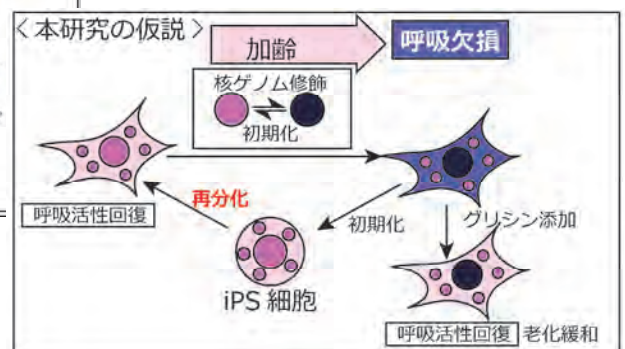
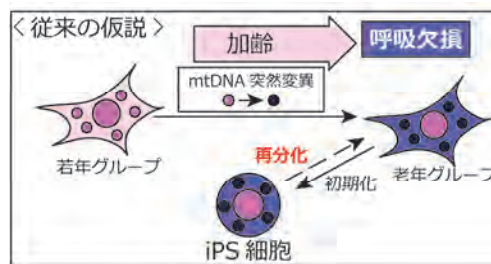


# BIOMEDICAL GERONTOLOGY

## 基礎老化研究

### 特集企画 「ストレスと老化・疾患」

- 総説 個体老化を左右する変幻自在な細胞；－学会の成長と未来研究に想いを馳せて－  
三井 洋司
- 特集企画 「ストレスと老化・疾患」
- 総説 哺乳類ミトコンドリアゲノムの突然変異ががん化と老化に与える影響  
林 純一
- 総説 酸化ストレスによる神経突起変性の誘因  
福井 浩二
- 総説 ゲノムに蓄積した8-oxoguanineに起因する病態とその防御機構－発がんから神経変性まで－  
中別府 雄作
- トピックス ● 脂肪組織特異的CREG1トランスジェニックマウスを利用した褐色脂肪化促進と生活習慣病改善の検討  
橋本 理尋、楠堂 達也、竹内 環、遠藤 優貴、山下 均
- トピックス ● *Lactobacillus gasseri* SBT2055の寿命延長・抗老化作用メカニズムの解明  
中川 久子、宮崎 忠昭
- トピックス ● ミトコンドリア病診断マーカーGDF15の同定と老年医学への応用  
藤田 泰典
- 大会報告 ● 第39回日本基礎老化学会大会報告  
石井 直明
- 大会見聞録 ● 第39回日本基礎老化学会大会に参加して  
海野 けい子
- 追悼文 ● 今堀和友先生とその時代  
丸山 直記



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

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

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

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

千葉 卓哉 早稲田大学 人間科学学術院 基礎老化学研究室  
〒359-1192 埼玉県所沢市三ヶ島2-579-15

渡辺 信博 東京都健康長寿医療センター研究所 老化脳神経科学研究チーム  
〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2

---

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

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

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

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

Takuya Chiba, Biomedical Gerontology Laboratory, Faculty of Human  
Sciences, and Institute of Applied Brain Sciences, Waseda University,  
2-579-15 Mikajima, Tokorozawa, Saitama 359-1192, JAPAN

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

## 【日本基礎老化学会賛助会員一覧】

下記の諸団体が賛助会員として本学会を支えています。

賛助会員は随時募集しております。事務局にお問い合わせください。

あなたの会社も老化研究を支えてみませんか？入会をお待ちしています。

### 賛助会員

合同会社 オータニ

小林製薬 中央研究所 研究部

重岡胃腸科外科医院

日本水産株式会社

(株) ファンケル総合研究所

株式会社 不二工芸製作所

(株) 明治 研究本部

Medical information network

医療法人 裕和会

### 広告会員

岩井化学薬品株式会社

(50音順)

私たちの遅れが、  
研究の遅れになってはいけません。

今、さまざまな場所で、さまざまな生命科学に関する研究が行われています。それは、現代の医学では治せない病の研究だったり、人のカラダの仕組みを解明する研究だったりします。私たちは、そんな研究の素となる、抗体、タンパク質、有機・無機化合物、各種測定キットなど数多くの研究用試薬を国内外へ提供。発展し続けるライフサイエンス分野の最新研究動向を的確に把握し、さまざまなニーズに応えた戦略を展開しています。私たちが動向を把握していないことで、ある研究が進まない。そんなことがないように、研究者の方々の信頼を得ながら、これからも研究用試薬をお届けしていきます。

研究を、研究したい。

岩井化学薬品株式会社

〒103-0023 東京都中央区日本橋本町3-2-10  
TEL:03-3241-2572 FAX:03-3270-2444

[www.iwai-chem.co.jp](http://www.iwai-chem.co.jp)

## この雑誌について（投稿される方へ）

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

## 投稿規定

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

## 執筆要領

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

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

る位置に [ ] で括って表示する。

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

編集委員会：editor@jsbmg.jp

## 目 次

### 総説

個体老化を左右する変幻自在な細胞；－学会の成長と未来研究に想いを馳せて－

三井 洋司 ..... 1-5

特集企画「ストレスと老化・疾患」 ..... 7

### 総説

哺乳類ミトコンドリアゲノムの突然変異ががん化と老化に与える影響

林 純一 ..... 9-15

### 総説

酸化ストレスによる神経突起変性の誘因

福井 浩二 ..... 17-21

### 総説

ゲノムに蓄積した 8-oxoguanine に起因する病態とその防御機構

－発がんから神経変性まで－

中別府 雄作 ..... 23-31

### トピックス

脂肪組織特異的 CREG1 トランスジェニックマウスを利用した褐色脂肪化促進と

生活習慣病改善の検討

橋本 理尋、楠堂 達也、竹内 環、遠藤 優貴、山下 均 ..... 33-35

### トピックス

*Lactobacillus gasseri* SBT2055 の寿命延長・抗老化作用メカニズムの解明

中川 久子、宮崎 忠昭 ..... 37-39

### トピックス

ミトコンドリア病診断マーカー GDF15 の同定と老年医学への応用

藤田 泰典 ..... 41-43

### 大会報告

第 39 回日本基礎老化学会大会報告

石井 直明 ..... 45-46

### 大会見聞録

第 39 回日本基礎老化学会大会に参加して

海野 けい子 ..... 47

### 追悼文

今堀和友先生とその時代

丸山 直記 ..... 49-50

---

表紙図の説明：老化に伴う呼吸欠損は、核ゲノムのゲノム修飾にあるという筆者らの新仮説。(9-15 ページの総説を参照)。

【総説】

個体老化を左右する変幻自在な細胞；  
—学会の成長と未来研究に想いを馳せて—

三井 洋司

国際科学振興財団 (FAIS) 研究開発部 特任研究員

はじめに、

半世紀近く私のライフワークとなった主な研究が、縁を得て始まった老化や寿命に対する実験解析や考察に終始できそうなことを、私はとても意義深く感じている。その過程を紹介すると共に意義深さの理由を本学会員にも伝え、自分の意を新たにもしたく、ここに筆を執る次第である。

1 研究と思索の重み

今までに関わってきた多々なる学会も、煎じ詰めれば技術開発としての日本組織培養学会と思索形成としての日本基礎老化学会、の二つに集約できると、最近、実感することになった。技術は、思索を深めるための貴重な手段である。細胞の生体外培養を精緻に実現すれば、生命の有り様を示してくれる。同時に所詮は技術であるから、その開発次第によって、実際を下回ることも、はるかに越えることも可能である。しかしそれは積み重ねを得て、思索形成に強い evidence を提供する。その思索とは私にとって、ヒト個体や細胞の成り立ちと寿命であった。老化や寿命の研究は、それほど深く自分の人生にかかわっていたのであろう。

研究の成果には、外向けに公表する創造的な原著論文と、それに並行して内面的に深め、充実させる精神活動があるだろう。ただ自分の場合、英語原著論文はおよそ230報、そして総説、解説も同数程度を發表しているが、本当に大事で画期的といえる論文は1割にも及ばない。所詮そんなものとは言え、大部分の論文数や研究費を稼ぐに利する仕事には、大した感慨もなく、虚しさが残る。他方で、研究活動に相乗して老化、寿命の多様性、必然性やそれらの仕組みを生物進化の視点からずっと考察してきた。その思索活動は、自分自身の生きていくことへの意義と有り様を照らすものだから、その過程は大いなる充実と期待の連続である。基礎老化学会、老年学会を通じて得たそうした生、老、病、死に対する思索の成果は、実験科学の現場を離れつつある今や、自分自身をまな板に載せて、納得した生きざまに導く実験的な指針で

あり続ける。

こうした述懐をもとに、本稿では、思索の軌跡を辿りつつ学会設立のいきさつを始め、今でも気になっている研究の課題や行方に言及して、老化研究に関わってきたことへの喜びと意義深さを、本学会員と共有したく思っている。

2 進化の視点、その始まり

「安田講堂燃える！」とは、私の大学院時代を象徴する出来事である。高校生の折には、安保条約への闘争時代に揺れ、入学した大学構内では、今回政界を引退した江田五月さん達の巨大プラカードや赤旗に迎えられた。悩んだ末の進路決定では、薬学での基礎医学研究に挑戦することを決意した私は、なおも自分の価値観や生き様を揺さぶられ続けた。

そして1964年の春だった。本郷キャンパスで開催された大学祭に、思い切ってシンポジウムの提案をした。「世界観の統一を求めて——」である。当時自分のキリスト教や仏教への関わりと周囲を取り巻くマルキシズムの風潮の中、「物質の進化から観る」のが私の行きついた視点となった。賛同する友人も得て、講師依頼の交渉に奔走した。流石である。学内には超一流の先生方がそろっており、謝金なしに快諾し、自分も大いに興味あると応援してくれた。最初は小野先生による「宇宙の進化」、続いて「地球の進化と生命の誕生」を話していただいた。3つ目は単純に、生物の進化と題するのを避けて、時実先生に「脳の進化から辿るヒト」の話に依頼した。精神活動も物質の進化から観たかったのである。そして最後に「ヒト社会への進化」を話してもらった筈だが、記憶があいまいである。

この企画は大いに興味を引き、歴史ある広い階段講堂で、講師の先生方も最後まで議論に沸いた。終了して帰り際、「私たちも、進化という統一テーマで、他分野の先生方と議論できる機会は貴重だった」と、又「この記録は出版に値するよー」とも、激励された。

録音テープを見失って出版をできずにいるのが、残念至極である。

その後50年たった今、各学問領域の大きな発展を反映した同一企画を実現できたならまさに研究者冥利に尽きることであろう。

当時に思ったことがある。物質は進化し続けている。新しく生じた多様な分子などは、その複雑な相互作用か

連絡先：三井洋司 〒791-8013

愛媛県松山市山越1-7-13 エクゼコート山越206号

TEL：090-1540-8953

E-mail：ymitsui8310@gmail.com



ら新機能を獲得した集合体を生じる。そして次々と更に上位階層の集合体を形成して、予測不能な特性を獲得したうえ、いっそう進化し続ける。今のこの世界はこうした進化の足跡を残しつつ、それらの限りない多彩な相互作用から成り立つ。遺伝子の働きや人間の行動、さらに宇宙をも見据える精神活動さえ、そうして物質が進化した結果であり、いくら下位階層の構造、機能を究明しても上位階層の正確な予測は不可能であると。しからば、生物には階層ごとに主要な強い相互作用を見極めて、その応答については所詮、近似の推測をするに過ぎないのがサイエンスと言われるものだ。

こうした思いが、今の研究課題に影響しているかもしれない。生物寿命の多様性は、何に由来するか？ ヒト種の寿命に強く相互作用するのは、何だろうか？

### 3 老化研究の幕開け

連日、実験室の窓からは、武闘訓練するヘルメット学生集団の叫びがひびく。多数の研究室封鎖や弾劾集会が長く続く中、ついに機動隊が導入されて、占拠されていた安田講堂は催涙弾にまみれ、燃え上がった。混乱からの安堵と同時に研究への不安がよぎって立ちすくんだ。この大学紛争は若者による学問、研究それ自体の目的を問い直させる世界的な運動の一環でもあった。ところが強権によって弾圧されたその問いは、答える TPO を失って、個々人の内面で漂い、行き場をさまよった。

不甲斐ない思いの下に学位を得たが、その後バイオ医学研究に専念しなかった私に、大変恵まれた offer を頂いた。放射線とコラーゲン、繊維芽細胞の増殖性と栄養などで、多少の老化研究に携わっていた指導教官の鶴藤丞先生からだ。当時、財政的にも隆盛を誇っていた美濃部都政がその目玉として老人問題の解決を目指した。基礎生物学から臨床、社会福祉まで取り上げる総合研究所の設立を計画したのである。おかげで養育院企画部の研究所開設委員となり、翌年4月に東京都老人総合研究所が開設した。1972年の事である。同時に私は薬理学部の研究員として再出発した。当時、老化の生物学を本格的に進めていた研究者は殆どいなかったの、各専門領域では相当の権威だった部長や室長達も、実態はそれぞれの持ち越し研究で成果を競いながら、老化研究の進め方は手探りの状態であった。そこで若い自分たちも、老化や寿命に関する勉強で切磋琢磨し、対等に近い議論を大いに楽しんだ。

### 4 米国 NIA の設立と細胞老化研究のスタート

ラット繊維芽細胞の培養系を使って増殖制御因子の精製を進めていた私に、翌年早くも米国 NIH に属する Gerontology Research Center へ老化研究での留学の誘いがあった。放医研の佐渡俊彦先生からだ。Shock 博士の率いるこの GRC で私は始めて、ヒト正常繊維芽細胞の分裂寿命とヒト年齢との相関を解析した。当時 Gorge Martin が年齢が進むにつれて分裂寿命は直線的に短縮すると報告していたが、直線を示すと決めてかかる統計処理に間違いがあったのだ。ボルチモア住民の

縦断的健康指標とリンクした我々の研究は、30歳前後と60歳前後とで細胞には明らかな増殖の衰えや、寿命短縮のあることを結論できた (PNAS, 1976)。ただ、この分裂寿命の概念を提唱した Hayflick 博士と NIH とは、その WI38 細胞の帰属問題で裁判係争中であつたり、細胞寿命も技術的なミスではないかと、その真偽について科学界に溝の深い論争があつた。しかし、私は自分自身の経験から、細胞分裂寿命に対する確信がゆるぎないものとなつていた。

一方、私の GRC 滞在中の一年目には NIH 本部に NIA が設立された。NICHD という小児成長医学研究所に属していた GRC を、加齢医学研究所の設立で昇格させ、米国において本格的な老化研究が再出発したのである。

2年余りに老人研に復帰した私は、極く早期の WI38 細胞が入手できなくなつてた為、細胞老化研究に使うヒト細胞を自分たちで樹立することに奔走した。規制の少ない当時、合法的に入手できたヒト胎児にメスを入れた時には、孤独な中で震える心と科学に貢献する引き締まった思いが交差した。こうして分離した最初の TIG-1 細胞について、仲間と協力して特性を明らかにし、その後の細胞老化研究の標準株となつた。それは後年に、私が不死化細胞や iPS 細胞を樹立する親株にもなつたのだ。

### 5 基礎老化研究会の発足と学会への発展

帰国後すぐに、私は細胞老化の研究に専念したが、自分の成果発表は主に日本組織培養学会であつた。ところが、細胞の癌化に注力を注いでいた学会の創設者である学会長は自ら立ち上がり、「君のデータは信用できるだろうけど、細胞に寿命があるとは信じない！」と、コメントしたものだ。生化学会でも発表する機会があつたが、討論は表面的に終わり、両学会とも生物の老化そのものを議論する場になり得なかつた。そのことを、老人研で生化学部長だった永井克孝先生に嘆いたところ、「よし、分かつた」と言うなり、所長の太田邦夫先生のところへふっ飛んで行つた。それからは矢継ぎ早に事が運んだ。永井先生のお手伝いで同席する中、「学会とはこうして作るのか！」と私が仰天するほどの、太田先生の俊敏な英断で、各地域代表からなる基礎老化研究会が立ち上がったのである。第一回大会は、大学院後期時代に師事した山田正篤先生が主催し、田内久先生が「組織内の細胞老化」で特別講演をなさつた。老化の特徴は細胞の減数であり、疾病と峻別すべし、と説いた。1977年の事である。そして4年後、学会という今の組織に改めたが、最初は役員を選挙をしなかつた。これでいいのかなーと心配したものである。学会に基盤ができたことで、我々の議論は単に、分子レベル、細胞レベル、臓器レベルでの現象記述に終わることの無いように意識されたのは、大きな発展と喜びだつた。

### 6 老化プログラム説の検証に新手法

老化の理論も混沌としていた初期の頃、年会の合間に開催するシンポジウムにおいて老化学説が取り上げら

れ、私にプログラム説を話せとの事だった。細胞分裂回数の限界性がプログラムされているとの印象を与えていたからであろう。生物の最大寿命が多様であるなか、動物種に応じて特有な一定値を示すことは、遺伝子プログラムへの大きな示唆だった。しかし、一卵性双生児の寿命解析から、遺伝子より環境因子のほうがはるかに、寿命への影響が強いと示唆されてもいた。しかも老化を発生と同じように遺伝子にプログラムされているとの根拠は、何も提示されていなかった。発生と老化とに違いはあるのだろうか、それはどのように表わされるのだろうか、宿題講演の迫る中、頭も気持ちもその疑問で一杯だった。そして突然に閃いたことがあった。ゴンペルツ曲線の活用である。人の死亡割合を年代ごとに算出して対数で縦軸に示し（初期は発生異常者、末期は遺伝的エリートとみて、その時期を除外すると）、年齢を横軸にしてプロットすると直線で表せることである。しかも自分で日本人の生命表からデータをとって10年毎にそれを作図すれば、直線は横に並行移動するだけで、その傾きはいつも一定であった。すなわち、直線の傾きである遺伝子的要因と横にずれて死亡率の変わる環境的要因（医療進歩の貢献も含めて）との分離ができると考えた。他の生物種にその適用を図ると、温度や栄養などで寿命が延びる中、その傾斜度は一定であり、各動物に固有の値と分かったのである。そこで、この傾斜度は生物の老化速度と言い換えてもよいと考えられた。

私はこれを、人間の発生現象と老化現象の比較に応用してみたのである。成熟前の幼少期発生の一部と思われる現象として、3本目の歯が生えてくる割合、1mの背丈に達する割合、初潮の始まる割合などを任意に取り上げて、各年齢ごとにプロットしたのである。一方、必然的な老化現象として閉経の起こる割合などを計算して作図し、これらを比較した。その結果、いずれの発生現象も老化速度の様な直線性を示さないことが判明した。

老化は発生の様なプログラムに沿った事象ではないということが、始めて可視化、実証されたと考えている。この知見は、プログラム説と題して公表された（臨床老年医学体系 第1巻, 1983）。そこでは更に考察を深めて、細胞が分裂回数を計り、分裂寿命に至るクロック機構を推測した。そして配列が多数回も繰り返される遺伝子、例えばリボソーム遺伝子などに例をとって、それが細胞分裂のたびに消失する機構を提案した。テロメア配列リピートの短縮が言われるずっと以前の事である。

## 7 公立研究所の独立行政法人化と細胞老化説の受難

ヒトの繊維芽細胞から血管内皮細胞へと細胞老化モデルを追加して、個体老化との接点を探りつつあった私たちに、大きな事件が起きた。老人研の設立以来10年の頃である。経済不振の下で公務員削減を迫られ、研究所の独立法人化が強いられたのである。一大事でありながら一枚板でない研究者間の溝も深まった。この機に今堀和友2代目所長の新体制を歓迎する向きは、法人化反対運動に白い眼を向けた。しかもこの頃、研究所内部と多くの科学者から、細胞老化はアーティファクトであり、

その研究は無意味だとする非難の風も吹き荒れていた。これが克服されるのは更に何年もの忍耐と不屈の研究魂が必要であった。

それでも耐えた老人研で、今も記憶に残る仕事がある。老化で肥大化した核のタンパク質を院生の坂上宏君と解析していた途中、妙に気にかかったのが、ヒストンの動向だった。トリチュウムとカーボン14で標識したリジンを使ってそれぞれ老若細胞を培養して混合し、ヒストン各分画での比較をする方法で解析した。その結果スクレオソームを繋ぐHIの量が減少している事が、明瞭に実証された（ECR, 1980）。それはWerner細胞でも確認された。クロマチン構造の破たんや遺伝子発現パターンの乱れを意味するだろうが、原因は不明のままで、当時は注目も受けなかった。しかし、15年ほどたった後、石川冬樹教授のグループが再発見をしてくれたのだ。その後の展開が気にかかっている。

クロマチン構造と機能変化の関係で、今でも私は分化細胞と老化細胞の厳密な違いに関心がある。最終分裂停止するのは共通しながら、分化は遺伝子が正常で、その発現が特化されていくのに対比して、老化はクロマチンと遺伝子の傷害が起り、発現の制御に破たんが生じていると考えている。その可視化と分子指標を使って、生体内の分化細胞と老化細胞の選別と除去の技術開発に応用できないだろうか。若い人の奮起を願っている。

## 8 エンドセリンの発見と肺高血圧症治療薬

私は法人化された老人研を2年後に去り、つくば市にある通産省の微生物工業技術総合研究所で動物細胞研究室の新設に携わった。「細胞大量培養」の産官学による次世代プロジェクトに参加するため、1984年秋だった。これは、老人研でヒト細胞の分裂寿命と制御因子、そしてミニプタ血管内皮細胞の無限寿命化を研究した私には、打って付けの巨大プロジェクトだった。

その後、その不死化したプタ内皮細胞を使って無血清培養を実施し、その培養液から血管収縮因子の精製に至り、ヒト血管内皮細胞からのエンドセリン遺伝子を発見したのである。筑波大真崎先生グループが主導してチームを作った共同研究の成果であった（Nature 1988）。更に、エンドセリン family である新規のVIC 遺伝子を私たちはマウスから見つけ、腸管での働きを提案した（JBC 1989）。今も続くエンドセリン国際学会が設立され、製薬業界も大きく動いた。現在はその受容体拮抗薬が肺高血圧症の治療薬として臨床で使われている。特許取得はいろいろあるが、このように自分たちの基礎研究の成果が実際に疾病の治療に使われるようになった例には、研究者冥利に尽きる思いがある。エンドセリンは平滑筋の収縮や、心筋細胞の拍動を誘導する（FEBS Letter, 1990）だけでなく、心筋細胞自身が分泌すると分かった（BBRC, 1993）。また、これは細胞の増殖期に分泌されるのに、分裂寿命後期の細胞とか高齢者由来の血管細胞において生産の上昇することが判明した（Lab. Invest, 1992）。老年病との関連も含め、新しい働きが未だ見つかるかと期待される。

## 9 テロメアの短縮とヒト細胞の不死化

テロメア反復配列が、DNA複製ごとに短縮化すると報告は、細胞分裂加齢（細胞老化）のクロック機構を説明するに、極めて適切だった。短縮の限界こそが分裂寿命（Hayflic 限界）の実態だったのだ。テロメアとテロメラーゼの発見で、ノーベル賞も授与された。そしてこれを機に細胞老化研究への世間の風は、温かくなってきた。ただ、ヒト細胞とは違って、正常マウス細胞でもテロメラーゼの発現の有ることを、実測した時には戸惑い、一元的な理解の難しさを実感したものだ。

しかし、ヒト細胞の老化を脱却する、すなわち無限寿命細胞株を取得すれば、テロメア長の維持によって細胞老化しないと実証できることは、容易に想定できた。そこで、テロメラーゼ遺伝子の強制発現を実行したのである。ほどなくヒトの皮膚繊維芽細胞、血管内皮細胞、肺繊維芽細胞（TIG-1）の集団培養で、確実に不死化細胞株の樹立に成功すること、更に不死に至る遺伝子発現の変動も報告するに至った（Int J Oncol, 2004, BBRC, 2007）。しかしテロメラーゼ遺伝子を導入された細胞について、個々のクローン別に、長期継代培養して追跡してみると、意外にも不死化するクローンは、数パーセントに過ぎなかった。テロメラーゼの発現に加えて、別の要因が必要なのであろう（Cell Biol Int, 2012）。

加えて、この不死化した TIG-1 細胞に、数種の癌遺伝子を導入しても、マウス細胞のような癌化細胞に達することは、困難であった。マウスよりもヒト細胞は、何かの変化に対する抵抗性、あるいは細胞特性の安定性が、獲得されていると感じた次第である。

このことは、次の iPS 細胞の樹立でも、感じられた。

## 10 iPS 細胞の樹立と細胞の変幻自在性

老化研究用の標準細胞として樹立した TIG-1 細胞を使って、不死化に続いて今度は iPS 化、つまり 4 種の山中因子を導入することで多能性幹細胞の樹立を図った。

いくつかの iPS クローンで 3 種の胚葉細胞に分化する能力も獲得させた（Hum Cell, 2011）。一方で、形成したテラトーマから分化形質を発現した細胞クローンを分離し、特定の条件で培養すると、今度は初期化遺伝子を発現するような脱分化が起こった。しかもその性質は再び喪失してしまうことが確認された。また一方で、テラトーマから軟寒天培地で増殖できる細胞クローンを分離して培養すると、その前がん状態の細胞特性は、やがて喪失してしまうのだった（Hum Cell, 2016）。

こうして我々は、TIG-1 というヒト正常細胞が一定の分裂寿命を例外なく持つが、遺伝子操作によって、分化形質を維持した不死化細胞を創出できる一方で、多能性幹細胞をも誘導できるようになった。まさに細胞は変幻自在である。しかもまた、その初期化状態とか、分化状態、前がん状態も互いに変換し得るような極めて不安定な、言い換えれば、変幻自在な特性であることを知った。この変幻自在性は、細胞の進化を反映すると私は考えている。

## 11 進化からの教訓

紙面の都合で、先を急ぐことにする。

生物界を辿ると、単細胞生物の無限増殖性と変異性は明らかであるが、多細胞生物に向かう過程で、原始的な体細胞と生殖細胞が生じる。そして無限増殖性は生殖細胞が担い、体細胞の分裂停止が容認される。個体における体細胞の分裂寿命性が発生したのであるが、初期には幹細胞的な再生能力も発揮した。生殖細胞は特殊な分化をした半面、生殖に伴う遺伝子の再編成で、全能的な多能性を保証した。しかも適度な変異性によって、個体進化の可能性を確保したのである。そうした個体は環境適応に伴う選別と中立的生残によって、予想もできない多様性を発達させてきた。

我々ヒトの細胞もこうした多様な進化の結果の一部、成れの果てである。そうした過程は遺伝子個々、例えば最近の発見では接着分子の遺伝子、の系統樹からも窺い知ることができる。今後、技術の粋を尽くせば、下等生物で機能した残骸遺伝子の働きを誘導も出来るだろう。体細胞に潜む全能性も引き出すことが可能であろう。

しかし、今、老化と死の必然性が、明らかになっている。これは生物にとって悪いことなのだろうか？ 例えば、体細胞の分裂停止は癌化リスクとの trade off だったり、体細胞死による個体の寿命は、生殖細胞による次世代への遺伝子保存との trade off だったりするだろう。進化は生物の多様性を生んで来たがこうした trade off のうち、一方だけをずっと選択し続けてきたのである。生物の個体死は、生物の生存継続性を保つ、必然の結果とも考えられる。遺伝子改造の臓器は移植出来ても、更に、脳での記憶を再現、移し替えができたとしても、所詮は、無限に生きることは出来ないし、その意義もない。寿命の有限性を必然と認識すれば、生きること、その終焉をも視野に入れることだ。

## 12 終わりに

人間の技術と欲は、際限なく発達しうる。変幻自在なる体細胞をもとに、技術を尽くせば、遺伝子改造を施した人間個体をも創造できるだろう。性（生）の曖昧な生き物もできるだろう。しかし、それはもうヒトと呼べる生物ではない。

不備の有る遺伝子保有者が、その改造を求める事は当然の願いであり、権利でもあろう。だから、健康と長寿を保つ遺伝子、そしてその機能をベストに保つ環境条件は、今後も解明されていくのを、若い研究者に期待する。物質、生命体の進化は、まだ途中である。不備を残したまま進行しているに違いない。その一方で、地球誕生からさえ 20 億年の物質進化の歴史はそれを良しとし、必然性をも包含している。生命体の根本のところは、絶え間なくその有り様を試され続けた結果に違いない。単純な分子や細胞改造で、「不老長寿が可能か！」と、期待する世間、マスコミや期待させる研究者は、進化の重みを再認識すべきと考えている。もちろんテロメラーゼの発現誘導因子による不老長寿化の安易なストーリーも含めてだ。

私は基礎老化研究者であったからこそ、死を包含した生の全体像を絶えず、考え続けてこれた。本学会員の皆さんとその幸運を共有したい。

最近は自分も、例えば百歳での自然死なら、その終焉

を周囲とともに感謝の心で迎えたく思っている次第である。自分の生きざまを、充実した生と性（子孫）のもと、全うするにあたって、本学会での成果を活かせるか、愉しみに。

【特集企画】

## 「ストレスと老化・疾患」

ヒトを含め生物は、体の内外から絶えず様々な刺激を受けており、過度な刺激はストレスとなって分子・細胞・組織・器官レベルで生体機能に障害を引き起こす。このようなストレスには、紫外線や放射線などの物理的、あるいは環境ホルモンや薬剤などの化学的な外的環境ストレス、さらには代謝バランスの変化により生体内酸化還元バランスを崩壊した内的環境ストレスがある。生体内で、これらのストレス消去や傷害された分子・細胞の除去修復、組織・器官障害の修復が滞りなく済まなければ、老化の促進や疾病の罹患リスクが増加する。基礎老化研究分野では、早老症あるいは長寿モデル動物の確立、および遺伝学・遺伝子改変技術の発展に伴い 1980 年代から 30 年以上に亘ってストレス研究が盛んに進められてきた。

本特集では、生体が分子・細胞・組織・器官レベルで受けるストレスによって、如何に老化や疾患を引き起こされているか、長年その分子メカニズムを精力的にご研究されてこられた先生方に近年の研究成果を踏まえご執筆頂きました。

まず、ミトコンドリアゲノム研究の第一人者であります筑波大学の林純一先生に「哺乳類ミトコンドリアゲノムの突然変異ががん化と老化に与える影響」と題して、老化に関わる新仮説を提唱される玉稿を賜りました。次に、酸化ストレスによる加齢依存的な神経突起変性のご研究に精力的に取り組まれております芝浦工業大学の福井浩二先生に「酸化ストレスによる神経突起変性の誘因」についてご寄稿賜りました。さらに、遺伝子損傷修復研究の第一人者であります九州大学の中別府雄作先生に「ゲノムに蓄積した 8-oxoguanine に起因する病態とその防御機構－発がんから神経変性まで－」と題して、酸化塩基による自然突然変異に起因する発がんや神経変性について玉稿を賜りました。

本特集企画が皆様の目に留まり、ストレス応答について関心と理解を深め、今後のストレス研究の躍進にご尽力頂けたら幸甚です。

基礎老化研究誌 編集委員

千葉 卓哉

石井 恭正

【総説】

## 哺乳類ミトコンドリアゲノムの突然変異ががん化と老化に与える影響

林 純一

筑波大学

### 要約

老化ミトコンドリア原因説によると、加齢に伴いミトコンドリアゲノム (mtDNA) に後天的に蓄積する突然変異 (体細胞突然変異) はミトコンドリアの呼吸活性低下を引き起こすため老化の原因になるという。さらにこの仮説では、老化のみならずがん化を含む老化関連疾患にも mtDNA の体細胞突然変異が関与しているというが、これらはすべて状況証拠の積み重ねの結論である。その後、mtDNA 複製酵素の校正機能を破壊したマウス (ミューテーターマウス) が作製され、mtDNA の体細胞突然変異が高頻度で誘発される結果、早期老化表現型を発現し短命であることが示された。これによってこの仮説はより強固なものとなり現在でも多くの研究者に支持されている。一方筆者らはこの仮説を検証するため mtDNA の細胞間移植や、高齢者由来の繊維芽細胞の初期化などを行った。その結果、少なくともヒト繊維芽細胞では加齢に伴うミトコンドリア呼吸活性低下は mtDNA の突然変異ではなく核ゲノムのゲノム修飾が原因であり、可逆的なプロセスであることを立証した。

キーワード: Human aging; Metastasis; mtDNA mutations; mtDNA exchange; Epigenetic regulation

### 1. 背景

超高齢化社会を迎えた我国においては、老化や老化関連疾患の問題解決が急務であるが、特に老化に伴うミトコンドリアの呼吸活性低下 (呼吸欠損) がこれらの問題の根源に位置しているといわれている。ミトコンドリアはすべての真核生物に存在し生体エネルギー産生において重要な役割を果たしており、その中には核ゲノムとは独立した固有のゲノム (ミトコンドリアゲノム; mtDNA) が存在している。

mtDNA に存在する遺伝子はすべて酸化的リン酸化による生体エネルギー産生に関係しているが、エネルギー産生の副産物として活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) がミトコンドリア内に発生する。ミトコンドリアはさらに外的因子である化学発がん物質なども吸着することから、ミトコンドリア内に存在する mtDNA はこの外的因子と同時に内的因子である ROS

の影響を受けることになり、結果として核ゲノムよりも高頻度で突然変異が蓄積するといわれている。

このような背景から、mtDNA 突然変異の蓄積と、その結果生じる呼吸欠損はミトコンドリア病の原因となるだけでなく、老化や老化関連疾患 (がん化、糖尿病等の生活習慣病、パーキンソン病等の神経変性疾患) の原因にもなるという仮説「老化ミトコンドリア原因説」が提出された [1-6]。仮にそうだとすると、mtDNA 突然変異は加齢とともに蓄積することで、われわれ一人ひとりの健康にも重大な影響を与えていることになる。

### 2. mtDNA 突然変異とがん化との関係

通常酸素分圧から低酸素分圧になると細胞内では解糖系が上昇してエネルギー産生をまかなう。一方、ミトコンドリアの呼吸活性が低下するとエネルギー欠損になるため、その補完作用として通常酸素分圧でも解糖系が上昇する。これがワールブルグ効果である。通常酸素分圧で解糖系が上昇していると、がん細胞の増殖によりがん細胞が低酸素状態におかれても生存が可能になることから、通常酸素分圧での解糖系の上昇は細胞のがん化の前段階と考えられている [7-10]。もちろん、mtDNA の病原性突然変異も通常酸素分圧での呼吸欠損と解糖系上昇を誘発することになるので、十分のがん化の原因になり

連絡先: 林 純一 〒305-8572

茨城県 つくば市 天王台 1-1-1

TEL: 029-853-6650

FAX: 029-853-6614

E-mail: jih45@biol.tsukuba.ac.jp

得る [1-3]。

もしこの仮説が正しければ、ミトコンドリア病患者さんはがんの発症頻度が上昇するはずである。また mtDNA は母性遺伝するため、mtDNA 突然変異が原因でがんを発症した場合、その突然変異を持つ mtDNA が母親の生殖細胞に存在すれば、母性遺伝するがんが存在してもおかしくないはずである。それにもかかわらず実際にこの二つの事実をきちんとした統計学的有意差をもって証明した報告例は一切存在しない。

しかし、実際にがん組織には正常組織に比べ mtDNA の突然変異が蓄積されているという結果が続々と報告されている [11-13]。ちなみにそのほとんどは呼吸活性に影響を与えない突然変異、すなわち多型突然変異であるため、ワールブルグ効果を引き起こさないが、これをもって mtDNA 突然変異ががん化の原因だとしている。しかし、これらはすべて並行現象であり、mtDNA の多型突然変異が呼吸欠損を誘発せずにいかにしてがん化を引き起こすのかという道筋すら示されていない。

そもそも細胞のがん化は正常組織中の一つの細胞に起こり、このがん細胞が悪性化して抑制のきかない増殖を始めるため、がん組織は正常組織の中の一つの細胞由来のクローンに相当する。一方、周辺の正常組織は多様な細胞から構成されているので、その「平均値」としての mtDNA の塩基配列を比較した場合、両者の間に差が出てくるのは当たり前の話である。したがって本来なら一つのがん細胞と周辺組織の一つの正常細胞を用いて比較しなければならないところである。

さらにいえば、がん化の原因が mtDNA の突然変異にあるのか、それとも核ゲノムの突然変異にあるのかを決めるために両者の塩基配列を比較しても何も結論は出てこないはずである。大量に出てくる塩基配列の差のカ

タログから、どれががん化の原因でどれがそうでないのかを区別することは難しい。仮に一つの塩基の差しかなかったとしても、本当のその突然変異ががん化の原因なのかを判定するのは不可能である。

そこで筆者らはまず正常細胞とがん細胞の間で mtDNA を交換した細胞を樹立し、この細胞の表現型を比較することで、がん化の原因が mtDNA にあるのか核ゲノムにあるのかを判定した (図 1A)。そこでもし mtDNA にその原因があることが明らかになったら、その時こそは両者の塩基配列を比較することで原因突然変異を特定するという戦略を立てた。しかしこれまでにヒトやマウスの細胞を使ってそれぞれの種の正常細胞とがん細胞の間で mtDNA 交換をしたが、ことごとくがん化の原因は mtDNA ではなく核ゲノム側にあった [14, 15]。

次に、がん化という表現型ではなく、がんの悪性化 (例えば、がん転移) という、がんに関係する別の表現型に着目した。マウスの肺がん細胞で低転移性を示す細胞株と高転移性を示す細胞株の間でミトコンドリアの呼吸活性を比較したところ、高転移性の細胞株で呼吸鎖酵素複合体 I の活性が著しく低下していた。そこで両者の間で mtDNA を交換した細胞を樹立し、「高転移性」と「呼吸鎖酵素複合体 I の活性低下」という 2 種類の表現型の原因がどちらのゲノムにあるかを調べた。その結果両方の表現型ともに mtDNA 側にその原因があることが明らかになった (図 1B)。

そこで両者の mtDNA の全塩基配列を比較した結果、高転移性を示す細胞株の mtDNA の ND6 遺伝子 (呼吸鎖酵素複合体 I を構成するサブユニットの一つである ND6 をコードしている遺伝子) に一つの突然変異 (G1397A) が存在することが判明した。ただしがん転移を誘発すると想定されるこの突然変異 mtDNA

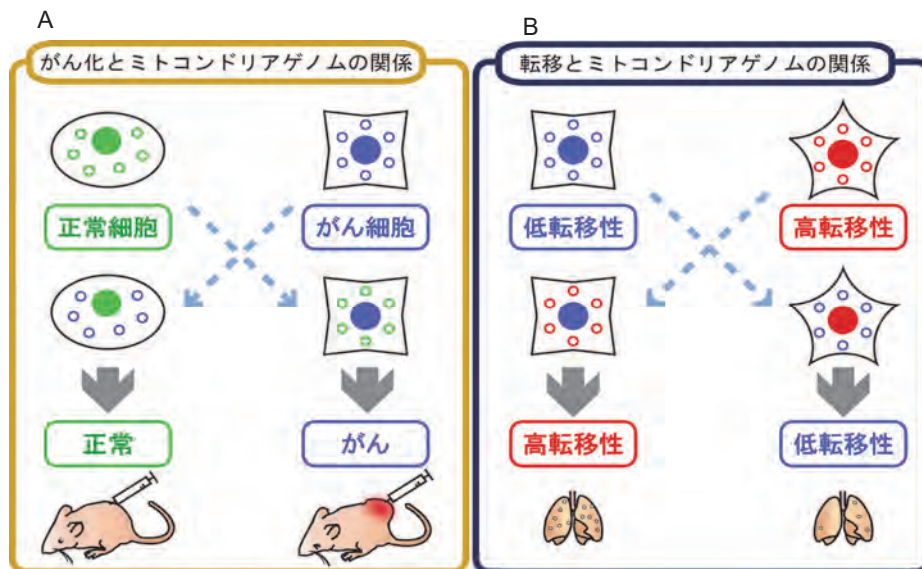


図 1 ミトコンドリアゲノムはがんの表現型と関係あるのか：mtDNA 交換を用いた研究

正常細胞とがん細胞の間で mtDNA を交換しても、核ゲノムががん細胞由来であればがん化したままである (A)。これに対し低転移性と高転移性のがん細胞の間で mtDNA を交換すると mtDNA が高転移性がん細胞由来であれば高転移性を示す (B)。

(G13997A mtDNA) をマウスの正常細胞に移植してもがん化は誘発しなかった。またこの突然変異により呼吸欠損と同時に ROS の過剰産生が誘発されるため抗酸化剤処理したところ、高転移性の発現が抑制されたことから、高転移性の誘発は G13997A mtDNA による呼吸欠損が原因なのではなく、呼吸欠損の副産物として過剰に発生した ROS が原因であることが明らかになった [16 - 20]。

しかし、これらの結果はすべて培養がん細胞で得られたものであるため、ROS の過剰産生を誘発する G13997A mtDNA が実際の生体内ではどのような表現型に影響を与えるのかは不明である。そこでこの問題を解決するために G13997A mtDNA を培養がん細胞からマウスの雌の生殖細胞系列に導入した。そのために先ずこの G13997A mtDNA を XO タイプ (雌型) のマウス ES 細胞に導入し、キメラマウス作製後、この G13997A mtDNA をさまざまな割合で持つ新奇ミトマウス (ミトマウス ND6M) を樹立した [21]。

ミトマウス ND6M は呼吸鎖酵素複合体 I の活性が低下していたことから、若年で発症し母性遺伝するとされるミトコンドリア病の一種であるレーバー病 (LHON; 遺伝性神経萎縮症) のモデルになり得る [21]。なぜかという、この疾患では mtDNA にコードされる 7 種類の ND 遺伝子群 (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6) のいずれかに高頻度で突然変異が存在しているからである。ND 遺伝子群は呼吸鎖酵素複合体 I のサブユニットをコードしており、これらの遺伝子群の突然変異によって生じる呼吸欠損や ROS の漏出が若年での疾患発症原因とされている [2]。また、男性の発症率が極めて高いことから核ゲノムの Y 染色体遺伝子の関与も示唆されている [2]。しかし、少なくとも若年 (3 ヶ月齢) のミトマウス ND6M の視神経には雌雄ともに異常はなかった [21]。

次にミトマウス ND6M の生存曲線と腫瘍発生率を見るため、核背景が同じ B6 系統マウスをコントロールにして比較したところ、両者の平均寿命に有意差はなかった。この結果は ROS を漏出する G13997A mtDNA は老化を促進しないことを示唆している [22]。また自然死したマウスの剖検と組織化学的解析から、リンパ腫発症頻度が B6 系統マウスの約 5 倍になることが示された [22]。一方、18 ヶ月齢のミトマウス ND6M では呼吸鎖酵素複合体 I の活性低下に加え、高血糖症と骨髄細胞での ROS の有意な増加が確認できた。

これらの結果は ROS の過剰産生と高転移性を誘発する G13997A mtDNA は生体内では高血糖症とリンパ腫の原因になることを示唆している [22]。さらに抗酸化剤の投与により ROS 産生を抑制することで、ミトマウス ND6M が示した高血糖症とリンパ腫の発症は著しく抑制されたことから、これらの原因が呼吸欠損にあるというよりは ROS の過剰産生にあると推察された [23]。

ここで問題となるのは、さきほどのレーバー病のように突然変異 mtDNA 単独でこれらの症状を発症したのではなく、なんらかの B6 マウス系統の核背景も発症に

必須なのかということである。なぜなら他のマウス系統と異なり、B6 系統は 1 割程度のリンパ腫を自然発症するからである。

そこでミトマウス ND6M の雌を A/J 系統 (リンパ腫を発症しない系統) の雄に戻し交配し、これを 8 回以上繰り返すことでミトマウス ND6M の核背景を A/J 系統に置き換えてリンパ腫の発症頻度を調べた。その結果、生存曲線には影響がなかったがリンパ腫はまったく発症しなかった。この結果は、(1) リンパ腫がミトマウス ND6M の死因になっていないこと、そして (2) G13997A mtDNA が単独でリンパ腫を誘発したのではなく、B6 系統の核背景に存在する何らかの異常の存在も必須であることを示している [24]。

このように mtDNA の突然変異が高転移性やリンパ腫の発症を誘発する可能性があるため、ヒトでも母性遺伝するがん転移やリンパ腫が存在するかもしれない。しかし mtDNA 突然変異単独では何事も起こらず何らかの核ゲノムの異常が十分条件として必須である。したがってこれら両方の条件を満足する症例は極めて希であることから、母集団を厳選せずに統計学的処理をしても有意差が出るのは難しい状況にある。ここでいう母集団の厳選とは、たとえば mtDNA の ND 遺伝子群に ROS 過剰産生を誘発する突然変異をもつことが証明された集団のみを選ぶことである。

### 3. mtDNA 突然変異と老化との関係

老化ミトコンドリア原因説によると、呼吸欠損を誘発する mtDNA の突然変異 (病原性突然変異) は全人類の宿命である老化や老化関連疾患にも関与するという。つまり加齢に伴う「mtDNA 突然変異蓄積」により「呼吸欠損」が誘発され、この「呼吸欠損」が「ROS 漏出量増大」を誘発し、「ROS 漏出量増大」はさらなる「mtDNA 突然変異蓄積」を誘発するという、この三者の悪循環が存在することで老化や老化関連疾患を発症するというのである (図 2A)。

ここで問題となるのは、なぜ核ゲノムではなく mtDNA の突然変異が老化の原因になるのかという点である。そもそもこの三者 (mtDNA 突然変異蓄積、呼吸欠損、ROS 漏出) の悪循環はすべて状況証拠の積み重ねで、ヒトの老化現象においてお互いの因果関係を直接証明した証拠はどこにも存在しない。

この仮説を検証するため筆者らは高齢者由来と若年者由来の繊維芽細胞の mtDNA を、それぞれ mtDNA を除去した HeLa 細胞へ移植した [25]。また、高齢者由来の繊維芽細胞に HeLa 細胞の核ゲノムのみを移植し呼吸活性に与える影響を調べた [26]。結果はいずれも高齢者由来の繊維芽細胞が発現しているミトコンドリア呼吸欠損の原因が mtDNA の突然変異ではなく、核ゲノムの劣性突然変異であることを示していた (図 2B)。

しかし、2004 年と 2005 年にこの老化ミトコンドリア原因説を支持するマウスの研究が相次いで報告され [27, 28]、この分野の研究者に広く支持されるようになった。この二つの研究はともに、まず mtDNA 複製酵素の校



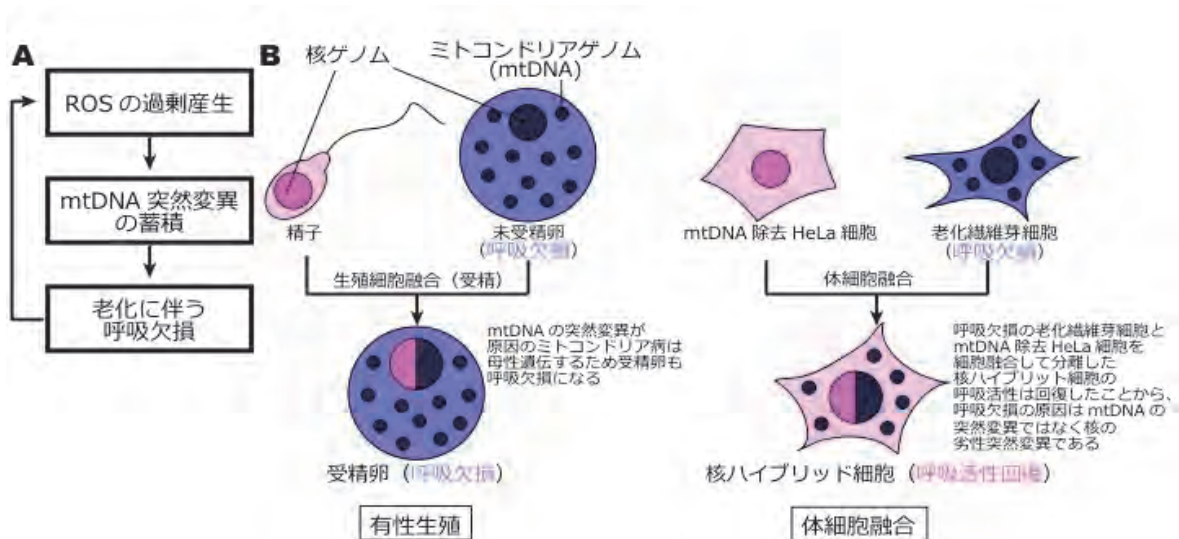


図2 老化に伴う呼吸欠損の原因は mtDNA にあるのか核 DNA にあるのか？

A: mtDNA の突然変異にあるとする老化ミトコンドリア原因説

B: 体細胞遺伝学的手法により母性遺伝ではなく核側の劣性遺伝とする仮説

通常の生殖では mtDNA に原因があれば受精卵も呼吸欠損になる。

体細胞遺伝学的手法を使うと、呼吸欠損は核側の劣性変異にあることが判明。

濃いピンク色は正常な核ゲノム、濃紺は呼吸活性低下を誘発する可能性のある核ゲノムと mtDNA。正常な呼吸活性を持つ細胞は細胞質をピンク色、呼吸欠損の場合は細胞質を青色に着色した。

正機能を人工的に破壊したマウス（ミュートーターマウス）を作製した。このマウスは mtDNA 複製の際に生じるエラーを校正できないため、このエラーがそのまま体細胞突然変異として固定されてしまう。その結果、通常よりも遥かに速いスピードで mtDNA に大量の体細胞突然変異が蓄積し、誕生後数ヶ月程度でミトコンドリアの呼吸欠損が誘発され、最終的には早期老化症状（白髪化、脊柱後湾、筋萎縮など）を発症して、本来2年半あるマウスの寿命が1年に短縮されたというのである。この研究結果から、mtDNA に後天的に蓄積された突然変異がミトコンドリアの呼吸欠損を誘発し、その結果早期老化症状を発現し、寿命を縮めたと結論づけることができる。これはまさに老化ミトコンドリア原因説を見事に立証した研究成果といえる。ただし、このマウスは「ROSの漏出」は全く観察されなかったという。また通常のマウスでは老化してもこのような呼吸欠損にはならないことから、ミュートーターマウスはマウスの老化ではなくヒトの老化モデルだという。

この研究結果は筆者らによっても確認された [29]。しかし筆者らの「ミュートーターマウス」は、核ゲノムの背景が B6 系統で、同じ B6 系統の核背景でかつて筆者らが作製したミトコンドリア病モデルマウスである「ミトマウスΔ」[30, 31] と極めて症状が似ていたのである [29]。このミトマウスΔは大規模欠失突然変異をもつマウス mtDNA を受精卵に導入することで作製された。ミトマウスΔの組織に存在する大規模欠失突然変異 mtDNA が8割を超えるとその組織が呼吸欠損になり、その呼吸欠損になった組織でのみ病態が発症することを示すことができた。その意味では、このミュート

ターマウスは「老化モデル」というより「ミトコンドリア病モデル」といった方が適切であるように思えた。

以上、ここまではヒトの老化や老化に関連したミトコンドリアの呼吸欠損の原因が mtDNA の突然変異か、それとも核ゲノムの突然変異かという前提で議論してきた。しかし、「分化」がそうであるように、「老化」も突然変異ではなくゲノム修飾が原因であるという可能性は残されている。当時としてはこの問題を解決する手段はなかったが、その後の2つの技術革新によりこの可能性を直接調べるチャンスが提供されたのである。

その第一が iPS 細胞 (induced pluripotent stem cells; 人工多能性幹細胞) 樹立法である [32, 33]。分化した細胞の初期化の成功は、この手法を老化した細胞にも活用する道を拓いた。老化に伴う呼吸欠損の原因がゲノム突然変異でなくゲノム修飾であるとするれば、高齢者由来の細胞から iPS 細胞を樹立して初期化することで同時に「老化に伴う呼吸機能低下」も初期化できるはずである。

筆者たちはまず複数の若年者と高齢者から提供されたヒト繊維芽細胞を iPS 細胞にしてから再び繊維芽細胞に分化させた。その結果、加齢にともなう呼吸機能低下は解消され、若年者から提供された繊維芽細胞のレベルにまで呼吸機能が回復することを見いだした。したがってこの老化現象は可逆的であることから、その原因が mtDNA や核ゲノムの突然変異にあるのではなく、核ゲノムのゲノム修飾にあると考えられる [34-36] (図 3A, B)。

第二の技術革新は次世代シーケンサーの開発である。核ゲノムは各細胞に原則として2コピーしか存在しない

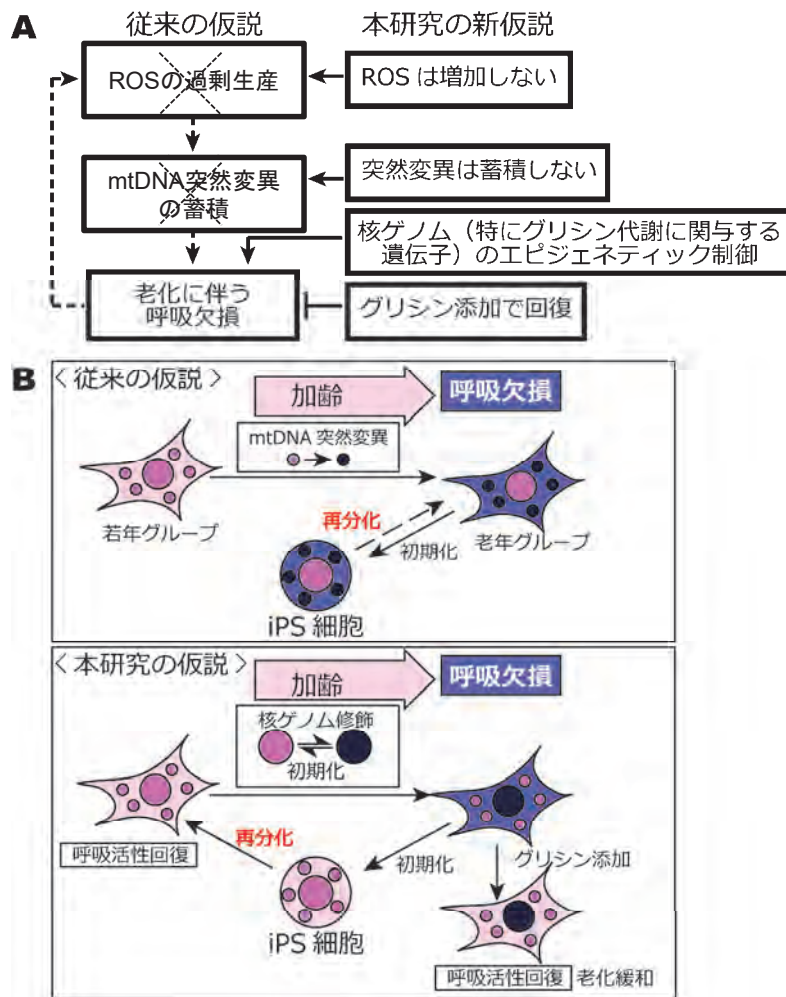


図3 老化に伴う呼吸欠損は核ゲノムのゲノム修飾にあるという筆者らの新仮説

- A. 新仮説の模式図
- B. 新仮説の図解

が mtDNA は数千コピーもの集団として存在している。したがって加齢とともに mtDNA に体細胞突然変異が蓄積しても数千コピーの mtDNA 分子のごく一部にランダムにしか存在しないため、従来のシーケンサーで mtDNA 集団全体の平均的塩基配列を決めてもこのような体細胞突然変異は検出できない。しかし次世代シーケンサーを使用すると、同じ場所の塩基配列を 10 万回以上解析できるため、仮に特定の塩基番号の体細胞突然変異が細胞集団全体に存在する mtDNA の 10 万個に一カ所しかなくてもその存在を突き止めることが可能である。

今回この手法で複数の若年者由来と高齢者由来の繊維芽細胞の mtDNA を解析したところ、理由は不明であるが両者の間で体細胞突然変異の頻度に全く優位差が検出されなかった。ちなみに両者の間で ROS 産生量も有意差がなかった [34-36]。

これらの結果は、理論的には老化した組織の若返りは可能であることを示している。仮に繊維芽細胞以外の他のどの組織でも同じような仕組みで老化をしているとすれば、たとえば自分の皮膚（角化細胞）を初期化後再分

化させ自分に移植することでその部分の皮膚の若返りが可能になるはずである。

さらに若年者と高齢者の繊維芽細胞間、および初期化前と後の繊維芽細胞間での遺伝子発現パターンの比較から、ミトコンドリア内のグリシン合成に関与している遺伝子の発現低下が老化に伴う呼吸欠損の原因の一つである可能性が明らかになった。そこで、培養液中にグリシンを添加したところ、高齢者の繊維芽細胞での呼吸活性の回復が観察されたことから、グリシン摂取が老化に伴う呼吸欠損の改善に効果がある可能性が示された [34-36] (図 3A, B)。

ただし、今回の発見はあくまでもヒト繊維芽細胞の老化に伴う呼吸欠損の仕組みであり、これをヒトの他の組織や老化現象全般にまで普遍化できるか否かは今後の研究課題である。

#### 謝辞

筆者と共同研究して頂いた方々に、この場を借りて深く感謝致します。

## 引用文献

- [1] Larsson N-G, Clayton DA. Molecular genetic aspects of human mitochondrial disorders. *Annu Rev Genetics* 29:151-178, 1995.
- [2] Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283: 1482-1488, 1999.
- [3] Taylor RW, Turnbull, DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature Rev Genet* 6: 389-402, 2005.
- [4] Jacobs, HT. (2003) The mitochondrial theory of aging: dead or alive? *Aging Cell* 2: 11-17, 2003.
- [5] Khrapko, K, Vijg, J. Mitochondrial DNA mutations and aging: devils in the details? *Trends Genet* 25: 91-98, 2008.
- [6] Bratic A, Larsson NG. The role of mitochondria in aging. *J Clin Invest* 123: 951-957, 2013.
- [7] Baysal BE, *et al.* Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science* 287: 848-851, 2000.
- [8] Niemann S, Muller U. Mutations in SDHC cause autosomal dominant paraganglioma, type3. *Nat Genet* 26: 268-270, 2000.
- [9] Gottlieb E, Tomlinson IP. Mitochondrial tumor suppressors: a genetic and biochemical update. *Nat Rev Cancer* 5: 857-866, 2005.
- [10] Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* 11: 325-337, 2011.
- [11] Polyak K, *et al.* Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumors. *Nat Genet* 20:291-293, 1998.
- [12] Fliss MS, *et al.* Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids. *Science* 287: 2017-2019, 2000.
- [13] Yiping H, *et al.* Heteroplasmic mitochondrial DNA mutations in normal and tumor cells. *Nature* 464: 610-614, 2010.
- [14] Hayashi J-I, Werbin H, Shay JW. Effects of normal human fibroblast mitochondrial DNA on segregation of HeLaTG mitochondrial DNA and on tumorigenicity of HeLaTG cells. *Cancer Res.* 46: 4001-4006, 1986.
- [15] Akimoto M, *et al.* Nuclear DNA but not mtDNA controls tumor phenotypes in mouse cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327: 1028-1035, 2005.
- [16] Ishikawa K, *et al.* ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. *Science* 320: 661-664, 2008.
- [17] Ishikawa K, *et al.* Enhanced glycolysis induced by mtDNA mutations does not regulate metastasis. *FEBS Lett* 582: 3525-3530, 2008.
- [18] Koshikawa N, *et al.* Reactive oxygen species-generating mitochondrial DNA mutation up-regulates hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  gene transcription via phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/protein kinase C/histone deacetylase pathway. *J Biol Chem* 284: 33185-33194, 2009.
- [19] 石川香、竹永啓三、林 純一 エネルギー代謝転換とがん：解糖系亢進と悪性化は関係するか. *実験医学* 26: 2067-2073, 2008.
- [20] 石川香、林 純一 ミトコンドリアと疾患：ミトコンドリアDNAの新規機能. *医学のあゆみ* 232: 729-734, 2010.
- [21] Yokota, M, *et al.* Generation of trans-mitochondrial mito-mice by the introduction of a pathogenic G13997A mtDNA from highly metastatic lung carcinoma cells. *FEBS Lett.* 584: 3943-3948, 2010.
- [22] Hashizume O, *et al.* Specific mitochondrial DNA mutation in mice regulates diabetes and lymphoma development. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 10528-10533, 2012.
- [23] Yamanashi H, *et al.* Administration of an antioxidant prevents lymphoma development in trans-mitochondrial mice overproducing reactive oxygen species. *Exp. Anim.* 63: 459-466, 2015.
- [24] Hashizume O, *et al.* A specific nuclear DNA background is required for high frequency lymphoma development in trans-mitochondrial mice with G13997A mtDNA. *PLOS ONE* 10: e0118561, 2015.
- [25] Hayashi J-I, *et al.* Nuclear but not mitochondrial genome involvement in human age-related mitochondrial dysfunction. *J Biol Chem* 269: 6878-6883, 1994.
- [26] Isobe K, *et al.* Nuclear-recessive mutations of factors involved in mitochondrial translation are responsible for age-related respiration deficiency of human skin fibroblasts. *J Biol Chem* 273: 4601-4606, 1998.
- [27] Trifunovic A, *et al.* Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 429: 417-423, 2004.
- [28] Kujoth GC, *et al.* Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* 309: 481-484, 2005.
- [29] Mito T, *et al.* Mitochondrial DNA mutations in mutator mice confer respiration defects and B-lymphoma development. *PLOS ONE* 8: e55789, 2013.
- [30] Inoue K, *et al.* Generation of mice with mitochondrial dysfunction by introducing mouse mtDNA carrying a deletion into zygotes. *Nat Genet* 26: 176-181, 2000.

- [31] Nakada K, *et al.* Inter-mitochondrial complementation: Mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA. *Nat Med* 7: 934-940, 2001.
- [32] Takahashi, K, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861-872, 2007.
- [33] Okita, K, *et al.* A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods* 8: 409-412, 2011.
- [34] Hashizume O, *et al.* Epigenetic regulation of the nuclear-coded GCAT and SHMT2 genes confers human age-associated mitochondrial respiration defects. *Sci. Rep.* 5: 10434, 2015.
- [35] 清水章文ら 核コードのGCAT遺伝子とSHMT2遺伝子のエピジェネティック制御がヒトの加齢に伴うミトコンドリア呼吸欠損を誘発する. *細胞工学* 34: 1078-1079, 2015
- [36] Hayashi, J-I, *et al.* Mutations in mitochondrial DNA regulate mitochondrial diseases and metastasis but do not regulate aging. *Current Opinion in Genetics and Development* 38: 63-67, 2016.

## Effects of mutations in mammalian mitochondrial genomes on tumor phenotypes and aging

Jun-Ichi Hayashi  
University of Tsukuba

### Abstract

The mitochondrial theory of aging proposes that age-associated accumulation of somatic mutations in mitochondrial genome (mtDNA) is responsible for the age-associated respiration defects and the resultant expression of aging and age-associated disorders including tumor phenotypes. This idea is supported partly by the findings that mtDNA mutator mice expressing a proofreading-deficient mtDNA polymerase show accelerated accumulation of somatic mutations in mtDNA, resulting in the expression of mitochondrial respiration defects, premature aging phenotypes, and short lifespan. In contrast, our findings propose that age-associated respiration defects observed in elderly human fibroblasts are not due to mutations in mtDNA, but to epigenetic downregulation of nuclear-coded genes on the basis of the observations that the age-associated respiration defects is restored by reprogramming of the elderly human fibroblasts.

**Keywords** : Human aging; Metastasis; mtDNA mutations; mtDNA exchange; Epigenetic regulation

【総説】

## 酸化ストレスによる神経突起変性の誘因

福井 浩二

芝浦工業大学 システム理工学部 生命科学科分子細胞生物学研究室

### 要約

我々は、加齢に伴う認知機能の低下には、脳神経細胞での酸化傷害が関与していると想定し、そのメカニズムの解明に取り組んでいる。既知の様に、生体では加齢に伴い過酸化脂質が増加、培養細胞では酸化傷害により細胞死が起きる。よってこれらを防ぐためには、酸化傷害による神経細胞死が起きる前の早期変化が何であるかを見出すことが重要と考えている。我々の実験から、培養細胞では細胞が死なない低濃度の過酸化水素の添加により、神経細胞の突起上に数珠状の凝集物形成が生じていることが明らかとなった。また、この形態的变化は、初代培養系や老齢マウス、ビタミンE欠乏マウスの脳でも生じていた。更に、細胞膜酸化や微小管変性、カルシウムホメオスタシスの崩壊の可能性が、我々のものを含め多数報告されている。以上より、加齢に伴う認知機能障害の一因には、脳神経細胞内での酸化傷害に起因する神経突起障害が関与している可能性が考えられる。

キーワード：Oxidative stress, Aging, Cognition, Axonal degeneration, Microtubules

### 1. 加齢及び酸化ストレスによる神経突起障害の誘因

既知のように、老化とは不可避でかつ退行的な生理機能の低下現象を指す。加齢に伴い減衰する生体機能には、運動機能や内分泌機能など様々あるが、その中の一つに認知機能がある。脳老化の原因と称されるものは多数存在するが、我々はこれまで1950年代にD. Harmanによって提唱された「老化のフリーラジカル説」[1]に基づいて、そのメカニズムの解明に取り組んで来た。その結果、老齢ラットやマウスを使った実験からは、モーリス水迷路や放射状迷路課題などの行動実験において認知機能の有意な低下を確認し [2]、その後の生化学的解析では、脳内で過酸化脂質量の増加と抗酸化酵素活性の有意な低下 [3]、更には海馬領域にてアポトーシスが多数起きていることを明らかにした [4]。我々は更に、高濃度酸素に48時間暴露させた若齢ラットの認知機能についてもモーリス水迷路試験により検討した。その結果、酸素を暴露させた若齢群では、通常飼育の老齢群と同程度まで認知機能は有意に低下していた [2]。この際、遊泳速度に酸素暴露群と対照群では有意な差はなかった。

また、ビタミンEを欠乏させ、個体内での酸化を促進させたマウスやラットでも認知機能の有意な低下を確認した [2]。これより、加齢に伴う認知機能の低下の一因には、酸化傷害が関与している可能性が強く伺えた。しかし、これらの実験は全て、すでに酸化がある程度亢進し、認知機能が大きく低下したラットやマウスにおける解剖後の試料を実験に使用していることから、加齢に伴う酸化傷害に起因する認知機能不全に陥るのを防ぐためには、脳内の神経細胞で生じる変化を可能な限り早く明らかにすることが重要と考えるに至った。そこで、我々は神経細胞内の神経突起部に着目した。なぜならば、神経突起部は進展や縮退がダイナミックに起きていること、また、必要な物質の少なくとも一部を、細胞体からの軸索輸送による供給に頼っているからである。これより我々は、神経突起部が核や小胞体が存在する細胞体部より、外部からの刺激に対してより脆弱なのではないかと考えるに至った。よって、初めに培養細胞にて神経突起を進展させたモデルを用いて、酸化傷害時の神経突起の変化を検討した。培養細胞には、神経芽細胞腫であるNeuro2aやN1E-115細胞を用いた。数日間培養して神経突起を十分に伸長させたのち、培養細胞に酸化傷害を誘引させる目的で過酸化水素を添加すると、濃度・時間に依存して細胞死が生じた。そこで、細胞死が起きない低濃度の投与時における神経突起部を注意深く観察したところ、神経突起に形態的な変性が起きていることを明らかとした(図1) [5, 6]。この際、神経突起は対照群

連絡先：福井浩二 〒337-8570  
埼玉県さいたま市見沼区深作 307  
TEL：048-720-6033  
FAX：048-720-6011  
E-mail：koji@shibaura-it.ac.jp

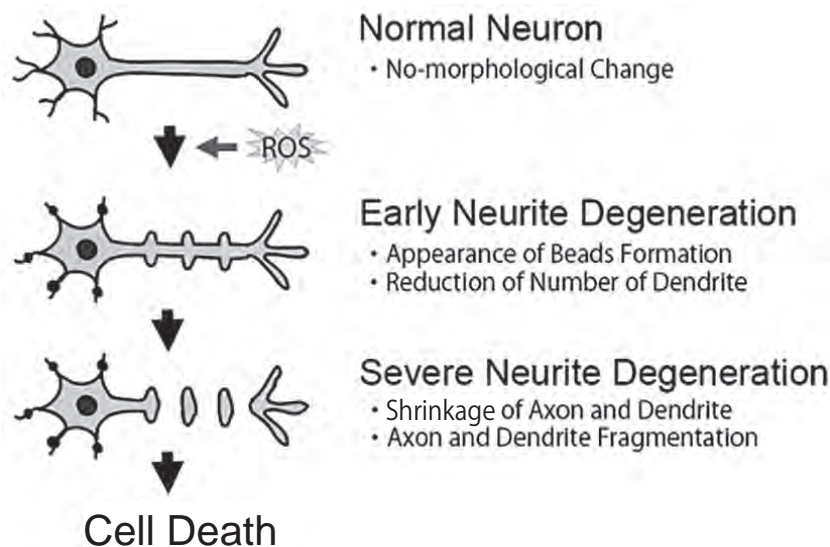


図1 培養細胞への低濃度のROSの暴露は神経突起障害を誘因する [6]。

細胞が死なない低濃度の過酸化水素やラジカル開始剤の添加は、神経突起や樹状突起部に数珠状の凝集物形成を誘因する。さらに高濃度での添加や添加時間の延長は、神経突起の断片化を経て、細胞死を誘引する。

と比べ非常に細くなり、また、数珠状の凝集物が多数形成されていることを確認した。また、この現象は Green fluorescent protein: GFP を遺伝子導入して可視化した初代培養系でも確認された [7] ことから、酸化傷害による神経細胞死が起きる前の初期段階では、神経突起に障害が起きる可能性を明らかとした。さらに我々は、行動実験にて有意な認知機能の低下を示した老齢やビタミン E 欠乏マウスを還流固定してパラフィン切片を作成し銀染色したところ、海馬領 CA1 領域において軸索部に培養細胞時と同様の凝集物が多数形成されていることを確認した [8]。以上のことから、加齢に伴い脳神経細胞では神経突起に障害が起きている可能性があり、また、その原因の一つとして酸化傷害が関係する可能性が考えられた。通常飼育においても加齢に伴い、徐々に酸化傷害が蓄積していく可能性を示しており、非常に興味深い。

## 2. 酸化傷害に起因する神経突起障害のメカニズムの解明

神経突起障害はアルツハイマー病 [9]、パーキンソン病 [10]、ハンチントン病 [11] などの、様々な神経退行性疾患との関連が取りざたされている。これらの疾患の多くは、その発症や進展に酸化傷害が深く関与することが明らかにされている。このことから、酸化に伴う神経突起障害が、これらの疾患の発症や進展に関係する可能性は容易に想像できる。では、加齢に伴う認知機能障害に脳酸化が関連し、酸化により生じる神経突起障害が、細胞死が起きる前の一つの大きなイベントであるとして、そのメカニズムには何が考えられるのか。ここでは、3つの仮説について述べる。

まず、第一は細胞膜酸化である。既知のように細胞膜

はその主成分がドコサヘキサエン酸やエイコサペンタエン酸などの高度不飽和脂肪酸を多く含むリン脂質で構成されているため酸化を受けやすい。特に、ヒトの場合、体重に占める脳重量は約 13 分の 1 であるにもかかわらず、酸素消費量は約 20% と非常に高い [12]。その為、脳は常に酸化の危険にさらされている。膜酸化に関する研究はこれまでも非常に多く行われており、酸化を防ぐ物質としてビタミン E をはじめとした抗酸化物質の有効性が多くの論文から立証されている [13]。事実、我々も培養細胞への過酸化水素の投与により、神経突起障害を確認 [5, 7] するとともに、有意な脂質ヒドロペルオキシドの産生を確認した [7]。しかし、過酸化水素は小さい分子量であるが故に、一部は細胞膜を通過する。よって、細胞膜の酸化が神経突起障害を誘引していることを更に確認するために水溶性のラジカル開始剤である 2,2'-Azobis (2-methylpropionamide) Dihydrochloride: AAPH を培養液中に添加したところ、過酸化水素の添加時と同様に濃度依存的に細胞死を誘引し、また低濃度の添加においては、多数の神経突起障害を確認したことから、細胞膜の酸化が神経突起障害の誘因に関連している可能性が考えられる。

第二は細胞骨格タンパク質である微小管崩壊の可能性である。微小管は通常、 $\alpha$ -tubulin と  $\beta$ -tubulin の二量体が重合と脱重合を繰り返すことで動的安定性を保ち、突起形態の維持を行っている。また、この際の微小管は kinesin や dynein などのモータープロテインが物質輸送を行う際のレールの役割も担っている。よって、仮に微小管に何らかの変性が生じれば軸索輸送にも障害が生じると考えられる。そこで、我々は微小管関連タンパク質の一つである collapsin response mediator protein

(CRMP)-2に着目して、そのタンパク質と mRNA 発現について検討した。CRMP-2は同じ微小管関連タンパク質である Tau とそのはたらきが類似しており、tubulin と結合することで、微小管の安定性向上に寄与する。また、CRMP-2はリン酸化することで tubulin との結合能を失うことから、アルツハイマー病において神経原繊維変化として知られる Tau 同様に、発症や病態の亢進、または早期発見のマーカーとしての可能性が多く報告されている [14, 15]。我々の実験では、加齢に伴い脳内での CRMP-2 mRNA 発現は有意に低下し、またビタミン E 欠乏マウスでは、同月齢の対照群との比較でリン酸化の割合が有意に増加していた [16] (図 2)。また、これらの上流に位置する glycogen synthase kinase (GSK) -3 $\beta$ もリン酸化の割合が大きく変動していた。培養細胞での免疫染色では、過酸化水素由来の神経突起変性時に生じる数珠状の凝集部位にリン酸化 CRMP-2 (pCRMP-2) が強く呈色していることも確認しており、pCRMP-2 の割合の増加による tubulin の重合能の低下が微小管の安定性を低下させ、加齢やビタミン E 欠乏時 (つまり酸化が亢進していると考えられる状態) に生じる神経突起変性を誘因する一因となっている可能性が考えられる。しかし、これらの反応が直接的な細胞内外で発生した活性酸素によるものか、また二次的な傷害の結果として生じたものであるかは不明であり、我々は現在も継続して検討を重ねている。

第三は細胞内カルシウムイオン流入を引き金とした小胞体 (endoplasmic reticulum: ER) やミトコンドリアの機能不全である。前述した細胞膜の酸化は同時に様々なイオンチャネルの酸化・変性も引き起こして

いることが予想される。特に、N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体や、 $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic-acid (AMPA) 受容体は、膜が酸化される際に同時にダメージを受け、細胞内へカルシウムやナトリウムイオンなどの過剰流入を引き起こす [17, 18]。これらの中でもカルシウムイオンの細胞内への過剰流入は、カルシウム誘発性カルシウム放出 (calcium-induced calcium release: CICR) により、ER ではリアノジン受容体を介して、細胞内へカルシウムイオンを放出する。ミトコンドリアでは、細胞内へのカルシウムイオンの流入により、ミトコンドリア内でのカルシウムイオンの蓄積が起こり、ミトコンドリア膜透過性遷移孔 (mitochondrial membrane transition pore: mPTP) を介したシトクロム C の放出や膜電位の低下、活性酸素の一種であるスーパーオキシドの産生、またスーパーオキシドを消去する Mn-superoxide dismutase (SOD) の活性低下を介した酸化亢進が起こる。このミトコンドリアでの酸化傷害が、二次的にモータータンパク質や微小管に作用し、結果として神経突起障害を誘引している可能性がある。事実、我々の検討においても、神経突起部にミトコンドリアが細胞体部よりは少ないが、存在していることを確認している [16]。また、システインプロテアーゼファミリーのカルパインはカルシウムイオン存在下で活性化し、CRMP-2 の断片化を誘引して神経突起変性を引き起こすことも知られている [19]。細胞内でのカルシウム代謝異常は、カルシウム毒性としてこれまでも知られてはいるが、ミトコンドリアのみならず細胞内で更なる活性酸素の産生増加を導くことが考えられ、これにより酸化反応が連鎖反動的に生じ酸化傷害が増悪することも考えられる。

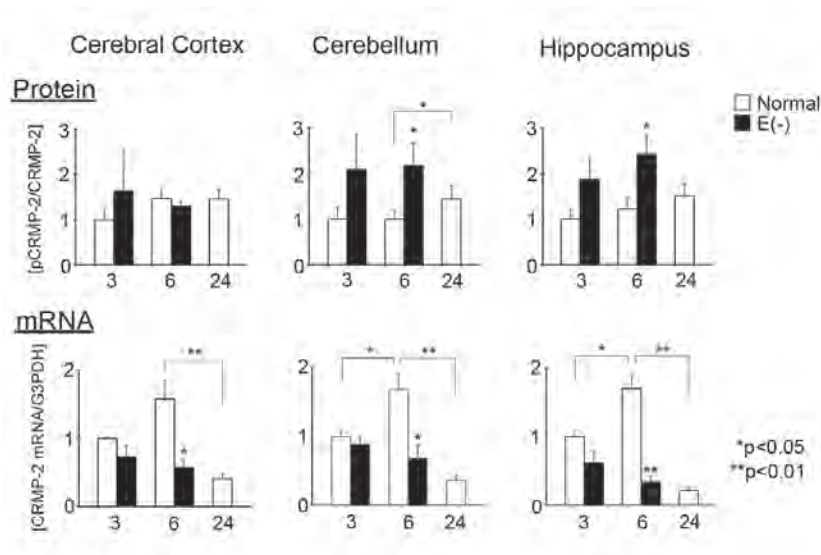


図2 加齢及びビタミン E 欠乏に伴う pCRMP-2 タンパク質および CRMP-2 mRNA 発現の変化 [16 一部改]。

マウス脳を 1 月齢よりビタミン E 欠乏食にて飼育し、3 月齢に達したものを 3 月齢ビタミン E 欠乏群、6 月齢に達したものを 6 月齢ビタミン E 欠乏群として実験に使用。大脳、小脳、海馬領域に分け Western blot にて pCRMP-2、CRMP-2 を、PCR にて CRMP-2 と G3PDH の mRNA 発現を検討した。

### 3. 最後に

加齢やビタミン E 欠乏に伴う認知機能障害の原因の一つには、脳神経細胞での酸化傷害に伴う神経突起変性に関連している可能性があり、そのメカニズムには膜酸化による微小管変性やミトコンドリア機能不全が関与している可能性がある。神経細胞死が起きていなくとも神経突起障害時、神経伝達機能はおそらく破たんしている。その根拠として、我々は単離したシナプス小胞の脂肪酸組成の変化 [20]、シナプトタグミンやシンタキシンなどの SNARE タンパク質の変性 [21] に起因する膜融合不全やオートファジー：microtubule-associated protein light chain (MAP LC) 3-II の活性低下 [16] を確認している。1 月齢より 2 か月間ビタミン E 欠乏食で飼育した短期ビタミン E 欠乏マウスの海馬領では MAP LC3-II が高発現しており、このマウスの海馬領に切片の免疫染色からは、軸索変性は見られなかった。しかし、1 月齢より 5 か月間ビタミン E 欠乏食で飼育し、脳内での酸化が亢進しているであろう長期ビタミン E 欠乏マウスの海馬領では、MAP LC3-II はほとんど発現しておらず、切片の免疫染色では軸索変性が起きていた。しかし、多方面で研究はなされているが、まだ、酸化傷害に起因する神経突起変性のメカニズムには不明な点が多い。当然のことながら、上述したいくつかの反応も複数と同時に起きているであろう。我々の究極的な目標は、脳内で起きている神経突起変性を含む初期の神経細胞の変化を外部から非侵襲的な手段により判断できないかというものである。この変性・変化に我々は酸化傷害が深く関与していると考えている。将来、事前診断が可能となり、様々な神経退行疾患発症へのリスクが少しでも軽減できれば幸いである。

### 参考文献

1. Harman D. Aging a theory based on free radical and radiation theory of aging. *J Gerontol* 11: 298-300, 1956.
2. Fukui K, Onodera K, Shinkai T, *et al.* Impairment of learning and memory in rats caused by oxidative stress and aging, and changes in antioxidative defense systems. *Ann NY Acad Sci* 928: 169-176, 2001.
3. Onodera K, Omoi NO, Fukui K, *et al.* Oxidative damage of rat cerebral cortex and hippocampus and changes in antioxidative defense systems caused by hyperoxia. *Free Radic Res* 37: 367-372, 2003.
4. Fukui K, Takatsu H, Shinkai T, *et al.* Appearance of  $\beta$ -amyloid-like substances and delayed-type apoptosis in rat hippocampus CA1 region through aging and oxidative stress. *J Alzheimers Dis* 8: 299-309, 2005.
5. Fukui K, Takatsu H, Urano S. Hydrogen peroxide induces neurite degeneration: Prevention by tocotrienols. *Free Radic Res* 45: 681-691, 2011.
6. Fukui K. Reactive oxygen species induce neurite degeneration before induction of cell death. *J Clin Biochem Nutri* doi: 10.3164/jcfn.16-34, 2016.
7. Fukui K, Ushiki K, Takatsu H, *et al.* Tocotrienols prevent hydrogen peroxide-induced axon and dendrite degeneration in cerebellar granule cells. *Free Radic Res* 46: 184-193, 2012.
8. Fukui K, Kawakami H, Honjo T, *et al.* Vitamin E deficiency induces axonal degeneration in mouse hippocampal neurons. *J Nutri Sci Vitaminol* 58: 377-383, 2012.
9. Petratos S, Li QX, George AJ, *et al.* The beta-amyloid protein of Alzheimer's disease increases neuronal CRMP-2 phosphorylation by a Rho-GTP mechanism. *Brain* 131 (Pt 1): 90-108, 2008.
10. Cappelletti G, Surrey T, Maci R. The parkinsonism producing neurotoxin MPP+ affects microtubule dynamics by acting as a destabilising factor. *FEBS Lett* 579: 4781-4786, 2005.
11. Li H, Li SH, Yu ZX, *et al.* Huntingtin aggregate-associated axonal degeneration is an early pathological event in Huntington's disease mice. *J Neurosci* 21: 8473-8481, 2001.
12. Reiter RJ. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol* 56: 359-384, 1998.
13. Niki E. Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radic Biol Med* 47: 469-484, 2009.
14. Gu Y, Hamajima N, Ihara Y. Neurofibrillary tangle-associated collapsing response mediator protein-2 (CRMP-2) is highly phosphorylated on Th-509, Ser-518, and Ser-522. *Biochemistry*, 39: 4267-4275, 2000.
15. Good PF, Alapat D, Hsu A, *et al.* A role for semaphoring 3A signaling in the degeneration of hippocampal neurons during Alzheimer's disease. *J Neurochem* 91: 716-736, 2004.
16. Fukui K, Masuda A, Hosono A, *et al.* Changes in microtubule-related proteins and autophagy in long-term vitamin E-deficient mice. *Free Radic Res* 48: 649-658, 2014.
17. Sensi SL, Yin HZ, Carriedo SG, *et al.* Preferential  $Zn^{2+}$  influx through  $Ca^{2+}$ -permeable AMPA/kainate channels triggers prolonged mitochondrial superoxide production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2414-2419, 1999.
18. Lee YS, Lee SJ, Seo KW, *et al.* Homocysteine induces COS-2 expression in macrophages through ROS generated by NMDA receptor-calcium signaling pathways. *Free Radic Res* 47: 422-431, 2013.
19. Touma E, Kato S, Fukui K, *et al.* Calpain-mediated



- cleavage of collapsing response mediator protein (CRMP) -2 during neurite degeneration in mice. Eur J Neurosci 26: 3368-3381, 2007.
20. Omoi NO, Arai M, Saito M, *et al.* Influence of oxidative stress on fusion of pre-synaptic plasma membranes of the rats brain with phosphatidyl choline liposome, and protective effect of vitamin E. J Nutri Sci Vitaminol 52: 248-255, 2006.
21. Kaneai N, Arai M, Takatsu H, *et al.* Vitamin E inhibits oxidative stress-induced denaturation of nerve terminal proteins involved in neurotransmission. J Alzheimers Dis 28: 183-189, 2012.

## Oxidative stress induces neurite degeneration

Koji Fukui

Molecular Cell Biology Laboratory, Division of Bioscience and Engineering,  
Shibaura Institute of Technology

### Abstract

In order to verify the mechanism of cognitive dysfunction during aging, we are studying the relationship between cognitive dysfunction and brain oxidation. It is well known that lipid peroxidative products increase in living tissues, and cultured cell death is occurred by oxidative injury. Our final goal is to determine events prior to reactive oxygen species (ROS) -derived cell death. Treatment with a low concentration of hydrogen peroxide induced neurite degeneration such as appearance of beads formation. We also found these morphological changes in primary cell culture and aged- and vitamin E-deficient mice brains. Several kinds of evidence including our recent data have indicated the possibilities of membrane oxidation, destabilization of microtubules, and calcium homeostasis alteration. These results show that one reason of cognitive dysfunction during aging is related to ROS-induced neurite degeneration.

**Keywords** : Oxidative stress, Aging, Cognition, Axonal degeneration, Microtubules

【総説】

## ゲノムに蓄積した 8-oxoguanine に起因する病態とその防御機構

### －発がんから神経変性まで－

中別府 雄作

九州大学 生体防御医学研究所

#### 要約

8-oxoguanine は代表的な酸化塩基であるが、これまで自然突然変異の主要な原因として研究が進められてきた。細胞ゲノムへの 8-oxoguanine の蓄積はヌクレオチドプールに生じた 8-oxo-dGTP を分解する MTH1 (MutT homolog-1) と DNA 中の cytosine に対合した 8-oxoguanine を切り出す OGG1 (8-oxoguanine DNA glycosylase)、鋳型 DNA 中の 8-oxoguanine に挿入された adenine を切り出す MUTYH (MutY homolog) の 3 つの酵素によって低いレベルに保たれている。MTH1、OGG1、MUTYH 欠損マウスの解析から、8-oxoguanine の核ゲノムとミトコンドリアゲノムへの蓄積は MUTYH によって開始される塩基除去修復反応に依存して、2 つの独立した細胞死の経路を活性化することが明らかになった。MUTYH に依存した細胞死はがん抑制機構の 1 つとして機能するだけでなく、ミトコンドリア機能障害による神経細胞死とミクログリオーシスを介して神経変性疾患の発症に関与する。

キーワード：MTH1, OGG1, MUTYH, Cancer, Neurodegeneration

#### 1. はじめに

生物にとって、その遺伝情報を担うゲノム DNA を細胞から細胞へ、親から子へと正確に伝え維持することは最も基本的な生物学的機能であるが、ゲノム DNA やその前駆体であるヌクレオチドは、酸素呼吸の過程で必然的に発生する活性酸素や生体防御のために生体が能動的に産生する活性酸素によって酸化される危険に常に曝されている [1]。活性酸素に曝された DNA やヌクレオチドは様々な酸化的化学修飾を受けるが、このような酸化損傷は修復、除去されないとゲノムに蓄積する。その結果、突然変異を引き起こすことで細胞のがん化の原因となり [2]、あるいは細胞死を引き起こすことで多くの変性疾患などの原因となり [3]、老化を促進することが明らかにされつつある。本稿では、DNA の構成塩基の中で最も酸化されやすい guanine の酸化体である 8-oxoguanine のゲノム蓄積を制御する 3 つの酵素

(MTH1, OGG1, MUTYH) の研究から明らかになった 8-oxoguanine による発がんや神経変性について、我々のグループの研究成果を中心に概説する。

#### 2. 8-oxoguanine の生成とゲノム蓄積の経路

DNA を構成する 4 つの塩基の中で guanine が最も酸化されやすいことが知られているが、DNA や遊離の 2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate (dGTP) が水酸基ラジカル (OH•) や一重項酸素 ( $^1O_2$ ) にさらされるとその guanine 塩基の 8 位の炭素に酸素原子が付加され、8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoguanine) が生成される [1, 4]。

8-hydroxy-7,8-dihydroguanine (8-hydroxyguanine) は 8 位の炭素に水酸基 (OH) が付加された状態である。8-oxoguanine と 8-hydroxyguanine は平衡状態にある互変異性体 (tautomer) であるが、中性の水溶液中ではほとんど 8-oxoguanine の形で存在する [5] (図 1 A)。DNA 中の guanine よりヌクレオチドプール中の dGTP の方が 10 倍近く酸化されやすく 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate (8-oxo-dGTP) が生成される [6] (図 2)。DNA polymerase は鋳型 DNA 中の cytosine と adenine に対して 8-oxo-dGTP を挿入することから、DNA 中の 8-oxoguanine は、ヌクレオチドプールの dGTP の酸化と DNA 中の guanine の直接酸化に由

連絡先：中別府雄作 〒 812-8582

福岡市東区馬出 3-1-1

TEL：092-642-6800

FAX：092-642-6791

E-mail：yusaku@bioreg.kyushu-u.ac.jp

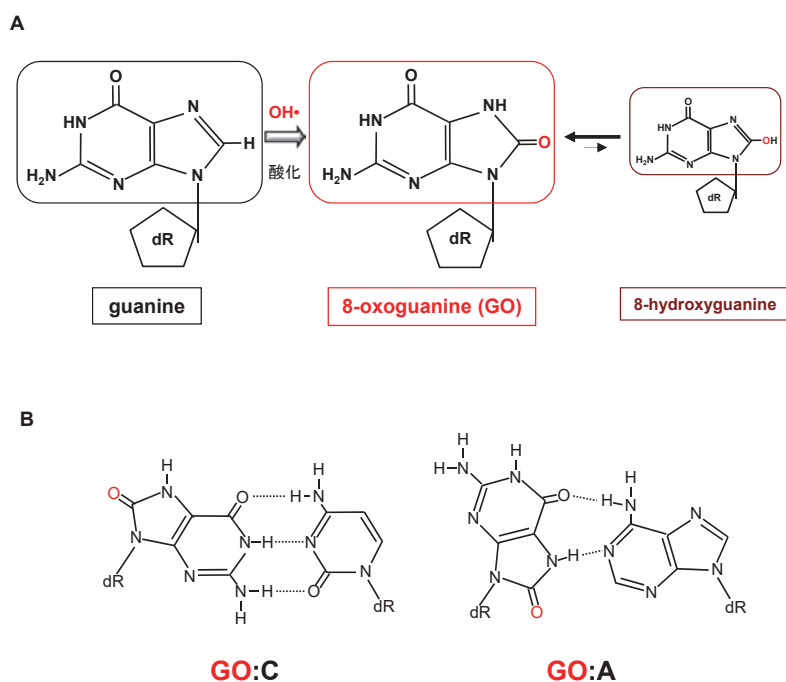


図1 8-oxoguanine の生成と塩基対合の特性

- A. 核酸塩基の中で guanine が最も酸化されやすく、水酸基ラジカルなどにさらされると8位の炭素に酸素が付加され8-oxoguanine (GO) を生じる。8位に水酸基が付加された8-hydroxyguanine は8-oxoguanine の互変異性体であるが、細胞内の環境ではほとんどが8-oxoguanine として存在する。dR: デオキシリボース。
- B. DNA 中の guanine は通常 *syn/anti* 配置の平衡状態にあるが、8-oxoguanine の場合この平衡が *syn* 配置に偏っており、cytosine に加えて adenine と同程度に安定な塩基対 (GO:A) を形成する。

来する。

DNA 中の8-oxoguanine はデオキシリボースに対して *anti* 配置と *syn* 配置の両方をとることから、二本鎖 DNA 中では cytosine に加えて adenine とともに安定な塩基対を形成する (図1 B)。このような状態で DNA 複製が進行すると guanine から thymine へ、あるいは adenine から cytosine への transversion 型の塩基置換変異が誘発される [1] (図2)。

### 3. 8-oxoguanine のゲノム蓄積を防ぐ仕組み

哺乳動物では、酸化プリンスクレオシド三リン酸分解酵素 (MTH1、NUDT1 と呼ばれる) により 8-oxo-dGTP が 8-oxo-dGMP と pyrophosphate に加水分解される [7] (図2)。MTH1 は細胞内では細胞質に最も多く分布し、ミトコンドリアと核にも局在している [8, 9]。MTH1 以外にも 8-oxo-dGTP 分解活性を持つ酵素が複数報告されている [1]。DNA polymerase は 8-oxo-dGMP を基質として利用できないために、MTH1 により 8-oxo-dGTP が分解されると DNA への 8-oxo-dGTP の取り込みが抑制される。

DNA 中の cytosine と対合している 8-oxoguanine は、8-oxoguanine DNA グリコシラーゼ (OGG1) により切り出され、塩基除去修復反応により最終的に guanine に置換される (図2)。OGG1 は、DNA グリコシラーゼ活性に加えて、脱塩基部位 (apurinic/apyrimidinic site: AP

site) で DNA 主鎖の切断を引き起こす AP lyase 活性を持つ。OGG1 には、その mRNA の選択的スプライシングにより核型とミトコンドリア型が存在する [9, 10]。

鋳型鎖 DNA 中の 8-oxoguanine に対して誤って取り込まれた新生鎖 DNA 中の adenine は adenine DNA グリコシラーゼ (MUTYH) により切り出される [11, 12] (図2)。MUTYH が adenine を除去した後は塩基除去修復反応で鋳型鎖の 8-oxoguanine に対して cytosine か adenine が挿入される。cytosine が挿入された場合には、次に OGG1 が作用して 8-oxoguanine は最終的に guanine に置換される。しかし、adenine が再度挿入されると MUTYH による塩基除去修復反応が繰り返される [13] (図3 A)。MUTYH にも、その mRNA の選択的スプライシングにより核型とミトコンドリア型が存在する [9, 14]。核型の MUTYH は PCNA (proliferating cell nuclear antigen) などの複製装置と複合体を形成することから、複製時に鋳型 DNA 中の 8-oxoguanine に対して新生鎖に取り込まれた adenine を特異的に認識して塩基除去修復を開始すると考えられている [13, 15]。

### 4. MTH1、OGG1、MUTYH の欠損は突然変異と発がんを促進する

MTH1 を欠損したマウス個体では核ゲノムへの 8-oxoguanine の蓄積が野生型に比べて 10% 程度上昇し、さらに adenine から cytosine への transversion の自然発

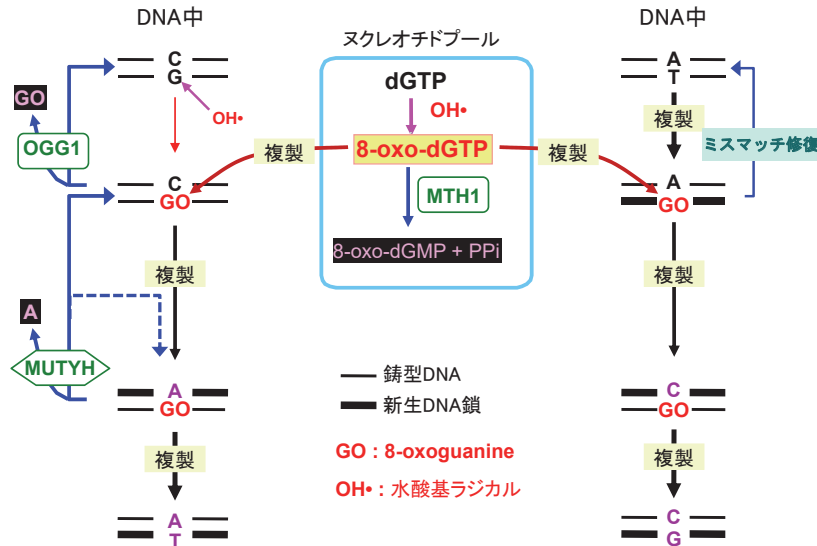


図2 8-oxoguanine の生成とそのゲノム DNA への蓄積を防ぐ仕組み

8-oxoguanine は、2つの経路を介して哺乳動物細胞のゲノム中に蓄積する。1つはヌクレオチドプール中の dGTP が活性酸素で酸化されて生じた 8-oxo-dGTP が DNA ポリメラーゼにより DNA 中に取り込まれる経路である。もう1つは、活性酸素により DNA 中の guanine 残基が直接酸化されて 8-oxoguanine が生成される経路である。ヌクレオチドプール中の 8-oxo-dGTP の分解と DNA 中に蓄積した 8-oxoguanine の修復経路を示す（詳細は本文参照）。

生頻度が野生型の約3倍に上昇していた。このような自然突然変異の上昇に伴い、MTH1 欠損マウスでは生後1年半で肝腫瘍の自然発生が19.4%に認められ、野生型マウス（6.7%）に比べて顕著に増加していた。特に雄マウスでの肝細胞がんの発症頻度は高く（38%）野生型マウスの3倍に達していた [16, 17]。

一方、OGG1 欠損マウスでは 8-oxoguanine の核ゲノムへの蓄積が野生型マウスの数倍に増加するとともに、guanine から thymine への transversion の自然発生頻度が数倍上昇する [18, 19]。さらに、生後1年半の野生型マウスの11%に発症が認められた肺腫瘍（腺腫/腺がん）の自然発生頻度が OGG1 欠損マウスでは52%に上昇していた。OGG1 欠損マウスで見られる肺がんは、OGG1/MTH1 二重欠損マウスでは全く認められなかった。非常に興味深いことに、OGG1/MTH1 二重欠損マウスの臓器では核ゲノムに野生型の数倍以上の 8-oxoguanine が蓄積していた [18]。次節で述べるように、MTH1/OGG1 二重欠損マウスでは、MUTYH の働きで 8-oxoguanine を蓄積した細胞が発がんに至る前に排除されている可能性が示唆される。

MUTYH 単独欠損マウスでは、生後1年半で野生型マウスにはほとんど見られない消化管の腺がんやリンパ腫の自然発生が数倍以上に増加する。また、KBrO<sub>3</sub> の飲水投与（16週間）により野生型マウスや MTH1、OGG1 単独欠損マウスの数十倍近い頻度で消化管腫瘍の発生を認め、3つの遺伝子の中で MUTYH による発がん抑制が最も強力であることが示唆された [20]。ヒトの家族性大腸ポリポーシスの原因の1つとして MUTYH の劣性変異が同定されており、MUTYH-associated polyposis (MAP) と呼ばれている [21]。MAP

患者の大腸腫瘍においては、家族性大腸腺腫症の主要な原因遺伝子の1つである APC 遺伝子において guanine から thymine への変異頻度が高いことが明らかにされている [13]。MUTYH 欠損マウスにおいても、消化管腫瘍で Apc 遺伝子や β-カテニン遺伝子に guanine から thymine への transversion が高頻度で同定されており、MUTYH はこのような自然突然変異を抑制することで、発がんを抑えていると考えられる [22]。

OGG1 と MUTYH の二重欠損マウスでは、肺腫瘍とリンパ腫が野生型マウスの数倍に増加し、さらに野生型マウスでは通常見られない卵巣・子宮の腫瘍と消化管の腫瘍も発生することが報告された。これらの結果は、OGG1/MUTYH 二重欠損マウスにおいて、guanine から thymine への transversion が野生型の40倍以上に上昇することと一致しており、OGG1 と MUTYH がゲノム中に生じた 8-oxoguanine に起因する自然突然変異を協調的に抑制することを示している [23]。

我々は、Mth1、Ogg1、Mutyh の3つの遺伝子をすべて欠損した MTH1/OGG1/MUTYH 三重欠損マウスを樹立し、自然突然変異と発がんに注目して解析を進めてきた。MTH1/OGG1/MUTYH 三重欠損マウスは、生後50日頃から死亡する個体が認められ、500日では生存率は10%近くまで低下した。野生型マウスや3つの遺伝子のヘテロ欠損マウスは生後500日でもその生存率は100%であった。MTH1/OGG1/MUTYH 三重欠損マウスでは、肉眼で35%以上のマウスに肝臓、腎臓、肺、卵巣、乳腺、リンパ組織などの腫瘍に加えて、ハーダー腺腫瘍、毛包上皮腫など多様な腫瘍を含めてさまざまな腫瘍が認められた [24]。

MTH1/OGG1/MUTYH 三重欠損マウスは、in bred

で交配、維持している間に出生数減少し、離乳期を過ぎて生存するマウスが8世代目には数パーセントとなり、系統としての維持が困難であった。さらに、MTH1/OGG1/MUTYH 三重欠損マウス系統では子孫に水頭症や特殊ながんの発生、毛色の変化など遺伝性の表現形質の変化が観察された。MTH1/OGG1/MUTYH 三重欠損マウスの精巣や卵巣から抽出した DNA には野生型マウスの数倍高いレベルの 8-oxoguanine の蓄積が認められ、生殖細胞系列の突然変異頻度が上昇している可能性が示唆された。そこで、生殖細胞突然変異が最も蓄積していると考えられる 8 世代目の 3 匹のマウスを選択し、その DNA のエクソン領域 40.9 Mb を次世代シーケンサーを用いて解析したところ、このマウスの系統では 1 世代当たりの生殖細胞突然変異発生率が野生型マウス ( $5.4 \times 10^9$  変異 / 塩基 / 世代) と比較して約 3.7 倍 ( $2 \times 10^7$  変異 / 塩基 / 世代) 上昇していた。同定された変異の 99% は 8-oxoguanine に起因する guanine から thymine への transversion で、その頻度は野生型マウスの 450 倍以上に増加していた [24, 25]。同定された guanine から thymine への transversion の約 60% は遺伝子の機能に影響を与えるものであった [24]。

鋳型 DNA の adenine に対して挿入された 8-oxoguanine はミスマッチ修復で除去されることから、MTH1/OGG1/MUTYH 三重欠損マウスでも adenine から cytosine への transversion 変異は増加しないと考えられる [13, 26] (図 2)。

## 5. 8-oxoguanine は MUTYH に依存して細胞死を引き起こす

MTH1/OGG1 二重欠損マウスは MTH1/OGG1/MUTYH 三重欠損マウスに比べると、ゲノム DNA に 8-oxoguanine が野生型の数倍蓄積しているにもかかわらずその寿命も発がん頻度も野生型レベルである [18, 24]。MTH1/OGG1 二重欠損マウスでは、MUTYH の働きで 8-oxoguanine を蓄積した細胞が発がんに至る前に排除されている可能性が示唆される。我々は OGG1 欠損マウス細胞株を用いた解析により、OGG1 欠損細胞が酸化ストレスに対して高い感受性を示すことを見出した [27]。ヒト細胞には、選択的スプライシングによって生じた核型とミトコンドリア型の OGG1 タンパク質が存在する。我々は OGG1 欠損細胞株に核型とミトコンドリア型ヒト OGG1 (hOGG1) の cDNA 発現ベクターを導入し、2 種類の hOGG1 の一方、あるいは両方を発現する細胞株を樹立した。核型とミトコンドリア型の hOGG1 の両者を発現する細胞は酸化ストレスを負荷してもいずれのゲノム DNA にも 8-oxoguanine を蓄積することはなく、酸化ストレスに対して最も強い抵抗性を示した。核型 hOGG1 を発現する細胞は酸化ストレス負荷後にミトコンドリアゲノムに選択的に 8-oxoguanine を蓄積し、ミトコンドリアの変性を伴って細胞死に陥る。ミトコンドリア型 hOGG1 を発現する細胞は、酸化ストレス負荷後に核ゲノムに選択的に 8-oxoguanine を蓄積し、細胞死に陥る。いずれの場合も MUTYH の

ノックダウンによって細胞死は顕著に抑制されることから、MUTYH に依存した細胞死の経路の存在が明らかになった [27]。

ゲノム DNA 中に 8-oxoguanine が高度に蓄積したまま DNA 複製が進行すると鋳型 DNA 中の 8-oxoguanine に対して adenine が高頻度に取り込まれる。8-oxoguanine に対合した adenine は MUTYH によって切り出されるが、鋳型 DNA には依然として 8-oxoguanine が存在するために塩基除去修復過程で比較的高頻度に adenine が再度挿入される。その結果、MUTYH による adenine の除去修復が継続的に起こるために、特に新生 DNA 鎖に一本鎖の切断が蓄積する (図 3 A)。

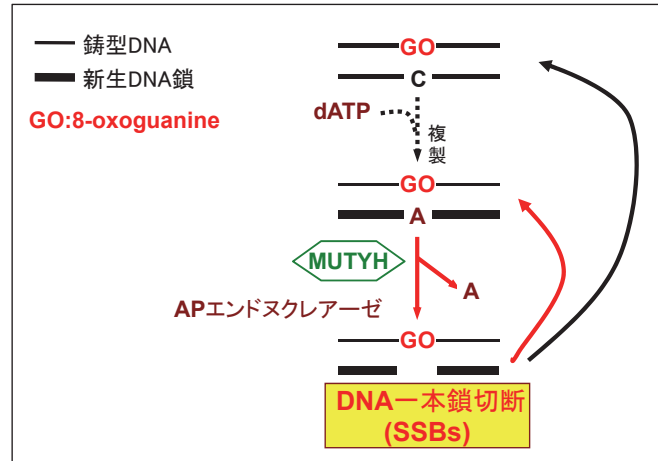
核ゲノムに 8-oxoguanine が蓄積した場合、新生 DNA 鎖の過剰切断によりポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼ (PARP) が活性化される。その結果、ADP-リボース・ポリマー (PAR) の蓄積によりミトコンドリアに局在している Apoptosis-inducing factor (AIF) がプロセッシングが引き起こされ、AIF が核へ移行してカスパーゼ非依存性のアポトーシスを引き起こす (図 3 B 上)。一方、ミトコンドリアゲノムに 8-oxoguanine が蓄積した場合、その過剰切断からミトコンドリアゲノム DNA の枯渇を引き起こし、ミトコンドリア機能障害を引き起こす。その結果、ATP の枯渇によりミトコンドリア膜の透過性が亢進し、ミトコンドリアからの  $Ca^{2+}$  イオンの流出に伴って細胞質のタンパク質分解酵素カルパインが活性化されてリゾソームの崩壊による細胞死が誘導される (図 3 B 下)。この 2 つのプログラム細胞死の経路は、8-oxoguanine を蓄積し変異を起こしやすい細胞を排除する方向に作用することから、発がん抑制機構として重要と考えられる [13, 26]。

## 6. 8-oxoguanine と神経変性

老化と活性酸素ストレスが神経変性疾患の主要な原因として注目されているが、どのような分子機序で神経細胞脱落が引き起こされるか、その詳細は未だ明らかになっていない。パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病など多くの神経変性疾患では、神経細胞に脂質やタンパク質の酸化体に加えて 8-oxoguanine が多量に蓄積することが報告されており、神経変性が酸化ストレスをとともなうことを示す根拠として注目されている。また、我々は、パーキンソン病とアルツハイマー病患者の剖検脳の解析から、MTH1、OGG1、MUTYH タンパク質の発現が変化していることを報告しているが [28-32]、OGG1 遺伝子については、アルツハイマー病患者特異的な変異も報告され、8-oxoguanine の蓄積が神経変性に関与することが強く示唆されている [33, 34]。

我々は、MUTYH に依存した 2 つのプログラム細胞死が個体レベルで神経変性の過程に関与する可能性を検討するために、ミトコンドリア神経毒 3-ニトロプロピオン酸 (3-NP) の投与によって引き起こされるハンチントン病モデルを用いて、MTH1、OGG1、MUTYH の欠損の影響を解析した [35]。3-NP はミトコンドリア呼吸鎖 (複合体 II) のコハク酸脱水素酵素活性を不可逆的に

A



B

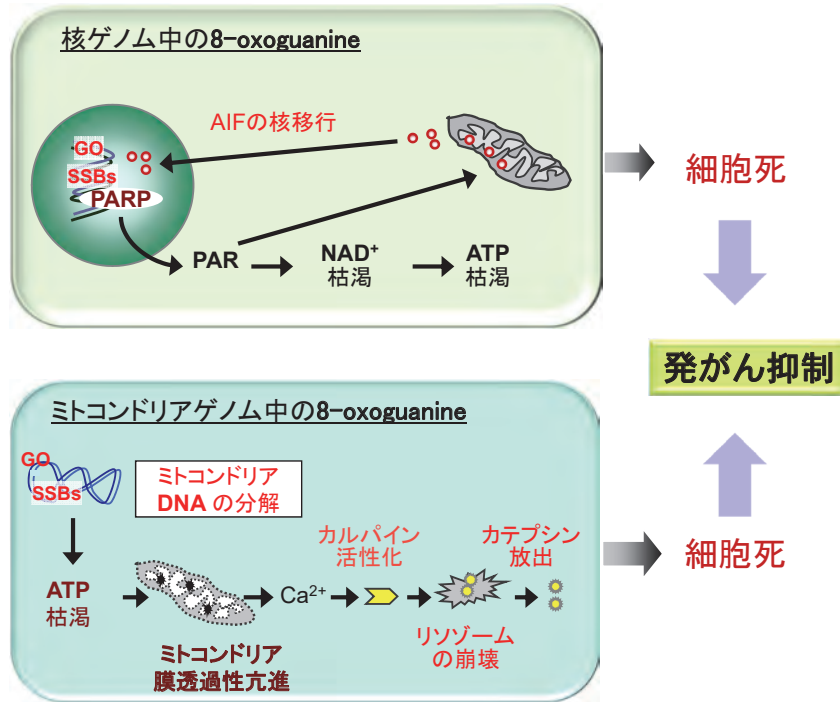


図3 MUTYHによるプログラム細胞死の誘発機構

A. 鋳型 DNA 中に 8-oxoguanine (GO) が存在すると次の複製の際に比較的高頻度に adenine が挿入される。この adenine は MUTYH で切り出され、その後の塩基除去修復過程では cytosine が挿入される場合と adenine が再挿入される場合とに分かれる。cytosine が挿入された場合には、図 2 に示すように OGG1 により 8-oxoguanine が除去修復される。しかし、adenine が再挿入されると、MUTYH による adenine の除去修復が継続的に起こるために、新生 DNA 鎖に一本鎖の切断 (SSBs) が蓄積する。

B. 核ゲノムに 8-oxoguanine (GO) が高度に蓄積し、新生鎖 DNA の過剰切断 (SSBs) が生じるとポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼ (PARP) が活性化され、ADP-リボース・ポリマー (PAR) の蓄積によりミトコンドリアに局在している Apoptosis-inducing factor (AIF) のプロセッシングが誘発される。プロセッシングを受けた AIF は、核移行してカスベース非依存性のアポトーシスを引き起こす (上図)。一方、ミトコンドリアゲノムに 8-oxoguanine が高度に蓄積し、ミトコンドリアゲノム DNA の過剰切断 (SSBs) が生じるとミトコンドリアゲノム DNA の分解・枯渇を引き起こし、ミトコンドリア機能障害を引き起こす。その結果、ATP の枯渇によりミトコンドリア膜の透過性が亢進し、ミトコンドリアからの  $\text{Ca}^{2+}$  イオンの流出に伴って細胞質のタンパク質分解酵素カルパインが活性化される。最終的に、リゾソームが崩壊し、タンパク質分解酵素カテプシンの放出されるため細胞成分が分解され、細胞死が誘導される (下図)。このような MUTYH による細胞死は発がん抑制に寄与すると考えられる。

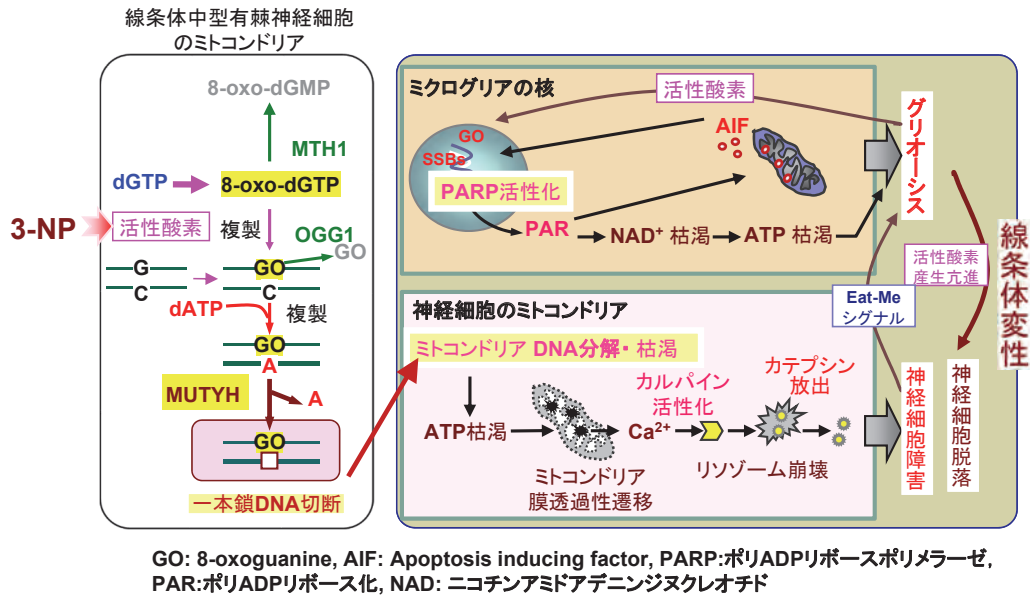


図4 3-ニトロプロピオン酸による線条体変性の分子機序

3-ニトロプロピオン酸 (3-NP) をマウスに全身投与すると線条体の神経細胞に選択的に取り込まれ、ミトコンドリア呼吸鎖の複合体 II を特異的に阻害し、活性酸素の生成を誘発する。その結果、ヌクレオチドプール中の dGTP が酸化され、8-oxo-dGTP が生じる。神経細胞ではミトコンドリアゲノムのみが複製しているために、ミトコンドリアゲノムに選択的に 8-oxoguanine が蓄積する。MUTYH により 8-oxoguanine に対して取り込まれた adenine が除去されると修復過程でミトコンドリアゲノム DNA が分解され、神経細胞の機能不全や細胞死が誘導される。このような障害を受けた神経細胞はミクログリアを活性化する。その結果、ミクログリア自身が産生する活性酸素によりミクログリアの核ゲノムに 8-oxoguanine の蓄積を引き起こす。ミクログリアの核ゲノムに蓄積した 8-oxoguanine は MUTYH に依存してミクログリオシスを増悪させ、神経変性を加速する。(詳細は本文参照)

阻害することでミトコンドリアにおける活性酸素の生成を亢進させるため、さまざまな機能分子の酸化を引き起こし、細胞機能障害を誘発する (図4左)。ヒトやサル、マウスが 3-NP を摂取すると、特に 3-NP に脆弱な線条体の中型有棘神経細胞死が誘発され、ハンチントン病様の運動機能障害を呈することが知られている。

MTH1、OGG1 あるいは MUTYH の単独欠損マウスと OGG1/MTH1 二重欠損マウス、そして野生型マウスに 3-NP を投与したところ、OGG1/MTH1 二重欠損マウス、OGG1 欠損マウス、MTH1 欠損マウスの順に野生型マウスよりも重篤な運動機能障害を呈し、線条体に高度な 8-oxoguanine の蓄積を伴う神経細胞脱落を呈することが明らかになった。興味深いことに、MUTYH 欠損マウスは野生型マウスと同程度かそれ以上の 3-NP 抵抗性を示した。OGG1/MTH1 二重欠損マウスや OGG1 欠損マウスで見られる線条体変性の早期には、3-NP による 8-oxoguanine の高度な蓄積は主に中型有棘神経細胞のミトコンドリアゲノムに認められ、ミトコンドリア機能障害を介してカルパイン活性化を伴う神経細胞の障害が観察された。一方、線条体変性の後期には神経細胞脱落部に増生したミクログリアの核ゲノムに顕著な 8-oxoguanine の蓄積が認められ、PARP の活性化と AIF の核移行が認められた。3-NP による線条体神経細胞脱落、ミクログリオシス、そして運動機能障害は、いずれもカルパイン阻害剤、あるいは PARP 阻害剤の

投与により有意に軽減することが確認された [35]。

OGG1 単独欠損マウスと OGG1/MTH1 二重欠損マウスの 3-NP 投与に対する応答を比較したところ、OGG1/MTH1 二重欠損マウスにおいては運動機能障害が顕著に軽減し、線条体における神経細胞脱落およびミクログリオシスもほとんど認められなかった。OGG1 欠損マウスの線条体の中型有棘神経細胞のミトコンドリア DNA とミクログリアの核ゲノムに認められた一本鎖 DNA 切断の蓄積も OGG1/MTH1 二重欠損マウスにおいては全く認められなかった [35]。

我々は、線条体組織に蓄積する 8-oxoguanine の起源を明らかにするために、ヒト MTH 1 (hMTH1) を高発現するトランスジェニックマウスを樹立し、3-NP による線条体変性の程度を野生型マウスと比較した [36]。その結果、hMTH1 の高発現により線条体における 8-oxoguanine の蓄積と線条体変性が顕著に抑制され、3-NP の神経毒性に対して顕著な抵抗性を獲得することが確認された。OGG1/MTH1 二重欠損マウスが最も 3-NP の神経毒性に対して感受性が高いことをあわせて考えると、ヌクレオチドプール中の dGTP の酸化で生じた 8-oxo-dGTP が神経細胞のミトコンドリアゲノムやミクログリアの核ゲノム中に蓄積した 8-oxoguanine の起源であると結論される (図4左)。

細胞分裂しない神経細胞では核ゲノムは複製されないが、ミトコンドリアは神経細胞の機能維持に不可欠なエ

エネルギーを供給するためにそのゲノム DNA を常に複製し、新しいミトコンドリアをシナプス等に供給している。ヌクレオチドプール中に生じた 8-oxo-dGTP が DNA 中に取り込まれるには DNA 複製が不可欠である。3-NP を投与した OGG1/MTH1 二重欠損マウスの神経細胞では複製するミトコンドリアゲノムのみならず 8-oxoguanine が高度に蓄積し、さらにその後の複製に際して DNA 中に存在する 8-guanine に対して取り込まれた adenine を MUTYH が除去することで開始される塩基除去修復の中間産物である一本鎖 DNA 切断の生成が過剰となり、ミトコンドリアゲノム DNA が分解枯渇したと考えられる。その結果、ミトコンドリア膜電位が維持されなくなり、細胞質に放出された  $Ca^{2+}$  イオンによって活性化されたカルパインに依存した神経細胞の機能障害が誘導されると考えられる [37] (図 4 右下)。

最近我々は、MTH1/OGG1 二重欠損マウスの脳から大脳皮質の神経細胞を取り出し、抗酸化剤の存在下、非存在下で培養し、神経細胞の神経突起の生成やミトコンドリア機能に注目して解析した。その結果、MTH1/OGG1 二重欠損神経細胞は抗酸化剤のない条件で培養すると、ミトコンドリアゲノムに 8-oxoguanine を多量に蓄積し、ミトコンドリア機能障害に陥り、さらに神経突起の生成が顕著に低下することを見出した。すなわち、神経細胞のミトコンドリアゲノムに 8-oxoguanine が蓄積すると、ミトコンドリア機能が障害されるためミトコンドリアは神経突起の生成とその維持に不可欠なエネルギーを供給できなくなるために、神経突起が維持されずに変性が進むことが確認された [38]。

一方、神経細胞の変性は、それ自身が脳内の免疫担当細胞であるミクログリアの活性化と増殖を誘発する。活性化ミクログリアは NADPH oxidase (NOX) 等により、その周囲に活性酸素を発生させるため、ミクログリアのヌクレオチドプールにも 8-oxo-dGTP が蓄積する。ミクログリアは分裂増殖に際して核ゲノムを複製することから、ヌクレオチドプールからその核ゲノム中に 8-oxoguanine が取り込まれて蓄積する。核ゲノム中に多量に蓄積した 8-oxoguanine もその後の複製に際して adenine と対合し、MUTYH による塩基除去修復の標的となる。その結果、核ゲノムの新生鎖に一本鎖 DNA 切断が蓄積するために PARP が活性化され、その下流でミトコンドリアに局在する AIF が切断され核に移行してミクログリアの活性化を促進すると考えられる。このような状況では、ミクログリオシスの増悪とともに活性酸素の生成が顕著に増強されるために、神経細胞はさらにダメージを受ける。また、活性化ミクログリアによる神経細胞の貪食作用によっても線条体の変性が著しく亢進されると考えられる [35, 37] (図 4B 右上)。

最近、フリードリヒ運動失調症において、MUTYH と PARP に依存したミクログリアの活性化が小脳と脊髄の神経変性、そして運動失調症の発症に関与することが報告され、我々が見出した MUTYH に依存したミクログリアの活性化機構が普遍的なものであることが報告された [39]。

## 7. おわりに

パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病など多くの老年性の神経変性疾患患者脳では、神経細胞のミトコンドリアゲノムに 8-oxoguanine が普遍的に蓄積しミクログリオシスを伴うことから、これらの神経変性疾患に共通の分子機序として図 4 に示した 2 つの経路が関与している可能性が強く示唆される。これらの経路に関わる分子は、認知症を始めとする神経変性疾患の治療薬開発に向けた新たな分子標的として有用と期待される。

## 謝辞

本稿で紹介した研究は、九州大学 生体防御医学研究所 脳機能制御学分野でおこなわれたものです。研究を推進していただいたメンバーの皆様に感謝いたします。

## 引用文献

1. Nakabeppu Y, Behmanesh M, Yamaguchi H, *et al.* Prevention of the Mutagenicity and cytotoxicity of Oxidized Purine Nucleotides. In *Oxidative Damage to Nucleic Acids*, ed. M Evans, M Cooke, pp. 40-53. Landes Bioscience, Springer Science+Business Media, Austin, TE, USA and New York, NY, USA: 2007.
2. Nakabeppu Y, Sakumi K, Sakamoto K, *et al.* Mutagenesis and carcinogenesis caused by the oxidation of nucleic acids. *Biol Chem* 387: 373-379, 2006.
3. Nakabeppu Y, Tsuchimoto D, Yamaguchi H, *et al.* Oxidative damage in nucleic acids and Parkinson's disease. *J Neurosci Res* 85: 919-934, 2007.
4. Kasai H, Nishimura S Hydroxylation of Deoxyguanosine at the C-8 Position by Ascorbic-Acid and Other Reducing Agents. *Nucleic Acids Res* 12: 2137-2145, 1984.
5. Jang YH, Goddard WA, Noyes KT, *et al.* First Principles Calculations of the Tautomers and pKa-Values of 8-Oxoguanine: Implications for Mutagenicity and Repair. *Chem Res Toxicol* 15: 1023-1035, 2002.
6. Kamiya H, Kasai H Formation of 2-hydroxydeoxyadenosine triphosphate, an oxidatively damaged nucleotide, and its incorporation by DNA polymerases. Steady-state kinetics of the incorporation. *J Biol Chem* 270: 19446-19450, 1995.
7. Nakabeppu Y Molecular genetics and structural biology of human MutT homolog, MTH1. *Mutat Res* 477: 59-70, 2001.
8. Nakabeppu Y, Tsuchimoto D, Ichinoe A, *et al.* Biological Significance of the Defense Mechanisms against Oxidative Damage in Nucleic Acids



- Caused by Reactive Oxygen Species: From Mitochondria to Nuclei. *Ann N Y Acad Sci* 1011: 101-111, 2004.
9. Nakabeppu Y Regulation of intracellular localization of human MTH1, OGG1, and MYH proteins for repair of oxidative DNA damage. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 68: 75-94, 2001.
  10. Nishioka K, Ohtsubo T, Oda H, *et al.* Expression and differential intracellular localization of two major forms of human 8-oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced OGG1 mRNAs. *Mol Biol Cell* 10: 1637-1652, 1999.
  11. Tominaga Y, Ushijima Y, Tsuchimoto D, *et al.* MUTYH prevents OGG1 or APEX1 from inappropriately processing its substrate or reaction product with its C-terminal domain. *Nucleic Acids Res* 32: 3198-3211, 2004.
  12. Ushijima Y, Tominaga Y, Miura T, *et al.* A functional analysis of the DNA glycosylase activity of mouse MUTYH protein excising 2-hydroxyadenine opposite guanine in DNA. *Nucleic Acids Res* 33: 672-682, 2005.
  13. Oka S, Nakabeppu Y DNA glycosylase encoded by MUTYH functions as a molecular switch for programmed cell death under oxidative stress to suppress tumorigenesis. *Cancer Sci* 102: 677-682, 2011.
  14. Ohtsubo T, Nishioka K, Imaiso Y, *et al.* Identification of human MutY homolog (hMYH) as a repair enzyme for 2-hydroxyadenine in DNA and detection of multiple forms of hMYH located in nuclei and mitochondria. *Nucleic Acids Res* 28: 1355-1364, 2000.
  15. Hayashi H, Tominaga Y, Hirano S, *et al.* Replication-associated repair of adenine:8-oxoguanine mismatches by MYH. *Curr Biol* 12: 335-339, 2002.
  16. Tsuzuki T, Egashira A, Igarashi H, *et al.* Spontaneous tumorigenesis in mice defective in the *MTH1* gene encoding 8-oxo-dGTPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 11456-11461, 2001.
  17. Tsuzuki T, Nakatsu Y, Nakabeppu Y Significance of error-avoiding mechanisms for oxidative DNA damage in carcinogenesis. *Cancer Sci* 98: 465-470, 2007.
  18. Sakumi K, Tominaga Y, Furuichi M, *et al.* *Ogg1* knockout-associated lung tumorigenesis and its suppression by *Mth1* gene disruption. *Cancer Res* 63: 902-905, 2003.
  19. Isogawa A Functional cooperation of *Ogg1* and *Mutyh* in preventing G: C->T: a transversions in mice. *Fukuoka Igaku Zasshi* 95: 17-30, 2004.
  20. Sakamoto K, Tominaga Y, Yamauchi K, *et al.* MUTYH-null mice are susceptible to spontaneous and oxidative stress induced intestinal tumorigenesis. *Cancer Res* 67: 6599-6604, 2007.
  21. Yanaru-Fujisawa R, Matsumoto T, Ushijima Y, *et al.* Genomic and functional analyses of MUTYH in Japanese patients with adenomatous polyposis. *Clin Genet* 73: 545-553, 2008.
  22. Isoda T, Nakatsu Y, Yamauchi K, *et al.* Abnormality in Wnt signaling is causatively associated with oxidative stress-induced intestinal tumorigenesis in MUTYH-null mice. *Int J Biol Sci* 10: 940-947, 2014.
  23. Xie Y, Yang H, Cunanan C, *et al.* Deficiencies in mouse *Myh* and *Ogg1* result in tumor predisposition and G to T mutations in codon 12 of the K-ras oncogene in lung tumors. *Cancer Res* 64: 3096-3102, 2004.
  24. Ohno M, Sakumi K, Fukumura R, *et al.* 8-oxoguanine causes spontaneous de novo germline mutations in mice. *Sci Rep* 4: 4689, 2014.
  25. Uchimura A, Higuchi M, Minakuchi Y, *et al.* Germline mutation rates and the long-term phenotypic effects of mutation accumulation in wild-type laboratory mice and mutator mice. *Genome Res* 25: 1125-1134, 2015.
  26. Nakabeppu Y Cellular Levels of 8-Oxoguanine in either DNA or the Nucleotide Pool Play Pivotal Roles in Carcinogenesis and Survival of Cancer Cells. *Int J Mol Sci* 15: 12543-12557, 2014.
  27. Oka S, Ohno M, Tsuchimoto D, *et al.* Two distinct pathways of cell death triggered by oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNAs. *EMBO J* 27: 421-432, 2008.
  28. Shimura-Miura H, Hattori N, Kang D, *et al.* Increased 8-oxo-dGTPase in the mitochondria of substantia nigral neurons in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 46: 920-924, 1999.
  29. Furuta A, Iida T, Nakabeppu Y, *et al.* Expression of hMTH1 in the hippocampi of control and Alzheimer's disease. *Neuroreport* 12: 2895-2899, 2001.
  30. Iida T, Furuta A, Nishioka K, *et al.* Expression of 8-oxoguanine DNA glycosylase is reduced and associated with neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathologica* 103: 20-25, 2002.
  31. Fukae J, Takanashi M, Kubo S, *et al.* Expression of 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathol* 109: 256-262, 2005.
  32. Arai T, Fukae J, Hatano T, *et al.* Up-regulation of hMUTYH, a DNA repair enzyme, in the mitochondria of substantia nigra in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 112: 139-145, 2006.
  33. Mao G, Pan X, Zhu BB, *et al.* Identification and

- characterization of *OGG1* mutations in patients with Alzheimer's disease. *Nucleic Acids Res* 35: 2759-2766, 2007.
34. Jacob KD, Noren Hooten N, Tadokoro T, *et al.* Alzheimer's disease-associated polymorphisms in human *OGG1* alter catalytic activity and sensitize cells to DNA damage. *Free Radic Biol Med* 63: 115-125, 2013.
  35. Sheng Z, Oka S, Tsuchimoto D, *et al.* 8-Oxoguanine causes neurodegeneration during MUTYH-mediated DNA base excision repair. *J Clin Invest* 122: 4344-4361, 2012.
  36. De Luca G, Russo MT, Degan P, *et al.* A role for oxidized DNA precursors in Huntington's disease-like striatal neurodegeneration. *PLoS Genet* 4: e1000266, 2008.
  37. Abolhassani N, Leon J, Sheng Z, *et al.* Molecular pathophysiology of impaired glucose metabolism, mitochondrial dysfunction, and oxidative DNA damage in Alzheimer's disease brain. *Mech Ageing Dev*, in press, 2016 (DOI: 10.1016/j.mad.2016.05.005)
  38. Leon J, Sakumi K, Castillo E, *et al.* 8-Oxoguanine accumulation in mitochondrial DNA causes mitochondrial dysfunction and impairs neurogenesis in cultured adult mouse cortical neurons under oxidative conditions. *Sci Rep* 6: 22086, 2016.
  39. Shen Y, McMackin MZ, Shan Y, *et al.* Frataxin Deficiency Promotes Excess Microglial DNA Damage and Inflammation that Is Rescued by PJ34. *PLoS One* 11: e0151026, 2016.

## Pathophysiology caused by 8-oxoguanine accumulated in genomes and protective mechanisms: from carcinogenesis to neurodegeneration

Yusaku Nakabeppu

Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University

### Abstract

8-oxoguanine, the most common oxidized base, has been characterized as a major cause of spontaneous mutagenesis. Levels of 8-oxoguanine in cellular genomes are maintained very low by coordinated actions of MTH1 (MutT-homolog-1) hydrolyzing 8-oxo-dGTP formed in nucleotide pool, OGG1 (8-oxoguanine DNA glycosylase) excising 8-oxoguanine opposite cytosine in DNA, and MUTYH (MutY homolog) excising adenine inserted opposite 8-oxoguanine in template DNA. Studies with mutant mice lacking MTH1, OGG1 or MUTYH, revealed that accumulation of 8-oxoguanine in either nuclear or mitochondrial genome triggers two distinct cell death programs dependent on MUTYH-initiated base excision repair. MUTYH-dependent cell death contributes to not only suppression of carcinogenesis, but also is involved in neurodegeneration through neuronal death due to mitochondrial dysfunction and microgliosis.

**Keywords :** MTH1, OGG1, MUTYH, Cancer, Neurodegeneration

【トピックス】

## 脂肪組織特異的 CREG1 トランスジェニックマウスを利用した 褐色脂肪化促進と生活習慣病改善の検討

橋本 理尋、楠堂 達也、竹内 環、遠藤 優貴、山下 均  
中部大学 生命健康科学部 生命医科学科

キーワード：CREG1、UCP1、褐色脂肪、生活習慣病

### 1. はじめに

我が国を筆頭とした先進国では、医療技術の進歩により平均寿命が大幅に延長した結果、超高齢化社会を迎えるに至っている。この中にあり、多くの国民の興味が単なる寿命の延長から、如何に元気に老後を過ごせるかという、いわゆる健康寿命の延長に移っている。健康寿命の延長を達成するためには加齢性疾患の予防が不可欠であることから、現在さまざまな老化研究が推進されている。我々の研究グループは、加齢/老化と密接に係る生活習慣病の基盤となる肥満という切り口から健康寿命の延長に貢献しようと考え、基礎研究を重ねてきた。

### 2. 褐色脂肪化促進による生活習慣病の改善

脂肪細胞に中性脂肪が過剰に蓄積した肥満は、それ単独では病気とは言い難いが、高脂血症、高血圧、糖尿病、悪性新生物、心疾患、脳血管疾患などの様々な生活習慣病の発症リスクを大幅に上昇させる要因となる。哺乳動物の脂肪細胞は多様であり、中性脂肪としてエネルギーを貯蔵する白色脂肪細胞以外にも、中性脂肪を燃焼させることにより熱産生を行う褐色脂肪細胞も存在している。最近の研究では、従来から知られている筋前駆細胞由来の褐色脂肪細胞（クラシカルタイプ）とは別に、中胚葉由来前駆細胞から分化誘導される褐色様脂肪細胞（ベージュ細胞あるいはブライト細胞と呼ばれる）が存在することが明らかとなっているが、どちらも熱産生によりエネルギーを消費し、抗肥満効果やインスリン抵抗性の改善作用を示すと考えられている [1]。従って、褐色脂肪細胞の数が増加すれば、肥満に悩む中年男性に光明が差すわけだが、そう都合のよいことばかりではない。実は、褐色脂肪細胞は加齢に伴い減少していくことがわ

かっており、この減少が肥満や糖尿病、メタボリックシンドローム発症の一因であることが明らかになっているのである [2]。つまり褐色脂肪細胞の分化誘導を促進すること（褐色脂肪化）が可能となれば、先進国で深刻な社会問題となっている加齢に伴うメタボ発症やその悪化を抑制する有効な手段になるものと期待されるわけである。

### 3. 褐色脂肪細胞分化誘導剤の探索

未分化脂肪細胞の褐色脂肪細胞への分化は、熱産生の中心的な役割を果たすミトコンドリア脱共役タンパク質 1（UCP1）の発現上昇で特徴づけられる（図1）。古くから知られている褐色脂肪細胞への分化誘導機構は、ノルエピネフリンや甲状腺ホルモン T3 などの内分泌因子を介するものである。ノルエピネフリンは脂肪細胞膜上の  $\beta$ 3 アドレナリン受容体を介して PKA や CREB を活性化することにより UCP1 の転写を促進している。一方で、T3 は甲状腺ホルモン核内受容体を介して UCP1 の転写を促進する。加えて、BMP7、Irisin、FGF21、Natriuretic peptides などの内分泌因子が褐色脂肪細胞

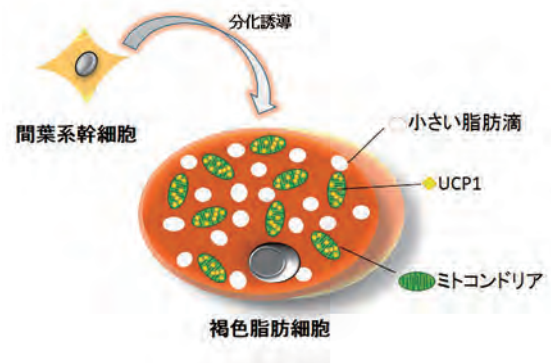


図1 褐色脂肪細胞の特徴

褐色脂肪細胞は多数のミトコンドリアと UCP1 の発現で特徴づけられる。脂肪滴は白色脂肪細胞と比較して小さい。

連絡先：橋本理尋 〒 487-8501

愛知県春日井市松本町 1200

TEL：0568-51-1111（内線 8135）

FAX：0568-51-6017

E-mail：mhashimoto@isc.chubu.ac.jp

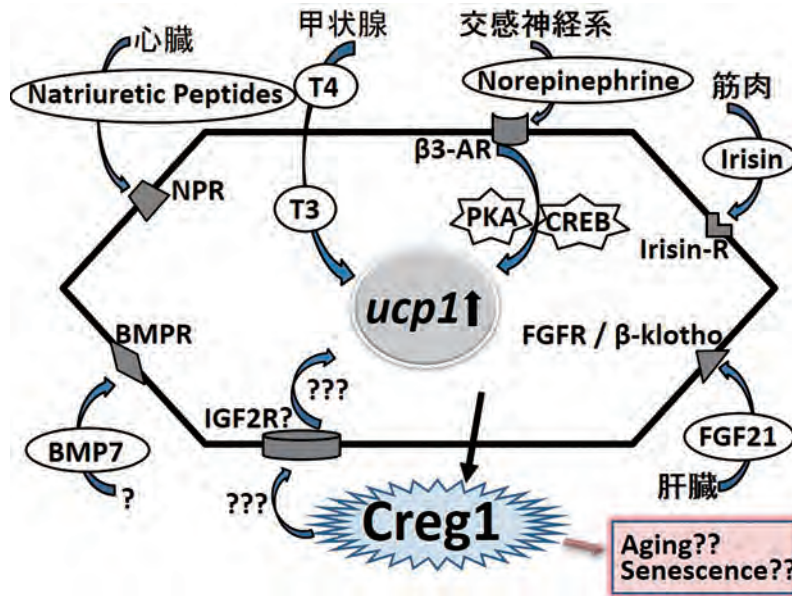


図2 褐色脂肪細胞の分化促進因子  
褐色脂肪化の促進に関わることが報告されている内分泌因子と CREG1 の関係性を模式的に示した。

への分化誘導に関与していることも報告されている (図2)。最近の研究では、PRDM16 や EHM1 などの転写制御因子が関わっていることも報告されている [3]。これらの知見を利用して、様々な角度から褐色脂肪化への分化誘導促進剤開発が進められてきたが、現在のところヒトへ応用された分化誘導剤はない。

#### 4. CREG1 の褐色脂肪化及び抗肥満作用

我々は先行研究において UCP1 欠損マウスが加齢に伴い食餌誘導性肥満になることなどを報告してきた [4, 5]。また、UCP1 欠損マウスを用いて白色脂肪組織の褐色脂肪化に関連する遺伝子群を探索する中で、褐色脂肪化の促進に伴い発現量が上昇する遺伝子の1つとして Cellular Repressor of E1A-stimulated genes 1 (CREG1) を同定した。CREG1 は分子量が約 24,000 の分泌糖タンパク質であり、細胞の増殖や分化に関与する Rb や E2F などの転写因子と相互作用すること [6] や M6P/IGF2R に結合すること [7] などが報告されているが、その生理的機能についてはほとんど分かっていなかった。我々は UCP1 欠損マウスの研究から得られた知見をもとに、褐色脂肪組織や鼠蹊部白色脂肪組織から調製した初代培養細胞を用いた分化誘導実験を行い、褐色脂肪化マーカーである UCP1 の発現上昇に先行して CREG1 の発現が誘導されることを見出した。さらに、培養細胞への CREG1 遺伝子の導入により UCP1 の mRNA レベルが上昇することを確認した。

続いて、生体における CREG1 の生理機能を検証するために、食餌誘導性肥満条件下の C57BL/6 マウスに精製した CREG1 タンパク質を浸透圧ポンプにより投与する実験を行い、実際に CREG1 投与群では PBS を投与した対照群と比較して有意な体重抑制効果が認められ、

白色脂肪組織では脂肪サイズの減少や褐色脂肪細胞の出現も確認された。加えて、CREG1 投与群では肝中脂質レベルにおける有意な改善効果も認められた。これらの成績は、生体レベルでも CREG1 が褐色脂肪化に関与しており、抗肥満において重要な役割を果たすことを強く示唆するものと考えられた (論文投稿中)。

#### 5. 脂肪組織特異的 CREG1-Tg マウスの樹立と表現型の解析

我々は、生体レベルにおける CREG1 の役割や抗肥満作用をさらに検討するため、aP2 プロモーターを用いて脂肪組織特異的に CREG1 の発現が誘導されるトランスジェニックマウス (CREG1-Tg マウス) を作製した。得られた複数の CREG1-Tg マウスラインについて C57BL/6 マウスへの戻し交配を進め、脂肪細胞で誘導される CREG1 の発現レベルの異なる低発現ラインと高発現ラインを樹立した。これら両ラインのマウスでは、通常の飼育条件下でも複数の脂肪組織で褐色脂肪化の促進が認められた。次に、これらの Tg マウスに高脂肪食を投与する実験を行った結果、野生型の WT マウスと比較して、Tg マウスでは体重増加が顕著に抑制され、血糖値や血清脂質レベルも改善する傾向が認められた。さらに組織学的検討から、Tg マウスでは各脂肪組織の脂肪細胞のサイズが小さくなり、UCP1 の発現量も増加しているという褐色脂肪化の特徴を有していることが明らかとなった。これらの結果は CREG1 が生体内においても脂肪組織の褐色脂肪化を促進する生理機能を有しており、褐色脂肪化促進により抗肥満作用を発揮する新規内分泌因子であることを証明するものと考えられた (図2)。

## 6. おわりに

CREG1に関する報告は少ないが、Moolmuang らは、CREG1が癌抑制遺伝子であるp16により誘導される細胞老化を促進することを報告している [8]。最近では、糖尿病患者のアテローム動脈粥状硬化症部位から採取した内皮細胞では、正常な内皮細胞と比較してCREG1の発現量が減少しており、アポトーシスが促進されていることが報告された [9]。この研究では、CREG1が高グルコース条件下で誘導される内皮細胞のアポトーシスを抑制することも示された。これらの報告は、我々の研究成果と同様に、CREG1の働きが老化や生活習慣病と密接な関わりを持っていることを示唆しており大変興味深い。未だ十分明らかとなっていない新規内分泌因子としてのCREG1の作用メカニズムの解明が待たれるところである。

## 参考文献

1. Inagaki, T, Sakai, J, and Kajimura, S. Transcriptional and epigenetic control of brown and beige adipose cell fate and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17 (8) :480-495, 2016.
2. Cypess, A M, Lehman, S, Williams, G, *et al.* Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *N Engl J Med* 360 (15) :1509-1517, 2009.
3. Harms, M J, Ishibashi, J, Wang, W, *et al.* Prdm16 is required for the maintenance of brown adipocyte identity and function in adult mice. *Cell Metab* 19 (4) :593-604, 2014.
4. Enerbäck, S, Jacobsson, A, Simpson, E M, *et al.* Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature* 387 (6628) :90-94, 1997.
5. Kontani, Y, Wang, Y, Kimura, K, *et al.* UCP1 deficiency increases susceptibility to diet-induced obesity with age. *Aging Cell* 4 (3) :147-155, 2005.
6. Veal, E, Eisenstein, M, Tseng, Z H, *et al.* A cellular repressor of E1A-stimulated genes that inhibits activation by E2F. *Mol Cell Biol* 18 (9) :5032-5041, 1998.
7. Di Bacco, A and Gill, G. The secreted glycoprotein CREG inhibits cell growth dependent on the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *Oncogene* 22 (35) :5436-5445, 2003.
8. Moolmuang, B and Tainsky, M A. CREG1 enhances p16 (INK4a) -induced cellular senescence. *Cell Cycle* 10 (3) :518-530, 2011.
9. Liu, Y, Tian, X, Li, Y, *et al.* Up-regulation of CREG expression by the transcription factor GATA1 inhibits high glucose- and high palmitate-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. *PLoS One* 11 (5) :e0154861, 2016.

## 【トピックス】

# *Lactobacillus gasseri* SBT2055 の寿命延長・抗老化作用メカニズムの解明

中川 久子、宮崎 忠昭

北海道大学 遺伝子病制御研究所 プロバイオティクス・免疫ロジー研究部門

キーワード：乳酸菌、寿命、老化、線虫、酸化ストレス、生体防御

### 1. はじめに

プロバイオティクスとは、「腸内菌叢のバランスを改善することにより人に有益な作用をもたらす生きた微生物」と定義されており、乳酸菌はその代表的なものとして広く認知されている。1907年にイリヤ・メチニコフにより、乳酸菌は人の健康と長寿を推進するという「ヨーグルト不老長寿説」[1]が説かれ、その作用としては腸内の腐敗菌の増殖を防ぐこと等が推察されていたが、未だそのメカニズムの詳細は明らかにされていない。近年いくつかのグループが乳酸菌による線虫 (*Caenorhabditis elegans*, *C.elegans*) の寿命延長効果とその作用機序について調べたところ、乳酸菌の種類によりその効果と作用機序は異なることが明らかとなってきた。一方で寿命延長作用を示さない乳酸菌も報告されていることから、一概にすべての乳酸菌が寿命延長作用を有しているわけではない。

今回、我々は、日本人の糞便より分離された *Lactobacillus gasseri* SBT2055 (LG2055) に着目した。LG2055 は胃酸や胆汁酸に抵抗性を有することから、腸管定着性が高く、これまでに整腸作用 [2]、およびコレステロール低下作用 [3] を示すことが報告されている。また我々の最近の研究により LG2055 はインフルエンザ A ウイルスの感染予防効果 [4] および IgA 抗体産生誘導能を有する事 [5] を報告した。本検討では、LG2055 による線虫の寿命延長および抗老化効果を評価し、その作用メカニズムを明らかにすることとした。

### 2. LG2055 による線虫の寿命延長・抗老化効果とその作用メカニズム

LG2055 による線虫の寿命延長効果を評価した結果、通常食の *Escherichia coli* OP50 摂取群に対し LG2055 摂取群では 37% 程度の平均寿命の延長が認められた。

そこで、抗老化作用を調べるため、他の実験動物と同様に線虫においても加齢に伴い増加・蓄積する脂肪やリポフスチン量を老化の指標として OP50 摂取群および LG2055 摂取群で解析した。その結果両群とも加齢により脂肪・リポフスチンの蓄積量が増加する傾向が認められたが、LG2055 摂取群では OP50 摂取群に比べ顕著に蓄積の程度が低く、摂取 10 日目では脂肪の蓄積が OP50 摂取群の 50% 程度であった。また運動能についても同様に LG2055 摂取により低下の抑制が認められたことから、LG2055 は抗老化作用を有し、線虫の寿命を延長させる事が明らかになった。

線虫の老化関連シグナル伝達経路においては DAF-16 (forkhead box O (FOXO) transcription factor) と SKN-1 (ortholog of mammalian NF-E2-related factor 2 (NRF2)) が重要な役割を担っている。そこで我々は LG2055 摂取と DAF-16、DAF-2 (インスリン/インスリン様成長因子 (IGF) 受容体) の関与について検討する事とした。*daf-2* 変異株及び *daf-16* 変異株の線虫では LG2055 摂取による寿命延長効果が失われなかったことより、LG2055 摂取による寿命延長効果は DAF-16 に依存しない経路を介しているものと考えられた。

NRF-2 は外的・内的酸化ストレス刺激により活性化され、解毒、代謝、免疫応答、酸化ストレス応答など種々のプロセスで生理的に調節する役割を担っており、MAPK 経路を介してその発現が誘導される。MAPK 経路の一つである p38MAPK (PMK-1) 経路は、炎症性サイトカイン、リポ多糖などの様々な細胞ストレスによって活性化した MAPKKK ASK-1 (NSY-1) が MAPKK (SEK-1) をリン酸化し、続いて MAPKK (SEK-1) により MAPK である p38 (PMK-1) がリン酸化 (活性化) されることでシグナルが伝達される。細菌感染により CeDUOX/BLI-3 から産生された ROS が p38MAPK 経路を介して SKN-1 を活性化することが報告されており [6]、また、SKN-1 と PMK-1 は線虫の免疫老化にも関与することが明らかにされている [7]。そこで LG2055 摂取が p38MAPK 経路あるいは他の MAPK 経路を介して SKN-1 の発現を誘導し、加齢による酸化ダメージを抑制するか否かを検討した。LG2055 を摂取した野生株の線虫では OP50 摂取群に比べ、加齢による ROS の蓄

連絡先：宮崎忠昭 〒060-0815

北海道札幌市北区北 15 条西 7 丁目

TEL：011-706-8095

FAX：011-706-8095

E-mail：miyazaki@pop.med.hokudai.ac.jp

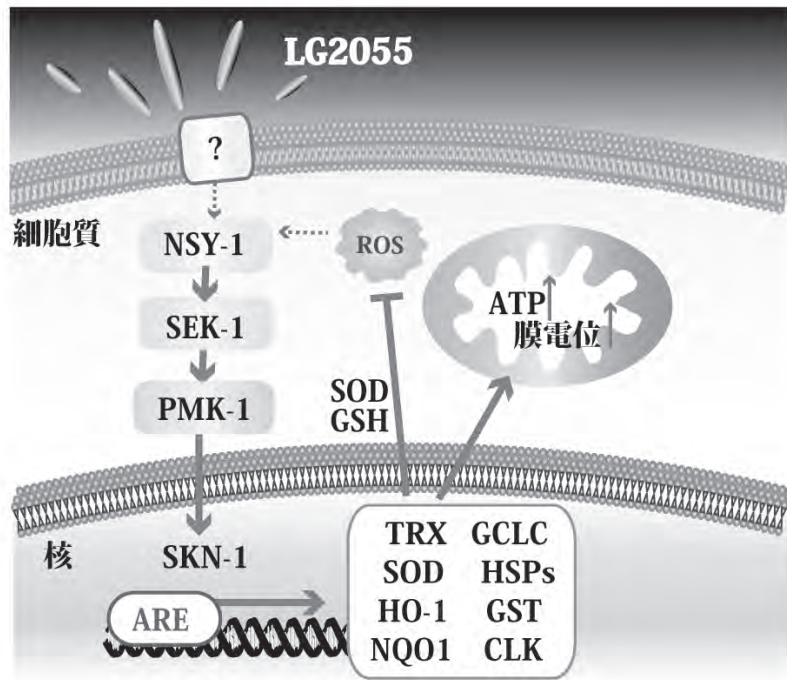


Figure.1 LG2055 による寿命延長・抗老化作用メカニズム。

線虫の消化管では LG2055 摂取により NSY-1-SEK-1-PMK-1 が活性化し、SKN-1 およびその標的遺伝子が up-regulation される。それにより加齢による酸化ストレス防御応答やミトコンドリアの機能低下が抑制され、寿命延長・抗老化作用を示す (文献 10 より一部改変)

積、及び酸化タンパクの増加が有意に抑制された。また LG2055 摂取により SKN-1 の遺伝子発現およびタンパク質量が亢進した。次に、MAPK 経路関連遺伝子について LG2055 摂取による発現変化を解析したところ、*nsy-1* (MAPKKK ASK1 のオルソログ)、*sek-1* (MAPKK) の遺伝子発現が亢進していた。さらに MAPK 関連遺伝子変異株の生存率を解析した結果、LG2055 摂取による *nsy-1*、*sek-1*、*pmk-1*、*skn-1* 変異株の平均寿命の延長は認められなかった。また LG2055 を摂取した野生株の線虫ではリン酸化 PMK-1 タンパク質の発現量が増加していた。これらの結果から、LG2055 は線虫の p38MAPK シグナル伝達経路を介して SKN-1 を活性化することにより、寿命延長・抗老化作用を示していることが明らかとなった。

### 3. LG2055 による酸化ストレス抵抗性の増強

SKN-1 は PMK-1 により活性化された後、Phase II 解毒遺伝子やミトコンドリア生合成関連遺伝子などの転写を誘導すること [8] から、これらの遺伝子発現を解析したところ LG2055 摂取により SOD やチオレドキシシンなどの ROS 消去系や HSP 遺伝子群などの遺伝子発現が亢進した。加えて ROS 消去系酵素活性を比較したところ LG2055 摂取により加齢に伴う SOD 活性や GSH/GSSG 比の低下が抑制された。このように LG2055 が ROS 消去系を活性化することから、加齢によるミトコンドリアの機能低下も抑制されることが想定された。ミトコンドリアの機能は加齢と共に低下する事が知られており、加齢による ROS の蓄積はミトコンドリア機能障

害を引き起こし、癌や糖尿病、代謝障害などの発症に関与する [9]。そこで我々はミトコンドリアの機能を示すパラメーターであるミトコンドリア膜電位と ATP 産生量について検討した。その結果、LG2055 摂取により加齢に伴うミトコンドリア膜電位および ATP 産生の低下が抑制されたことから、LG2055 は酸化ストレス抵抗性を増強し、ミトコンドリアの機能維持に働くことが明らかとなった。

### 4. おわりに

今回、我々は LG2055 による線虫の寿命延長および抗老化作用の有無と作用機序について検討し、LG2055 が p38 型 MAPK シグナル伝達経路を制御し、SKN-1 を活性化することにより、その下流に存在する抗酸化関連遺伝子の発現を誘導することで、加齢による ROS 消去系およびミトコンドリアの機能低下を抑制し寿命延長効果および抗老化作用を示すことを明らかにした [10]。最近、我々のマウス細胞を用いた試験においても同様の結果が得られていることから、哺乳類に対しても LG2055 の抗酸化ストレス効果および抗老化作用を示すことが推察される。今後、より詳細なメカニズムの解析と作用物質の特定により、LG2055 が酸化ストレス・老化関連疾患の治療または予防に応用されることが期待される。

[1] Metchnikoff E. The prolongation of life: optimistic studies. William Heinemann, London 1907: pp. 161-83.

[2] Fujiwara S, Seto Y, Kimura A, Hashiba H. Es-

- establishment of orally-administered *Lactobacillus gasseri* SBT2055SR in the gastrointestinal tract of humans and its influence on intestinal microflora and metabolism. *Journal of Applied Microbiology*. 2001;90 (3) :343-52.
- [3] Kajimoto O HH, Aoe S, Takahashi T, Suzuki Y, Tanaka H. Fermented milk containing *Lactobacillus gasseri* (SP strain) decreases serum cholesterol concentration in men with boundary and mild hypercholesterolemia. *Jpn J Lactic Acid Bacteria (in Japanese)* . 2002;13:114-24.
- [4] Nakayama Y, Moriya T, Sakai F, Ikeda N, Shiozaki T, Hosoya T, et al. Oral administration of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 is effective for preventing influenza in mice. *Sci Rep*. 2014;4:4638.
- [5] Sakai F, Hosoya T, Ono-Ohmachi A, Ukibe K, Ogawa A, Moriya T, et al. *Lactobacillus gasseri* SBT2055 induces TGF-beta expression in dendritic cells and activates TLR2 signal to produce IgA in the small intestine. *PLoS One*. 2014;9 (8) :e105370.
- [6] Bishop NA, Guarente L. Two neurons mediate diet-restriction-induced longevity in *C. elegans*. *Nature*. 2007;447 (7144) :545-9.
- [7] Hoeven R, McCallum KC, Cruz MR, Garsin DA. Ce-Duox1/BLI-3 generated reactive oxygen species trigger protective SKN-1 activity via p38 MAPK signaling during infection in *C. elegans*. *PLoS Pathogens*. 2011;7 (12) :e1002453.
- [8] Papp D, Csermely P, Söti C. A role for SKN-1/Nrf in pathogen resistance and immunosenescence in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Pathogens*. 2012;8 (4) :e1002673.
- [9] Inoue H, Hisamoto N, An JH, Oliveira RP, Nishida E, Blackwell TK, et al. The *C. elegans* p38 MAPK pathway regulates nuclear localization of the transcription factor SKN-1 in oxidative stress response. *Genes & Development*. 2005;19 (19) :2278-83.
- [10] Nakagawa H, Shiozaki T, Kobatake E, Hosoya T, Moriya T, Sakai F, et al. Effects and mechanisms of prolongevity induced by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*. 2016 Apr;15 (2) :227-36.



## 【トピックス】

# ミトコンドリア病診断マーカー GDF15 の同定と老年医学への応用

藤田 泰典

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

キーワード：ミトコンドリア病、GDF15、高齢者、疫学研究、総死亡

### 1. はじめに

ミトコンドリア病は、ミトコンドリア DNA または核 DNA の変異・欠失によるミトコンドリア機能障害を原因とする遺伝性疾患である [1]。一方、加齢に伴いミトコンドリア DNA 変異が蓄積することやミトコンドリア呼吸活性などが低下することが報告されている。近年、マイトファジー、慢性炎症、幹細胞機能などと老化・老化関連疾患との関係が注目されており、それらとミトコンドリアとの関係も示唆されている [2]。しかしながら、ミトコンドリア機能障害が老化・老化関連疾患に關与する分子メカニズムは十分には明らかにされていない。そのため、ミトコンドリア機能障害を有する細胞の解析は、ミトコンドリア病だけでなく老化・老化関連疾患の研究においても重要であると考えられる。そこで、我々は、ミトコンドリア病患者の細胞から樹立されたサイブリッドと呼ばれる細胞株のトランスクリプトーム及びメタボローム解析を行ってきた。最近、これらサイブリッドの解析から、ミトコンドリア病の診断マーカーとして GDF15 を同定した。また、この成果をもとに、高齢者における血中 GDF15 の意義の解明を目的とした研究にも取り組んでいる。今回は、これらミトコンドリア病の基礎・臨床研究と、GDF15 に着目した疫学研究の内容について紹介する。

### 2. ミトコンドリア病の診断マーカー GDF15 の同定

#### 1) ミトコンドリア病のバイオマーカー

ミトコンドリア病では、主にエネルギー需要の高い脳、骨格筋、心筋で症状が現れるが、多臓器において多彩な臨床症状を呈する [1]。また、患者によって症状が現れる臓器や重症度は様々である。症状を呈する組織では、ミトコンドリア機能障害に伴う ATP 産生の低下により解糖系が亢進し、乳酸が過剰に産生されることから、血

中の乳酸/ピルビン酸比 (L/P 比) はミトコンドリア機能障害を評価するマーカーとして臨床的に利用されている。しかしながら、臨床症状と相関しない場合もあり、診断や治療効果判定に有用な新たなバイオマーカーが求められている。

#### 2) ミトコンドリア病研究に有用なサイブリッド

サイブリッド (cybrid) は、ミトコンドリア DNA を除去した細胞と、細胞核を除いた患者由来の細胞を融合して樹立した細胞株であり、核 DNA が同一でミトコンドリア DNA が異なる [3]。そのためサイブリッドは、ミトコンドリア DNA 変異・欠失がミトコンドリアの呼吸鎖活性や細胞機能に与える影響を調べるために広く使用されてきた。我々は、ミトコンドリア病の一種である Mitochondrial Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like episodes (MELAS) 患者由来の細胞から樹立された 2SD 細胞と 2SA 細胞を用いて研究を行ってきた。2SD 細胞は、約 90% のミトコンドリア DNA に MELAS の原因となる mt.3243A>G 変異があり、ミトコンドリアの呼吸鎖活性が低下している。一方、2SA 細胞は、野生型のミトコンドリア DNA だけを有し、ミトコンドリアの機能は正常である。

#### 3) サイブリッドに対するピルビン酸投与と乳酸曝露の影響

我々は、これらサイブリッドのメタボローム解析から、ピルビン酸投与が 2SD 細胞のエネルギー代謝障害を改善し、乳酸曝露がエネルギー代謝障害を増悪することを明らかにした [4]。具体的には、ピルビン酸投与によりミトコンドリア機能障害に伴う NADH/NAD<sup>+</sup> 比の上昇が抑えられ、解糖系での ATP 産生が維持された。一方、乳酸曝露は NADH/NAD<sup>+</sup> 比の上昇を促進し、解糖系での ATP 産生を低下させた。このように、ピルビン酸投与はピルビン酸療法によりエネルギー代謝が改善された状態を、乳酸曝露は高乳酸血症を呈するほどエネルギー代謝障害が増悪した状態を反映するモデルとして有用であると考えられた。

連絡先：藤田泰典 〒173-0015

東京都板橋区栄町 35-2

TEL：03-3964-3241

FAX：03-3579-4776

E-mail：yfujita@tmig.or.jp

#### 4) 網羅的遺伝子発現解析によるバイオマーカー探索

我々は、ミトコンドリア病の診断や治療効果判定に有用な新規バイオマーカーを探索するために、ピルビン酸投与または乳酸曝露を行ったサイブリッドの網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、乳酸を曝露した2SD細胞でGrowth Differentiation Factor 15 (GDF15)の遺伝子発現が顕著に増加していた。このGDF15の遺伝子発現上昇は、2SA細胞では認められなかった。また、遺伝子発現変化と一致して、GDF15の分泌量は、2SA細胞よりも2SD細胞の方が多く、乳酸曝露によりさらに増加することがわかった。これらの結果から、GDF15はミトコンドリア機能障害によるエネルギー代謝障害を反映し、ミトコンドリア病の診断、治療効果判定に有用なバイオマーカー候補になることが示唆された[5]。

#### 5) ミトコンドリア病の診断における血中GDF15の有用性

GDF15の臨床的有用性を検証するために、ミトコンドリア病患者の血中GDF15濃度を調べた結果、健康者と比較して約6倍に増加していた[6]。また、血中GDF15濃度はミトコンドリア病の重症度スコアと相関がみられた(相関係数 $r = 0.76$ ,  $p < 0.001$ )。さらに、ROC解析を行った結果、GDF15とL/P比の曲線下面積(AUC)が0.997、0.919であり、GDF15がよりも高い診断精度を示した。今後、診断薬の開発が進み、臨床研究が広く実施されることで、ミトコンドリア病における血中GDF15の臨床的意義が確立されるものと期待される。

### 3. GDF15の老年医学への応用

#### 1) GDF15の発現と機能

GDF15はTGF- $\beta$ スーパーファミリーに属する分泌タンパクであり、前立腺、腸、腎臓、脈絡叢、胎盤などで顕著に発現している。また、他の組織・細胞においても、

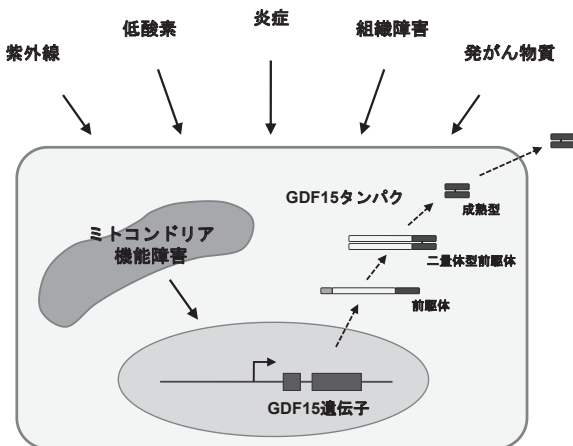


図1 GDF15の遺伝子発現誘導と細胞外分泌

GDF15は炎症、低酸素、紫外線、組織障害、発がん物質などに加え、ミトコンドリア機能障害により遺伝子発現が誘導される。通常、GDF15タンパクは前駆体、二量体型前駆体を経て成熟型となり細胞外に分泌される。

低酸素、炎症、UV曝露、組織傷害などのストレスに反応してGDF15の遺伝子発現が誘導される(図1)[7]。このような発現制御に関与する転写因子として、p53、Egr-1、NF- $\kappa$ B、ATF3、HIF-1 $\alpha$ などが報告されている。我々が行った網羅的遺伝子発現解析では、ミトコンドリア機能障害で発現誘導された遺伝子の中に、p53とATF3の下流の遺伝子が多数見られたことから、ミトコンドリア機能障害によるGDF15の遺伝子発現誘導には、p53やATF3が関与している可能性が考えられた。一方、GDF15タンパクの機能として、抗炎症、心筋保護、神経保護、食欲・代謝調節作用などが報告されている[7, 8]。また、癌細胞の増殖、転移、治療耐性などに関与することも明らかにされている(図2)[9]。

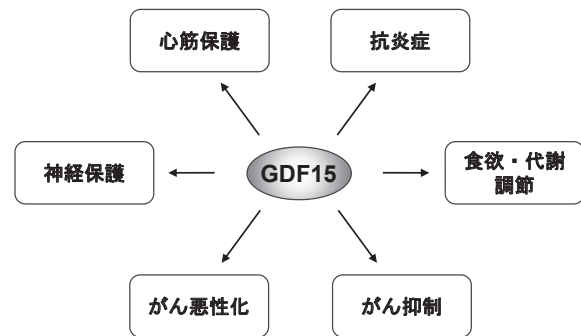


図2 GDF15の機能

GDF15タンパクは、抗炎症、心筋保護、神経保護作用を有する。また、食欲・代謝を調節する働きがある。一方、がんの悪性化に関与することが知られているが、がん抑制的に機能することも報告されている。

#### 2) 血中GDF15と疾患・病態との関連

血中GDF15濃度に注目した臨床研究の報告は多数あり、癌、心血管疾患、腎疾患、貧血などの疾患・病態と血中GDF15との関連性が示唆されている[7]。また興味深いことに、近年の研究により、血中GDF15濃度が高齢者の認知機能障害と関連し、将来の認知機能低下の予測因子となることが報告された[10]。さらに、MRIによる高齢者の脳構造を解析した研究では、血中GDF15濃度が高いほど灰白質体積が低く、白質線維の統合性と関連する異方性度が低いことが示されている[11, 12]。今後、GDF15の認知機能低下、認知症との関連およびそのメカニズムの解明が期待される。

#### 3) 高齢者の血中GDF15濃度と総死亡との関連

近年、高齢者の血中GDF15濃度が将来の総死亡の予測因子となることが報告されている[13, 14]。しかしながら、身体機能、栄養状態、心理・社会的機能などの交絡要因を調整した上での、血中GDF15濃度と総死亡の独立した関連性は明らかにされていない。そこで、地域在住高齢者1832人を対象に、血中GDF15濃度と身体機能、栄養状態、心理・社会機能との横断的な関連性及び将来の総死亡との関連性を検討した。その結果、血中GDF15濃度が高いほど身体機能が低く、炎症マーカー

が高いことがわかった。さらに、対象者を血中 GDF15 濃度により四分位に分けた場合、最高値群は最低値群と比較して将来の総死亡の発生リスクが約 2 倍高いことが明らかになった。

#### 4. おわりに

ミトコンドリア機能障害を有する細胞が分泌するタンパクや、それらが周囲の細胞に与える影響に関する報告は限られている。老化・老化関連疾患のメカニズムの解明において、ミトコンドリア機能障害を有する細胞から分泌されるタンパクが、新たな標的になるかも知れない。今後、GDF15 に着目した基礎研究に加え、臨床・疫学研究も推進していきたいと考えている。

#### 謝辞

本研究の実施にあたり多大なご協力を頂きました伊藤雅史研究部長、新開省二副所長、谷口優氏（東京都健康長寿医療センター研究所）、田中雅嗣部長（東京都健康長寿医療センター）、小島俊男氏（豊橋技術科学大学）、古賀靖敏氏、八ッ賀秀一氏（久留米大学小児科）に深く感謝申し上げます。

#### 参考文献

1. Vafai SB, Mootha VK: Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. *Nature* 2012, 491 (7424) :374-383.
2. Sun N, Youle RJ, Finkel T: The Mitochondrial Basis of Aging. *Mol Cell* 2016, 61 (5) :654-666.
3. Wilkins HM, Carl SM, Swerdlow RH: Cytoplasmic hybrid (cybrid) cell lines as a practical model for mitochondrial pathologies. *Redox Biol* 2014, 2C:619-631.
4. Kami K, Fujita Y, Igarashi S, Koike S, Sugawara S, Ikeda S, Sato N, Ito M, Tanaka M, Tomita M et al: Metabolomic profiling rationalized pyruvate efficacy in cybrid cells harboring MELAS mitochondrial DNA mutations. *Mitochondrion* 2012, 12 (6) :644-653.
5. Fujita Y, Ito M, Kojima T, Yatsuga S, Koga Y, Tanaka M: GDF15 is a novel biomarker to evaluate efficacy of pyruvate therapy for mitochondrial diseases. *Mitochondrion* 2015, 20:34-42.
6. Yatsuga S, Fujita Y, Ishii A, Fukumoto Y, Arahata H, Kakuma T, Kojima T, Ito M, Tanaka M, Saiki R et al: Growth differentiation factor 15 as a useful biomarker for mitochondrial disorders. *Ann Neurol* 2015, 78 (5) :814-823.
7. Unsicker K, Spittau B, Kriegstein K: The multiple facets of the TGF-beta family cytokine growth/differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1. *Cytokine Growth Factor Rev* 2013, 24 (4) :373-384.
8. Fujita Y, Taniguchi Y, Shinkai S, Tanaka M, Ito M: Secreted growth differentiation factor 15 as a potential biomarker for mitochondrial dysfunctions in aging and age-related disorders. *Geriatr Gerontol Int* 2016, 16 Suppl 1:17-29.
9. Wang X, Baek SJ, Eling TE: The diverse roles of nonsteroidal anti-inflammatory drug activated gene (NAG-1/GDF15) in cancer. *Biochem Pharmacol* 2013, 85 (5) :597-606.
10. Fuchs T, Trollor JN, Crawford J, Brown DA, Baune BT, Samarasinghe K, Campbell L, Breit SN, Brodaty H, Sachdev P et al: Macrophage inhibitory cytokine-1 is associated with cognitive impairment and predicts cognitive decline - the Sydney Memory and Aging Study. *Aging Cell* 2013, 12 (5) :882-889.
11. Jiang J, Trollor JN, Brown DA, Crawford JD, Thal-amuthu A, Smith E, Breit SN, Liu T, Brodaty H, Baune BT et al: An inverse relationship between serum macrophage inhibitory cytokine-1 levels and brain white matter integrity in community-dwelling older individuals. *Psychoneuroendocrinology* 2015, 62:80-88.
12. Jiang J, Wen W, Brown DA, Crawford J, Thal-amuthu A, Smith E, Breit SN, Liu T, Zhu W, Brodaty H et al: The relationship of serum macrophage inhibitory cytokine-1 levels with gray matter volumes in community-dwelling older individuals. *PLoS One* 2015, 10 (4) :e0123399.
13. Wiklund FE, Bennet AM, Magnusson PK, Eriksson UK, Lindmark F, Wu L, Yaghouyfam N, Marquis CP, Stattin P, Pedersen NL et al: Macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1/GDF15) : a new marker of all-cause mortality. *Aging Cell* 2010, 9 (6) :1057-1064.
14. Daniels LB, Clopton P, Laughlin GA, Maisel AS, Barrett-Connor E: Growth-differentiation factor-15 is a robust, independent predictor of 11-year mortality risk in community-dwelling older adults: the Rancho Bernardo Study. *Circulation* 2011, 123 (19) :2101-2110.

## 【大会報告】

### 第 39 回日本基礎老化学会大会報告

石井 直明

東海大学医学部 基礎医学系 分子生命科学領域

本年 5 月 27 日、28 日の二日間にわたり神奈川県伊勢原市民文化会館において第 39 回日本基礎老化学会大会を開催しました。伊勢原には新宿から小田急線で 1 時間以上かかり、一番近い新幹線の小田原駅はのぞみが停車しないことから、参加するには便利とは言えない場所にありますので、最初は東京か横浜での開催を考えました。しかし横浜は去年の開催地であり、東京も本学会のシンポジウムや老年学会で頻繁に開催されていますので、たまには普段あまり訪れることがない場所での開催も新鮮ではと、私の所属する医学部がある伊勢原市に決めました。医学部に講堂が新設され、そこを使いたかったのですが、今年カリキュラム改訂があり、準備を始めた時点では利用できるか分からなかったため、隣接する文化会館を利用しました。

伊勢原市には丹沢大山国定公園があり、その入り口にあたる標高 1252m の大山は古くから山岳信仰の山として親しまれてきました。狂言・落語の「六人僧」は江戸時代の「大山詣り」を題材にしたものです。大山は別名を「阿夫利(あふり)山」、「雨降(あふ)り山」ともいい、雨乞いの神として農民の信仰を集めたそうです。晴れた日には山頂から東京湾から横浜市、三浦半島、鎌倉・湘南海岸、伊豆半島まで一望できます。伊勢原市は別名、「果物の里」と呼ばれ、イチゴ、ブドウ、梨の農園がたくさんあり、風光明媚、農産物が豊かな土地として知られています。隣の厚木市には連合国軍最高司令官だったマッカーサーが戦後降り立った米軍の厚木基地があります。学会前日の理事会後の夕食会はマッカーサー夫妻が使っていたという車が置いてあり、ジャズの生演奏が聴ける

レストラン「マッカーサーギャレージ」で行いました。

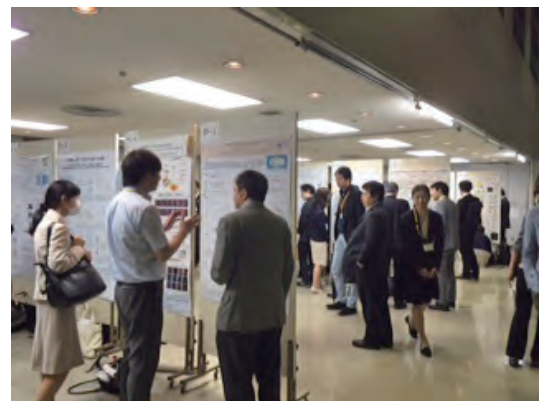
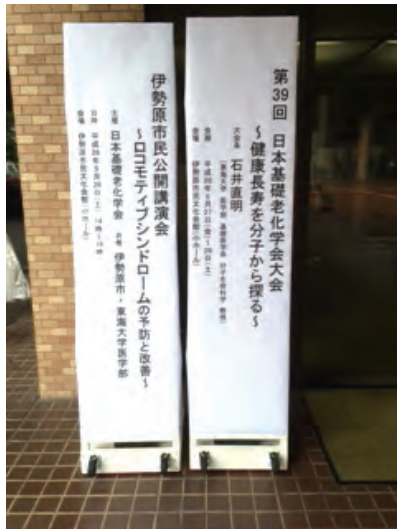
伊勢原のような辺鄙な場所に来てくれるのかと危惧しましたが、東海大学関係者を除き 113 名の方々に参加していただき、演題も 37 題と例年と変わらない数の申し込みがありました。

今回の学会のタイトルを「健康長寿を分子から探る」とし、特別講演には日本の百寿者研究の第一人者である慶應義塾大学医学部百寿総合研究センターの広瀬信義先生に「ヒトの長寿を遺伝子から探る：スーパーセンテナリアン研究の展望」というタイトルでお話いただきました。百寿者の遺伝子から炎症や免疫、テロメアなどとの関係など多岐に亘る解析の結果と、105 歳以上のスーパーセンテナリアン(超百寿者)の研究の展望について、広瀬先生でなければ語れない貴重な講演をしていただきました。

基礎老化学の進歩により、老化にシグナル伝達経路を介する代謝が深く関わっていることが明白になってきましたので、シンポジウムでは東海大学医学部基盤診療系健康管理学教授で附属病院健診センター長であり、本大会副会長の西崎泰弘先生には臨床医の立場から、我々が医学部附属東京病院で展開している抗加齢ドック受診者の血液のデータ解析の話、「人間ドックによる老化の推量と介入：抗加齢ドック 10 年間の取り組み」を、筑波大学生命領域学際研究センターの深水昭吉先生には基礎生命科学者の立場から線虫を使った食事制限による代謝、特にアミノ酸代謝の加齢変化の話、「寿命を動かす代謝の仕組み」をしていただきました。

一般演題講演は老化特定分子 4 題、老化関連ストレス





分子6題、神経老化関連分子5題、老関連階層性生体分子5題の20題の他に、1日目夕方のポスター発表26題の中の奨励賞候補者17名に対してポスター発表の前に5分間の講演の時間を設けました。これには、ポスターの発表時間が短いという理由もありましたが、全参加者の前で口頭発表することが若手の貴重な経験・訓練になることと、事前に発表内容を聴衆や奨励賞の審査員に理解してもらうことで、ポスター会場でもより活発な議論をするという狙いがありました。この奨励賞には、橋本理尋さん（中部大学生命健康科学部生命医科学科）「脂肪組織特異的CREG1-Tgマウスによる褐色脂肪化生活習慣改善の検討」、中川久子さん（北海道大学遺伝子病制御研究所）「Caenorhabditis elegansの寿命延長効果を示すLactobacillus gasseri SBT2055の作用メカニズム」、藤田泰典さん（東京都健康長寿医療センター老化機構研究チーム）「地域在住高齢者の血中GDF-15と負のアウトカムとの関連解析」が選ばれました。

今回の大会で感じたのは、研究の質が高くなったことと、若手の目覚ましい成長、そして、討論時間を長めに取ったことでしっかりとした議論がされたことでした。一番嬉しかったのは、「昔の基礎老化学会の大会会場にいるような雰囲気の活気溢れた大会だった」と参加者から声をかけていただいたことでした。

大会1日目の昼には東海大学のブランド戦略事業の支援により我々が考えた「抗加齢ヘルシー弁当」を参加者全員に試食していただきました。量的に男性には少し物足りなかったかもしれませんが、味は好評でした。1日目の夜は文化会館隣の市役所の食堂において懇親会をおこないました。夜7時半開始にも関わらず60名の方に参加していただき、和やかな雰囲気の会を持つことができました。

2日目の午前の一般演題講演と奨励賞受賞式・総会に続き、午後からは「ロコモティブシンドロームの予防と改善」というタイトルで市民公開講演会を開催し、市民70名が参加してくれました。東海大学体育学部教授

で整形外科医の中村豊先生にはロコモティブシンドロームの解説と神奈川県大磯町で展開している健康事業について、医学部の客員研究員で小関アスリートバランス研究所の小関勲所長にはヒモを使った健康トレーニング法（ヒモトレ）を参加者に体験してもらいました。高山松太郎伊勢原市長にご挨拶をお願いしたのですが、奥様も同伴で来られ、最後まで残って熱心にヒモトレをおこなっていただきました。

基礎老化学会がまだ研究会の時代から毎年欠かさず参加し、この学会に育てられたと思っておりますが、現役最後の年に大会長を務めさせていただく機会を与えていただき、本学会の皆さまに感謝いたします。また大会の参加登録管理や開催準備をしてくれた秘書の辛島由希子さん、準備・運営に尽力してくれた技術員の安田佳代さん、企画からプログラム編成、開催に至るまでほとんどの業務に携わり、討論時間を長く取る、奨励賞の候補者は口頭発表とポスター発表をおこなうなどのアイデアを出してくれた石井恭正講師という優秀な研究室のスタッフがいてくれたからこそ開催できた大会であったことを記したいと思います。大会開催に協力・支援をいただきました東海大学や医学部同窓会、企業の関係者の方々にも感謝申し上げます。

基礎老化学が老年医学や抗加齢医学の発展に大きな役割を果たし、今後ますます重要で、世の中に必要な学問になっていくと思いますので、日本基礎老化学会のさらなる発展をお祈りします。

## 【大会見聞録】

### 第 39 回日本基礎老化学会大会に参加して

海野 けい子

静岡県立大学 薬学部 統合生理学分野

2016年5月27日から28日までの2日間に、東海大学の石井直明教授を大会長として、伊勢原市において第39回日本基礎老化学会大会が開催された。本大会では「健康長寿を分子から探る」をタイトルとして掲げ、様々な切り口による老化研究の報告が行われた。大会長の初めのご挨拶の中で、自分の専門に深く入り込んでしまうと老化との接点を見失いがちになってしまうこともあるので、時に原点に立ち戻ることは重要ではないか、というようなことを述べられていたと思う。老化研究という難問に取り組んでいく上で、1つの会場で2日間じっくり多様な研究成果を聞いたことは、それぞれに有意義な時間となったと思われる。いずれの発表も素晴らしかったが、個人的に印象に残ったものをいくつか紹介する。

「基礎・臨床研究から健康長寿を考える」と題したシンポジウムでは、副大会長の西崎泰弘先生が、ご自身が勤務されている東海大学ライフケアセンター抗加齢ドッグで10年間集積されたデータを紹介された。加齢に伴い変化する様々な因子とともに、介入を行ったりピーターの方々では加齢変化がどのように変わるのかをお示しいただいた。その結果は、確かに加齢変化に抗うことができることを示唆するものであった。「抗加齢」という言葉には多少違和感を感じていたが、「加齢に抗う」ことがわかった気がした。続いて筑波大学の深水昭吉先生から「寿命を動かす代謝の仕組み」と題して、カロリー制限による寿命延長効果のメカニズムについて、線虫を用いメチオニン代謝に着目された最新の研究成果が紹介された。誰もが知っているTCAサイクルではあるが、教科書には載っていないTCAサイクルの仕組みをワクワクとした気持ちで聞かせていただいた。

特別講演では慶応義塾大学の広瀬信義先生から「ヒトの長寿を遺伝子から探る —スーパーセンテナリアン研

究の展望—」と題して、百寿者、超百寿者(105歳以上)、およびスーパーセンテナリアン(110歳以上)の方々での研究成果を紹介いただいた。炎症は老化の重要な因子であり、超高齢者(85~99歳)や百寿者、超百寿者のいずれの年代においても、炎症指標が高い人ほど生存期間が短いことを示された。また、白血球のテロメア長は通常は加齢とともに短くなるが、百寿者や超百寿者ではテロメアは短くなっていないこと、さらに百寿者や超百寿者の子供達もテロメアは短くなっていないことが示され、大変興味深く思った。

一般演題では20の講演が行われた。その中から2つほど紹介する。高齢者では膝の痛みを抱えていることが多く、生活の質を低下させる重要な要因になっているが、変形性関節症患者の軟骨変性において、ミトコンドリアスーパーオキシドが治療標的になることを千葉大学の清水孝彦先生らが示された。実用化が待たれると感じた。またアミロイド $\beta_{42}$ ( $A\beta_{42}$ )はアルツハイマー病の原因タンパク質のひとつと考えられているが、立体構造と神経毒性との興味深い関連が、泉尾直孝先生ら(千葉大学他)から報告された。

奨励賞候補講演としては17演題が発表された。今大会ではポスター発表に加え、5分間の口頭発表も行われたことから、各演題の概要を知ることができ非常に良かった。この中で、橋本理尋先生(中部大学)、藤田泰典先生(東京都健康長寿医療センター)、中川久子先生(北海道大学)に奨励賞が授与された。若手研究者には更なる活躍を期待したい。これらに加え一般演題ポスター講演も9演題が報告され、非常に活発な討論が行われた。

2日間の学会が非常に円滑に運営され充実した内容であったことを、大会長をはじめとする東海大学医学部の大会関係者の皆様に深く感謝する。

【追悼文】

今堀和友先生とその時代

丸山 直記

草加ロイヤルケアセンター

57歳で死んだ私の父は今堀先生と生年が同じで、よく「俺の青春は灰色だった」と言っていたものです。軍隊に2回もとられて運良く生き抜いたので、私がいるわけですが。今堀先生の自伝ともいえる「蛋白質に魅せられて」をいただいて読んだ時、先生にも回避できないその時代の宿命があったことを感じたのです。広島原爆投下が一日遅れていたら先生は生きてはいなかったでしょうし、その幸運は私たちにも影響していたのですから。でも先生はいつも前向きにその能力を発揮していたように思います。そのことが戦後における先生の研究者としての多彩な生き方の基礎となったように思います。

1983年に米国のスクリップス医学研究所から帰国し、心ならずも大学を辞してアカデミック・キャリアを外れて千葉労災病院の病理部長として着任した私は3年間で縁がなかったら普通の病理医になろうと思っていました。2年が過ぎた頃、千葉大学の谷口 克先生から東京都老人総合研究所（東京都健康長寿医療センター研究所）に基礎病理室長に応募してはというお話がありました。今堀先生が永井克孝先生に御相談され長岡高校の後輩である谷口先生を経てきた人事案件でした。当時、東大にいらした多田富雄先生から今堀先生へのご推薦もあり、結果的には今堀先生に拾っていただく事になりました。まさしく「こね」で採用してもらった様なものでし

た。初めて先生にお会いしたのは養育院の構内では桜が満開の頃でした。緊張して研究所にむかいましたが以前からの知己であるかと錯覚してしまいそうな先生の笑顔でほっとした事を今でも生き生きと思い出します。研究所に移籍してからは、なぜか忘年会では隣に座られることが多かったのです。そんな時は学問の話よりも、医師としての失敗談をお話することが多かったような気がします。先生は医学部の教授でもあったので、その手の話が好きでした。その後、私は「こね」から「御縁」と言い換えることができるように努力してきたつもりです。

基礎老化学会への貢献は先生が生命研に移られてから突然電話があり「君に重要な任務を与える。会計幹事を命ずる。」とのことでした。その時から現在まで私にとって一番重要な学会は基礎老化学会となったわけです。その後も「今堀フォーラム」に招いてくださるなど、あの笑顔を拝することができました。

最後に先生とお話したのは研究所の副所長時代に研究所のメンバーを中心に完成した Geriatrics and Gerontology International の Supplement を老人医療センターの外来で先生に差し上げた時でした。お疲れでもあったのでしょうか、その時は本を手にとって穏やかに微笑まれました。私にとって都合の良い解釈はあま



写真：2003年の名古屋で開催された学会で、左から黒田行昭先生、藤原美定先生、今堀和友先生。

りにも文学的ですが、「あのこねで拾った若い室長がなんとか老人研をひっぱるようになったのか」と思ってくれるかなという勝手なものでした。

今、先生が生きた激動の時代を改めて振り返ると、戦中、戦後、高度成長時代、高齢化社会のその時々先生は力を求められると確かな足跡を残されてきたように思います。その時代を快活に生きて、若い研究者にエネルギーを与えていたのだと感じています。

この文章を書いていると先生がお好きだったモーツァルトのレクイエムの *Lacrimosa* が頭の中を巡ってきました。この楽章はモーツァルトの絶筆であり、先生の自伝にもこの部分の楽譜が載っていたかと思います。私たちは予期せず生を終えるかも知れないが、最後の時まで十分な能力を発揮しなさいと言われてるように感じています。



## 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、直接本会へご連絡ください。

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

## Notice about photocopying(In the USA)

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

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

## 基礎老化研究 第40号 第3号

平成28年(2016)9月23日

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

編集 編集委員会

印刷所 コロニー印刷



日本基礎老化学会

Japan Society for Biomedical Gerontology