、エンドサイトーシスされない変異体を作成して阻害剤の効果を見たところ、この場合には50%阻害に要する阻害剤の濃度が同じことが分かった（図3）。

以上の結果は、家族性Sweden型APPは分泌経路内で、正常型APPはエンドサイトーシス経路内でAβを産生していることを示している[5]。図4に大まかな流れを模式図として示したが、細胞外から加えた薬剤はエンドサイトーシス経路の方に多く取り込まれ、分泌経路の方には拡散でしか入らないことを考えると納得できる結果であ

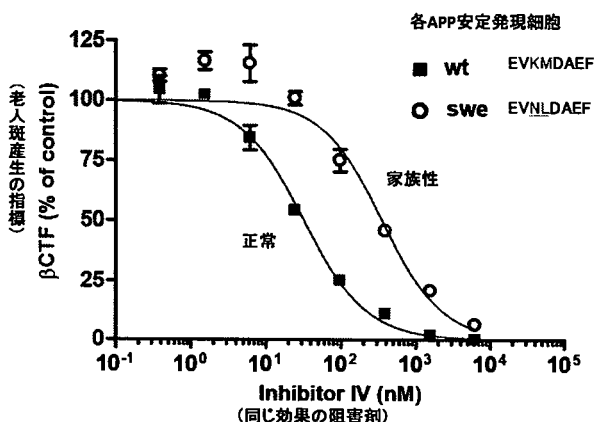


図2 阻害剤のはたらきの差 (SH-SY5Y細胞)

正常型APP(wt)とスウェーデン型家族性アルツハイマー病変異APP(swe)を安定形質発現させたヒトSH-SY5Y細胞でのβセクレターゼ活性。市販のinhibitor IVによる阻害を見た。家族性変異を持つと、阻害剤が10倍効きにくいことを示す。文献5より引用改変。

ろう。

3. γセクレターゼ

私たちは、新しく酵母で、プレセニリン、ニカストリン、PEN-2、APH-1並びにAβを含むAPPの一部を発現させることによって、γセクレターゼ活性を再構成する系を立ち上げた[6]。この系によって、Aβは長いAβ46からAβ43、そしてAβ40へとプロセッシングされることを明らかにした。また従来、プレセニリン1とプレセニリン2の機能の差が推測されていたが、再構成系によって両プレセニリンのAβ産生機能には、ほとんど差がないことが明らかになった[7]。

4. 食べるワクチン

このAβの生成を阻止したり、長期間かかる沈着を防ぐことによってアルツハイマー病のリスクが軽減できる。また一方、いったん沈着したAβを何らかの方法でなくすことができれば、アルツハイマー病人口は激減することが期待される。

アルツハイマー病は、遺伝性のもも長寿に伴うものも基本的には発症機構は同じで、Aβの生成が原因の鍵を握っていることが多くの研究から明らかになっている。Aβは、数十年単位の長期間にわたってゆっくりと脳組織に沈着し、神経細胞死を導く。ワクチン療法はこのようにときにElan社によって提案され、ヒトと同じ遺伝子変異を持つトランスジェニックマウスを用いた予備実験

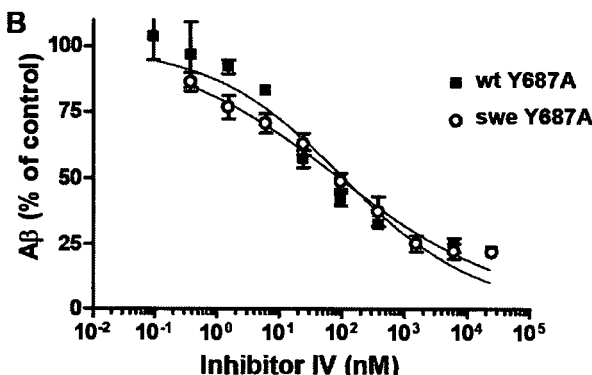
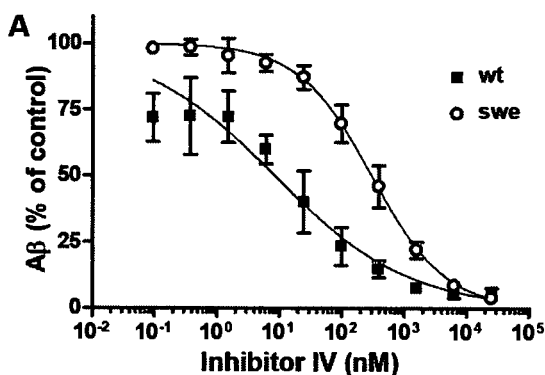


図3 Y687A変異の有無による阻害剤の効果の差

この図はAβを見たもので、Aは図2と同様の細胞で、Bはこれに加えてY687A変異を入れた細胞で見たもの。Bではinhibitor IVの効きは同じだが、Aでは10倍異なる。文献5より引用改変。

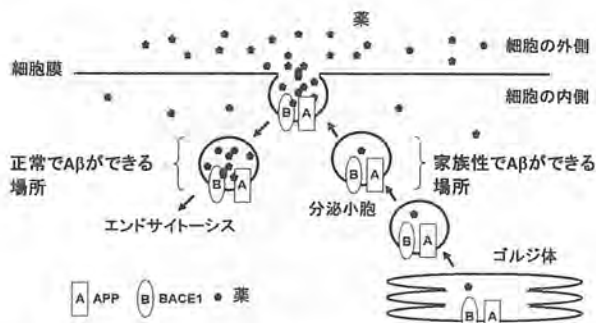


図4 細胞内でAβができる箇所

結果を模式的に図示したもの。SweではAβは分泌経路で作られ、正常ではエンドサイトーシス経路で作られる。薬は、エンドサイトーシス経路の方が取り込まれやすい。文献5より引用改変。

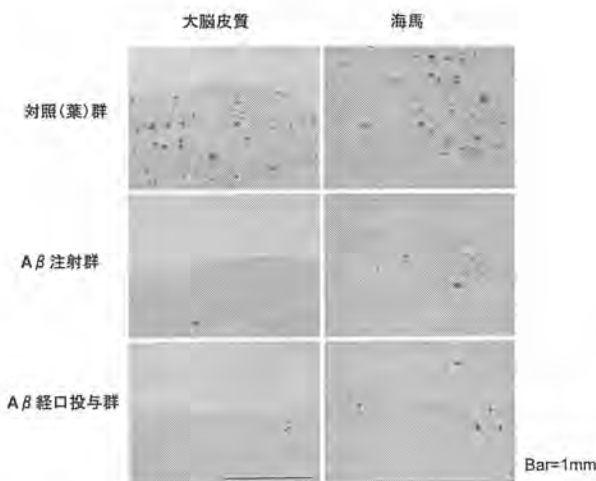


図5 食物ワクチンによるAβの低減

遺伝子改変Aβ入りピーマン投与の結果。注射群でも経口投与群でも、老人斑が劇的に減っていることが分かる。文献14より引用改変。

では、抗体投与がAβ量を減らすと報告された[8]。しかし、Aβを直接注射で投与する(ヒトを対象にした)第二相試験では、約300人中18人に髄膜脳炎の症状が出たため、結果が得られないまま2002年に実験は中止の憂き目を見た[9]。しかし、その後の剖検で脳内Aβの減少が確認された例もあった[10]。

このような現状をふまえ、私は注射によって副作用が出たと考え、安全な経口ワクチンを目的として、2004年に東京大学渡辺雄一郎教授とともに高等動物細胞では発現しにくいAβをナス科の植物細胞で発現させる系を開発し、ピーマン葉に大量発現させることに成功した[11]。これを用いて、人間の家族性アルツハイマー病Sweden変異と同じ遺伝子変異をもつTg2576モデルマウスに経口投与並びに皮下投与を行い、脳内のAβ量が70%も減少する結果を得た[12]。これはすなわち、Aβ

の蓄積を予防することもできるという結果である(図5)。しかも、炎症性IgGの出現は注射では多く、経口ではほとんど認められないという結果になり、新しい食物ワクチンは過去の副作用を克服できるものとして大いに期待が持たれた。

しかしながら、将来の長期間投与を考えると、私たちの主食である米を用いることができれば、安価な治療が期待され、効果は倍増すると考えられる。またAβは肉類にも含まれており、私たちには食経験がある。そこで、東北農業センター吉田泰二上席研究員とともにイネでのAβ発現を試み、成功した[13-15]。この米Aβワクチンは、Tg2576マウスの老人斑を減らすとともに、同マウスの異常行動に対しても良好な治療効果が得られた。図6は、Y字迷路での進入回数を表すが、Tg2576マウスでは侵入回数の増加がみられる。これは、脳内不溶性Aβ量に比例するが、経口ワクチン群では顕著に低下した。このことは、ワクチン投与群では自発行動量が抑えられたことを意味する。

5. おわりに

私たちのつくった遺伝子改変イネでは、Aβを米1gあたり約100μg生産することができる画期的なものである。遺伝子改変米を用いた花粉症予防の例を見るまでもなく、遺伝子改変食物による疾病予防は、その簡便さと経済性から、世界が待ち望んでいるものである。

ワクチンは、致命的な感染症に対して確実かつ安価な防御手段として、現在もジフテリア、百日咳、はしか、破傷風、結核、小児マヒ(ポリオ)、風疹など多くの病気の予防に用いられている[16]。またワクチンは、経済的にも優れた方法である。今後は、十分に副作用の有無を検討し、広めていきたい。植物を用いた経口ワクチンは、安全性やアレルギー誘発性の有無等のリスクもある。しかし、社会に深刻な影響を与える疾患に対する食物ワクチンの社会的、経済的なベネフィットははかりしれない。このような食物に関しては、遺伝子改変であろうと、多くの消費者がリスクよりベネフィットを選択すると考えられる。もともと食物ワクチンは疾患の予防と治療のため

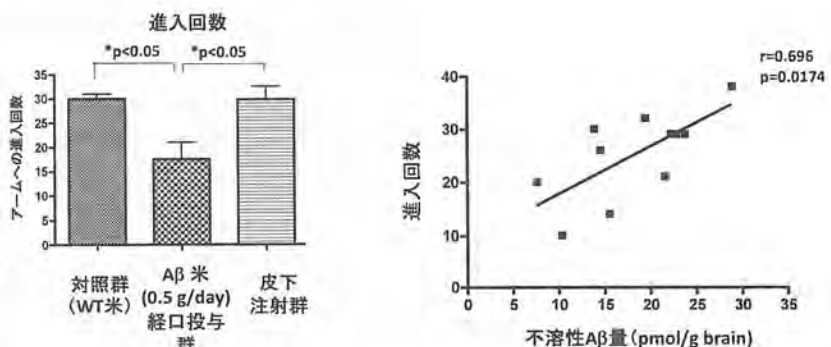


図6 Tg2576マウスと自発行動

遺伝子改変Aβ入り米投与の結果。Tg2576マウスは自発行動量が上昇するという報告があるため、Y-迷路における進入回数とAβ量の相関を調べた。その結果、経口投与群での自発行動量の減少が認められた。また、脳内の不溶性Aβ量と進入回数の多さは比例した。文献14より引用改変。

めに考案されたものなので、これらの応用研究は人類に対する貢献としてはきわめて大きいと考えられる。

引用文献

1. Casserly I, Topol E. Convergence of atherosclerosis and Alzheimer's disease: inflammation, cholesterol, and misfolded proteins. *Lancet* 363: 1139-1146, 2004.
2. Tanzi RE, Bertram L. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell* 120: 545-555, 2005.
3. 石浦章一、服部千夏. アルツハイマー病の治療戦略, 蛋白質・核酸・酵素, 49: 2179-2185, 2004.
4. Asai M, Hattori C, Iwata N, et al. A novel beta-secretase inhibitor KMI-429 reduces amyloid beta peptide (Abeta) production in amyloid precursor protein (APP) transgenic and wild-type mice. *J Neurochem* 96: 533-540, 2006.
5. Yamakawa H, Yagishita S, Futai E, et al. Beta-Secretase inhibitor potency is decreased by aberrant beta-cleavage location of "Swedish mutant" amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 285: 1634-1642, 2010.
6. Futai E, Yagishita S, Ishiura S. Nicastrin is dispensable for gamma-secretase protease activity in the presence of specific presenilin mutations. *J Biol Chem* 284: 13013-13022, 2009.
7. Yonemura Y, Futai E, Yagishita S, et al. Comparison of presenilin 1 and presenilin 2 gamma-secretase activities using a yeast reconstitution system. *J Biol Chem* 2012 in press
8. Schenk D, Barbour R, Dunn W, et al. Immunization of amyloid-beta attenuates Alzheimer disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400: 173-177, 1999.
9. Orgogozo JM, Gilman S, Dartigues JF, et al. Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta 42 immunization. *Neurology* 61: 46-54, 2003.
10. Nicoll JA, Wilkinson D, Holmes C, et al. Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nature Med* 9: 448-452, 2003.
11. Szabó B, Hori K, Nakajima A, et al. Expression of amyloid-beta 1-40 and 1-peptides in *Capsicum annum* var. *angulosum* for oral immunization. *ASSAY Drug Dev Technol* 2: 383-388, 2004.
12. Ishii-Katsuno R, Nakajima A, Katsuno T, et al. Reduction of amyloid β -peptide accumulation in Tg2576 transgenic mice by oral vaccination. *Biochem Biophys Res Commun* 399: 593-599, 2010.
13. Yoshida T, Kimura E, Koike S, et al. Transgenic rice expressing amyloid beta-peptide for oral immunization. *Int J Biol Sci* 7: 301-307, 2011.
14. Nojima J, Maeda A, Aoki S, et al. Effect of rice-expressed amyloid beta in the Tg2576 Alzheimer's disease transgenic mouse model. *Vaccine* 29: 6252-6258, 2011.
15. Nojima J, Ishii-Katsuno R, Futai E, et al. Production of the antibody against Abeta in mice with rice plant expressing Abeta. *Biosci Biotech Biochem* 75: 396-400, 2011.
16. Tacket CO and Mason HS. A review of oral vaccination with transgenic vegetables. *Microbes and Infection* 1: 777-783, 1999.

Effect of rice-expressed amyloid β protein in the Tg2576 Alzheimer's disease transgenic mouse model

Shoichi Ishiura

Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences,
The University of Tokyo

Senile plaques are pathological hallmarks of Alzheimer's disease. They are composed of amyloid β protein (A β). We developed a new edible vaccine: rice expressed GFP-A β 42. We investigated whether A β rice had therapeutic effects in Tg2576 transgenic mouse model. We found that levels of intracerebral A β and serum A β decreased and A β vaccine improved memory. These results suggest that new edible vaccine may have therapeutic effects in Alzheimer's disease.

【総 説】

細胞の生存・増殖・分化の制御と細胞接着由来シグナル

伊豫田拓也^{1,2}、深井文雄^{1,2}

¹ 東京理科大学・薬学部・分子病態学教室

² 東京理科大学総合研究機構・DDS 研究センター

要約

細胞外マトリクス (ECM) への細胞の接着は、細胞を物理的に支持するのみならず、細胞の生存、増殖、分化など、恒常性の維持に重要な生理現象に関わるシグナルの基盤となっている。それゆえ細胞接着が起因となるシグナル伝達における異常は、癌を含む種々病態の形成を招くと考えられ、細胞接着の制御機構をターゲットとした研究が、これまでに多くなされてきた。近年我々は、接着分子 β 1-インテグリンの活性化を介して細胞接着を増強するペプチド「TNⅢA2」を、ECM分子の1種であるテネイシン-C (TN-C) 分子内より発見した。このペプチドは細胞の増殖・分化を制御し、さらに一部の細胞では細胞死の制御にも関与するなど、多彩な機能を示すことが分かってきた。そこで本稿ではTNⅢA2が示す様々な機能の紹介を通じ、これら生理現象における β 1-インテグリンシグナルの重要性について紹介する。

キーワード: ECM protein, Tenascin-C, Integrin,

1. はじめに

多細胞生物において細胞は、個々に独立して存在するのではなく、周囲の環境や他の細胞に接着することで器官・組織を形成し、機能的な集合体として存在している。この時細胞に接着の足場を提供する分子が、フィブロネクチンやコラーゲンなどに代表される細胞外マトリクス (ECM) ファミリー分子である。ECMファミリー分子は一般的に、細胞膜上に発現するインテグリンファミリー分子と相互作用することで、細胞をその場に繋ぎとめる役割を担う。しかしECM分子の機能は、このような物理的支持機能に留まらない。ECMとインテグリンの結合によって細胞側に伝えられるシグナルは、細胞の生存や増殖、分化、遊走など、細胞の生理機能を調節する重要なシグナルとなっている。

ECMファミリー分子の1つにテネイシン-C (TN-C) がある。TN-Cは胎児期において高い発現を示すが、生体の成熟に伴ってその発現量は低下する。しかし炎症や創傷治癒の局所、がん病巣などの特殊な環境下では、成体においてもTN-Cが一過的に高発現するとされ、各種病態との関連が注目されている。細胞の接着制御におけるTN-Cの機能に着目すると、多くの細胞に対してこの分子は、ECM分子でありながら細胞接着に直接関与せず、他のECMタンパクと細胞の相互作用を調節すると

いうユニークな性質を示す。このような分子は“matrix-cellular protein”ファミリーとして定義され、標的細胞の細胞膜上に存在する受容体に作用し、細胞からのサイトカインや増殖因子、またはタンパク分解酵素等の産生を調節することで、標的細胞の接着性やその他機能を制御している [1,2]。しかし今までのところ、TN-Cが細胞接着に対して示す効果にはコンセンサスが得られていない。いくつかの細胞においてはTN-Cが接着を促進するという結果が報告されている。一方、別の細胞では接着を抑制するとの結果も観察されている。

TN-Cが細胞接着を正負両方向に制御する機序については未だ不明な点が多いが、これを説明しうる可能性の1つとして、TN-C構造の多様性がある。TN-Cは分子内FNⅢリピート領域にて選択的スプライシングを受けることが知られており (図1)、多彩なアイソフォーム群を形成すると考えられる。またTN-C分子は生体内で6量体を形成しているという事実を考慮すると、TN-Cは発現する場所によって表出部位を使い分けることで、生体応答の適切な制御を担っている可能性がある。しかしTN-Cの種々スプライシング・バリエーションが示す機能に関して、その詳細は未だ解明されていない。

一方で、ECM分子内に存在する種々領域が示す活性に関しては、既に様々な報告がされている。これら分子内領域のいくつかは、炎症性プロテアーゼであるマトリクスメタロプロテアーゼ (MMP) 等による分解によって表出すると考えられることから、こちらも病態との関連が注目される。興味深い領域を分子内に持ち合わせるECM分子の1つに、“フィブロネクチン (FN)” がある。この分子は一般的に、 β 1-インテグリンとの結合を介し

連絡先: 〒278-8510

千葉県野田市山崎2641

Tel: +81-4-7124-1501 ext 6466-6469

FAX: +81-4-7121-3619

e-mail: iyoda@rs.tus.ac.jp

て細胞接着に寄与する。しかし我々はこの接着に寄与するFN分子内に、細胞接着を抑制する機能性部位が存在することを見出した。この活性部位を含む22-merのペプチド(FNⅢ14)は、 $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) または $\alpha 5\beta 1$ (VLA-5) インテグリンを不活性化することでFNを介した細胞接着を抑制しており、この活性の表出にはペプチドFNⅢ14のC末に存在するYTIYVIAL配列が重要であることを我々は明らかにした[3]。その後ペプチドFNⅢ14は、その反接着活性に基づいて細胞の生存や増殖、分化、さらに遺伝子発現の調節まで多大な影響を及ぼす、生理学的に重要なシステムであることが明らかとなった[3-8]。

我々は近年、このYTIYVIAL配列と相同性を有するYTITIRGV配列が、TN-C分子内に存在することを見出した。しかしこの配列を含む22-merのペプチド(TNⅢA2)は、その活性領域にペプチドFNⅢ14との相同性を有するにも関わらず、 β

1-インテグリンの構造的・機能的活性化を介した細胞接着の促進という、FNⅢ14とは正反対の活性を示した。 $\beta 1$ -インテグリンの活性化はサイトカイン刺激などによるものが一般的であり、その活性化は一過的である(数時間のうちに基底状態に戻る)という性質を持つ[9]のに対して、TNⅢA2ペプチドが誘導する $\beta 1$ -インテグリンの活性化は、その活性化状態を長時間維持するという特徴を持っている。また、TNⅢA2はヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)であるSyndecan-4を受容体とすることが明らかとなっており[10]、この“ペプチド-HSPG複合体”が $\beta 1$ -インテグリン細胞外領域に直接作用することで、インテグリン構造の活性化型への変化を誘導することが分かっている。このユニークな“outside-outシグナル伝達系”によるインテグリンの活性化機構が、TNⅢA2において特徴的な $\beta 1$ -インテグリンの「持続的活性化」に重要であることも示唆されており、既存のインテグリン活性化系とは著しく異なる経路を利用していることもわかってきている[10]。

TNⅢA2がある種の接着性細胞において細胞増殖を強く促進することから、この領域は腫瘍細胞の増殖、ひいては病態の進展に大きく寄与していると考えられる。その一方で非接着性のいくつかの細胞にはアポトーシスを誘導することも観察しており、生理的・病理的環境下におけるTNⅢA2の多機能性は注目に値する。そこで本稿ではTNⅢA2の機能に注目し、これまでに得られている知見を紹介する。

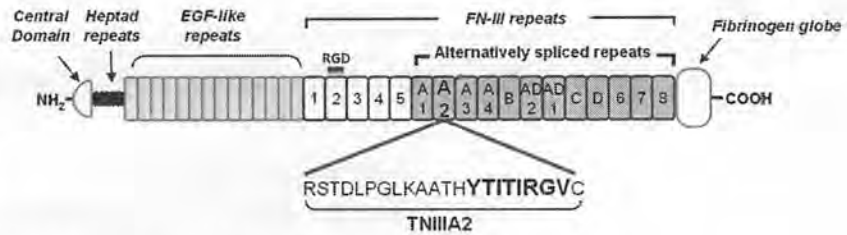


図1 テネイシン-C分子構造の概略図

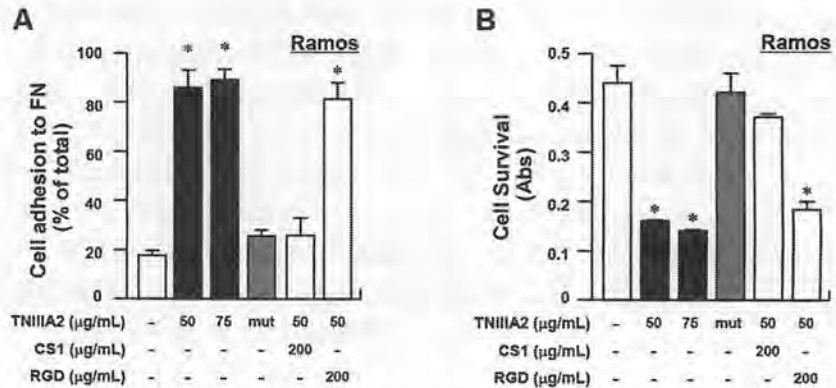


図2 Ramos細胞においてTNⅢA2が誘導する細胞接着の亢進(A)とアポトーシス誘導(B). mut; inactive controlペプチド, CS-1; $\alpha 4\beta 1$ インテグリンアンタゴニスト, RGD; $\alpha 5\beta 1$ インテグリンアンタゴニスト。*: $p < 0.05$ vs TNⅢA2単独処置群。(参考文献[22]より改変)

2. 浮遊性造血器悪性腫瘍細胞とTNⅢA2

2-1) TNⅢA2による白血病細胞のアポトーシス誘導

血球系細胞の生存・増殖において重要な役割を担うのが、FNとその受容体(インテグリン $\alpha 4\beta 1$ /VLA-4、インテグリン $\alpha 5\beta 1$ /VLA-5)に起因するシグナルであり[11]、造血器悪性腫瘍細胞の生存・増殖も、同様のインテグリンシグナル依存性を示す[12-14]。この時インテグリンシグナルは、アポトーシス抑制効果を基盤として、細胞の生存維持に寄与する[15,16]。またいくつかの白血病や骨髄腫では、骨髄に発現するFNに一部の腫瘍細胞が接着し、その結果として薬剤耐性(接着依存性薬剤耐性(CAM-DR))を獲得することも知られており[17]、薬剤存在下における腫瘍細胞の生存維持にも、インテグリンシグナルが深く関与している。

一方TN-Cの発現は、成体においては前述のとおり高くないが、骨髄などのリンパ系組織においては恒常的に発現している[18,19]。またがん病態局所においても、TN-Cの一過的な発現上昇が報告されている[20,21]。がん病態においてはMMPの高発現も認められることから、このような領域においてはTNⅢA2の表出が生じていると推測される。そこでTNⅢA2によって白血病細胞のインテグリン $\alpha 4\beta 1$ を活性化し、強制的にFNに接着させた(図2A)。細胞接着の誘導により、細胞の生存・増殖が亢進すると予想されたが、実際には白血病細胞にアポトーシスによる細胞死が誘導されるとの結果を得た(図2B)[22]。ミエロイド系や赤血球の前駆細胞において、インテグリンを介したFNへの細胞接着がアポトーシス

を誘導するとの報告がされており[23-25]、上記我々の結果とも合致する。しかし一方で、白血病細胞のVLA-4を介したFNへの接着とそれに伴うCAM-DR獲得が、急性白血病の再発の主因であることも我々は報告している[26,27]、さらに前述の反接着誘導ペプチドFNⅢ14を抗がん剤と組み合わせて投与することで、再発のない完全な治療を白血病モデルマウスにおいて実現している[28]。この治療法の基盤は、FNⅢ14が誘導するβ1-インテグリンの不活化に伴う細胞接着の抑制により、白血病細胞のCAM-DRが解除されて抗がん剤感受性が高められる点にある。これらの結果は、インテグリンを介したCAM-DRが、確かに病態で成立していることを意味している。

インテグリンからのシグナルが、白血病細胞に「生」と「死」という両極端の結果を誘導するという事実、整合性は取れるのであろうか。我々はこの矛盾が、「接着の強度と持続時間が、細胞の生死を決める重要なファクターになる」との仮説により説明可能であると考えている。即ちFNへの「適度」な接着は細胞の生存・増殖の維持にプラスに働き、逆にTNⅢA2が誘導するような「過度で持続的」な接着は細胞生存にはマイナスに働くとの考えである。CAM-DR獲得に関してなされている報告は、全て細胞の自発的な接着をベースに検討されたものであり、インテグリンを人為的に活性化させたものは皆無である[15,27,29,30]。またCAM-DRにおいて認められる白血病細胞の自発的な接着は、サイトカイン刺激を介したβ1-インテグリンの活性化に依存している

[31]。前にも述べたが、一般的にサイトカインが誘導するβ1-インテグリンの活性化は急速(30min以内に最大値となる)かつ一時的(数時間以内に定常状態に回帰する)であり[9]、CAM-DRはこのような、細胞とFNとの「適度」な接着によって誘導されると推測される。一方でTNⅢA2の誘導するような強力かつ持続的な細胞接着

は、結果として細胞にアポトーシスを誘導すると考えている。

ではこのTNⅢA2が誘導する特徴的な細胞接着は、どのような機序に依っているのであろうか。この答えの一つとして我々は、TNⅢA2が細胞にアポトーシスを誘導するためには、Syndecan-4と呼ばれるHSPGの発現が必須であることを報告した[10,31]。Syndecanファミリー分子の発現は極めて高度に制御されており、好中球や末梢血単核球でのSyndecan-4発現は極めて低く[32,33]、確かにこれら末梢血細胞に対して、ペプチドTNⅢA2はアポトーシス誘導能を示さない(表1)。種々血球系細胞におけるSyndecan-4およびVLA-4の発現レベルとTNⅢA2誘導性アポトーシスの相関性に関する検討は、Syndecan-4分子がTNⅢA2受容体として機能する可能性を示唆している(表1)。

現在のところ、TNⅢA2によるインテグリンの活性化とそれに伴う細胞接着が、アポトーシス誘導へとシグナルを伝える仕組みについては不明である。しかしながら以上に記した結果は、インテグリンを介した細胞接着が、少なくとも血球系がん細胞の生存に対して「負」にも作用することを示唆している。TNⅢA2領域はTN-C分子内に埋没しているものの、ひとたび表出すれば血球悪性腫細胞の異常な生存・増殖を負に制御できるという事実から、今後は造血器腫瘍にあるリンパ系組織において、TNⅢA2領域をいかにして機能的に十分なレベルで表出させるか、その表出の機構とともに検討する価値がある。

表1 種々血球系細胞におけるVLA-4 (α4β1インテグリン)、VLA-5 (α5β1インテグリン)、およびSyndecan-4の発現レベルと、TNⅢA2誘導性細胞接着およびアポトーシスに対する感受性。(参考文献[53]より改変)

細胞種	発現率 (%)			細胞接着性		アポトーシス感受性	
	VLA-4	VLA-5	Syndecan-4	+ TNⅢA2	+ Mg ²⁺	+ TNⅢA2	+ Mg ²⁺
“患者由来急性骨髄性白血病細胞”							
患者 A	98.2	88.8	48.8	++	++	+	++
患者 B	97.5	98.5	9.5	-	+	-	++
“末梢血白血球細胞”							
好中球	6.7	N.D.	3.2	-	-	-	-
単球	48.6	N.D.	2.0	-	++	-	++
リンパ球	405	N.D.	4.4	-	++	-	+
“細胞株”							
B 細胞系							
Ramos	96.5	3.2	92.1	+++	++	+++	++
Raji	94.3	65.3	2.3	-	++	-	+
T 細胞系							
Jurkat	92.8	96.6	42.4	+++	++	+++	++
造血球系							
K562	9.3	97.2	66.7	+++	++	-	-
骨髄系							
U937	98.1	98.2	87.5	+++	++	++	+++
HL60	99.8	99.7	75.3	+++	++	++	+
THP1	68.5	20.3	30.1	++	++	++	+
THP1(+PMA)	10.5	18.7	99.2	++	++	-	-

2-2) 赤血球分化の誘導とTNⅢA2

細胞分化の不完全性は、増殖の異常性と共に挙げられる腫瘍細胞の特徴の1つである。血球細胞の分化は、その増殖と同様、骨髓や胎児肝臓、胎児脾臓で生じている[11,34-38]。血球形成において重要な役割を担うレギュレーターはサイトカインや増殖因子であるが、血球前駆細胞と細胞外マトリクスとの相互作用も、

血球分化を支える重要な因子と考えられている。血球分化の際には「造血幹細胞ニッチ」と呼ばれる微小環境が造血組織内に形成されるが、この微小環境の形成にはFNやTN、コラーゲン、ラミニン、そしてプロテオグリカンなどのECM分子がその構成分子として関与しており、中でもFNは最も重要な構成分子とされている[39-43]。赤血球分化においては、FN受容体のVLA-4やVLA-5を介した赤血球前駆細胞の接着が重要とされるが、この時FNは赤血球前駆細胞を物理的にアンカーするのみならず、細胞の生存・増殖の支持にも寄与すると考えられている[25,43-47]。しかしインテグリンシグナルと細胞分化に関しては、これまでその詳細がよく分かっていなかった。

最近我々はTNⅢA2による細胞接着の誘導が、hemin刺激による赤血球分化を顕著に増進することを明らかにした(図3)。赤血球への分化過程では、p38やJNK、そしてERKといったMAPKの関与が報告されており[48-52]、我々もK562細胞のhemin誘導性赤血球分化においてp38の活性化を観察したが、TNⅢA2はこの活性化を亢進させた[53]。K562細胞はFN受容体としてVLA-5のみを発現している[53,54]ことから、TNⅢA2が示す赤血球分化促進効果は、VLA-5を介したFNへの接着に依存していると考えられた。しかしVLA-5アンタゴニストのRGDペプチドのみならずVLA-4アンタゴニストのCS-1ペプチドも、TNⅢA2による赤血球分化(図3B)およびp38活性化の亢進を抑制したことから、VLA-4の関与も示唆された[53]。その後、TNⅢA2によるVLA-5を介したFNへの接着が、K562細胞にVLA-4発現を誘導することが示されたことから、この新たに発現したVLA-4を介したFNへの接着亢進が、p38の関与するシグナル伝達経路を介して、hemin誘導性の赤血球分化を促進していると考えている[53]。赤血球の分化には、骨髓間質細胞に発現するTN-Cが重要との報告があり[55]、我々の結果はこの詳細を示すものと考えられる。TNⅢA2の母体分子であるTN-Cは骨髓などの免疫系組織に高発現してお

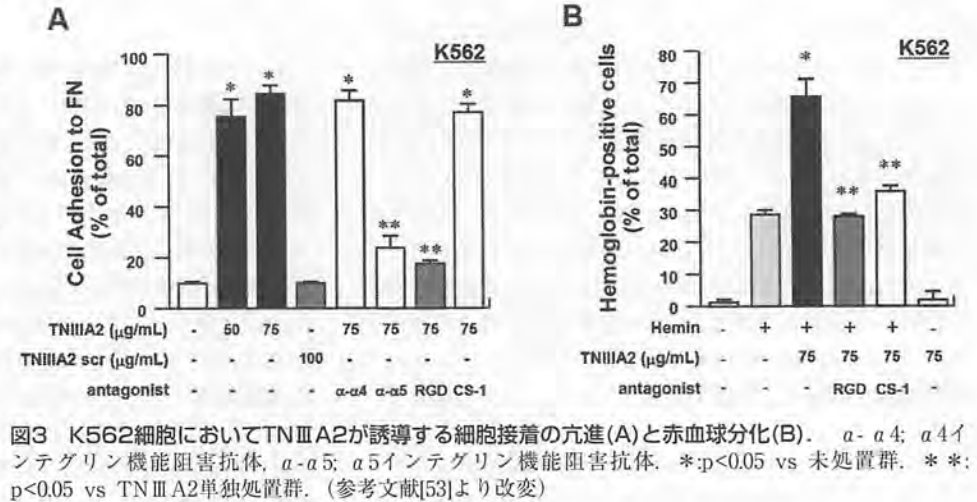


図3 K562細胞においてTNⅢA2が誘導する細胞接着の亢進(A)と赤血球分化(B)。α-α4: α4インテグリン機能阻害抗体、α-α5: α5インテグリン機能阻害抗体。* $p < 0.05$ vs 未処置群。** $p < 0.05$ vs TNⅢA2単独処置群。(参考文献[53]より改変)

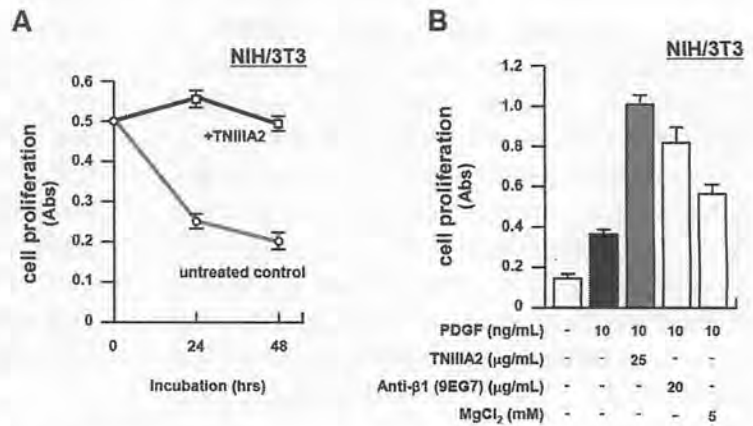


図4 NIH/3T3細胞においてTNⅢA2が示す(A)アノイキス耐性誘導効果と(B)PDGF依存性増殖の過剰増強効果。

り[18,19]、かつタンパク分解による修飾に感受性を持つ分子である[56]ことから、TNⅢA2領域の表出割合を制御できれば、少なくともがんの持つ性質の1つである「不完全分化」を減弱でき、病態の改善に寄与できる可能性がある。

3. 接着性細胞の生存・増殖とTNⅢA2

線維芽細胞や上皮系細胞などの接着性細胞は通常、β1-インテグリンを介したECMとの接着を失うとアポトーシス様の細胞死を起こす。この現象は足場喪失性細胞死(アノイキス)と呼ばれ、細胞が本来あるべき場所から脱離した際に別の場所で生存し続けることのないように仕組みられた、組織維持のための重要なシステムである[57,58]。一方でがん細胞は高い転移能を示すが、この能力はアノイキスに対する耐性を獲得することでもたらされると考えられており、細胞がアノイキス耐性を獲得する機序に関する理解は、がん病態の解明に重要な課題である。

最近我々は、マウス線維芽細胞株NIH/3T3細胞を脱着させた際に誘導される細胞死(アノイキス)が、TNⅢA2によって抑制されることを見出した(図4A)。この時TNⅢA2はAktやBcl-2の発現上昇を誘導しており、その一

方で細胞の接着状態には影響を与えないことから、細胞にアノキス耐性を付与していると考えられる。一方様々ながん病態においては局所における増殖因子の高発現が観察されており、中でも変異した細胞の増殖促進にはPlatelet-Derived Growth Factor (PDGF) が寄与すると考えられている。しかしPDGF依存性の細胞増殖も、インテグリンを介したECMへの細胞接着なしでは生じない[59]。PDGFはPDGF受容体に作用し、自己リン酸化サイトのリン酸化を介してRas/MAPKの活性化を誘導する[60]が、この時インテグリンからのシグナルがPDGF受容体からのシグナルと合流し、MAPK/ERK経路の活性化状態が増幅されることで、細胞増殖が誘導される。この事実は接着受容体であるインテグリンが、増殖因子と同程度に細胞増殖に寄与することを示唆している。そこでFNコート上にて培養したNIH/3T3細胞の示すPDGF依存的な細胞増殖におけるTNⅢA2の効果を評価したところ、増殖がさらに促進されるとの観察結果を得た(図4B)。VLA-5の阻害がTNⅢA2による、PDGF依存性細胞増殖の過剰促進を抑制することから、この応答も $\beta 1$ -インテグリンの活性化に依存しているといえる。更に、神経膠芽腫細胞はPDGF受容体を高発現することが知られているが、この神経膠芽腫細胞のPDGF依存性増殖が、TNⅢA2による $\beta 1$ インテグリン活性化によって著しく促進されることも明らかになっている(論文投稿中)。これらの知見は、TN-C内の活性部位「TNⅢA2」を標的とした薬剤が、過剰な細胞増殖を伴う疾患の治療に対して新たなアプローチとなる可能性を示唆している。

4. おわりに

今回注目したTN-Cの発現は、慢性肝炎や心筋梗塞、関節炎などの病態においても報告され、その病態の形成・進展との関連が示唆されている[61-63]。TNⅢA2領域はMMPなどの炎症性のプロテアーゼによるTN-Cの分解によって表出する[56]ことから、今回取り上げた悪性腫瘍以外の種々疾患治療においても、TNⅢA2領域が新規ターゲットとなる可能性を秘めている。一方でTNⅢA2による強力かつ持続的なインテグリンの活性化は、Rasの持続的な活性化を誘導する。Rasの持続的活性化は、前述の通り不死化されているマウス線維芽細胞株細胞においては細胞の生存維持や、場合によっては過剰増殖をもたらす。しかし最近、不死化していないヒト線維芽細胞株WI38細胞では、むしろ増殖が抑制され、細胞老化を引き起こすとの観察結果を得た。他のヒト細胞株でも同様の細胞老化が観察されるとともに、TNⅢA2の誘導する細胞老化がインテグリンの持続的活性化に基づいていることも分かってきた。これまで述べてきたとおり、炎症局所や種々病巣組織において表出したTNⅢA2は $\beta 1$ -インテグリンの活性化を誘導し、その微小環境にある細胞に持続的な細胞接着を促す。この時強力かつ持続的な接着を強制された細胞は老化を起し、その結果不必要な応答が回避されることで、定常状態への速やかな回帰に寄与するのかもしれない。一方炎症局所における不応答性に変異をきたした細胞は、異常増殖やさ

らなる炎症応答などを誘導することで、がん化を含む種々病態を進展させている可能性が考えられる。病態の進行と接着誘導を介した細胞老化のクロストークについてはこれまで殆ど報告がないが、新たな病態制御のアプローチとして、その詳細の解明が期待される。

参考文献

- [1] P. Bornstein P and Sage EH. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin in Cell Biol* 14:608-616, 2002.
- [2] Murphy-Ullrich JE. The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state? *J Clin Invest* 107:785-790, 2001.
- [3] Fukai F, Hasebe S, Ueki M, et al. Identification of the anti-adhesive site buried within the heparin-binding domain of fibronectin. *J Biochem.* 121:189-192, 1997.
- [4] Watanabe K, Takahashi H, Habu Y, et al. Interaction with heparin and matrix metalloproteinase 2 cleavage expose a cryptic anti-adhesive site of fibronectin *Biochemistry* 39:7138-7144, 2000.
- [5] Kato R, Kamiya S, Ueki M, et al. The fibronectin-derived antiadhesive peptides suppress the myofibroblastic conversion or rat hepatic stellate cells. *Exp Cell Res.* 265:54-63, 2001.
- [6] Kato T, Ishikawa T, Kamiya S, et al. A new type of antimetastatic peptide derived from fibronectin. *Clin Cancer Res.* 8:2455-2462, 2002.
- [7] Kamiya S, Kato R, Wakabayashi M, et al. Fibronectin peptides derived from two distinct regions stimulate adipocyte differentiation by preventing fibronectin matrix assembly. *Biochem.* 41:3270-3277, 2002.
- [8] Kamiya S, Kawaguchi T, Hasebe S, et al. A fibronectin fragment induces tumor necrosis factor production of rat basophilic leukemia cells. *Biochim Biophys Acta.* 1675:87-94, 2004.
- [9] Chigaev A, Blenc AM, Braaten JV, et al. Real time analysis of affinity regulation of alpha 4-integrin. The physiologically activated receptor is intermediate in affinity between resting and Mn^{2+} or antibody activation *J Biol Chem* 276:48670-48678, 2001.
- [10] Saito Y, Imazeki H, Miura S, et al. A peptide derived from tenascin-C induced $\beta 1$ integrin activation through syndecan-4. *J Biol Chem* 282:34929-34937, 2007.
- [11] Williams DA, Rios M, Stephens C, et al. Fibronectin and VLA-4 in haematopoietic stem cell-microenvironment interaction. *Nature*

- 352:438-441, 1991.
- [12] Shain KH, Landowski TH, and Dalton WS. The tumor microenvironment as a determinant of cancer cell survival: a possible mechanism for de novo drug resistance. *Curr Opin Oncol* 12:557-563, 2000.
- [13] Sachs L. The adventures of biologist: prenatal diagnosis, hematopoiesis, leukemia, carcinogenesis, and tumor suppression. *Adv Cancer Res* 66:1-40, 1995.
- [14] Bradstock KF, and Gottlieb DJ. Interaction of acute leukemia cells with the bone marrow microenvironment: implications for control of minimal residual disease. *Leuk Lymphoma* 18:1-16, 1995.
- [15] Hurley RW, McCarthy JB, and Verfaillie CM. Direct adhesion to bone marrow stroma via fibronectin receptors inhibits hematopoietic progenitor proliferation. *J Clin Invest* 96:511-519, 1995.
- [16] Molla A, and Block MR. Adherence of Human erythroleukemia cells inhibits proliferation without inducing differentiation. *Cell Growth Differ* 11:83-90, 2000.
- [17] Damiano JS, Hazlehurst LA, and Dalton WS. Cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) protects the K562 chronic myelogenous leukemia cell line from apoptosis induced by BCR/ABL inhibition, cytotoxic drugs, and γ irradiation. *Leukemia*. 15:1232-1239, 2001.
- [18] Chilosi M, Lestani M, Benedetti A, et al. Constitutive expression of tenascin-C in T-dependent zones of human lymphoid tissues. *Am J Pathol* 143:1348-1355, 1993.
- [19] Ocklind G, Talts J, Fassler R, et al. Expression of tenascin in developing and adult mouse lymphoid organs. *J Histochem Cytochem*. 41:1163-1169, 1993.
- [20] Atula T, Hedstrom J, Finne P, et al. Tenascin-C expression and its prognostic significance in oral and pharyngeal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*. 23:3051-3056, 2003.
- [21] Leins A, Riva P, Lindstedt R, et al. Expression of tenascin-C in various human brain tumors and its relevance for survival in patients with astrocytoma. *Cancer*. 98:2430-2439, 2003.
- [22] Saito Y, Owaki T, Matsunaga T, et al. Apoptotic cell death of hematopoietic tumor cells through potentiated and sustained adhesion to fibronectin via VLA-4. *J Biol Chem* 285:7006-7015, 2010.
- [23] Sugahara H, Kanakura Y, Furitsu T, et al. Induction of programmed cell death in human hematopoietic cell lines by fibronectin via its interaction with very late antigen 5. *J Exp Med* 179:1757-1766, 1994.
- [24] Terui Y, Furukawa Y, Sakai T, et al. Up-regulation of VLA-4 expression during monocytic differentiation and its role in negative control of the survival of peripheral blood monocytes. *J Immunol*. 156:1981-1988, 1996.
- [25] Kapur R, Cooper R, Zhang L, et al. Cross-talk between $\alpha 4 \beta 1 / \alpha 5 \beta 1$ and c-kit results in opposing effect on growth and survival of hematopoietic cells via the activation of focal adhesion kinase, mitogen-activated protein kinase, and Akt signalling pathways. *Blood* 97:1975-1981, 2001.
- [26] Matsunaga T, Takemoto N, Sato T, et al. Interaction between leukemic cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia. *Nat Med* 9:158-165, 2005.
- [27] Hazlehurst LA, and Dalton WS. Mechanisms associated with cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR) in hematopoietic malignancies. *Cancer Metastasis Rev* 20:43-50. 2001.
- [28] Matsunaga T, Fukai F, Miura S, et al. Combination therapy of an anticancer drug with FNIII14 peptide of fibronectin effectively overcomes cell adhesion-mediated drug resistance of acute myelogenous leukemia. *Leukemia* 22:353-360. 2008.
- [29] Wang MWJ, Consoli U, Lane CM, et al. Rescue from apoptosis in early (CD34-selected) versus late (non-CD34-selected) human hematopoietic cells by very late antigen 4- and vascular cell adhesion molecules (VCAM)1-dependent adhesion to bone marrow stromal cells. *Cell Growth Differ* 9:105-112, 1998.
- [30] Damiano JS, Cress AE, Hazlehurst LA, et al. Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell line. *Blood* 93:1658-1667, 1999.
- [31] Lévesque JP, Leavesley DI, Niutta S, et al. Cytokines increase human hematopoietic cell adhesiveness by activation of very late antigen (VLA)-4 and VLA-5 integrins. *J Exp Med* 181:1805-1815, 1995.
- [32] Yamashita Y, Oritani K, Miyoshi EK, et al. Syndecan-4 is expressed by B lineage lymphocytes and can transmit a signal for formation of dendritic processes. *J Immunol*. 162:5940-5948, 1999.
- [33] Kaneider NC, Egger P, Dunzendorfer S, et al.

- Syndecan-4 as an antithrombin receptor of human Neutrophil. *Biocheml Biophysic Res Commun* 287:42-46, 2001.
- [34] Coulombel L, Vunillet MH, Leroy C, et al. Linage- and stage-specific adhesion of human hematopoietic progenitor cells to extracellular matrices from marrow fibroblasts. *Blood* 71:329-34, 1988.
- [35] Williams DA. Molecular analysis of the hematopoietic microenvironment. *Pediatr Res* 36:557-560, 1994.
- [36] Murti KG, Brown PS, Kumagai M, et al. Molecular interactions between human B-cell progenitors and the bone marrow microenvironment. *Exp Cell Res* 226:47-58, 1996.
- [37] Clark BR, Gallagher JT, and Dexter TM. Cell adhesion in the stromal regulation of haematopoiesis. *Baillieres Clini Haematol* 5:619-652, 1992.
- [38] Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow Haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol* 6:93-106, 2006.
- [39] Patel VP, and Lodish HF. A fibronectin matrix is required for differentiation of murin erythroleukemia cells into reticulocytes. *J Cell Biol* 105:3105-3118, 1987.
- [40] Vuillet-Gaugler MH, Breton-Gorius J, Vainchenker W, et al. Loss of attachment to fibronectin with terminal human erythroid differentiation. *Blood* 75:865-873, 1990.
- [41] Tada T, Widayati DT, and Fukuta K. Morphological study of the transition of haematopoietic sites in the developing mouse during the peri-natal period *Anat Histol Embryol* 35:235-240, 2006.
- [42] Weinstein R, Riordan MA, Wenc K, et al. Dual role of fibronectin in hematopoietic differentiation. *Blood* 73:111-116, 1989.
- [43] Eshghi S, Vogelesang MG, Hynes RO, et al. $\alpha 4 \beta 1$ integrin and erythropoietin mediate temporally distinct steps in erythropoiesis: integrin in red cell development. *J Cell Biol* 177:871-880, 2007.
- [44] Papayannopoulou T, Priestley GV, and Nakamoto B. Anti-VLA4/ VCAM-1-induced mobilization requires cooperative signaling through the kit/mkit ligand pathway. *Blood* 91:2231-2239, 1998.
- [45] Van Der Loo JCM, Xiao X, McMillin D, et al. VLA-5 is expressed by mouse and human long-term repopulating hematopoietic cells and mediates adhesion to extracellular matrix protein fibronectin. *J Clin Invest* 102, pp. 1051-1061, 1998.
- [46] Yanai N, Sekine C, Yagita H, et al. Roles for integrin very late antigen-4 in stroma-dependent erythropoiesis. *Blood* 83:2844-2850, 1994.
- [47] Hamamura K, Matsuda H, Takeuchi Y, et al. A critical role of VLA-4 in erythropoiesis in vivo. *Blood* 87: 2513-2517, 1996.
- [48] Witt O, Sand K, and A. Pekrun. Butyrate-induced erythroid differentiation of human K562 leukemia cells involves inhibition of ERK and activation of p38 MAP kinase pathways. *Blood* 95:2391-2396, 2000.
- [49] Nagata Y, Takahashi N, Davis RJ, et al. Activation of p38 MAP kinase and JNK but not ERK is required for erythropoietin-induced erythroid differentiation. *Blood* 92:1859-1869, 1998.
- [50] Park JI, Choi HS, Jeong JS, et al. Involvement of p38 kinase in hydroxyurea induced differentiation of K562 cells. *Cell Growth Differ* 12:481-486, 2001.
- [51] Woessmann W, and Mivechi NF. Role of ERK activation in growth and erythroid differentiation of K562 cells. *Exp Cell Res* 264:193-200, 2001.
- [52] Di Pietro R, Di Giacomo V, Caravatta L, et al. Cyclic nucleotide response element binding (CREB) protein activation is involved in K562 erythroleukemia cells differentiation. *J Cell Biochem* 100:1070-1079, 2007.
- [53] Tanaka R, Owaki T, Kamiya S, et al. VLA-5-mediated adhesion to fibronectin accelerates hemin-stimulated erythroid differentiation of K562 cells through induction of VLA-4 expression. *J Biol Chem*. 284:19817-19825, 2009.
- [54] Elices MJ, Osborn L, Takada Y, et al. VCAM-1 on activated endothelium interact with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell*. 60:577-584, 1990.
- [55] Seki M, Kameoka J, Takahashi S, et al. Identification of tenascin-C as a key molecule determining stromal cell-dependent erythropoiesis *Exp Hematol* 34:519-527, 2006.
- [56] Siri A, Knäuper V, Veirana N, et al. Different susceptibility of small and large human tenascin-C isoforms to degradation by matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 270 :8650-8654, 1995.
- [57] Ilic D, Almeida EA, Schlaepfer DD, et al. Extracellular matrix survival signals transduced by focal adhesion kinase suppress p53-medi-

- ated apoptosis. *J Cell Biol* 143:547-560, 1998.
- [58] Frisch SM, and Screaton RA. Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* 13:555-562, 2001.
- [59] Chiarugi P. From anchorage dependent proliferation to survival: Lessons from redox signaling. *IUBMB Life* 60:301-307, 2008.
- [60] Claesson-Welsh L. Platelet-derived growth factor receptor signals. *J Biol Chem* 269:32023-32026, 1994.
- [61] El-Karef A, Yoshida T, Gabazza EC, et al. Deficiency of tenascin-C attenuates liver fibrosis in immuno-mediated chronic hepatitis in mice. *J Pathol* 211:86-94, 2007.
- [62] Nishioka T, Onishi K, Shimojo N, et al. Tenascin-C may aggravate left ventricular remodeling and function after myocardial infarction in mice. *Am J Physiol* 211:86-94, 2007.
- [63] Midwood K, Sacre S, Piccinini AM, et al. Tenascin-C in an endogenous activator of Toll-like receptor 4 that is essential for maintaining inflammation in arthritic joint disease. *Nat Med* 15:774-780, 2009.

Regulation of Cell Survival, Proliferation, and Differentiation through the β 1-integrin signaling.

Takuya Iyoda^{1,2} and Fumio Fukai^{1,2}

¹Department of Molecular Patho-Physiology, Faculty of Pharmaceutical Science,
Tokyo University of Science

²Center for Drug Delivery Research, Research Institutes for Science and Technology,
Tokyo University of Science

Cell adhesion to extracellular matrix (ECM) is an essential event not only for anchoring cell to stroma, but also for stimulating cell proliferation, differentiation, and migration. Since disorder of these processes leads to a variety of diseases including cancer, understanding of molecular mechanisms underlying the regulation of cell adhesion would provide an important basis for understanding of tissue homeostasis based on an anchorage-dependent cell regulation, and contribute to development of therapeutic strategy for relating diseases. We previously found a peptide from tenascin (TN)-C, termed TNIIIA2 which stimulates cell adhesion to ECM through activation of β 1-integrin. It has become clear that TNIIIA2 is capable of modulating a variety of anchorage-dependent cellular processes, such as cell survival, proliferation, and differentiation through β 1-integrin activation. The multifunctional properties of TNIIIA2 thus demonstrate an importance of β 1-integrin signaling in cell regulation.

Key words : ECM protein, Tenascin-C, Integrin,

【総 説】

脳と免疫系の相互作用という観点から老化促進モデルマウスをとらえる

島田厚良、石井さなえ

愛知県心身障害者コロニー・発達障害研究所・病理学部

要約

老化促進モデルマウス (SAM) は、促進老化を示すSAMP系統群と、通常老化を示すSAMR系統群とから成る。SAMP10系は加齢とともにニューロンが変性し学習能が低下する。SAMP10系の脳では炎症性サイトカインのレベルが高く、ミクログリアは退行変性している。また、損傷を受けた脳組織でミクログリアとアストロサイトやニューロンの間にサイトカインを介した細胞間コミュニケーションが構築されず、神経保護機能に欠陥がある。一方、SAMP系統群のマウスは胸腺萎縮やヘルパー T細胞の低下を始めとする免疫系の老化徴候を早期より示す。よって、SAMマウスは脳の老化と免疫系の老化がどのように相互に関係するのかを知るために有用である。とりわけ、脳組織微小環境を調節する機構として、髄膜・脈絡叢に展開する免疫系が近年注目されており、その加齢変化を解明することが、脳の老化の原理を探る基礎研究のひとつの方向であろう。

キーワード: brain aging, microglia, cytokine, immunosenescence, meninx

1. 脳の老化と炎症性サイトカイン

老化は、生体組織に損傷が蓄積された結果、恒常性が破綻した状態と考えられ、その背景として免疫系の異常は重要である[1-2]。健全な老化の過程では脳におけるニューロンの脱落は軽度である。しかし、個々のニューロンでは複雑に発達した樹状突起が退縮し、スパインが脱落することによってシナプスが減少する。とりわけ前頭皮質ニューロンのこうした退行性変化の結果、認知機能が低下する[3-5]。脳はかつて免疫系から隔絶された特権器官と見做されていたが、いまでは脳と免疫系とは積極的に相互作用し合うと考えられるようになってきている。例えば、炎症反応が末梢組織に惹起されると、脳組織内にインターロイキン(IL)-1、IL-6、tumor necrosis factor (TNF)- α 、プロスタグランジンなどの炎症性メディエーター産生が亢進する。この状態では、脳と免疫系のバランスが崩れ、ニューロンの過興奮、ホルモン異常、神経栄養因子の低下、神経新生の阻害などが生じ、高次機能低下が引き起こされる[6]。脳実質内では、骨髄単球系を起源とするミクログリアのみならず、アストロサイトやニューロンといった神経外胚葉由来の細胞が、種々のサイトカインを介した細胞間相互作用を行うことが分かってきた。サイトカイン環境の加齢変化として、IL-6に代表される炎症性サイトカインが海馬・大脳皮質で上昇する[7]一方、IL-10に代表される抗炎症性サイトカインは減少する[8]。従って、老化脳組織は一種の炎症性微

小環境を形成した、いわゆる“neuro-inflammation”の状態にあると考えられる[9-12]。この状態では“prime”されたミクログリアが炎症性刺激に過剰に反応することから、ミクログリアが神経傷害性に作用すると考えられてきた。一方、ミクログリアは健常脳においては脳組織を保護する機能を有すること[13]を重視し、ヒト老人脳に存在するミクログリアが突起の退行した形態変化 (microglial dystrophy)を示すことなどから、ミクログリアが加齢によって神経保護機能を失うことで神経変性が進行すると思える説がある[14-16]。

2. SAMマウスの老化に伴う脳の変化

老化促進モデルマウス (Senescence-Accelerated Mouse, SAM) は京都大学の竹田 (現SAM研究協議会会長) らによって開発された一群の近交系マウスであり、促進老化・短寿命を特徴とするSAMP系統群 (Pは老化に対してproneの意) と、通常老化・長寿命を示すSAMR系統群 (Rは老化に対してresistantの意) とに2大別される。現在市販にて入手可能な系統は、SAMPとして4つの近交系 (SAMP1、SAMP6、SAMP8、SAMP10) およびSAMRとして1つの近交系 (SAMR1) であり、SAM研究協議会 (<http://samrc.md.shinshu-u.ac.jp/firste.html>) を通じて研究者へ供与されている。

著者らはSAMの中から、脳の老化を研究するためのモデルとしてSAMP10系を樹立した。SAMP10マウスは他のSAMP系統と共通した促進老化・短寿命の形質を示すと同時に、この系統に特有な脳の老化関連病態を自然発症する。例えば、SAMP10マウスの脳は加齢とともに萎縮し[17-18]、大脳皮質ではニューロンの樹状突起の退縮とスパインの減少が進行する[19]。シナプスの加齢による減少は顕著で[20]、学習課題の成績は低下する

連絡先: 〒480-0392

愛知県春日井市神屋町713-8

TEL: 0568-88-0811 内線3521

FAX: 0568-88-0829

E-mail: ats7@inst-hsc.jp

[21-24]。変性の病理組織像として、ニューロンの核内にDNA損傷[25]、細胞質内にユビキチン化封入体(図1)[26]が蓄積する。これらはヒトの加齢変化で見られる脳の変化に類似している[5, 27]。

SAMP10マウスは国内外の多くの研究者に利用されてきた。情動の異常として、動機付けの欠如および鬱的傾向[22]、社会的ストレスによる視床下部・下垂体・副腎皮質系を介した扁桃体の抑制[28]などが報告されている。また、神経伝達物質[23-24, 29]および神経栄養因子[30-31]の異常、扁桃体ニューロンの電気生理学的異常[32]が知られている。遺伝子・分子レベルでの検討としては、fibroblast growth factor 1の遺伝子異常[33]、海馬苔状線維のシナプス終末部における亜鉛含量および亜鉛トランスポーター発現の減少[34]、大脳皮質の膜画分におけるスフィンゴミエリナーゼ活性の上昇[35]、perineuronal netを構成するコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの発現低下[36]、細胞骨格系タンパク質のリン酸化の亢進[37]などが示されている。老化との関連性がよく知られている酸化ストレスおよび窒素化ストレスについては、SAMP1、SAMP8、SAMP10系の種々の組織で酸化・窒素化ストレスの亢進を示すデータが蓄積されている[38-40]。SAMマウスの脳に加齢変化は他の総説にも詳しい[41-43]。

3. SAMP10マウスの脳内サイトカインとミクログリア

酸化・窒素化ストレスの亢進は脳組織に炎症性微小環境を誘導する可能性がある。10ヵ月齢のSAMP8マウスの海馬ではIL-1のmRNAが、海馬および大脳皮質ではTNF- α およびIL-6が、それぞれ同月齢のSAMR1マウスに比して発現亢進していることが報告された[44]。我々は各月齢のSAMP10マウスの前頭皮質を用いて、各種サイトカインのmRNAレベルを同月齢のSAMR1マウスと比較検討した結果、IL-1 β 、IFN- γ 、IL-6に代表される炎症性サイトカインは、SAMP10マウスで亢進していることを報告した[45]。従って、SAMP10マウスにおいても、“neuro-inflammation”が神経変性の背景に存在する可能性が考えられる。

海馬におけるミクログリアの加齢に伴う形態変化をSAMP10とSAMR1マウスで比較検討した結果、3ヵ月および8ヵ月齢のSAMP10マウスのミクログリアでは、突起の総延長が短い、枝分かれの数が少ないといった、SAMR1マウスのミクログリアでは14ヵ月齢以降の高齢で現れる特徴を、既に3ヵ月齢から示した(図2)[46-47]。さらに、突起のビーズ状変化などの異常構造の割合もSAMP10マウスでは3ヵ月齢から多く見られ、14ヵ月齢のSAMR1よりも高頻度であった。SAMP10マウスにおけるミクログリアの退行性変化は、ニューロン樹状突起の退縮が明らかとなるより早期の

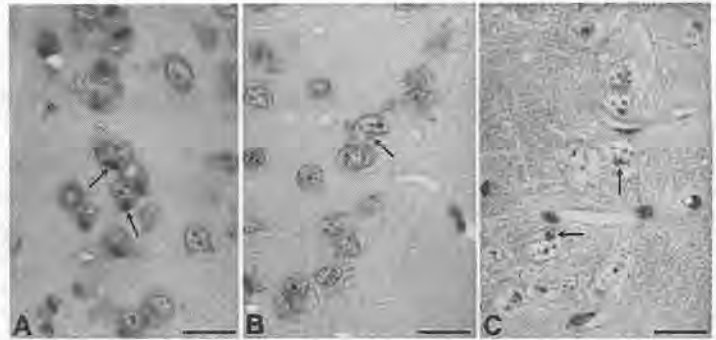


図1. 老齢マウスに見られるニューロン細胞質内ユビキチン化封入体
17ヵ月齢SAMP10マウスの嗅野におけるニューロン細胞質内封入体をユビキチンに対する免疫組織学的染色にて検出した図(A)。この封入体はHE染色では目立たないが(B)、PAS染色に陽性である(C)。スケール・バーは20 μ m。(reproduction of copyrighted material permitted by John Wiley and Sons [引用文献26], License ID 2814080202186, Copyright Clearance Center)

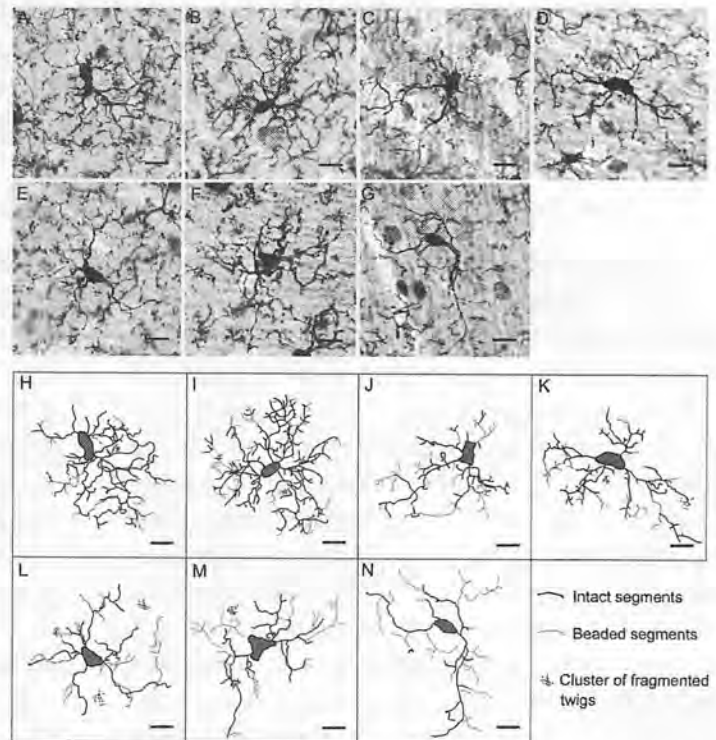


図2. マウスに見られるミクログリア形態の加齢変化
(A-G) Iba-1に対する免疫組織化学的染色にて海馬におけるミクログリアを特異的に染色した。3、8、14、24ヵ月齢のSAMR1マウス(それぞれ、A、B、C、D)と3、8、14ヵ月齢のSAMP10マウス(それぞれ、E、F、G)の比較。(H-N) ミクログリアの全体像を描画装置を用いて記録した図。HからKの描画およびLからNの描画は、それぞれAからDの細胞およびEからGの細胞に対応。実線は健全なセグメント、点線はビーズ状の病的なセグメント、小点の集合は断片化突起のクラスターを表す。スケール・バーは10 μ m。(reproduction of copyrighted material permitted by John Wiley and Sons [引用文献47], License ID 2814450035433, Copyright Clearance Center)

3ヵ月齢には既に生じていることから、このマウスに生じる神経変性の原因のひとつとしてミクログリアの機能異常が考えられる。

4. 海馬損傷に対する応答としてのサイトカイン発現の意義

グルタミン酸受容体作動薬で興奮毒性を有するカイニン酸(KA)をマウスに投与すると、主として海馬CA3領

域の錐体細胞が細胞死を起こし、投射先であるCA1領域の錐体細胞は二次的に樹状突起の変性を来す。この実験系で、KA投与3日後の細胞死を免れる海馬CA1領域に多数出現するミクログリアは、ニューロンとの細胞間接触を増やした特徴的な形態を有し、非貪食性の活性化状態にある[48]。我々はDNAマイクロアレイおよび定量的リアルタイムRT-PCRを用いた網羅的遺伝子発現解析を行い、KA投与3日後のSAMR1マウスの海馬で発現が上昇する遺伝子を検索した結果、Ifng, Spp1, Ccl3, Cxcl10, Cd44, Socs3, Csf2, Ccl4, および Osmr遺伝子(順に、IFN- γ 、osteopontin (OPN)、macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α 、chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (CXCL10)、CD44、suppressor of cytokine signaling 3、granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)、MIP-1 β 、およびoncostatin M-specific receptorをコードしている)の発現が亢進することを示した[49]。IFN- γ およびGM-CSFは非貪食性活性化ミクログリアが発現し、IFN- γ 受容体、CXCL10、MIP-1 α はアストロサイトが発現する。OPNの発現はニューロビル全域で著明に発現亢進し、とりわけ、非貪食性活性化ミクログリアはOPNを強発現する。OPN受容体の一種であるCD44は海馬全域で劇的に増加し、ニューロン樹状突起が発現する[49]。この結果とサイトカイン機能に関する過去の知見とを統合すると、SAMR1マウスの損傷を受けた海馬では、ミクログリアが分泌するIFN- γ がIFN- γ 受容体を介してアストロサイトを活性化し、アストロサイトにCXCL10産生を促す、CXCL10はアストロサイトからのMIP-1 α 分泌を促し、自身が分泌するGM-CSFによってプライムされたミクログリアをリクルートすると考えられる(図3)[49]。さらに、OPN・CD44系が神経組織の保護・修復に関わることを考慮すると、KA投与3日後のSAMR1マウスの海馬は、急性期に受けた損傷からニューロンおよび神経回路を保護する仕組みの構築を指向していると考えられる。

5. SAMP10マウスにおけるサイトカインを介したグリア・ニューロン間相互作用の欠如

KAをSAMP10マウスに投与すると、海馬ニューロンにはSAMR1マウスで見られたのと同様の細胞死と細胞変性が生じる。それにも関わらず、KA投与3日後のSAMP10マウスの海馬において、ミクログリア、アストロサイト、ニューロンが示すサイトカインおよびその受容体を介した応答は極めて微弱である[49]。KA投与3日後のSAMP10マウスの海馬では、Ifng, Spp1, Ccl3, Cxcl10, Cd44, Socs3, Csf2, Ccl4, Osmrの遺伝子発現が上昇しない。従って、ミクログリアに発現すべきIFN- γ と、アストロサイトに発現すべきIFN- γ 受容体によって惹起される一連のサイトカイン応答が成立しない。OPN・CD44の発現上昇も海馬全体で微弱なものであり、SAMP10マウスの海馬では、神経保護を指向したサイト

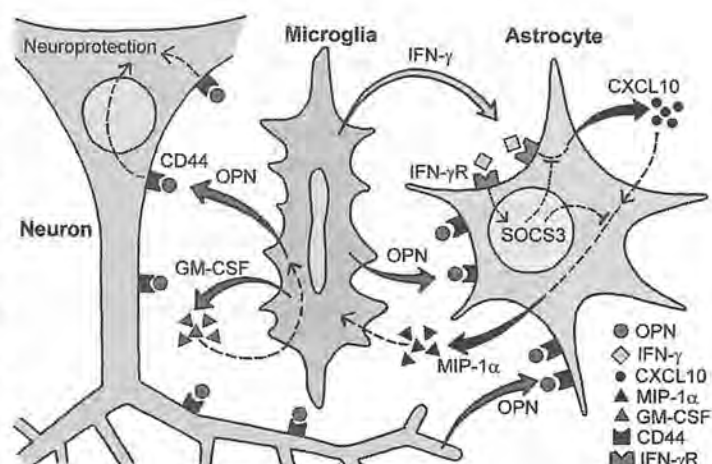


図3. 損傷後のマウス海馬に見られるサイトカインを介したグリア・ニューロン間ネットワークの構築

SAMR1マウスの海馬では、興奮毒性損傷の後にミクログリア・アストロサイト・ニューロンの間にサイトカインを介した細胞間コミュニケーションが構築される。実線矢印は実験的に証明された経路、破線矢印は文献に基づく仮説的な経路。略号: CXCL10, chemokine (C-X-C motif) ligand 10; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IFN- γ , interferon-gamma; IFN- γ R, interferon-gamma receptor; MIP-1 α , macrophage inflammatory protein-1 alpha; OPN, osteopontin; SOCS3, suppressor of cytokine signaling 3. (reproduction of copyrighted material permitted by Elsevier [引用文献49], License ID 2814440884719, Copyright Clearance Center)

カインを介するグリア・ニューロン間ネットワークが構築されない。その結果、KA投与30日を経たSAMP10マウスの海馬では錐体細胞層および放線状層が萎縮する。これはSAMR1マウスの海馬が萎縮を免れるのとは対照的である。SAMP10マウスでは、ミクログリアが主導する神経組織の保護機能に欠陥があることを示唆する興味深い実験結果である[49]。

6. SAMマウスにおける免疫系の老化

SAMP10マウスを用いて全身の免疫機能を調べた研究はさほど多くないが、類縁近交系で促進老化を示すSAMP1マウスの免疫機能は多くの免疫学者によって調べられてきた。SAMP1マウスでは、正常老化を示すSAMR1マウスに比べて、胸腺萎縮が早期から生じ、末梢血中のCD4⁺T細胞数およびCD4/CD8比が早期より減少する[50]。また、自己抗体が5ヵ月齢頃より検出される[51]。細野らは、SAMP1マウスでは*in vivo*における抗ヒツジ赤血球抗体産生能が低下していることを示し[52]、細川らは、SAMP1マウスの脾臓細胞を用いた*in vitro*の系で、T細胞依存性および非依存性抗原に対する抗体産生能やナチュラルキラー細胞活性が、同月齢のSAMR1マウスに比べて低いことを報告した[53-54]。西村らは、SAMP1マウスの脾臓由来のCD4⁺T細胞ではIL-2産生の持続時間が著明に短縮していたことから、免疫応答の際に抗原特異的なT細胞の増殖を促す作用がSAMP1マウスでは低いと考えている[55]。細川らは、Th1サイトカインであるインターフェロン(IFN)- γ と、Th2サイトカインであるIL-4の産生能をSAMP1マウスとC3H/Heマウスとで比較した結果から、SAMP1マウスではTh2細胞の活性に障害があると考えている[56]。抗

原提示細胞 (APC) の機能については、老齢SAMP1マウスから調整した樹状細胞 (dendritic cell, DC) およびB細胞は、同月齢のBALB/cマウスや若齢SAMP1マウスに比して活性が低い[57]。SAMP1マウスにインフルエンザAウイルス[58]および呼吸器合胞体 (RS) ウイルス[59]を感染させた場合の死亡率は高く、肺におけるウイルス感染が遅延する。SAMP1系を用いて報告されてきたこのような免疫系の異常の一部はSAMP8系でも認められており、SAMP10系にも同様の免疫系異常があるものと推測される[56]。

7. 脳と免疫系の接点

SAMP10マウスに見られるミクログリアの異常に関与する脳内微小環境の変化を解明するために、脳実質が炎症性サイトカインを産生する経路を明らかにすることは重要である。これまで、末梢の炎症性サイトカインがどのように免疫系と脳の相互作用を開始させるかに関しては、感染の過程を中心に研究されて来た。Lipopolysaccharide (LPS) もしくは炎症性サイトカインを末梢に投与すると、脳内の特定の部位でIL-1 β 、IL-6、およびTNF- α の発現が亢進する[60-61]。この実験系において、LPS投与8時間後にはIL-1 β を発現するマクロファージ/ミクログリアが髄膜、脈絡叢、血管周囲腔、脳室周囲器官に増加する[62]。髄膜・脈絡叢・血管周囲腔は、発生的にひとつながりの空間を形成し、これが脳と免疫系のインターフェイスのひとつとなっていると考えられる。脳の血管周囲細胞は、末梢の炎症性刺激にตอบสนองしてサイトカインを発現し[62]、脳の炎症性病態においては神経組織の損傷や細胞死を感知するAPCとして機能するほか、末梢組織の損傷、サイトカイン、エンドトキシンを感知する[63]。さらに、血管周囲細胞は末梢のIL-1刺激にตอบสนองし、プロスタグランジンを通じて、視床下部・下垂体・副腎系の反応を開始させる一方、抗炎症作用を発揮して血管内皮の応答を抑制する機能を併せ持つ[64]。

マウスの髄膜・脈絡叢にはマクロファージおよび樹状細胞 (DC) が常在し、脈絡叢間質はミエロイド系前駆細胞のニッチとしてマクロファージの供給源となる[65]。髄膜・脈絡叢のマクロファージ/DCは免疫サーベイランス機能を有する。Chinneryらは骨髄キメラを用いた実験を行い、骨髄由来マクロファージ/DCは、成体マウスの髄膜においては4週間程度で新規細胞に置換され、脈絡叢においては8週間程度で置換されると報告した[66]。Prodingerらは、DCは脳室周囲およびその近傍の白質線維束に分布し、血管周囲腔に隣接する脳実質側へと進入することを示した[67]。こうしたDCは突起の一部を血管周囲のグリア境界へと伸ばしていることから、脳内抗原を血管周囲のT細胞へ提示できると考えている[67]。DCの発見によって2011年ノーベル生理学・医学賞を受賞したRalph M. Steinman博士と共同研究を行ったRockefeller大学のグループは、表面分子・転写因子・パターン認識受容体などの遺伝子発現、細胞形態、抗原提示能、および発生過程でのFlt3リガンド要求性を解析することによって、マウス健康脳の髄膜・脈絡叢に常在す

るDCは、脾臓のDCとの間に緊密な類似性がある一方、単球やミクログリアとは異なっていることを明らかにした[68]。また、髄膜・脈絡叢DCは骨髄に由来し血中を移動するpre-DC (前駆細胞) から発生し、5~7日の半減期を有することを示した。

髄膜・脈絡叢に展開する免疫系(meningeal immunity)の極めて興味深い機能として、Kipnisらのグループは、マウスが認知課題を遂行する際に、髄膜・脈絡叢へとT細胞が集積することを示した[69]。これに対し、T細胞を欠損するマウスでは学習・記憶能が低下していること、そのマウスにT細胞を補充すると学習・記憶能が向上することを示した[70]。

このように、髄膜・脈絡叢においてミエロイド系細胞を主体として構築されるmeningeal immunityが、脳と末梢免疫系が出会うインターフェイスを構成する可能性が予想できる。しかし、末梢の免疫系に生じた刺激や変化が、このインターフェイスを介して、どのように脳実質へ伝達されるのかについては、今後解明すべき研究課題である。SAMPマウスでは末梢免疫系の機能が低下していることから、meningeal immunityにも何らかの異常を来たしていると予想する。今後、SAMP10マウスを用いた研究により、どのような細胞間相互作用、媒介分子、反応経路などが関与して、末梢の免疫系に生じた異常が脳実質内の細胞へと伝えられ、脳内微小環境を変化させるのかというメカニズムが解明されることを期待する。そうした研究成果から、我々は、免疫系の加齢に伴う機能低下が、脳組織恒常性の破綻を誘発し、神経変性へと至る過程を知ることになるであろう。

引用文献

1. Kirkwood TB. Understanding the odd science of aging. *Cell* 120:437-447, 2005.
2. Ron-Harel N, Schwartz M. Immune senescence and brain aging: can rejuvenation of immunity reverse memory loss? *Trends Neurosci* 32:367-375, 2009.
3. Barnes CA. Normal aging: regionally specific changes in hippocampal synaptic transmission. *Trends Neurosci* 17:13-18, 1994.
4. Duan H, Wearne SL, Rocher AB, Macedo A, Morrison JH, Hof PR. Age-related dendritic and spine changes in corticocortically projecting neurons in macaque monkeys. *Cereb Cortex* 13:950-961, 2003.
5. Dickstein DL, Kabaso D, Rocher AB, Luebke JI, Wearne SL, Hof PR. Changes in the structural complexity of the aged brain. *Aging Cell* 6:275-284, 2007.
6. Yirmiya R, Goshen I. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain Behav Immun* 25:181-213, 2011.
7. Ye SM, Johnson RW. Increased interleukin-6 expression by microglia from brain of aged

- mice. *J Neuroimmunol* 93:139-148, 1999.
8. Ye SM, Johnson RW. An age-related decline in interleukin-10 may contribute to the increased expression of interleukin-6 in brain of aged mice. *Neuroimmunomodulation* 9:183-192, 2001.
 9. Johnson RW, Godbout JP: Aging, Neuroinflammation, and Behavior. In: *Psychoneuroimmunology*, 4th edn. edited by Ader R. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2007, p. 379-391.
 10. Sparkman NL, Johnson RW. Neuroinflammation associated with aging sensitizes the brain to the effects of infection or stress. *Neuroimmunomodulation* 15:323-330, 2008.
 11. Lucin KM, Wyss-Coray T. Immune activation in brain aging and neurodegeneration: too much or too little? *Neuron* 64:110-122, 2009.
 12. Perry VH. Contribution of systemic inflammation to chronic neurodegeneration. *Acta Neuropathol* 120:277-286, 2010.
 13. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308:1314-1318, 2005.
 14. Streit WJ, Sammons NW, Kuhns AJ, Sparks DL. Dystrophic microglia in the aging human brain. *Glia* 45:208-212, 2004.
 15. Conde JR, Streit WJ. Microglia in the aging brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:199-203, 2006.
 16. Streit WJ, Xue Q-S. The brain's aging immune system. *Aging Dis* 1:254-261, 2010.
 17. Shimada A, Ohta A, Akiguchi I, Takeda T. Inbred SAM-P/10 as a mouse model of spontaneous, inherited brain atrophy. *J Neuropathol Exp Neurol* 51:440-450, 1992.
 18. Shimada A, Hosokawa M, Ohta A, Akiguchi I, Takeda T. Localization of atrophy-prone areas in the aging mouse brain: Comparison between the brain atrophy model SAM-P/10 and the normal control SAM-R/1. *Neuroscience* 59:859-869, 1994.
 19. Shimada A, Tsuzuki M, Keino H, Satoh M, Chiba Y, Saitoh Y, Hosokawa M. Apical vulnerability to dendritic retraction in prefrontal neurons of ageing SAMP10 mouse: a model of cerebral degeneration. *Neuropathol and Appl Neurobiol* 32:1-14, 2006.
 20. Shimada A, Keino H, Satoh M, Kishikawa M, Hosokawa M. Age-related loss of synapses in the frontal cortex of SAMP10 mouse: A model of cerebral degeneration. *Synapse* 48:198-204, 2003.
 21. Shimada A, Ohta A, Akiguchi I, Takeda T. Age-related deterioration in conditional avoidance task in the SAM-P/10 mouse, an animal model of spontaneous brain atrophy. *Brain Res* 608:266-272, 1993.
 22. Miyamoto M. Characteristics of age-related behavioral changes in senescence-accelerated mouse SAMP8 and SAMP10. *Exp Gerontol* 32:139-148, 1997.
 23. Okuma Y, Murayama T, Tha KK, Yamada C, Hosokawa M, Ishikawa A, Watanabe R, Maekawa M, Nomura Y. Learning deficiency and alterations in acetylcholine receptors and protein kinase C in the brain of senescence-accelerated mouse (SAM)-P10. *Mech Ageing Dev* 114:191-199, 2000.
 24. Onodera T, Watanabe R, Tha KK, Hayashi Y, Murayama T, Okuma Y, Ono C, Oketani Y, Hosokawa M, Nomura Y. Depressive behavior and alterations in receptors for dopamine and 5-hydroxytryptamine in the brain of the senescence accelerated mouse (SAM)-P10. *Jpn J Pharmacol* 83:312-318, 2000.
 25. Shimada A, Keino H, Satoh M, Kishikawa M, Seriu N, Hosokawa M. Age-related progressive neuronal DNA damage associated with cerebral degeneration in a mouse model of accelerated senescence. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 57:B415-421, 2002.
 26. Shimada A, Keino H, Kawamura N, Chiba Y, Hosokawa M. Limbic structures are prone to age-related impairments in proteasome activity and neuronal ubiquitinated inclusions in SAMP10 mouse: a model of cerebral degeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol* 34:33-51, 2008.
 27. 島田厚良, 河村則子, 慶野裕美, 衛佐, 千葉陽一, 齋藤優子, 細川昌則. SAMマウスにおける脳の老化・変性パターンとユビキチン・プロテアソーム系の関与. *基礎老化研究* 29(4):17-21, 2005.
 28. Chida Y, Sudo N, Mori J, Kubo C. Social isolation stress impairs passive avoidance learning in senescence-accelerated mouse (SAM). *Brain Res* 1067:201-208, 2006.
 29. Nie K, Yu JC, Fu Y, Cheng HY, Chen FY, Qu Y, Han JX. Age-related decrease in constructive activation of Akt/PKB in SAMP10 hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun* 378:103-107, 2009.
 30. Ohnishi K, Tomimoto H, Akiguchi I, Seriu N, Kawamata T, Nakamura S, Kimura J, Nishio

- T, Higuchi K, Hosokawa M. Age-related decrease of nerve growth factor-like immunoreactivity in the basal forebrain of senescence-accelerated mice. *Acta Neuropathol* 90:11-16, 1995.
31. Miyazaki H, Okuma Y, Nomura J, Nagashima K, Nomura Y. Age-related alterations in the expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in the senescence-accelerated mouse brain. *J Pharmacol Sci* 92:28-34, 2003.
 32. Nakanishi H, Miyazaki M, Takai N, Wang HD, Yamamoto T, Watanabe S, Yamamoto K. Hyperexcitability of amygdala neurons of senescence-accelerated mouse revealed by electrical and optical recordings in an in vitro slice preparation. *Brain Res* 812:142-149, 1998.
 33. Carter TA, Greenhall JA, Yoshida S, Fuchs S, Helton R, Swaroop A, Lockhart DJ, Barlow C. Mechanisms of aging in senescence-accelerated mice. *Genome Biol* 6:R48, 2005.
 34. Saito T, Takahashi K, Nakagawa N, Hosokawa T, Kurasaki M, Yamanoshita O, Yamamoto Y, Sasaki H, Nagashima K, Fujita H. Deficiencies of hippocampal Zn and ZnT3 accelerate brain aging of Rat. *Biochem Biophys Res Commun* 279:505-511, 2000.
 35. Kim SS, Kang MS, Choi YM, Suh YH, Kim DK. Sphingomyelinase activity is enhanced in cerebral cortex of senescence-accelerated mouse-P/10 with advancing age. *Biochem Biophys Res Commun* 237:583-587, 1997.
 36. Saitoh Y, Matsui F, Chiba Y, Kawamura N, Keino H, Satoh M, Kumagai N, Ishii S, Yoshikawa K, Shimada A, Maeda N, Oohira A, Hosokawa M. Reduced expression of MAb6B4 epitopes on chondroitin sulfate proteoglycan aggrecan in perineuronal nets from cerebral cortices of SAMP10 mice: a model for age-dependent neurodegeneration. *J Neurosci Res* 86:1316-1323, 2008.
 37. Furukawa A, Oikawa S, Hasegawa-Ishii S, Chiba Y, Kawamura N, Takei S, Yoshikawa K, Hosokawa M, Kawanishi S, Shimada A. Proteomic analysis of aging brain in SAMP10 mouse: a model of age-related cerebral degeneration. *Mech Ageing Dev* 131:379-388, 2010.
 38. Unno K, Takabayashi F, Kishido T, Oku N. Suppressive effect of green tea catechins on morphologic and functional regression of the brain in aged mice with accelerated senescence (SAMP10). *Exp Gerontol* 39:1027-1034, 2004.
 39. Sasaki T, Unno K, Tahara S, Shimada A, Chiba Y, Hoshino M, Kaneko T. Age-related increase of superoxide generation in the brains of mammals and birds. *Aging Cell* 7:459-469, 2008.
 40. Chiba Y, Shimada A, Kumagai N, Yoshikawa K, Ishii S, Furukawa A, Takei S, Sakura M, Kawamura N, Hosokawa M. The senescence-accelerated mouse (SAM): a higher oxidative stress and age-dependent degenerative diseases model. *Neurochem Res* 34:679-687, 2009.
 41. Shimada A. Age-dependent cerebral atrophy and cognitive dysfunction in SAMP10 mice. *Neurobiol Aging* 20:125-136, 1999.
 42. Takeda T. Senescence-accelerated mouse (SAM) with special references to neurodegeneration models, SAMP8 and SAMP10 mice. *Neurochem Res* 34:639-659, 2009.
 43. Shimada A, Hasegawa-Ishii S. Senescence-accelerated Mice (SAMs) as a Model for Brain Aging and Immunosenescence. *Aging Dis* 2:414-436, 2011.
 44. Tha KK, Okuma Y, Miyazaki H, Murayama T, Uehara T, Hatakeyama R, Hayashi Y, Nomura Y. Changes in expressions of proinflammatory cytokines IL-1beta, TNF-alpha and IL-6 in the brain of senescence accelerated mouse (SAM) P8. *Brain Res* 885:25-31, 2000.
 45. Kumagai N, Chiba Y, Hosono M, Fujii M, Kawamura N, Keino H, Yoshikawa K, Ishii S, Saitoh Y, Satoh M, Shimada A, Hosokawa M. Involvement of pro-inflammatory cytokines and microglia in an age-associated neurodegeneration model, the SAMP10 mouse. *Brain Res* 1185:75-85, 2007.
 46. 石井さなえ, 千葉陽一, 梅垣宏行, 井口昭久, 河村則子, 吉川圭介, 古川絢子, 武井史郎, 細川昌則, 島田厚良. 加齢性神経変性に対するミクログリアの機能解明にむけて. *基礎老化研究* 32(4):21-24, 2008.
 47. Hasegawa-Ishii S, Takei S, Chiba Y, Furukawa A, Umegaki H, Iguchi A, Kawamura N, Yoshikawa K, Hosokawa M, Shimada A. Morphological impairments in microglia precede age-related neuronal degeneration in senescence-accelerated mice. *Neuropathology* 31:20-28, 2011.
 48. Hasegawa S, Yamaguchi M, Nagao H, Mishina M, Mori K. Enhanced cell-to-cell contacts between activated microglia and pyramidal cell dendrites following kainic acid-induced neurotoxicity in the hippocampus. *J Neuroimmunol* 186:75-85, 2007.
 49. Hasegawa-Ishii S, Takei S, Inaba M, Umegaki H, Chiba Y, Furukawa A, Kawa-

- mura N, Hosokawa M, Shimada A. Defects in cytokine-mediated neuroprotective glial responses to excitotoxic hippocampal injury in senescence-accelerated mouse. *Brain Behav Immun* 25:83-100, 2011.
50. Toichi E, Hanada K, Hosono M, Hosokawa T, Hosokawa M, Baba M, Imamura S, Takeda T: Early decline of T cell function in humoral immunity and long-lasting inflammatory T cell activity in aging SAM mice. In: *The SAM model of senescence*, edited by Takeda T. Amsterdam: Excerpta Medica, 1994, p. 175-178.
 51. Yoshioka H, Yoshida H, Doi T, Muso E, Ohshio G, Higuchi K, Inada M, Miyake T, Kita T, Hamashima Y, et al. Autoimmune abnormalities in a murine model of accelerated senescence. *Clin Exp Immunol* 75:129-135, 1989.
 52. Hosono M, Hanada K, Toichi E, Naiki H, Higuchi K, Hosokawa T. Immune abnormality in relation to nonimmune diseases in SAM mice. *Exp Gerontol* 32:181-195, 1997.
 53. Hosokawa T, Hosono M, Higuchi K, Aoike A, Kawai K, Takeda T. Immune responses in newly developed short-lived SAM mice. I. Age-associated early decline in immune activities of cultured spleen cells. *Immunology* 62:419-423, 1987.
 54. Hosokawa T, Hosono M, Hanada K, Aoike A, Kawai K, Takeda T. Immune responses in newly developed short-lived SAM mice. Selectively impaired T-helper cell activity in in vitro antibody response. *Immunology* 62:425-429, 1987.
 55. Nishimura Y, Hosokawa T, Hosono M, Baba M, Hosokawa M. Insufficient interleukin-2 production from splenic CD4+ T cells causes impaired cell proliferation and early apoptosis in SAMP1, a strain of senescence-accelerated mouse. *Immunology* 107:190-198, 2002.
 56. Hosokawa T: Immune system deficiencies in SAM. In: *The Senescence-Accelerated Mouse (SAM): An Animal Model of Senescence*, edited by Nomura Y, Takeda T, Okuma Y. Amsterdam: Elsevier, 2004, p. 41-46.
 57. Haruna H, Inaba M, Inaba K, Taketani S, Sugiura K, Fukuba Y, Doi H, Toki J, Tokunaga R, Ikehara S. Abnormalities of B cells and dendritic cells in SAMP1 mice. *Eur J Immunol* 25:1319-1325, 1995.
 58. Dong L, Mori I, Hossain MJ, Kimura Y. The senescence-accelerated mouse shows aging-related defects in cellular but not humoral immunity against influenza virus infection. *J Infect Dis* 182:391-396, 2000.
 59. Liu B, Kimura Y. Local immune response to respiratory syncytial virus infection is diminished in senescence-accelerated mice. *J Gen Virol* 88:2552-2558, 2007.
 60. Ban E, Haour F, Lenstra R. Brain interleukin 1 gene expression induced by peripheral lipopolysaccharide administration. *Cytokine* 4:48-54, 1992.
 61. Laye S, Parnet P, Goujon E, Dantzer R. Peripheral administration of lipopolysaccharide induces the expression of cytokine transcripts in the brain and pituitary of mice. *Brain Res Mol Brain Res* 27:157-162, 1994.
 62. van Dam AM, Brouns M, Louisse S, Berkenbosch F. Appearance of interleukin-1 in macrophages and in ramified microglia in the brain of endotoxin-treated rats: a pathway for the induction of non-specific symptoms of sickness? *Brain Res* 588:291-296, 1992.
 63. Williams K, Alvarez X, Lackner AA. Central nervous system perivascular cells are immunoregulatory cells that connect the CNS with the peripheral immune system. *Glia* 36:156-164, 2001.
 64. Serrats J, Schiltz JC, Garcia-Bueno B, van Rooijen N, Reyes TM, Sawchenko PE. Dual roles for perivascular macrophages in immune-to-brain signaling. *Neuron* 65:94-106, 2010.
 65. Nataf S, Strazielle N, Hatterer E, Mouchiroud G, Belin MF, Ghersi-Egea JF. Rat choroid plexuses contain myeloid progenitors capable of differentiation toward macrophage or dendritic cell phenotypes. *Glia* 54:160-171, 2006.
 66. Chinnery HR, Ruitenber MJ, McMennamin PG. Novel characterization of monocyte-derived cell populations in the meninges and choroid plexus and their rates of replenishment in bone marrow chimeric mice. *J Neuro Pathol Exp Neurol* 69:896-909, 2010.
 67. Prodinge C, Bunse J, Kruger M, Schiefen-hovel F, Brandt C, Laman JD, Greter M, Immig K, Heppner F, Becher B, Bechmann I. CD11c-expressing cells reside in the juxtavascular parenchyma and extend processes into the glia limitans of the mouse nervous system. *Acta Neuropathol* 121:445-458, 2011.
 68. Anandasabapathy N, Victoria GD, Meredith M, Feder R, Dong B, Kluger C, Yao K, Dustin ML, Nussenzweig MC, Steinman RM, Liu K. Flt3L controls the development of radiosensitive dendritic cells in the meninges and chor-

- oid plexus of the steady-state mouse brain. *J Exp Med* 208:1695-1705, 2011.
69. Brynskikh A, Warren T, Zhu J, Kipnis J. Adaptive immunity affects learning behavior in mice. *Brain Behav Immun* 22:861-869, 2008.
70. Derecki NC, Cardani AN, Yang CH, Quinnes KM, Carihfield A, Lynch KR, Kipnis J. Regulation of learning and memory by meningeal immunity: a key role for IL-4. *J Exp Med* 207:1067-1080, 2010.

Senescence-accelerated mouse (SAM) revisited from the viewpoint of brain-immune interaction

Atsuyoshi Shimada and Sanae Hasegawa-Ishii

Department of Pathology, Institute for Developmental Research, Aichi Human Service Center

The Senescence-Accelerated Mouse (SAM) represents a group of inbred mouse strains developed as a model for the study of aging. Senescence-prone SAMP strains have a short life span and exhibit an early onset of age-related decline in physiological functions. SAMP10 mice undergo age-related changes in the brain such as brain atrophy, loss of neurons, retraction of cortical neuronal dendritic arbors, loss of dendritic spines, loss of synapses, impaired learning and memory, accumulation of neuronal DNA damage, neuronal ubiquitinated inclusions, reduced hippocampal cholinergic receptors, decreased neurotrophic factors, and elevated oxidative-nitrative stress. SAMP strains exhibit an early onset of age-related decline in the peripheral immunity such as thymic involution, impaired helper T cell function, decreased antibody-forming capacity, dysfunction of antigen-presenting cells, and susceptibility to virus infection. Recent data indicating increased pro-inflammatory cytokines in the brains of SAMP10 mice are directing investigators toward an integration of neural and immune abnormalities to enhance understanding of the principles of brain aging. We highlight how mouse brain cells adopt cytokine-mediated responses and how SAMP10 mice are defective in these responses. SAMP10 model would be useful to study how age-related disturbances in peripheral immunity have an impact on dysregulation of brain tissue homeostasis, resulting in age-related neurodegeneration.

Keywords: brain aging, microglia, cytokine, immunosenescence, meninx

【トピックス】

マイクロアレイを使って老化トランスクリプトームのアトラスを作成するために

小西 智一

秋田県立大学

ゲノムは遺伝する生命情報を保持しているが、その情報がはじめて物として形になる段階がトランスクリプトーム（細胞に含まれているRNAのコンテンツ、mRNAとncRNAから成る）である。それぞれのトランスクリプトは細胞ごとに異なる量だけ存在し、あるいは生理条件で変化し、また周期的にも変化する。この量の調整が、遺伝情報が適切に「発現」するためには重要である。逆に、その量を網羅的に測ることで、組織の状態や、細胞の機能を推定できる。たとえば老化について、この組織ではどんなことがおきているだろう、おなじ変化は別の組織でもおこるのか、組織間の共通性と相違点はどこにあるのだろう、といったことを多くの遺伝子を使って調べることができる。

発現型マイクロアレイを使えば、研究対象のトランスクリプトームの状態を隅々まで俯瞰して見ることができる。オミックス研究の本質は、情報が物質になり相互関係をもち複雑化していく過程を定量的に調べることにある。しかし、現時点でこれが網羅的に観察できるのは（測定対象が生化学的に均質である）トランスクリプトームだけだ。測定方法には他にもリアルタイムPCRやRNA-seqなどがあるが、本稿の執筆時点で現実的な選択肢はマイクロアレイに限られている。また精度や測定項目（スプライシングの違いが検出できるかどうか等）を考えると、実用に耐えるのはほんのわずかな種類の製品だけだ。しかし、得られるデータはただ網羅的なだけでなく正確無比、これまでにないほど高感度である上に、ほぼ任意の組み合わせで測定結果の比較・統合が可能である。データの性質がよくわかっていて、得られた知見を生物物理学のレベルで統合できるからだ。もちろんこれは、たとえばX線フィルムに焼かれたノザン法の結果には到底、不可能だったことだ。分子生物学はもともと、物理学者たちが生物学の分野に進出することで誕生した学問領域であるが、その後の長い期間、むしろ定性的なパラダイムが席卷していた。ほとんどのケースで、遺伝子発現量の増減はコントラストの不明な写真を使って説明された。それらが数値化されることは珍しく、されたとしてもその定量性・正確さには疑問があった。複数の遺伝子の発現量を定量的に比較検討することは稀だった；異なる実験系のデータを統合することは試みられな

かったし、おそらく技術的に不可能だった。マイクロアレイは、これを可能にした初めての技術だと思われる。ところが一般によく使われているデータ解析の方法は、残念ながらマイクロアレイの特性を引き出せていない。この正確で網羅的な遺伝子発現データを解析するためには、（生物物理学と同じような）定量的な議論の体系に原点回帰する必要がある。本稿ではマイクロアレイの解析方法に関する筆者の考え方を紹介したい。

1. 数理モデルによるマイクロアレイ測定データの定量的な比較の可能性について

あらゆる測定と分析には、その結果がひとまとまりの測定のなかだけで有効なもの、異なる測定との間でも比較・統合できるものがある。後者の性質を指して一般性があると言う、これは測定方法と分析方法に由来する性質である。本稿を通じて、マイクロアレイには（本来は）一般性を期待できることを示そう。この性質のおかげで、異なる実験群で得られた複数の発現量のデータを、比較検討が可能な定量解析に持ち込むことができる。

データを比較・統合するためには適切な基盤が必要で、その基盤はなんらかの数理モデルが担う。そのモデルには根拠のない仮定をおくべきでないし、モデルの反証可能性は確保されていなければならない。アドホックな（思いつきの、エビデンスのない）仮定がひとつ置かれるごとに、それが誤りであるリスクが生じる。またそうした仮定のもとでの解析は、その仮定を採らなかった別の解析結果との間に違いを生じるため、比較可能性の範囲がその仮定によって制限されてしまう。しかし遺憾ながら、マイクロアレイの解析では、アドホックなモデルがたくさんつくられて使われている。それらのモデルの仮定は検証されず、それどころか原理的に検証不能であることさえある。こうしたモデルを注意深く避けないと、データの比較と統合が困難になる。

2. マイクロアレイの度量衡

測定結果を広く比較するためには、統一された度量衡が必要だ。マイクロアレイのような「単位のない測定値」に度量衡を提供するのも数理モデルである。たとえば、あらゆる重量測定はキログラム原器との比較であるが、トランスクリプトームをこのようにSI単位系に還元できる測定方法はまだない。そこでなにか別の基準が必要になる。ここでは原器のように万国共通な物体を使うかわりに、正規分布モデルという万国共通な概念を使う。このモデルを用いるのは、正規分布が万国共通であることと、そしてマイクロアレイのデータからいつも見出さ

連絡先：〒010-0195

秋田県秋田市下新城巾野字街道端西241-438

TEL: 018-872-1603

FAX: 018-872-1677

E-mail: konishi@akita-pu.ac.jp

れてくる性質だからだ（生データから適切なバックグラウンド値を引いて対数をとると、その値は正規分布する性質を持っている[1]）。同じ基準を使うことができるのなら、その基準を使える範囲で、データは比較可能になる。

しばしば、それぞれ正規分布する複数の測定間で要素を比較するとき、測定ごとに標準化という作業を行う。生データは様々な値をとるが、それらをz標準化「(データ-サンプル平均)/サンプル標準偏差」して得たzスコアの集団は、平均ゼロ、標準偏差1の正規分布をする。こうやって標準化されたデータは比較可能である。たとえばこれは「異なる学力試験の結果を比較する」際に使われる；もしそれらの受験者の集団を同等とみなせるなら、偏差値(=zスコア×10+50)は比較可能である。

この原理を使って、測定ごとにデータの母数を測定し、標準化する。こうした流儀をパラメトリック法という。用意したモデルが実データに合わなければわかるので（たとえばデータが対数正規分布しなければ、そのことは標準化の過程で明らかになる）、モデルの反証可能性を保つことができる。ちなみにこの分布形式は、細胞がゲノムを読んでトランスクリプトームをつくりだす機構と[2]、そのサンプルからのシグナルの検出原理[3]とから演繹的に導かれるものであり、この性質はデータごとに実際に確認される。この分布形式がわかっているために、原理的にはどのデータも、他の任意のデータと比較可能である[1]（いくつかの例外を後述する、たとえば異なる種類のチップ間でのデータ比較は要注意）。またこの分布は、ノイズとシグナルを区別することにたいへん役立つ。

良いことだらけのようだが、実際にパラメータを推定する作業は簡単ではない。この困難さが、アドホックなモデルがまだ使われている一つの理由だろう。標準化作業にどんな方法を使うかは、分析者の知識、技量と誠実さが試される試金石となるのではないか。この技術の初期からずっと使われてきたのがノンパラメトリックな方法で、いまでもチップメーカーの推奨する方法はこうしたものだ。たとえばRMA (Robust Multichip Average) という方法がよく使われているが、これは「全てのデータを仮想の標準データの分布へ完全に変換する」ことによって、データ分布を揃えるという方法だ。このデータの恣意的操作の結果、検証可能性は失われ、データの信頼域を計測することもできなくなる。また改竄という点でも、灰色だと言わざるを得ない。余談だが、いわゆるドライの研究者にこの原理と問題点を指摘し、科学者がデータの恣意的な操作を忌避する理由を説明した折に、「ではどうやってRMAを補正すればノイズを除けるのでしょうか？」という質問があって驚いたことがある。一もつとも、無批判にRMAに依存してきたウエットの研究者にも、当然、責任の一端はある。

3. いかに測定データのノイズの影響を避けるか

あらゆる測定にはノイズがある。マイクロアレイの場合、主に二種類の発生源がある。ひとつは測定の原理に

よるもの、もうひとつは生物学的なものだ。たとえばサンプルに混入したホコリは複数のスポットに影響するが、画像処理で（汚染されたデータごと）取り除くことができる。またスキャナーは一定のレベルのホワイトノイズを発生するが、データ分布からそのレベルを推定して、影響される強度域の信号を捨てることができる。こうした測定のノイズと異なり、生物学的なノイズ、つまりサンプルの個体差や細胞のロット間差は、遺伝子発現のレベルを実際に変えてしまうので、簡単には除去できない。それこそフィッシャーがやったように、実験をデザインして影響を推定する——繰り返し測定をしてノイズの影響を推定し、ノイズよりも大きな違いがあるかどうかを検定する——ことでしか扱えない。

ここでは詳細を省くが、仮説検定には、統計学者の間に大きな考えの隔たりがあり、それはP値の解釈に端的に現れる。数学的にはP値の定義は共通であり、「帰無仮説 H_0 のもとで、使用する数理モデルに基づいて検定量Tの分布を推定したとき、Tの値が観測値 t_{obs} 以上になる確率」である。ところが、実際に検定したデータを解釈する時には、P値が意味するところについて意見の相違があり、それを基にして3つの学派が存在する[4]。実際のデータの背景は様々であり、それぞれにふさわしい考え方がありと私は考えている。発現型のマイクロアレイについて仮説検定をどのように適用させるべきかについては、(ほかの考え方の紹介もふくめて)この文献[5]を参照されたい。

4. マイクロアレイの結果を直感的に俯瞰するには

マイクロアレイのデータを得た、検定をして1万ほどの遺伝子が残った。でも、これがエクセルシートにあったとしても、どこから手をつけていかわからないと思う。データはサンプルと遺伝子の行列になっている。通常、計りたい生理条件を何回か繰り返して測定するので、Excelで開くのがちょっと重いような大きな行列になっているだろう（表1）。それでもかまわずに見ていくのも楽しい。こんな遺伝子がある、これは何をやっているんだろう——たぶん3週間くらいは夢中になれる。ただ、それを論文にまとめるのはたいへんだ。森の中で楽しく迷っているようなもので、これでは俯瞰図としては役に立たない。

複雑なデータでも、うまく視覚化すると理解しやすくなる。そのために、遺伝子や実験を階層型クラスタリングで視覚化することがひとつのパラダイムになって久しい。この技術は「似ている2つずつを組にしていき、最終的に系統樹のようなものをつくる」方法である（図1）。手軽に計算ができるので重宝なことは確かだ。しかし、計算条件に多数の選択肢があるため、あまり客観的な方法とは言いがたい——複数の発現量の違いをどんな「距離」で測るのか、そして複数のサンプル間の距離をどうまとめるのかについて、それぞれ幾種類かの選択肢があって分析者に委ねられている。その組み合わせは50種類くらいあり、それぞれで異なる結果を返す。また結局のところ示されるのは「何と何が近いか」であって、

表1 マイクロアレイのデータの例 実験ごとに複数の群をもち、それぞれが繰り返し実験で測定されている。実際にはさらにひとつの遺伝子が複数のプローブで測定されており (GeneChipの場合)、検定はそれらすべてを使って行う。

遺伝子 ID	group "0"				group "1"			
	Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Rep1	Rep2	Rep3	Rep4
100001_at	-1.68	-1.21	-0.85	-0.79	-1.96	-0.19	-0.70	-1.59
100002_at	-0.11	-0.05	-0.99	-0.77	-0.94	-0.68	-0.52	-2.03
100003_at	-0.33	0.53	-0.39	4.66	-0.50	0.16	-0.09	-0.09
100004_at	0.14	0.63	0.40	0.93	1.05	-0.04	-0.67	-0.53
100005_at	-1.90	-2.10	-1.37	-1.41	-1.32	-1.58	-1.03	-1.34

図1 (参考) 階層型クラスタリングの原理

(ア) 元データ

A	B	C
1	3	6

もっとも簡単な例を考えてみよう。ふつう階層型クラスタリングは多変量を相手にするものだが、ここではA,B,Cのそれぞれの群にひとつだけ変数を与え、1次元のデータだとする(ア)。2点間の距離の定義は、差の絶対値ということにしよう(1次元なので、たとえばマンハッタン距離でもユークリッド距離でも、これと等しくなる)。これらの群間の総当り距離を考えると表(イ)のようになる。

(イ) 距離

	A	B	C
A	0	2	5
B	2	0	3
C	5	3	0

これら組み合わせの中で、もっとも近いのはAとBの組である。これをまとめてひとつにする(ウ)。ここでは複数データ間の距離の定義として平均を用いた。

(ウ) 統合

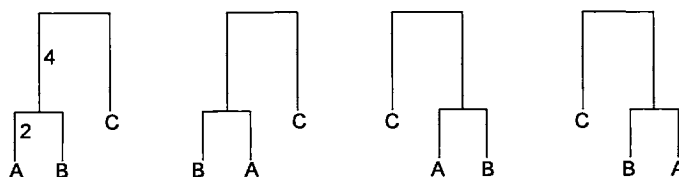
(AB)	C
2	6

(エ) 距離

	(AB)	C
(AB)	0	4
C	4	0

以上が一回のルーチン計算である。このように、1回ルーチンをまわすごとに1対のデータをひとつにまとめるので、1つずつデータが減っていく。残った組の総当り距離は表(エ)の通り。

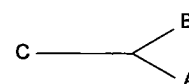
これで計算はおわり。この結果の表示方法は4通りあり、どれも等しい。



距離の定義、そして複数データ間の距離の定義によって結果が変わってくるが、基本的な考え方は以上である。群Cの上下位置をA,Bと揃えるかどうかはむしろ作図上の約束による(ここでは揃えていない、揃えるためにはCの位置を下げて線を延長する)。

さて、この4通りのいずれからも、「AとC」「BとC」の距離は読み取れない。つまり、実際にはAとCのほうがBとCよりも遠いんだけど、その関係は現れてこない。情報はたて方向にだけ現れ、横方向には意味が無い。これが階層型クラスタリングの考え方である。系統樹は人間にとってたいへんわかりやすい構造で、たとえばそれはネットワークを理解することの難しさと対比すると納得がいくものと思う。その構造的なわかりやすさからくる先入観が、階層型クラスタリングへの過剰な期待につながっているものと思われる。わずか3つのデータでさえこんな状態なのだから、数が増えたときにはその「歪み(本文参照)」の問題はより深刻になる。この問題は、とくに対象のもつ構造が系統樹的でない場合に大きくなる(たとえば遺伝子、また実験の群)。しかし実際には真に系統樹的である構造をもつデータは少ない(たとえば種の進化、ミトコンドリアなどの「交配による組換えのない」塩基配列)。

ちなみに、パッケージソフトによっては右のような「無根」系統樹風の出力をしてくれる。一種の便利機能だけど、これは階層型クラスタリングの原理を正しく表すものではない、階層構造がわかりにくくなるからだ(階層型クラスタリングでは階層の順位が生じる。最上位の階層が根に接続する)。もちろんこの図は、群間の正しい構造を表すわけではない。ただ情報が一部、省かれているだけだ。



それぞれのクラスターの距離は表示されない。なにより、遺伝子も実験も系統樹的な構造をもっていない（遺伝子はむしろネットワーク的な関係を有し、サンプル間の関係がどうなるのかは予想しがたい）。だから無理やり系統樹を押し付けてもあまり良い俯瞰図はできない。そこには遺伝子のもつ機能上のつながりも、群どうしの関係も正確には映し出されない。

1) 主成分分析

私は最近では、もっぱら主成分分析をつかって俯瞰図を作成している。これは（測定項目が複数あるデータののための手法である）多変量解析でよく使われる方法で、行列データを原点を中心にして回転させ、データ間差の大きな方向を見出していくものだ。マイクロアレイは各サンプルが遺伝子コンテンツ数だけの測定項目を持つため、どうしても次元数が大きな行列データになる。しかし、たとえば各遺伝子はまったく独立しているわけではなく、似通った傾向をもって増減するものだ。これはサンプル間の関係にもあてはまる、それぞれのサンプルは全く独立しているわけではなくて、似た傾向をもつものがあるのが普通だ。そうした傾向に沿う方向を見付けて、その方向を軸として定めてやれば、データを（その軸によって）いわば要約してやることができる。いくつかの直行軸に沿うようにデータを回転させれば、もとのデータの次元よりもずっと小さな次元で、データのほとんどを表すことができる。またこれは（数学的には）ただの行列の回転なので、データ間の関係はそのまま保たれる；ただ、新しい軸を使ってもとの行列を表現するようになっただけである。以上が主成分分析の原理である、これによって、異なる実験から得たデータのほとんどを、同じ仮想的グラフ上の少数の軸で、同時に比較することができるようになる。階層型クラスタリングとは異なり、行列内の要素間の関係はそのまま保たれるので、俯瞰図が歪むことがない（ここで歪みというのは、図上のデータ間の位置関係と、実際のデータの位置関係の縮尺が一定にならないことだ。階層型クラスタリングは数万もの次元のデータを2次元で表現するために大きく歪む）。

なお主成分分析は1930年頃につくられたと言われており、長い実績があるが、デザインされた実験科学のために用いるにあたってはいくつかの問題がある。特に問題なのは、この方法が最初にのべた「一般性」を持たないことだ；軸の方向はデータに依存するし、軸上の距離は行列の次元数に依存する。そもそもこの方法は一つの行列のなかで完結させるもので、複数の行列を比べることはもともと念頭になかった。でもこれでは地図としては面白くない、異なる地図をつなげて全体像が得られてこそそのアトラスである。こうした問題を解決した上で使用している；つまり、縮尺をあわせて、方向を明確に表示できるようにしている[6]。また、ここまで地図に例えて説明してきたが、いわゆる「地図」にはない使い方もある。より具体的な説明を、実際のデータを例にして見てみよう。

2) マイクロアレイへの適用

図2はマウスの乳腺で発現する遺伝子のアレイデータの平均値を、妊娠ゼロ日から出産、授乳、断乳とタイムコースで追いかけた測定データである[7]。パネルAに階層型クラスタリングによる像を示す。パネルBはデータの主成分の軸1と軸2を示したもので、数字はそれぞれのタイムコースの1点を表している（図の脚注を参照）。この実験では4匹のサンプルで繰り返し測定をしているので、それぞれの数字は4ずつ表示されている。

これらの軸は、あくまでも数学的に求められたものなので、それが実際に（即物的に）どんな意味を持つのかは分析者が考えねばならない。しかし、ほとんどのケースで、軸の生物学的な意味をサンプル群の分離から推測することができる。例えば図2Bの場合、横軸にとった軸1が乳腺の発達過程を表すことは容易に想像することができる；妊娠の最初期から授乳中ずっと、群は横一列に順番にならんでいるからだ。同じ数字が少しずつばらついているのは、サンプルの個体差の大きさを反映しているためである。そして、もし断乳後に、ただ来た道を引き返して乳腺が戻っていくのなら、群9もこの列のなかにあるはずだ。実際、群9の横軸の値は妊娠中期くらいの位置まで戻っている。しかしこの群はもっと別のことに於いて特別で、それが軸2（縦軸）を形成し、群9はこの列から分離されている。この軸2は、断乳後の過程でだけ変化する遺伝子によって形成される。こうした軸は、最大で（調べている群の数-1）だけ現れる——このケースでは10群なので最大で9軸であるが、ほとんどのデータの変化はここに表示した2軸に収まっている。調べる群の数を増やせば軸の数も増える、それらの軸はたとえば「筋肉に特異的」「肝臓に特異的」といった共通の動きの方向を示すことになる。軸が多ければ多いほど、分離能が高くなる；もし中年期までの老化と老年期の老化が質的に異なるのであれば、それらは見分けられるようになる。十分な実験データが揃えば、それらの軸の方向は、以後データを増やしてもあまり変化しなくなるはずだ。ある程度の数の軸が用意できれば、未知試料をそれら既存の軸にプロットすることで、その試料を分類することもできる。

その同じ軸に遺伝子を表示することができる（図3）。図中の一つの円がひとつの遺伝子を示している。たとえば横軸の乳腺の発達過程で、ずっと上昇してきた遺伝子は、この図の右の方に表示される——あるいは、それらの遺伝子の動きが、この軸を規定している。そのような、右はじにある遺伝子群には、たとえばlipid metabolic processというキーワードをアノテーションに持つ遺伝子が多く含まれている（表2）。逆に、乳腺の発達過程で発現量を低下させた遺伝子は、左のほうに表示される。同様に、断乳後に上昇した遺伝子は図の下の方に表示される。

図2のパネルBや図3は、いわば地図帳の一枚の地図にあたるものである。遺伝子発現がどのような傾向を持つか、また群の関係はどうなのかが、この図に表示される。あるいは、地図の方向は実験群が示し、そこにどんな街

表2 軸1で大きく変化する遺伝子に頻出したキーワード 図3の左端に位置する500遺伝子について出現頻度を調べた。それぞれのワードについて、Contentsはチップ内の遺伝子数、Selectedは着目した500遺伝子のなかの遺伝子数を表す。P値の算出方法は本文を参照。

Gene Ontology Biological Process	Contents	Selected	P-value
lipid biosynthetic process	90	14	2.3E-05
steroid biosynthetic process	55	10	9.6E-05
cholesterol biosynthetic process	28	8	2.2E-05
sterol biosynthetic process	30	8	3.6E-05
isoprenoid biosynthetic process	16	5	5.2E-04
centrosome cycle	3	2	6.7E-02
negative regulation of nuclear mRNA splicing	3	2	6.7E-02

があるのかは遺伝子が示す。縮尺は全ての地図で統一されている。

主成分分析の軸は遺伝子と遺伝子の関係、群と群の関係、そして群と遺伝子の関係を内包しているが、数学的にはそれはただの行列数である。そこで、他の実験で得た測定値をその行列で演算することができ、結果はその軸上に表示される。新しいデータを、ある地図の軸をつかって表示することができるのだ。もし、なんらかの実験が乳腺の発達と関連しそうなら、ここで示した軸を試すことができる。実際にそうした動きがあるのなら、その実験の群は左右に分かれるはずだ。もちろん逆もできる；私の測定した「皮膚の老化」の軸にこの「乳腺の発達」のデータを表示すると、この実験期間内にも乳腺は老化していることがわかる。つまり、(まだ測定数が限られており、分解能に難があるものの)皮膚のデータから見つかった軸は、老化の方向をある程度表すものだと考えられる。その方向を通じてこの「乳腺の発達」実験を見ることで、その実験期間中にあった経時的変化と大きな生理的变化が、器官にもたらした老化を観察することができるのだ。——残念ながら、(その逆に)皮膚のデータをこの乳腺の軸で処理しても、顕著な動きは見られなかった。汗腺などの変化が見えないか期待したのだが…。このように、「何かが見えない」ときは黙るしかない(「差がない」とは言えない、ただ検出できなかったのだ。これは検定のもつ同じ性質に起因している)。

主成分分析にかける数値は遺伝子の発現変化であり、それを回転させた主成分の値はそれをいくつかの方向に分解したものの平均値である。実際に「ある群と別の群でどう変化したか」はもとのデータに戻って計算したほうが手っ取り早いですが、原理的には主成分から再現することもできる(主成分分析ではデータの要素が損なわれないので、結果から出発の行列を再現することができる)。ちなみに、出発の行列では、各サンプルの違いはログレシオで表されている；倍率は、そのままだと増える側と減る側でリニアではなくて扱いにくい(増える方は無限大で、減る方はゼロで行き止まる)からだ。ログレシオの比例定数は大雑把にあって0.4増えると2倍、だから同様に0.8減ると1/4倍である。サンプルの主成分sPCsは、

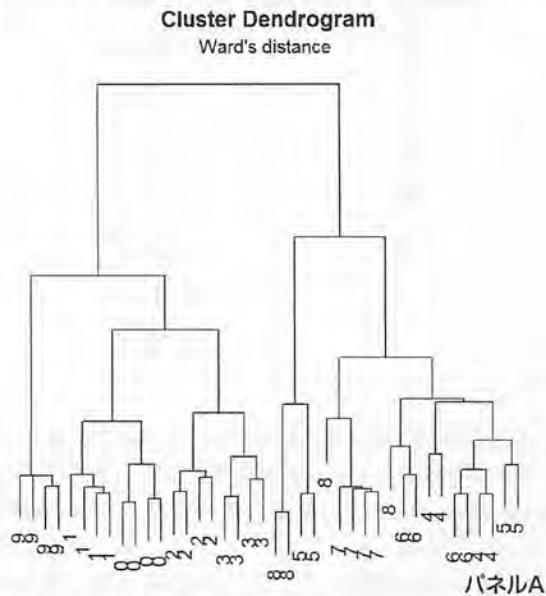
いろいろな遺伝子が(その軸に沿って)増えたり減ったりしているのを合算して得た平均値である(通常は、主成分PCsは遺伝子ごとの値を合算して求めるので総和と言ったほうが正しい。しかし、これだと調べた遺伝子数が変われば値が変動してしまう。縮尺をそろえるために平均で表している、これがscaled PC: sPCである)[6]。この主成分そのものにはあまり即物的な意味がないが、しかし同じような遺伝子の増減をしているサンプルは地図の上で近所に表示されることになる。同様に、遺伝子の主成分sPCgは、サンプルごとの値の平均である。当然、大きな値をもつ遺伝子ほど、触れ幅が大きくなるし、同じパターンで増減するのなら近所に表示される。

3) 地図を詳しく読む

その地図にどのような特徴があるのかは、主成分分析の軸ごとに、遺伝子の機能を手がかりにして調べる。その軸で大きく動いている遺伝子の機能がその実験の特徴をあらわす。実験群の機能的な特徴は、それら遺伝子の中に共通する機能として発見できる。ここではじめて、数学的に発見された軸が、生物学的な意味のあるものとして理解できるようになる。こうした機能について生化学的な経路をネットサーチするサービスもあるが、チップメーカーから提供されるアノテーションファイルから見つけることもできる。私は、基準を設けて選択した遺伝子のアノテーションからキーワードを抽出し、ワードの出現頻度とP値を求めている[1]。有意に高頻度で出現するワードは、その組織を特徴づけるものだ。たとえば、例に示した乳腺の発達のタイムコースで、軸1で正の遺伝子500個から、Gene Ontology Biological Processのキーワードを抽出し、P値が低かったキーワードを表2に示す。これらは乳腺の発達に伴って発現が増大する遺伝子である。さらにそれら遺伝子の発現変化が大きいのなら、重要性は増大することになる。

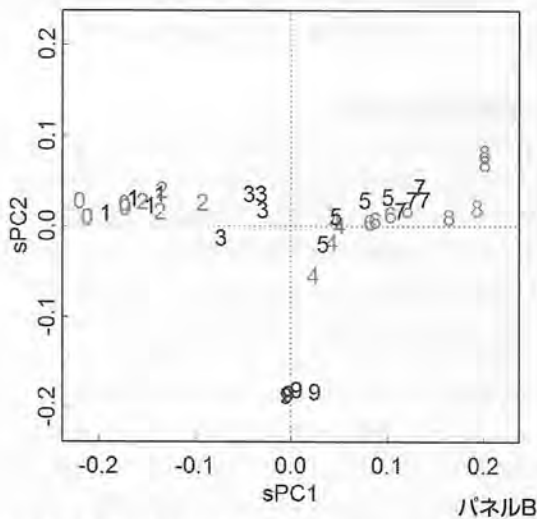
ここでP値は二項分布モデルをつかって計算する。おもしろそうなキーワードはたくさん見つかるが、そうしたワードは多くの遺伝子に割り振られていることがある。有意にその頻度が高いかどうかを検定しておかないと、ワードに振り回されるかもしれない。この際に

図2 マウスの乳腺の発達過程を示したタイムコース実験のデータ[7] 数字はそれぞれの実験群を表している(0から5, 妊娠1, 3, 7, 12, 17, 19日; 6から8, 授乳1, 2, 9日; 9, 断乳後2日)。4回の繰り返し測定を行っている。



パネルA: 階層型クラスタリングの例

それぞれ、最も近い2つの群(ないしそれらの平均)との間をまとめていきながら系統樹をつくっているのがわかる。そこで、たとえば左端と右端のサンプルの関係は不明である、表示されないからだ。当然、2つに分断されてしまった群5が、どのような位置関係にあるのかはここには示されない。



パネルB: 主成分分析の例

パネルAと全く同じ遺伝子のセットを用いて計算したサンプルの主成分の分布を示しているが、マウスの乳腺の発達過程との明確な相関が見えてくる。妊娠0日から出産を経て授乳をしている間、群は(x軸に表された)横軸を左から右に一直線に移っていることが明らかである。また断乳後2日目である群9は、横軸をただ戻ってだけでなく、縦軸方向へ、それまで妊娠期間を通じて現われなかった方向性をもって移動していることがわかる。このT字型の構造は、データの中にあつたものが自ずから現れたものである。おなじ構造をパネルAから読みとることは不可能であろう、それは、元来が系統樹のようでない構造に、系統樹のモデルをあてはめたからだ。

二項分布モデルをどうデータに当てはめるかの概略は以下のとおり。たとえば袋に12,488個のボールが入っていて、そのうち90個にlipid biosynthetic processと書い

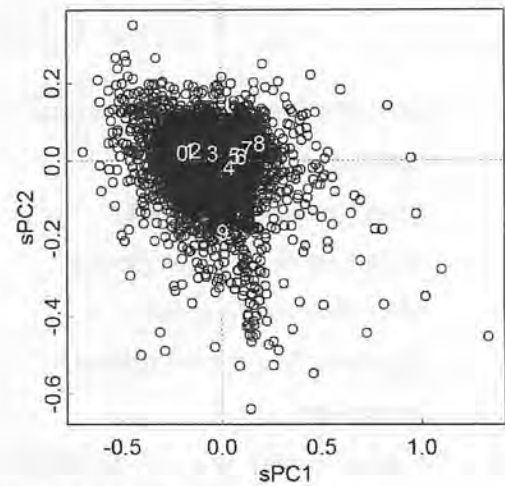


図3 遺伝子の主成分分析の例

群の主成分と共に表示したもの。白抜き丸のひとつずつが遺伝子を表している。乳腺の発達過程で発現量が増加する遺伝子が左側に、断乳後に増加する遺伝子が下側に表示されている。

である。そこから500個、目をつぶって取り出したなかに、14個以上のlipid biosynthetic processボールが含まれている確率の推定値がP値である。帰無仮説は「それら遺伝子は偶然によって選ばれた」ということなので、P値がととても低い値であるなら、きっと偶然ではなくて何か意味のあることだろうと考える。実際、母乳を産生するにあたって脂質やステロールの合成が重要であろうことは容易に想像できる。

こうして全体像の見当をつけながら、個々の遺伝子をあたっていくことになる。脂肪酸の合成といっても、たとえば肝臓でのそれと比較すると趣がだいぶ異なっていて、*de novo*合成ではなくて脂肪酸の伸長や不飽和化にかかわるものが多いな——といったことは、個々の遺伝子を眺めることでわかる。なんにせよ全体像が見えているので、森の中で迷っているのとはかなり事情が違う。またこうした「自分の調べた」実験系の特徴は、他の実験結果と比べることで(たとえば乳腺のデータを肝臓のデータと比較することで)初めて明らかになることは特筆すべきだろう。

5. 他の実験との比較と統合

すでに述べたように、標準化したデータは基本的に比較可能である。ただし、注意すべき点がいくつかある。同じ系統の動物や培養細胞でも、ラボや実験のロットが異なると、けっこうデータが違っているものだ。こうしたラボ間差や実験間差をキャンセルしないと、何を見ているのかわからなくなる。基本的には、それぞれのラボにおける対照群を使ってこれらを消していく。ラボ間・実験間で、これら対照群が実質的に同等であるという仮定をおく。たとえばあるラボは少し暑くてHSPが高めになるのが標準かもしれない。そうしたトリビアな影響をキャンセルするために、対照群との差だけを扱うようにする。これだけで、あるサプリメントが肝臓と脂肪組織にどう違う効果をもたらすか、を別々の実験から

(臓器の差もキャンセルして) 比較することができるようになる。これで基本的にはチップの感度の違いも補正できる、だからチップの種類が違って原理的には比較が可能である。ただ、チップが異なると、(メーカーが同一であっても) 同じ遺伝子でも異なるプローブで測定されることが多い。よく調べたら別物だったとか、スプライシングが異なる別種のトランスクリプトを見ていたとか、ちょっとややこしいことが起きがちなことには留意されたい。じつはスプライシングバリエーションが生じるのはありふれた現象らしく、1遺伝子を複数のプローブで測定するAffymetrix社のGeneChipを使うとしばしば目にするようになる。これもまた別の機会にご紹介したい。

実験をまたがって主成分分析を行うことで、群を増やした状態で解析ができるようになる。これには大きなメリットが期待できる；この分析方法の分解能は群数によっているので、それを高められる。これがつまり、アトラスをつくるということだ。群数が少ないと、ひとつの軸が複数の動きをまとめて示すことになる、たとえば脂肪酸合成と細胞分化といったような、本来は分離できるはずの動きが同じ軸上に現れる。これは群間の関係を見たい時には問題にならないが、遺伝子間の関係をみたいときには、特にアノテーションがない遺伝子のなかから有望そうなものを選択したいときには、重要だ。遺伝子のアノテーションの情報量と精度は、遺伝子ごとにより異なる。たとえば肝臓で動く遺伝子にはかなりよく分かっているものが多いが、脳ではトランスクリプトの配列さえ怪しく、機能不明であるものがきわめて多い。どのような生理条件でどう動くのかという情報は、こうした遺伝子の機能への一つの手がかりになるだろう；少なくとも、どの遺伝子の機能を詳細に調べようかという選択のひとつの指標にはなる、その指標の精度はこの分解能で決まる。なるべく多くの実験結果を集めたほうがいい。

6. アトラスを作成するという仕事

以上、述べてきた方法論は、これまでの全ての遺伝子発現解析の方法に関するパラダイムとは本質的に異なるものである。もともとのパラダイムは定性的だった。その不格好な発展型としてノンパラがあり、それをまとめるために系統樹に基づくクラスタリングが使われた。ここで紹介したのは定量的な方法論で、パラメトリックな標準化と検定で、そして特定のモデルを想定しないまとめ方である。アドホックな方法論の開発に比べて、エビデンスをベースとした方法論の開発には時間がかかる、そして(だから)こんな考え方をするインフォマティシャンは稀だ。この事情に免じて、お手本としての仕事がまだあまり出版できていない時点でパラダイムを語ることをご容赦願いたい——しかし参考までに数葉の「地図」を挙げさせてほしい、大豆食が肝臓に及ぼす影響を調べた農研機構の高橋博士の研究である[8]。ここでは、複数の食餌の影響を比較するために、主成分分析を使用している。今ならさらにもう少し良い方法を使える、データはまだ増え続けているので、それらを統合していくこと

でアトラスが作れるはずだ。

フロントランナーはドン・キホーテになってしまうリスクを負う。トランスクリプトーム研究はまだ誰にでも遂行できる仕事ではない、特に、アトラスといえるようなものはまだひとつも完成していない状況である。地図を作ることができる人は、未踏の地を走ることに耐えられる人だけだ。それでもよかったら、ぜひ伴走させてほしい。必要なりピートの数からチップの選択まで、相談をもちかけてほしい(ドライとしては計画段階から参加したい、そのほうが無駄な実験をせずに済む)。そして、もし多くの読者が一緒に走ってくれば、老化トランスクリプトームのアトラスを作ることができるのだということは覚えてほしい。それはこの分野の誰にでも役立つものだ。

引用文献

1. Konishi T, Konishi F, Takasaki S, Inoue K, Nakayama K, Konagaya A. Coincidence between transcriptome analyses on different microarray platforms using a parametric framework. *PLoS ONE* 3: e3555, 2008.
2. Konishi T. A thermodynamic model of transcriptome formation. *Nucl Acids Res* 33: 6587-6592, 2005.
3. Xu M. Theoretically modeling microarray with the chemical equilibrium and thermodynamics. *J Bioinform Comput Biol* 3:477-490, 2005.
4. Berger, J. Could Fisher, Jeffreys and Neyman have agreed on testing? *Statist Sci* 18: 1-32, 2003.
5. Konishi T. Microarray test results should not be compensated for multiplicity of gene contents, *BMC Systems Biology* 5: S6, 2011
6. Konishi T. Principal component analysis for experiments. (submitted)
7. Anderson S, Rudolph M, Mcmanaman J, Neville M. Key stages in mammary gland development. Secretory activation in the mammary gland: it's not just about milk protein synthesis! *Breast Cancer Res* 9: 204, 2007
8. Takahashi Y, Konishi T. Tofu (soybean curd) lowers serum lipid levels and modulates hepatic gene expression involved in lipogenesis primarily through its protein, not isoflavone, component in rats. *J Agric Food Chem* 59:8976-84, 2011

【トピックス】

X線により生じるヒドロキシルラジカルの量とその分布の解析

松本謙一郎

放射線医学総合研究所・重粒子医科学センター・先端粒子線生物研究プログラム・
レドックス応答制御研究チーム

1. はじめに

生体内で常に発生する活性酸素 (Reactive Oxygen Species: ROS) やフリーラジカル (Free Radical) による弱い連続的な有害反応が老化に関与すると考えられている。一方、生体に放射線を照射すると生体内で一過的に大量の活性酸素やあるいはその他のフリーラジカル種が生成する。放射線がん治療では、それら活性酸素の毒性を利用して癌細胞を殺傷する。活性酸素の生成量は、組織のpHや酸素濃度、抗酸化成分の量、もともとの活性酸素生成量など、組織のレドックス状態に係わる環境によって変化し、その結果、生体の応答もそれがもともと持っているレドックス環境によって変わってくると考えられる。レドックス (Redox) とはReduction (還元) とOxidation (酸化) から成る造語で、「酸化還元」を意味している。組織のレドックス状態は患者個人の生活習慣により様々であると予想されるため、あらかじめターゲット組織周囲のレドックスイベントを観察して、それを踏まえて放射線治療を行うことにより、より効率的な、あるいはより安全な放射線治療が行えるようになると思われる。そこで、どのようなフリーラジカルあるいは活性酸素がどのような条件でどのくらい生成するのかを評価し、またそういう条件を動物や細胞に与えた時にどのような応答が得られるか、更にあるフリーラジカル種に対してはどの抗酸化剤が有効に消去するか、それが生体内でも同様に有効かについて考える必要がある。

そもそも放射線というのは相手を選び好みせず、たまたまぶつかった電子や原子核に作用する。しかしながら、放射線の生体に対する影響には選り好みが見られる。放射線の生物に対する作用には直接作用と間接作用があり、その内訳は教科書等によって幾分異なるが、おおむね直接作用が20~30%くらい、間接作用が70~80%くらいとされている。ただし直接作用と間接作用の割合は状況によって変化する。それは間接作用の割合が変化するからである。いずれにしても生体を構成する成分は主に水であるので間接作用の割合が多いと考えられている[1,2]。直接作用は放射線が、あるいは2次電子が、ターゲット分子を直接電離あるいは励起することに起因して起こり、ある程度の確率で起こる直接作用は避けることができない。

一方の間接作用では、放射線が先ず生体内に大量に含まれる水分子を電離あるいは励起して非常に反応性の高い活性種を生じ、続いてそれら同士のあるいはそれらと溶存酸素の反応で少しだけ安定な、とはいえ比較的反応性の高い分子種が生じて周囲の有機物へ反応が広がっていく。この過程のどこかで、生成物を消去し反応を止めることができれば間接作用を避けることが可能になる。

我々の体には活性酸素に対抗するための抗酸化機能が備わっており、例えばスーパーオキシド($\cdot\text{O}_2^-$)はSODによって過酸化水素(H_2O_2)と酸素に不均化され、更に H_2O_2 はカタラーゼやグルタチオンペルオキシダーゼによって水へ戻される。グルタチオンペルオキシダーゼが H_2O_2 を分解する際に還元型グルタチオンからの水素が使われ酸化型グルタチオンが生成する。酸化型グルタチオンはグルタチオン還元酵素によってもとの還元型グルタチオンに戻り、この時NADPHからの水素が使用される。このようにして連鎖的に酸化還元反応が進んでいき、その過程で何らかの遺伝子を発現させるようなイベントが起こり、それによって生体があるいは細胞が何らかの応答を示すことをレドックスシグナリングと呼んでいる。

そのような生体内のレドックス反応系を介して、通常は活性酸素の生成量とそれを消すための抗酸化能が釣り合った状態で我々の健康が維持されている。健康であれば抗酸化能に少しゆとりがあるので、日常の運動などによる弱い酸化的ストレスの増加に対しては対処が可能で、また時々与えるそのような弱いストレスによって抗酸化酵素が誘導され抗酸化能のパufferを少しずつ増やすこともできる。しかしながら、極端に抗酸化能が弱まったり、あるいは活性酸素の生成が増えたりすればこのバランスが崩れ、最終的に病態に至ると考えられている。放射線は、生体内で水を電離してヒドロキシルラジカル($\cdot\text{OH}$)を生成し、更にその後の反応を介してその他の活性酸素種を生成する。それによって生体に酸化ストレスを与えるのであるが、放射線による活性酸素の生成量はどの程度なのだろうか。本稿ではX線で生じる $\cdot\text{OH}$ についてその量と分布を調べた。

2. フリーラジカルと活性酸素

「活性酸素」という言葉と「フリーラジカル」という言葉が混同して使われることが時々あるので念のため軽くおさらいをすると、活性酸素とは、狭義には $\cdot\text{OH}$ 、 O_2^- 、 H_2O_2 、一重項酸素($^1\text{O}_2$)の4つを指す。ただし広義には、活性酸素種が生体の成分と反応して生じたヒドロペルオキシラジカル($\text{HOO}\cdot$)や脂質ペルオキシラジカル

連絡先：〒263-8555
千葉県千葉市稲毛区穴川4-9-1
Tel: +81-43-206-3123
Fax: +81-43-255-6819
E-mail: matsumok@nirs.go.jp

($\text{LOO}\cdot$)、 $\cdot\text{O}_2^-$ と $\cdot\text{NO}$ との反応で生じるペルオキシナイトライドなど、酸素を含む様々な活性種を活性酸素と呼ぶこともある。一方フリーラジカルとは、不対電子を持つ分子、あるいはその不対電子を指す言葉で、すなわち上記の狭義の活性酸素種4つの中では、 $\cdot\text{OH}$ と $\cdot\text{O}_2^-$ のみがフリーラジカルである。

放射線の生体への影響を考える上で重要な活性酸素種は $\cdot\text{OH}$ 、 $\cdot\text{O}_2^-$ 、 H_2O_2 である。放射線による水の電離によって $\cdot\text{OH}$ が、続いて溶存酸素との反応によって $\cdot\text{O}_2^-$ や H_2O_2 が生じ、 H_2O_2 は Fe^{2+} や Cu^+ などによって容易に還元され再び $\cdot\text{OH}$ を生成する。 H_2O_2 自体は比較的安定なので生体成分と直接反応することは少ないと考えられるが、そのぶん長い距離を移動することが出来るようになり、また蓄積することも可能になるので、影響の広がりや後続する影響を考える上で重要と言える。これらの活性種の中で一番の問題児が $\cdot\text{OH}$ であり、放射線の間接作用は主に $\cdot\text{OH}$ によると言われている。

3. フリーラジカル (活性酸素) の測定法

電子常磁性共鳴 (EPR) 法は、電子スピン共鳴 (ESR) ともいうが、不対電子 (電子スピン) による電磁波 (ラジオ波~マイクロ波) の吸収を観測する磁気共鳴法の一つで、フリーラジカルを直接検出できる唯一の方法である。活性酸素の中で $\cdot\text{OH}$ と $\cdot\text{O}_2^-$ はフリーラジカルでもあるので、基本的にはEPR法で測定することが可能である。ただし $\cdot\text{OH}$ や $\cdot\text{O}_2^-$ のような短寿命のフリーラジカルは室温で直接観測することは難しい。そこでスピントラップ剤と反応させ、比較的安定なラジカル体 (スピアダクト) としたうえでEPRを用いて測定することが出来る。そのEPRスペクトルの形状によってトラップしたラジカル種が何であるかを知ることが出来る。これをEPRスピントラップ法と呼ぶ。

中でも5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) は医・歯・薬学の分野で特に広く利用されているスピントラップ剤である。DMPOが $\cdot\text{OH}$ と反応して生成するDMPOの $\cdot\text{OH}$ アダクト (DMPO-OH) は、特徴的な1:2:2:1の4本線のEPRスペクトルを示す (図1右)。同様にDMPOが $\cdot\text{O}_2^-$ と反応して生成するDMPOの $\cdot\text{O}_2^-$ アダクト (DMPO-OOH) は、図1左に示すような複雑な12本線を示す。

4. X線で生じる $\cdot\text{OH}$ の量と密度

DMPOの水溶液にX線を照射すると、生じた $\cdot\text{OH}$ をDMPOがトラップしてDMPO-OHが生じ、これをEPRで測定することができる。そこで、この $\cdot\text{OH}$ のディテクターであるDMPOの濃度を変えていくと、すな

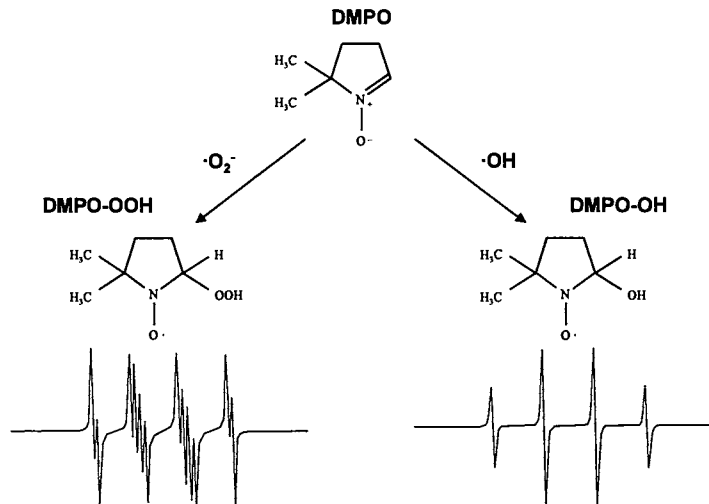


図1. EPRスピントラップ法による活性酸素種の測定

スピントラップ剤DMPOと $\cdot\text{OH}$ の反応で生じるDMPO-OHのEPRスペクトルは1:2:2:1の4本線を示す。DMPOと $\cdot\text{O}_2^-$ の反応で生じるDMPO-OOHのEPRスペクトルは12本線を示す。

わちディテクターの数をだんだん増やしていった場合に、どれくらいの濃度でDMPO-OHの生成が飽和するのかを調べた。つまり飽和したDMPOの濃度辺りが、 $\cdot\text{OH}$ の生成量であろうと考えられる。

表1に示す幾つかの濃度でDMPOを含む反応溶液を調製した。ここで分子間距離とは、各濃度で分子がどれくらいの距離で存在するかを計算した値で、分子1つが占める体積を正立方体としてその一辺の長さを求めた。例えば0.5mMの濃度では分子が前後左右上下に約15nm間隔で存在していることになる。またここで密度とは、分子間距離の逆数で、言い換えると1 μm の距離にディテクターであるDMPOがいくつ存在するかを意味する。

まずX線で、照射線量が一定の条件でDMPOの濃度を濃くしていくと、DMPO-OHの生成量が増加する (図2)。

表1. 反応溶液中のDMPOの濃度、分子間距離、密度、およびX線32Gy照射によるDMPO-OH生成量

DMPO 濃度 (mM)	分子間距離 (nm)	密度 (μm^{-1})	DMPO-OH 生成量 (mM)
0.5	15.0	66.7	5.69
1.6	10.0	100.0	15.80
3.3	8.0	125.0	18.60
7.7	6.0	166.7	20.16
13.3	5.0	200.0	21.95
15.0	4.8	208.3	21.96
26.0	4.0	250.0	21.82
30.0	3.8	263.2	23.44
61.6	3.0	333.3	24.14
208.0	2.0	500.0	27.38
600.0	1.4	714.3	31.60
1685.0	1.0	1000.0	32.75

ここで横軸は分子間距離であるが、DMPO濃度の低いほうから2番目の点、すなわちDMPOの濃度が1.6 mM程度からDMPO-OHの生成量はプラトーに達しており、それ以上の濃度ではそれほどDMPO-OHの生成量が変化不再なることから、つまり、1.6mMくらいの濃さで・OHができていることを示している。つまり1.6 mMの濃度では分子が約10nm間隔で存在するので、おそらく約10nmくらいおきに・OHが生成しているのだらうと予想できる。ただしDMPO-OHの生成量は32 Gy照射した場合にプラトーレベルでも30 μM程度である。つまりこれは・OHの生成が局所的に高いことを示しており、X線が水中を進む過程で、その飛跡上に約10nmくらいおきに生成するものと考えられるが、X線の粒子の密度はそれよりも疎であるので大きいボリュームの中での平均の濃度は30μM程度と低くなる。つまりX線による・OH生成量は、ボリュームで平均すると32 Gyで約30μMなので、Gy当たりおよそ1μMと考えられる。

生体内ではそもそも、常日頃から活性酸素が生成している。体重63kgの成人男性の1分間の酸素消費量は約250mL (11.2mmol) といわれており[3]、消費される酸素は主にミトコンドリアで使われるが、ミトコンドリアで使われる酸素の数%が $\cdot O_2^-$ となると考えられている[4,5]。最近の報告では、ラットの組織由来のミトコンドリアで、酸素消費量の0.1~0.2%が活性酸素種に変換されるという報告もある[6]。ここでは単純に1%とするが、1分当たり11.2mmolの1%が $\cdot O_2^-$ になるとするならば、ヒト一人の中で1秒当たり1900nmolの $\cdot O_2^-$ が生じることになる。人体には約60兆個の細胞があると言われているので、 $1900\text{nmol} \times 6.022 \times 10^{23} / 60\text{兆}$ を計算すると、細胞一個の中で1秒間に約2万個の $\cdot O_2^-$ が生じていると考えられる。

しかし、我々も含め好気性生物には、すばらしい抗酸化機能が備わっており、 $\cdot O_2^-$ はSODによって過酸化水素(H_2O_2)と酸素に不均化され、更に H_2O_2 はカタラーゼやグルタチオンペルオキシダーゼによって水へ戻される。これを掻い潜って・OHがどれくらい生成するかを考えると、この部分は想像になるが、ここでも酵素的なエラーがやはり1%くらいは起こるとして、ヒト一人の中で1秒当たり20nmol、細胞一個の中で1秒間に2百個くらいであろうか。体重63kgの人の体積は約65Lと考えられるので、1秒間に細胞1個の中で200個くらい生成するとした・OHの量は、濃度で考えると約300pmol/L/secに相当することになる。

ここからは単なる数字遊びになってしまうが、上述の数字に基づいて1秒間に200個を1秒間に201個にするために必要なX線の線量を予想すると、つまり1秒間に1.5 pmol/Lの・OHをX線で生成させようとするならば、大体1.5μGy/secくらいの線量率が必要で、これは5.4mGy/hrに相当する。これは、ちょうどホメオスタシスの実験で使用される線量率と同じ程度かそれよりも少し強いくらいのレベルである。しかし抗酸化能にバッファがあることを考えると、・OHがこの程度増えても明確な事象は何も起こりそうもない。1割増やして1秒間に細胞当たり

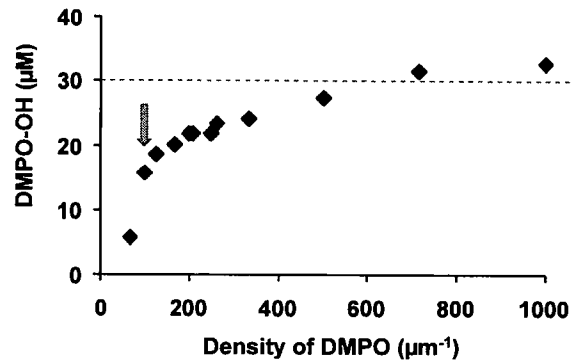


図2. DMPOを含む反応溶液にX線を32Gy照射したときの、反応溶液中のDMPOの濃度とDMPO-OHの生成量の関係
矢印で示すDMPO濃度以上では、DMPO-OHの生成量のDMPO濃度に対する増加率が少ない。

220個の場合を考えると、1.8mGy/minくらいの線量率が必要になる。この程度であれば何らかのレドックス応答が見えてくるのではないだろうか。さらに健常時の倍に増やして1秒間に細胞当たり400個であれば、必要な線量率は18mGy/minとなり、これなら少し時間をかけて照射すれば確実に何らかの影響が出るだろう。逆に、放射線治療時の線量率が1Gy/min程度であると考え、放射線治療時には細胞1個の中で1秒間に1万個くらいの・OHを作っている計算になる。ここでは単純に細胞1個当たりで数字を示したが、実際にはその中で更に・OHの局所的な分布があるだろうことを考えなければならぬので、影響の予測はもう少し複雑であろう。

5. おわりに

酸素消費に伴って先ず生じる活性酸素種は $\cdot O_2^-$ で、これはおそらくミトコンドリアに局在しているだろう。しかし $\cdot O_2^-$ の不均化で生じる H_2O_2 は反応性も弱くまた膜透過性であるので広い範囲にある程度均等に分布することができる。健常時やあるいは病態においても、生体内での・OHの生成量がどの程度であるかについてはまだ検討の余地が残るが、 H_2O_2 の還元で生じるであろう・OHは、ある程度均等に分布するものと予想できる。すなわち酸素を呼吸して生きているだけで常に小さな障害が細胞内のあちこちに万遍なく起こる状態であろうとイメージできる。一方、X線による・OHはおそらくX線の軌跡に沿って局所的に生成しており、つまり放射線による障害は、局所的にある程度まとまって生じると思われる、すなわち、やや纏まった障害がまばらに生じるものとイメージできる。このような障害のでき方の違いにより、この後に起こる結果が老化であったり炎症であったりあるいは発癌であったり、様々な病状へつながっていくものと思われるが、それを述べるには今後の更に詳しい調査が必要である。

参考文献

1. 西臺武弘・著、放射線治療物理学・第2版、文光堂、東京、2004年。
2. 馬場茂雄・編、薬学生の放射化学・第4版、廣川書店、東京、1999年。

3. Ganong WF. Chapter 32: Circulation Through Special Regions, in "Review of Medical Physiology 16th Edition," Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1993.
4. 山本順寛, 抗酸化物質の役割とコエンザイムQへの期待, J. Anti-Aging Med. 1, 13- 19, 2003.
5. 青木茂治, 久和彰江, 仲村健二郎, 中村康則, Candida albicans呼吸欠損株の細胞生物学, Jpn. J. Med. Mycol. 46, 243- 247, 2005.
6. Tahara EB, Navarete FDT, Kowaltowski AJ. Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. Free Radic. Biol. Med. 46, 1283- 1297, 2009.

【随 筆】

老化研究事起こし——アンチ・エイジングは、すべて幻か？

三井 洋司
徳島文理大学

はじめに

生物学では大局観を失うと、大きな迷路に陥る事が有ります。

今や老化を遅延し、寿命を延長させると言う新化合物を、企業が必死にスクリーニングしようとし、巷ではアンチ・エイジング療法のかけ声が高まっています。

しかし、生き物の長い進化の過程で、適応・選択を重ねて落ちてきた老化や寿命が、簡単な外因子で変更出来るものでしょうか。

例えば、現在、酸化ストレスを老化の原因と考えた抗酸化剤とか、加齢に伴って減量するホルモン等の補充、ヒストンのアセチル化修飾の変更、そして、カロリー減量の代替物などが、寿命延長物質の探索の対象になっているようですが、それらにも私は懐疑的です。

生物の寿命の起源に関わる、基本的な機序を操作しなければ寿命を大きく変更出来ないように、私には思うのです。勿論、DNAストレスと総称される傷害因子による老化亢進は、当然、抑制の対象ですが、それは傷害因子による病的老化の改善であって、本質的な寿命延長ではないでしょう。

今回は、寿命を修飾する因子を、もう少し考えましょう。

意外とショックかも。

第12話 抗酸化剤は、無意味か

今になっても、酸化ストレスが老化の原因とする説を、主張する人がいるのは、私にとってはむしろ驚きです。もちろん、動物実験では、酸化ストレスを大量に浴びれば、生体内高分子の酸化変性が進み、寿命が短縮するという報告もあります。また、それに抗酸化剤を投与すれば、健康に益ありとの報告もあります。

でも、普通の生活をしている人にとって、フリーラディカル或いは、活性酸素は、老化の原因になるほど、有害なのでしょうか？ 普段の生活で発生する量の活性酸素に対しては、長い進化の過程で、消去酵素群の遺伝子を発達させるなど、対処する能力を獲得しているように思えます。むしろ、活性酸素などを代謝調節などに有益に活用するまでに、進化したではないですか。

実際、ヒトの場合、健康人が、いろいろな抗酸化剤を摂取した場合の健康への効果は、膨大な報告のメタアナリシスによると、“害は有っても益はなし” が結論でした。

それどころか、最近では、細胞傷害を及ぼさない程度の酸化ストレスは、与えたほうが、寿命をむしろ延長させるといくつも報告されています。これに関連しますが、

いわゆる適度な運動が健康に良いのは、運動による活性酸素の放出のおかげであり、それが良い効果をもたらしているとの報告もあります。運動効果は、神経、筋肉、感覚の機能向上が、鍵だと思いますが。いずれにしても生理的な老化に、酸化ストレスは関係ないと考えられます。むしろ、一般的には、Mild stressorがあれば、健康に対する防御反応の遺伝子発現を誘起するため、hormesis 効果を期待してよいかもしれませんね。

第13話 サーチュインの活性化は、寿命を延長せず

サーチュインは、寿命延長物質を見つける画期的な分子標的となりました。しかし、一昨年のエイプリルフールの時期には、sirtuin を活性化するように見える化合物は、アッセイ系の間違いによる非特異的な現象の結果であって、ヒストンの脱アセチル化は、亢進していなかったとNatureが報じた事を覚えているでしょう。当時も、レスベラトロールによるsirtの活性化や寿命延長効果は、何かおかしいと噂されていましたが、合成された新規化合物も、その根拠を失ってしまいました。そこで、sirtuin活性化の正しいアッセイ系で、寿命延長物質を探索することに、切り替わっていました。

ところが昨年9月、sirtuinを、ターゲットにすること自身が誤りだと分かってきたのです。sirtuin遺伝子の過剰導入によって、寿命を延長できると、酵母、ショウジョウバエ、線虫で報告されていましたが、その効果は、遺伝子導入に伴って、偶然生じた既知遺伝子（感覚ニューロンの機能をつかさどるDyf）の変異が原因であって、sirtuin (Sir2) は寿命に関係ないことが、Natureに発表されたのです。Back crossを重ねて、挿入sirtuinとDyf 変異の個体を分離して、証明しました。一方で、カロリー制限によって、各種動物の寿命が延長するのは、sirtuinの活性化を起こすからだとしてきた一連の報告も根拠がないことを、ショウジョウバエの例から実証してしまっただけです。

正しいコントロールをとらなかつたつけが、いろんなところに回ってきたのです。

第14話 制限食の寿命延長効果も、あやしいのか？

カロリーを減らした制限食は、下等生物から霊長類に至るまで、寿命を延長させる唯一の手段と言われて久しいところですが、この効果が、sirtuinの活性化にあることが示されて以来、にわかに活気づいたのが、制限食代替分子を探す仕事でした。もはや、薬を飲むように、寿命延長をはかる物質を発見できるのは目前かのような勢いでしたが、暗転しました。前述のように、sirtuin は、寿

命と関係なかったのです。

正しいコントロールを取らなかったと言いましたが、この制限食の寿命延長効果にも、私には、前から引っかかることがありました。

丁度、40年前になります。私がNIAに留学中の時、制限食によるネズミの寿命延長が報告され、研究所内で大きな話題になりました。しかし、私の気を引いた議論は、実は、この正しいコントロールの取り方だったのです。当時すでに、自由摂食群が、実際は過剰カロリー群ではないかと、Barrows博士からの指摘があったのです。成長、生殖の良さを指標に高タンパクの餌が開発され、高齢期での障害などは、顧みられていないとのことでした。ネズミでは、タンパク尿もあり、腎臓への過重負担が指摘されたのです。

当時、同じラボに留学中の廣川勝彦先生（本学会員）や平野俊夫先生（現阪大総長）がそれを記憶しているかもしれません。

今でいう断続的な制限食こそが、野生生物の摂食であり、私たちが言う自由摂食とは、すなわち、過剰栄養による病的な状態で、寿命短縮が起きたと解釈できたわけなのです。

第15話 既成事実にはチャレンジを

コントロールの視点の取り方一つで、制限食の解釈は、寿命延長でなく、寿命短縮の結果に変わります。この教訓は、NIAで、意識されていたのに違いありませんが、生かし切れていないように見えます。アカゲサルでの最終結果とその人間への外挿に注目しましょう。楽しみです。

暴飲暴食に陥りがちな我々、そして、やせすぎを目指している女性たち、どちらも寿命を縮めているのではありませんか？

一方、遺伝子改変によって、寿命を延長した生物には多数の例が知られています。ただこれも、特殊に開発さ

れてきた実験動物モデルでの結果です。正しいコントロールが、気になるところです。

結局のところ、生物の寿命を延長すると期待された根拠はどこに行ってしまったのでしょうか。分子機序も、すっかり混沌としてしまいましたね。

それにしても、多数の優秀な研究者が、大きな回り道をしてしまいました。今後、どのように再構築できるでしょうか？ 簡単な外因子で、安易に寿命を変えられると考えるのが、そもそも間違いなのでは？

事起こし⑨です。

科学は、大勢のストーリーに従っていると安心し、論文が書きやすいものですから、流されてしまう危険があります。

“Challenging published results is an essential aspect of science”を、今こそ、もう一度見直したいものです。私はiPS細胞の世界でそれを、試してみます。皆さんも如何？

おわりに

基礎老化研究の 事初めと事起こし を長く発信してきましたが、今回のChallengingなセリフをもって、修了とさせていただきます。

実は、事起こし⑦において、成体から老化細胞を選択的に除去する方法と実施を提案しました。嬉しいことに、NATURE 11月号においてp16遺伝子の発現を指標に、それが実行されましたね。Science誌が選ぶ今年10大科学ニュースに入っています。ただ、これも、特殊な改変マウスの系ですし、個体寿命への効果は言及されていません。それが残念です。更にリファインした老化細胞の指標を使って、チャレンジする人を期待しています。

また、いつかお会いしましょう。

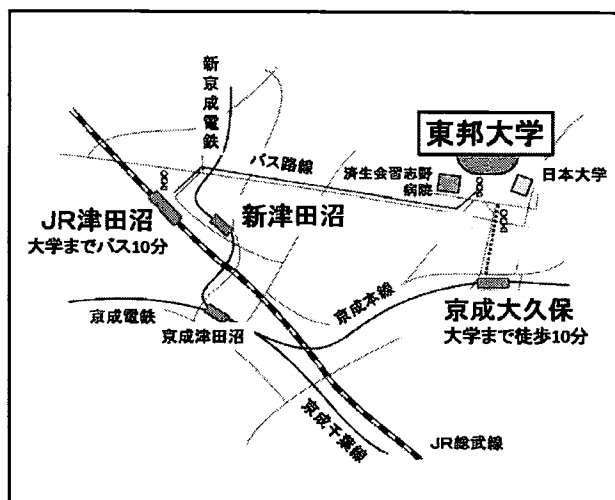
【お知らせ】

第35回日本基礎老化学会大会のご案内

日本基礎老化学会の第35回大会は2012年7月26日（木）、27日（金）に東邦大学習志野キャンパス（千葉県船橋市）にて開催します。多くの会員のご参加と活発なディスカッションを期待しております。

【開催要領】

大会会長：高橋 良哉（東邦大学薬学部生化学教室）
会 期：2012年7月26日（木）・27日（金）
会 場：東邦大学習志野キャンパス
〒274-8510 千葉県船橋市三山2-2-1
<http://www.phar.toho-u.ac.jp/>
事務局：〒274-8510 千葉県船橋市三山2-2-1
東邦大学薬学部生化学教室
日本基礎老化学会第35回大会事務局
担当：大寺恵子
E-mail: 35jsbg@phar.toho-u.ac.jp
TEL/FAX: 047-472-1546/1562



【プログラム概要（予定）】

- < 前 日 > 7月25日（水）
理事会
- < 第1日目 > 7月26日（木）
一般演題（口頭）、評議委員会、特別講演、一般演題（ポスター発表）、懇親会
- < 第2日目 > 7月27日（金）
一般演題（口頭）、シンポジウム、総会 / 市民公開講座

【一般演題募集】

締切日：4月20日（金）

演題登録・要旨は、日本基礎老化学会ホームページ（<http://www.tmig.or.jp/jsbg/>）より所定のファイルをダウンロードして作成し、大会事務局に送付ください。原則的に一般演題はポスター発表とし、一部口頭発表をお願いいたします。若手奨励賞エントリー者（40歳以下）は口頭発表とポスター発表の両方を行って頂く予定です。お送り頂いた要旨は、大会事務局のプログラム委員会に於いて査読し、採択の可否、発表形式、発表日時等を決定致します。

【事前参加費】

締切日：7月10日（火）

一般会員	8,000円（当日 10,000円）
学生会員	5,000円（当日 6,000円）
非会員	10,000円（当日 12,000円）

【懇親会】

事前参加費との同時振り込みにご協力お願いいたします。

一般会員・非会員	5,000円
学生会員	2,000円

会場：東邦大学習志野キャンパス PAL 2階

本大会の最新情報や詳しいご案内は、本学会または本学部ホームページで随時掲載して行く予定です。

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36巻 第1号

平成24年(2012)2月10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 三陽メディア株式会社

基礎老化学会サーキュラー 第92号

日本基礎老化学会 Japan Society for Biomedical Gerontology

2012年2月10日 発行

【事務局より】	1
【会員異動】	2
【日本基礎老化学会会員の動向】	2
【日本基礎老化学会賛助会員】	3

【事務局より】

【日本基礎老化学会入会のご案内および会費納入のお願い】

日本基礎老化学会への入会ご希望の方は、日本基礎老化学会ホームページ (<http://www.tmig.or.jp/jsbg/index.html>) に掲載されています入会申込書 (MS Word版) をダウンロードして記入し、e-mailに添付してお送りください。本号末尾の入会申込書を使っても構いません。折り返し、会費納入のご案内をお送り申し上げます。また、既に会員になっていただいている方には、今年度の会費の納入をお願い申し上げます。会費は正会員が7000円、学生会員は2000円です。未納分についてご質問のある方は、入金される前にメールにて事務局 (jsbg@tmig.or.jp) にお問い合わせください。会費の振込は同封の払込取扱票にご記入の上郵便振込をしていただくか、銀行振込ですることができます。銀行振込の場合は振込することをメールで下記メールアドレスにお知らせいただいた上で下記の銀行口座にお支払いください。

【日本基礎老化学会の賛助会員入会のご案内】

日本基礎老化学会の賛助会員には以下の特典があります。

- (1) 当学会の雑誌「基礎老化研究」を毎号お送りいたします。
- (2) 「基礎老化研究」に年4回まで広告を無料で掲載することができます。広告の版下を郵便またはメールに添付して下記の学会事務局にお送りください。大きさはA4用紙半ページです。
- (3) 年1回開かれる日本基礎老化学会大会に1名に限り無料で参加できます。

賛助会員をご希望の方は下記学会事務局にお知らせくだされば入会申込書をお送りいたします。本号末尾にある入会申込書に必要な事項をご記入の上、下記宛に郵便またはFAXでお送りください。入会申込書をPDF版にしたものをe-mailに添付してお送りくださっても構いません。賛助会員の会費は一口、年5万円です。会費の振込は郵便局あるいは下記の銀行口座をお願いいたします。郵便振替の場合は本号に綴じ込んである払込取扱票かあるいは入会申込書に同封の払込取扱票にご記入の上、切り取って、最寄りの郵便局でお支払いください。

日本基礎老化学会事務局

〒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

FAX: 03-3579-4776

E-mail: jsbg@tmig.or.jp

【銀行口座にお振込の場合】

みずほ銀行 (銀行コード0001)

大山支店 (支店番号628)

普通103406

名前 (口座使用者): 日本基礎老化学会

【基礎老化研究誌に広告をご希望の方へ】

基礎老化研究誌に広告を載せることができます。半ページ3万円、1ページ5万円で毎号年4回掲載します。ご希望の方は学会事務局にご一報ください。

【退会に際してのご注意】

退会の管理を適性かつ厳密に行うために、下記の事項をお守りください。

- (1) 退会の際は、書式は自由ですが、ご自身の署名と捺印のある退会届を事務局までお送りください。ただし、お急ぎの場合は電子メールによる退会手続きも受け付けております。
- (2) 日本基礎老化学会の会計年度は4月1日～3月31日となっています。従いまして、退会時が年度途中の場合でも、その年度の「年会費」はお支払いいただくこととなりますのでご了承ください。

【E-mailについて】

学会事務局と会員の皆様との連絡を迅速に行うため、本学会ではE-mailを活用しています。メールにて会員の皆様に連絡等のご希望がございましたら、事務局宛にご連絡ください。また、メールアドレス登録のお済みでない、あるいは変更された会員の皆様（メールが配信されない事態が発生しています）は、アドレスを下記事務局宛にE-mailでお送りください。なお、アドレスをお持ちでない会員は事務局までご連絡ください。E-mailアドレスはjsbg@tmig.or.jpです。ご協力よろしくお願い申し上げます。

【基礎老化学会ホームページについて】

日本基礎老化学会ホームページのアドレスは <http://www.tmig.or.jp/jsbg> です。是非ご覧ください。また、ホームページに掲載を希望する記事等がございましたら、学会事務局までご連絡ください。

入退会、住所変更、会費等についての手続きは、下記の学会事務局へお問い合わせください。特に大学等の研究室を離れた会員の動向につきまして、指導されていた先生からのご連絡をお願いします。

日本基礎老化学会事務局
〒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
FAX: 03-3579-4776
E-mail: jsbg@tmig.or.jp

【会員異動】

平成23年9月22日～平成23年12月15日

(入会者)

氏名	所属	〒	住所
榎本 圭	アスピオファーマ株式会社 探索第二ファカルティ	650-0047	神戸市中央区港島港町6-4-3
山田 篤	東京理科大学薬学部薬学科 分子病理・代謝学	278-8510	野田市山崎2641
湊 将太	東京理科大学薬学部薬学科 分子病理・代謝学	278-8510	野田市山崎2641
岸本 憲人	名古屋市立大学大学院医学研究科 再生医学分野	467-8601	名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄1

(所属変更)

藤井 道彦	横浜市立大学 生命ナノシステム科学研究科	236-0027	横浜市金沢区瀬戸22-2
-------	-------------------------	----------	--------------

(退会者)

二見晶（ご逝去）、篠原恒樹（ご逝去）、渡邊和忠、武田裕

【日本基礎老化学会会員の動向】

会員数（2011/12/15現在）

正会員：270名

学生会員：52名

合計：322名

【日本基礎老化学会賛助会員一覧】

下記の諸団体に賛助会員としてご参加いただいております。ご協力感谢您いたします。

株式会社 明治 研究本部

株式会社 ファンケル総合研究所

東京大学高齢社会総合研究部門 秋山弘子教授

小林製薬中央研究所 研究部

東レ株式会社 医薬医療事業本部

日本水産株式会社

日本基礎老化学会 入会申込書 (正会員・学生会員)

記入日 西暦 年 月 日

ふりがな		生年月日	性別
氏名		西暦 年 月 日生	男女

正会員用欄 (該当するものに○)
 学部卒業、修士課程修了、博士課程修了
 種類：理・獣医・医・歯・薬・工・その他

学生会員用欄 (該当するものに○)
 学部、修士、博士 年在学
 理・獣医・医・歯・薬・工・その他

所属機関 (部署名まで記載すること。学生会員登録の場合は研究指導者の名も記入して下さい。)

住所 〒

電話番号 (内線) FAX
 E-mail 研究指導者 (学生会員の場合)

役職名 (学位 :)

専門分野のキーワード 1. 2. 3.

所属機関以外を連絡先にしたい場合は下記にその住所を記入してください。

〒

電話番号 (内線) FAX
 E-mail

送り先：〒173-0015 東京都板橋区栄町 35-2 東京都老人総合研究所内 日本基礎老化学会事務局

Mail address : jsbg@tmig.or.jp FAX 03-3579-4776

日本基礎老化学会賛助会員 入会申込書

平成 年 月 日

日本基礎老化学会理事長

石井 直明 殿

その趣旨に賛同し、下記の通り日本基礎老化学会に賛助会員として入会いたします。

入会口数 _____ 口

但し、賛助会員費 1 口 年五万円（会計年度：4月1日より翌年3月31日まで）

名称（あるいは氏名）：

担当責任者役職名：

氏名：

印

住所：

電話番号：

FAX 番号：

e-mail：

入会申し込み送付先：

日本基礎老化学会事務局

〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2 地方独立法人東京都健康長寿医療センター研
究所内

e-mail: jsbg@tmig.or.jp

基礎老化学会サーキュラー 第92号

2012年2月10日 発行
日本基礎老化学会

編集委員 三浦 ゆり (幹事)
事務局 〒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

印刷所 三陽メディア株式会社