

BIOMEDICAL GERONTOLOGY

基礎老化研究

特集企画 「発生工学の老化・疾患研究への応用」

シンポジウム

第39回日本基礎老化学会シンポジウム

テーマ「栄養・代謝シグナルと老化制御機構の接点」

名誉会員
寄稿文
特集企画

『知るは力なり』

丸山 直記

「発生工学の老化・疾患研究への応用」

総説

iPS細胞を用いた神経変性疾患研究の応用・展開

佐俣 文平、高橋 淳

総説

老年性筋疾患研究におけるiPS細胞の利用とその有用性

細山 徹

総説

マウス発生工学の技術革新

平手 良和

総説

遺伝子改変を可能とする発生工学技術の歴史と進展

徳永 暁憲

奨励賞
トピックス

キロショウジョウバエにおいて食餌制限は、dMycを介して腸管バリア機能維持と寿命延伸に寄与する

赤木 一考

奨励賞
トピックス

ミトコンドリア調節能からみたりんごプロシアニジンの生理作用

増田 功、小池 正人、中島 翔平、水谷 由布、小澤 裕介、渡辺 憲史、野尻 英俊、指原 浩一、横手 幸太郎、清水 孝彦

奨励賞
トピックス

カロリー制限による白色脂肪組織の代謝リモデリングとその制御因子

小林 正樹、樋上 賀一

大会報告

第41回日本基礎老化学会大会を振り返って

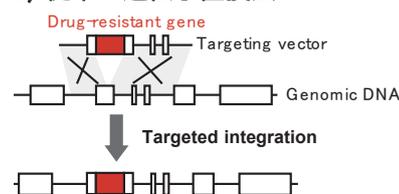
樋上 賀一

学会報告

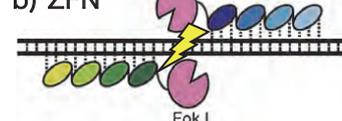
第41回 基礎老化学会大会に参加して

篠崎 昇平

a) 従来の遺伝子置換法



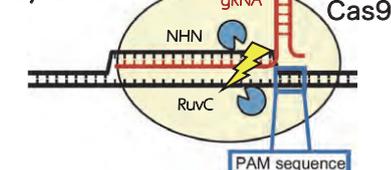
b) ZFN



c) TALEN



d) CRISPR



編集委員会委員長： 清水 孝彦 千葉大学大学院医学研究院 細胞治療内科学

〒260-8670 千葉市中央区亥鼻1-8-1

編集委員会委員： 赤木 一考 国立長寿医療研究センター 組織恒常性研究プロジェクトチーム

〒474-8511 愛知県大府市森岡町7-430

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

多田 敬典 国立長寿医療研究センター

統合加齢神経科学研究部 神経内分泌学研究室

〒474-8511 愛知県大府市森岡町7-430

福井 浩二 芝浦工業大学 システム理工学部 生命科学科

分子細胞生物学研究室

〒337-8570 さいたま市見沼区深作 307

渡辺 信博 東京都健康長寿医療センター研究所 老化脳神経科学研究チーム

〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2

BIOMEDICAL GERONTOLOGY

vol. 42 No.3 2018

Official Journal of The Japan Society for Biomedical Gerontology

Editor-in Chief: Takahiko Shimizu, Department of Clinical Cell Biology and Medicine,

Chiba University Graduate School of Medicine,

1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8670, JAPAN

Editors: Kazutaka Akagi, Aging Homeostasis Research Project Team,

National Center for Geriatrics and Gerontology,

7-430, Morioka, Obu, Aichi 474-8511, JAPAN

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

Hirobumi Tada, Section of Neuroendocrinology
Department of Integrative Aging Neuroscience,
National Center for Geriatrics and Gerontology,
7-430, Morioka, Obu, Aichi 474-8511, JAPAN

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

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

【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

ココロ力株式会社

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

小林製薬 中央研究所 研究部

(株) 明治 研究本部

Medical information network

医療法人 裕和会

(50 音順)

高電位の威力

電圧のみをかける「交流高圧電界」で、身体全体を包み込むようにして治療を。

1/fゆらぎの可能性

1/fゆらぎの原理を電位治療に応用(特許取得:特許番号4179625号)。

カラダだけでなく、ココロにもやすらぎと癒しを。

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



LEGACIS

LEGACIS 低周波・電位・温熱組合せ家庭用医療機器

ココロカ株式会社はアスリートの健康管理をサポートします。



COCOROCA

ココロカ株式会社 <http://www.cocoroca.co.jp/>

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

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

この雑誌について（投稿される方へ）

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

投 稿 規 定

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

執 筆 要 領

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

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

る位置に [] で括って表示する。

1. 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, 下村一泉山七生貴, 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

第 39 回日本基礎老化学会シンポジウム	1-9
名誉会員寄稿文	
『知るは力なり』	
丸山 直記	11-13
特集企画「発生工学の老化・疾患研究への応用」	15
総説	
iPS 細胞を用いた神経変性疾患研究の応用・展開	
佐俣 文平、高橋 淳	17-22
総説	
老年性筋疾患研究における iPS 細胞の利用とその有用性	
細山 徹	23-30
総説	
マウス発生工学の技術革新	
平手 良和	31-36
総説	
遺伝子改変を可能とする発生工学技術の歴史と進展	
徳永 暁憲	37-43
奨励賞トピックス	
キロショウジョウバエにおいて食餌制限は、dMyc を介して腸管バリア機能維持と 寿命延伸に寄与する	
赤木 一考	45-47
奨励賞トピックス	
ミトコンドリア調節能からみたりんごプロシアニジンの生理作用	
増田 功、小池 正人、中島 翔平、水谷 由布、小澤 裕介、渡辺 憲史、野尻 英俊、 指原 浩一、横手 幸太郎、清水 孝彦	49-52
奨励賞トピックス	
カロリー制限による白色脂肪組織の代謝リモデリングとその制御因子	
小林 正樹、樋上 賀一	53-56
大会報告	
第 41 回日本基礎老化学会大会を振り返って	
樋上 賀一	57-58
学会報告	
第 41 回 基礎老化学会大会に参加して	
篠崎 昇平	59

表紙図の説明：従来の遺伝子置換法および人工制限酵素 ZFN, TALEN, CRISPR の模式図

- 遺伝子置換法：両端に標的遺伝子座と相同な領域を持つターゲティングベクターを構築し、薬剤耐性遺伝子（赤色）の発現を指標に相同組換え ES 細胞株を同定する。
- ZFN：1 モジュール毎に 3 塩基を認識する。2 量体を形成し標的部位を切断する。
- TALEN：1 モジュール毎に 1 塩基を認識する。2 量体を形成し標的部位を切断する。
- CRISPR/Cas9 システム：gRNA により相補的な DNA 配列を認識し切断する。HNH ドメインが gRNA と相補的な DNA 鎖を切断するのに対し RuvC ドメインは非相補的 DNA 鎖を切断する。(37-43 ページの総説を参照)。

第 39 回日本基礎老化学会シンポジウム

テーマ「栄養・代謝シグナルと老化制御機構の接点」

場 所 千葉大学けやき会館 大ホール (千葉大学西千葉キャンパス構内)
日 時 2018 年 10 月 13 日 (土) (受付開始 13 時より)
参加費 無料

プログラム

13 時 30 分 開会の挨拶

千葉大学大学院医学研究院・細胞治療内科学 清水 孝彦

座長 国立長寿医療研究センター研究所 杉本 昌隆

東海大学・医学部 石井 恭正

13 時 35 分 「インスリンシグナルによる記憶システムの恒常性維持機構」

千葉大学大学院薬学研究院・生化学 殿城 亜矢子 先生

14 時 05 分 「食餌制限による腸管バリア機能の制御機構」

国立長寿医療研究センター研究所・組織恒常性研究 PT 赤木 一考 先生

14 時 35 分～ 14 時 45 分 (休憩 10 分)

座長 東京理科大学・薬学部 樋上 賀一

東京都健康長寿医療センター研究所 石神 昭人

14 時 45 分 「アミノ酸シグナルとインスリン様シグナルによる物質代謝の調節」

東京大学大学院農学生命科学研究科・動物細胞制御学 高橋 伸一郎 先生

15 時 15 分 「エネルギー代謝を制御する内分泌型 FGF ファミリーの解析」

東京大学大学院農学生命科学研究科・食品生化学 清水 誠 先生

15 時 45 分～ 15 時 55 分 (休憩 10 分)

座長 京都大学・医学部 近藤 洋司

国立長寿医療研究センター研究所 丸山 光生

15 時 55 分 「DNA 損傷によるエピゲノム自己同一性の破綻と個体老化の分子機構」

慶応義塾大学医学部・眼科学 早野 元嗣 先生

16 時 25 分 「ヒトの老化促進病態としての早老症ウエルナー症候群：研究と診療の進歩」

千葉大学大学院医学研究院・細胞治療内科学 横手 幸太郎 先生

17 時 05 分 閉会の挨拶

長崎大学・副学長 下川 功 理事長

懇親会

17時30分 千葉大学生協フードコート1（参加費約3,000円、学生割引予定）

懇親会参加の事前登録のお願い：懇親会参加人数把握のため、事前登録をお願い致します。9月30日までに、シンポジウム事務局（shimizut@chiba-u.jp）にメール連絡下さい。氏名・所属機関・メール・役職（あるいは学生）・会員非会員等、ご教示ください。

事務局：〒260-8670 千葉市中央区亥鼻1-8-1

千葉大学大学院医学研究院・細胞治療内科学 清水 孝彦

TEL: 043-222-7171（内線71232）

e-mail：shimizut@chiba-u.jp

会場アクセス

最寄駅：JR西千葉駅（北口）南門を經由し徒歩7分

京成電鉄みどり台駅正門を經由し徒歩7分

詳しくはHPへ http://www.chiba-u.ac.jp/campus_map/nishichiba/index.html



けやき会館

栄養・代謝シグナルと 老化制御機構の接点

千葉大学けやき会館 大ホール (千葉大学西千葉キャンパス構内)

2018年 10月13日(土) (受付開始13時より)

参加費
無料

プログラム

- 13時30分 **開会の挨拶** 千葉大学大学院医学研究院・細胞治療内科学 清水 孝彦
- 13時35分 **「インスリンシグナルによる記憶システムの恒常性維持機構」**
千葉大学大学院薬学研究院・生化学 殿城 亜矢子 先生
- 14時05分 **「食餌制限による腸管バリア機能の制御機構」**
国立長寿医療センター研究所・組織恒常性研究PT 赤木 一考 先生
- 14時35分～14時45分(休憩10分)
- 14時45分 **「アミノ酸シグナルとインスリン様シグナルによる物質代謝の調節」**
東京大学大学院農学生命科学研究科・動物細胞制御学 高橋 伸一郎 先生
- 15時15分 **「エネルギー代謝を制御する内分泌型FGFファミリーの解析」**
東京大学大学院農学生命科学研究科・食品生化学 清水 誠 先生
- 15時45分～15時55分(休憩10分)
- 15時55分 **「DNA損傷によるエピゲノム自己同一性の破綻と個体老化の分子機構」**
慶応義塾大学医学部・眼科学 早野 元嗣 先生
- 16時25分 **「ヒトの老化促進病態としての早老症ウエルナー症候群:研究と診療の進歩」**
千葉大学大学院医学研究院・細胞治療内科学 横手 幸太郎 先生
- 17時05分 **閉会の挨拶** 長崎大学・副学長 下川 功 理事長

懇親会

17時30分～ 千葉大学生協フードコート1 (参加費約3,000円、学生割引予定)

懇親会参加の
事前登録のお願い

懇親会参加人数把握のため、事前登録をお願い致します。
9月30日までに、シンポジウム事務局 (shimizu_takahiko@yahoo.co.jp) にメール連絡下さい。
氏名・所属機関・メール・役職(あるいは学生)・会員非会員等、ご教示ください。

事務局

〒260-8670 千葉市中央区玄鼻1-8-1
千葉大学大学院医学研究院・細胞治療内科学 清水 孝彦
TEL: 043-222-7171 (内線71232)
e-mail: shimizu_takahiko@yahoo.co.jp

会場アクセス

最寄駅: JR西千葉駅(北口) 南門を經由し徒歩7分
京成電鉄みどり台駅 正門を經由し徒歩7分

詳しくはHPへ

http://www.chiba-u.ac.jp/campus_map/nishichiba/index.html



インスリンシグナルによる記憶システムの恒常性維持機構



殿城 亜矢子

千葉大学大学院薬学研究院
生化学研究室

加齢と共に学習や記憶機能が低下する加齢性記憶障害は、高齢者における生活の質向上のために克服すべき課題のひとつである。近年、学習や記憶低下の原因の一つとして、糖尿病など生体内の代謝変化による脳機能への影響が示唆されている。血糖調節ホルモンであるインスリンは、摂食・代謝調節をはじめとして、発生、成長、老化、さらには学習・記憶機能など様々な局面で重要な役割を果たしている。しかし、インスリンシグナル経路が学習や記憶の形成にどのように関わっているのか、さらに加齢性記憶障害との関与については不明な点が多い。我々はインスリンシグナル経路が進化的に高く保存されていることに着目し、ショウジョウバエの嗅覚記憶をモデル系として用いて、加齢に伴い記憶が低下するメカニズムを解明することを目指している。

まず、遺伝学的にインスリン産生を一過的に抑制した個体を作成して嗅覚記憶を測定したところ、学習機能は正常だが記憶の維持が低下した。また、記憶の維持にはインスリンペプチドの一つである *dilp3* のインスリン産生細胞における発現や、哺乳類の脂肪組織に相同するハエ脂肪体におけるインスリン受容体の発現が必要であることが明らかとなった。一方で、老齢個体においてインスリン産生を一過的に抑制させても記憶低下は亢進しなかったことから、加齢によるインスリンシグナル経路の変化が加齢に伴う記憶低下の原因の一つであることが示唆された。そこでインスリンペプチドの加齢による発現変化を解析したところ、*dilp3* の発現が特異的に低下していることが明らかとなった。また、インスリン産生細胞における一過的な *dilp3* の過剰発現は、老齢個体における記憶維持の低下を抑制することを見出した。これらのことより、記憶の維持はインスリン産生細胞と脂肪細胞を介して全身性に制御されている可能性が示唆された。また、加齢による生体内の代謝機能の変化が加齢性記憶障害の一因となる可能性について議論したい。

[参考論文]

1. Tanabe, K., Itoh, M., Tonoki, A. Age-Related Changes in Insulin-like Signaling Lead to Intermediate-Term Memory Impairment in *Drosophila*. *Cell Reports* 18, 1598-1605 (2017).
2. Tonoki, A. and Davis, R. L. Aging impairs protein synthesis-dependent long-term memory in *Drosophila*. *J. Neurosci.* 35, 1173-1180 (2015).
3. Tonoki A., and Davis, R. L. Aging impairs intermediate-term behavior memory by disrupting the dorsal paired medial neuron memory trace. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109, 6319-6324 (2012).

食餌制限による腸管バリア機能の制御機構

赤木 一考

国立長寿医療研究センター 研究所
組織恒常性研究 PT



食餌制限 (Dietary restriction: DR) は、酵母から霊長類に至る様々な動物で寿命を延伸させるだけでなく、様々な加齢性疾患の予防に効果があることが知られている。しかし、寿命延伸や組織恒常性維持に関わる DR の分子機構については未だに解明されていない。老化研究の分野では、飼育コストの安さ、寿命の短さ、遺伝学的ツールの豊富さなどの理由から、無脊椎動物モデルが研究に用いられてきた。特に、キイロショウジョウバエは、進化的に保存されたシグナリングパスウェイが多く、哺乳類と機能的に相同な器官を多く保有していることから、DR の作用機構を組織レベルで理解するためには非常に優れたモデル動物であり、得られた知見は将来的な介入のために役立つことが期待できる。

ショウジョウバエの腸管では、哺乳類での知見と同様に、加齢に伴う腸管バリア機能の破綻が観察される。そのメカニズムとしては、腸内細菌叢の異常 (dysbiosis) や、タイトジャンクションの異常が考えられている。興味深いことに、DR によって加齢に伴う腸管バリア機能の破綻を抑制できることが明らかにされている。我々は、腸管において転写因子 *dMyc* の発現が加齢依存的に低下することを見出し、その低下が DR によって抑制されることを明らかにした。そして、腸管特異的に *dMyc* の発現をノックダウンすることで、細胞死が誘導され腸管の透過性が上昇することを明らかにした。さらに、これらの表現型は腸内細菌の有無にかかわらず観察されることから、*dMyc* による内在的な制御が腸管バリア機能に重要な役割を持つことが考えられた。本シンポジウムでは、DR による寿命延伸効果と腸管恒常性維持機構について議論したい。

[参考文献]

1. Katewa, S. D., Akagi, K., Bose, N. *et al.* Peripheral circadian clocks modulate nutrient dependent changes in lifespan and fat metabolism. *Cell Metabolism* 23, 143-154 (2016).
2. Clark, R. I., Salazar, A., Yamada, R. *et al.* Distinct shifts in microbiota composition during *Drosophila* aging impair intestinal function and drive mortality. *Cell Reports* 12, 1656-1667 (2015).
3. Rera, M., Clark, R. I., Walker, D. W. Intestinal barrier dysfunction links metabolic and inflammatory markers of aging to death in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 21528-21533 (2012).

アミノ酸シグナルとインスリン様シグナルによる物質代謝の調節

高橋 伸一郎

東京大学
大学院農学生命科学研究科
応用動物科学専攻
動物細胞制御学研究室



摂取する食事タンパク質に応答して体タンパク質代謝が調節されていることは、古くから知られている。我々は、この代謝調節を引き起こす仕組みの解明を進めてきた。その結果、成長期のラットが、全アミノ酸量が不足している食餌（窒素量が要求量に達していない食餌）や特定のアミノ酸が要求量に達していない食餌（栄養価の低い食餌）を摂取していると、プロインスリンと相同性が高いペプチドホルモンであるインスリン様成長因子（IGF）-Iの産生が低下すると同時に、IGFの血中寿命を延長するIGFBP-3が減少、IGFをクリアランスするIGFBP-1産生が増加する。更に、筋肉などでのIGFシグナルが抑制される結果、成長遅滞が起こることが明らかとなった。これは、栄養失調の一つ「クワシオルコル」の成長遅滞の発生機序の一部と考えられる。

最近になり、我々は、全アミノ酸が不足している食餌を摂取しているラットで肝臓に脂肪が蓄積することを見出した。脂肪肝も「クワシオルコル」の表現型の一つであるが、この発生機構を解析する過程で、アミノ酸欠乏のシグナルは、インスリンシグナルを増強させると同時に、直接肝臓の脂肪蓄積を引き起こすことが明らかとなった。更に、全アミノ酸が不足あるいはアルギニンが不足している食餌を摂取しているラットでは肝臓に脂肪が蓄積するのに対して、全アミノ酸が不足あるいはリジンが不足している食餌を摂取していると脂肪組織や筋肉でも脂肪が蓄積することを見出した。また、機械学習により、血中のアミノ酸濃度のプロファイルから肝臓中の脂肪蓄積量が推定できることも明らかとなり、この結果は、血液中のアミノ酸濃度が肝脂肪量を決定していることを示唆している。

一連の結果は、「全アミノ酸や特定のアミノ酸が要求量に達していないことが生体でアミノ酸シグナルの変動となって、IGFシグナルが低下し成長遅滞が起こる。この際、十分にエネルギーを摂取していると、それぞれの臓器がアミノ酸シグナルの低下やインスリンシグナルの増強などを介して、過剰となったエネルギーを取り込み、脂肪として蓄積する」という仕組みの存在を示している。このようなアミノ酸シグナルとインスリン様シグナルによる物質代謝の調節は、成長期のみならず成長後にも観察され、その後の動物の健康や寿命にも大きな影響を及ぼすものと考えられる。

[参考文献]

1. Nishi, H., Yamanaka, D., Kamei, H. *et al.* Importance of serum amino acid profile for induction of hepatic steatosis under protein malnutrition. *Sci. Rep.* 8, 5461 (2018).
2. Toyoshima, Y., Tokita, R., Taguchi, Y. *et al.* Tissue-specific of protein malnutrition on insulin signaling pathway and lipid accumulation in growing rats. *Endocr. J.* 61, 499-512 (2014).
3. Takenaka, A., Oki, N., Takahashi, S-I., *et al.* Dietary restriction of single essential amino acids reduces plasma insulin-like growth factor-I (IGF-I) but does not affect plasma IGF-binding protein-1 in rats. *J. Nutr.* 130, 2910-2914 (2000).
4. Takenaka, A., Komori, K., Morishita, T. *et al.* Amino acid regulation of gene transcription of rat insulin-like growth factor-binding protein-1. *J Endocrinol.* 164, R11-R16 (2000).
5. Miura, Y., Kato, H., Noguchi, T. Effect of dietary proteins on insulin-like growth factor-1 (IGF-1) messenger ribonucleic acid content in rat liver. *Br. J. Nutr.* 67, 257-265 (1992).
6. Takahashi, S., Kajikawa, M., Umezawa, T. *et al.* Effect of dietary proteins on the plasma immunoreactive insulin-like growth factor-1/somatomedin C concentration in the rat. *Br. J. Nutr.* 63, 521-534 (1990).

エネルギー代謝を制御する内分泌型 FGF ファミリーの解析

清水 誠

東京大学大学院農学生命科学研究科
応用生命化学専攻
食品生化学研究室



生活習慣病の患者数は依然として増加し続けている。また我が国は超高齢社会であり、高齢者を対象とした生活習慣病の予防・軽減やその発症メカニズムの研究の重要性が高まっていると考えられる。

繊維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor) は哺乳類で 22 種類存在する分泌タンパク質で、その多くはオートクリン・パラクリン様に作用し、細胞膜上に存在する FGF 受容体を介して細胞内にシグナルを伝達する。一方、FGF19 ファミリー (FGF19、FGF21、FGF23) は内分泌型 FGF とも称され、ホルモン様に作用する。FGF19 と FGF21 はエネルギー代謝に関与する内分泌型 FGF であり、それぞれ小腸、肝臓で合成・分泌される。FGF19 は肝臓に作用し胆汁酸代謝を負に制御する。FGF21 は主に白色脂肪組織に作用し、糖代謝や脂肪酸分解を活性化する。一方で、FGF19 と FGF21 は共に抗肥満効果を有することが知られている。特に FGF21 は創薬の標的として注目されており、アナログなどの開発が盛んである。さらに FGF21 の過剰発現マウスの寿命延伸効果も報告されている。

これまで、FGF19 と FGF21 の遺伝子発現は栄養シグナル (胆汁酸や脂肪酸など) による制御が知られていた。我々は、FGF19・FGF21 の発現がストレスシグナルによっても制御されることを見出した。このストレスシグナルは転写因子 ATF4 を介して遺伝子発現を活性化する。また、ATF4 を標的とした抗肥満性食品成分の研究も展開してきた。本シンポジウムでは、特にエネルギー代謝と寿命の両者に関与する FGF21 を中心に、我々の研究成果を含め最新の知見について紹介したい。

[参考文献]

1. Maruyama, R., Shimizu, M., Hashidume, T., *et al.* FGF21 Alleviates Hepatic Endoplasmic Reticulum Stress under Physiological Conditions. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. 64, 200-208 (2018).
2. Hashidume, T., Kato, A., Tanaka, T., *et al.* Single ingestion of soy β -conglycinin induces increased postprandial circulating FGF21 levels exerting beneficial health effects. *Sci. Rep.* 6, 28183 (2016).
3. Patel, R., Bookout, A. L., Magomedova, L., *et al.* Glucocorticoids regulate the metabolic hormone FGF21 in a feed-forward loop. *Mol. Endocrinol.* 29, 213-223 (2015).
4. Shimizu, M., Morimoto, H., Maruyama, R., *et al.* Selective Regulation of FGF19 and FGF21 Expression by Cellular and Nutritional Stress. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. 61, 154-160 (2015).
5. Shimizu, M., Li, J., Maruyama, R., *et al.* FGF19 (fibroblast growth factor 19) as a novel target gene for activating transcription factor 4 in response to endoplasmic reticulum stress. *Biochem. J.* 450, 221-229, (2013).

DNA 損傷によるエピゲノム自己同一性の破綻と個体老化の分子機構

早野 元詞^{1,2}

¹慶應義塾大学医学部、眼科学教室

²Glenn Labs for the Biological Mechanisms of Aging, Department of Genetics,
Harvard Medical School, Boston



DNA の共通一次配列から異なる遺伝子発現パターンによって臓器特異的な機能が形成される。このアイデンティティ（自己同一性）はヒストンや DNA の修飾といったエピゲノムによって構築されているが、老化によって変化する。先進国において人口の老齢化が急速に進行しており、神経変性疾患、癌、心臓疾患、糖尿病、サルコペニアなど加齢に伴う老化関連疾患が社会的な問題となっている。これらの疾患と歩行や認知能力を含めたフレイルの理解と治療薬が求められるが、老化に伴い臓器の機能が失われていく共通の分子機構としてエピゲノム変化が存在する。Harvard Medical School, David A. Sinclair 研究室において DNA 損傷依存型エピゲノム変化による老化モデル、ICE (Inducible Changes in Epigenome) が構築されている。ICE マウスでは I-PpoI と呼ばれるエンドヌクレースがマウスの若い時期に 3 週間だけ誘導される。その結果、DNA 変異非依存的に記憶、筋肉、視力、骨密度の低下、白髪など老化関連する組織の機能低下が引き起こされ、老化の表現系が促進される。さらに筋肉や脳において代謝や炎症に関する遺伝子変化が観察され、H3K27ac や H3K56ac などのヒストン修飾や DNA メチル化において炎症細胞様エピゲノムとなる。エピゲノム自己同一性喪失が老化や疾患をどのように誘導するのか、またその可逆性について議論したい。

[参考文献]

1. Hayano, M., Salfati, E. L. S., Apostolides, J., *et al.* Evidence for epigenetic cause of aging in mice. *submitted*.
2. Oberdoerffer, P., Michan, S., McVay, M., *et al.* SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging. *Cell* 135, 907-918 (2008).
3. Mills, K. D., Sinclair, D. A., Guarente, L. MEC1-dependent redistribution of the Sir3 silencing protein from telomeres to DNA double-strand breaks. *Cell* 97, 609-620 (1999).

ヒトの老化促進病態としての早老症ウエルナー症候群：研究と診療の進歩

横手幸太郎

千葉大学大学院医学研究院
細胞治療内科学



ウエルナー症候群（以下、WS）は、RecQ型DNAヘリケースWRNの変異によって生じる常染色体劣性の遺伝性疾患である。思春期以降に、白髪や脱毛、両側性白内障、皮膚の萎縮や硬化、糖尿病、動脈硬化、悪性腫瘍など、老化が促進されたように見える症候や加齢に付随する疾患を好発することが知られている。世界中の症例の6割以上を日本人が占めるという特徴がある。

内臓脂肪の過剰蓄積とインスリン抵抗性を伴うことが多く、早発性動脈硬化への関与が想定される。事実、インスリン抵抗性改善薬や脂質異常症治療薬の進歩により、動脈硬化性疾患の減少や患者の寿命延長が示唆されている。1990年代に原因遺伝子が特定されたものの、ノックアウトマウスが早老症候を示さないなど、個体レベルでの解析に障壁があることから、老化機序は未解明であり、患者は今も様々な合併症に苦しむ。

2009年に厚生労働科学研究によりWSの全国調査が実施され、その結果に基づき四半世紀ぶりの診断基準改訂や世界初の診療ガイドライン策定が行われた。2010年には、患者家族の会が設立され、患者間および患者と研究者の交流が活発化、2015年にコケイン症候群やロスモンドトムソン症候群など他の早老症とともに難病指定を受けることができた。現在は、日本医療研究開発機構AMEDのプロジェクトとして、WSの疾患レジストリーが構築され、我が国における実態や長期的な予後調査がスタートしている。

近年の多方面にわたる科学技術の進歩は、WSの病態解明にも手がかりを与えることが期待される。次世代シーケンサーを用いたゲノム解析に基づくWS合併骨髄異形成症候群へのアプローチ、末梢血および線維芽細胞からセンダイウイルスベクターを用いて作出されるWS由来疾患iPS細胞と遺伝子修復技術の応用など、ヒト患者に立脚した研究手法通じて早老症と老化関連疾患に挑む取り組みをご紹介したい。

シンポジウム協賛企業（50音順）

アサヒカルピスウェルネス株式会社

株式会社池田理化

岩井化学薬品株式会社

株式会社ジェー・エー・シー

全薬工業株式会社

株式会社ナガセビューティケア

ナカライテスク株式会社

ムサシノ製薬株式会社

株式会社薬研社

【名誉会員寄稿文】

『知るは力なり』

丸山 直記

埼玉セントラル病院

《Scientia est Potentia》

2003年にケンブリッジ大学のクイーンズカレッジを会場として Aubry de Grey が主催した第10回国際基礎老化学会に参加した。ケンブリッジに縁のある科学者、ニュートン、ダーウィン、ホーキンス、ラザフォード、ワトソン、サンガーなど名前を上げるだけでもめまいがしそうであった。ややスノビッシュなこの小タイトルはトリニティカレッジの学生であったフランシス・ベーコン(1561-1626)の著作に由来する。彼の大理石像でありながらも畏敬の念を持って眺めたことを覚えている。(図1)



図1 Francis Bacon, Baron Verulam and Viscount St. Albans (1561-1626)

この言葉に強く惹かれる所以は東京都健康長寿医療センター研究所で耳にしたエピソードがあるためである。東京都の様々な施設による老年学会の発表の際であったと記憶している。研究所の自律神経機能研究の堀田晴美部長らがポスター発表していたのは歩行の認知機能に対する効果であった。歩行が良い効果を与えることを動物実験で証明したものである。従来、高齢者が歩行時間を充分とると認知機能に良い効果を与えることは知られていたのである。そこに研究者ではないと思われる方が

やってきて「ありがとうございます。お年寄りに充分歩いてもらうことは良いとはわかっていました。この研究成果のおかげで私達が行っていることに確信が持てるのです。」と語ったそうだ。おそらく介護関連の方と思われる。このエピソードは研究所の責任者として外部組織との対応に腐心している私を元気づけたのである。基礎科学が社会的な活動に直接貢献するという好事例なのである。現在、臨床の現場にいる私にとっては、深い基礎的な事象を知らなくても診療はできるのではあるが、基礎科学的により深化された機序の理解は強い自信となっている。そう、「知るは力なり」を実感できるのである。

《Time Lag》

研究所に在籍している時には折に触れて研究成果の還元に関するコメントが求められた。拙文を読む方達も現在あるいは将来悩まされていることであろう。質問される多くの方は研究者に期待を込めているのであろう。応対する我々の気分はやや不快であった。ある分子を発見したという説明に議員さんが「それで薬ができるのですか?」との質問があった。同席していた井藤英喜先生(現理事長)が「これが薬になるには三千億円かかっても不思議ではないのですね。それに今、新薬として世に出ている薬剤は20年以上かかっているんですよ。製薬会社の合併は、開発費が膨大になるからです。」議員さんは無言であった。発見と応用のタイムラグについての無知である。ある時は東京都の担当部局の課長さんが「先生達、特許をどんどん取得してください!」と言ってくれた。「ありがとうございます。国際特許などは数千万円かかるんですからね」と私が言うと、その後は無言であった。我々はこのような方達に基礎研究の意義を理解してもらわなければならない。最近のノーベル賞受賞者が語る日本の科学研究の危機はこんなところにあるのだろう。いつも著者が用いるレトリックはアインシュタインに依存している。彼が1905年に発表した特殊相対性理論の応用である。今なら理系の読者はすぐに理解できるのであろう。物体の速度が増すと時間の進み方が遅くなるというやつである。著者はこの程度の理解ではあるが、そんなバカなことがあるはずはないと思うことも無く素直に受け止めるのである。大陸間ミサイルが世界に緊張をもたらした頃、その命中精度は20~30キロずれていたそうだ。東京駅を狙って埼玉県のどこかに着弾するようなものである。それでもミサイルがもたらす威嚇効果に大差は無かったのである。そんな時代にPh.D.を

連絡先: 丸山直記 〒345-0045
埼玉県入間郡三芳町上富 2177
TEL: 049-259-0161
FAX: 049-2591229
E-mail: mars610jp@aol.com

とったばかりの若い物理学者が、その差は特殊相対性理論で補正できるのではと提案したそうだ。その結果、GPSは私たちのものになったのである。研究者では無い方達への講演会で、カーナビや携帯が使えるのはアインシュタイン先生のおかげですと私は言っている。(図2)

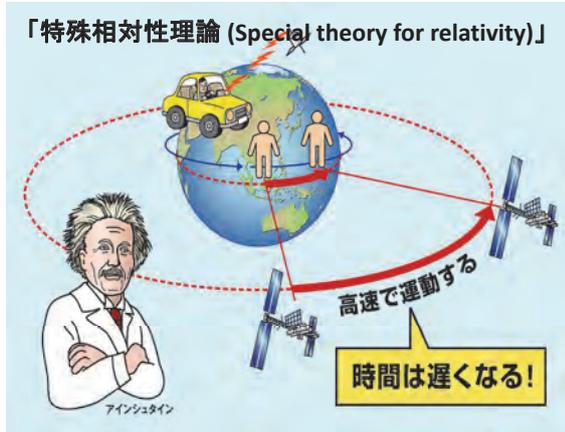


図2

発見と応用のタイムラグについては「産業科学技術の哲学」(吉川弘之・内藤 耕著:東京大学出版会)に液晶科学への人々の関心の変遷が記述されており深く共感した。液晶の原理が発表されると人々は未来の壁掛けテレビや持ち運びができるディスプレイなどを夢見たのである。夢は費用もかからず、寝転んでいても見ることは可能である。開発者はその後、悪夢の時代を過ごさなければならなかった。世の人々は失望したのであろう。企業内では開発担当者に相当のプレッシャーがかかったであろうことに同情する。そして今、私たちは当たり前のように便利さを享受している。開発者の苦しみなど考慮はされないのである。私たち研究者はこの nightmare を耐えなければならぬのだ。(図3)



「産業科学技術」の哲学 吉川弘之・内藤 耕著(東京大学出版会)

図3

《Science & Technology》

いつぞや科学と技術の間に「・」を加えるべきか、あ

るいは必要が無いという論争があった。私は入れるべき派であった。一時期、ポチが入ったと思ったのであるが、どうも最近が入っていないようである。科学はわからないことをわかる様にし、技術はできないことをできる様にするという事に尽きる。極めて単純なのである。この2つの言葉の混同では思い出がある。当時の石原都知事が首都大学を視察した時だと思うが、芝の研究をしていることへのコメントで、そんなことよりゴルフ場の芝の研究をと言ったとか。基礎的研究が有する広い diversity を理解していない典型例だと感じたのである。最近の例で言えば山中さんのノーベル賞受賞理由はiPS細胞を「作った」ことに授与されたと報道されるようなものである。多くの人々は科学的アチーブメントを賞賛はするが、応用がすぐに見通せなかったり、技術的に極めて困難であるのがっかりするのである。筆者もささやかな経験をしている。我々は加齢に伴い減少する分子SMP30を発見した。SMP30は後に gluconolactonase であることが解明されビタミンC合成酵素の一つであったのだ。発見直後の機能がわからない頃は「何それ?」という反応であった。しばらくして蛍が永く光る際に必要な酵素であることが製薬会社の研究で明らかになった。あの蛍の光に我々の発見がからんでいるとは、感慨深いことであった、この時は企業が明確な応用を目指した研究であった。さらに驚いたことに米国化学防御研究所はSMP30はサリンを分解する酵素であることを報告したのである。さっそく防衛庁に貢献すべくアプローチしたのであったが、全く反応が無かった。同じ頃、米国ではSMP30の高次構造解明の研究でDelaware大学の生化学研究室に米軍の研究資金が投入されていたのを知りがっかりした。我が国では「役に立つ研究を」とよく言っている人たちは口だけである。そんなことにめげないことが研究を続けるためには肝要であろう。そんなこともあったが最近、防衛医大出身のある某市の保健所長と面会した際に、その話題をしたところ、彼は防衛庁の研究所に在籍していた時、米国の米国化学防御研究所に出張に行ったとか。「先生、アプローチする筋が悪かったんですね」と言われた。「実際に研究活動している我々に伝われば違ったと思いますよ。」とのこと。相談する相手が研究をしていなくて reality が無いのが悪かったのである。(図4)



図4

《Serendipity》

Serendipity、これはなんと魅惑的な言葉だろう。年齢を重ねた最近はほとんどの研究者にこの恩寵がもたらされるのだという気持ちになっている。それを serendipity と感ずるかどうかが分かれ道である。当然ことながらそのインパクトに差はあるだろうが。私の恩師である白井俊一先生は、若かりし時、免疫グロブリンに対する抗体で脾臓組織を免疫染色したところ、多くの細胞が陽性であったことに気がついた。そのことを先輩に相談したところ、「それは形質細胞（免疫グロブリン産生細胞）だろう！」と一蹴された。ほどなくしてリンパ球には細胞表面に免疫グロブリンが陽性である亜集団があることが報告された。免疫細胞の受容体としての免疫グロブリン陽性細胞である。白井俊一先生は「よくよく考えてみれば脾臓にはあれほど多くの形質細胞は無いのだから。引っ込めた俺が悪いんだ。」と酒を飲みながらぼやいた。それ以来、本居宣長の言葉、「必ずや師の説にな、なずみそ」が私のモットーの一つとなった。我が師はくやしがつた。目の前を大発見が通り過ぎたのである。B細胞のマーカの発見である。我が師は想像もつかないほど粘り強い性格であった。我々は師の性格は「竹を割ったような性格」とは真逆の「竹を折ったような性格」とであると表現していた。その後、その性格が発揮され我が師は自己免疫病に出現する Natural Thymocytotoxic Autoantibody (NTA) を発見した。その論文は自己免疫病領域の日本人では最も高い citation index を示したのである。

科学史の偉人たちだけが Serendipity に恵まれていたと思いがちである。でも捕まえることができずに無名であった優秀な科学者が数えきれずいただろう。言い換えれば Serendipity を確実に自分のものにした者が科学史に名を残したのではないか？そして Serendipity はほぼ同時に見つかるのではないだろうかと思うのである。私がいつも感動する科学史上の事件がある。それは

微積分学の確立が別々の国に住む3人によりほぼ同時になされたことである。イギリスのニュートン（1642-1727）、ドイツのライプニッツ（1646-1716）に加えて我が国の関 孝和（1642-1708）の名が挙げられるのだ。Serendipity は結構そこらにあるのかも知れない。

最後に大野 乾博士（1928-2000）のことに触れたい。私は生前、2度、彼の講演を聴いたことがあるが、その2度とも心が揺さぶれるような感動があった。米国での同僚は Dr. Ohno はストローから宇宙を見ることができる人だと言っていた。彼の著作の「遺伝子重複による進化（岩波書店）」の序文も私にとっては衝撃的であった。《基礎科学に携わる研究者で自尊心のある人ならば誰でも望むように、次世代の生物学者の考え方に影響を与えたいと思うならば、実験データの単なる生産者であるという水準から抜きん出て、新しい概念を明確に提示する者とならねばならない。》とのことであった。これを読んで消え入りたくなった。いや私はもう消え入っているのである。若い世代の活躍を祈念し、この拙文を終える。（図5）



図5 大野 乾（1928-2000）

【特集企画】

「発生工学の老化・疾患研究への応用」

細胞・個体レベルに関わらず、時間の経過に伴う生体恒常性の破綻により死へと向かう過程を解明するのが基礎老化研究の命題とするならば、生物の発生過程に焦点を置き、その仕組みを応用して新しい細胞・個体を生み出す発生工学は、真逆の存在のように思えるかもしれない。しかしながら、生体恒常性が破綻するメカニズムを理解するためには、それがどのように維持されているのかはもちろん、そもそもどのように生み出されたのかを知ることは非常に重要であり、両者は表裏一体の存在なのかもしれない。そして何よりも、近年の発生工学領域における様々な技術革新は、基礎老化研究者にとっても必要不可欠な研究ツールを生み出していることは疑いようもない事実である。

そこで本特集号では、老化・疾患研究分野においてもその重要性を増している発生工学に注目し、実際に最先端の発生工学技術を用いて精力的に研究活動を展開されている4人の先生方に執筆をお願いした。高橋淳先生には既に世界的標準となったiPS細胞を用いた神経変性疾患研究の応用・展開について、細山徹先生には同じくiPS細胞を用いた老年性筋疾患の研究について、平手良和先生には発生工学に重要な胚操作の最新技術について、そして徳永暁憲先生には発生工学技術がどのように進展してきたのかについて執筆を頂戴する予定である。

基礎老化研究誌 編集委員

木村 展之

下田 修義

【総説】

iPS 細胞を用いた神経変性疾患研究の応用・展開

佐俣 文平、高橋 淳

京都大学 iPS 細胞研究所 臨床応用研究部門

要約

中枢神経の障害をきたす神経難病は治療困難な症例が多く症状緩和が主体となっている。これらの疾患は加齢とともに発症頻度が増すことから、超高齢化社会を迎える現在その治療法の開発が急務となっている。神経変性疾患のなかでもパーキンソン病は細胞移植の歴史が最も長く、胎児組織の移植によって長期にわたる運動機能の回復が期待できる。iPS 細胞の誕生によって移植細胞の制約が無くなり、理論的には目的の細胞を十分量得られるようになった。さらに疾患特異的 iPS 細胞を利用することで病態メカニズムの解明や創薬開発等の新しい研究アプローチも発達してきた。このように iPS 細胞がもたらす恩恵は極めて大きく、再生医療は大きなブレイクスルーを迎えている。そこで本項では、iPS 細胞を用いたパーキンソン病治療に焦点を当てて神経変性疾患における応用とその展開について概説する。

キーワード：神経変性疾患、iPS 細胞、細胞治療

1. はじめに

神経変性疾患に対する細胞治療の歴史は古く、パーキンソン病を例に挙げると、1980 年代より欧米を中心として胎児組織を用いる移植治療が行われてきた。これまでに 400 例以上の移植治療が実施されており、そのなかには治療効果が約 20 年間持続したというケースもある。しかし、十分な治療効果を得るためには一度に複数個体の胎児が必要であることが分かってきた。また目的以外の細胞が脳内に生着することにより不随意運動等の副作用が生じることも分かっている。このように従来の胎児組織を用いる移植治療では細胞の量と質をコントロールすることが困難であった。iPS 細胞の誕生により分化誘導法を工夫することで一度に多量の細胞が得られるようになった。さらに細胞選別技術を開発することによって目的細胞を純化する手法も整ってきた。現在は臨床用ヒト iPS 細胞株も作製されており、再生医療実現の環境は

整いつつある。そこで本項では、再生医療のブレイクスルーの中心にある iPS 細胞に焦点を当て、神経変性疾患研究への応用と展開について概説する。

2. 疾患特異的 iPS 細胞を用いた移植治療と疾患モデリング

病因の発生や病態の進行過程が十分に明らかにされていない難治性疾患は数多くあるが、このような疾患に対しては生体からの組織採取や疾患モデル動物等を用いた研究が発症機序の解明に重要である。しかし神経や心筋などの組織採取が一般的に不可能である部分についてはこれらの解析が困難であった。このような問題に対して、患者由来の疾患特異的 iPS 細胞は新しい疾患モデルとして細胞治療や病態メカニズムの解明、創薬開発等においてその有用性が期待されている。

これまでに実施されてきた細胞治療の多くは他家移植であったが、iPS 細胞の登場によって患者自身の細胞からも目的の細胞が得られるようになった。自己の細胞を移植する自家移植は移植免疫の観点で有益であるが、患者由来の iPS 細胞が移植後に生着して正しく機能するかどうかについては不透明な部分が多かった。6-ヒドロキシドパミンの片側投与によって作製されたパーキンソン病ラットモデルを用いた解析からは、疾患特異的 iPS 細胞由来のドパミン神経細胞が脳内に生着し、運動機能症

連絡先：佐俣文平 〒 606-8507

京都府京都市左京区聖護院川原町 53

TEL : 075-366-7066

FAX : 075-366-7071

E-mail : samata.bumpei@cira.kyoto-u.ac.jp

状の改善に寄与することが報告されている[1]。またパーキンソン病患者の脳内では α シヌクレインの異常集積がしばしば認められ、このような異常タンパク質がドパミン神経細胞の脱落につながる事が分かっている。そこで α シヌクレインに対する移植細胞の感受性の違いを検討した研究もあるが、健常者由来 iPS 細胞と疾患特異的 iPS 細胞の間に有意な差は認められなかった [2]。近年ではパーキンソン病カニクイザルモデルを用いた移植実験においても特発性パーキンソン病患者由来 iPS 細胞は健常者由来 iPS 細胞と同等の機能を有することが明らかにされている [3]。このような研究成果は患者由来 iPS 細胞の存在無くして成し遂げることはできなかったであろう。

また疾患特異的 iPS 細胞は分化誘導によって病態を再現できるという特徴から、薬剤スクリーニングによる新しい治療薬の探索を可能にした。進行性骨化性線維異形成症 (FOP) はアクチビン A の刺激に応答して異所性骨化を生じることが分かっているが、これまでに有効な治療法は確立されていなかった。そこで FOP 患者由来の iPS 細胞を間葉系間質細胞へ分化する過程でアクチビン A と複数の化合物を同時に加えたところ、軟骨分化を抑制することができる化合物 (ラパマイシン) を同定することができた [4]。また軟骨無形成症およびタナトフォリック骨異形成症患者由来の iPS 細胞を用いた薬剤スクリーニングからはスタチンを投与することによって軟骨細胞の増殖能と軟骨形成能が回復することが明らかにされている [5]。神経変性疾患では、パーキンソン病や筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、デュシェンヌ、ベッカー型筋ジストロフィー、ハンチントン病等の患者由来 iPS 細胞が樹立されている [6,7]。今後は、これらの細胞株を用いて薬剤スクリーニングを含めた様々な治療アプローチが検討されていくだろう (図 1)。

3. ヒト iPS 細胞を用いた細胞治療

神経変性疾患とは特定の細胞集団が徐々に障害を受けて脱落してしまう病気を指す。これに対して成体脳では少なくとも側脳室周囲の脳室下帯および海馬の歯状回顆粒細胞下帯に神経幹細胞が存在しており、複雑な構造を持つ神経回路が破綻した際には失われた細胞と置き換えることによって恒常性を維持する方向に働く。例えば、神経幹細胞より新しく生み出される神経細胞は失われた神経回路の再生に寄与するし、新生アストロサイトは残存神経細胞を保護することによって病態の進行抑制に貢献する。しかし成体脳に含まれる神経幹細胞の数は僅かであることから、多数の細胞が障害を受けた場合はその再生能力が限定的となる。そこで細胞治療では外部より細胞を補うことによって病態の回復促進を目指す。

1) 神経保護作用を目的とする細胞治療

神経変性疾患は特定の細胞集団が進行性に脱落する病態を示すため、この脱落を防ぐことができれば病態の進行を食い止めることにつながる。パーキンソン病では進行性に脱落する中脳黒質のドパミン神経細胞を救済するために、ドパミン神経細胞の生存及び軸索伸長に作用するグリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) の効果が検証されてきた [8]。パーキンソン病カニクイザルモデルを用いた実験からは、GDNF の脳内投与により脳内に残存するドパミン神経細胞の数が増加し、その結果として、パーキンソン病の主症状である筋強剛および姿勢反射障害が改善することが報告されている [9]。このような効果を得るためには GDNF を脳内に複数回投与する必要があるが、一部の症例では GDNF が脳脊髄液を介して全身へ拡散するという問題が指摘されている。このような問題に対して、GDNF 発現細胞を用いた細胞治療が試みられている。本法では GDNF 発現細胞を遺伝子組換え技術によって作製し、この細胞を移植することにより治療効果を期待するものである。GDNF が発現する

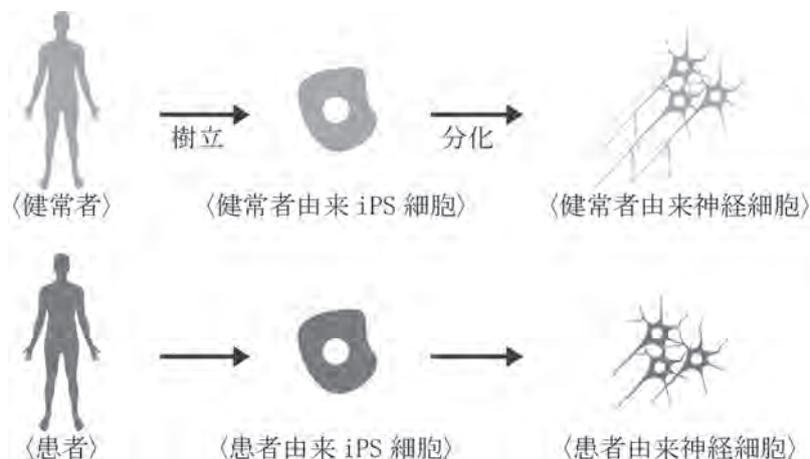


図 1 疾患特異的 iPS 細胞を用いる治療開発。

遺伝子変異を伴う神経変性疾患の情報は初期化後も iPS 細胞に引き継がれる。この特徴を利用することで病態の再現が可能となる。健常者由来 iPS 細胞及び疾患特異的 iPS 細胞から神経系の細胞を誘導することにより、従来では解析が困難であった神経細胞の特徴を比較解析することができる。また患者由来 iPS 細胞を患者自身に移植 (自家移植) することにより、拒絶反応の無い移植治療も検討できるようになった。

ように加工したヒト神経幹細胞をパーキンソン病動物モデルの線条体に移植した研究からは、宿主のドーパミン神経細胞の生存が促進されることによって運動機能症状の改善につながる事が明らかにされている [10] (図2)。

この他にも、ALSやアルツハイマー病等においても神経保護作用を目的とする細胞治療は有効とされている。実際にGDNFや神経成長因子(NGF)が発現するように加工した細胞を移植することで宿主の神経細胞の脱落を抑制できることが分かっている [11,12]。このように宿主の神経細胞保護効果を目的とする細胞治療は、神経栄養因子等を持続的に供給することで病態の進行が食い止められるという点で優れている。

2) 神経回路の再構築を目的とする細胞治療

神経変性疾患に対する細胞治療はいくつか試みられているが、ここではその歴史が最も古いパーキンソン病に焦点を当てて説明する。パーキンソン病は中脳黒質のドーパミン神経細胞が進行性に脱落するといった病態を示す。主な治療はドーパミン前駆物質やドーパミン作動薬の投与または脳深部刺激療法といった対症療法であることから、病態の進行自体を食い止めることはできない。これらの治療法に対して移植治療では失われた神経回路の再構築を目的としている。多くの移植治療が障害部位またはその周辺領域をターゲットとしているのに対して、パーキンソン病では線条体をターゲットとする点で他の疾患とは異なる。この理由は、中脳ドーパミン神経細胞が大脳基底核の中心である線条体へ出力する一方で、他からの入力をほとんど受けていないからである。つまりパーキンソン病の移植治療では線条体において新しい神経回路を再構築することができれば病態の回復が期待できる [13] (図2)。

パーキンソン病に対する細胞移植で高い治療効果を期待するためには機能性ドーパミン神経細胞を移植する必要がある。ドーパミン神経細胞は胎生期の中脳基板より分化することが明らかにされているため [14]、同領域をiPS細胞で分化誘導することが重要になる。現在は分化誘導初期にSMADシグナルの二重阻害により強力に神経系の細胞を誘導しつつ [15]、WNTシグナルの活性化による後方化および腹側化因子の添加によって中脳腹側領域を高効率に得られることが分かっている [16,17]。このような細胞をパーキンソン病ラットモデルの脳内に移植することで胎児組織移植と同程度の機能を有すこと

が明らかにされている [17,18]。また、オプトジェネティクスを用いた遺伝子操作実験からは抑制性オプシン(ハロロドプシン)が発現するように加工したヒトiPS細胞由来ドーパミン神経細胞を移植することにより、移植後の運動機能症状の改善が移植片から分泌されるドーパミンによってもたらされることが明らかにされている [19]。しかし、移植片から分泌されるドーパミンを一定濃度に保つことができなければ予期せぬ副作用につながりかねない。狂犬病ウイルスを用いて移植片の単シナプス性接続を調べた研究からは、移植後のヒトiPS細胞由来ドーパミン神経細胞と宿主脳の間で新生シナプスが形成されることが明らかにされており [20]、これらの研究成果はパーキンソン病に対する移植治療の有効性と安全性を補強するものと言える。

4. パーキンソン病に対するiPS細胞の臨床応用

iPS細胞は無限に増殖させてあらゆる細胞に分化させることができるという最大の利点があるが、この特性が移植治療では副作用のリスクになり得る。一般的に分化誘導で目的の細胞のみを作製することは難しく、神経系の場合であれば初期神経幹細胞の残存が移植後の腫瘍化につながる [21]。そこで移植前にドーパミン神経細胞を濃縮する技術が検討されてきた。現在は細胞表面抗原の違いを指標にして細胞を分取できる選別技術が開発されている。ドーパミン神経細胞であれば中脳基板から分化することが明らかにされているので [14]、同領域に発現する細胞表面抗原を利用することでドーパミン神経前駆細胞を濃縮することができる [22,23]。当研究室では世界初のパーキンソン病に対するヒトiPS細胞の臨床応用に向けてその有効性及び安全性を検証してきたのでその内容を紹介する。

1) 安全性

一般的にヒトiPS細胞の維持培養及び分化誘導にはマウス由来フィーダー細胞や異種由来タンパク質が利用されてきたが、このような動物由来成分は感染リスクを高めることになる。我々はフィーダー細胞の代わりにラミニンフラグメントを用いてiPS細胞の維持培養や神経分化誘導を可能にし、そして既存の異種由来タンパク質を低分子化合物に置き換えることによってこれらの問題を解決してきた。また分化誘導後の細胞にはある程度の割合で目的以外の細胞が含まれる。この中でも初期神経幹



図2 神経変性疾患に対するiPS細胞の治療アプローチ。

神経変性疾患のひとつであるパーキンソン病では中脳黒質のドーパミン神経細胞が進行性に脱落する。細胞治療では神経保護効果のある細胞を移植することで内在性ドーパミン神経細胞の脱落を防いだり、ドーパミン神経細胞を補充することで失われた神経回路の再構築を目的とする。

細胞は移植後の腫瘍化につながることから、このような細胞を事前に取り除く必要がある [21]。我々は、底板で特異的に発現する細胞表面抗原を利用することでドパミン神経前駆細胞の濃縮に成功している [22,23]。このような細胞を移植細胞として用いることにより安全且つ機能的ドパミン神経細胞の移植治療が可能になる。

2) 有効性

パーキンソン病に対する移植治療ではドパミン神経細胞の生着数と治療成績の間にある程度的相关性があることが分かっており、ヒトではおよそ10万個のドパミン神経細胞の生着が運動機能症状の改善に必要とされる。しかし細胞移植では術後の生着率の乏しさが問題とされており、この課題に対して我々は宿主の脳内環境に着目した研究にも取り組んできた。血液脳関門を通過する既存薬を用いて移植細胞に対する効果を検証したところ、抗てんかん薬であるゾニサミドにドパミン神経細胞の生着促進作用があることが明らかとなった [24]。我々の研究室ではこれらの研究成果を基軸にして、パーキンソン病カニクイザルモデルを用いてヒト iPS 細胞由来ドパミン神経細胞の安全性と有効性を明らかにしてきた [3] (図3)。現在は、臨床用に確立した製造手法に沿って臨床株由来ドパミン神経前駆細胞の有効性及び安全性を検証しているところである。

5. おわりに

滲出型加齢黄斑変性の患者を対象として iPS 細胞の臨床応用が既に実施されている。これに次いでパーキンソン病や重症虚血性心筋症の患者を対象とした細胞治療の準備も進められており、iPS 細胞が誕生してから12年で遂にそのステージは臨床の場に移りつつある。その一方で iPS 細胞については未だに未解明な部分もある。iPS 細胞は個人から作製できるという利点がある一方で、細胞株間におけるばらつきが生じることも分かってきた。このような問題は再生医療が加速すればより一層深刻化することから、iPS 細胞の持つ可能性に一喜一憂するだけでなく、日々の基礎研究によってより安全・有効な治療開発に努めていく必要がある。

6. 文献

- [1] Hargus G, Cooper O, Deleidi M, *et al.* Differentiated Parkinson patient-derived induced pluripotent stem cells grow in the adult rodent brain and reduce motor asymmetry in Parkinsonian rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:15921-15926 (2010).
- [2] Kikuchi T, Morizane A, Doi D, *et al.* Idiopathic Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells function as midbrain dopaminergic neurons in rodent brains. *J Neurosci Res* 95:1829-1837 (2017).
- [3] Kikuchi T, Morizane A, Doi D, *et al.* Human iPS cell-derived dopaminergic neurons function in a primate Parkinson's disease model. *Nature* 548:592-596 (2017).
- [4] Hino K, Horigome K, Nishio M, *et al.* Activin-A enhances mTOR signaling to promote aberrant chondrogenesis in fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Clin Invest* 127:3339-3352 (2017).
- [5] Yamashita A, Morioka M, Kishi H, *et al.* Statin treatment rescues FGFR3 skeletal dysplasia phenotypes. *Nature* 513:507-511 (2014).
- [6] Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, *et al.* Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science (New York, NY)* 321:1218-1221 (2008).
- [7] Park IH, Arora N, Huo H, *et al.* Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134:877-886 (2008).
- [8] Lin LF, Doherty DH, Lile JD, *et al.* GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science (New York, NY)* 260:1130-1132 (1993).
- [9] Gash DM, Zhang Z, Ovadia A, *et al.* Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature* 380:252-255 (1996).
- [10] Behrstock S, Ebert A, McHugh J, *et al.* Human neural progenitors deliver glial cell line-derived neurotrophic factor to parkinsonian rodents and aged primates. *Gene therapy* 13:379-388 (2006).

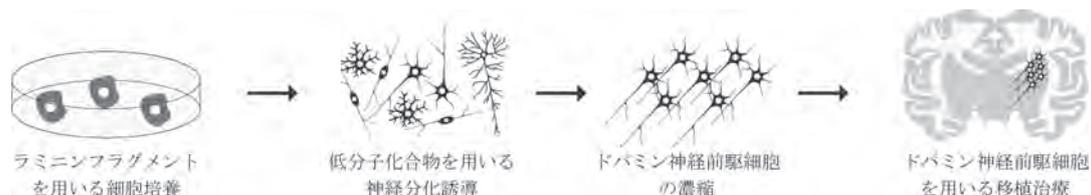


図3 ヒト iPS 細胞由来ドパミン神経前駆細胞の安全性・有効性の検証。

ヒト iPS 細胞の臨床応用に向けて、①動物由来因子を含まない培養法、②異種由来タンパク質を含まない分化誘導法、③ドパミン神経前駆細胞の選別技術等を開発するとともに、④ヒト iPS 細胞由来ドパミン神経前駆細胞の安全性・有効性をカニクイザルモデルを用いた移植実験により検証してきた。

- [11] Suzuki M, McHugh J, Tork C, *et al.* Direct muscle delivery of GDNF with human mesenchymal stem cells improves motor neuron survival and function in a rat model of familial ALS. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 16:2002-2010 (2008) .
- [12] Tuszynski MH, Thal L, Pay M, *et al.* A phase I clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease. *Nat Med* 11:551-555 (2005) .
- [13] Kordower JH, Freeman TB, Snow BJ, *et al.* Neuropathological evidence of graft survival and striatal reinnervation after the transplantation of fetal mesencephalic tissue in a patient with Parkinson's disease. *The New England journal of medicine* 332:1118-1124 (1995) .
- [14] Ono Y, Nakatani T, Sakamoto Y, *et al.* Differences in neurogenic potential in floor plate cells along an anteroposterior location: midbrain dopaminergic neurons originate from mesencephalic floor plate cells. *Development* 134:3213-3225 (2007) .
- [15] Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, *et al.* Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol* 27:275-280 (2009) .
- [16] Kriks S, Shim JW, Piao J, *et al.* Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature* 480:547-551 (2011) .
- [17] Kirkeby A, Grealish S, Wolf DA, *et al.* Generation of Regionally Specified Neural Progenitors and Functional Neurons from Human Embryonic Stem Cells under Defined Conditions. *Cell Rep* 1:703-714 (2012) .
- [18] Grealish S, Diguet E, Kirkeby A, *et al.* Human ESC-derived dopamine neurons show similar preclinical efficacy and potency to fetal neurons when grafted in a rat model of Parkinson's disease. *Cell Stem Cell* 15:653-665 (2014) .
- [19] Steinbeck JA, Choi SJ, Mrejeru A, *et al.* Optogenetics enables functional analysis of human embryonic stem cell-derived grafts in a Parkinson's disease model. *Nat Biotechnol* 33:204-209 (2015) .
- [20] Grealish S, Heuer A, Cardoso T, *et al.* Monosynaptic Tracing using Modified Rabies Virus Reveals Early and Extensive Circuit Integration of Human Embryonic Stem Cell-Derived Neurons. *Stem cell reports* (2015) .
- [21] Katsukawa M, Nakajima Y, Fukumoto A, *et al.* Fail-safe therapy by gamma-ray irradiation against tumor formation by human induced pluripotent stem cell-derived neural progenitors. *Stem cells and development* (2016) .
- [22] Doi D, Samata B, Katsukawa M, *et al.* Isolation of human induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitors by cell sorting for successful transplantation. *Stem cell reports* 2:337-350 (2014) .
- [23] Samata B, Doi D, Nishimura K, *et al.* Purification of functional human ES and iPSC-derived midbrain dopaminergic progenitors using LRTM1. *Nat Commun* 7:13097 (2016) .
- [24] Yoshikawa T, Samata B, Ogura A, *et al.* Systemic administration of valproic acid and zonisamide promotes differentiation of induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic neurons. *Frontiers in cellular neuroscience* 7:11 (2013) .

Application and development of induced pluripotent stem cells for neurodegenerative diseases.

Bumpei Samata, Jun Takahashi

Department of Clinical Application, Center for iPS Cell Research and Application,
Kyoto University.

Abstract

Effective treatment for neurodegenerative diseases has not been established. It needs to develop a therapeutic method for treatment of the diseases because the number of the patients is increasing with the aging of society. Cell therapy is one of the promising approaches to treat the diseases. Currently, pluripotent stem cells are expected to apply to clinical application and understand the disease mechanisms. In this section, we explained the outline of the cell therapy for neurodegenerative diseases.

【総説】

老年性筋疾患研究における iPS 細胞の利用とその有用性

細山 徹

国立長寿医療研究センター 再生再建医学研究部

要約

超高齢社会を迎えた我が国において、加齢性筋萎縮「サルコペニア」に対する予防法・治療法の開発は喫緊の課題である。しかし、臨床からの概念であるサルコペニアの基礎的な理解は進んでおらず、発症機序を含むサルコペニアの本態解明が強く望まれる。一方で近年、加齢に伴う骨格筋幹細胞の維持機構の破綻とサルコペニア発症との関連性が指摘されており、本態解明の標的の一つとして注目されている。しかしヒトにおいては、バイオプシーによる筋採取では得られる骨格筋幹細胞はごく微量であり、詳細な解析は困難である。自己細胞から作製される iPS 細胞は標的細胞を比較的大量に供給することが可能であり、希少な骨格筋幹細胞の詳細な解析を可能にすると期待されている。本項では、ヒト骨格筋幹細胞の供給源としての iPS 細胞の可能性について概説し、サルコペニアの本態解明における *in vitro* モデルとしての iPS 細胞由来骨格筋細胞の可能性について考察する。

キーワード：sarcopenia, skeletal muscle stem cells, induced pluripotent stem cells, stem cell maintenance

1：骨格筋老化と幹細胞

成人体重の約 40% を占める骨格筋は、最大のエネルギー産生組織であり、高い収縮特性を有することから、歩く、物を運ぶといった日常生活を送るうえで重要である。一方、体内の組織恒常性維持に関与する種々の液性因子(マイオカイン)を産生することが近年明らかになってきており、単なる運動器としての役割だけでなく分泌器官としても重要な役割を果たしている^[1]。

我々の身体は加齢に伴い“成長(成熟)”し、やがて“衰え”ていくが、骨格筋も例外ではなく、加齢という身体的変化に伴って萎縮(量的変化)や収縮能の低下(質的变化)が生じ、運動機能ばかりでなく他臓器(器官)の恒常性維持にも影響を与える。このような加齢に伴う骨格筋の減弱はサルコペニア(ギリシャ語で、サルコは骨格筋、ペニアは喪失を意味する)と呼ばれ、我が国にお

いても診断基準の決定とともに注目されている^[2,3]。特に近年の臨床的検証から、加齢に伴って生じる筋萎縮・筋量低下・筋力低下などを一次性サルコペニア(骨格筋が病態の起点となるもの)、加齢に伴って生じる種々の身体的変化により結果として筋萎縮等が生じる二次性サルコペニア(骨格筋以外の組織・臓器の状態変化が起点となり、結果として筋萎縮などの病態が引き起こされるもの)が提案されている^[4]。しかしながら、サルコペニアは臨床からの概念であり、発症機序を含む詳細な分子機構は不明である^[2,5,6]。すなわち、サルコペニアの予防法や治療法を開発する上では、「サルコペニアの本態」についてその発症の分子機構を明らかにする必要がある。

骨格筋の持つ重要な特性として、先に挙げたエネルギー産生、収縮特性および内分泌能に加えて「高い再生能」も挙げられ、軽微な筋損傷であれば直ちに修復し得る能力を有する。この骨格筋の再生過程において重要な役割を果たすのが筋サテライト細胞である^[7]。筋サテライト細胞は、その名のとおり“衛星”として筋線維に接着している単核の細胞であり、筋損傷や筋成長といった外的刺激を受容すると、休止状態から活性化状態へと移行し、新たな筋細胞を作り出す(図 1)。この筋再生

連絡先：細山徹 〒474-8511
愛知県大府市森岡町 7-430
TEL：0562-46-2311
E-mail：toruhoso@ncgg.go.jp

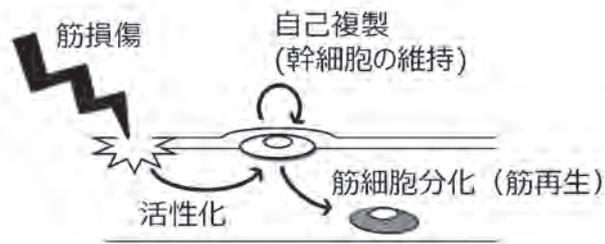


図1. 筋サテライト細胞による骨格筋恒常性維持

休止状態で筋線維の基底膜下に存在する筋サテライト細胞は、筋損傷などの刺激により活性化し、損傷部を修復する為に筋芽細胞へと分化する（筋再生）。一方、自己複製により幹細胞プールを維持し、次の活動に備える（幹細胞の維持）。

の過程は、筋サテライト細胞の活性化→筋芽細胞への分化運命決定・増殖→筋芽細胞の筋線維への融合→筋線維の成熟、を経ると考えられている。また筋サテライト細胞は、一過的に筋細胞へと分化する（筋細胞を供給する）ばかりでなく、自己複製により幹細胞プールを維持し次の動員に備えるために再び眠り（G0期）につく。すなわち筋サテライト細胞は、成体骨格筋における幹細胞として働き、一生涯に渡り我々の骨格筋の恒常性を制御している^[8]。

マウスを用いた近年の報告では、老化に伴い筋サテライト細胞の数と機能が低下（量的・質的な変化）する可能性が指摘されており、サルコペニア発症との関連性が注目されている^[9]。これらの報告では、加齢に伴う筋サテライト細胞におけるオートファジー系の活性化、あるいは、加齢に伴う筋線維と筋サテライト細胞との相互作用の変化、などが示されており、加齢に伴う筋サテライト細胞の内的・外的な変化が要因として指摘されている^[10,11]。また最近、加齢に伴ってヒト筋サテライト細胞のゲノム中に変異が蓄積していくという興味深い知見も報告されており、加齢に伴って骨格筋幹細胞の維持制御機構が破綻し結果としてサルコペニアが発症するという仮説を支持する^[12]。一方、Petersonらは、筋サテライト細胞特異的にジフテリア毒を発現させ生後の骨格筋において幹細胞を枯渇させる手法を用いて、筋サテライト細胞を有する老齢マウスと筋線維径などに差が無いという興味深い結果を報告している^[13]。このことは、筋サテライト細胞がサルコペニア発症に積極的には関与しないことを示唆しており、定説を覆す驚くべき結果である。しかしこの報告は、あくまでもマウスでの結果であり、ヒトに当てはめることが出来るか否かは今のところ不明である。また現在までのところ、別グループによる追試結果や同グループによる続報も出ておらず、加齢に伴う筋萎縮と筋サテライト細胞の質的・量的変化に関するこれまでの研究結果との整合性についても結論が出ていない。いずれにせよ、加齢に伴う筋サテライト細胞の数と質の低下は、複数の研究グループによりコンセンサスが得られている信ぴょう性の高いものであることから、サルコペニア発症との間に何らかの関連性があるのは間違いない。しかし、そもそも若齢期においてさえも骨格筋幹細胞が如何に維持されているかは明らかに

なっており、近年の骨格筋幹細胞研究の大きなトピックとなっている。言い換えれば、成体骨格筋における幹細胞プールの維持制御機構が明らかになれば、老齢個体で生じる筋サテライト細胞の量的・質的变化とサルコペニア発症との関連性について重要な示唆を与えることができる。

しかしながら、成体骨格筋内に存在する筋サテライト細胞は微量であり、また未分化性（幹細胞性）を維持した状態での解析が困難である。すなわち、詳細な解析を行う研究対象として、希少性と扱いづらさの両面において高いハードルが存在する。更にヒトにおいては、筋バイオプシーにより得られる筋サテライト細胞数は極めて限定的であり、解析を行うのはさらに困難になる。それ故に、骨格筋幹細胞（筋サテライト細胞）の維持制御機構および加齢との関連性について詳細に解析するには、まとまった数の幹細胞を得る方法論を確立する必要がある。

2：骨格筋幹細胞の供給源としての iPS 細胞

人工多能性幹細胞（iPS細胞）は、体細胞を初期化することで樹立される多能性細胞であり、胎盤以外の全ての細胞へと分化することができる^[14]。実際に、神経細胞や心筋細胞といった様々な細胞種へと分化し得ることが報告されており、患者由来 iPS 細胞から分化誘導した網膜色素上皮細胞の滲透性加齢黄斑変性症患者への自家移植は記憶に新しい^[15]。iPS細胞を用いた応用研究としては、失われた細胞を補完する再生医療と in vitro 疾患モデル化（Disease modeling：特に遺伝性疾患が対象となる）による病態解明・薬剤スクリーニングが広く知られているが、他にも骨格筋幹細胞のような希少細胞種の動態解析への応用も期待される。すなわち、iPS細胞由来細胞を供給源として得られた骨格筋幹細胞を用いることで、前項で述べた「ヒト骨格筋幹細胞の維持制御機構」に対する詳細な解析が可能となる。しかし、多能性幹細胞からの骨格筋系譜細胞の分化誘導研究は、神経細胞や心筋細胞ほどは進んでおらず、再現性のある高効率な分化誘導プロトコルの確立が必要である。

ヒト多能性幹細胞から特定の細胞を分化誘導する方法論としては、主に積み重ねられてきたマウス発生研究

の情報をもとに、発生段階の転写因子発現パターンを模倣する方法が一般的である。骨格筋の場合は、胚発生初期に発現するペアードボックス型転写因子 (paired-box transcriptional factor: Pax) と筋制御因子 (muscle regulatory factors: MRFs) を起点に筋発生が進行する為、これらの転写因子を指標に多能性幹細胞から筋細胞を誘導していく場合が多い。実際、我が国の iPS 細胞研究の拠点である CiRA (京都大学 iPS 細胞研究所) の研究グループは、ヒト多能性幹細胞に MyoD を導入することで高効率に筋細胞分化を誘導することに成功している^[16]。しかしながら、MyoD 導入により誘導された筋細胞は、骨格筋幹細胞よりもより分化ステージの進んだ筋芽細胞であり、希少な骨格筋幹細胞を得るという目的にはそぐわない。一方、米国ミネソタ大学の研究グループは、マウスやヒトの多能性幹細胞においてドキシサイクリン誘導性に Pax3 もしくは Pax7 を過剰発現させて分化効率を上げる方法を開発し、FACS 技術を組み合わせるなどして高濃度の骨格筋幹細胞 (発生期の前駆細胞も含む) の入手に成功している^[17,18]。また外来遺伝子導入を用いず、マウス発生研究の情報を参考に種々の細胞成長因子を段階的に添加する方法 (胚発生に忠実な方法) も報告されており、Pax7 や MyoD などの骨格筋系譜細胞マーカーの発現も認められることから、外来遺伝子の影響を考慮する必要のないより安全な方法として期待されている^[19,20]。方法論としては、細胞成長因子の添加による中胚葉の誘導を皮切りに、段階的に筋節および骨格筋前駆細胞 (骨格筋幹細胞) を分化誘導していく。CiRA の桜井らは、種々の成長因子の添加によりまず PDGFR- α 陽性の沿軸中胚葉を誘導し、そこから更に骨格筋幹細胞を誘導することに成功している^[21]。しかし、桜井らの方法も含め同様の現行法では分化誘導効率

が低く、また複雑なプロトコルであるために、更なる改善が求められる^[22]。一方、近年では、低分子化合物を添加することにより中胚葉への分化を強力に誘導した後に、種々の細胞成長因子を段階的に加えていくという方法が世界的潮流である。本法は、Pax7 陽性細胞 (骨格筋幹細胞) への高い誘導効率も期待されることから^[23,24]、別の研究グループによる追試により再現性が確認されれば、効率の良い骨格筋幹細胞分化誘導法として定着する可能性がある。

またこれまでに報告されているいくつかの方法においては、筋ジストロフィーなどの患者由来 iPS 細胞から骨格筋細胞を誘導することに成功しており、iPS 細胞技術を用いた遺伝性筋疾患の *in vitro* 疾患モデル化への利用が期待されている^[16,25,26]。

3: EZ スフィア法によるヒト多能性幹細胞からの高効率骨格筋幹細胞の分化誘導

一方、筆者らは、これまでとは異なる方法によりヒト多能性幹細胞から簡便かつ高効率に骨格筋幹細胞様細胞 (厳密には発生期で認められる Pax7 陽性の骨格筋前駆細胞) を誘導することに成功しており、希少な骨格筋幹細胞を得る新たな方法として期待される^[25]。

筆者らが開発した新しい骨格筋幹細胞分化誘導法—EZ スフィア法—は、スフィア培養法 (浮遊培養により細胞塊を形成させる方法) を基盤としており、平均で約 6 週間の浮遊培養により 50 ~ 60% の細胞で骨格筋幹細胞マーカー (CD56⁺/CD82⁺ あるいは Pax7) の発現が認められる (図 2)。同様の浮遊培養形態として胚様体 (Embryoid Body) 形成法が良く知られるが、細胞塊内部で細胞増殖がほとんど起こらない胚様体と比べて、本法ではスフィア内での盛んな細胞増殖が認められる。こ

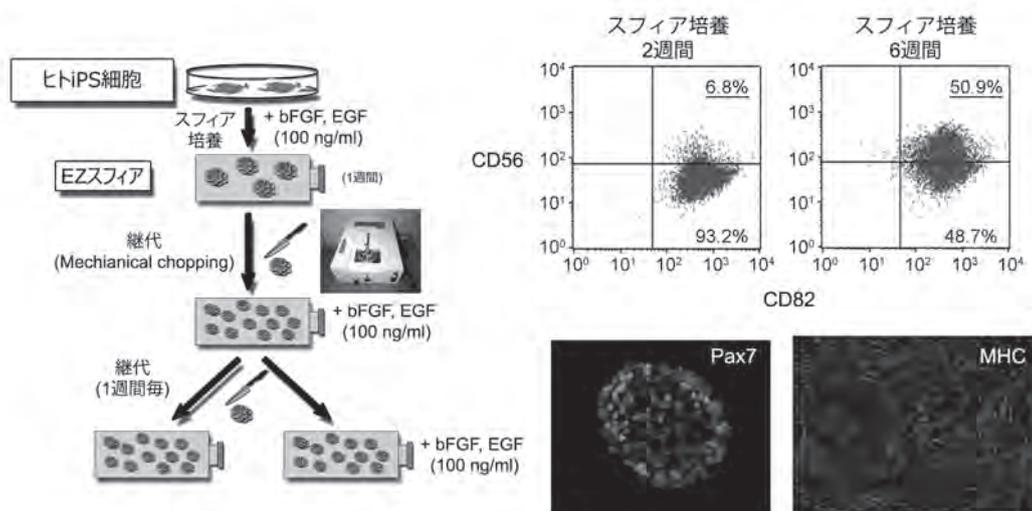


図 2. EZ スフィア法を用いたヒト iPS 細胞からの骨格筋幹細胞の誘導
 (左) EZ スフィア法の流れ。未分化ヒト iPS 細胞を高濃度 bFGF/EGF を含む Stemline 培地中で浮遊培養する。1 週間ごとに機械的裁断法 (Mechanical Chopping) でスフィアを継代する。
 (右上) スフィア培養 2 週間後と 6 週間後の FACS 解析。骨格筋幹細胞マーカーとして CD56 と CD82 を使用。
 (右下) スフィア培養 6 週間後のスフィアにおける Pax7 発現と接着培養に移行後の MHC 発現。

これは、培地に添加した高濃度の bFGF と EGF（通常使用の 5～10 倍高濃度）が未分化多能性幹細胞からの筋細胞系譜への分化を誘導するばかりでなく、細胞増殖も伴うことによると考えられる（形態イメージとしては、胚様体が風船で EZ スフィアが野球の硬球）。それ故に、形成された細胞塊（スフィア）は培養期間中に徐々に成長していき、胚様体法では通常行われない継代が可能である。EZ スフィアの継代は、トリプシンなどの酵素を使わずに機械的裁断法（Mechanical Chopping 法）が用いられる。すなわち、酵素処理により単一細胞の状態にせず、裁断により 10～15 個程度の細胞で構成される小さな細胞塊を作り出して継代する。培養期間中には個々の骨格筋幹細胞から種々の細胞外マトリックスや液性因子が産生され、「幹細胞ニッチ様構造」を形成していることが予想されることから、裁断法を用いることでこの構造を維持した状態で継代することが出来る。幹細胞ニッチは、骨格筋幹細胞の未分化性や休止状態の維持に重要であるとされることから^[27]、裁断法を用いることで未分化維持効果が期待される。また本法で採用している浮遊培養法は接着培養法に比べて細胞の大量培養に適しており、多能性幹細胞から大量の骨格筋幹細胞を得ることも可能である。

このように、EZ スフィア法は極めて簡便な方法であり、特別な技術や経験を必要としない（ヒト多能性幹細胞の適切なハンドリング技術は必要）。そのため誰にでも比較的容易に使いこなせると予想される。実際、我々とは別の研究グループによって再現性が確認されており^[28]、骨格筋幹細胞の供給およびその応用研究を行う上で有力な選択肢となり得る。また最近、本法に低分子化合物添加を組み合わせるにより iPS 細胞株間での分化誘導効率のバラツキを抑え得ることが報告され^[29]、EZ スフィア法がよりロバストな骨格筋幹細胞の分化誘導法となり得ることを示している。

4：骨格筋幹細胞の短期間未分化維持モデルとしての EZ スフィア法

前述のように、様々な方法によりヒト iPS 細胞から骨

格筋幹細胞を分化誘導することが可能になりつつあり、希少な骨格筋幹細胞の維持制御機構を明らかにする上で iPS 細胞が有用な細胞供給源として認識されつつある。その一方で、骨格筋幹細胞を未分化状態のまま維持する方法は確立されていないという課題もある^[30]。すなわち、ヒト多能性幹細胞からの骨格筋幹細胞の分化誘導は一過性であり、培養期間中に分化が進行（＝筋芽細胞へ分化）し幹細胞プールを維持することができない。これは、解析に必要な骨格筋幹細胞をその都度ヒト iPS 細胞から分化誘導する必要があることを意味しており、手間やコスト面などにおいて大きなハードルとなり得る。近年の報告では、細胞培養時に筋線維膜や幹細胞ニッチの構成成分である細胞外マトリックス（あるいはその代用物）を利用することで、単離した筋サテライト細胞の未分化状態を維持できる可能性が示されている^[31,32]。現状、これら細胞外マトリックス成分のヒト多能性幹細胞由来骨格筋幹細胞における有用性は確認されておらず、また、誰にでも手軽に検討できる実用段階のものはないが、細胞を取り巻く環境（ニッチ）を調節することにより、骨格筋幹細胞の未分化性をある程度までは維持できることを示唆しており、より汎用性の高い新たな培養法あるいはデバイスの開発が期待される。

骨格筋幹細胞は、細胞外マトリックスを自己分泌し幹細胞ニッチを形成することから^[27]、EZ スフィア法によって形成された骨格筋幹細胞スフィアにおいても最低限の幹細胞ニッチが形成され、幹細胞の未分化状態が維持できる環境にあると予想される。そこで、EZ スフィア法を用いてヒト iPS 細胞から分化誘導した骨格筋幹細胞スフィアを、同じ培養条件でさらに 6 週間培養（12 週間の培養期間）し、長期スフィア培養の未分化幹細胞に与える影響について検討した。しかしながら、予想に反し、培養 6 週間にピークを迎えていたヒト iPS 細胞由来骨格筋幹細胞は、培養期間の延長に伴いスフィア内部で筋分化が進行してしまい、培養 12 週の時点では骨格筋幹細胞がほとんど確認できなくなった（図 3A）。このことは、分化誘導後の骨格筋幹細胞を長期間維持する上では EZ スフィア法が不十分な方法であることを示

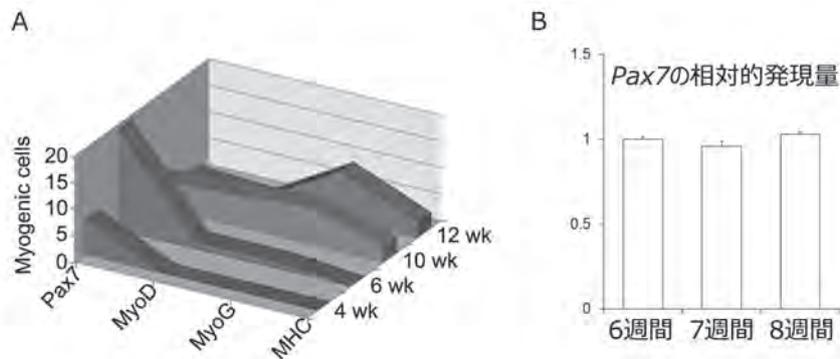


図 3. EZ スフィア法による培養時の Pax7 発現量の変化

(A) EZ スフィア培養 4～12 週間の細胞分布の変遷。Pax7 は骨格筋幹細胞を示す。

培養期間の延長により筋分化が進行してしまい、幹細胞プールは枯渇する。

(B) EZ スフィア培養 6～8 週間の Pax7 遺伝子の発現変化。幹細胞の分化誘導後 2 週間はスフィア内に幹細胞集団が保たれることを示唆している。

している。しかし一方で、EZ スフィア法の培養6週～8週の間は、一度分化誘導された骨格筋幹細胞がスフィア内に維持されることも確認した(図3B)。現在までのところそのメカニズムは明らかではないが、この結果は、ヒト iPS 細胞から分化誘導した骨格筋幹細胞を短期間であればスフィア内部に維持できることを示しており、EZ スフィア法が骨格筋幹細胞の維持制御機構を明らかにするための短期間培養モデル系になり得ることを示唆している^[33]。ミネソタ大学の研究グループによる Pax7 過剰発現系による骨格筋幹細胞分化誘導法に関する報告では、分化誘導24日目には出現した Pax7 陽性骨格筋幹細胞が誘導30日には筋細胞分化のステージに入ると述べられており^[34]、EZ スフィア法は幾分か長い間幹細胞プールを維持できるものと思われる。

5: 高齢者由来 iPS 細胞を用いたサルコペニア研究の可能性

これまで述べてきたように、iPS 細胞技術は希少なヒト骨格筋幹細胞の供給源として有用であり、iPS 細胞由来ヒト骨格筋幹細胞をモデル系として、サルコペニア患者において破綻するとされる「幹細胞プールの維持制御機構」の解明を進めることも可能である。しかし、この研究アプローチは、あくまでも「一般的な」骨格筋幹細胞の維持制御に関するものであり、高齢者 iPS 細胞を用いた同様の検証が有効であるか否かは不明である。この点は、遺伝性疾患研究において最もその効力を発揮する iPS 細胞技術が、遺伝的要因が少ないと考えられるサルコペニアの研究に不向きであると危惧されてきた点でもある。しかし近年、「高齢者由来筋サテライト細胞におけるゲノム変異の蓄積」といった新たな事象も報告されたことから、今後、高齢者 iPS 細胞から誘導した骨格筋幹細胞を用いた研究にも応用の幅が広がる可能性が出てきた。この報告では、高齢者から単離した筋サテライト細胞クロンの全ゲノムシーケンス解析により、ゲノム当たり年間で13か所に変異が蓄積していくことが示されており、これらの変異部位にはエクソンやプロモーター領域も含まれるとされる^[13]。このことは、骨格筋幹細胞のゲノムにおける変異が、骨格筋幹細胞の性質に影響を及ぼす可能性を示しているが、現在までのところその関連性は不明である。

骨格筋幹細胞の希少性(高齢者では尚更採取は困難)がゲノム変異蓄積に対する研究を難しくしている一要因であると考えられるが、iPS 細胞の樹立は年齢に関係なく可能であり、EZ スフィア法を含め iPS 細胞から骨格筋幹細胞への分化誘導方法も確立されつつある現在であれば、高齢者 iPS 細胞から誘導したヒト骨格筋幹細胞を用いたゲノム変異研究は十分可能である(ただし、高齢者 iPS 細胞ではゲノム不安定性の惹起などの異常が頻発すると言われており、これら背景因子に対する対策が必要)^[35]。また、体細胞におけるゲノム(あるいはエピゲノム)レベルでの変異が iPS 細胞化しても持ち込まれることは、多くの遺伝性疾患研究で証明されており^[36,37]、

高齢者骨格筋幹細胞で見られるゲノム変異蓄積の表現型についても再現されると予想される。

6: おわりに

骨格筋老化研究における iPS 細胞技術の位置づけは、互いに相反する関係のように思われる。しかし、幹細胞レベルで加齢に伴うゲノム変化(変異)が生じる可能性が示されたことから、今後その状況は変化していくと予想される。本項で述べてきたように、iPS 細胞からの骨格筋幹細胞の分化誘導は確立されつつある為、幹細胞でのゲノム変異の蓄積という「病態」の再現が確認されれば、高齢者 iPS 細胞由来の骨格筋幹細胞は一種の「in vitro サルコペニア疾患モデル」となる可能性がある。このモデルを用いることで、骨格筋幹細胞ゲノムに蓄積される変異の挿入機序やそれに伴う幹細胞への影響の一端が明らかになり、さらに筋サテライト細胞特異的な遺伝子改変マウスなどによる発生工学や EZ スフィア法による短期間骨格筋幹細胞未分化維持モデルとの併用により、サルコペニアの本態解明およびその予防法の開発へ大きく前進するものと期待される。

参考文献

- 1) Karstoft K, Pedersen BK. Skeletal muscle as a gene regulatory endocrine organ. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 19: 270-275. 2016.
- 2) Rosenberg I. Summary comments: epidemiological and methodological problems in determining nutritional status of older persons. *Am J Clin Nutr.* 50:1231-1233. 1989.
- 3) Arai H et al., Clinical guidelines for sarcopenia. *Geriatr Gerontol Int.* 18 Suppl 1: 5-44. 2018.
- 4) Shimokata H, Shimada H, Satake S, Endo N, Shibasaki K, Ogawa S, Arai H. Chapter 2 Epidemiology of sarcopenia. *Geriatr Gerontol Int.* 18 Suppl 1:13-22. 2018.
- 5) Rosenberg IH. Sarcopenia: origins and clinical relevance. *J Nutr.* 127: 990S-991S. 1997.
- 6) Morley JE, Baumgartner RN, Roubenoff R, Mayer J, Nair KS. Sarcopenia. *J Lab Clin Med.* 137: 231-243. 2001.
- 7) Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol.* 9: 493-495. 1961.
- 8) Chargé S, Rudnicki MA. Fusion with the fused: a new role for interleukin-4 in the building of muscle. *Cell.* 113: 422-423. 2003.
- 9) Sousa-Victor P, Muñoz-Cánoves P. Regenerative decline of stem cells in sarcopenia. *Mol Aspects Med.* 50: 109-117. 2016.
- 10) Roza M, Li L, Fan CM. Targeting β 1-integrin signaling enhances regeneration in aged and dystrophic muscle in mice. *Nat Med.* 22: 889-896. 2016.
- 11) García-Prat L, Martínez-Vicente M, Perdiguero

- E, Ortet L, Rodríguez-Ubreva J, Rebollo E, Ruiz-Bonilla V, Gutarra S, Ballestar E, Serrano AL, Sandri M, Muñoz-Cánoves P. Autophagy maintains stemness by preventing senescence. *Nature*. 529: 37-42. 2016.
- 12) Franco I, Johansson A, Olsson K, Vrtačnik P, Lundin P, Helgadottir HT, Larsson M, Revêchon G, Bosia C, Pagnani A, Provero P, Gustafsson T, Fischer H, Eriksson M. Somatic mutagenesis in satellite cells associates with human skeletal muscle aging. *Nat Commun*. 9: 800. 2018.
 - 13) Fry CS, Lee JD, Mula J, Kirby TJ, Jackson JR, Liu F, Yang L, Mendias CL, Dupont-Versteegden EE, McCarthy JJ, Peterson CA. Inducible depletion of satellite cells in adult, sedentary mice impairs muscle regenerative capacity without affecting sarcopenia. *Nat Med*. 21: 76-80. 2015.
 - 14) Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 126: 663-676. 2006.
 - 15) Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, Hirami Y, Morinaga C, Daimon T, Fujihara M, Akimaru H, Sakai N, Shibata Y, Terada M, Nomiya Y, Tanishima S, Nakamura M, Kamao H, Sugita S, Onishi A, Ito T, Fujita K, Kawamata S, Go MJ, Shinohara C, Hata KI, Sawada M, Yamamoto M, Ohta S, Ohara Y, Yoshida K, Kuwahara J, Kitano Y, Amano N, Umekage M, Kitaoka F, Tanaka A, Okada C, Takasu N, Ogawa S, Yamanaka S, Takahashi M. Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N Engl J Med*. 376: 1038-1046. 2017.
 - 16) Tanaka A, Woltjen K, Miyake K, Hotta A, Ikeya M, Yamamoto T, Nishino T, Shoji E, Sehara-Fujisawa A, Manabe Y, Fujii N, Hanaoka K, Era T, Yamashita S, Isobe K, Kimura E, Sakurai H. Efficient and reproducible myogenic differentiation from human iPS cells: prospects for modeling Miyoshi Myopathy in vitro. *PLoS One*. 8: e61540. 2013.
 - 17) Darabi R, Gehlbach K, Bachoo RM, Kamath S, Osawa M, Kamm KE, Kyba M, Perlingeiro RC. Functional skeletal muscle regeneration from differentiating embryonic stem cells. *Nat Med*. 14: 134-143. 2008.
 - 18) Darabi R, Arpke RW, Irion S, Dimos JT, Grskovic M, Kyba M, Perlingeiro RC. Human ES- and iPS-derived myogenic progenitors restore DYSTROPHIN and improve contractility upon transplantation in dystrophic mice. *Cell Stem Cell*. 10: 610-619. 2012.
 - 19) Barberi T, Bradbury M, Dincer Z, Panagiotakos G, Socci ND, Studer L. Derivation of engraftable skeletal myoblasts from human embryonic stem cells. *Nat Med*. 13: 642-648. 2007.
 - 20) Mizuno Y, Chang H, Umeda K, Niwa A, Iwasa T, Awaya T, Fukada S, Yamamoto H, Yamanaka S, Nakahata T, Heike T. Generation of skeletal muscle stem/progenitor cells from murine induced pluripotent stem cells. *FASEB J*. 24: 2245-2253. 2010.
 - 21) Sakurai H, Sakaguchi Y, Shoji E, Nishino T, Maki I, Sakai H, Hanaoka K, Kakizuka A, Sehara-Fujisawa A. In vitro modeling of paraxial mesodermal progenitors derived from induced pluripotent stem cells. *PLoS One*. 7: e47078. 2012.
 - 22) Awaya T, Kato T, Mizuno Y, Chang H, Niwa A, Umeda K, Nakahata T, Heike T. Selective development of myogenic mesenchymal cells from human embryonic and induced pluripotent stem cells. *PLoS One*. 7: e51638. 2012.
 - 23) Shelton M, Metz J, Liu J, Carpenedo RL, Demers SP, Stanford WL, Skerjanc IS. Derivation and expansion of PAX7-positive muscle progenitors from human and mouse embryonic stem cells. *Stem Cell Reports*. 3: 516-29. 2014.
 - 24) Chal J, Oginuma M, Al Tanoury Z, Gobert B, Sumara O, Hick A, Bousson F, Zidouni Y, Mursch C, Moncuquet P, Tassy O, Vincent S, Miyanari A, Bera A, Garnier JM, Guevara G, Hestin M, Kennedy L, Hayashi S, Drayton B, Cherrier T, Gayraud-Morel B, Gussoni E, Relaix F, Tajbakhsh S, Pourquié O. Differentiation of pluripotent stem cells to muscle fiber to model Duchenne muscular dystrophy. *Nat Biotechnol*. 33: 962-969. 2015.
 - 25) Hosoyama T, McGivern JV, Van Dyke JM, Ebert AD, Suzuki M. Derivation of myogenic progenitors directly from human pluripotent stem cells using a sphere-based culture. *Stem Cells Transl Med*. 3: 564-574. 2014.
 - 26) Shoji E, Sakurai H, Nishino T, Nakahata T, Heike T, Awaya T, Fujii N, Manabe Y, Matsuo M, Sehara-Fujisawa A. Early pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy modelled in patient-derived human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep*. 5: 12831. 2015.
 - 27) Baghdadi MB, Castel D, Machado L, Fukada SI, Birk DE, Relaix F, Tajbakhsh S, Mourikis P. Reciprocal signalling by Notch-Collagen V-CALCR retains muscle stem cells in their niche. *Nature*. 557: 714-718. 2018.
 - 28) Uezumi A, Nakatani M, Ikemoto-Uezumi M, Yamamoto N, Morita M, Yamaguchi A, Yamada H,

- Kasai T, Masuda S, Narita A, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Fukada S, Nishino I, Tsuchida K. Cell-Surface Protein Profiling Identifies Distinctive Markers of Progenitor Cells in Human Skeletal Muscle. *Stem Cell Reports*. 7: 263-278. 2016.
- 29) Sakai-Takemura F, Narita A, Masuda S, Wakamatsu T, Watanabe N, Nishiyama T, Nogami K, Blanc M, Takeda S, Miyagoe-Suzuki Y. Premyogenic progenitors derived from human pluripotent stem cells expand in floating culture and differentiate into transplantable myogenic progenitors. *Sci Rep*. 8: 6555. 2018.
- 30) Montarras D, Morgan J, Collins C, Relaix F, Zaffran S, Cumano A, Partridge T, Buckingham M. Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science*. 309: 2064-2067. 2005.
- 31) Gilbert PM, Havenstrite KL, Magnusson KE, Sacco A, Leonardi NA, Kraft P, Nguyen NK, Thrun S, Lutolf MP, Blau HM. Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture. *Science*. 329:1078-1081. 2010.
- 32) Ishii K, Sakurai H, Suzuki N, Mabuchi Y, Sekiya I, Sekiguchi K, Akazawa C. Recapitulation of Extracellular LAMININ Environment Maintains Stemness of Satellite Cells In Vitro. *Stem Cell Reports*. 10: 568-582. 2018.
- 33) Hosoyama T, Ichida S, Kanno M, Ishihara R, Hatashima T, Ueno K, Hamano K. Microgravity influences maintenance of the human muscle stem/progenitor cell pool. *Biochem Biophys Res Commun*. 493: 998-1003. 2017.
- 34) Magli A, Incitti T, Kiley J, Swanson SA, Darabi R, Rinaldi F, Selvaraj S, Yamamoto A, Tolar J, Yuan C, Stewart R, Thomson JA, Perlingeiro RCR. PAX7 Targets, CD54, Integrin $\alpha 9\beta 1$, and SDC2, Allow Isolation of Human ESC/iPSC-Derived Myogenic Progenitors. *Cell Rep*. 19: 2867-2877. 2017.
- 35) Strässler ET, Aalto-Setälä K, Kiamehr M, Landmesser U, Kränkel N. Age Is Relative-Impact of Donor Age on Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cell Functionality. *Front Cardiovasc Med*. 5:4. 2018.
- 36) Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr, Mattis VB, Lorson CL, Thomson JA, Svendsen CN. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*. 457: 277-280. 2009.
- 37) Marchetto MC, Carromeu C, Acab A, Yu D, Yeo GW, Mu Y, Chen G, Gage FH, Muotri AR. A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell*. 143: 527-539. 2010.

Applications of induced pluripotent stem cells for age-related muscle diseases

Tohru Hosoyama

Department of Regenerative Medicine, National Center for Geriatrics and Gerontology.

Abstract

Development of prevention and treatment for age-related muscular atrophy "sarcopenia" is an urgent issue in Japan, which has entered a super-aging society. However, the basic understanding of sarcopenia, which is a concept from clinical practice, has not progressed, and elucidation of the essential status of sarcopenia including disease onset mechanism is strongly desired. On the other hand, in recent years, the relationship between dysregulation of maintenance mechanism of skeletal muscle stem cells accompanying aging and the occurrence of sarcopenia has been pointed out and attracted attention as one of the targets to elucidate sarcopenia. However, in humans, skeletal muscle stem cells obtained by muscle biopsy are very rare and detailed analysis is difficult. Induced pluripotent stem (iPS) cells developed from autologous somatic cells can supply target cells in a relatively large amount and are expected to enable detailed analysis of rare skeletal muscle stem cells. This section outlines the possibility of iPS cells as a source of human skeletal muscle stem cells and discusses the possibility of iPS cell-derived skeletal muscle cells as an *in vitro* model in the elucidation of sarcopenia.

Keywords : sarcopenia, skeletal muscle stem cells, induced pluripotent stem cells, stem cell maintenance

【総説】

マウス発生工学の技術革新

平手 良和

国立大学法人東京医科歯科大学統合研究機構実験動物センター

要約

マウスは古くから研究に供されてきた実験動物であり、基礎医学研究における哺乳類のモデル生物としてその重要性は今後も変わることはないだろう。ゲノム編集法の急速な発展により遺伝子改変体を容易に作製できるようになったが、その発展を縁の下で支えているのは発生工学技術である。本稿では発展著しい最新のマウス発生工学技術について概説する。取り上げる技術は“超”過剰排卵誘起法、発情周期の同調法、胚凍結、精子凍結、精巣上部尾部および胚の冷蔵輸送、そしてトリプル CRISPR である。これらの新技術により遺伝子改変体の作製が促進され、系統保存の信頼性が向上し、輸送手段は多様化した。これらはみな完成度の高い技術であるが、難易度が高いわけではなく導入障壁は比較的低い。各研究機関の動物実験施設でマウスの発生工学に携わる技術者は新しい技術を積極的に取り入れ、技術革新の恩恵を研究者に還元してほしい。

キーワード： ultra-superoovulation, synchronization of estrus cycle, cryopreservation, transportation at a cold temperature; triple CRISPR

1. はじめに

実験動物の扱いやすさは繁殖・系統保存を自在にコントロールできるか否かによって決まるといっても異論はないかと思う。ゲノム編集法の急速かつ飛躍的な進展のおかげで、マウスでも種々の遺伝子改変体を比較的容易に作製できるようになった。ゲノム編集技術が華々しくマウス研究の世界を塗り替えていく中、それを縁の下で支えているのは発生工学技術である。マウスの発生工学技術はこの10年で大きく進展しており、一部の技術に至っては発生工学を専門としない一般の研究者でも実施可能なほどに簡易化されている。しかしながら、やはり発生工学というと専門外の研究者には敷居が高く感じられているのではないだろうか。本稿では技術的な解説は最小限とし、一般のマウス研究者にとっての新技術のメリットに重きを置いて解説する。

本稿で紹介する発生工学技術は以下のとおりである。
1) 抗インヒビン抗血清の投与により1匹のメスから最高で100個の卵子を採取できる“超”過排卵法。この方法には通常性成熟前のメスを使用する。2) 性成熟後のメスで超過排卵を行うと、得られる卵子数は発情周期に大きく影響されてしまう。性成熟後のメスで過排卵を行う場合は、プロゲステロンによる発情周期の同調と抗インヒビン抗血清の投与を併用する。これにより1匹のメスから60個程度の卵子を採取することができる。3) また、この発情周期同調法を用いることで、小さなメスコロニーから仮親や里親を効率よく準備することができる。4) 動物の施設間移動の際は、コストが高く逃亡や死亡のリスクもある生体での輸送に代わって、精巣上部尾部あるいは胚を冷蔵状態で輸送することができる。とりわけ精巣上部尾部の冷蔵輸送は、送り手側に発生工学の技術者がいない場合の生体輸送に代わる動物授受の手段として大変有用である。5) 大切な系統のオスが絶えそうになったら精巣上部尾部を摘出して精子凍結を行うのがよい。精巣上部尾部の摘出さえできればそこから精子を採取して凍結するのは比較的容易であり、発生工学を専門としない研究者でも実施可能である。いざという時のためにぜひ精子凍結をマスターしておきたい。6) 最後に紹介するのはトリプル CRISPR である。この

連絡先：平手良和 〒113-8510

東京都文京区湯島 1-5-45

TEL：03-5803-5783

FAX：03-5803-0373

E-mail：hirate.arc@cmn.tmd.ac.jp

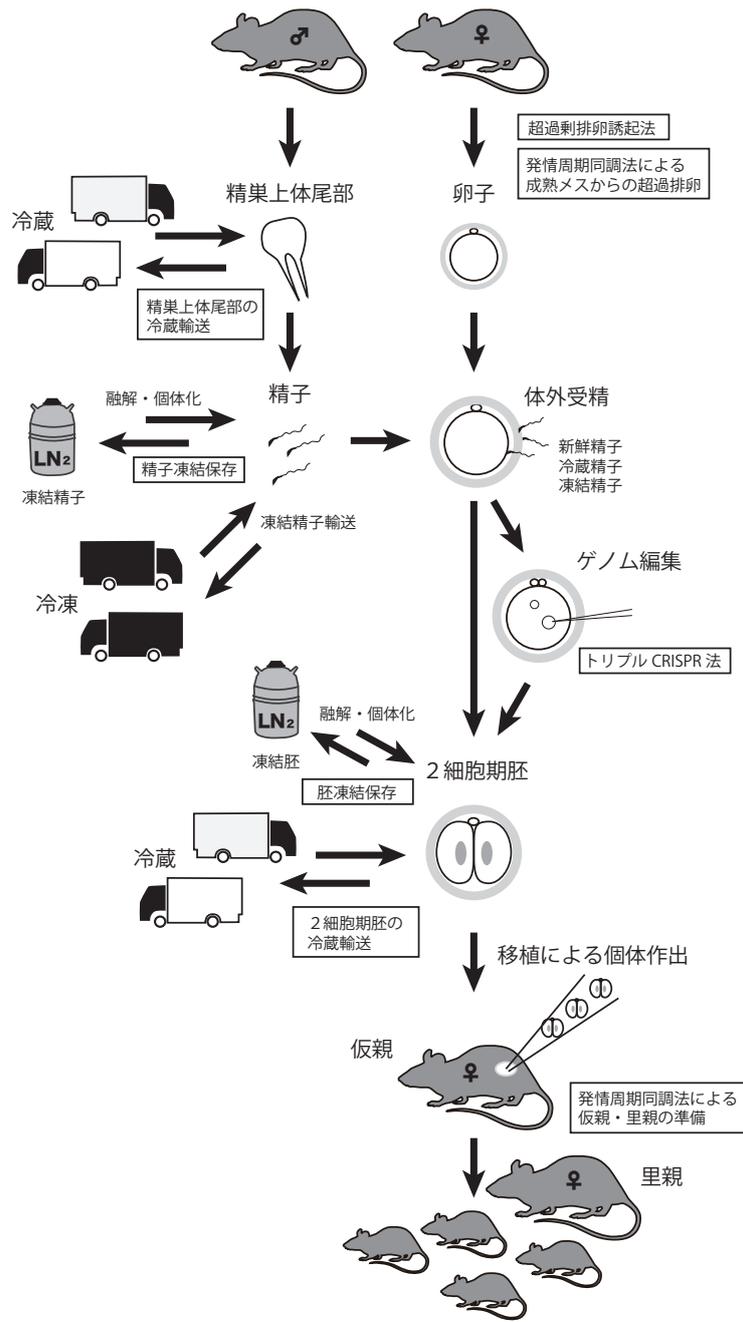


図. マウス発生工学図解

非常に効率の高いゲノム編集方法はインジェクションを行った個体 (F0 個体) で9割以上のノックアウトマウスを作出できるため、改変体のスクリーニングや繁殖という手間や時間をかけずに F0 個体を用いて実験を行うことができる。これらの新技術は、福祉的配慮の観点から供試動物数を大きく削減しつつ、解析に必要な個体を効率よく得るための手段の一つとして応用されている。これら新技術の恩恵を受けない手はない。本稿で紹介した技術の中に読者の研究に生かせそうなものがあればぜひ試してみてほしい。

2. 未成熟メスからの“超” 過剰排卵誘起法

過排卵法は内在性ホルモンと同様の作用を示すホル

モンを適切なタイミングで投与することにより過剰な排卵を誘発し、多くの卵子を得る方法である。過排卵処理によって得られた卵子を用いた体外受精 (in vitro fertilization, IVF) は発生工学技術の根幹をなすものであり、胚凍結も遺伝子改変マウス作製も卵子を得ることから始まる。したがって、過排卵法の改良は発生工学技術全体の底上げにつながる。1匹のメスから得られる卵子数を増やすことができればメスの使用数を削減できるので3Rの理念に適っているし、飼育スペースの縮小や経費節減にもつながる。

マウスの卵胞成熟は脳下垂体前葉から分泌される卵胞刺激ホルモン (FSH) の作用により促進され、同じく脳下垂体前葉から分泌される黄体形成ホルモン (LH) に

よって排卵が誘起される。これまで一般的に行われてきた過排卵法では、FSH 様の作用を示す妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG、eCG と呼ばれる) の投与により多数の卵胞を发育させ、LH 様の作用を示すヒト絨毛性腺刺激ホルモン (hCG) の投与により排卵を誘起して1匹の雌マウスから30個程度の成熟卵子を得ることができた。熊本大学動物資源開発研究施設(熊本大学CARD)の竹尾と中潟はFSHの分泌が发育卵胞中の顆粒膜細胞から放出されるインヒビンにより抑制されていることに着目し、PMSGと共に抗インヒビン抗血清を投与することで性成熟前のメス(4週齢)から最高で100個程度、従来の3~4倍の卵子数を得ることができる“超”過排卵誘起法を開発した^[1,2]。本法で使用する抗インヒビン抗血清とPMSGの混合液はCARD HyperOva[®]という商品名で九動株式会社(<http://www.kyudo.co.jp/>)から入手可能である。

1匹のメスから多くの卵子が得られることによるメリットは数多いが、とりわけトランスジェニックやノックアウトなどの遺伝子組換え系統をホモで維持しているとき、オスメスともホモの個体を使うことでホモの凍結胚を作製できることが大きな利点である。従来法でもホモ凍結胚の作製は原理的に可能であったが、3~4週齢のメスをまとまった匹数準備することが必要だったため実際に行うことは難しかった。それに対して過排卵法であれば、3~4週齢のメスが数匹いれば実施できる。従来の過排卵法ではメス親にオス親(組換え体)と同じ遺伝的背景をもつ野生型を用いるためIVFにより得られる凍結胚の遺伝子型は野生型またはヘテロとなる。それに対し、オス親だけでなくメス親もホモを用いて凍結胚を作製すれば、凍結胚はすべてホモとなる。凍結胚がヘテロの場合、実験に用いるホモ個体を得るには凍結胚から個体化したヘテロマウス同士の交配が必要となるが、ホモで凍結した場合は個体化したマウスをそのまま実験に用いることができ、時間を大幅に節約することができる。また、得られたホモのメス親とオス親からそれぞれ卵子と精子を採取してIVFを行い再びホモの凍結胚を作製したり、同一週齢のまとまった数のマウスが必要であれば、ホモ胚を複数の仮親に移植することで同一週齢のホモ個体の大きなコロニーを作ることにもできる。

3. 発情周期の同調による成熟メスからの過排卵誘起

前述のとおり性成熟前のメスで過排卵を行うことで1匹から100個の卵子を得ることができるが、この方法を性成熟後のメスで行った場合、PMSG-hCG投与の2倍(40個)程度の卵子しか得ることができない。理研バイオリソースセンター(理研BRC)の長谷川らは、性成熟後のメスを用いた過排卵処理では排卵数は発情周期に大きく影響されること、そして、発情後期で過排卵処理を行うことにより最大の卵子数(59±7個)が得られることを明らかにした^[3]。したがって、メスが発情後期のときに過排卵処理を行うとよいわけだが、マウスの発情周期を同調させる方法はなかったため、発情後期のメスを計画的に必要な数準備することは難し

かった。そこで長谷川らはプロゲステロンの投与によりモルモットの発情周期を同調できることに着目し、マウスにおいてプロゲステロン投与による同調を試みたところ、プロゲステロンを1日1回、2日間投与することにより投与開始から4日目には93%のメスが発情後期となることを見出した。このプロゲステロンによる発情周期同調と抗インヒビン抗血清による過排卵を組み合わせることで、性周期に影響されずに安定して62±5個の卵子を得ることができることを報告した^[3]。野生型の採卵であれば3~4週齢の野生型メスを購入することでいつでも過排卵処理ができるが、組換えマウスの場合にはそうはいかない。性成熟後のメスからでも安定して多くの卵子を得ることができるようになったことは想像以上に大きなメリットである。本法の具体的な投与スケジュールは以下の通りである。抗インヒビン抗血清は2日間投与するほうが多く採卵できるため、1日目と2日目にプロゲステロン投与、3日目と4日目に抗インヒビン抗血清の投与、6日目にhCGを投与するとその翌朝(7日目)に卵子を得ることができる。ここでひとつ注意して注意しておきたいことがある。性成熟前のメスの過排卵では抗インヒビン抗血清とPMSGの混合液(CARD HyperOva[®])が卵胞成熟促進に効果的だったが、性成熟後のメスで過排卵を行うときはPMSGの添加されていない抗インヒビン抗血清を用いる。抗インヒビン抗血清はセントラルリサーチ株式会社(<http://www.cr-c.co.jp/>)から購入可能である。

4. 発情周期同調による仮親コロニーサイズの縮小

凍結胚を個体化するには、凍結胚を融解して偽妊娠状態にある仮親の卵管への移植を行う。偽妊娠の仮親を準備するには、仮親用に維持しているICR等のマウス系統のコロニーから発情前期の状態にある個体を選び、精管結紮オスと交配させることで陰栓を付けさせ偽妊娠状態にさせる。1回の移植に2~3匹の偽妊娠メスを用いる場合、陰栓が付かないことも想定して5匹程度の発情前期メスを交配させるが、確実に発情前期の状態にあるメスを5匹用意するには仮親用のメスを多数飼育しておく必要がある。発情前期の状態にあるメスは外生殖器の赤みがかった色合いや状態を観察して選ぶが、発情前期であると確信が持てる個体は意外に少なく、多数のメスを飼育していないと必要な数を用意するのは難しい。マウスの発情周期は通常4~5日でまわるので、移植に必要とする個体数の4~5倍のメスを飼育していればよいと思うかもしれないが、実際にはその中から必要な数の発情前期のメスを見つけ出すことは困難である。また、仮親から帝王切開で産仔を得ることもしばしばであり、そうなることを想定して仮親に加え里親も用意しておく必要がある。

理研BRCの長谷川らは彼らが開発した発情周期同調法が仮親の準備にも効果的であることを明らかにした。彼らはICR系統のメスを用い、1日目、2日目にプロゲステロンを投与すると3日目に85%のメスは発情後期になり、4日目から精管結紮オスとの交配を開始すると

7日目に63%のメスに陰栓が確認できることを報告した^[4]。この陰栓率はプロゲステロン投与を行っていない仮親用のメスコロニーから発情前期のメスを選んで精管結紮オスと交配させた場合と同程度である。したがって、仮親用の大きなメスコロニーが用意できる施設であれば本法を行うことのメリットは感じられないが、大きなメスコロニーを用意することが困難な小規模施設では本法を導入することにより胚移植による凍結胚の個体化が可能となる。また、里親の準備にも本法を用いることができる。

5. 胚の凍結保存

胚の凍結保存はマウスの維持に要する経費、人的負担、および飼育スペースの削減に寄与するのはもちろんのこと、感染事故による系統の喪失や交配による遺伝的コンタミネーションなどのトラブルから系統を回復するためのリソースとして大変重要である。また、研究機関のあいだでマウスの授受を行うとき、生体の輸送に代わる手段として凍結胚での輸送が一般的になってきている。一般の研究者が凍結胚を取扱うことは少ないと思うが、輸送の際には取扱うことがあるかもしれない。そんなときに注意していただきたいのは、一般の研究者にとって細胞の凍結保存は馴染みがあるため、凍結胚を凍結細胞と同じように扱ってしまうことである。凍結細胞は-80℃でも保存できるタイプの保存液が市販されているが、凍結胚はたとえ一時的にでも-80℃で保管することはできず、液体窒素の液相または気相での保管となる。また、凍結胚を液体窒素タンクから出し入れする際はチューブの温度が上昇しないようデュワー瓶等に液体窒素を準備し、チューブを常に液体窒素で冷却しておくことが重要である。一時的であってもドライアイスでの保冷は行うべきではない。他機関から輸送されてきた貴重な凍結胚の取扱いが適切でなかったために、融解後に生存胚が得られなかったという泣くに泣けない事態もしばしば起きている。

凍結胚を適切に扱うためには凍結の原理について理解しておく必要がある。1985年にガラス化凍結法が開発されて以降はガラス化による急速凍結法が普及し、現在、国内のマウス胚凍結法の主流である熊本大学CARDの方法も理研BRCの方法も急速凍結法をベースとしている^[5,6]。急速凍結法で凍結された胚は過冷却状態にあり、細胞内の水はガラス化された状態となっている。したがって、ガラス転移温度(-130℃付近)より高い温度では脱ガラス化してしまうため細胞内に氷晶が形成されて胚は死んでしまう。ドライアイスや-80℃フリーザーで保管された凍結胚から生存胚が得られないのはそのためである。そのため凍結胚は必ず液体窒素タンクで保管する。また、凍結胚を輸送する際はドライシッパーと呼ばれる輸送容器を用いる。ドライシッパーを使用することで液体窒素の気相で-150℃以下の超低温中の試料を輸送できる。輸送中の温度を記録できる温度データロガーがあるとよい。

一般の研究者が胚凍結を行うのは少しハードルが高

いが、熊本大学CARDの胚凍結法で使用する試薬はアーク・リソース株式会社(<http://www.ark-resource.co.jp/>)から市販されており、発生工学に不慣れな研究者でも比較的容易に胚凍結を行うことができる。胚凍結を行う際は、試し起し用の10~20個の胚入りの凍結チューブを1本用意しておき、1週間程度液体窒素タンクで保管した後に融解して、*in vitro*で胚盤胞まで発生することを確認しておく。

6. 精子の凍結保存

胚凍結と並んでマウスの系統保存に用いられるのが精子凍結である。以前はC57BL/6背景の精子は凍結に弱く実用的ではなかったが、凍結技術自体の改良に加え、凍結精子を用いたIVFの改良により実用レベルになった。精子凍結およびIVFは熊本大学CARDの方法が優れており、必要な試薬は九動株式会社から購入することが可能である。

マウス精子の凍結保存は発生工学施設でなくても実施可能であり、一般の研究者にもぜひ挑戦していただきたい。精子凍結をマスターしておけば、大切な系統が絶えてしまいそうなき、オスの精巢上体尾部を摘出してそこから採精した精子を凍結保存することで系統回復の望みを残すことができるし、他機関の研究者からマウス系統分与のリクエストがあったときに凍結精子を輸送することで迅速に対応できる。精巢上体尾部の摘出方法や精子凍結の手順は後述する熊本大学CARDのウェブサイトですく詳しく解説されているのでそちらを参照されたい。

7. 精巢上体尾部および胚の冷蔵輸送

他機関の研究者からマウス系統分与のリクエストがあったとき、生体での輸送は費用が高額であるうえに、輸送中のマウスの逃亡や死亡のリスクがある。また微生物学的統御の観点から生体での搬入が拒否されることもある。凍結胚や凍結精子での輸送によりこれらの問題の大半は解決するが、輸送にはドライシッパーを用いるため、その返却を考えると往復分の輸送費がかかってしまうところが難点である。この問題を解決したのが熊本大学CARDが開発した精巢上体尾部の冷蔵輸送法である^[7]。この方法では精巢上体尾部をクール宅急便で輸送することができるので大変割安である。冷蔵輸送された精巢上体尾部から精子を採取することで最大72時間はIVFが可能である。精子の前培養にはFERTIUP[®]・精子前培養培地を使用し、IVFにはCARD MEDIUM[®]高性能体外受精用培地を使用することで十分な数の受精卵を得ることができる。どちらの試薬も九動株式会社から入手することができる。冷蔵輸送は近距離であれば研究者自らがアイスボックス中で保冷しながら輸送することもできるが、長距離であればクール宅急便を利用する。必要な物品一式はCARD冷蔵輸送キットとして九動株式会社から市販されているので簡単に揃えることができる。冷蔵輸送のメリットは、一般的なクール宅急便で良いため輸送費が割安であること、またマウスに輸送ストレスを与えないということに加え、送り手側は

精巢上体尾部を摘出するだけでよく、発生工学技術を有していない施設からでも輸送可能であることである。デメリットとしては、冷蔵精子の IVF は系統によっては受精率が低く、十分な数の受精卵が得られない可能性があることである。こういった問題が懸念されるときは 2 細胞期胚の冷蔵輸送を検討する^[8]。2 細胞期胚も CARD 冷蔵輸送キットを使用することでクール宅急便で冷蔵輸送できる。

8. トリプル CRISPR

遺伝子改変マウスの作製は発生工学の基盤をなす技術の一つであるが、近年のゲノム編集技術とりわけ CRISPR/Cas9 システムの普及により胚性幹細胞 (ES 細胞) での遺伝子組換えを行うことなく遺伝子改変マウスを作製できるようになった。CRISPR/Cas9 システムはガイド RNA (gRNA) と Cas9 ヌクレアーゼの複合体が gRNA と相同なゲノム配列に結合して DNA を二本鎖切断し、その切断部位が修復される際に生じる欠失・挿入により変異を生じさせる^[9]。大変便利な方法であるが、従来の CRISPR/Cas9 によるゲノム編集効率は良くても 60~80% 程度であり改良の余地が残されていた。理研生命システム研究センターの砂川らは、コンピューターモデルにより一つの標的配列に対する gRNA を高濃度で作用させるより、一つの遺伝子について異なる複数の gRNA を作用させるほうがゲノム編集効率の高いことを見出した。実際、一つの遺伝子に対して 3 種類の gRNA を同時に作用させると 90% 以上の効率でノックアウトマウスを作製できることが分かり、これをトリプル CRISPR 法と命名した^[10]。2 種類の gRNA を作用させる従来法の場合、ホモ個体を得るにはインジェクションを行った胚由来のマウス (F0 世代マウス) を数回交配させる必要があり、インジェクションから解析まで半年以上の時間を要していたが、トリプル CRISPR 法は F0 世代で解析できるので圧倒的に早い。また、このノックアウト効率の高さのおかげで 2 つの遺伝子を同時にノックアウトする場合でも、計算上では 80% 以上の効率で作製できると期待される。大変ありがたいことに、この高効率なトリプル CRISPR 法で使用する gRNA はマウス全遺伝子に対してデザインされており、その配列をウェブサイト (<http://crispr.riken.jp/>) で検索することができる。トリプル CRISPR は技術的には既存の CRISPR/Cas9 の延長線上にあり目新しさはないが、変異体解析に要する時間を圧倒的に短縮したことのインパクトは大きく、今後のマウス変異体作製のスタンダードになりうる方法だと思われる。

9. 終わりに

日本のマウス発生工学技術はマウスのバイオリソース拠点である熊本大学 CARD と理研 BRC が中心となって精力的に開発が進められてきた。彼らの素晴らしい点は技術開発を行うだけでなく、それを普及させるための技術研修を行っているところである。新技術を導入したいが壁を感じてなかなか手が出せないでいるようなら、

ぜひ技術研修に参加することをお勧めする。すでに発生工学技術をお持ちの方であれば、熊本大学 CARD のウェブサイト“CARD マウス生殖工学技術マニュアル” (<http://card.medic.kumamoto-u.ac.jp/card/japanese/manual/index.html>) を参考にするとよい。非常に分かりやすいイラストや動画と簡潔な説明のおかげで難なく新技術をマスターすることができるだろう。この秀逸なマニュアルに加え、熊本大学 CARD が開発した発生工学試薬は九動株式会社あるいはアーク・リソース株式会社から市販されているので、これを利用することで容易に新技術を導入できる。

本稿で発生工学技術の最新技術をまとめてみて、技術の完成度の高さに改めて目を見張る思いであった。動物実験は 3R の原則に則って実施されなければならないが、発生工学の新技術は 3R のうちの Refinement (改善) にあたるし、これによって使用動物数の Reduction (削減) を実現している。Replacement (代替) を進めるのは難しいと思っているのは古い世代の悲しい性で、新しい人たちはコンピューターモデルでトリプル CRISPR を開発して世界をリードする研究に邁進している。各研究機関の実験動物施設の技術者はぜひ貪欲に新技術に挑戦し、その恩恵を利用者に還元してほしい。本稿では 7 つの新技術を紹介したが、紙面の制約の関係で紹介できなかった新技術がほかにもまだまだたくさんある。発生工学技術の発展にたゆまぬ努力を続けているすべての研究者に敬意を表したい。

謝辞

素敵なマウスのイラストを作成くださった理研生命機能科学研究センターの高瀬比菜子研究員と、本稿を通読し有益なアドバイスをくださった東京医科歯科大学疾患モデル動物解析学分野の鈴木仁美助教に感謝申し上げます。

参考文献

- 1 Takeo T and Nakagata N. Superovulation using the combined administration of inhibin antiserum and equine chorionic gonadotropin increases the number of ovulated oocytes in C57BL/6 female mice. *PLoS one* 10: e0128330. 2015.
- 2 Takeo T and Nakagata N. Immunotherapy using inhibin antiserum enhanced the efficacy of equine chorionic gonadotropin on superovulation in major inbred and outbred mice strains. *Theriogenology* 86: 1341-1346. 2016.
- 3 Hasegawa A, Mochida A, Inoue H, *et al.* High-Yield Superovulation in Adult Mice by Anti-Inhibin Serum Treatment Combined with Estrous Cycle Synchronization. *Biol reprod* 94: 21. 2016.
- 4 Hasegawa A, Mochida A, Ogonuki N, *et al.* Efficient and scheduled production of pseudopregnant female mice for embryo transfer by estrous cycle synchronization. *J reprod dev* 63:

- 539-545. 2017.
- 5 Nakao K, Nakagata N, and Katsuki M. Simple and efficient vitrification procedure for cryopreservation of mouse embryos. *Exp Anim* 46: 231-234. 1997.
 - 6 Mochida K, Hasegawa A, Li MW, *et al.* High osmolality vitrification: a new method for the simple and temperature-permissive cryopreservation of mouse embryos. *PloS one* 8: e49316. 2013.
 - 7 Takeo T, Tsutsumi A, Omaru T, *et al.* Establishment of a transport system for mouse epididymal sperm at refrigerated temperatures. *Cryobiology* 65: 163-168. 2012.
 - 8 Takeo T, Kaneko T, Haruguchi Y, *et al.* Birth of mice from vitrified/warmed 2-cell embryos transported at a cold temperature. *Cryobiology* 58: 196-202. 2009.
 - 9 山本 卓. ゲノム編集入門: ZFN・TALEN・CRISPR-Cas9. 裳華房 2016.
 - 10 Sunagawa GA, Sumiyama K, Ukai-Tadenuma M, *et al.* Mammalian Reverse Genetics without Crossing Reveals Nr3a as a Short-Sleeper Gene. *Cell reports* 14: 662-677. 2016.

Technological innovation in mouse developmental engineering

Yoshikazu Hirate

Center for Experimental Animals, Tokyo Medical and Dental University

Abstract

The mouse is a classical and valuable laboratory animal. Certainly, mice are used continuously as a representative mammalian model organism in various fields of medical research. In parallel to the history of mice as laboratory animals, developmental engineering techniques have progressed significantly and have further supported their usefulness. Recently, developmental engineering supported an advancement in genome editing techniques. In this review, I describe the recent progress made in the developmental engineering of mice. The techniques I have selected are ultra-superovulation, synchronization of the estrus cycle, cryopreservation of embryos and spermatozoa, transportation of cauda epididymis and 2-cell embryos at a cold temperature (4-8 °C), and triple CRISPR. These innovative techniques promote the production of genetically modified mice, improve the reliability of freezing stocks of mice strains, and increase transportation options. These techniques are highly sophisticated, but easier to conduct than ever before. Technicians engaged in developmental engineering would benefit from learning these modern techniques, as they would give benefit to the researchers in their institution. These modern techniques push mouse research to a higher level.

Keywords : ultra-superovulation, synchronization of estrus cycle, cryopreservation, transportation at a cold temperature; triple CRISPR

【総説】

遺伝子改変を可能とする発生工学技術の歴史と進展

徳永 暁憲

福井大学ライフサイエンス支援センター・生物資源部門

要約

発生工学技術の進展に伴い、細胞のみならず生体レベルで遺伝子機能を解析する事が可能となり、これまでは主に遺伝子ターゲティング法を用いた遺伝子改変マウスの作出を通じて生体恒常性や疾患に関わる個々の遺伝子に関する機能の検証が進められてきた。しかしながら、従来法では胚性幹細胞（ES細胞）での相同組換えおよびES細胞由来のキメラマウスの産出が必要となるため、生体リソースでの研究はマウスなど一部の生物種に限定されていた。近年のCRISPR/Cas9を利用したゲノム編集技術の登場によってその様相は一変し、生物種や細胞種を問わず遺伝学的解析が可能となったことで、発生・老化研究などの生体を対象とする生命科学研究分野において革新的な技術展開が予想されている。また食料品の品種改良や資源エネルギーなど幅広い分野への技術応用も期待されており、本稿ではこれまで発生工学技術がどのようなブレイクスルーを通して発展してきたのかその歴史を概説すると共に、様々な研究分野において今後の貢献が期待される最新のゲノム改変技術を紹介する。

キーワード：TALEN、CRISPR/Cas9、相同組換え、非相同末端結合、マイクロホモロジー媒介末端結合

1. はじめに

ゲノム編集技術の登場により、これまで特定の生物種に限定されていた遺伝子改変操作が微生物、昆虫および動植物を含む様々な生物種において利用可能となったことで非モデル動物での新たな研究の可能性が開かれた。特にCRISPR/Cas9によるゲノム編集では遺伝子改変に伴う煩雑な操作が大幅に簡略化されたことで、多くの研究者にとって身近なツールとなり急速に普及している。最近では遺伝子の欠損や置換だけでなく染色体レベルでのゲノム編集（大規模欠損や転座など）の報告もなされており、その発展は目覚ましい。本稿では、これまでに発生工学研究が幾つものブレイクスルーを経て進展してきたその歴史を振り返りつつ、近年の実用的なゲノム編集技術基盤について概説する。また、後半では様々な研究分野での貢献が期待される最新の遺伝子改変動物の作

出法についてその動向を紹介したい。

2. これまでの遺伝子組換えマウス作出法としての発生工学研究

ヒトゲノムプロジェクトの完了が2003年に宣言され、またその後には次世代高速シーケンサーの開発も伴ってゲノムの解読能力が飛躍的に向上した。そのため現在までにヒトを含む多様な生物種の遺伝子配列情報が明らかとなっている。加えて生物種間で見られるゲノム多様性やヒト疾患関連遺伝子に関する情報も蓄積されつつあり、今世紀に入って遺伝子機能や形質を理解するためのポストゲノム研究が精力的に進められている。しかし特定の遺伝子異常と生体で生じる病態との相関関係を遺伝子配列の一次情報から解明することは容易では無く、その解明には特定の遺伝子配列を人為的に操作して細胞や個体レベルで解析を進める必要がある。そのため遺伝学的アプローチを可能とする発生工学技術は、発生や老化研究など生体レベルでの遺伝子機能を解析する上で極めて重要なツールと位置付けられ進展してきた。

発生工学の基盤となる技術は1980年代に確立され、1989年にCapecchiらがES細胞を用いた遺伝子改変マウスの作製を成功させたことが最初のブレイクスルーとなり^[1]、汎用性の高いマウスを主要なモデル生物とし

連絡先：徳永暁憲 〒910-1193

福井県吉田郡永平寺町松岡下合月23-3

TEL：0776-61-8427

FAX：0776-61-8124

E-mail：aktoku@u-fukui.ac.jp

て発展してきた (図 1 a)。従来の遺伝子組換え技術では胚形成に寄与する ES 細胞の樹立ならびに変異 ES 細胞株に由来するキメラマウスの作製が必須であったが、当初は 129 系統の特殊なマウス ES 細胞以外から遺伝子改変動物を作成することが難しく 129 系統と C57BL/6 系統との交雑系として研究に利用されていた。遺伝子背景の均一化が必要な研究課題では数世代に渡る戻し交配を行うなど個体の作製および解析に年単位の期間を要していた。しかしその後 2006 年に報告された iPS 細胞の登場によって幹細胞研究が急速に進展したことで C57BL/6 系統由来の ES 細胞株 (JM8 など) が複数樹立され^[2]、近年では数ヶ月単位で遺伝子背景が均一なマウス系統を作製することが可能となっている。

2010 年代に入って米国 National Institutes of Health (NIH) と欧州 Sanger Institute を中心に国際ノックアウトマウスコンソーシアム (International Knockout Mouse Consortium : IKMC) が立ち上がり、各遺伝子の Targeting vector (約 25,000 遺伝子) および変異 ES 細胞株 (約 20,000 遺伝子) の作製が精力的に進められた。現在は 2011 年に発足した国際マウス表現型解析コンソーシアム (International Mouse Phenotyping Consortium : IMPC) へと業務が引継がれ、基礎医学や創薬研究に役立てることを目的として国際的な基準に基づいた表現型解析が行われている。既に 5,000 系統近くのノックアウトマウスの表現型が報告されており 2021 年を目処に遺伝子機能カタログの作成が進められている^[3]。IMPC のサイトでは有用な遺伝子情報が公開されており、新たに遺伝子改変マウスを作製する際には是非本サイトを参考にして頂きたい (www.mousephenotype.org)。

この様に ES 細胞およびキメラマウスを経て作出される遺伝子改変動物は有用なツールとして利用されてきた一方で、生殖系列に寄与する ES 細胞の取扱いには煩雑な手間を要し、キメラマウスの作出にはマニピレーターなどの設備環境が必要となるなど作製上の制約も多かった。そのため一般の研究ツールとしては敷居の高いものとなっていた。加えて最近ではマウスで得られる解析結果がヒトの病態を反映しないケースも散見され、糖尿病やアルツハイマー型認知症など発症メカニズムが未だ不明な疾患の場合、単一遺伝子変異だけで手間と時間を要する本手法で病態を再現することは困難であった。またヒトとマウス間で異なる分子機構が働くケースも想定され、近年では霊長類など新たなモデル動物の利用も求められており従来のジーンターゲット法に代わる遺伝子組換え法が望まれていた。

3. ゲノム編集技術の登場

1) 人工ヌクレアーゼ ZFN (Zinc Finger Nuclease)

従来の遺伝子改変法に代わる革新的な技術として 1996 年に報告されたのが ZFN によるゲノム編集法である^[4]。この新技術の出現は、発生工学技術が現在の形まで進展する上での大きなブレイクスルーとなっている。これまでに DNA 二本鎖切断 (double-strand

break : DSB) が生じた際にはゲノム修復機構が誘導され遺伝子変異が促進されることが知られていた。そのため特定の遺伝子領域を人為的に切断する事が出来れば遺伝子欠損が可能となるという概念に基づきゲノム編集技術は開発された。ZFN は複数の ZF モチーフに制限酵素 FokI のヌクレアーゼドメインを融合させた構造からなり 28 アミノ酸の各 ZF モジュールが 3 塩基配列に対応し、複数の ZF モジュールを連結させる事で目的の遺伝子配列を認識する事が出来る (図 1 b)。ES 細胞を用いた従来の遺伝子改変法と異なり ZFN によるゲノム編集法は細胞種、動物種を問わずに利用出来る利点がある一方、連結した ZF モジュールが互いに干渉し DNA 配列の認識特異性が変化してしまうため配列に対応する ZF モジュールを予測して構築する事が困難であり機能的な ZFN の構築に極めて煩雑な作業を要するという欠点があった。加えてコマーシャルベースの価格が非常に高額であったため注目を浴びたが一般的な技術として普及するには至らなかった。

2) TALEN (transcription activator-like effector nuclease)

ZFN の報告から 10 年以上の期間を経て、汎用型の第二世代として登場したのが 2010 年に報告された TALEN である^[5]。TALEN はキサントモナス属の細菌由来の TALE ヌクレアーゼを改変したシステムで概念的には ZFN を踏襲しており、ATGC の各ヌクレオチドを認識する 34 アミノ酸からなる TALE モジュール部分が DNA 結合ドメインとして働き ZFN と同様に FokI ヌクレアーゼを付加させた融合タンパクから成る (図 1 c)。TALE は ZFN の問題点を見事にクリアしており各モジュール同士の干渉が少なく目的配列に対応する TALE を構築する事が出来るようになった^[6]。TALEN を用いたゲノム編集技術は実用性の高い技術として認知され、現在 Addgene などでアカデミア向けにマテリアルが配布されており多少の分子生物学的経験があれば誰もが簡単に自作して研究に用いることが可能となっている (www.addgene.org/genome-engineering/)。TALEN 法は 2 量体を形成することで二本鎖 DNA の切断活性を発揮するため高い特異性を有する反面、目的の配列に対応したモジュールを設計・構築するには一定の労力が必要とされ依然として利便性の面での課題は残されていた。

3) CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat)

ZFN や TALEN と異なる簡便な手法として登場したのが第三世代となる CRISPR-Cas9 システムである^[7]。高い特異性を示す TALEN 法にも利点はあるが、CRISPR/Cas9 の持つ利便性・汎用性の高さから瞬く間に普及し現在ではゲノム編集技術の主流となっている。CRISPR/Cas9 システムは原核生物のもつ外来 DNA の排除機構を応用したもので、元々はファージなど細胞内に侵入した外来 DNA に対する防御機構として機能する。まず

Cas タンパク質群の働きによって外来 DNA がゲノム上の CRISPR 領域に取り込まれ、その後同領域から転写された単鎖 CRISPR RNA (crRNA) とトランス活性化型 crRNA (tracrRNA) が Cas9 タンパク質と複合体を形成し相補的な外来 DNA を認識して切断・排除する。Cas9 タンパク質は RNA 依存性 DNA エンドヌクレアーゼであり、PAM (protospacer adjacent motif) 配列を認識して結合した Cas9 が二本鎖 DNA を開裂し、HNH ドメインおよび RuvC ドメインの持つヌクレアーゼ活性によって相補鎖および非相補鎖の切断がそれぞれ誘導される (図 1 d) ^[8,9,10]。CRISPR/Cas9 による遺伝子改変は 2012 年に発表され ^[11,12]、翌 2013 年に受精卵上でのゲノム編集が報告されてから僅か 5 年足らずだが ^[13,14]、CRISPR に関連する論文は既に 10,000 報近くに達していることからゲノム編集技術が多くの研究者にとって身近な技術となったことを示している。CRISPR/Cas9 によるゲノム編集では crRNA と tracrRNA を人工的に繋いだガイド RNA (gRNA) と Cas9 タンパク質を細胞に共導入するだけでゲノム DNA を配列特異的に切断できる。この簡便さが広く利用されている理由であろう。これまで変異導入効率に違いは見られるものの様々な細胞や生物で CRISPR/Cas9 により遺伝子変異を導入した報告がなされ、また驚異的なスピードで技術革新が進んでおり遺伝子組換えマウスを始めとする個体レベルでの研究の様相と進展スピードを一変させつつある。最近の報告では CRISPR/Cas9 を用いる際に非相同末端結合 (non-homologous end joining : NHEJ) の選択的阻害剤 SCR7 を加えることで相同組換え効率が数倍まで促進されることも明らかとなっている ^[15,16]。SCR7 は DSB の修

復に働く Ligase IV の活性をブロックすることで NHEJ 経路を阻害し、結果として CRISPR-Cas9 システムが介在する相同組換え (HDR) 効率を改善するようだ。他にも小分子 L755,507 でも同様の効果が得られる事が報告されており ^[17]、これらの小分子の毒性が低く多様な細胞種に適用できることから、鋳型 DNA を介する遺伝子挿入や一本鎖オリゴヌクレオチド (ssODN) を介する SNPs 編集の効率促進に利用できる有用なツールと期待されている。このように次々に新たな手法が報告されている段階であり、今後のスタンダードとなる手法が確立されるまでは有用な改良技術を自らの研究に積極的に取り入れていく姿勢が重要であろう。

4. 多彩な改変技術の開発

生体モデルでの遺伝子欠損に関し、既に CRISPR システムで十分な成果が挙がってきており、現在は GFP などのカセットの挿入や大きな遺伝子断片の効率的な挿入法の開発が課題となっている。例えば Exon 部を挟んで 2 箇所に loxp 配列の挿入を必要とする flox マウスの作成効率は 1 割程度と低く ^[13,14]、所謂コンディショナルノックアウト動物の簡便な作出法の開発が精力的に進められてきている。次では最近報告された有用な遺伝子挿入 (ノックイン) 法を幾つか紹介する。

1) 相同組換え効率を高めたノックイン手法

切断された DNA 部位は NHEJ により速やかに修復されるが、その際に DNA 変異が導入されることで遺伝子破壊が引き起こされる。また切断部位の修復時にドナー DNA を導入しておくことで相同組換え (homology-

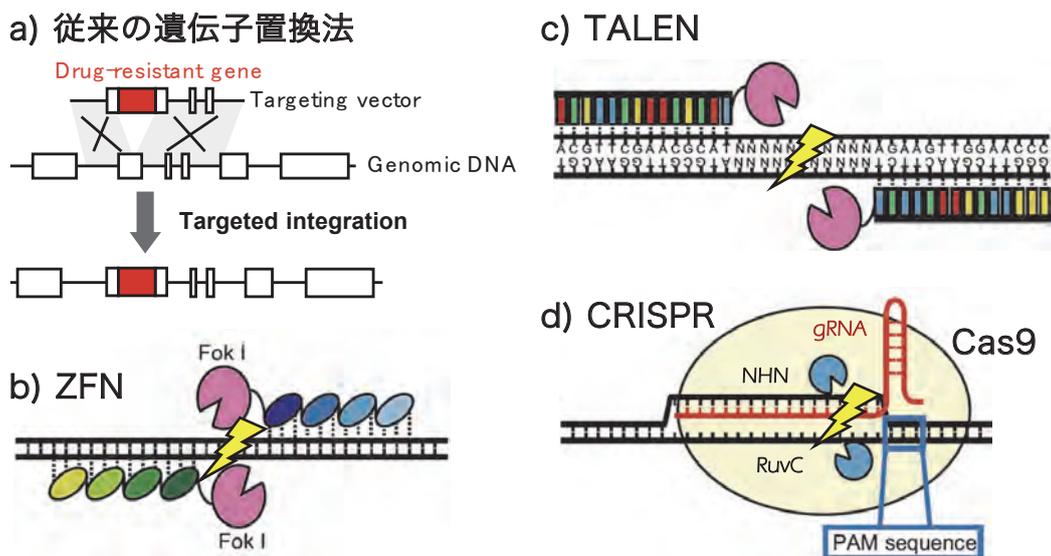


図 1 : 従来の遺伝子置換法および人工制限酵素 ZFN, TALEN, CRISPR の模式図

- 遺伝子置換法：両端に標的遺伝子座と相同な領域を持つターゲティングベクターを構築し、薬剤耐性遺伝子 (赤色) の発現を指標に相同組換え ES 細胞株を同定する。
- ZFN：1 モジュール毎に 3 塩基を認識する。2 量体を形成し標的部位を切断する。
- TALEN：1 モジュール毎に 1 塩基を認識する。2 量体を形成し標的部位を切断する。
- CRISPR/Cas9 システム：gRNA により相補的な DNA 配列を認識し切断する。HNH ドメインが gRNA と相補的な DNA 鎖を切断するのに対し RuvC ドメインは非相補的 DNA 鎖を切断する。(文献 7 より改変)

directed repair : HDR) により 1~数十塩基の DNA 配列を容易にノックインすることも可能となっている (図 2 a)。受精卵上では数百塩基以上のプラスミド DNA をノックインすることは HDR の活性が低いこともあり困難であったが、その後の解析から二本鎖 DNA に比べ ssODN の導入効率が高いことが示され、現在はドナー DNA として ssODN を導入する手法の効率が良いとされている。しかしながら ssODN は 200 塩基程度までしか合成できず大きな DNA 配列を ssODN でノックインすることは出来ていなかった。2016 年に吉見らが報告した 2 ヒット 2 オリゴ法 (2H2OP 法) では CRISPR/Cas9 システムにより標的部位を切断し、更に ssODN を繋ぎ目に利用する事で 5.5 キロ塩基の CAG-GFP カセットを標的部位へ効率的にノックインする事に成功している^[18]。2H2OP 法を利用することでそれまで不可能であった BAC プラスミド (~数百キロ塩基) のノックインや複数の遺伝子を含む DNA 領域の置換なども可能になり、現在ではマウス遺伝子をヒト遺伝子に置換する「ヒト化動物」の作製も可能となってきている。また長鎖の一本鎖 DNA (lsODN) の作製方法も新たに開発され、lsODN をドナー DNA として利用することで GFP などの遺伝子を効率的かつ正確にノックインすることが報告された^[18]。lsODN を用いた改良法としてその後報告された CLICK 法では flox マウス (条件付きノックアウトマウス) を作製するための置換カセット全体を lsODN にて行っており導入効率が更に改善されている^[19]。

2) 2-Step Electroporation 法

また上記と異なる方法で flox マウスの作成上での問題点を解決した画期的な方法が 2017 年に報告されている^[20]。flox マウスを作製するためにはエクソンの両端の 2 箇所を loxp サイトを挿入する必要があり、そのため ssODN を用いる場合は 2 箇所を CRISPR/Cas9 システムで切断し、おのおのに相補的な配列に loxp 配列を持つオリゴ DNA をノックインする手順となる。ssODN を用いる利点として、受精卵での CRISPR/Cas9 によるゲノム編集に関して長鎖 2 本鎖 DNA と比べ ssODN は格段にノックイン効率が高い事が挙げられる。しかし従来の方法で受精卵に導入しても、ゲノムの近接 2 箇所が切られた後にその間の染色体欠失が起こってしまい 2 箇所の置換を伴う flox マウスを得ることは非常に困難であった。この問題点を解決するため 2-Step 法では 2 箇所の loxp 配列を一度に挿入するのではなく、1 箇所ずつ段階的に loxp 配列を挿入することで欠失を避けるというシンプルな原理に基づいている。受精卵の 1 細胞期と 2 細胞期の 2 階的に分けて ssODN を導入する事で染色体欠失が減少し、少ないながら flox マウスを得ることができている。しかしながらマイクロインジェクションでの導入では 2 度の胚操作によるダメージから産仔の数が少ないなどの問題が生じたため、よりダメージが少ない電圧ポレーション法を用いることで生存率と flox マウス作製効率が大幅に上昇し、flox マウス

を効率良く作製できることが示された。2STEP 法は電圧ポレーション法により Cas9 と gRNA および ssODN を導入するだけの極めて簡便な手法であるため、現時点では CLICK 法および 2-Step Electroporation 法による遺伝子導入が一般的かつ簡便な遺伝子改変動物の作出法として挙げられるだろう。

3) 煩雑なベクター構築を必要としないノックイン手法の開発

従来ノックインマウスを作成する上では煩雑なターゲットベクターの作成が必要であったが、この点を簡略化したのがマイクロホモロジー媒介末端結合修復機構 (MMEJ) を利用した PITCh (Precise Integration into Target Chromosome) 法である^[21]。通常は相同組換えを介して遺伝子ノックインが行われるが相同領域を含むターゲットベクターの構築には一定の労力が必要であり、生物種によっては HDR 活性が低いことから導入が困難なケースが知られていた。PITCh 法は MMEJ による新たな遺伝子ノックイン技術を利用している。遺伝子挿入の際に切断末端と重複する配列を 20 塩基程度付加するだけで外来ドナー DNA を一定の確率で挿入することができる (図 2 b)。PITCh 法による遺伝子挿入はヒト細胞にも適用できることが実証されており、特に HDR 活性の低い生物種などでの応用が期待される。

4) 非分裂細胞でのノックインを可能とする HITI 法

現在の CRISPR の急速な進歩にもかかわらず、成体組織を構成する非分裂細胞に対してゲノム標的部位に外来遺伝子を挿入することは未だに適用できていなかったが、これは遺伝子をノックインする際に利用される HDR 活性が分裂期 (S-G2 期) でのみ高く、増殖期にある細胞種での利用に限られる事に起因する。このことが基本的な生物学的原理の解明や広範な遺伝性疾患に対する治療法開発の障壁になっていたが、2016 年に NHEJ を利用した全く新しいノックイン手法として HITI (homology-independent targeted integration) 法が報告された^[22]。それまで非相同末端結合を利用した遺伝子ノックインの手法の報告は少なく、また挿入出来ても目的の遺伝子が順・逆両方向にランダムに挿入されるという欠点があり^[23]、NHEJ を応用したノックイン手法自体あまり検討されていなかった。HITI 法では導入する遺伝子配列の両端に gRNA の認識部位の一部を付加する事で、逆位で挿入された場合には再切断されるよう設計されており最終的に高い確率で準方向に遺伝子が挿入されるよう改良されている (図 2 c)。

HITI 法の特徴は相同組換えに伴う修復機構を必要とせずにノックインすることだが、HITI 法と相同組換えを利用した既存のノックイン手法と比較した結果、細胞種によっては HITI 法が明らかに高い効率でノックインされることが示された^[23,24]。また HITI 法により標的となる部位に挿入された約 90% の外来 DNA は末端が変異することがなく正確にゲノムに組み込まれていたことが

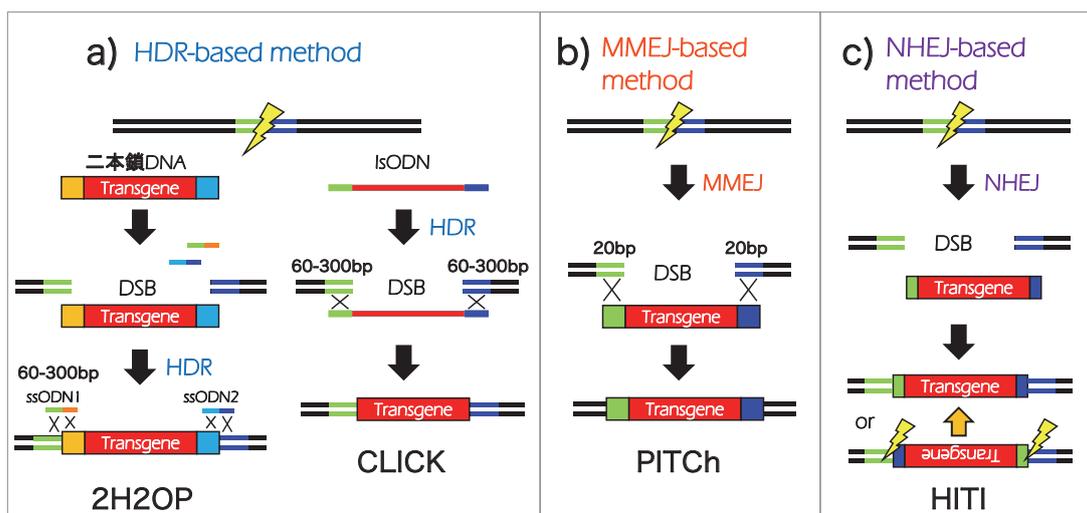


図2：遺伝子ノックイン法の概略図

CRISPR/Cas9 システムによる DNA 切断後、細胞内のインテグラーゼにより修復される。

- HDR 活性を利用した 2H2OP 法および CLICK 法では ssODN を用いており、従来よりも高効率なノックイン手法として広く利用される。
- MMEJ 機構を利用した PITCh 法では切断末端と重複する配列を 20 塩基程度付加することで一定の確率でノックインすることができ、HDR 活性の低い生物種などで利用される。
- NHEJ 機構を応用した HITI 法では従来は導入が困難であったニューロンなど非分裂細胞へのノックインが可能である。

ら NHEJ による修復機構を用いても正確にゲノムに組み込める可能性が示唆された。また一番の利点は HDR に依存した従来法では困難であったニューロンなど非分裂細胞への遺伝子挿入を可能とした点の特徴である。DNA 二本鎖切断の主要な修復機構の一つである NHEJ による修復は細胞周期を通して働くことから、HITI 法により分裂細胞および非分裂細胞の両方に対する高効率な DNA ノックイン手法が確立された。

以上の様に PITCh 法および HITI 法はベクター構築などに労力を必要とせず有用であるが、欠点は NHEJ を利用していることから挿入部位周辺に予期しない塩基欠損や挿入を伴う可能性があり今後の更なる手法改良が望まれる。また生体での遺伝子導入手法である子宮内エレクトロポレーション法やアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を組み合わせることで生体へ直接的に変異を導入する事も可能であるため^[25,26]、老齢動物などでの遺伝子改変に伴う表現型解析も可能となり、長期にわたる飼育・経過観察を必要とする老化・疾患研究の分野においてその利用が期待される。

5. 萌芽的ゲノム編集ツール

既に第四世代とも言える様々なヌクレアーゼを応用した新規のゲノム編集ツールも報告されてきている。CRISPR システムを利用している系としてヌクレアーゼ活性を消失させた変異 Cas9 タンパク質に脱アミノ化酵素デアミナーゼを連結させ、DNA 切断を伴わずに点変異のみを導入することの出来る Target-AID 法の開発や^[26]、RNA を対象に変異・切断を誘導する RNA リボヌクレアーゼ Cas13a/C2C2 による報告などがなされている^[27]。DNA の切断や分解を伴わない可逆的な技術であ

るためヒトでの遺伝子治療に向けて予期しないゲノム損傷リスクを避ける有効な手法として期待される。また変異 Cas9 タンパク質に FokI を融合させた Cas9-FokI を用いた報告では TALEN 同様に 2 量体で初めてヌクレアーゼ活性が獲得されるため特異性が高く、off-target 効果を低減できる CRISPR システムとなることが予想される^[28]。

TALEN や CRISPR システムを応用してゲノムの改変以外に遺伝子発現調節やエピジェネティック修飾を制御する試みも進められている。ヌクレアーゼ活性を持たない変異 Cas9 タンパク質に VP16,VP64 といった転写活性化ドメインを融合させる事で発現誘導が、また抑制ドメイン KRAB を融合させる事で目的遺伝子の発現抑制が可能である事が示されている^[29]。Tet-ON/OFF のシステムと組み合わせることで時期特異的な発現調節も可能であり、またエピジェネティック修飾の改変による表現型解析など今後の更なる解析が望まれる。その他、CRISPR と GFP などの蛍光分子と融合する事で染色体イメージングや FISH としての応用例も報告されている^[30]。

6. おわりに

本稿では、主に病態モデルなど生体解析を行う分野での利用が期待されるゲノム編集ツールに関して紹介を行った。現時点では CRISPR/Cas9 を利用したゲノム編集法が広く利用されているが、最近ではより小型の構造から成る Cpf1 (Cas12a) も報告され^[31]、更に実用的なシステムへと進んでいくことが予想される。マウス受精卵上でのゲノム編集効率を例にすると通常の遺伝子欠損や置換であれば既に十分実用的なレベルにあり、数年内

には外来遺伝子のノックインや flox マウスの作成に関しても先述の技術改良によって高頻度で遺伝子改変を導入出来る段階へと進んでゆくだろう。ゲノム編集技術が登場する数年前はノックアウトマウスの作出だけでも年単位の歳月を必要としていたが現在では1ヶ月足らずで遺伝子改変動物の作出が可能となっており、生体を用いた疾患研究に欠かせない基盤的技術となることは想像に難しくなく今後の更なる技術進展が楽しみである。

これまでコストや労力の面から実現出来なかった様々な研究が新たにスタートすることで医療分野でのゲノム編集治療、食品の改良や藻類を用いたバイオ燃料など多方面でのゲノム編集技術の応用の可能性が予感され、様々な分野へゲノム編集技術が広がって行くことで次なるブレイクスルーを生み出す起爆剤となることを期待したい。

参考文献

1. Capecchi MR. The new mouse genetics: Altering the genome by gene targeting. *Trends in Genetics*. 5: 70-76, 1989.
2. Pettitt SJ, Liang Q, Rairdan XY, et al. Agouti C57BL/6N embryonic stem cells for mouse genetic resources. *Nat Methods* 6 (7) : 493-495, 2009.
3. Meehan TF, Conte N, West DB, et al. Disease model discovery from 3,328 gene knockouts by The International Mouse Phenotyping Consortium. *Nat Genet*. 49 (8) : 1231-1238, 2017.
4. Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93 (3) : 1156-1160, 1996.
5. Christian M, Cermak T, Doyle EL. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*. 186 (2) : 757-761, 2010.
6. Miller JC, Tan S, Qiao G, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol*. 29 (2) : 143-148, 2011.
7. Tokunaga A, Anai H, Hanada K. Mechanisms of gene targeting in higher eukaryotes. *Cell Mol Life Sci*. 73 (3) : 523-533, 2016.
8. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 337 (6096) : 816-821, 2012.
9. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109 (39) : E2579-2586, 2012.
10. Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell* 156 (5) : 935-949, 2014.
11. Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339 (6121) : 819-823, 2013.
12. Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339 (6121) : 823-826, 2013.
13. Wang H, Yang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 153 (4) : 910-918, 2013.
14. Yang H, Wang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*. 154 (6) : 1370-1379, 2013.
15. Srivastava M, Nambiar M, Sharma S, et al. An inhibitor of nonhomologous end-joining abrogates double-strand break repair and impedes cancer progression. *Cell*. 151 (7) : 1474-1487, 2012.
16. Maruyama T, Dougan SK, Truttmann MC, et al. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nat Biotechnol*. 33 (5) : 538-542, 2015.
17. Li G, Zhang X, Zhong C, et al. Small molecules enhance CRISPR/Cas9-mediated homology-directed genome editing in primary cells. *Sci Rep*. 7 (1) : 8943, 2017.
18. Yoshimi K, Kunihiro Y, Kaneko T, et al. ssODN-mediated knock-in with CRISPR-Cas for large genomic regions in zygotes. *Nat Commun* 7 : 10431, 2016.
19. Miyasaka Y, Uno Y, Yoshimi K, et al., CLICK: one-step generation of conditional knockout mice. *BMC Genomics*. 19 (1) : 318, 2018.
20. Horii T, Morita S, Kimura M, et al. Efficient generation of conditional knockout mice via sequential introduction of lox sites. *Sci Rep*. 7 (1) : 7891, 2017.
21. Nakade S, Tsubota T, Sakane Y, et al. Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9. *Nat Commun* 5 : 5560, 2014.
22. Suzuki K, Tsunekawa Y, Hernandez-Benitez R, et al. In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature* 540 (7631) : 144-149, 2016.
23. Auer TO, Duroure K, De Cian A, et al. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated knock-in in zebrafish by homology-independent DNA repair. *Genome Res*. 24 (1) : 142-153, 2014.
24. Yao X, Wang X, Hu X, et al. Homology-mediated end joining-based targeted integration using CRISPR/Cas9. *Cell Res*. 27 (6) : 801-814, 2017.
25. Mikuni T, Nishiyama J, Sun Y, et al. High-

- Throughput, High-Resolution Mapping of Protein Localization in Mammalian Brain by In Vivo Genome Editing. *Cell* 165 (7) :1803-1817, 2016.
26. Nishida K, Arazoe T, Yachie N, et al., Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science*. 353 (6305) , pii : aaf8729, 2016.
 27. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*. 356 (6336) :438-442, 2017.
 28. Guilinger JP, Thompson DB, Liu DR. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. *Nat Biotechnol*. 32 (6) :577-582, 2014.
 29. Liao HK, Hatanaka F, Araoka T, et al. In Vivo Target Gene Activation via CRISPR/Cas9-Mediated Trans-epigenetic Modulation. *Cell* 171 (7) :1495-1507, 2017
 30. Batra R, Nelles DA, Pirie E, et al. Elimination of Toxic Microsatellite Repeat Expansion RNA by RNA-Targeting Cas9. *Cell*. 170 (5) :899-912, 2017.
 31. Yamada M, Watanabe Y, Gootenberg JS, et al. Crystal Structure of the Minimal Cas9 from *Campylobacter jejuni* Reveals the Molecular Diversity in the CRISPR-Cas9 Systems. *Mol Cell* 65 (6) :1109-1121, 2017.

History and application of genome editing technology.

Akinori Tokunaga

Division of Animal Resources, University of Fukui

Abstract

Targeted genome modifications using techniques that alter the genomic information of interest have contributed to multiple studies in both basic and applied biology. In gene targeting, the target-site integration of a targeting vector by homologous recombination is used. Mice carrying mutations in multiple genes are traditionally generated by sequential recombination in embryonic stem cells and time-consuming intercrossing of mice with a single mutation. However, this strategy has several technical problems. The first problem is the extremely low frequency of gene targeting, which makes obtaining recombinant clones an extremely labor-intensive task. The second issue is the limited number of biomaterials to which gene targeting can be applied. Traditional gene targeting hardly occurs in most of the cell lines. However, a new approach using designer nucleases that can introduce site-specific double-strand breaks in genomic DNAs has increased the efficiency of gene targeting in zygotes. This new method including CRISPR-Cas system is has also expanded the number of biomaterials to which gene targeting could be applied. Targeted integration of transgenes can be achieved by strategies based on homologous recombination (HR) , microhomology-mediated end joining (MMEJ) or non-homologous end joining (NHEJ) . Here, we summarize various strategies for target gene modification, including a comparison of traditional gene targeting with designer nucleases.

Keywords : TALEN, CRISPR-Cas, HDR, NHEJ, MMEJ

【奨励賞トピックス】

キイロショウジョウバエにおいて食餌制限は、dMyc を介して 腸管バリア機能維持と寿命延伸に寄与する

赤木 一考

国立長寿医療研究センター 研究所 組織恒常性研究プロジェクトチーム

はじめに

食餌制限 (Dietary restriction: DR) は、様々な動物で加齢性疾患の発症を遅らせることや寿命を延伸させることが明らかにされている^[1]。また、加齢に伴う腸管バリア機能の破綻は、無脊椎動物のみならず脊椎動物においても観察される。したがって、腸管バリア機能の維持は、健康寿命延伸のために重要な要素であると考えられる。ショウジョウバエでは、DR によって加齢に伴う腸管バリア機能の破綻が遅延できることが知られているが、その詳細なメカニズムは明らかにされていない。我々は、DR による腸管恒常性制御機構を解析する過程において、転写因子 dMyc が腸管バリア機能の維持に重要な役割を持つことを見出した。すなわち、腸細胞において dMyc の発現をノックダウンすると、アポトーシスの上昇に伴い腸管透過性が上昇することがわかった。ショウジョウバエの発生過程では、dMyc の発現レベルが低い細胞は、「細胞適応度 (cellular fitness)」が低い細胞と見なされ、アポトーシスによって除去されることが知られている^[2]。この現象は細胞競合と呼ばれているが、我々の解析によって、ショウジョウバエ成虫の腸管においても同様の現象が起こることが明らかになりつつある。本稿では、ショウジョウバエ腸管における Myc の役割について、筆者の最新の研究成果を紹介する。

Myc と老化

転写因子 Myc は、細胞増殖を強く促進することから、がん研究においてよく知られた因子である。一方で、Myc は老化制御の観点においても重要な因子の一つである。Myc の発現レベルが低下した *Myc* ハプロ不全マウス (*Myc*^{+/−}) では、組織恒常性や代謝調節など様々な側面での老化が遅延し、寿命が延伸することが明らかにされている^[3]。同様に、*Myc* ハプロ不全ショウジョウバエ (*dMyc*^{+/−}) においても、寿命が延伸することが知られている^[4] ことから、Myc の発現を低く保つことが寿命延伸のために重要であることが示唆されている。しかしながら、上述のマウスを用いた実験では、骨組織、

心臓、肝臓という特定の組織しか観察していない。さらに、ショウジョウバエを用いた最近の研究では、DR によって dMyc の発現が上昇し、免疫機能を高めるといった報告がなされている^[5]。したがって、Myc は栄養条件などの環境要因に対応し、異なる組織で異なる役割を持つことが考えられる。

興味深いことに、我々はショウジョウバエの腸管における dMyc の発現が、mRNA、タンパク質ともに加齢に伴い低下することを見出した。さらに、その発現低下は、DR によって抑制できることがわかった。そこで、成虫のショウジョウバエにおいて、Gal4-UAS システムを用いて腸管の分裂終了細胞 (Enteroblast: EB と Enterocyte: EC) のみで dMyc の発現を RNA 干渉によりノックダウンし、寿命への影響を調べた。その結果、腸管の分裂終了細胞特異的な dMyc の抑制によって、ショウジョウバエの寿命が短縮し、その影響は DR 条件下で顕著であることが明らかになった。したがって、DR による寿命延伸効果に腸管の dMyc 発現レベルが寄与していることが示唆された。

アポトーシスと腸管バリア機能

ショウジョウバエでは、腸管バリアの機能不全と個体の致死率に密接な相関関係があることが知られている^[6]。そこで我々は、腸管分裂終了細胞特異的な dMyc のノックダウンが腸透過性に与える影響について調べた。その結果、腸管で dMyc の発現を抑制した個体では、腸の透過性が上昇していることが明らかになった。さらに、それらの個体では、体液中に存在する細菌数が顕著に上昇しており、脂肪体 (肝臓に相同な組織) における抗菌ペプチドの発現も著しく上昇していることがわかった。したがって、腸管における dMyc のノックダウンによって、腸の透過性が上昇し、感染症を引き起こすことで寿命の短縮に繋がっていることが示唆された。

次に我々は、dMyc の抑制によって腸管の透過性が上昇する原因について調べた。上皮細胞におけるバリア機能の制御には、細胞膜上のトランスポーターを介する経細胞輸送 (transcellular pathway) とタイトジャンクションを介する傍細胞輸送 (paracellular pathway) が存在することが知られている^[7]。後者について、ショウジョウバエにおける細胞間接着は、哺乳類のタイトジャンクションに相同なセプテートジャンクション (septate junction) によって保たれている^[8]。まず我々は、腸管

連絡先：赤木一考 〒474-8511

愛知県大府市森岡町 7-430

TEL : 0562-44-5651 (内線 7988)

E-mail : kazuakg@ncgg.go.jp

分裂終了細胞特異的に *dMyc* の発現を抑制した個体において、セプテートジャンクション関連遺伝子群の発現を調べた。その結果、コントロールと比較して、それらの発現に顕著な差は見られなかった。一方で、*dMyc* の発現を抑制した個体では、腸管におけるサイトカイン (*Upd3*) の発現が上昇しており、腸幹細胞 (intestinal stem cell: ISC) の増殖も顕著に上昇していた。腸管の恒常性は、細胞死と幹細胞増殖のバランスによって成り立っているため、次に我々は、腸管の細胞死に注目して研究を行った。その結果、腸管分裂終了細胞特異的に *dMyc* の発現を抑制した個体では、腸管でのアポトーシスが上昇していることがわかった。さらに、*dMyc* の発現を抑制した個体にアポトーシス抑制因子 p35 を強制発現したところ、腸透過性の上昇が抑えられ、部分的ながら寿命の減少が回復した。これらのことから、腸管における *dMyc* のノックダウンによって観察された腸透過性の上昇は、アポトーシスの上昇によるものであることが示唆された。

Myc による腸細胞の適応度制御

ショウジョウバエにおける腸透過性は加齢依存的に上昇し、DR によってその上昇が遅延できることが明らかにされている^[9]。そして、そのメカニズムの一つとして、DR がセプテートジャンクション構成因子の加齢依存的な発現低下を抑制することが報告されている^[10]。一方で我々は、加齢に伴い腸管でのアポトーシスが頻発することと、DR によって腸管でのアポトーシスが抑制されることを見出した。このことは、腸管における加齢依存的な *dMyc* の発現低下と負に相関している。さらに、腸管分裂終了細胞特異的に RNA 干渉によって *dMyc* の発現を低下させることでアポトーシスの上昇が観察されたことから、*dMyc* は腸細胞の適応度を規定するパラメーターとして働いている可能性が考えられた。

興味深いことに、ショウジョウバエの発生過程においては、*dMyc* の発現レベルが周囲に比べて低い細胞は、アポトーシスによって除去されることが知られており、細胞競合と呼ばれている^[2]。細胞競合とは、遺伝的な変異を持つなどの細胞適応度の低い細胞 (loser cell) が、正常な細胞 (winner cell) と隣接した際に組織から除去される機構で、組織恒常性維持に重要な役割を持つと考えられている。細胞競合に関する研究は、主に発生段階のショウジョウバエを用いて行われてきたが、近年では、哺乳類においても同様の機構が報告されており、進化的に保存されたシステムであると考えられている^[11]。そこで我々は、遺伝学的モザイク解析によって、正常な腸管に一過的に *dMyc* 発現低下細胞をモザイク状に誘導し、その挙動を観察した。その結果、誘導された *dMyc* 発現低下細胞は、アポトーシスによって積極的に除去されることが明らかになった。

以上の結果から、腸管の分裂終了細胞における *dMyc* の発現は、それらの細胞の適応度を規定するパラメーターとして働いており、高栄養条件や加齢した個体の腸管では *dMyc* の発現が低い細胞が多く出現するため、アポトーシスが頻発し、腸透過性が上昇するため感染症のリスクが高まると考えられる。一方で、DR 条件下では、腸管での *dMyc* の発現が維持されているため、細胞死が起こりにくく寿命の延伸に寄与していることが示唆された (図 1)。

おわりに

ショウジョウバエでは、効率的な loser cell の除去によって個体寿命が延伸し、loser cell を除去できない変異系統では寿命が短縮することが明らかにされている^[12]。したがって、老化制御において細胞競合が重要な役割を持つことが考えられる。しかし、細胞競合と老化、または栄養シグナルとの関係について、その分子メカニ

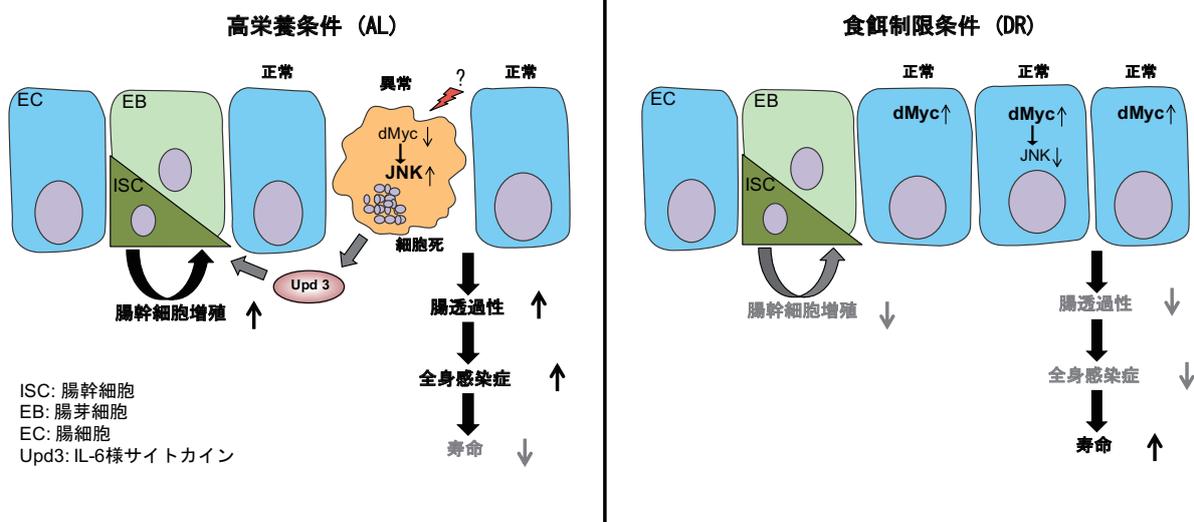


図 1 *dMyc* による腸管バリア機能と寿命の制御 (未発表)

高栄養条件や老化によって腸細胞での *dMyc* の発現が低下し、アポトーシスが頻発することで腸透過性が上昇する。一方で DR 条件では、*dMyc* の発現バランスよく維持されることでアポトーシスが抑制される。それに伴い腸管バリア機能が維持され、全身感染症が抑えられることで寿命が延伸する。

ズムは全く解明されていない。また、今回我々が見出した dMyc 発現低下細胞の除去機構が細胞競合と定義できるものなのか、さらなる解析が必要である。老化という文脈における細胞競合の分子機構と役割について、引き続き解析を進めていきたい。

参考文献

1. Fontana L and Partridge L. Promoting Health and Longevity through Diet: From Model Organisms to Humans. *Cell* 161 : 106–118, 2015.
2. Levayer R and Moreno E. Mechanisms of cell competition: themes and variations. *J. Cell Biol.* 200 : 689–698, 2013.
3. Hofmann JW, Zhao X, De Cecco M, *et al.* Reduced expression of MYC increases longevity and enhances healthspan. *Cell* 160 : 477–488, 2015.
4. Greer C, Lee M, Westerhof M, *et al.* Myc-dependent genome instability and lifespan in *Drosophila*. *PloS One* 8 : e74641, 2013.
5. Lee JE, Rayyan M, Liao A, *et al.* Acute Dietary Restriction Acts via TOR, PP2A, and Myc Signaling to Boost Innate Immunity in *Drosophila*. *Cell Rep.* 20 : 479–490, 2017.
6. Clark RI, Salazar A, Yamada R, *et al.* Distinct Shifts in Microbiota Composition during *Drosophila* Aging Impair Intestinal Function and Drive Mortality. *Cell Rep.* 12 : 1656–1667, 2015.
7. Powell DW. Barrier function of epithelia. *Am. J. Physiol.* 241 : G275–288, 1981.
8. Tepass U, Tanentzapf G, Ward R, *et al.* Epithelial cell polarity and cell junctions in *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.* 35 : 747–784, 2001.
9. Rera M, Clark RI and Walker DW. Intestinal barrier dysfunction links metabolic and inflammatory markers of aging to death in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 : 21528–21533, 2012.
10. Resnik-Docampo M, Koehler CL, Clark RI, *et al.* Tricellular junctions regulate intestinal stem cell behavior to maintain homeostasis. *Nat. Cell. Biol.* 19 : 52–59, 2016.
11. Clavería C, Giovinazzo G, Sierra R, *et al.* Myc-driven endogenous cell competition in the early mammalian embryo. *Nature* 500 : 39–44, 2013.
12. Merino MM, Rhiner C, Lopez-Gay JM, *et al.* Elimination of unfit cells maintains tissue health and prolongs lifespan. *Cell* 160 : 461–476, 2015.

【奨励賞トピックス】

ミトコンドリア調節能からみた りんごプロシアニジンの生理作用

増田 功^{1) 2) 3)}、小池 正人^{1) 4)}、中島 翔平^{2) 3)}、水谷 由布²⁾、小澤 裕介¹⁾

渡辺 憲史¹⁾、野尻 英俊⁴⁾、指原 浩一²⁾、横手 幸太郎¹⁾、清水 孝彦¹⁾

¹⁾ 千葉大学大学院・医学研究院

²⁾ アサヒグループホールディングス株式会社

³⁾ アサヒカルピスウェルネス株式会社

⁴⁾ 順天堂東京江東高齢者医療センター

序

古来より「1日1個のりんごで医者いらず」ということわざがあるが、りんごの健康機能の全貌については未知な部分が多い。一方「フレンチ・パラドックス」解明で話題になった赤ワイン中のポリフェノール成分であるレスベラトロールの生理作用については、長寿遺伝子の活性化をはじめ、その後の研究が目覚ましい。本稿では、りんごに含まれる主要ポリフェノールであるプロシアニジンについて、またその生理作用や作用機序に焦点を当てる。

キーワード：apple procyanidins, functional mechanism, mitochondria

1. りんごポリフェノールについて

「りんご」と聞けば、漠然と身体に良い食材であると感じる人は少なくない。また幼い頃、体調をくずした時に、ほとんどの人が親からりんごを勧められたであろう。はたして本当に、りんごは身体に良い影響を与えるのか。そして、りんごの中のどのような成分が健康の維持・増進に寄与するのだろうか。我が国におけるりんごの疫学研究のひとつに動脈硬化リスクとの関連性調査がある。本調査では、推定エネルギー必要量より摂取エネルギーが少ないまたは脂質比が30%より低い食生活の者において、りんご摂取は動脈硬化に予防的に作用する可能性が示唆されている^[1]。さらにアメリカ人を対象にした調査では、りんごを多く摂取している者ほど、受診率や薬の処方率が低い傾向にあるとの報告がある^[2]。このような知見を踏まえれば、やはりりんごはことわざ通りの機能的な食材なのかもしれない。一般的にりんごはビタミンや有機酸、カリウムを比較的多く含むが、先の疫学調査結果やこれから述べる研究論文の内容は、むしろ

ポリフェノールの重要性を物語っている。ポリフェノールとは、光合成により植物体内で生成される色素や苦味成分を指すが、作物や品種により、含まれるポリフェノールの種類とその構成は様々である。一方、りんごに含まれるポリフェノールの大半は、カテキン体が連なった構造を有するプロシアニジンという成分である(図1)。プロシアニジンフラボノイド類に属し、りんご以外にもブドウやカカオに含まれているが、その含有量や分子量構成は大きく異なる。

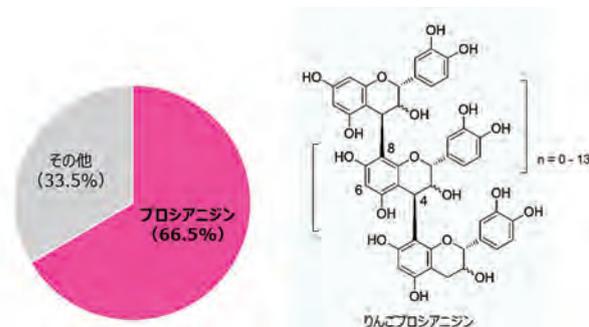


図1. りんごに含まれるポリフェノールについて
(a) りんごポリフェノールの組成、(b) りんごプロシアニジンの構造

連絡先：増田功 〒260-8670

千葉市中央区亥鼻 1-8-1

TEL：042-769-7824

E-mail：isao.masuda@asahicalpis-w.co.jp

2. りんごプロシアニジンの健康機能研究の歴史と明らかになりつつある作用機序

これまでに報告されているプロシアニジンの生理機能は、他のポリフェノールと同様に抗酸化作用^[3]や抗炎症作用^[4]があるが、とりわけりんごプロシアニジンに着目してみると抗アレルギー作用、脂質代謝調節作用、寿命延長作用、発毛促進作用、美容作用など多岐にわたっている(表1)^[5-18]。ここに掲げられている生理作用を見れば、あの「1日1個のりんごで医者いらず」ということわざが、いかに真実に近いと感じられる。

一方りんごプロシアニジンに関する総掲載論文数は、茶カテキンやレスベラトロールと比較すると決して多くなく、またその多くが国内の研究機関によるものであることから、世界的に見ればりんごプロシアニジン研究の歴史は浅いと言わざるを得ない。それは、りんごからポリフェノール成分を得ること、あるいはそこからプロシアニジン成分のみを抽出することに大きな技術的障壁があるためである。そのような状況の中、我々は独自の技術により、りんごからプロシアニジン成分のみを抽出し、分子量あるいは異性体毎に分取・精製することで、表1に示すようなりんごプロシアニジンが持つ非常に特異な生理活性を見出してきた^[20,21]。ここで多彩な生理機能が報告されているりんごプロシアニジンだが、その作用機序は未知な点が多い。一方升本らは、肥満モデルマウスを用いた試験において、腸管吸収率が極めて低い高分子量プロシアニジンが腸内環境へ及ぼす影響について報告している^[15,21]。高脂肪高ショ糖食摂取マウスに4量

体以下の低分子量プロシアニジンと5量体以上の高分子量プロシアニジンを摂取させた結果、高分子量プロシアニジン摂取群特異的に体重増加抑制作用ならびに腸内代謝産物の変動、さらには腸内 *Akkermansia* 属の増加を認めた。*Akkermansia* 属は腸内に存在するムチン分解菌として有名であるが、近年の研究により肥満や糖尿病との相関性が注目を集めている^[22,23]。

3. りんごプロシアニジンのミトコンドリア新生作用

前項で紹介した高分子量プロシアニジンの腸内環境改善作用に関する報告に対し我々は、血中へ移行する低分子量プロシアニジンにも高分子量のそれとは異なる作用点があるだろうと考え、このたび軟骨細胞を用いた研究によりミトコンドリア新生作用を見出した^[24]。関節の軟骨変性を伴う運動器疾患として変形性関節症は有名であるが、未だ詳しい発症メカニズムが解明されておらず、内科的治療の開発も遅れている。一方近年の研究により、変形性関節症の発症・増悪は軟骨細胞のミトコンドリア機能の低下と相関することが明らかとなり^[25-28]、現在、それらをターゲットとした介入研究が期待されている。運動器に対するりんごプロシアニジンの保護効果は現状報告例がほとんどないが、表1に記す研究成果のいくつかは、りんごプロシアニジンが細胞に直接働きかけることを示唆しており、ミトコンドリアに作用していても不思議ではないと考えるに至った。そこで我々はマウス初代軟骨細胞に対し、りんご由来プロシアニジン画分を添加しミトコンドリアマーカーを調べたところ、ミ

表1. りんごプロシアニジンの生理作用に関する研究論文

キーワード	細胞/動物/ヒト	試験デザイン/結果	引用
アレルギー	ヒト	りんごプロシアニジン摂取により、炎症スコア、舌癬化スコア、かゆみスコアが対照群(通常治療)と比較し有意に改善	Kojima et al. (2000) ^[5]
	動物	りんごプロシアニジンはI型アレルギーモデルマウスに対し、濃度依存的に耳の厚化反応を抑制した	Akiyama et al. (2000) ^[6]
	細胞	りんごプロシアニジンはIgEとそのレセプターをリンクすることでマスト細胞の脱顆粒を抑制した	Tokura et al. (2005) ^[7]
	細胞	りんごプロシアニジンC1(3量体)は細胞間シグナリング経路を介してマスト細胞を活性化した	Nakano et al. (2008) ^[8]
寿命	細胞(線虫)	りんごプロシアニジンはsir2を介して線虫の寿命を延長した	Sunagawa et al. (2011) ^[9]
血管	細胞	りんごプロシアニジンは、血管内皮細胞においてNO-cGMP経路を介して血管弛緩作用を示した	Matsui et al. (2009) ^[10]
	細胞	りんごプロシアニジンは、血管内皮細胞においてKLF2発現を上昇させ、エンドセリン合成を抑制することで血管を弛緩させた	Caton et al. (2010) ^[11]
	動物	りんごプロシアニジンオリゴマーは、LOX-1を阻害し、ラット血管への脂質沈着を抑制した	Nishizuka et al. (2011) ^[12]
脂質	細胞	りんごプロシアニジンは、脂肪細胞への分化を阻害した	Shoji et al. (2000) ^[13]
	動物	りんごプロシアニジンオリゴマーは、腓リパーゼを阻害し、トリグリセリドの吸収を抑制した	Sugiyama et al. (2007) ^[14]
	動物	りんごプロシアニジンは、腸内フローラに影響を及ぼし、抗肥満作用を示した	Masumoto et al. (2016) ^[15]
アルツハイマー	細胞	りんごプロシアニジンは、アミロイドβの凝集を抑制した	Toda et al. (2011) ^[16]
発毛	動物	りんごプロシアニジンB体(2量体)はマウスにおいて、ミノキシジルと同程度の発毛促進作用を示した	Takahashi et al. (1998) ^[17]
美容	細胞	プロシアニジンの3量-5量体はメラニン生成を抑制した	Shoji et al. (2005) ^[18]

トコンドリア転写調節因子として知られる PGC-1 α の遺伝子発現量ならびにミトコンドリア DNA コピー数の著しい増加 (図 2 (a))、さらにはミトコンドリア脱水素酵素活性の増加を認めた。また主要軟骨基質であるプロテオグリカンの産生能評価においては、単量体であるエピカテキンとの活性比較により、プロシアニジン構造特異的な促進作用が明らかとなった。さらに、軟骨細胞のミトコンドリア機能低下により再現される変形性膝関節症モデルマウス (Sod2 欠損型) において、りんごプロシアニジン経口摂取群では膝関節軟骨変性病態が抑制された (図 2 (b))。これにより、りんごプロシアニジンのミトコンドリアを介した作用機序、また「関節」という新たな健康領域での生理作用が明らかとなった。

終わりに

長きにわたりその健康機能が注目されてきたりんごの作用機序は、「腸内細菌」や「ミトコンドリア」という切り口から、今日、分子レベルで解明されつつある。とりわけミトコンドリア調節作用の観点から見れば、非侵襲療法の開発が遅れている変形性膝関節症のような疾患に留まらず、ミトコンドリアが重要な働きを担う多くの疾病に対しても、一般食材であるりんごに秘められた可能性を提示できるものと確信している^[29,30]。

参考文献

1. Tokuda, I., Takahashi I., Totsuka M. *et al.* Influence of dietary habits on the association between apple consumption and atherosclerosis risk in general population. *JPFNI*, **25**, 1 (2015).
2. Davis, M. A., Bynum, J. P. & Sirovich, B. E. Association between apple consumption and physician visits: appealing the conventional wisdom that an apple a day keeps the doctor away. *JAMA Intern. Med.* **175**, 777-783 (2015).
3. Packer, L., Rimbach, G. & Virgili, F. Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol. *Free Radic. Biol. Med.* **27**, 704-724 (1999).
4. Mackenzie, G. G., Delfino, J. M., Keen, C. L. *et al.* Dimeric procyanidins are inhibitors of NF-kappaB-DNA binding. *Biochem. Pharmacol.* **78**, 1252-1262 (2009).
5. Kojima, T., Akiyama, H., Sasai, M. *et al.* Anti-allergic effect of apple polyphenol on patients with atopic dermatitis: A pilot study. *Allergology International* **49**, 69-73 (2000).
6. Akiyama, H., Sakushima, J., Taniuchi, S. *et al.* Antiallergic effect of apple polyphenols on the allergic model mouse. *Biol. Pharm. Bull.* **23**, 1370-1373 (2000).
7. Tokura, T., Nakano, N., Ito, T. *et al.* Inhibitory effect of polyphenol-enriched apple extracts on mast cell degranulation in vitro targeting the binding between IgE and FcepsilonRI. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 1974-1977 (2005).
8. Nakano, N., Nishiyama, C., Tokura, T. *et al.* Procyanidin C1 from apple extracts inhibits Fc epsilon RI-mediated mast cell activation. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **147**, 213-221 (2008).
9. Sunagawa, T., Shimizu, T., Kanda, T. *et al.* Procyanidins from apples (*Malus pumila* Mill.)

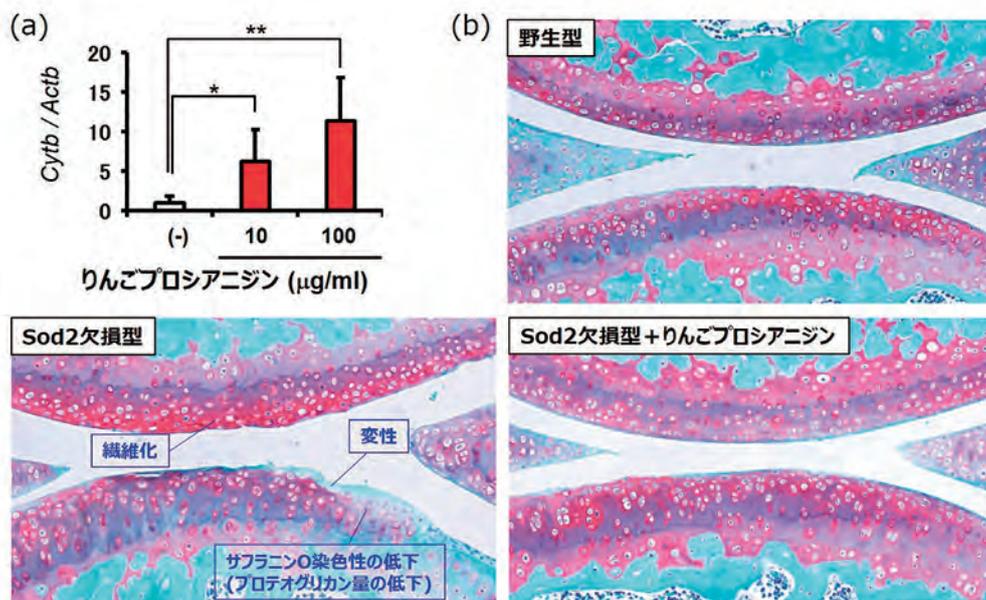


図 2. ミトコンドリアに対するりんごプロシアニジンの作用

(a) マウス初代培養軟骨細胞におけるミトコンドリア DNA コピー数、(b) 機械的負荷条件下での 16 週齢マウス膝関節軟骨切片のサフラニン O 染色像

- extend the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Planta Med.* **77**, 122-127 (2011) .
10. Matsui, T., Korematsu, S., Byun, E. B. *et al.* Apple procyanidins induced vascular relaxation in isolated rat aorta through NO/cGMP pathway in combination with hyperpolarization by multiple K⁺ channel activations. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 2246-2251 (2009) .
 11. Caton, P. W., Pothecary, M. R., Lees, D. M. *et al.* Regulation of vascular endothelial function by procyanidin-rich foods and beverages. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 4008-4013 (2010) .
 12. Nishizuka, T., Fujita, Y., Sato, Y. *et al.* Procyanidins are potent inhibitors of LOX-1: a new player in the French Paradox. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* **87**, 104-113 (2011) .
 13. Shoji, T., Kobori, M., Shinmoto, H. *et al.* Inhibitory Effects of Apple Polyphenols on Differentiation of 3T3-L1 Cells into Adipocytes. *Food Sci. Technol Res.*, **6**, 119-121 (2000) .
 14. Sugiyama, H., Akazome, Y., Shoji, T. *et al.* Oligomeric procyanidins in apple polyphenol are main active components for inhibition of pancreatic lipase and triglyceride absorption. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 4604-4609 (2007) .
 15. Masumoto, S., Terao, A., Yamamoto, Y. *et al.* Non-absorbable apple procyanidins prevent obesity associated with gut microbial and metabolomic changes. *Sci. Rep.* **6**, 31208 (2016) .
 16. Toda, T., Sunagawa, T., Kanda, T. *et al.* Apple Procyanidins Suppress Amyloid beta-Protein Aggregation. *Biochem. Res. Int.* **2011**, 784698 (2011) .
 17. Takahashi, T., Kamiya, T., Hasegawa, A. *et al.* Procyanidin oligomers selectively and intensively promote proliferation of mouse hair epithelial cells in vitro and activate hair follicle growth in vivo. *J. Invest. Dermatol.* **112**, 310-316 (1999) .
 18. Shoji, T., Masumoto, S., Moriichi, N. *et al.* Procyanidin trimers to pentamers fractionated from apple inhibit melanogenesis in B16 mouse melanoma cells. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 6105-6111 (2005) .
 19. Shoji, T., Mutsuga, M., Nakamura, T. *et al.* Isolation and structural elucidation of some procyanidins from apple by low-temperature nuclear magnetic resonance. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 3806-3813 (2003) .
 20. Nakashima, S., Oda, C., Masuda, S. *et al.* Isolation and structure elucidation of tetrameric procyanidins from unripe apples (*Malus pumila* cv. Fuji) by NMR spectroscopy. *Phytochemistry* **83**, 144-152 (2012) .
 21. Shoji, T., Masumoto, S., Moriichi, N. *et al.* Apple procyanidin oligomers absorption in rats after oral administration: analysis of procyanidins in plasma using the porter method and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 884-892 (2006) .
 22. Cani, P. D., Everard, A., [Akkermansia muciniphila: a novel target controlling obesity, type 2 diabetes and inflammation?]. *Med. Sci. (Paris)* , **30**, 125-127 (2014) .
 23. Yassour, M., Lim M. Y., Yun, H. S. *et al.* Sub-clinical detection of gut microbial biomarkers of obesity and type 2 diabetes. *Genome Med.* **8**, 17-016-0271-6 (2016) .
 24. Masuda, I., Koike M., Nakashima, S. *et al.* Apple procyanidins promote mitochondrial biogenesis and proteoglycan biosynthesis in chondrocytes. *Sci. Rep.* **8**, 7229-018-25348-1 (2018) .
 25. Aigner, T., Fundel, K., Saas, J. *et al.* Large-scale gene expression profiling reveals major pathogenetic pathways of cartilage degeneration in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **54**, 3533-3544 (2006) .
 26. Ruiz-Romero, C., Calamia, V., Mateos, J. *et al.* Mitochondrial dysregulation of osteoarthritic human articular chondrocytes analyzed by proteomics: a decrease in mitochondrial superoxide dismutase points to a redox imbalance. *Mol. Cell. Proteomics* **8**, 172-189 (2009) .
 27. Scott, J. L., Gabrielides, C., Davidson, R. K. *et al.* Superoxide dismutase downregulation in osteoarthritis progression and end-stage disease. *Ann. Rheum. Dis.* **69**, 1502-1510 (2010) .
 28. Koike, M., Nojiri, H., Ozawa, Y. *et al.* Mechanical overloading causes mitochondrial superoxide and SOD2 imbalance in chondrocytes resulting in cartilage degeneration. *Sci. Rep.* **5**, 11722 (2015) .
 29. Wang, Y., Zhao, X., Lotz, M. *et al.* Mitochondrial biogenesis is impaired in osteoarthritis chondrocytes but reversible via peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha. *Arthritis Rheumatol.* **67**, 2141-2153 (2015) .
 30. Reddy, P. H. Inhibitors of mitochondrial fission as a therapeutic strategy for diseases with oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *J. Alzheimers Dis.* **40**, 245-256 (2014) .

【奨励賞トピックス】

カロリー制限による白色脂肪組織の代謝リモデリングとその制御因子

小林 正樹^{1,2}、樋上 賀一^{1,2}

¹ 東京理科大学薬学部 分子病理・代謝学研究室

² 東京理科大学総合研究機構 トランスレーショナルリサーチ (TR) センター

1. はじめに

カロリー制限 (CR) は、加齢に伴う生理的变化や老化関連疾患の発症を抑制し、寿命延伸をもたらす。この効果は酵母や線虫等の下等生物からマウスやラット等の哺乳類にいたるまで幅広い生物種で観察され、最近ではサルにおいても CR が有効であることが発表された [1]。これは、CR がヒトにも有益な効果をもたらす得ることを支持している。

白色脂肪組織 (WAT) は、体内に摂取した栄養分を主に中性脂肪の形で蓄積するいわばエネルギー貯蔵の場である一方、アディポカインを分泌する内分泌組織としても機能する。近年、WAT の性質変化やそれに応じたアディポカイン分泌動態が寿命制御において重要な役割を担っていることが知られている。例えば、脂肪組織特異的インスリン受容体欠損マウスは、WAT 重量減少、ミトコンドリア生合成亢進を示し、寿命が延伸する [2]。また、肝臓においてアディポネクチンを過剰発現するマウスが長寿を示すことも報告されている [3]。

CR は WAT の脂肪細胞の小型化を促進し、さらに血中の活性型アディポネクチン量を増加させる [4]。このことから、CR は WAT の性質変化にも強く寄与しているといえる。それゆえ我々は WAT における CR の影響、特に代謝への関与に注目し、解析を行ってきた。

2. 新規 CR 応答遺伝子 : SREBP-1c

網羅的遺伝子解析により、我々は CR 動物の形質として、WAT における脂肪酸合成関連因子およびそのマスター転写因子である Sterol responsive element binding protein 1c (SREBP-1c) の誘導を見出した (詳細は [5] を参照)。これを踏まえ本研究では、SREBP-1c 欠損 (KO) マウスの解析を行い、CR 効果における WAT での SREBP-1c の役割や寄与の解明を試みた。

はじめに、SREBP-1c 野生型 (WT) と KO マウスそれぞれを自由摂食 (AL) 群と AL 群の摂食量を 70% に

制限した CR 群とに分け、これら 4 群の寿命を追跡した。その結果、WT において CR は寿命を延伸したが、KO マウスではこの効果は見られなかった [6]。このことは、SREBP-1c が CR の寿命延伸効果に寄与することを強く示唆している。

前述の網羅的解析の結果を踏まえ、WAT における SREBP-1c およびその下流である脂肪酸合成関連因子 (Fatty acid synthase, Acetyl-CoA carboxylase 等) の発現量を確認した。すると、やはり CR によりこれらの発現量は増加しており、KO マウスでは変わらなかった (図 1 A)。さらに脂肪酸合成に重要なクエン酸合成酵素 (CS) 活性を測定したところ、上記と一致して WT マウスにおいてのみ CR による CS 活性の誘導が見られた [6]。

CS はミトコンドリアに存在する酵素であるため、その活性はミトコンドリア量とも相関があるといえる。そこで、我々は WAT におけるミトコンドリア関連因子 (Sirtuin 3 (SIRT3), Cytochrome c oxidase subunit IV (COXIV) 等) のタンパク質発現量を解析した。すると、いずれも CR 群において増加していたが、KO マウスではその増加は確認されなかった。また、ミトコンドリア量を反映するとされるミトコンドリア DNA 量も同様の挙動を示した。これらの結果から、CR は SREBP-1c を介して脂肪酸合成だけでなくミトコンドリア生合成も亢進していることが示唆された [6]。

Peroxisome proliferative activated receptor γ coactivator 1 α (PGC-1 α) はミトコンドリア生合成のマスター転写補助因子であり、様々なミトコンドリア関連因子の転写を促進する。また PGC-1 α が CR によるミトコンドリア機能維持に重要であるという報告もある [7]。以上を踏まえ、我々は PGC-1 α に着目し、WAT での CR に伴うその挙動を調べた。すると、PGC-1 α 発現量は CR により増加していたが、興味深いことに KO マウスでは変化していなかった (図 1 B)。さらにこの増加は、SREBP-1c による直接的な転写誘導に由来することも明らかとなった [6]。

次にミトコンドリア機能と密接に関連のある酸化ストレスを、アコニターゼ活性および還元型・酸化型グルタチオン比 (GSH/GSSG) を指標として評価した。これらのマーカーは、共に酸化ストレスが抑制されると増加する。結果として、CR によりこれらの値は増加し、KO では変化しなかった。この結果は CR が WAT において

連絡先 : 小林正樹 〒 278-8510

千葉県野田市山崎 2641

TEL : 04-7124-1501 ex. 6536

FAX : 04-7121-3676

E-mail : kobayashim@rs.tus.ac.jp

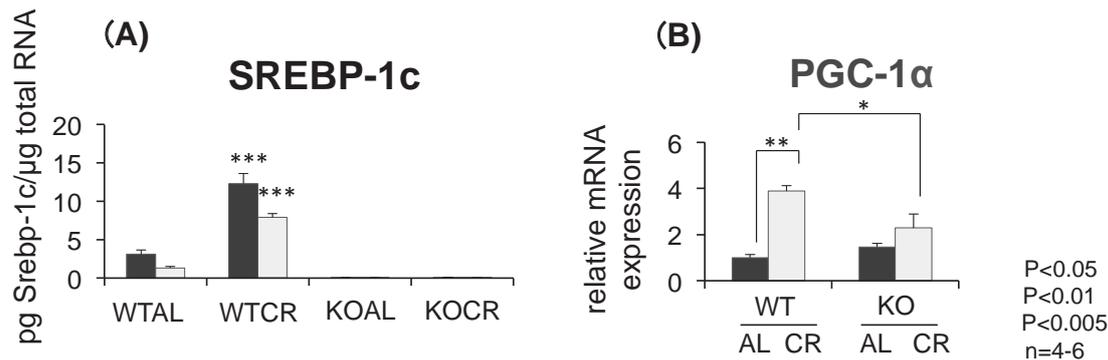


図1 CRによるSREBP-1c, PGC-1 α の誘導
 (A) CRはWATにおいてSREBP-1c mRNA発現量を増加させた。
 (B) CRはSREBP-1c WTマウスのWATにおいてのみ、PGC-1 α mRNA発現量を増加させた。

SREBP-1cを介して酸化ストレスを抑制していることを示している [6]。

以上の結果から、CRはSREBP-1cを誘導しその下流である脂肪酸合成関連因子の発現を亢進すること、SREBP-1cはPGC-1 α を介したミトコンドリア合成の亢進および酸化ストレス低下にも寄与すること、これらの作用が協調し寿命延伸に寄与し得ること、以上3点が示唆された。

興味深いことに、上記CR効果は肝臓や骨格筋等では観察されず、WAT特異的なものであった。これはCRにおけるWATの重要性、およびWATの性質変化が全身の形質に影響を及ぼすことを示している。

3. CR応答性ミトコンドリア活性化メカニズム ~ MIPEP-SIRT3 ~

次に、我々はPGC-1 α 以外のSREBP-1cを介したCRによるミトコンドリア制御機構の解明を試みた。その候補としてミトコンドリアタンパク質であるSIRT3に着目した。

SIRT3は、Sirtuinファミリーの一つであり、ミトコンドリアマトリックスに局在する脱アセチル化酵素である。ミトコンドリア内の様々なタンパク質の活性をその脱アセチル化活性により調節している [8]。また、CRがSIRT3発現を誘導することが報告されており、CRとの関連も注目されている [9]。前項で記したとおり、CRはSREBP-1c WTマウスのWATにおいてSIRT3タンパク質発現量を増加させた。しかしmRNA量を解析したところ、転写レベルでの増加は確認できなかった。以上を踏まえ、我々はCRによるSIRT3の増加は翻訳後制御により生じているのではないかと考察した。

一般に、99%以上のミトコンドリア局在タンパク質は細胞質での翻訳後、ミトコンドリアへと輸送され、mitochondrial signal peptidase (MtSPase) による切断を受けて活性化される。SIRT3もまたMtSPaseによる切断を受けることが報告されていたため [10]、我々は高濃度ゲルを用いることで分離能を高めたウエスタンブロッティングを行い、SIRT3の切断前の前駆体およ

び切断後の成熟体の検出を試みた。すると前駆体、成熟体であると報告のあるサイズの位置に計2本 (37, 28 kDa) のバンドを検出することができた。興味深いことに、成熟体を表す28 kDaのバンドのシグナルが、CRにより増強されていた [11]。またこの増強はSREBP-1c KOマウスでは見られなかった (未発表データ)。これらの知見は、CRがMtSPaseの誘導を介してSIRT3の活性化を亢進させることを示唆している。

SIRT3の切断を担うMtSPaseとして、Mitochondria processing peptidase (MPP) が報告されていたが [10]、CRによるMPP発現量の変化は見られなかった [11]。そこで、AL群、CR群のWATの網羅的な遺伝子発現解析の結果から、CR群において発現が誘導されるMtSPaseを探索した。その結果、CR誘導性のMtSPaseとして、Mitochondrial intermediate peptidase (MIPEP) を同定した [11]。このMIPEPの誘導は、SREBP-1c KOマウスのWATでは観察されなかった (未発表データ)。

MIPEPは、MPPにより一度切断されたミトコンドリアタンパク質を基質とするMtSPaseである。ある種のミトコンドリアタンパク質は二段階切断を受けることが報告されており、MIPEPはこの二段階目の切断を担う [12]。例えば、COXIVやMalate dehydrogenase 2 (MDH2)はMIPEPの基質として知られている [13]。我々は、SIRT3がMIPEPの基質であり、上記のような二段階切断を受けているのではないかと仮説を立てた。実際に、プロテアソーム阻害剤を処理したタンパク質分解を抑制した細胞において、前駆体、成熟体、そしてその間のサイズに中間体と3つのSIRT3のバンドを検出することができた [11]。これは上記仮説を支持する結果であるといえる。

次に、MIPEPをノックダウン (KD) した細胞株において、基質であるCOXIV、MDH2、そしてSIRT3の成熟体量を確認したところ、MIPEP KDによりいずれも減少していた [11]。さらに、SIRT3により脱アセチル化されることで活性化するManganese superoxide dismutase (MnSOD) のアセチル化レベルを調べた

ところ、MIPEP KDにおいてその増加が確認され、SIRT3 活性の低下が示唆された [11]。

上記解析により、CRはSREBP-1cを介してMIPEP発現を増加させ、それがSIRT3の成熟活性化に寄与し得ることを示した。このSIRT3活性化は、酸化ストレスの抑制やミトコンドリア代謝能の亢進など、CR時に観察されるミトコンドリア機能の改善につながると考えられる。

4. 考察

CRによるWATでの脂肪酸合成の誘導は何を意味するのだろうか。脂肪酸等の脂質のエネルギー効率そのものは糖質よりも高く、脂質の効率的な利用は生体にとって有益とされる。WATは主要な脂肪酸合成組織であり、全身への脂質の供給において大きな役割を持つ。またCRは全身の脂質利用を高めることが知られている [14]。このような、エネルギー基質の変化も含めた代謝経路の再構築は一般に代謝リモデリングと呼ばれる。以上より、我々はCR時のSREBP-1cを介した脂肪酸合成関連因子の増加は、糖質から脂質へのエネルギー基質の変換に代表される代謝リモデリングを促し、全身の代謝効率を促進させていると結論づけた。

一方で、CRはPGC-1 α およびMIPEP発現を誘導した。PGC-1 α は主にミトコンドリアタンパク質の発現量を増加させ、ミトコンドリア生合成を誘導する。すなわちミトコンドリアの“量”的な制御に関与する。対して、MIPEPは本稿で示したようにSIRT3をはじめとしたミトコンドリアタンパク質の活性化、言い換えればミトコンドリアの“質”的な制御に寄与する。まとめると、PGC-1 α によるミトコンドリア量の増加、MIPEPによるミトコンドリアの質の改善、これら両者が協調することでCR時のミトコンドリア機能維持につながると見な

すことができる。

5. おわりに

CRはSREBP-1cを介して、脂肪酸合成関連因子の亢進、さらにPGC-1 α 、MIPEPの増加を促してミトコンドリア機能の改善をもたらすことが明らかとなった(図2)。これらはWATでの代謝リモデリングをもたらし、ひいては抗老化・寿命延伸効果に寄与していると考えられる。これらSREBP-1c、PGC-1 α 、MIPEPは、CR効果の新たなメディエーターであり、CR模倣の新規分子標的となり得ることが期待される。

6. 謝辞

本研究は東京理科大学薬学部分子病理・代謝学研究室のメンバーをはじめ、山口東京理科大学沖田直之先生、長崎大学下川功先生、秋田県立大学小西智一先生、東京都健康長寿医療センター研究所三浦ゆり先生、津元裕樹先生、筑波大学島野仁先生、中川嘉先生、以上の先生方にも多大な御助言や解析上での御協力をいただきました。この場をかりて感謝申し上げます。

7. 参考文献

1. Mattison JA, Colman RJ, Beasley TM, *et al.* Caloric restriction improves health and survival of rhesus monkeys. *Nat Commun.* 8:14063, 2017.
2. Blüher M, Kahn BB, Kahn CR. Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science* 299:572-574, 2003.
3. Otabe S, Yuan X, Fukutani T, *et al.* Overexpression of human adiponectin in transgenic mice results in suppression of fat accumulation and prevention of premature death by high-calorie diet. *Am. J. Physiol.*

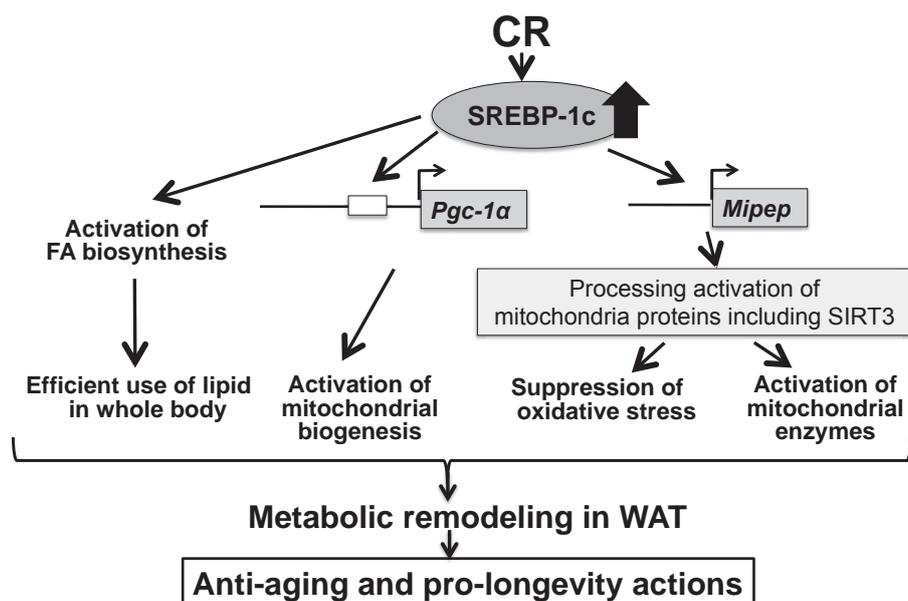


図2 CRによるWATでの代謝リモデリング

CRはWATにおいてSREBP-1cを誘導し、脂肪酸合成亢進やミトコンドリア機能改善をもたらす。

- Endocrinol.Metab. 293:E210-218, 2007.
4. Miller KN, Burhans MS, Clark J, *et al.* Aging and caloric restriction impact adipose tissue, adiponectin, and circulating lipids. *Aging cell* 16:497-507, 2017.
 5. Chujo Y, Fujii N, Okita N, *et al.* Caloric restriction-associated remodeling of rat white adipose tissue: effects on the growth hormone/insulin-like growth factor-1 axis, sterol regulatory element binding protein-1, and macrophage infiltration. *Age (Dordr)* 35:1143-1156, 2013.
 6. Fujii N, Narita T, Okita N, *et al.* Sterol regulatory element-binding protein-1c orchestrates metabolic remodeling of white adipose tissue by caloric restriction. *Aging Cell* 16:508-517, 2017.
 7. Anderson RM, Barger JL, Edwards MG, *et al.* Dynamic regulation of PGC-1 α localization and turnover implicates mitochondrial adaptation in calorie restriction and the stress response. *Aging Cell* 7:101-111, 2008.
 8. Shi T, Wang F, Stieren E, *et al.* SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes. *J Biol Chem.* 280:13560-13567, 2005.
 9. Someya S, Yu W, Hallows WC, *et al.* Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction. *Cell* 143:802-812, 2010.
 10. Schwer B, North BJ, Frye RA, *et al.* The human silent information regulator (Sir) 2 homologue hSIRT3 is a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylase. *J Cell Biol.* 158:647-657, 2002.
 11. Kobayashi M, Takeda K, Narita T, *et al.* Mitochondrial intermediate peptidase is a novel regulator of sirtuin-3 activation by caloric restriction. *FEBS Lett.* 591:4067-4073, 2017.
 12. Isaya G, Kalousek F, Fenton WA, *et al.* Cleavage of precursors by the mitochondrial processing peptidase requires a compatible mature protein or an intermediate octapeptide. *J Cell Biol.* 113:65-76, 1991.
 13. Emmermann M, Schmitz UK. The Cytochrome c Reductase Integrated Processing Peptidase from Potato Mitochondria Belongs to a New Class of Metalloendoproteases. *Plant Physiol.* 103:615-620, 1993.
 14. Bruss MD, Khambatta CF, Ruby MA, *et al.* Calorie restriction increases fatty acid synthesis and whole body fat oxidation rates. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 298:E108-E116, 2010.

【大会報告】

第41回日本基礎老化学会大会を振り返って

樋上 賀一

東京理科大学

薬学部生命創薬科学科 教授

総合研究院トランスレーショナルリサーチセンター長

2018年5月31日から6月2日にかけて、東京理科大学葛飾キャンパスにて、『基礎老化研究からトランスレーショナルリサーチへ』という主題で、第41回日本基礎老化学会を日韓合同シンポジウムと、さらに平成26年度私立大学戦略的研究基盤形成支援事業により5年間の時限で設立されたトランスレーショナルリサーチ (TR) センターのシンポジウムとの合同で開催させていただきました。この合同会をお認めいただき、また開催にご協力いただき、さらに大会に参加いただいた全ての皆様に、深く感謝いたします。

一般演題のうち口頭発表は56演題（うち若手枠発表22題）、ポスター発表は21演題とそれなりの演題数が集まり、また実質参加者数は212名（一般会員87名、学生会員17名、非会員108名）とかなりの数の方々にご参加いただけたことを考えると、多少のトラブルはあったものの一応成功裡に終えることができたのではないかと安堵しているところです。

今大会では、1つの会場で広々とまた一般口演においても1演題15分と余裕を持ってご発表いただき議論できるようなプログラムになるように配慮いたしました。そのため、都内とはいいながら都心からやや離れた交通の便の悪い葛飾区での開催になってしまいました。しかしながら、3題の招待講演や8題の日韓合同シンポジウムを含め3日間の長丁場ではありましたが、広々と席を使ってあまり疲れずに発表や議論に集中いただけたのではないかと考えております。一方、他学会のスケジュールを勘案したばかりに、就職活動の解禁日に学会開催日がかぶってしまったため、折角大学内で開催したわりには、学生の参加、特に修士課程2年生など主力学年の学



生の参加および発表が少なかったのが、残念でした。

最近の分子生物学や分子遺伝学の進歩、さらにデータサイエンスの進歩は目を見張るものがあります。3日間のプログラムを通して、分子生物学や分子遺伝学の進歩に裏打ちされた、また海外経験のある若い先生方のレベルの高い発表が着実に増加している印象を持ちました。老化現象を解明するには、時間軸に沿ってその多様性が大きくなる、また多臓器間の相互作用自体が変化するという特徴を、個体レベルで包括的に理解する必要があります。そのような特徴から、今後の基礎老化研究では、『がん』などの他分野の研究よりも、さらにデータサイエンスなどを駆使したより学際的な研究が必要になるものと考えます。理工系総合大学である本学においてTRセンターシンポジウムとの合同で開催するという事で、専門性のみならず、このような学際的な共同研究の芽ができればとの期待もありました。しかしながら、学内における広報活動が思うに任せず、この件に関しては十分な成果を得ることができなかったのも残念でした。今後、



本学会が今にも増して、異分野の研究者も集うことができる、より学際的な研究交流の場となり、益々発展することを期待しております。

最後になりましたが、特にプログラム委員を快くお引き受けいただいた芝浦工業大学新海正先生、福井浩二先生、東邦大学高橋良哉先生、千葉大学清水孝彦先生、演題が十分に集まらない時期に研究所内にお声がけくださいました国立長寿医療研究センター丸山光生先生、また学会開催にあたり多くのご助言を賜りました東京都健康長寿医療センター研究所遠藤昌吾先生、長崎大学森望先生に深謝いたします。



【学会報告】

第 41 回 基礎老化学会大会に参加して

篠崎 昇平

マサチューセッツ総合病院麻酔救急科・ハーバード大学医学部

(旧所属：東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・基礎動脈硬化学講座)

2018年5月31日から6月2日にかけて、東京都葛飾区にある東京理科大学葛飾キャンパスにおいて行われた第41回基礎老化学会大会に参加したので報告する。この大会では、2日目に日韓老化学会合同シンポジウムが催され、多くの韓国人老化研究者が参加した。また、3日目には東京理科大学総合研究院トランスレーショナルリサーチセンターとの合同シンポジウムが行われ、基礎研究の成果を臨床現場へと還元するための試みがなされた。今回、日本から1名、アメリカから2名、韓国から10名の基礎老化研究者を招待講演者として招き、56題の口頭発表と15題のポスター発表が行われた。中枢神経、運動器、代謝、細胞障害・酸化ストレス、個体老化と細胞老化、炎症・免疫と多岐にわたって、幅広い老化研究の基礎を網羅する形でセッションが進行した。

今回、印象に残ったのは若い研究者が多く発表していた点である。全発表中の約半数(34演題)が若手の発表ということもあり、初々しいながらも内容のある発表が目多く映った。大学院生の発表も堂々としており、今後の基礎老化研究を担う新たな芽が確実に育っている印象を受けた。基礎老化学会も徐々にではあるが、世代交代が進行しているようである。また、今回の大会では日韓合同セッションおよび招待講演が開催され、これらは質疑応答を含めてすべて英語で行われた。中でも、韓国から参加した大学院生および若手研究者の英語力(スピーキング力)の高さには驚かされた。学生を引率され

た釜山大学のLee先生は、「発表の練習を繰り返したからですよ」と謙遜された様子で語られていたが、口演のみならず質疑応答もしっかりしており、基礎語学力の高さがうかがえた。我々ももっと研鑽し、日本国内のみならず世界に通用する発信力(語学力)を身につける必要があることを痛感した。

招待講演ではウイスコンシン大学のDenu先生によるSirt3の講演、アメリカ国立老化研究所のCabo先生によるカロリー制限(CR)の講演、東京理科大学の岩倉先生による腸管免疫の講演を拝聴した。Cabo先生によるCRの最新の知見に関しては、摂取カロリーの総量を減らすだけではなく、食事の内容(質)が重要であることが示された。また、マウスを用いて霊長類のCRを模倣する検討において、食事の仕方による違い(絶食期間の有無:空腹時間の有無)で、同じカロリーを摂取しても身体に対する影響が異なることが示された。平たく言えば「健康的な食事内容で、規則正しく食べる」のが重要という事だが、実践するのは大変そうである。これまで腹八分目(食べ過ぎないこと)が重要であると信じていたが、それだけでは健康長寿には足りないようである。

二日目と三日目の終わりには懇親会が開かれた。昼間のセッションとは異なり、自由な形で意見交換が行われた。ここでも、会場内の至る所から英語が聞こえ、若い研究者の姿も数多く見られた。全体的に国際化を感じられる、内容の濃い大会であったと思われる。



学会前日に東京都健康長寿医療センターで行われた釜山大学との日韓シンポジウムの集合写真。韓国からは学会プログラムの1つである日韓老化学会合同シンポジウムに合わせて来日していただいた。前列右から、昭和大学の笠原靖先生、釜山国立大学のSeung-Cheol Chang先生、東京都健康長寿医療センター研究所の石神昭人先生、順天堂大学の後藤佐多良先生、埼玉セントラル病院の丸山直記先生、釜山国立大学のJaewon Lee先生、著者(篠崎)の順。日韓合同シンポジウムおよび基礎老化学会の大会期間を通じて活発な議論が交わされた。

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42号 第3号

平成30年(2018)9月30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