

長寿科学の最前線

Vol.2

長寿科学研究者支援事業
平成26年度 研究報告集

公益財団法人 長寿科学振興財団

はじめに

わが国では、かつてどこの国も経験したことのない「超高齢社会」を迎えています。人々が健康に老い、心豊かに美しく天寿をまっとうできるような超高齢化社会を築くことが、日本の将来にとって非常に重要であり、これを実現することが長寿科学研究の喫緊の課題でもあります。

そこで、平成20年度より当財団では長寿科学研究に携わる若手研究者の研究活動を幅広く支援するため、「長寿科学研究者支援事業」により研究費の助成をしていることをございます。

このたび、平成26年度に実施しました長寿科学研究者支援事業において、研究助成を行いました16名の研究者から、提出された研究実績報告書を取りまとめて研究報告集を作成いたしました。

この小冊子に掲載した長寿科学研究者支援事業の成果が活用され、豊かで希望に満ちた活力ある長寿社会を創造するための一助となれば幸いです。

平成27年7月

公益財団法人 長寿科学振興財団

理事長 祖父江 逸郎

目 次

はじめに


I. 長寿科学研究者支援事業

助成実績	7
採択者一覧（平成26年度～平成20年度）	8

II. 平成26年度 研究実績報告書

① オートファジー制御がタウ病態に与える影響の解析	17
国立長寿医療研究センター 吉池 裕二	
② タウ病理伝播性細胞外タウの同定とタウを標的とした新規タウオパチー免疫学的治療法の開発	21
国立長寿医療研究センター 吉田 裕孝	
③ 骨格筋萎縮における鉄の意義の解明	25
徳島大学大学院 池田 康将	
④ 免疫老化制御による加齢関連疾患治療戦略の確立	29
慶応義塾大学 新村 健	
⑤ 疾患特異的iPS細胞と百寿者iPS細胞を用いた認知症の病態解明と創薬への展開	33
慶応義塾大学 伊東 大介	
⑥ 超長寿・がん化耐性齧歯類ハダカデバネズミを利用した新規老化／がん化予防機構の解明	37
北海道大学 三浦 恭子	
⑦ 心臓・骨格筋の加齢変化を制御するリン酸化酵素の網羅的解析	41
名古屋大学 竹藤 幹人	
⑧ IL-1ファミリーサイトカインをターゲットとしたCOPDの新規治療の開発	45
久留米大学 岡元 昌樹	
⑨ 誤嚥性肺炎予防の為に口腔ケア手法およびその専用口腔ケアジェルの開発	47
国立長寿医療研究センター 平識 善大	
⑩ 高齢者の属性や社会環境別にみたうつ症状に関する研究	55
千葉大学 佐々木由理	

- ⑪ 高齢者薬物療法の系統的なスクリーニング・アセスメント・サポート法の構築…………… 59
東北大学病院 富田 尚希
- ⑫ 地域在住中高年者に対するロコモーショントレーニングのサルコペニア予防効果の検証 …… 63
埼玉医科大学 新井 智之
- ⑬ ヒト骨格筋由来間葉系前駆細胞を用いたサルコペニア治療法の開発…………… 67
藤田保健衛生大学 上住 聡芳
- ⑭ 口腔乾燥症の発症における唾液粘性物質の役割…………… 71
国立長寿医療研究センター 山越 貴水
- ⑮ ユビキタス時代に即した高齢者のための自然な視線誘導技術と視認性評価技術の実現… 73
岡山県立大学 滝本 裕則
- ⑯ 細胞老化を制御する long non-coding RNA を用いた細胞老化状態からの回復…………… 79
国立長寿医療研究センター 岩下 雄二



I 長寿科学研究者支援事業
助成実績
採択者一覧

長寿科学研究者支援事業 助成実績

年 度	採択研究者数 (単位：人)	助成額 (単位：円)	継続・新規別 採択数
26年度	16	30,679,772	継続：6 新規：10
25年度	10	17,035,229	継続：5 新規：5
24年度	10	15,731,242	継続：6 新規：4
23年度	7	15,076,633	継続：4 新規：3
22年度	7	18,800,000	新規：7
21年度	0	0	継続：0 新規：0
20年度	4	17,012,600	新規：4
合 計	54	114,335,476	

平成26年度 長寿科学研究者支援事業 採択者名簿

No.	研究者氏名	所属機関・部局・職名	研究課題	助成額 (単位:円)	継続・新規
1	よし いけ 吉池 裕二	国立長寿医療研究センター アルツハイマー病分子病態・治療 開始プロジェクトチーム プロジェクトリーダー	オートファジー制御がタウ病態に与える影響の解析	2,000,000	継続
2	よし だ 吉田 裕孝	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 NC・企業連携共同研究部 薬理学研究室長	タウ病理伝播性細胞外タウの同定とタウを標的とした新規タウオパチー免疫学的治療法の開発	2,000,000	継続
3	いけ だ 池田 康将	徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部 薬理学分野 准教授	骨格筋委縮における鉄の意義の解明	2,000,000	継続
4	しんむら 新村 健	慶応義塾大学 医学部 内科学 (老年) 専任講師	免疫老化制御による加齢関連疾患治療戦略の確立	2,000,000	継続
5	い とう 伊東 大介	慶応義塾大学 医学部 神経内科 専任講師	疾患特異的iPS細胞と百寿者ips細胞を用いた認知症の病態解明と創薬への展開	2,000,000	継続
6	みうら 三浦 恭子	北海道大学 遺伝子病制御研究所 動物機能医科学研究室 講師	超長寿・がん化耐性齧歯類ハダカデバネズミを利用した新規老化/がん化予防機構の解明	2,000,000	継続
7	たけふじ 竹藤 幹人	名古屋大学医学部付属病院 循環器内科 病院助教	心臓・骨格筋の加齢変化を制御するリン酸化酵素の網羅的解析	2,000,000	新規
8	おかもと 岡元 昌樹	久留米大学 医学部 内科学講座 呼吸器・神経・膠原病内科部門 講師	IL-1ファミリーサイトカインをターゲットとしたCOPDの新規治療の開発	2,000,000	新規
9	へしき 平識 善大	国立長寿医療研究センター 先端診療部 歯科口腔外科 医員	誤嚥性肺炎予防の為に口腔ケア手法およびその専用口腔ケアジェルの開発	2,000,000	新規
10	さ さ き 佐々木由理	千葉大学 予防医学センター 特任助教	高齢者の属性や社会環境別にみたうつ症状に関する研究	1,000,000	新規
11	とみた 富田 尚希	東北大学病院 老年科 院内講師	高齢者薬物療法の系統的なスクリーニング・アセスメント・サポート法の構築	1,992,000	新規
12	あら い 新井 智之	埼玉医科大学 保健医療学部 理学療法学科 講師	地域在住中高年者に対するロコモーショントレーニングのサルコペニア予防効果の検証	1,992,000	新規
13	うえずみ 上住 聡芳	藤田保健衛生大学 総合医科学研究所 難病治療学研究部門 講師	ヒト骨格筋由来間葉系前駆細胞を用いたサルコペニア治療法の開発	2,000,000	新規
14	やまこし 山越 貴水	国立長寿医療研究センター 老化機構研究部 代謝研究室 室長	口腔乾燥症の発症における唾液粘性物質の役割	2,000,000	新規
15	たきもと 滝本 裕則	岡山県立大学 情報工学部 情報通信工学科 助教	ユビキタス時代に即した高齢者のための自然な視線誘導技術と視認性評価技術の実現	1,823,500	新規
16	いわした 岩下 雄二	国立長寿医療研究センター 老化機構研究部 流動研究員	細胞老化を制御する long non-coding RNA を用いた細胞老化状態からの回復	2,000,000	新規
合 計				30,807,500	

平成25年度 長寿科学研究者支援事業 採択者名簿

No.	研究者氏名	所属機関・部局・職名	研究課題	助成額 (単位:円)	継続・新規
1	よし いけ 吉池 ゆうじ 裕二	国立長寿医療研究センター アルツハイマー病分子病態・治療 開発プロジェクトチーム プロジェクトリーダー	オートファジー制御がタウ病態に与える影響の解析	1,999,733	継続
2	こん どう 近藤 いずみ 和泉	国立長寿医療研究センター 機能回復診療部 部長	高齢者の転倒リスクに対する自覚・受容能力の評価に関する研究	1,238,391	継続
3	こざわ 小澤 のぶよし 総喜	国立長寿医療研究センター 歯科口腔先進医療開発センター 室長	高齢者にも安全に用いる事が可能な薬剤含有可食性フィルムを用いた新たな歯科治療法・薬剤投与法・ドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発研究	2,000,000	継続
4	なかにし 中西 あきら 章	国立長寿医療研究センター 老化制御研究部遺伝子治療研究室 室長	血液脳関門の機能を制御する人工遺伝子エレメントの作成	2,000,000	継続
5	よし だ 吉田 ひろたか 裕孝	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 薬理学研究室長	タウ病理伝播性細胞外タウの同定とタウを標的とした新規タウオパチー免疫学的治療法の開発	1,997,105	継続
6	いけ だ 池田 やすまさ 康将	徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス部 准教授	骨格筋萎縮における鉄の意義の解明	1,000,000	新規
7	つね み ゆういちろう 常深祐一郎	東京女子医科大学 講師	高齢者施設における皮膚真菌症治療の適正化および効率化を目指した治療プロトコルの立案	800,000	新規
8	しんむら 新村 けん 健	慶応義塾大学医学部 内科学 (老年) 専任講師	免疫老化制御による加齢関連疾患治療戦略の確立	2,000,000	新規
9	い とう 伊東 だいすけ 大介	慶応義塾大学医学部 神経内科 専任講師	疾患特異的 iPS細胞と百寿者 iPS細胞を用いた認知症の病態解明と創薬への展開	2,000,000	新規
10	み うら 三浦 きょうこ 恭子	慶応義塾大学医学部 生理学 特任講師	超長寿・がん化耐性齧歯類ハダカデバネズミを利用した新規老化/がん化予防機構の解明	2,000,000	新規
合 計				17,035,229	

平成24年度 長寿科学研究者支援事業 採択者名簿

No.	研究者氏名	所属機関・部局・職名	研究課題	助成額 (単位:円)	継続・新規
1	あらい ゆみこ 荒井由美子	国立長寿医療研究センター 長寿政策科学研究部 部長	高齢社会に対する希望の醸成:「高齢期の生活実現期待」及び「高齢者観」の観点から	1,000,000	継続
2	なかい としはる 中井 敏晴	国立長寿医療研究センター 長寿医療工学研究部 神経情報画像開発研究室 室長	画像解析と脳機能計測による運動強調機能の加齢性変化の特徴抽出の研究	1,000,000	継続
3	こんどう いずみ 近藤 和泉	国立長寿医療研究センター 機能回復診療部 部長	高齢者の転倒リスクに対する自覚・受容能力の評価に関する研究	931,787	継続
4	わたなべ けん 渡辺 研	国立長寿医療研究センター 運動器疾患研究部 骨細胞機能研究室 室長	変形性膝関節症関連遺伝子の同定	2,000,000	継続
5	おざわ のぶよし 小澤 総喜	国立長寿医療研究センター 歯科口腔先進医療開発センター 歯科口腔先端診療開発室 室長	高齢者にも安全に用いることが可能な薬剤含有可食フィルムを用いた新たな歯科治療法・薬剤投与法・ドラッグデリバリーシステム (DDS)の開発研究	2,000,000	継続
6	えんどう しゅうご 遠藤 昌吾	東京都健康長寿医療センター研究所 老化制御研究チーム 研究部長	多剤併用による認知症治療を指向した基礎研究	1,000,000	継続
7	なおえ よしのり 直江 吉則	国立長寿医療研究センター 老化機構研究部 免疫研究室 室長	加齢に伴う免疫低下メカニズムの解明	2,000,000	新規
8	なかにし あきら 中西 章	国立長寿医療研究センター 老化制御研究部遺伝子治療研究室 室長	血液脳関門の機能を制御する人工遺伝子エレメントの作成	1,800,000	新規
9	よしいけ ゆうじ 吉池 裕二	国立長寿医療研究センター アルツハイマー病分子病態・治療開発プロジェクトチーム プロジェクトリーダー	オートファジー制御がタウ病態に与える影響の解析	1,999,455	新規
10	いしざき たつろう 石崎 達郎	東京都健康長寿医療センター研究所 研究部長	地域在住高齢者の医療・介護資源消費に関する研究	2,000,000	新規
合 計				15,731,242	

平成23年度 長寿科学研究者支援事業 採択者名簿

No.	研究者氏名	所属機関・部局・職名	研究課題	助成額 (単位:円)	継続・新規
1	たけした すなお 竹下 淳	国立長寿医療研究センター 研究所 運動器疾患研究部 骨代謝制御研 究室 室長	骨再生を促進する因子の同定	2,500,000	継続
2	あらい ゆみこ 荒井由美子	国立長寿医療研究センター 長寿政策科学研究部 部長	高齢社会に対する希望の醸成:「高齢 期の生活実現期待」及び「高齢者観」 の観点から	2,500,000	継続
3	なか い としはる 中井 敏晴	国立長寿医療研究センター 長寿医療工学研究部 神経情報画 像開発研究室 室長	画像解析と脳機能計測による運動強調 機能の加齢性変化の特徴抽出の研究	2,000,000	継続
4	えん どう しゅうご 遠藤 昌吾	東京都健康長寿医療センター研究所 老化制御研究チーム 研究部長	多剤併用による認知症治療を指向した 基礎研究	2,500,000	継続
5	おざわ のぶよし 小澤 総喜	国立長寿医療研究センター 先端診療部歯科口腔外科 医員	高齢者にも安全に用いることが可能な 薬剤含有可食フィルムを用いた新たな 歯科治療法・薬剤投与法・ドラッグデ リバリーシステム (DDS)の開発研究	2,500,000	新規
6	こんどう いずみ 近藤 和泉	国立長寿医療研究センター 機能回復診療部 部長	高齢者の転倒リスクに対する自覚・受 容能力の評価に関する研究	576,633	新規
7	わたなべ けん 渡辺 研	国立長寿医療研究センター 運動器疾患研究部 骨細胞機能研 究室 室長	変形性膝関節症関連遺伝子の同定	2,500,000	新規
合 計				15,076,633	

平成22年度 長寿科学研究者支援事業 採択者名簿

No.	研究者氏名	所属機関・部局・職名	研究課題	助成額 (単位:円)	継続・新規
1	たけした すなお 竹下 淳	国立長寿医療研究センター 研究所 運動器疾患研究部 骨代謝制御研 究室 室長	骨再生を促進する因子の同定	3,000,000	新規
2	あらい ゆみこ 荒井由美子	国立長寿医療研究センター 長寿政策科学研究部 部長	高齢社会に対する希望の醸成:「高齢 期の生活実現期待」及び「高齢者観」 の観点から	3,000,000	新規
3	なか い としはる 中井 敏晴	国立長寿医療研究センター 長寿医療工学研究部 神経情報画 像開発研究室 室長	画像解析と脳機能計測による運動強調 機能の加齢性変化の特徴抽出の研究	2,000,000	新規
4	かつ み あきら 勝見 章	国立長寿医療研究センター 臨床検査部 輸血管理室 医長	高齢者における後天性出血、血栓傾向 の実態調査	2,600,000	新規
5	しばさき まさたか 芝崎 正崇	国立長寿医療研究センター 包括診療部呼吸器内科 医師	高齢者肺炎の治療期間短縮、耐性化の 阻止を目的としたアミノグリコシド系 薬剤有効利用の検討	3,000,000	新規
6	さか い よしひと 酒井 義人	国立長寿医療研究センター 先端機能回復診療部骨粗鬆症科 医長	高齢者腰椎変性疾患における腰背筋活 動と腰痛の関連	2,200,000	新規
7	えん どう しょうご 遠藤 昌吾	東京都健康長寿医療センター研究所 老化制御研究チーム 研究部長	多剤併用による認知症治療を指向した 基礎研究	3,000,000	新規
合 計				18,800,000	

平成21年度 長寿科学研究者支援事業 採択者名簿

都合により、平成21年度の支援事業は実施しなかった

平成20年度 長寿科学研究者支援事業 採択者名簿

No.	研究者氏名	所属機関・部局・職名	研究課題	助成額 (単位:円)	継続・新規
1	しもかた ひろし 下方 浩史	国立長寿医療センター 研究所 疫学研究部 部長	加齢に伴う聴力障害の危険因子に関する大規模縦断研究 - 高齢者の聴力維持のために-	5,000,000	新規
2	すみ やすのり 角 保徳	国立長寿医療センター 先端医療部 口腔機能再建科 医長	光干渉断層画像診断法の高齢者口腔疾患への応用	4,000,000	新規
3	にいいいい だしゅんべい 新飯田俊平	国立長寿医療センター 研究所 運動器疾患研究部 骨代謝制御研究室 室長	経済的骨粗鬆症一次スクリーニング用検査試薬の実用化のための試験研究	3,012,600	新規
4	まるやま なおき 丸山 直記	(財)東京都高齢者研究・福祉振興財団 東京都老人総合研究所 副所長	加齢性筋減少の成因に基づく評価法の開発と高齢者集団への適用	5,000,000	新規
合 計				17,012,600	



Ⅱ 平成26年度 研究実績報告書

オートファジー制御がタウ病態に与える影響の解析

国立長寿医療研究センター
プロジェクトリーダー

吉池 裕二

研究期間 平成24年度～平成26年度（3年計画 3年目）

I. 研究活動の概要

アルツハイマー病は我が国が抱える最重要課題の一つとなっている。私はその治療法を見つけることを最終的な目的として本研究を行った。

アルツハイマー病は臨床的に学習記憶能や認知機能の低下によって特徴づけられる。これらの脳機能の障害は神経ネットワークを形成する神経細胞の消失に依るものとする考えが広く受け入れられている。神経細胞死を引き起こす原因は何かこれまでも多くの研究がされてきているにも関わらずその明確な答えは出ていない。しかし少なくとも臨床症状とよく相関する病理的变化が脳内で観察されている。それは神経原線維変化と呼ばれる病理像であり、タウタンパク質が線維状に凝集することで細胞内に蓄積して形成する。タウタンパク質は通常、微小管に着くことでその安定性を保つはたらきをする。しかし何らかの理由で微小管から遊離したタウタンパク質同士が会合し、やがて β シート化することで線維状の凝集体となる。このタウの凝集体がどのようにして神経活動を妨害するのかについてはいまだにわかっていないものの、タウ以外のタンパク質も同様な基本構造、すなわち β シート化した線維状形態の凝集体となって様々な病態で観察されることなどからすると、その線維状形態に何らかの病因があると考えられる。

微小管は常に安定な状態にある細胞内小器官で

はない。細胞の活動の状態に応じて形成と分解を繰り返すことで細胞のダイナミズムを調整しているとも言える。従ってタウが何らかの理由で微小管から遊離すること自体は正常な現象であると考えられる。またタンパク質は必ずしも単量体で機能を発揮するものばかりとは限らないため、タウ同士が会合することにも特段問題は無いように思われる。しかしそれが β シート状に多量体を形成した場合、すなわち凝集体として細胞質内の限られたスペースに出現したとしたら細胞内部の様々な機能に影響を及ぼす可能性は十分にある。

タウが凝集した線維は他のタンパク質の線維状凝集体すなわちアミロイド同様 β シートを基本骨格とした構造であることが知られている。タンパク質の機能は通常その3次構造によって決まるが、アミロイド線維については β シートという2次構造によって規定される要素が大きいように思われる。 β アミロイド線維を対象に行った私自身の研究から、アミロイド線維のたとえば神経毒性はその β シートから外側に向けて配向したアミノ酸側鎖の物理化学的性質によると考えている。特定のアミノ酸が β シート表面にならぶことで線維の軸に沿って特定の物理化学的特徴を持った領域ができる。これがタウであれば細胞内の様々な器官と接することで正常機能を阻害することになるのではないかと考えている。その物理化学的性質とは何か、またどの器官との接触が問題を生じるのかについては今後も研究したい課題である。しかし

治療法を見つけるという本研究の目標を考え、タウの凝集・蓄積をどうすれば抑制できるかということに集中することにした。

細胞内で変性したタンパク質などを分解するシステムには様々なものがある。プロテアーゼはその最もシンプルな例であり、より大きくまた複雑にからんだ凝集物を分解するシステムとしてユビキチン・プロテアソーム系やオートファジーが知られている。このように細胞にはその内部に不必要な分子を除去するためのシステムが幾重にも施されているにも関わらず、例えばアルツハイマー病においては老人斑や神経原線維変化ができてしまうのは何故かと考える。βアミロイドの蓄積は主に細胞外に見られるためそういった代謝システムでは捉えられない異常によるのかもしれないが、タウは細胞内に蓄積するのであるから何らかの理由でその分解が抑制された可能性がある。当初私はその原因はβアミロイドの蓄積であるという作業仮説を立てた。しかしβアミロイドの蓄積があるにも関わらず神経活動に異常を生じない場合もあることを考えれば、細胞の形状をかたちづくる程パンパンにタウ線維が溜るような神経原線維変化の形成を抑制できれば病気の進行も阻止可能ではないかと考えた。

分子、細胞、システム、ネットワーク、個体というように生体をなすレベルが上がれば上がる程その仕組みは複雑になる。つまりあるインプットに対して生体は様々な反応をする。アルツハイマー病は様々な原因が複雑に影響することで生じる病気であるから、ある特定の酵素反応を阻害するような戦略では解決は困難かもしれない。言い換えればin vitroで特定の分子に効くからといって個体でも効く可能性は高くはないように思われる。分子や細胞レベルでは検出が難しい現象としては補償機構や適応応答といったものがある。こういった現象を理解すればβアミロイドも低濃度では神経活動を上げるような現象を無視することはできない。また分解されずにタウが細胞内に蓄積するのは分解が低下しているのでは無く、ある程度分解系は活性化していても十分に分解しきれ

ないタウが蓄積してしまっていると考えるほうが自然である。βアミロイドなどによって抑圧された細胞の代謝・分解能力を発揮させるために少々荒療治を試みることにした。

II. 研究の成果

酸化ストレスはアルツハイマー病や老化の原因とされている。しかし私はタウの分解・代謝を促進するための方策として酸化ストレスを用いることにした。

精製したタウタンパク質の凝集を阻害するような化合物をin vitroでスクリーニングした結果アロキサンという化合物が見つかった。アロキサンは活性酸素を発生する程高い酸化活性を有する化合物であり、その発生した活性酸素がすい臓のβ細胞を破壊してマウスでは糖尿病を引き起こすことが知られている。そんな毒性の知られたアロキサンを少しだけタウの遺伝子改変マウスに投与したところ、タウの蓄積が減少していることがわかった。このとき不溶性タウだけでなく可溶性タウも減少していたことから低濃度アロキサン投与はタウの凝集抑制だけでなくタウの代謝にも影響したのではないかと考えた。

一方、タウを標的とした治療薬開発で最も進んでいるメチレンブルーもまた強力な酸化剤となることが知られている。メチレンブルーの生体内での作用機序は明確に同定された訳ではないが、オートファジーを誘導することも知られていた。最近では酸化ストレス応答に関与する分子の増加なども報告されている。そこでまずタウを発現させたショウジョウバエにメチレンブルーを投与してその効果をみることにした。その結果メチレンブルー投与はこのハエモデルの脳内における不溶性タウ蓄積を抑制することがわかった。またタウの蓄積に伴って生じる行動異常も改善することがわかった。しかしメチレンブルー投与はハエの生存率を著しく低下させただけでなく、野生型のハエの行動を悪化させるなどの毒性効果も認められた。この有効性と毒性の混在は酸化ストレスをイ

ンプットとした場合の複雑な生体反応と解釈できる。ハエモデルへのメチレンブルーの投与はオートファジー関連タンパク質レベルを増加させた。オートファジーとはそもそも細胞が飢餓状態に置かれた際に起こる現象として知られている。メチレンブルー投与により個体を死なせない程度の酸化ストレスを与えることでオートファジーを誘導させた結果、タウは代謝され生き残った細胞からなる個体は対照群に比べて行動が改善したと考えられる。しかしメチレンブルー投与により死亡した個体も存在することは事実であり、ハエの適応応答の個体差をヒトに置き換えて外挿することは容易ではない。ただ進化論的に考えればヒトのような高等動物の方がより高い適応能力を有すると考えられる。メチレンブルーはその毒性が良く知られているにもかかわらずFDA設立前から使用されてきた薬剤であり、現在進行中の臨床試験でも副作用が出たとしても有効性を示すことが期待される。しかしより安全で尚かつ有効な薬があればそれに越したことはない。そこでメチレンブルー同様の酸化活性を有しながら毒性の低い化合物を探すことにした。

メチレンブルーは光を照射すると活性酸素を発生する光感受性色素である。メチレンブルーを投与したハエから活性酸素を検出した。またメチレンブルー投与によるタウ蓄積抑制効果は光の有無に大きく依存することもわかった。私はこのようなメチレンブルーと同様な性質を持ち、かつ毒性が低いことが知られているある既存の物質に着目した。ショウジョウバエモデルへのこの物質の投与はメチレンブルーほど効果的ではなかったもののタウの脳内蓄積を抑制することがわかった。またハエモデルの行動異常を改善した一方、野生型ハエの行動を悪化させることもなく生存率も低下させなかった。更にこの物質の投与はハエモデルの短期記憶を改善した。これらの結果からこの物質はアルツハイマー病を含むタウが蓄積するタウオパチーの薬のリードとなり得ると考え特許出願したとともに論文として現在投稿中である。薬の開発を念頭に置いた場合より説得力のある実験証

拠を示す必要がある。そこで老齢のカニクイザルを用いて投与実験を開始した。これまで特に β アミロイドの蓄積を抑制するような物質の投与が効果的に脳内の β アミロイドの蓄積を抑制したにもかかわらず臨床症状を改善せず臨床試験を突破できなかった例がある。タウについては臨床症状との相関が知られているが、タウの蓄積への影響だけでなく脳機能への影響も解析しておくことが今後重要な課題となる。そこでサル の記憶学習能を測るための装置を導入して予備的な試験を開始した。

私たちは本研究においてヒトタウを発現させたショウジョウバエを用いた。ハエモデルは神経原線維変化形成を伴わないと考えられていたことから、これまでタウの蓄積に対する薬剤投与の影響をみるモデルとしては注目されてこなかった。今回、不溶性画分におけるタウの蓄積とそれに相関した行動異常を検出したことでハエモデルのタウ蓄積阻害剤のスクリーニングへの応用が可能となった。今後、これまでに見つけた既存の物質の開発も進めていくとともに、ショウジョウバエのシステムを用いてより効果的かつ安全なそして可能であれば新規の物質の探索を続ける予定である。一般的に既存の物質は知財化が難しく製薬企業の支援を得ることが困難である一方、新規化合物でも細胞毒性のあるものは抗がん剤でもない限りはじめから候補から除外されてしまう傾向がある。しかしオートファジーは種々の疾患とりわけタンパク質が蓄積する変性疾患において新たな創薬の標的として注目されているがオートファジーは細胞を飢餓状態においた場合に誘導される現象であるという認識にもとづけばオートファジー誘導剤はスクリーニングで除外される可能性が高い。本研究により培養細胞では毒性としての表現型が顕著な酸化ストレスも個体では適応応答からオートファジーの誘導によって有効性を示し得ることがわかった。また野生型ハエの行動や生存率に対する影響をみることによって個体レベルでの安全性試験が可能であることが実証できた。以上のことをまとめると *in vitro* で細胞毒性を示すよ

うな物質の中には個体で効くものもあるがそれでも安全性は重要であり、その意味では既存の物質の中で生体投与時の安全性が調べられているものは副作用の懸念が少ないといった強みもあるものの新規化合物についてもある程度の個数までならばショウジョウバエを用いて有効性と安全性をあわせたスクリーニングができることがわかった。アルツハイマー病は世界中の研究者がその解明と

克服を目指している病気の一つである。それでも難しいとすれば今までの創薬の常識を見直しても本当に効く物質が存在するのかどうかを探る必要があるように思う。本研究によって少なくともアルツハイマー病においてはこれまでの一般的な創薬開発の常識の範囲を超えたアプローチの必要性を示すことができたとすればそれは本研究のひとつの成果ではないかと考える。

タウ病理伝播性細胞外タウの同定とタウを標的とした新規タウオパチー免疫学的治療法の開発

国立研究開発法人 国立長寿医療研究センター
NC・企業連携共同研究部（エーザイ）
薬理学研究室長

吉田 裕孝

研究期間 平成25年度～平成26年度（2年計画 2年目）

I 研究活動の概要

[目的]

アルツハイマー病（AD）および前頭側頭型変性症（FTD）などのタウオパチーは認知症の主な原因となる神経変性疾患であるが、その発症機構は不明である。異常リン酸化タウからなるタウ線維の脳内蓄積は、これらタウオパチー認知症を呈する疾患の主要な病理学的特徴であり、タウ線維形成・蓄積と神経細胞死は強く相関することが報告されてきた。しかし、今世紀に入ってからの研究報告から、タウ線維よりもタウ線維が形成される過程での中間体と考えられてきたタウ・オリゴマーの重要性が指摘され、タウ・オリゴマーの多様な機能がタウオパチーにおける認知症発症に関与することが示唆された。また、タウなど神経変性疾患で蓄積する線維状異常蛋白質はプリオン様に伝播する仮説（プリオン説）がBraakらにより提唱された。2007年以降、培養細胞系あるいは動物モデル系を用いてプリオン説を検証する実験が報告されているが、本モデルにおける以下の問題点も指摘できる。

- ① 凝集核（シード）を必要とする。一次病理物質の形成機構ならびにその実体が不明である。
- ② 凝集核タンパクと宿主内発現タンパクの同一性が必要である。
- ③ 連鎖伝播性物質が不明。そしてその細胞外への放出を必要とする。

- ④ 神経回路にしたがった伝播か不明である。
- ⑤ 病理伝播の神経活動・神経細胞死への影響が不明である。

したがって、プリオン説を検証し、タウオパチーにおける認知症発症メカニズムを解明するには、

- ① どのようなタウ（モノマー、オリゴマーあるいはタウ凝集体）が認知症発症に関与するのか？
- ② タウ病理はどのようにして拡大し、認知症発症に関与するのか？

という未解決の問題を明らかにする必要がある。従来タウを標的とした認知症治療を目的とした研究では、タウのリン酸化、凝集・線維化を抑制する阻害剤の開発と投与が主な戦略であった。しかし、本来細胞内蛋白質であるタウが、タウ病理伝播能を有し細胞外に放出されることが明らかになれば、細胞外タウを標的とした治療が可能である。したがって、細胞外タウの性質ならびに細胞外への放出機構を解析することにより、①病理伝播型タウの特異的な排除、②病理伝播型タウの細胞外放出の抑制、および③病理伝播型タウの細胞内取り込みの抑制により本疾患の進行を抑える戦略にもとづく新規治療ならびに創薬に結びつけられるものと期待される。

本研究課題では、培養細胞系ならびに野生型あるいは認知症モデルマウスを用いて

- ① タウ病理伝播性タウ（あるいは細胞外タウ）の同定と解析

② タウ病理伝播性タウ（あるいは細胞外タウ）
の生物学的機能の解析

③ タウの細胞外放出機構の解明

することによりプリオン説の検証を行ない、これまで不明である本疾患発症過程におけるタウ病理拡大機構の解明とタウ病理伝播抑制する戦略に基づく治療法の開発をめざすことを目的とし研究を遂行した。

[活動内容]

①細胞外タウの検出と生化学的性質の解析

HEK293ならびにSHSY 5Y細胞にタウを発現すると、細胞内タンパク質であるタウが細胞培養液中にも抗タウ抗体をプローブとしたイムノブロット法により検出されることから、タウが細胞外に放出されることをこれまでに見いだしている。同試料をBlue-Native電気泳動によりタンパクを分離した後、抗タウ抗体をプローブとしたイムノブロット法により解析した結果、複数の大きさのタウ・オリゴマーが検出された。同培養細胞を回収し、その抽出液をBlue-Native電気泳動後同様にしてイムノブロット法を行い、細胞内のタウを解析した結果、複数の大きさのタウ・オリゴマーが検出されたが、細胞培養液中のオリゴマーよりも大きさの小さいオリゴマーの割合が大きかった。

野生型マウスを用いたマウス脳マイクロダイアリシス法による回収液中にタウが検出されることをこれまでに見いだしているので、同様の実験を本回収液とマウス脳抽出液を用いて行った。その結果、両試料ともタウ・モノマーおよびタウ・オリゴマーが検出され、マウス脳抽出液中では大きさの小さいオリゴマーの割合が大きかった。

以上の培養細胞ならびにマウス脳では細胞外に放出されるタウは細胞内のタウよりも大きいオリゴマーであることが示された。

②タウの細胞外放出に関与するタウ分子内領域の

解析

タウには微小管結合領域をはじめとして特徴的な領域があるので、これらがタウの細胞外放出に関与するものか、N末端領域欠損、微小管結合領域欠損、C末端欠損ならびに微小管結合領域のみの変異タウを培養細胞に発現し、細胞内で発現したタウおよび培養細胞液中のタウの定量を行いその量比を比較した。その結果、C末端領域欠損変異タウ、微小管結合領域のみのタウがもっとも多く細胞外に放出され、これにN末端領域欠損変異タウ、野生型（全長）タウ、微小管結合領域欠損変異タウが続いた。以上の結果からタウ分子内にはタウの細胞外放出に不可欠な領域は存在しないことが示されたが欠損する領域によって放出量が異なるので、そのメカニズムを調節する領域が存在することが示唆された。

③家族性タウオパチーFTDP-17で発見された変異P301Sおよび凝集抑制変異のタウの細胞外放出に与える影響の解析

家族性タウオパチーFTDP-17で発見されたP301S変異は若年性タウオパチーを発症させ、分子レベルでは微小管重合促進能の低下とともに、タウの凝集を促進する。またタウの微小管結合量域内の二重変異I277PとI308Pはタウ凝集抑制効果があることが報告されている。そこで、これらの変異がタウの細胞外放出に及ぼす影響を①と同様にして解析した。その結果、野生型タウとP301S変異タウでは細胞外放出量に有意差は認められなかったが、タウ凝集抑制変異タウとでは有意にタウ凝集抑制変異タウの放出量の低下が認められた。①のBlue-Native電気泳動に続くイムノブロット法による実験結果から、モノマー状のタウも細胞外に放出されていることから、タウのオリゴマー化が放出に必須とは言い切れないが、I→Pへのアミノ酸置換変異によるタンパク質のコンフォメーション変化がこれに影響すると考えられた。

④ タウ細胞外放出を調節する化合物のスクリーニング

タウを発現する SHSY5Y 細胞を用いてタウ細胞外放出を調節する化合物のスクリーニングを行った結果、イオンチャンネル作用物質、細胞内輸送作用物質などの化合物の中にタウの細胞外放出を亢進あるいは抑制する化合物があることがわかった。この結果は、タウの細胞外放出が細胞活動の結果であることを示唆するものである。

II 研究の成果

本研究においてタウを発現する培養細胞ならびにマウス脳において細胞外にタウが放出されること、そしてこの現象とタウ・オリゴマーの形態が関連する可能性が示唆された。またタウの細胞外放出が化合物により生理的に調節可能であること

がわかった。本研究であきらかとなったタウの細胞外放出を調節する化合物を応用することにより細胞外タウの詳細な性質の解析とタウ・オリゴマーの形成と細胞外タウ放出メカニズムを解明することにより、細胞外タウを標的とした治療法への応用が可能性であると期待される。

学会発表国内外において学会発表された。

Yoshida H.

Identification and characterization of extracellular tau.

The Society for Neuroscience Annual Meeting 2014, Washington, D.C., U.S.A., November 19, 2014

吉田裕孝

「細胞外タウの生化学的解析」第33回日本認知症学会学術集会，横浜市，2014年11月29日－12月1日

骨格筋萎縮における鉄の意義の解明

徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部
薬理学分野 准教授

池田 康将

研究期間 平成25年度～平成26年度（3年計画 2年目）

I 研究活動の概要

本研究の目的は、骨格筋萎縮病態における鉄の役割を解明することによって、鉄が骨格筋萎縮の病態評価ならびに治療介入標的となりうるか、その基盤構築のための基礎的知見を集積することである。

鉄は必須微量元素元素である一方で、Fenton反応触媒を介した酸化ストレス産生することによって、各種病態の発症、進展に関与することが知られている。生体内鉄量が増加することで、実験動物モデルでは骨格筋萎縮が引き起こされること、また臨床研究でも、生体内鉄量と骨格筋量が負の相関を有することが報告された。しかし鉄による骨格筋萎縮メカニズムは未解明のままであった。

昨年度の研究によって、鉄過剰マウスモデルでは骨格筋萎縮が引き起こされること、筋萎縮関連因子ユビキチンリガーゼE3であるAtrogin-1やmuscle ring finger protein-1 (MuRF1) のatrogenes発現が増加すること、ユビキチンリガーゼE3制御に関わるAkt-FOXO3経路が抑制されることを見出した。培養骨格筋細胞を用いた検討では、FOXO3 siRNA導入によって鉄によるatrogenes発現増加ならびに骨格筋萎縮が抑制されることを明らかにした。

昨年度の研究成果をふまえて、今年度はさらなる知見を得るための基礎的研究と平行して予備的

な臨床研究を行った。

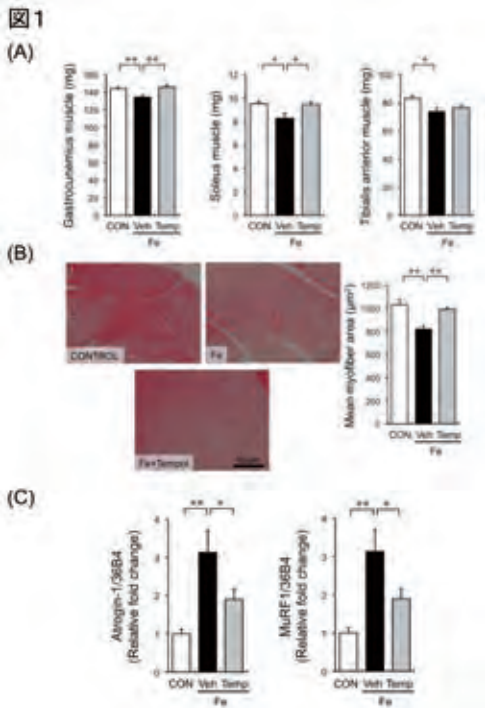
- ① 抗酸化剤が鉄誘導性骨格筋萎縮を抑制するか検討を行った。抗酸化薬にはテンポールを使用した。培養骨格筋細胞とマウスへの鉄負荷を行い、in vitro, in vivoの両面から検討した。In vitroでは骨格筋横径、リアルタイムPCR法でのatrogenes発現、ウエスタンブロット法でのAkt,FOXO3リン酸化を検討した。In vivoでは病理組織での骨格筋断面積に加えて、同様にatrogenes発現とAkt/FOXO3リン酸化を検討した。また酸化ストレスはDihydroethidium (DHE) 染色によるスーパーオキシド検出により評価した。
- ② 鉄過剰とならんで鉄欠乏も問題となる。鉄欠乏による骨格筋への影響を確認するためにマウスを用いて検討した。低鉄飼料は正常飼料をベースとしたと鉄含有が1/10のものを用いた。検討項目は骨格筋重量、病理組織による骨格筋断面積、リアルタイムPCR法でのatrogenes発現、ウエスタンブロット法でのAkt,FOXO3リン酸化によって正常飼料群と比較した。培養骨格筋での検討では鉄キレート剤(DFO)を使用した。
- ③ ヒトに骨格筋量と生体内鉄マーカとの関連の検討を行うため、徳島大学病院循環器内科に通院中の126名の患者における、骨格筋量と血清フェリチン濃度ならびに血清鉄濃度との関連を比較、検討を行った。骨格筋量はIn

Body720を用いたインピーダンス法によって算出した。なお臨床研究を行うにあたって、徳島大学臨床研究倫理委員会の承認を得た後、実施した。

II 研究の成果

(1) 鉄による骨格筋萎縮メカニズムと酸化ストレス

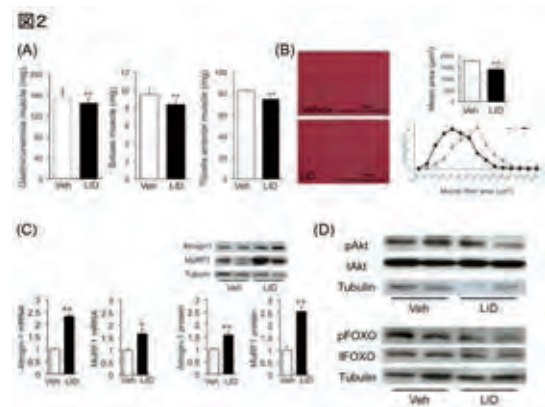
鉄負荷によって培養骨格筋細胞、マウス骨格筋ともにDHE染色輝度は増加した。in vitroにおいて鉄負荷によって引き起こされる骨格筋萎縮、atrogenes発現増加、Akt-FOXO3経路リン酸化抑制は、テンポール前処置によって回復した。またマウスへのテンポール投与によって鉄による骨格筋重量・筋断面積低下の抑制(図1 A, B)ならびにatrogenes増加は抑制(図1 C)された。



(2) 鉄欠乏による骨格筋萎縮への影響

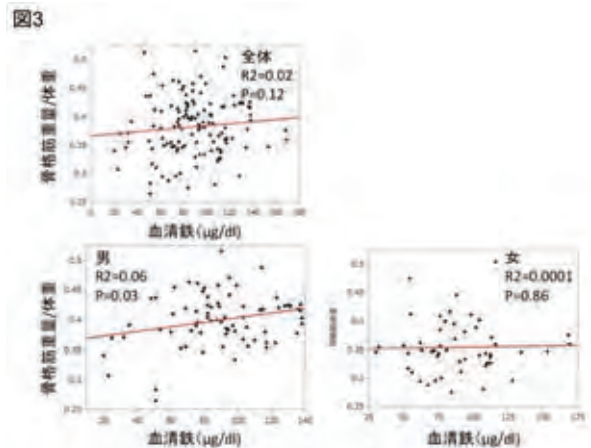
正常飼料群 (ND)、低鉄飼料群 (ID) に分けて、一ヶ月後にサンプリングを行った。ND群と比較して、ID群では軽度の貧血がみられ、骨格筋鉄量は約3/4に低下した(図2 A)。骨格筋重量はID群で低値であり、病理組織像での

骨格筋断面積も同様に低値であった(図2 B)。Atrogenes遺伝子発現はID群で増加しており(図2 C)、Akt-FOXO3のリン酸化はID群で抑制されていた(図2 D)。培養骨格筋細胞での検討では、DFO処置によって骨格筋萎縮が引き起こされ、in vivo同様にAkt-FOXO3経路の抑制、atrogenes発現増加を認めた。FOXO3 siRNA導入によって、DFOによる骨格筋萎縮は抑制された。



(3) ヒトにおける生体内鉄量と骨格筋量の関連評価

平均年齢69歳、男性74名、女性52名、平均BMI23.7、平均骨格筋量35.6%、平均血清鉄89.0 µg/dl、平均血清フェリチン値105.3ng/mlであった。骨格筋量と血清フェリチン値について、全体では有意な相関は認めず、また男性のみ、女性のみと分けて検討しても同様であった。しかしながら骨格筋量と血清鉄について、全体、女性のみでは相関はみられなかったが、男性では弱い正相関が認められた(R²=0.06, p<0.03)(図3)。



本研究によって、鉄過剰、鉄欠乏ともに Akt-FOXO3-atrogenes を介した骨格筋萎縮に関与することが明らかとなった。しかし臨床的な検討では、骨格筋量と血清フェリチンには相関がみられず、骨格筋量と血清鉄濃度には正相関していた。今回の対象とした患者群は外来通院可能な、いわゆるサルコペニア基準を満たすものがいなかったことが影響した可能性がある。生体内鉄量と骨格筋鉄量の臨床的な関連性については、今後さらなる検討が必要と思われた。

免疫老化制御による加齢関連疾患治療戦略の確立

慶應義塾大学 医学部 内科学（循環器内科） 専任講師（平成26年11月31日まで）
 兵庫医科大学 内科学総合診療科 主任教授（平成26年12月1日から）

新村 健

研究期間 平成25年度～平成26年度（2年計画 2年目）

I 研究活動の概要

本研究の目的は、加齢に伴う免疫機能の変化、特にT細胞機能の低下が、加齢関連疾患の発症や高齢者の循環器疾患の病態とその進展において果たす役割を解明すること、次に免疫老化に対する介入法を開発し、それが加齢関連疾患や高齢者の循環器疾患への新たな治療戦略となりうるかを明らかにすることである。

加齢に伴う燻り型の慢性炎症（Inflammaging）は、老化の本質的現象とも考えられ、加齢関連疾患の発症・進展や、高齢者での感染症重篤化・遷延化に寄与している。加齢に伴う免疫系の変化は、特異的獲得免疫応答性の低下と向炎症性応答の増強からなり、これらは“免疫老化”と呼ばれている。この免疫老化は、胸腺萎縮によるT細胞の枯渇に加え、特徴的な機能を持つ特殊なCD4 T細胞（programmed cell death-1 [PD-1] 陽性記憶型CD4陽性 T細胞）分画の出現・増加による可能性がある（Shimatani 他。PNAS 2009; 106:15807-12）。しかしこれまで、PD-1陽性記憶型T細胞が、加齢関連疾患の発症・進展に関与することを証明した研究はなく、またPD-1陽性記憶型T細胞を標的とした分子標的治療が、これらの発症・進展予防に有効な新規治療戦略となりうるかも検討されていなかった。

そこで本研究では、免疫老化への介入の標的細胞として、加齢に伴い増加し炎症促進効果を担う

PD-1陽性記憶型T細胞に着目し、基礎的、臨床研究を実施した。H26年度に我々は、マウスにおいて加齢や食事性肥満に関連したインスリン抵抗性の発症に伴いPD-1陽性記憶型T細胞発現が脂肪組織において増加することを確認し、PD-1を標的とする分子生物学的製剤が、これらの病態において新たな治療法となりうる可能性を明らかにした。引き続きH27年度は、①食事性肥満によりPD-1陽性記憶型T細胞が増加する分子機序、②脂肪組織におけるPD-1陽性記憶型T細胞と他の炎症性細胞との相互関係、③PD-1陽性記憶型T細胞によるインスリン抵抗性の誘導機序、を解明することを目的とした基礎的研究を継続した。臨床研究では、ヒトにおいてもPD-1陽性T細胞が糖代謝異常の合併で増加することを明らかにした。

実験① 脂肪組織における炎症性細胞の kinetics

4週齢の雄性C57Bマウスを2群に分け、1群は通常食、他群は高脂肪食の自由摂取条件で飼育した。6週齢、8週齢、12週齢の時点で、内臓脂肪を摘出し、免疫染色法、real-time PCR法により、マクロファージ、好中球、好酸球、B細胞、T細胞の浸潤数と局在、炎症性サイトカイン発現を評価した。インスリン抵抗性の出現時期とPD-1陽性記憶型T細胞出現の時相を対比した。

実験② PD-1陽性記憶型T細胞の adoptive transfer

我々は18週齢で、高脂肪食飼育マウスの内臓脂肪にPD-1陽性記憶型T細胞が高率で存在することを確認した。そこで18週齢の食事性肥満マウス

の内臓脂肪からPD-1陽性記憶型T細胞を抽出し、痩せ非糖尿病マウスの内臓脂肪にエコーガイド下に移植した。経口ブドウ糖負荷試験、インスリン負荷試験を実施し、インスリン抵抗性の出現を観察した。

実験③ PD-1陽性記憶型T細胞の性状解析

18週齢の食事性肥満マウスの内臓脂肪からPD-1陽性記憶型T細胞を抽出し、抗原刺激下での増殖能を評価し、PD-1陰性CD4陽性、PD-1陰性CD4陰性T細胞と比較した。またPD-1陽性記憶型T細胞における増殖機能、サイトカイン産出能、遺伝子発現レベル、細胞老化、DNA傷害を評価した。

実験④ T細胞におけるPD-1発現誘導実験

食事性肥満マウスまたは痩せ非糖尿病マウスから内臓脂肪組織を摘出し、ナイーブT細胞との共培養を行い、T細胞におけるPD-1の誘導を観察した。またT細胞でのPD-1誘導におけるマクロファージの役割を明らかにする目的で、in vitroにおいて18週齢の食事性肥満マウスの内臓脂肪からマクロファージを抽出し、6週齢のマウス脾臓から抽出したPD-1陰性T細胞と共培養した。in vivoにおいてはクロドロネートリポゾーム腹腔内投与することによりマクロファージをin vivoで除去したマウスにおいて高脂肪食飼育を行い、PD-1陽性記憶型T細胞の出現を評価した。

実験⑤ ヒトにおける循環血中PD-1陽性T細胞出現率と糖尿病の関連

慶應義塾大学病院通院中の40歳から60歳の非糖尿病および糖尿病患者から、書面と口頭両方による研究説明を行った後、書面による同意が得られた場合のみ、末梢循環血液を通常採血法により20mL採取した。採取血液は直ちにFACS解析に使用し、末梢循環血中のPD-1陽性T細胞の割合を検討した。

II 研究の成果

(1) 脂肪組織における炎症性細胞の kinetics

高脂肪食負荷開始後2週間の時点（6週齢）

から内臓脂肪においてマクロファージの有意な増加が見られ、経時的に漸増した。CD4+T細胞の内臓脂肪における増加は、高脂肪食開始後6週の時点（10週齢）で初めて有意であったが、PD-1陽性記憶型T細胞は、マクロファージと同様に6週齢の時点から有意に増加し、経時的に漸増した。B細胞は6週齢の時点から有意に増加したが、その後は数の増加が見られなかった。好酸球は6週齢の時点で最も増加し、その後漸減し、18週齢では通常食飼育群と差を認めなかった。好中球は、両群間で差を認めず、18週齢でのみ高脂肪食負荷群で増加していた。免疫染色検査による観察では、PD-1陽性T細胞は、王冠様構造の中に局在し、マクロファージと一緒に死につつある脂肪細胞を取り囲んでいた。これらの結果より脂肪組織の炎症において、マクロファージとともにPD-1陽性T細胞が早期の段階から関与している可能性が示唆された。

(2) PD-1陽性記憶型T細胞の adoptive transfer

PD-1陽性T細胞を熱可逆性ゼラチンポリマー (Mebiol gel) の溶解し、エコーガイド下に通常食で飼育した6週齢のレシピエントマウスの内臓脂肪に直接的に注入した。1回あたり 1×10^6 個の細胞を4週齢のマウスに週3回2週間にわたって移植した結果、Mebiol gelのみを注入した対照群と比べ、内臓脂肪におけるマクロファージ数は有意に増加し、その極性はM1優位とシフトした。PD-1陽性T細胞移植群では、内臓脂肪において王冠様構造が出現し、耐糖能異常とインスリン抵抗性が確認された。この結果より、PD-1陽性T細胞は内臓脂肪の炎症とインスリン抵抗性を惹起しうることが確認された。

(3) PD-1陽性記憶型T細胞の性状解析

PD-1陰性CD4+T細胞と比べると、PD-1陽性CD4+T細胞はTCR刺激下の増殖能は有意に低かった。PD-1陽性CD4+T細胞は、PD-1陰性CD4+T細胞と比べ、TCR刺激下の標準的なリンパ球性サイトカイン (IL-2やIFN γ) の分泌

能は著しく低かった一方、炎症性サイトカインであるオステオポンチンやIL-6の分泌能は著しく高かった。PD-1陽性CD4⁺T細胞ではリンパ系の細胞で発現の高いsatb1の発現が低く、一方myeloid系の細胞に発現するC/EBP α の発現が高かった。PD-1陽性記憶型T細胞は高率にp21WAF1/CIP1を発現していたが、PD-1陰性記憶型T細胞ではその発現はみられなかった。さらにPD-1陽性記憶型T細胞ではPD-1陰性記憶型T細胞と比べ、H2AX (pS139)の発現レベルが高かった。これらの所見から、PD-1陽性記憶型T細胞は、DNA傷害反応(DNA damage response)に特徴的な性質を持ち、リンパ系からmyeloid系の形質転換していることが示唆された。

(4) T細胞におけるPD-1発現誘導実験

内臓脂肪組織とナイーブT細胞との共培養では、T細胞におけるPD-1の誘導を観察できなかった。肥満が自己免疫状態と関連することを示唆する報告は多くみられる。そこで我々は、PD-1陽性T細胞は自己反応性T細胞由来ではないかと推測した。痩せ非糖尿病マウス

から抽出したPD-1陰性T細胞は、食事性肥満マウスの内臓脂肪由来の脂肪組織マクロファージと共培養することによってPD-1陽性T細胞へと変化した。

in vivoにおいて高脂肪食負荷時にクロドネートリポゾーム治療によりマクロファージを除去すると、内臓脂肪におけるPD-1陽性T細胞の割合は、対照となるPBS投与群と比べ有意に減少していた。

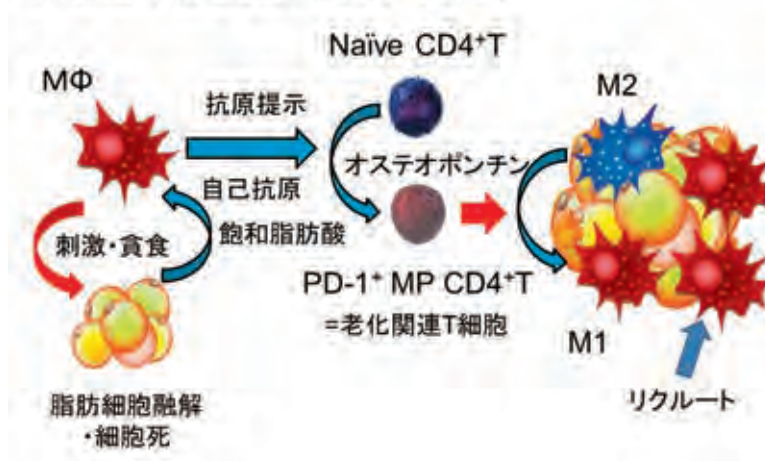
以上の結果から我々が考える図1に脂肪組織における炎症惹起におけるマクロファージとT細胞の相互関係に関する仮説を示す。

(5) ヒトにおける循環血中PD-1陽性T細胞出現率と糖尿病の関連

年齢をマッチさせた非糖尿病患者または糖尿病患者から文書による同意を得て末梢血を採取した。FACS解析を行うと、糖尿病患者では非糖尿病患者と比べ、PD-1陽性CD4⁺T細胞の割合が有意に増加していた。

H26年度の成果と合わせて現在論文を修正中であり、近日再投稿する予定である。

脂肪組織における炎症惹起におけるマクロファージとT細胞の相互関係に関する仮説



疾患特異的iPS細胞と百寿者iPS細胞を用いた 認知症の病態解明と創薬への展開

慶應義塾大学 医学部神経内科
専任講師

伊東 大介

研究期間 平成25年度～平成26年度（2年計画 2年目）

I 研究活動の概要

急速な高齢化でわが国の20年後には、65歳以上の人口が総人口のおよそ3分の1を占めるようになる」とされる。85歳以上の4人に1人が認知症であると報告されており、画期的な治療法・予防法が出現しない限り認知症患者の数は増加し、2030年には約350万人に達すると予測されている。認知症における医療、介護はわが国において最も大きな課題の一つといえる。頻度の高い認知症であるアルツハイマー病（AD）やパーキンソン病（PD）の病態解明にはある一定の進展がみられているが、近年の根本治療をめざした臨床治験ではほとんどで有効性を示せずにいる。疾患の診断、病態解明・治療法開発には、患者自身の障害組織を用いた研究が最も望ましいが、脳組織の場合その入手は侵襲性、技術的な問題により困難であり神経疾患診断、解析の大きな障壁となっている。2006年、山中らは体細胞を用いて、ES細胞に匹敵する多分化能を有するinduced pluripotent stem (iPS) 細胞の樹立に成功した。この技法を応用して患者由来iPS細胞を樹立することができれば、その多能性を基に、疾患に関連した臓器を含む種々の組織を誘導することができる。本研究では、孤発性AD、PDに注目し、iPS細胞を作成、 α シヌクレインの蓄積機構、脆弱性を解析、iPS細胞を用いた分子病態の解明、薬剤スクリーニング系そして脳生検に代わる診断法の確立を目標とする。

Common diseaseを主眼と置いた本プロジェクトは本邦の認知症医療の改善、医療費、介護費の削減に大きな貢献を示すとともに、我が国の医療産業の国際競争力の強化と「高齢者医療技術立国」としての我が国の国際的地位向上も期待できる。

初年度は、頻度の高い孤発性ADのiPS細胞の作製と解析を中心に行った。apoEの遺伝子多型を考慮して4症例（Coriell Cell Repositories AG21158:AD; apoE2/4、AG11368:AD; apoE4/4、AG10788:AD; apoE4/4）の皮膚線維芽細胞よりiPS細胞を作成した。近年の研究よりamyloid β の分子病態に関して、amyloid β 数分子が重合したオリゴマー、ターン構造を有する毒性の配座異性体やpyroglutamyl化したamyloid β がシナプス障害、神経細胞への毒性に重要とする知見があることから、iPS細胞由来分化誘導後神経細胞のamyloid β のオリゴマーをAnti Oligomer (A11)で、毒性の配座異性体をAnti-Human Amyloid β E22P (11A1)で、pyroglutamyl amyloid β をAnti-Oligo Pyro-Glu A β , Mouse-Mono (9D5)を用いて検討した。分化誘導後2週間の時点では、オリゴマー、毒性の配座異性体やpyroglutamyl化amyloid β いずれも培養液中には検出されなかった。以上から毒性の高いamyloid β の検出には、培養時間の延長、アストログリアとの共培養が必要と考え、さらなる検討を進めている。

次年度以降は、孤発性PDに疾患ターゲット絞

り研究を進めている。近年、アストロサイトによるニューロンの保護効果の減弱がパーキンソン病の進展と関与していることが示唆されている。Aim1では、PD患者から樹立したiPS細胞株由来のドパミンニューロンとアストログリアの脆弱性の検討を行った。正常コントロールとして百寿者、孤発性PD患者とPARK4 (α -Synuclein 3倍体)の家族性PD患者からiPS細胞株を樹立し、分化させたドパミンニューロンやアストロサイトに H_2O_2 を添加し酸化ストレスに対する応答を評価した。本実験では、アストロサイトにおいてニューロンより強い脆弱性が観察された。現段階ではコントロールとPDで脆弱性の差異は確認できていないが、本研究によりPD由来アストログリア産出と解析に成功した。今後は、PDの病態においてドパミンニューロンのみならずアストロサイトにおける病態把握にも解析を進めていきたい。

二つ目のプロジェクトとして、Gaucher病患者(L444Pホモ変異)由来iPS細胞を用いた孤発性パーキンソン病の遺伝子リスク glucocerebrosidase (GBA) による分子病態の検討を進めた。孤発性パーキンソン病の発症遺伝子リスクとしてGaucher病の原因遺伝子GBA 遺伝子の変異が見出されているが、その分子病態は不明である。本プロジェクトでは、Gaucher病患者(L444Pホモ変異)由来iPS細胞を樹立し、GBA活性と α シヌクレインの蓄積機構との関連を明らかにすることを目標とした。L444Pホモ変異Gaucher病患者由来iPS細胞を作成した。酵素活性を測定したところ、患者由来線維芽細胞では活性は極めて低値であったが、リプログラミング後、さらに神経細胞分化誘導後ではその活性がほぼ正常に回復していた。L444P変異は、ライソゾームへのtraffic障害により活性低下が起こると考えられているが、我々の結果より幹細胞、分化後細胞種によりGBAのtraffic障害が改善されて変異GBAの活性が回復する可能性が考えられた。今後は、神経細胞でのGBAの輸送機構と α シヌクレインの蓄積メカニズムを明らかにするとともに、本疾患iPS細胞を用いて薬剤スクリーニング系の確立を目指す。

最後に、本プロジェクトにより本理研バイオリソースセンター(BRC)に疾患iPS細胞12株を寄託し本邦の幹細胞研究に大きな貢献をはたしている。

II 研究の成果(2年度のみ)

審査評価委員会より 課題を絞る様コメントを頂いたことより、本年度は孤発性PDに疾患ターゲット絞り二つのプロジェクトを中心に解析を進めた。

Aim1. パーキンソン病患者から樹立したiPS細胞株由来のドパミンニューロン、アストログリアの脆弱性の検討

PDは中脳黒質のドパミンニューロンが変性脱落するため、その機能を果たせず発症する疾患である。現在失われたドパミンを補充する治療法が中心となっている。一方で、アストロサイトはニューロンへアミノ酸・グルコース・水分の供与を行うだけでなく、ホルモンなどの選択的透過を司っている。この血管—アストロサイト—ニューロンの三者の総合的關係はNeurovascular unit (NVU) と呼ばれ、パーキンソン病のような神経変性疾患においてもNVUの機能の重要性が論じられるようになり、アストロサイトによるニューロンの保護効果の減弱がパーキンソン病の進展と関与していることが示唆されている。

本研究では、正常と考えられる百寿者、孤発性PD患者とPARK 4 (α -Synuclein 3倍体)の家族性PD患者からiPS細胞株を樹立した。Stem Cell Technologies 社のSTEM-Neural Differentiation Kit[®]を用いることで分化させたドパミンニューロンやアストロサイトに H_2O_2 を添加し酸化ストレスに対する応答を評価した。

これらのiPS細胞からはチロシン水酸化酵素(TH)陽性のドパミンニューロンおよびGFAP陽性のアストロサイトが形成されることがわかった。この培養系に酸化ストレスである H_2O_2 を添加するとニューロン数に変化は見られなかったが、

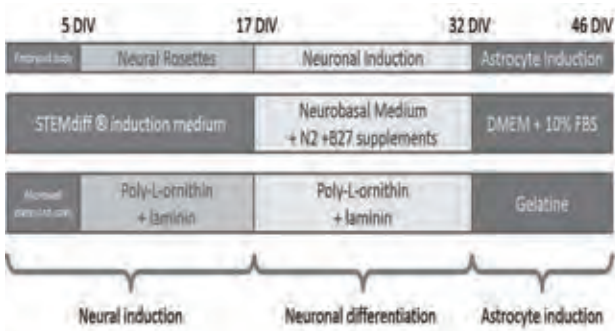


図1 ヒトiPS細胞からのドパミンニューロン分化とアストロサイト誘導法

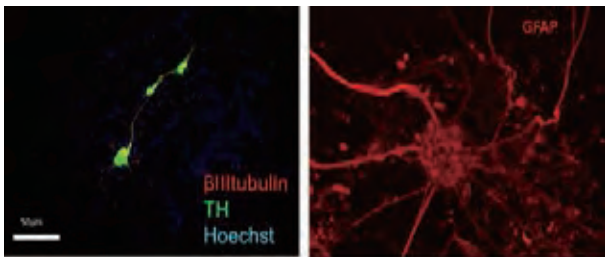


図2 ヒトiPS細胞から作製されたドパミンニューロン分化とアストロサイト

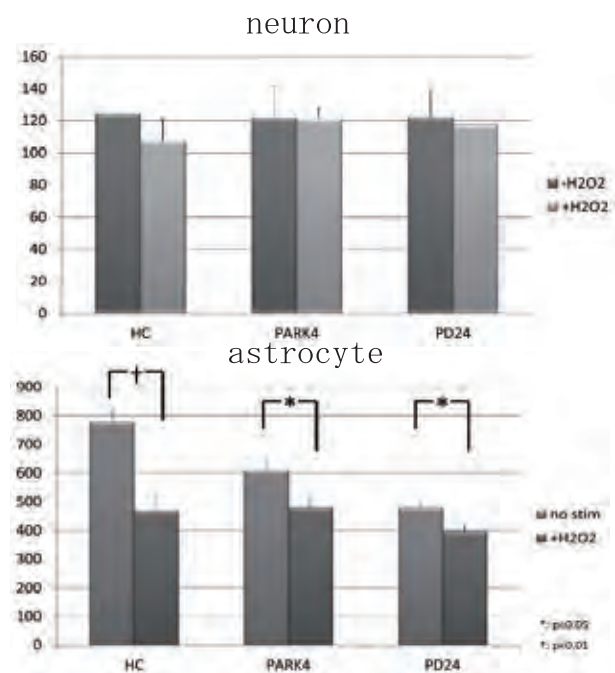


図3 H₂O₂刺激によりニューロン数は変化しないものの、アストロサイト数が有意に減少

アストロサイト数が有意に減少していることが観察された。現段階ではコントロールとPDで脆弱性の違いは確認できていないが、本研究によりPD由来アストログリア産出、解析に成功した。今後アストログリアにおける分子病態の検討も展開していきたい。

Aim2. Gaucher病患者 (L444P ホモ変異) 由来 iPS細胞を用いた孤発性パーキンソン病の遺伝子リスク glucocerebrosidase による分子病態の検討

孤発性パーキンソン病の発症遺伝子リスクとして Gaucher 病の原因遺伝子 glucocerebrosidase (GBA) 遺伝子の変異が見出されているが、その分子病態は不明である。本研究では、Gaucher 病患者 (L444P ホモ変異) 由来 iPS細胞を樹立し、glucocerebrosidase 活性と α シヌクレインの蓄積機構との関連を明らかにすることを目的とする。L444P ホモ変異 Gaucher 病患者由来線維 (GM07968) が細胞を Coriell 社より購入し、Human iPS Cell Generation™ Vector Set (Takara) を用いて、iPS細胞を作成した (図4-6)。L444P 変異は、ライソゾームへの traffic 障害

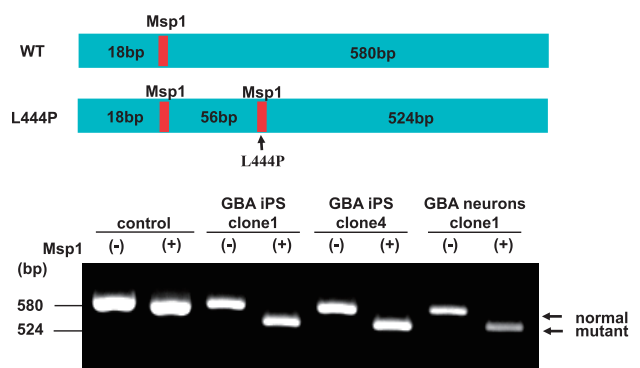


図4 Gaucher 病患者 (L444P ホモ変異) 由来 iPS細胞の genotyping PCR-Restriction Fragment Length により reprogramming 後 iPS細胞の変異を確認した。

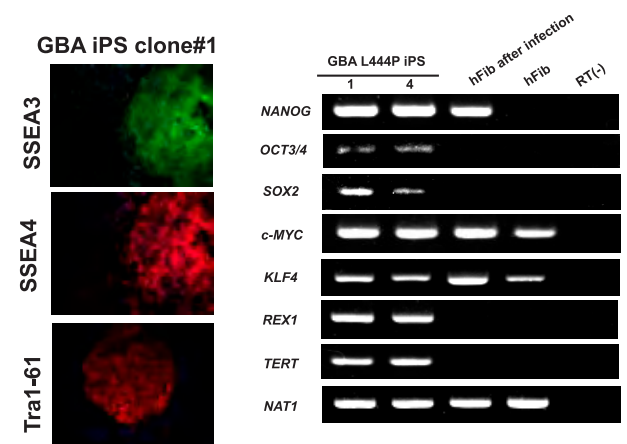


図5. Gaucher 病患者 (L444P ホモ変異) 由来 iPS細胞の pluripotency marker 免疫染色、RT-PCR にて pluripotency marker の発現を確認した。

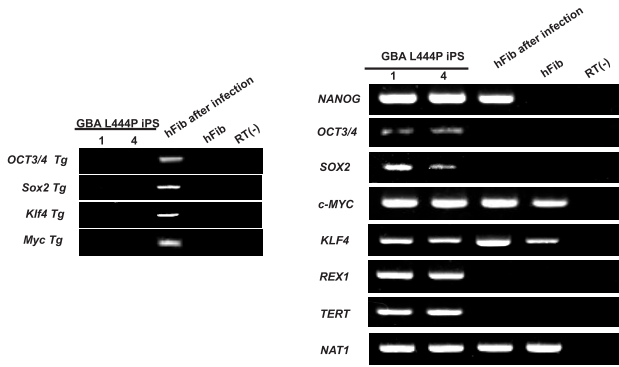


図6 Gaucher病患者（L444Pホモ変異）由来 iPSC細胞のTransgeneと内因性 pluripotency マーカーのRT-PCR解析

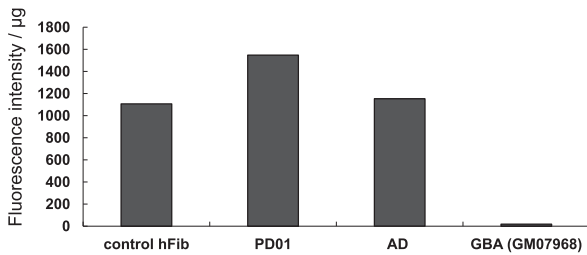


図7 線維芽細胞での β glucosidase 酵素活性 PD01:孤発性PD線維芽細胞、AD:家族性AD線維芽細胞

により活性低下が起こると考えられている。酵素活性を測定したところ、患者由来線維芽細胞では活性は極めて低値であったが（図7）、驚くべきことにリプログラミング後ではその活性がほぼ正常に回復していた（図8）。さらに神経細胞に分化誘導後しても活性は正常保たれていた（図9）。遺伝子解析の結果からは、L444Pホモ変異iPS細胞に他のiPS細胞の混入は否定している（図4）。以上から幹細胞、分化後細胞種により traffic 障害

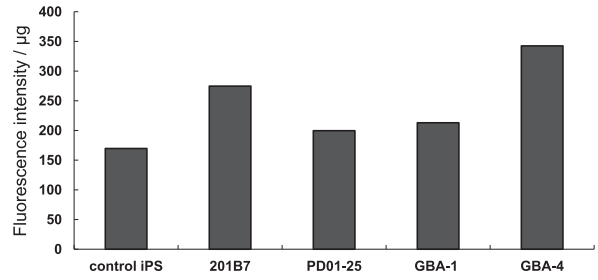


図8 iPSC細胞での β glucosidase 酵素活性 control iPS: 百寿者iPS細胞、201B7:健康者由来iPS細胞、PD01-25:孤発性PD iPS細胞

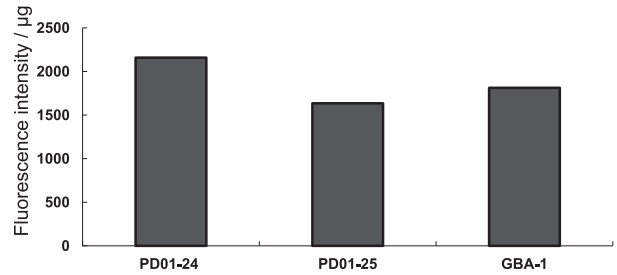


図9 分化誘導後神経細胞での β glucosidase 酵素活性 PD01-24、1-25:孤発性PD iPS細胞

が改善されて変異 glucocerebrosidase の活性が回復すると考えられた。現在、Gaucher病iPS細胞を血球系細胞に分化誘導し、glucocerebrosidase の活性低下の再現の確認を進めるとともに、 α シヌクレインの蓄積を検討している。今後は、神経細胞での glucocerebrosidase の輸送機構と α シヌクレインの蓄積メカニズムを明らかにするとともに、本疾患iPS細胞を用いて薬剤スクリーニング系の確立を目指す。

超長寿・がん化耐性齧歯類ハダカデバネズミを利用した新規老化／がん化予防機構の解明

北海道大学 遺伝子病制御研究所
動物機能医科学研究室 講師

三浦 恭子

研究期間 平成25年度～平成26年度（3年計画 2年目）

研究活動の概要

ハダカデバネズミ (Naked mole rat, DEBA) は、マウスと同等の大きさながら異例の長寿（平均寿命28年）かつ生存期間の約八割の間は老化の兆候を示さない、老化耐性哺乳類である。また、自発的な腫瘍形成が一切確認されていない（N = 800）。本研究の目標は、DEBAの老化耐性・がん化耐性の機構／関与因子を同定し、最終的には、関与因子をマウスに導入することによりマウス個体においてDEBAの老化耐性・がん化耐性の特徴を再現することである。本年度は、申請者が北海道大学において独立したことにより、新たに研究室・飼育室の設立・慶應大からのDEBA個体の移動が必要になったが、無事に動物の移動も完了し、9月から研究室を本格的に稼働させることができた。本報告書では、

1. 遺伝子発現をDEBA-iPS型に改変したマウス

iPS細胞における腫瘍化耐性能獲得の有無の検証

2. DEBA Gene A 遺伝子の機能解析と、DEBA型Gene A 遺伝子改変マウスの作出
3. DEBA 特異的な細胞老化に対する応答機構の解析の進捗について報告する。

I. 遺伝子発現をDEBA-iPS型に改変したマウス iPS細胞における腫瘍化耐性能獲得の有無の検証

申請者らは昨年度までに、DEBA-iPS細胞が種特異的に腫瘍化耐性であり、多能性をもつにも関わらず移植後の奇形腫形成能を有さないこと、その原因がDEBA特異的なiPS細胞におけるGene Aの発現活性化、さらにGene BのDEBA特異的配列変異による機能欠失にあることを突き止めた。本年度は、DEBA-iPS細胞から得られた知見をマウスiPS細胞に応用するべく、造腫瘍性を有するマウスiPS細胞において、抑制されたGene Aの活性化を行った。結果として、Gene Aを活性化させたマウスiPS細胞は多能性を有するにも関わらず、免疫不全マウスへ移植後の奇形腫形成能が顕著に減弱することが判明した。現在引き続き評価を進めている。また同時に、Gene A活性化ES/iPS細胞においてCRISPR/Casを用いたGene Bのノックアウトを進めている。

超長寿(約30年)



老化・がん化耐性

図1. ハダカデバネズミ (DEBA)

II. DEBA Gene A 遺伝子の機能解析と、DEBA 型 Gene A 遺伝子改変マウスの作出

申請者らは本年度、Gene A の coding sequence を DEBA 型にした遺伝子改変マウスを作出するために、北海道大学において新しく立ち上げた申請者の研究室において、遺伝子改変マウスの作出系の立ち上げを行った。Wild type の ES 細胞を用いたアグリゲーション法により、キメラマウスを作出することが出来た。次に、ES 細胞において BAC ターゲティングを行うため、Gene A locus を含む Mouse BAC に対して、Red/ET recombination system を用いて、DEBA Gene A 遺伝子を含む相同組換え用のカセットを挿入した。BAC の組換えに成功したため、現在 ES 細胞のターゲティングを開始している。

今後、DEBA-Gene A ノックイン ES 細胞の樹立と同時に、種々の *in vitro* での解析により DEBA-Gene A の機能を詳細に評価し、有効と認められる場合は、DEBA-Gene A ノックインマウスを作出してがん化耐性能・老化耐性能の獲得の有無に関して評価を進める。

III. DEBA 特異的な細胞老化に対する応答機構の解析

申請者らは昨年度までに、線維芽細胞の接触阻害後の長期培養によって細胞老化を誘導した場合に、DEBA における老化細胞の出現頻度がマウスやヒトと比べて非常に少なく、代わりに DEBA 特異的な細胞死の亢進が生じることを見出した。DEBA 特異的な細胞死により老化細胞が除去されることで、結果として個体の老化耐性が保たれている可能性を考え、解析を進めている。本年度は、これまでやってきた接触阻害後の長期培養による細胞老化誘導に加え、Bleomycin および Mitomycin C を用いた細胞老化の誘導を行った。その結果、マウスと比較して DEBA 線維芽細胞では老化マーカーである SA- β -gal 陽性細胞の出現の割合が低く、さらにその際、接触阻害後の長期

培養時と同様に、他種では見られない細胞死の上昇が確認された。これらのことからデバにおける細胞死の増加は、特定の条件のみで起こる現象ではなく、細胞老化誘導を行った際に共通してみられる現象であると考えられた。また興味深いことに、老化マーカーのひとつである Gene C の強制発現時に、DEBA 特異的な顕著な細胞死の上昇が見られることが判明した。現在、他の細胞老化関連因子を強制発現した時に同様の影響が見られるか否か、検証を進めている。今後、*in vivo* で同様の現象が見られるかを確認するために、DEBA 個体皮膚への紫外線照射によって細胞老化を誘発する、またはエレクトロポレーションにより Gene C を強制発現させた場合に、DEBA 特異的に細胞死が亢進し、結果的に個体における老化細胞の蓄積が少なくなるかどうか、検証を進める。

II 研究の成果

I の研究により、遺伝子発現を DEBA-iPS 型に改変することにより、マウス iPS 細胞の造腫瘍性を減弱させることが出来た。このことから、DEBA-iPS 細胞は、ES/iPS 細胞の造腫瘍性を抑制する機構／遺伝子を抽出するための有効な細胞ソースであると考えられる。こんど、さらなる因子を同定・検証していくことにより、マウス ES/iPS 細胞の多能性を遜色することなく造腫瘍性のみを消去することが可能となれば、将来的には、ヒト ES/iPS 細胞において本現象を再現することにより、将来の細胞移植治療に向けて、造腫瘍性の無いより安全な多能性幹細胞の作出が可能になると考えられる。また、I で同定した Gene A の体細胞での役割を検証するための解析も順調に進行している (II)。さらに III の研究により、DEBA 特異的な老化細胞の蓄積の減弱に寄与すると考えられる機構・関与因子を発見することが出来た。今後、分子メカニズムをさらに詳細に検討することにより、ハダカデバネズミ特異的な老

化の抑制機構の一端の解明が期待される。

発表論文

Molecular cloning and characterization of the
INK 4 a and ARF genes in naked mole-rat

Miyawaki S., Kawamura Y., Hachiya T.,
Shimizu A, Miura K. (責任著者)

Inflammation and Regeneration, Vol. 35 No.1,
2015

心臓・骨格筋の加齢変化を制御する リン酸化酵素の網羅的解析

名古屋大学 医学部附属病院
循環器内科

竹藤 幹人

研究期間 平成26年度（3年計画 1年目）

I 研究活動の概要

「目的」

現在、使用されている治療薬は、受容体、酵素、ホルモンなどを標的とした薬剤が多く使用されている。近年、酵素、特に、リン酸化酵素を標的とした薬剤開発が進んでおり、また欧米ではリン酸化酵素を標的分子とした病態解明が注目されている。本研究では、ヒト心臓・骨格筋に発現するリン酸化酵素を網羅的に解析し、「加齢」もしくは「加齢とともに罹患率が上昇する疾患」とリン酸化酵素の関わりについて研究を行い、創薬に繋がるシーズを見出すことを目的とする。

「概要」

従来のPCR法によるRNA測定では、発現量の相対値算出は可能であったが、絶対値測定は困難であった。2008年、nCounter法と呼ばれるRNA測定方法が報告され、発光色の組み合わせによりRNAの絶対量測定が可能となった。従来のPCR法では全ゲノムスクリーニングのような無限に近い種類の分子測定が可能であったが、nCounter法では、発光色の組み合わせ数に制限があり、およそ800種の分子を同時に測定が可能である。我々は、評価する分子群を限定することにより、nCounter法の絶対量測定という長所を生かした網羅的解析が可能と判断し、リン酸化酵素550種を測定した。脳・大脳・小脳・中脳・肺・左心房・右心房・左心室・右心室・胃・骨格筋・肝・大腸・

腎・大動脈・静脈・骨髄のヒトRNA（年齢24～39歳）を入手し、550種類のリン酸化酵素について網羅的に解析を行った。また、入手可能であった胎児および高齢者（80～86歳）の脳・心臓・骨格筋のRNAについても、リン酸化酵素を網羅的に解析した。

リン酸化酵素解析の結果、（1）心筋・骨格筋において加齢変化によって発現量が増加したKinase A、（2）心筋のみに発現しているKinase Bを候補遺伝子とした。nCounterの解析では、骨格筋のみに発現しているリン酸化酵素は見出せなかった。

マウスを用いた動物実験を行うため、Kinase Aの組織特異的欠損マウスの作製を行い、2015年3月現在、キメラマウスまで作成が進んでいる。また、生化学的手法・細胞生物学的手法によりKinase Aの新規基質を同定しており、そのリン酸化の生理的意義について検討を行った。

Kinase Bに関しては、アミノ酸配列からリン酸化酵素としてデータベース上、報告されているが、Kinase Bがリン酸化する基質に関して論文報告はない。現在、Kinase Bについてリン酸化活性を有しているかを生化学的手法により評価を行っている。Kinase Bのリン酸化酵素活性を確認後、Kinase Aと同様、遺伝子欠損マウスの作製を行う。

Kinase A, Bについて、生物学的手法、動物実験学的手法を用いて、「加齢」もしくは「加齢に

伴う疾患」における役割について解析を行った。

II 研究の成果

(A) リン酸化酵素網羅的解析

表1に示すリン酸化酵素の発現量をnCounter解析法により、網羅的に解析を行った。

リン酸化酵素発現解析の結果を図1に示す。ヒト心臓では、すべてのリン酸化酵素が同程度発現しているのではなく、リン酸化の種類によってその発現量が大きく異なることが明らかになった。

図1は心臓の解析結果であるが、他臓器、胎児、高齢者についても網羅的解析を施行した。解析の結果、「加齢とともに発現量が変化するKinase A」と「心臓のみに発現するKinase B」を候補分子として絞り込んだ。Kinase AとKinase Bに分けて、研究の結果について記載する。

(B) Kinase Aについて

Kinase Aについては、リン酸化活性を有している既報があったため、組織特異的遺伝子欠損マウスを作製した。ベクターの準備など当大学で行

表1 解析キナーゼ一覧

AAK1	BUB1B	CLK2	EPHB6	INSR	MAP4K1	NEK1	PKDCC	ROCK1	STK32A	TSSK3
AATK	C21orf7	CLK3	ERBB2	INSRR	MAP4K2	NEK10	PKMYT1	ROCK2	STK32B	TSSK4
ABL1	C9orf96	CLK4	ERBB3	IRAK1	MAP4K3	NEK11	PKN1	ROR1	STK32C	TSSK6
ABL2	CAMK1	COL4A3BP	ERBB4	IRAK2	MAP4K4	NEK2	PKN2	ROR2	STK33	TTBK1
ACVR1	CAMK1D	CPNE3	ERN1	IRAK3	MAP4K5	NEK3	PKN3	ROS1	STK35	TTBK2
ACVR1B	CAMK1G	CSF1R	ERN2	IRAK4	MAPK1	NEK4	PLK1	RPS6KA1	STK36	TTK
ACVR1C	CAMK2A	CSK	FASTK	ITK	MAPK10	NEK5	PLK2	RPS6KA2	STK38	TTN
ACVR2A	CAMK2B	CSNK1A1	FASTKD1	JAK1	MAPK11	NEK6	PLK3	RPS6KA3	STK38L	TXK
ACVR2B	CAMK2D	CSNK1A1L	FASTKD2	JAK2	MAPK12	NEK7	PLK4	RPS6KA4	STK39	TYK2
ACVRL1	CAMK2G	CSNK1D	FASTKD3	JAK3	MAPK13	NEK8	PNCK	RPS6KA5	STK4	TYRO3
ADCK1	CAMK4	CSNK1E	FASTKD5	KALRN	MAPK14	NEK9	PRKAA1	RPS6KA6	STK40	UHMK1
ADCK2	CAMKK1	CSNK1G1	FER	KDR	MAPK15	NIM1	PRKAA2	RPS6KB1	STRADA	ULK1
ADCK3	CAMKK2	CSNK1G2	FES	KIAA1804	MAPK3	NLK	PRKACA	RPS6KB2	STRADB	ULK2
ADCK4	CAMKV	CSNK1G3	FGFR1	KIT	MAPK4	NPR1	PRKACB	RPS6KC1	STYK1	ULK3
ADCK5	CASK	CSNK2A1	FGFR2	KSR1	MAPK6	NPR2	PRKACG	RPS6KL1	SYK	ULK4
ADRBK1	CCL2	CSNK2A2	FGFR3	KSR2	MAPK7	NRBP1	PRKCA	RYK	TAF1	VRK1
ADRBK2	CDC42BPA	DAPK1	FGFR4	LATS1	MAPK8	NRBP2	PRKCB	SBK1	TAF1L	VRK2
AKT1	CDC42BPB	DAPK2	FGFRL1	LATS2	MAPK9	NRK	PRKCD	SBK2	TAOK1	VRK3
AKT2	CDC42BPG	DAPK3	FGR	LCK	MAPKAPK2	NTRK1	PRKCE	SCYL1	TAOK2	WEE1
AKT3	CDC7	DCLK1	FLJ25006	LIMK1	MAPKAPK3	NTRK2	PRKCG	SCYL2	TAOK3	WEE2
ALK	CDK1	DCLK2	FLT1	LIMK2	MAPKAPK5	NTRK3	PRKCH	SCYL3	TBCK	WNK1
ALPK1	CDK10	DCLK3	FLT3	LMTK2	MARK1	NUAK1	PRKCI	SGK1	TBK1	WNK2
ALPK2	CDK11A	DDR1	FLT4	LMTK3	MARK2	NUAK2	PRKCC	SGK110	TBRG4	WNK3
ALPK3	CDK12	DDR2	FRK	LRRK1	MARK3	OBSCN	PRKCD	SGK196	TEC	WNK4
AMHR2	CDK13	DMPK	FYN	LRRK2	MARK4	OXSRI	PRKD1	SGK2	TEK	YES1
ANKK1	CDK14	DSTYK	GAK	LTK	MAST1	PAK1	PRKD2	SGK223	TESK1	YSK4
ARAF	CDK15	DYRK1A	GRK1	LYN	MAST2	PAK2	PRKD3	SGK3	TESK2	ZAK
ATM	CDK16	DYRK1B	GRK4	MAK	MAST3	PAK3	PRKDC	SGK494	TEX14	ZAP70
ATR	CDK17	DYRK2	GRK5	MAP2K1	MAST4	PAK4	PRKG1	SIK1	TGFBR1	
AURKA	CDK18	DYRK3	GRK6	MAP2K2	MASTL	PAK6	PRKG2	SIK2	TGFBR2	
AURKB	CDK19	DYRK4	GRK7	MAP2K3	MATK	PAK7	PRKX	SIK3	TIE1	
AURKC	CDK2	EEF2K	GS2	MAP2K4	MELK	PAN3	PRKY	SLK	TLK1	
AXL	CDK20	EGFR	GSK3A	MAP2K5	MERTK	PASK	PRPF4B	SMG1	TLK2	
BCKDK	CDK3	EIF2AK1	GSK3B	MAP2K6	MET	PBK	PSKH1	SNRK	TNIK	
BCR	CDK4	EIF2AK2	GUCY2C	MAP2K7	MINK1	PDGFRA	PSKH2	SPEG	TNK1	
BLK	CDK5	EIF2AK3	GUCY2D	MAP3K1	MKNK1	PDGFRB	PTK2	SRC	TNK2	
BMP2K	CDK6	EIF2AK4	GUCY2F	MAP3K10	MKNK2	PDIK1L	PTK2B	SRMS	TNNI3K	
BMPR1A	CDK7	EPHA1	HCK	MAP3K11	MLKL	PDK1	PTK6	SRPK1	TP53RK	
BMPR1B	CDK8	EPHA10	HIPK1	MAP3K12	MOK	PDK2	PTK7	SRPK2	TRIB1	
BMPR2	CDK9	EPHA2	HIPK2	MAP3K13	MOS	PDK3	PXK	SRPK3	TRIB2	
BMX	CDKL1	EPHA3	HIPK3	MAP3K14	MST1R	PDK4	RAF1	STK10	TRIB3	
BRAF	CDKL2	EPHA4	HIPK4	MAP3K15	MST4	PDPK1	RET	STK11	TRIM24	
BRD2	CDKL3	EPHA5	HSPB8	MAP3K2	MTOR	PEAK1	RIOK1	STK16	TRIM28	
BRD3	CDKL4	EPHA6	HUNK	MAP3K3	MUSK	PHKG1	RIOK2	STK17A	TRIM33	
BRD4	CDKL5	EPHA7	HUS1	MAP3K4	MYLK	PHKG2	RIOK3	STK17B	TRIO	
BRDT	CHEK1	EPHA8	ICK	MAP3K5	MYLK2	PIK3R4	RIPK1	STK19	TRPM6	
BRSK1	CHEK2	EPHB1	IGF1R	MAP3K6	MYLK3	PIM1	RIPK2	STK24	TRPM7	
BRSK2	CHUK	EPHB2	IKBKB	MAP3K7	MYLK4	PIM2	RIPK3	STK25	TRRAP	
BTK	CIT	EPHB3	IKBKE	MAP3K8	MYO3A	PIM3	RIPK4	STK3	TSSK1B	
BUB1	CLK1	EPHB4	ILK	MAP3K9	MYO3B	PINK1	RNASEL	STK31	TSSK2	

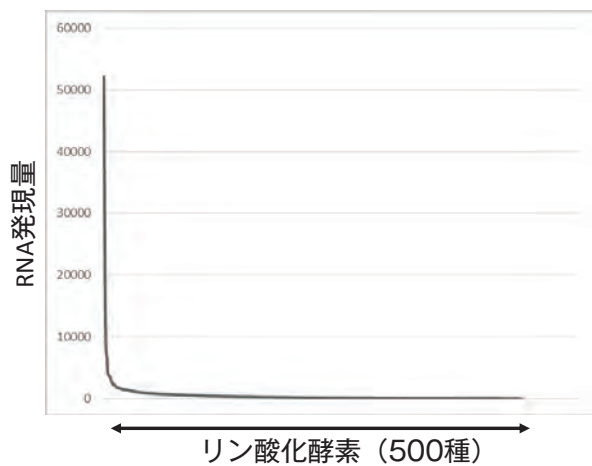


図1 ヒト心臓におけるリン酸化酵素の発現

えるも作業については行い、当大学では施行不可能な作業に関しては外部委託とした。2015年3月までにキメラマウスまで作製をしており、2016年度以降、マウスを用いた機能解析を行う。心臓超音波検査を用いた心機能評価、ぶら下がりなどによる筋力評価を行っていく。

Kinase Aについては自己リン酸化の報告はされているが、基質の報告はあまりされていない。培養心筋細胞では、Kinase Aが自己リン酸化することをウエスタンブロット法で確認しており、心筋細胞内で活性化されていることが示唆された。心筋、骨格筋における、新規基質同定を質量分析法により行い、分析の結果、遺伝子発現を制御する分子をリン酸化することを明らかにした。このリン酸化の意義について検討中であるが、リン酸化により細胞局在が変化し、遺伝子発現を制御している可能性を評価している（図2）。

(C) Kinase Bについて

Kinase Bの組織別発現プロファイルを示す（図

3)。発現量が比較的多く、心臓特異的に発現し、新規性の高いリン酸化酵素としてKinase Bに注目した。

データベース上、アミノ酸配列からリン酸化酵素に分類されているが、Kinase Bがリン酸化する基質の報告はされていない。そのため、Kinase Bをクローニングした。細胞発現用ベクターにKinase Bをサブクローニングし、Kinase Bがリン酸化酵素活性を有しているかを評価中である。リン酸化酵素活性を確認できた際には、Kinase Aと同様、基質の同定と遺伝子欠損マウス作製を行う。

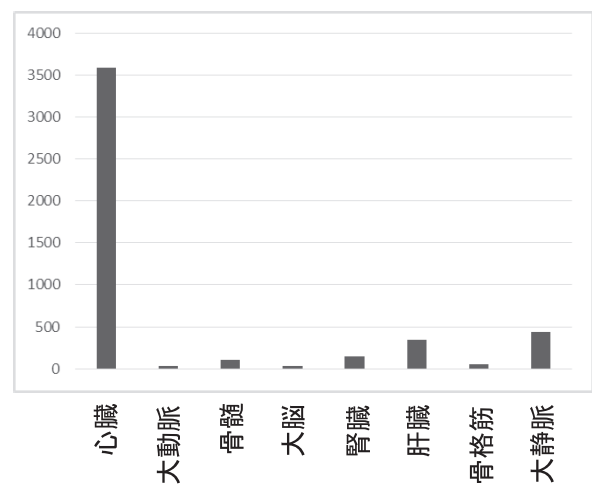


図3 KinaseBの組織別発現量

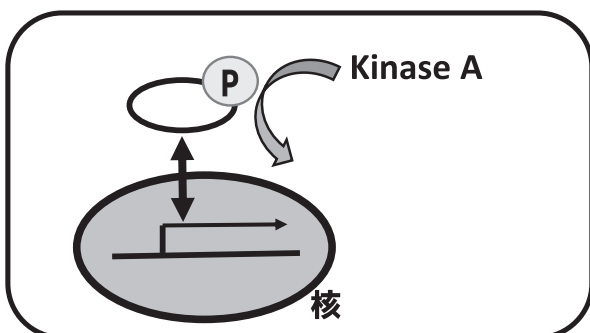


図2 KinaseAと遺伝子発現

IL-1ファミリーサイトカインをターゲットとした COPD の新規治療の開発

久留米大学 医学部 内科学講座
呼吸器・神経・膠原病内科部門

岡元 昌樹

研究期間 平成26年度（3年計画 1年目）

I 研究活動の概要

[研究の背景と目的]

喫煙による生活習慣病である慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive lung disease; COPD) は、日本人の長寿を脅かす重要な疾患であるが、根本的な治療法がないため、新規治療法の開発が望まれる。TNF- α などをターゲットとした全身的治療も試みられたが、有効性は証明されていない。我々は、これまでCOPDを含む炎症性呼吸器疾患において、IL-1ファミリーサイトカインであるIL-18が病態形成に関与しており、IL-18が本疾患の新規治療のターゲットとなり得る可能性を示した。さらに、我々は新規のIL-1ファミリーサイトカインで炎症の調節作用を持つ可能性があるIL-38に着目した。我々は、COPDにおいてIL-1ファミリーサイトカインIL-18とIL-38がCOPDの発症に関与していると考え、IL-18とIL-38を標的にしたCOPDの新規治療の開発を目指す。

[研究方法]

1. リコンビナント蛋白の作製

- (1) リコンビナントヒトIL-18, IL-38の作製：
全長および断片
- (2) リコンビナントマウスIL-18, IL-38の作製：
全長および断片

2. IL-18, IL-38の機能解析

- (1) 抗ヒトIL-18, IL-38モノクローナル抗体の

樹立

- (2) 抗マウスIL-18, IL-38モノクローナル抗体の樹立
- (3) 高感度ヒトIL-18, IL-38のELISA法の樹立
- (4) 高感度マウスIL-18, IL-38のELISA法の樹立
- (5) IL-18, IL-38のシグナル解析

3. IL-18, IL-38遺伝子及び受容体改変マウス樹立

- (1) IL-18, IL-38遺伝子及び受容体遺伝子欠損マウス作製
C57BL/6マウス由来ES細胞及びCRISPR/Cas9を用いてC57BL/6バックグラウンドIL-18, IL-38遺伝子及び受容体遺伝子欠損マウスを作製する。同時にBalb/cバックグラウンドIL-18, IL-38遺伝子及び受容体遺伝子欠損マウスを作製する。

- (2) 組織特異的IL-18, IL-38遺伝子及び受容体遺伝子過剰発現マウスを作製
- (3) (1),(2)の遺伝子改変マウスに、豚豚エラストラーゼを気道内に噴霧し、COPDマウスモデル作製する。肺組織の平均肺胞壁間距離 (Mean alveolar chord length) を指標として、COPDのIL-18, IL-38遺伝子及び受容体の遺伝子欠損による病態の抑制効果を証明する。

4. COPDの症例の血清中IL-38の測定、肺組織の免疫組織学的解析

- (1) COPDの肺組織における免疫染色、real time PCRによる解析

ヒトのCOPDの肺容量減少術 (lung volume reduction surgery) 例を対象症例とする。コントロールの肺組織は、COPD非合併の肺癌手術症例の正常部分の術後肺組織とする。我々が樹立したIL-38のモノクローナル抗体による肺組織の免疫染色を行う。さらに、同様にmRNAの発現をreal time PCR法で解析し、肺組織中のIL-38の局在、発現細胞を明らかにする。発現細胞が明らかになれば、蛍光顕微鏡を用いて、陽性細胞数のカウントを行い、陽性細胞数と呼吸機能の関連を統計学的に解析する。

(2) COPDの末梢血のIL-38の発現をELISA法で解析

COPD症例と健常人において、我々が樹立したELISA法を用いて、血清IL-38濃度の測定を行い、COPDにおけるIL-38濃度の上昇を証明する。更に、COPDにおけるIL-38濃度と呼吸機能の関連を統計学的に解析し、IL-38濃度が病勢と関連していることを証明する。

5. 将来的なIL-18, IL-38の受容体に対する阻害薬のスクリーニング

将来的には、IL-18, IL-38受容体が発現している細胞株を用いて、阻害薬のスクリーニングを行う。具体的には、IL-18, IL-38の受容体を発現している細胞とモノクローナル抗体などのIL-18, IL-38の阻害候補物質を接触させ、IL-18, IL-38の刺激で産生されるサイトカインなどの蛋白の発現量を測定する。抑制効果が得られた阻害物質をCOPDの治療の候補物質として、将来的にエラスターゼ気管内投与マウスCOPDモデルを用いたin vivoの抑制実験を行う。

イルスの二つの系を用いて作成した。このリコンビナントヒトIL-38蛋白を免疫原に抗ヒトIL-38モノクローナル抗体を作成した。

2. ヒトIL-38サンドイッチELISA法の確立

上記の抗ヒトIL-38モノクローナル抗体を用いて、世界初のヒトIL-38 sandwich ELISAを完成した。

3. エラスターゼ誘導性マウスCOPDモデルの実験

豚膵エラスターゼを気道内に噴霧し、COPDマウスモデルを作製した。リコンビナントIL-38の連日投与群と非投与群間の病変の程度の比較を行っている。評価の指標は、肺組織の平均肺胞壁間距離 (Mean alveolar chord length) である。この結果は現在進行中である。

4. COPD以外の疾患におけるIL-1ファミリー蛋白の機能解析

- ヒトの薬剤性肺傷害の剖検肺組織におけるIL-38モノクローナル抗体による免疫染色を行い、IL-38が病変局所で発現増加していることを証明した (論文投稿中)。
- ヒトの関節リウマチの組織中でIL-38の発現が増加していることを証明した (論文投稿中)。

[今後の研究]

1. マウスCOPDモデルのリコンビナントIL-38投与による抑制実験 (上記3の続き)
2. IL-38遺伝子及び受容体改変マウス樹立
3. 上記遺伝子欠損マウスを用いてのCOPDモデルマウスを用いての抑制実験
4. COPDの症例の血清中IL-38の測定、肺組織の免疫組織学的解析
5. 将来的なIL-18, IL-38の受容体に対する阻害薬のスクリーニング

II 研究の成果

1. 抗ヒトIL-38モノクローナル抗体の確立

リコンビナントヒトIL-38蛋白をE. coli、さらにはLPSによる影響を受けないバキュロウ

誤嚥性肺炎予防の為の口腔ケア手法及び その専用口腔ケアジェルの開発に関する研究

国立長寿医療研究センター 先端診療開発部
 歯科口腔外科
 平識 善大

研究期間 平成26年度（3年計画 1年目）

I 研究活動の概要

我が国は世界に類を見ない超高齢社会を迎え、平成23年度の死亡統計（図1）では肺炎の死亡者数は第3位となり、その97%が65歳以上の高齢者である。また、70歳以上の高齢者の肺炎のうち、80.1%が咳反射や嚥下機能が低下することで発症する誤嚥性肺炎であると報告されていることから、誤嚥性肺炎の予防は急務となっている。

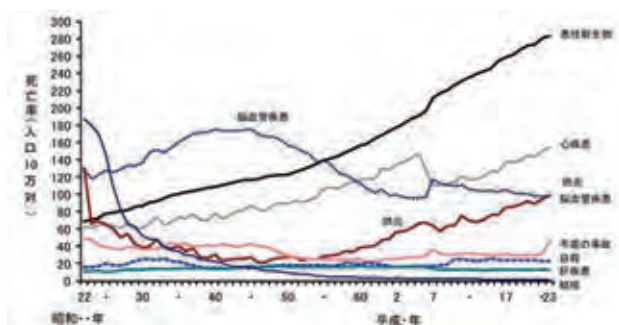


図1 平成23年度死亡統計

口腔内には数十億の細菌が存在し、口腔内細菌叢と咽頭細菌叢はほとんど同じことがわかっている。さらに、咽頭細菌叢と誤嚥性肺炎起炎菌の一致率が高いことから、誤嚥性肺炎の予防には、数ある方法の中でも口腔ケアの実践が極めて重要である。口腔ケアを行うことで細菌数を減らし、誤嚥性肺炎のリスクを低下させることが可能であり、口腔ケアを行うことは、細菌の誤嚥や低栄養を防ぎ、誤嚥性肺炎や他の疾病の予防や治療に貢献し、合併症なく早期退院の達成につながると多数報告されている。

一方で、口腔ケア時の事故も複数報告されており、口腔ケア時の誤嚥により発熱した症例の報告や、口腔ケア直後の死亡事故で訴訟となり敗訴した判例も存在する。口腔ケアは気道の一部である口腔に関わるので決して安全な処置とは言えず、リスク管理を怠ってはいけない処置である。口腔ケアの方法や使用する道具は施設や術者の好みにより様々であり、中には誤嚥の危険を伴う口腔ケアの方法も存在する。リスク管理の視点から、咳反射や嚥下機能が低下した要介護高齢者への水を使って洗浄する口腔ケアの施行は、誤嚥性肺炎起炎菌を誤嚥させ、誤嚥性肺炎を発症させる可能性がある。そのなかで、菅らは口腔湿潤剤を応用した口腔ケア手法を検討し、安全で確実なケアが行えると考えた。

そこで我々は、菅らのジェル状の口腔湿潤剤を使用した口腔ケア方法を発展させ、口腔ケア専用ジェルと吸引嘴管を使用した専門的口腔ケア（水を使わない口腔ケア）のシステムの確立を目指している。本研究は極めて近い将来に実際の医療サービスへの提供が可能な研究であり、歯科医療現場のみならず要介護高齢者の誤嚥性肺炎の予防や治療に広く貢献するべく立案されたものである。

3年計画の1年目にあたる本年度は、専門的口腔ケア時に必要な物性を持つ口腔ケア専用ジェルを作製するために、試作品を含めてジェルの物性評価（実験1）と口腔内の官能評価（実験2）を行った。また、口腔ケア専用ジェルを使用したブ

ラッシングにおけるプラークの除去効果を検討した（実験3）。加えて、実験群とコントロール群の評価時にそれぞれの咽頭に貯留した唾液や水の吸引回数をカウントし、誤嚥のリスクとして咽頭への垂れこみやすさを評価した（実験4）。

実験1：口腔ケア専用ジェルの物性評価

【対象】国立長寿医療研究センターに勤務する、嚥下障害を十分に理解している機能回復診療部、管理栄養部、歯科口腔外科の職員31名とした。また、対象者は口腔乾燥の症状、粘膜異常を認めない健常者である。

【評価方法】口腔ケア専用ジェルに必要と推測される物性を考慮し、それぞれ異なる物性を持ったジェルをあらかじめ試作した。評価方法は、開発中のジェル3種類と既に市販されている保湿ジェル3種類の計6種類（図2）をA～Fとし、ジェルの操作性の評価を3項目行った。主観的な項目である自覚的症候を数値化するためにvisual analog scale（VAS）を用いた。VASスケールは100mmとし、0mmの点を「悪い」、100mmの点を「良い」として、被験者には主観をこの直線上の適切な位置に縦線を引き印してもらい、0mmの点からの長さを測定した。評価項目は流動



図2 使用したジェル

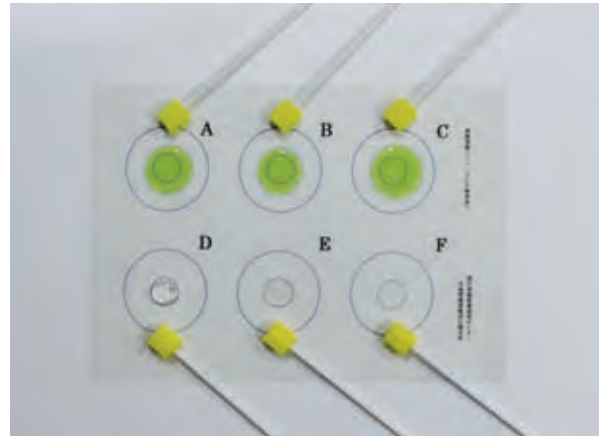


図3 物性評価シート

性、広がりやすさ、まとまりやすさの3項目である。二重丸が6つ描かれラミネートされた用紙を用い、それぞれの内側の円にジェルを同等量置き、それぞれのジェルをスポンジブラシを使用してVASスケールにて評価した（図3）。

統計処理は、対応のある因子による1元配置分散分析と多重比較を用いた。多重比較はBonferroniの多重比較を用い、ソフトはSPSS ver.22を使用した。

【結果】ペアごとの比較を行った結果、流動性はBとCの間に $p < 0.001$ で有意差が認められ（図4）、広がりやすさではBとA、BとDの間に $p < 0.001$ で有意差が認められ（図5）、まとまりやすさではBとC、BとD、BとFの間に $p < 0.001$ で有意差が認められ（図6）、いずれもBがそれぞれに比べて有意に評価が高いことが認められた。（図7）

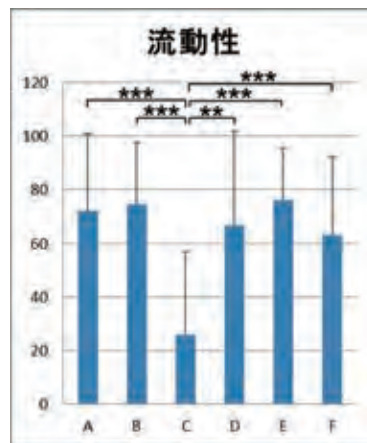


図4 流動性

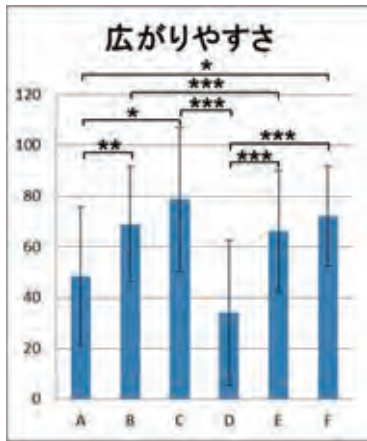


図5 広がりやすさ

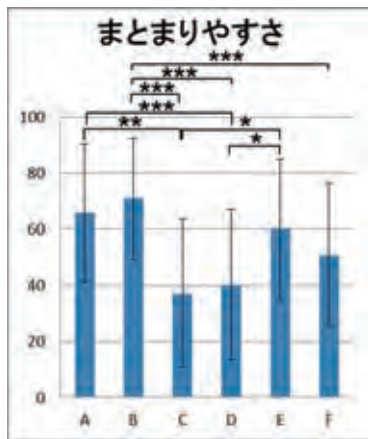


図6 まとまりやすさ

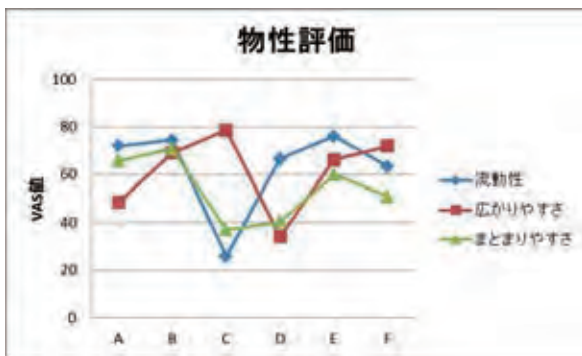


図7 物性評価

*** P<0.001 ** P<0.01 * P<0.05

実験2：口腔内の官能評価

【対象】 国立長寿医療研究センターに勤務する、嚥下障害を十分に理解している機能回復診療部、管理栄養部、歯科口腔外科の職員31名とした。また、対象者は口腔乾燥の症状、粘膜異常を認めない健常者である。

【評価方法】 口腔内の官能評価を11項目行った。評価項目は、味、味の濃さ、甘み、苦み、後味、香り、舌触り、潤い感、爽快感、刺激性、粘つき

感であり、口腔内にジェルを含み、それぞれの項目をVASスケールにて評価した(図8)。VASスケールは100mmとし、0mmの点を「悪い」、100mmの点を「良い」として、被験者には主観をこの直線上の適切な位置に縦線を引き印してもらい、0mmの点からの長さを測定した。各項目の左端から印までの長さを評価値とし、評価結果は数値が高いほど評価が高いことを示す。

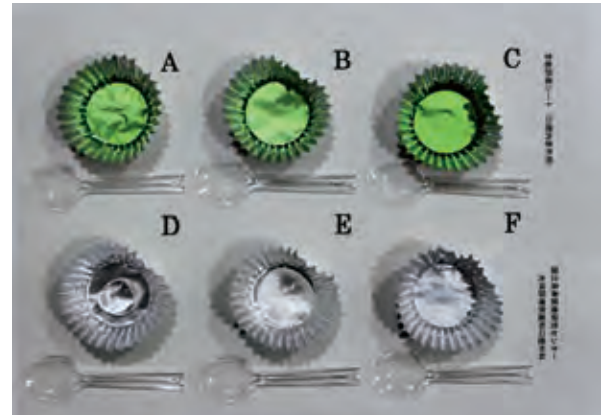


図8 使用したジェル

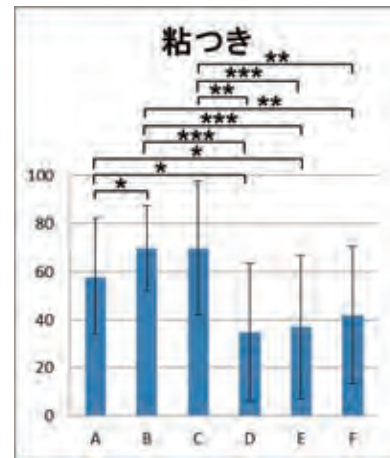


図9 粘つき

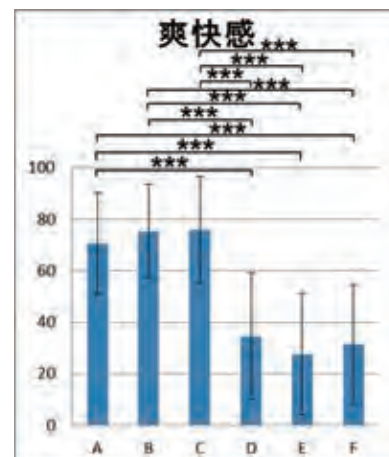


図10 爽快感

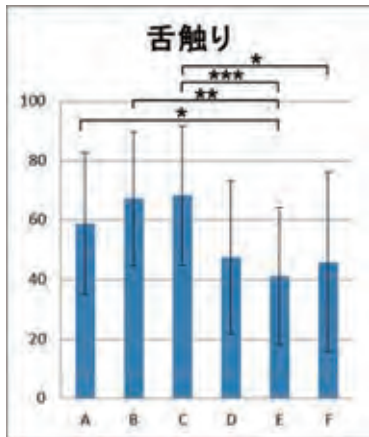


図11 舌触り

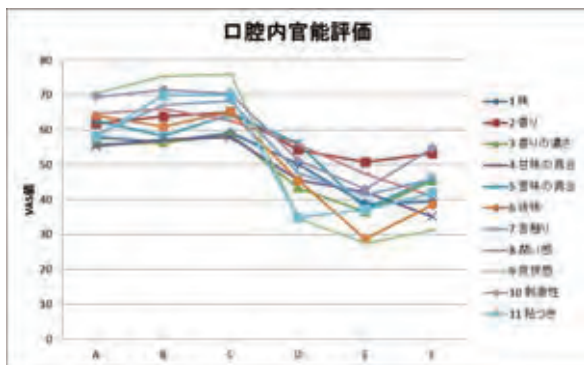


図12 物性および官能評価の比較

*** P<0.001 ** P<0.01 * P<0.05

統計処理は、対応のある因子による1元配置分散分析と多重比較を用いた。多重比較はBonferroniの多重比較を用い、ソフトはSPSS ver.22を使用した。

【結果】粘つきはBとD、BとE、BとFの間に $p < 0.001$ で有意差が認められ(図9)、爽快感はBとD、BとE、BとFの間に $p < 0.001$ で有意差が認められ(図10)、舌触りはBとEの間に $p < 0.01$ で有意差が認められ(図11)、それぞれBが有意に評価が高いことが認められた。香や味の濃さ等には有意差は認められなかった。また、Bはどの項目においてもVAS値が50以上であった(図12)。

実験3：口腔ケア専用ジェルを使用したブラッシングにおけるプラークの除去効果の検討

【対象】当センターの職員で喫煙のリスクがない健康者20名とした。試験前の事前調査により、全身疾患を有しているもの、薬物を服用している

者、現在歯数が20歯以下の者、矯正装置を装着している者は被験者から除外した。被験歯は、補綴物や修復物があり測定に支障をきたす歯は計測から外し、さらに口腔状態は臨床的に正常な歯肉を有するものを対象とした。

【評価方法】被験者には評価当日の朝から評価を行うまでの間、歯磨きを停止させ、プラークの付着状態を測定した。測定には歯垢染色剤デントリキッドプラークテスター®(ライオン歯科材料株式会社)で綿球を用いて染め出した後、臨床において最も使用されている評価方法であるO'Learyらのplaque control recordを基準にした1歯につき6点計測(頬側と舌・口蓋側の歯頸部歯面を均等に三分割し、近心隅角部より1/3を近心、中央、遠心とする)を用いてブラッシング前後のスコアをプラーク除去効果として表した。実験群では、口腔ケア専用ジェルを用いてブラッシングを行った(図13)。ブラッシングの際には被験者に口角鉤を掛け口唇を排除し、利き手に歯



図13 実験群：口腔ケア専用ジェル



図14 コントロール群：水

ブラシ、もう一方の手では吸引嘴管を操作し、歯ブラシで除去したプラークや分泌された唾液を常に吸引嘴管で口腔外に排出した(図14)。ブラッシング方法はスクラビング法を用い、ブラッシング時間は刷掃時間を1口腔につき4分間、上下顎に分けそれぞれ2分とした。ブラッシング終了後に術後のプラークの付着状態の測定を行った。コントロール群では水を使用してブラッシングを行った(図15)。ブラッシングを行った者は特定された歯科衛生士であり、すべての被験者に可能な限り同等の技術となるよう事前に訓練を行った。プラークの蓄積を可能な限り同等量にするために、実験群とコントロール群の評価の間は2週間空け、その間ブラッシング指導は行っていない。また、クロスオーバー法を用いて実験群とコントロール群の評価の順序を無作為に決定した。ブラッシングを行う者と評価する者は別の人物とし、それぞれが特定された歯科衛生士が行った。また、二重盲検法として評価者は評価時に実験群かコントロール群かをわからないようにした。

実験群とコントロール群の減少率をそれぞれ算出し、統計処理は対応のあるPaired t-testを用い、有意差の有無を確認した。解析ソフトはSPSS ver.22を使用した。



図15 除去したプラーク等を 常時吸引嘴管にて排出する

【結果】 Modified PCRの減少率は実験群が 0.46 ± 0.08 、コントロール群は 0.41 ± 0.11 、実験群とコントロール群の術後同士の比較では $p < 0.05$ で有意差が認められた(図16)。また、術前の実験群とコントロール群間の比較において有意差は認められなかった。

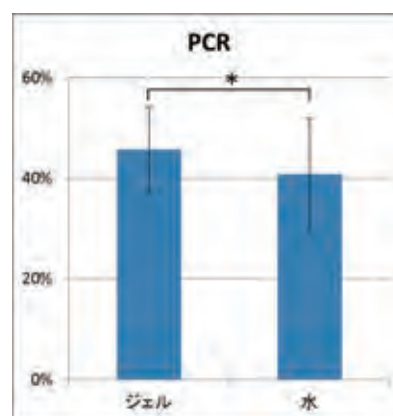


図16 PCRの減少率の比較

実験4：咽喉への垂れこみやすさの評価（誤嚥リスク評価）

【対象】 当センターの職員で誤嚥のリスクがない健常者20名とした。

【評価方法】 実験3の口腔ケア専用ジェルを使用したブラッシングにおけるプラークの除去効果の評価時、実験群とコントロール群の評価時にそれぞれの咽喉頭に貯留した唾液や水の吸引回数をカウントし、誤嚥のリスクとして咽喉への垂れこみやすさを評価した。

統計処理は、ウィルコクソンの符号順位和検定を用い、ソフトはSPSS ver.22を使用した。

【結果】 実験群では平均2.8回、とコントロール群では平均6.05回であった。実験群はコントロール群に比べて $p < 0.0001$ の危険率で有意に吸引回数が少ないことが認められた(図17)。

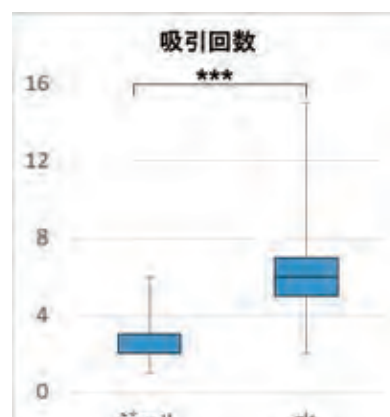


図17 吸引回数の比較

【考察】 物性の評価やいくつかの口腔内の官能評価でBのジェルが有意に評価が高いことが認められ、Bのジェルが口腔ケア専用ジェルに最も適

していると考えられた。口腔内での官能評価は個人の感受性のばらつきが大きく、味や香りに対する好みなども分かれていた。また、Bのジェルはどの項目においてもVAS値が50以上であり、既存に市販されている保湿ジェルを含めて、口腔ケア時の誤嚥を防ぐために口腔ケア時に使用する目的の口腔ケア専用ジェルにはBのジェルを使用することが適切と考えられた。

口腔ケア専用ジェルを新たに開発するにあたり、それに必要な機能や性能は、①誤嚥を防ぐための咽頭に流れ込まないような適度な粘稠度、②効果的に汚染物の回収をするために吸引嘴管で吸引できる流動性、③乾燥した剥離上皮や痰を粘膜に負担を掛けずに除去するための剥離上皮や痰を柔軟化できる浸潤度、④粘膜へ塗布する際の広がりやすさ、⑤口腔ケア専用ジェルと汚染物を共に回収できるまとまりやすさ、⑥口腔ケア専用ジェルがプラークや汚染物を絡め取る性状、⑦カンジダなどのへの静菌力、⑧前回使用した口腔内に残遺した口腔ケア専用ジェルを除去しやすい性状、⑨患者の不快感を軽減させるような清涼感を持つ味、⑩ジェルを塗布した際に、塗布した部分を口腔内で見分けられる色調等が考えられた。

口腔ケア専用でジェルを使用することは誤嚥のリスクを低減させるだけでなく、ブラッシング時に水を使用するよりもプラークの除去効果が高いことが認められた。口腔ケア専用ジェルは水に比べて粘度が高く、停滞性があり、刷掃時に歯面と歯ブラシの間でプラークの吸着性が高いため、ジェルでブラッシングを行った後と水を使用してブラッ

シングを行った後の評価の間で有意差が認められたと考えられる。要介護高齢者における歯牙のプラーク中の肺炎起炎菌検出率は66%と高率を示しており、ジェルを使用してブラッシングを行うことで、高齢者にとって致命的な誤嚥性肺炎起炎菌のリザーバーとなるプラークを効果的に除去することができると考えられた。

また、咽頭に貯留した唾液や水の吸引回数の有意差から、ブラッシング時にジェルを使用することは水を使用してブラッシングを行うよりも、誤嚥のリスクを抑えることができると考えられる。口腔ケア専用ジェルは水に比べて流動性が低く、塗布した汚染物に保持されやすいため、分泌された水分や汚染物が咽頭へ垂れ込むのを防ぐことができたと考えられる。さらに、常に吸引嘴管を使用することで、ジェルにより停滞した汚染物を常に口腔外へ排出させることができることから、誤嚥のリスクを下げ口腔ケアの効率をあげることが期待できる。

現在口腔ケアはQOLを維持・向上させる重要なケアであるという認識が定着してきたが、多忙な業務の中でケアの質を高め、維持することは容易なことではないとも言われており、介護の現場において「口腔ケア」はケア側の負担が大きいケア項目である。本研究で行った口腔ケア方法を用いることで、安全で効率の良いケアを行うことができ、誤嚥性肺炎の予防や治療費削減だけでなく、要介護高齢者と介護者双方のQOLを高めると考えられる。



専門的口腔ケア施行例



入院時



専門的口腔ケアの介入



退院時

II 研究の成果

初年度の成果として

- ⇒産官共同研究にて誤嚥性肺炎を予防する水で洗浄しない口腔ケアに用いる口腔ケア専用ジェルの新規開発に着手した。
- ⇒各種保湿剤や試作した口腔ケア専用ジェルの物性や官能評価を行い、適切な口腔ケア専用ジェルのスペックを検討した。
- ⇒口腔ケアでジェルを使用することはブラッシング時に水を使用するよりもプラークの除去効果が高いことが認められた。
- ⇒口腔ケア専用ジェルを使用することでブラッシング時に水を使用するよりも有意に吸引回数が少ないことが認められた。
- ⇒本年度は初年度なので、学術発表は日本摂食・嚥下リハビリテーション学会（9月京都）にて発表予定である。

高齢者の属性や社会環境別にみたうつ症状に関する研究

千葉大学
予防医学センター
佐々木由理

研究期間 平成26年度（2年計画 1年目）

I 研究活動の概要

高齢者は、配偶者や親しい友人の喪失体験、社会的地位や役割の喪失、その他様々なライフイベントとの遭遇、自己の身体疾患を含む社会生活や身体状況等の変化に伴い、心身の健康や生活満足度を低下させる可能性が高い（鷹見, 2013; 矢庭, 2009）。このようなリスクのある高齢者を対象としたうつ病の有病率や罹病率、うつ病発症のリスク要因については個人レベルでの知見が集約されてきている（Chapman, 2008; Luppá, 2012; Cole, 2003; Polyakova, 2014）。また、うつ病等の気分障害が大きな要因となっている自殺（Angst, 1999; Waern, 2002; Szanto, 2002）の年齢分布では高齢者の占める割合が高く、2012年のわが国においても総自殺者数の約38%が60歳以上となっている（警察庁, 2013）。究極の不健康である「死亡」（近藤, 2010）に至らずとも、うつ病がアルツハイマー型認知症発症や要介護認定のリスク要因であることもメタ解析などによって明らかになっている（Ownby, 2006; 平井, 2009）。また、要介護化の予防を促進する上で厚生労働省が掲げた6つの分野の強化の1つにも「うつ予防・支援」が入る。介護予防の観点からも、高齢者のうつ予防・支援対策が必要であることは明らかである。

高齢者のうつ予防事業では、病気に関する知識普及やスクリーニングのみでは不十分であると考えられる。しかし、高齢者個人の主観によらない

属性や社会環境別に、高齢者のうつ症状やリカバリー状況とその関連要因、うつ症状が死亡リスクに与える影響について、十分に検証されていないため、根拠に基づいた有効な対策を設定しづらい状況にある。特に、高齢者のうつ症状からのリカバリー状況やリカバリー要因はほとんど知られておらず、抑うつの予防要因とは異なる可能性もある。うつ症状やリカバリーの条件を知り、検証することで、高齢者のうつ予防事業を効果的に進められると考える。

本研究は、「地域におけるソーシャル・キャピタルの豊かさが、うつ症状発症の減少やリカバリー率の高さと関わりがある」および「その相関は高齢者個人の主観によらない属性や社会環境によって異なっている」ことを仮説とし、以下を目的とした研究を実施してきた。2014年度は、縦断データの作成、および下記の①を検証してきた。

- ① 高齢者のうつ症状に関連する心理・社会的決定要因を男女別・年齢階層別・都市規模別・等価所得別に明らかにする
- ② 高齢者のうつ症状からのリカバリー率およびリカバリー要因を男女別・年齢階層別・都市規模別・等価所得別に明らかにする。
- ③ 高齢者のうつ症状が死亡リスクに与える影響を男女別・年齢階層別・都市規模別・等価所得別に推定する。

本研究の特色は、1) うつ傾向・状態やうつからのリカバリーをエンドポイントに、その影響経

路を遡り「原因の原因」に迫るパネル分析で「見かけ上の関連」や「逆の因果関係」の除外ができること2) うつ予防やリカバリーに向けた地域づくりを戦略的に進めるための科学的根拠を提示する上で、10万人規模の多地域データを活用し、個人レベル要因のみならず地域要因の影響を考慮した分析が可能であること、である。

世界的に見ても最も高齢化が進行している日本において、高齢世帯における単独世帯の割合は2035年までには46都道府県で30%以上、9都道府県で40%以上になることが見込まれている(国立社会保障・人口問題研究所, 2014)。このように心身の健康を損ない兼ねない環境におかれる高齢者の増加が予測される中で、「うつ症状やうつからのリカバリーの社会的決定要因」を明らかにすることができれば、単独世帯の高齢者も、心身共に健康であるための手掛かりを早期に、戦略的に打ち立てることができると思う。

なお、本研究では、高齢者のうつ発症の早期の予防を目指した研究である。そこで、うつ指標には高齢者用うつ診断尺度短縮版(GDS-15)を用いてスクリーニングすることで、うつ傾向・状態にある人と健康な人の特性を解明する。

本研究は、日本老年学的評価研究(JAGES)プロジェクトのデータを用いた。2010年8月から2012年1月にかけて全国31自治体に居住する要介護認定を受けていない高齢者112,123人から、質問紙によって身体、心理、社会的な状況についての回答を得た(2010年度調査)。このデータを起点に、2013年度に実施済みの追跡データ(2013年度調査)を結合した。2010年度および2013年度いずれにも調査協力が得られ、なおかつデータリンクのためのキーとなる暗号化された被保険者番号についての同意の得られた24市町村のデータを結合し、クリーニング作業を行った。また、このクリーニング作業と同時進行で、2013年度データを用いて、上記①の目的に対し個人回答を市町村単位に変換可能であった全国29市町村データを用いて、横断的に個人回答を市町村単位に変換可能であった全国29市町村データを用いて、横断的に地域相関研究を実施しましたレベルでの検証を行った。

II 研究の成果

うつ傾向がある人の市町村別の割合は、29市町

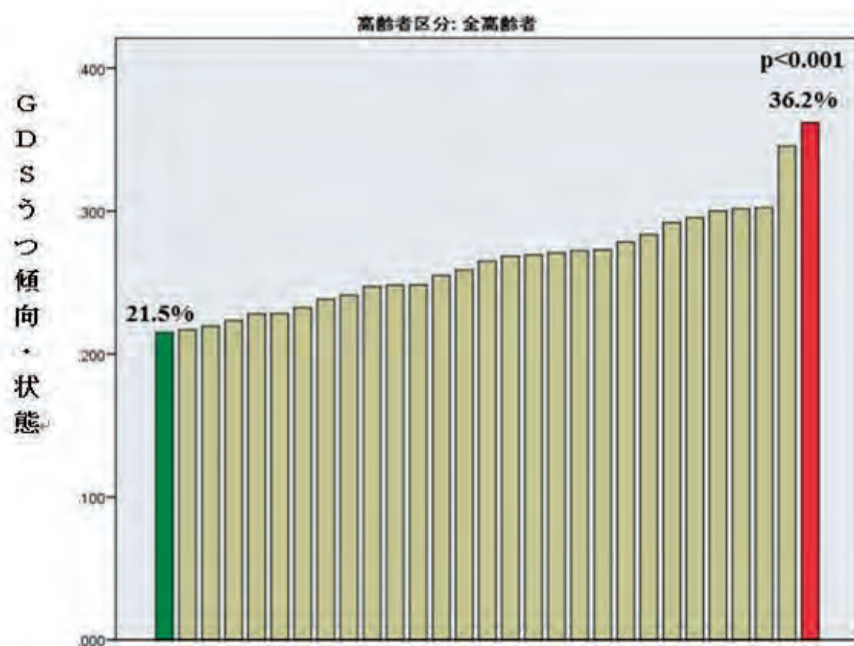


図1 29市町村のうつ傾向割合

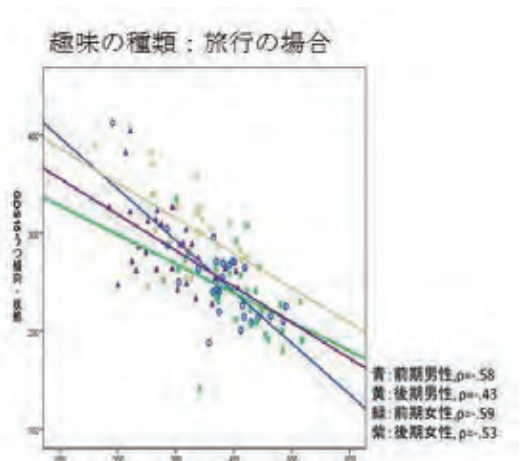


図2 うつ傾向と趣味の種類（旅行の場合）
*旅行、散歩・ジョギング、体操・囲碁・パソコンの趣味は、うつ傾向に保護的な関連を示した。

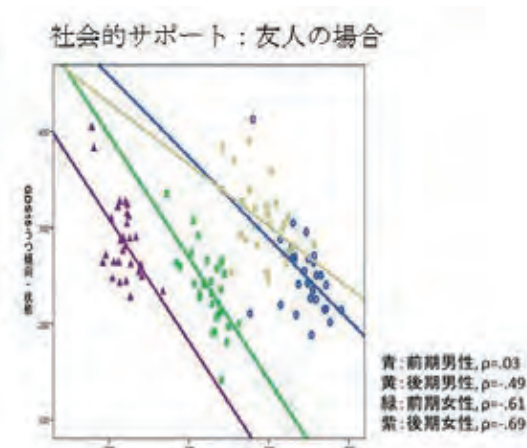


図3 うつ傾向と社会的サポート（心配事や愚痴を聞いてもらう：友人）
*家族のみならず、友人・近隣とのサポート授受割合が高い地域はうつ傾向が低かった。

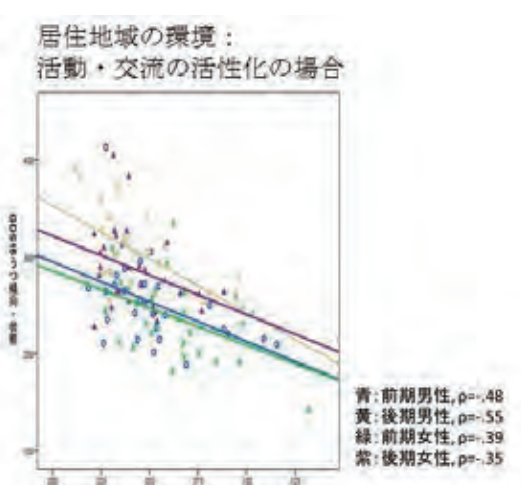


図4 うつ傾向と居住地域の環境
*地域の活動や交流の活発化はうつ傾向に保護的だが、運動・散歩に適した環境がない地域はうつ傾向が高かった。

村で最小が21.5%、最大が36.2%で、約15%ポイント（約1.7倍）の地域差が確認された（ $p < .001$ ）（図1）。また、19種類の種類ごとにうつ傾向との関連を検証した。男女前期後期いずれにおいても、旅行の趣味の割合が高いとうつ傾向割合が有意に低い傾向が見られた（図2）。その他、散歩、ジョギング、体操、パソコンなどの趣味がうつ傾向に保護的であった。社会的サポート指標として、心配事・愚痴を聞いてもらう人を相手別に聞いた（図3）。「心配事や愚痴を聞いてもらう人がいる」割合が高い地域はうつ傾向が低かった。逆に「心配事や愚痴を聞いてあげる人がいる」割合が高い地域もうつ傾向が低かった。「世話や看病をしてあげる人がいる」と認識している割合が高い地域でもうつ傾向が低かった。更に相手別に見ると、家族のみならず、友人・近隣の人とのサポート授受割合が高い地域はうつ傾向が低い傾向であった。

居住地域の環境については、地域住民の活動や交流の活性化を認識している割合が高い地域は趣味や社会的サポートほどの強い関連は示さなかったが、うつ傾向が低かった（図4）。

15%ポイントものうつ傾向割合の地域差を説明する上で、社会参加、周囲との関わり、居住環境に着目した。社会参加では、人と交流が生まれる可能性が高い趣味の参加割合が高い地域はうつ傾向が低かった。周囲との関わりではサポートの享受のみならず、提供が多い地域でうつ傾向が低かった。家族のみならず、近隣や友人からのサポートの授受割合が高い地域でもうつ傾向は低く、こうした相手と一緒にできる活動や交流しやすい環境が高齢者のうつに保護的に影響を与える可能性があると考えられた。更に、居住地域の環境でも、地域の活動が盛んなところ、運動・歩行環境が地域高齢者のうつ傾向に影響を及ぼす可能性が示唆された。社会参加・周囲との関わり、居住環境はうつの地域診断指標にもなり得ると考えられた。

高齢者薬物療法の系統的なスクリーニング・アセスメント・サポート法の構築

東北大学病院 老年科
院内講師

富田 尚希

研究期間 平成26年度（2年計画 1年目）

I 研究活動の概要

【研究の背景】

高齢者の薬物療法は、多剤併用 (polypharmacy)・Potentially inappropriate medication for the elderly (PIM)・薬剤関連性老年症候群・処方カスケードなど複数の問題を内包する。薬物療法のアドヒアランス (Medication adherence; 以下、アドヒアランスと表記) もその中に含まれるが、高齢者に限定されるものではない点が他の問題点とは異なる。また疾患や使用する薬物の特性により、アドヒアランスの性質や対策法が異なるため、疾患毎、薬剤毎にアドヒアランスが検討されることが一般的である。

高齢者では、多病により併用薬物数や処方元数が増加傾向にあることや、薬剤関連性老年症候群・処方カスケードなど、複数の疾患や薬物をまたいだ形で問題が生じる可能性があることから、使用している薬物全体のアドヒアランスを包括的に評価する必要性が高い。加えて、居住環境や管理法・使用法、Geriatric condition など薬物以外の問題点がアドヒアランスに影響する割合が大きくなる。このため、高齢者で問題となりやすい点全体の包括的な評価（高齢者総合的機能評価 (Comprehensive geriatric assessment: CGA)）の一部としてアドヒアランスを評価する必要性が高い。

高齢者の包括的な評価は、精度を保つため面接

法で行われることが多い。面接法は情報の精度を担保するものの、医療・ケアスタッフや患者・家族の双方の負担 (Diagnostic burden) を増すことになりやすい。「多職種連携」で評価を分担することでスタッフ側の負担は減らせる反面、結果がうまくシェアされないと、繰り返し評価されることで患者・家族側の負担は逆に増えてしまう。包括的評価の必要部分を系統的に自記式調査票にまとめ、結果をシェアしやすい形にまとめることが双方の Diagnostic burden を軽減するひとつの方法として挙げられる。ただし、高齢者対象に自記式調査を行うには、回答の精度を保つための工夫を十分に行うことが不可欠である。また自記式評価は、アドヒアランスの状態を過大に評価する傾向が示されており客観的な指標と組み合わせて最終的な評価とする必要がある（病気や治療に対する「信条」など、主観の評価でしか測定できない重要項目があるため、客観的指標のみでアドヒアランスを評価することは不十分であり、主観評価と客観評価を系統的に組み合わせることが必要である）。

集めた情報を処理してアドヒアランスを評価する方法としては、「遵守状態」「不遵守状態」といったバイナリー指標を用いる方法や、推測されるアドヒアランスの程度により「良好、やや良好、やや不良、不良」など数段階に分類する指標を用いる方法が臨床現場でよく用いられている。これらの指標は単純で判定しやすい反面、効果的な対策

に必ずしもつながらない。ノンアドヒアランスの対策を考える際に重要なノンアドヒアランスのサブタイプとして、「意図的なノンアドヒアランス」と「ノンアドヒアランス準備状態」の2つが挙げられる。

ノンアドヒアランスを、意図的の操作の程度により「非意図的なノンアドヒアランス (Unintentional nonadherence)」と「意図的なノンアドヒアランス (Intentional nonadherence)」に分ける分類法は歴史があり、先行研究が多く存在する確立された概念である。高齢者や認知症患者のノンアドヒアランスは、Unintentional nonadherenceであると思われがちだが、臨床現場ではIntentional nonadherenceを経験する。意図的なアドヒアランスの評価は、非意図的なものの評価よりも困難であるため、精度の高い評価を行うための系統的な評価法と効果的な対処法の検討が求められる。また、「ノンアドヒアランス準備状態 (nonadherence at risk)」「条件付きアドヒアランス (conditional adherence)」といった、遵守と不遵守の間に位置する状態が存在することは臨床現場で経験することだが、コンセンサスの得られている厳密な定義は存在しない。ノンアドヒアランス発生の予防的観点からその定義や同定方法を検討することの重要性は大きい。

【研究の目的】

1. CGAの一部として、アドヒアランス全体を包括的に評価する自記式調査法を開発する。
2. 意図的なノンアドヒアランスやノンアドヒアランス準備状態を含むアドヒアランス指標の定義と具体的な分類法を提案する。

【研究の方法】

(1) 文献レビュー

高齢者の薬物療法のアドヒアランスについての一般的なアセスメントツールと、高齢者総合的機能評価の中でのアドヒアランスの評価のなされ方についての現状を把握し、効果的なアドヒアランス評価を行うための指標と

その分類法の提案につなげる。

(2) 病院を受診した高齢患者の調査

文献レビューをもとに試作した自記式調査票を、実際に病院受診患者に回答してもらい、問題点・改善点を明らかにして改善していく。

(3) 調剤薬局・老健施設でのモニター調査

ある程度出来上がった段階で、回答者の年齢層やバックグラウンドを広げる目的で調剤薬局・老健施設でのモニター調査を実施する。

II 研究の成果

文献レビューの結果以下のことが判明した。①普及しているCGA screening toolにはアドヒアランスのスクリーニングは含まれない、②CGA full assessmentの中では、手段的ADL指標の薬剤管理状況のサブカテゴリーを用いてアドヒアランスの評価としているものがほとんどである、③ノンアドヒアランス準備状態の厳密な定義は未だ確立されていない、④ノンアドヒアランス準備状態は、ノンアドヒアランス状態と同様にIntentional, Unintentionalに分ける必要がある、⑤アドヒアランス低下の要因は数多く存在するが、Proximal-Distal Continuum of Adherence Drives model (2009)によれば、proximal driversの評価を通じてIntentionalなノンアドヒアランス準備状態の存在を推定できる可能性がある、⑥Unintentionalなノンアドヒアランス準備状態は、展望記憶 (Prospective memory) の低下と関連する。アドヒアランス (遵守状況) は、他の薬物治療関連情報 (処方状況・管理状況・使用状況) と併せることで評価精度が上がることに加え、効果的な対策の立案に役立つ。このため管理状況の指標であるLawton Brody IADLのサブカテゴリーを直接アドヒアランスの指標として用いることは適切ではないと考えられた。

以上のレビュー情報をもとに、手段的ADLの拡張をベースにProximal adherence drivers (薬に対する信条)・Geriatric conditionを加え、A3サイズの用紙1枚 (見開き2ページ) にまとめた

自記式調査票を設計した。この問診票を東北大学病院老年科もの忘れ外来にて日常診療に導入し検討を行った。

実用に耐えるレベルにまで改善をすすめた問診票について、さらに広い年齢・バックグラウンドの回答者で検討するため、調剤薬局と老健施設でモニター調査を行った。

最終的に出来上がった自記式調査票を図1に掲載する。また、モニター調査での各年齢層の回答状況について表1にまとめる。

モニター調査の結果、回答に対する負担感・不快感を低く抑えられ、回答時間は全ての年代において10分程度にまで低減できていた。回答はマークシート方式としているが、専用の読み取り装置ではなくスキャナでの読み取りで90%以上の読み取り確率を達成した。これにより、比較的コストで問診票の読み取り・自動処理を導入することが可能になり広く医療施設で使えるものとなり得る。

これまでに提唱されているアドヒアランスの系

統的評価方法は、個別に検討された面接法や performance test の組み合わせであり、全員に施行することが困難である。当然CGAの一部として行うことも難しい。今回開発した自記式調査票は、系統的なスクリーニング法として利用可能で、しかもその評価結果からは、対策立案に有用な情報が多く得られる。また調査票の主体がIADLを拡張した構成となっており、Lawton Brody IADL 得点の推定も行うことが可能であり、CGAの一部として利用することができる。

【今後の課題】

1. 調査票で収集される情報の質の改善

開発した新規自記式調査票により収集される情報の質を改善する作業は、本研究である程度進んだが、まだ無回答や誤回答がゼロではない。このため、改善の余地について検討する必要がある。

2. ノンアドヒアランスの分類・評価の精度の検証

図1 作成した自記式調査票

表2 自記式調査票のモニター調査結果

Variables	30代	40代	50代	60代	70代	80代	90代
回答者数(人)	16	12	19	14	20	9	12
平均年齢(歳)	33.8	44.3	55.2	65.4	74.0	84.8	91.1
性別(男/女)	2/14	4/8	10/9	7/7	6/13	0/9	5/7
教育年数(年)	15.1	15.1	13.2	13.4	12.3	10.2	9.2
定期薬数分布(1/≥2/0)	0/1/15	2/2/8	2/9/8	2/8/4	3/17/0	1/6/2	0/11/1
回答(一人/相談/代理)	16/0/0	12/0/0	19/0/0	13/0/3	13/1/5	6/0/3	4/0/8
回答時間(sec) Median (min, max)	3:32 (2:18, 20:50)	6:19 (3:42, 8:18)	6:20 (2:30, 13:08)	7:11 (4:21, 11:01)	9:31 (5:01, 19:38)	13:40 (8:20, 20:34)	10:06 (5:05, 18:05)
負担感(VAS scale)	0.6	2.0	1.3	1.4	0.7	0.7	1.3
不快感(VAS scale)	0.4	1.7	0.9	1.5	0.4	0.3	1.3

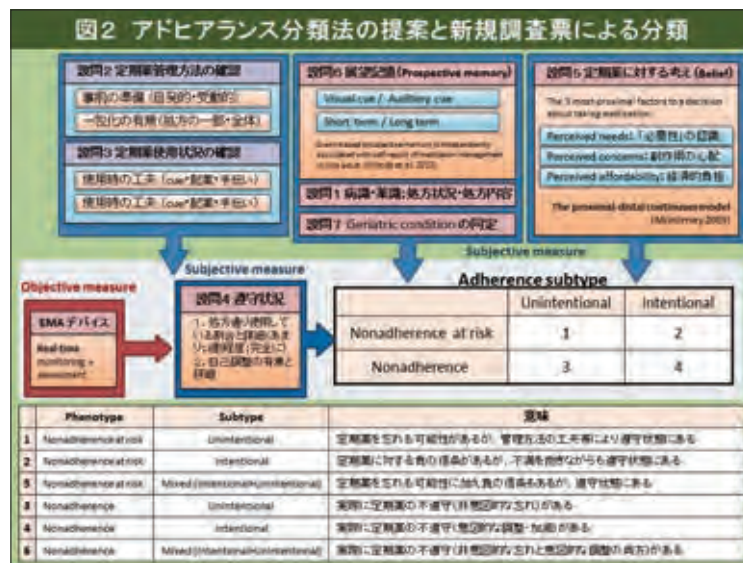


図2 アドヒアランスの分類法の提案と新規調査票による分類

今回提案したアドヒアランスの分類についての論文化を行い、妥当なものかどうか広く議論を行う。また、新規自記式調査票で得た回答情報から分類を行うアルゴリズムの検証を、アドヒアランスの状態が詳細にわかっている入院患者について検討することを通じて行う。

3. 客観的評価に用いる機器の開発と、自記式調査による主観的評価結果との組み合わせ方法

の検討

新規調査票の設問4で得た回答情報をconfirmするための客観的評価機器の開発が必要である。それにはまず使用薬剤を包括的に管理可能なデバイスの開発が必要で、昨年度内に実際の作成まで進めることができなかったため、今年度開発を行う。

地域在住中高年者に対するロコモーション トレーニングのサルコペニア予防効果の検証

埼玉医科大学 保健医療学部 理学療法学科
講師

新井 智之

研究期間 平成26年度（2年計画 1年目）

I 研究活動の概要

高齢化率が進む我が国では、変形性膝関節症・変形性腰椎症・骨粗鬆症など運動器障害を抱える人は、4700万人と推定されている。さらに近年では筋肉量の低下が引き起こすサルコペニアも注目され、運動器に障害を抱える高齢者は増加の一途をたどっている。そのため、高齢者の運動器障害を総合的に予防し、かつ誰もが簡単に実施できる汎用性の高いトレーニング方法が必要である。

このような背景から、申請者らはこれまでにロコモーショントレーニング（ロコトレ）による高齢者の運動介入に取り組んできた。ロコトレとはロコモティブシンドロームを予防するために提唱された運動であり、スクワットと片脚立ち運動を行うことが推奨されている。

申請者らのグループの研究では地域在住高齢者172名を対象に、2ヶ月間の自宅でのロコトレを行った。その結果下肢筋力、バランス能力、移動能力といった運動機能が有意に改善することを報告した（石橋・他, 2011）。また本研究で行うロコトレは、『スクワット』、『片脚立ち』、『かかと上げ』というわかりやすい3種類の運動だけを選択して指導すること、またトレーニングノートを配布することで、運動の継続率を高く保つ工夫をしている。実際に以前に行った介入研究では、8割以上の参加者が2ヶ月間で50日以上運動を実施するという高い継続率を保つことに成功した（石

橋, 2011)。以上のように本研究で行うロコトレは、一般的に言われているホームエクササイズの欠点を補った運動プログラムであり、高齢者の介護予防領域だけでなく、一般市民への健康増進分野への応用も十分可能であると考えられる。

しかし、これまでのロコトレの介入研究はコントロール群を設定するような無作為化比較対照試験では行われていない。申請者らは、これまで埼玉県伊奈町の一般住民約450人を対象にしたロコモティブシンドロームの関する横断調査を行ってきた。横断調査の結果を元に、本研究では介入研究として、ロコトレの効果を運動機能や生活機能の側面から検証することを目的とし、340名を対象とした無作為化比較対照試験を行う。さらに体組成計での筋量の評価を加えることでロコトレのサルコペニア予防効果を検証することを目的とし、高齢者の運動器疾患を総合的に予防できるかどうかを検討する。

本研究の対象は、要介護認定者と身体障害者を除く埼玉県伊奈町在住の60歳から79歳の一般住民である。伊奈町の協力を得て住民の中から男女、性別が均等になるように抽出された1200名に対し、本研究の説明書を送付し公募した。その後説明書が送付された1200名の中から研究の参加に同意した先着340人（男性163人、女性177人であり、平均年齢 69.8 ± 5.3 歳）を研究対象者とした。なお本研究は厚生労働省「疫学に関する倫理指針」に基づく倫理的原則を遵守し、研究を行い、埼玉医科

大学保健医療学部倫理委員会の承認を得て実施した。さらに対象となる高齢者全員に対し、十分な説明を文書及び口頭で行い、同意書を得た。

まず対象者を無作為にロコトレ群200人、コントロール群140人に割りつけた。その後ロコトレ群とコントロール群に対し初期評価を行った。初期評価では身体組成の指標として、身長、体重、体脂肪率、筋肉量を測定した。体重、体脂肪率、筋肉量の測定は体組成計（タニタMC-190）を用いて測定した。身長と体重の値からBody Mass Index (BMI) を算出した。測定した四肢の筋肉量から補正四肢筋肉量（SMI、四肢の筋肉量の総和を身長²で除した値）を求めた。

また運動機能として握力、膝伸展筋力、片脚立ち時間、Functional Reach Test (FRT)、快適歩行速度、最大歩行速度を測定した。

握力はアナログ式握力計（TKK5001, 竹井機器）を使用した。測定手の近位指節間関節が90度となるようにグリップ幅を調整した。測定は左右の最大筋力を1回ずつ測定し、最左右の最大値を採用した。

最大等尺性膝伸展筋力はハンド・ヘルド・ダイナモメーター（ μ Tas MT-1, ANIMA社製）を使用し測定した。測定肢位は股関節・膝関節90°の椅子座位とし、測定誤差を最小限にするために、ハンド・ヘルド・ダイナモメーターをベルトで下腿部に固定した。測定は左右1回ずつ行い、最大値を代表値とした。さらに測定肢の膝関節裂隙から測定部のハンド・ヘルド・ダイナモメーター中央部までの距離を計測し、下腿長とした。解析では測定値からトルクを求め、体重で除した値（Nm/kg）を採用した。

片脚立ち時間（秒）の測定は、開眼にて両手を腰にあてどちらか一方の足を床面から離れた片脚立ち姿勢で行った。検者は転倒に注意しながら、対象者が片脚立ち姿勢を維持できなくなるまでの時間をストップウォッチで測定した。測定の終了条件は、拳上側下肢

の測定が床または支持側下肢に接地すること、体幹が動揺し腰に当てた手が離れることとした。測定では事前に左右肢それぞれで練習を行い、安定している側の脚を選択した。その後選択した脚で2回測定を行った。測定時間は最大2分間とした。

Functional Reach Test (cm) は、Duncanらの方法に従って測定した²²⁾。対象者の左右のつま先を床面に設定した直線にあわせ直立姿勢をとり、その後肩関節屈曲90°、肘関節伸展、前腕回内位にて手指を屈曲させた。手指の先端位置を決めた後、対象者には前方に出来るだけリーチさせ、そのときの手指の先端位置を再び計測した。測定値は開始肢位と終了肢位の差を算出した。測定は2回行い、最大値を代表値とした。なお、計測肢は対象者の利き手側とし、リーチの方向は出来るだけ水平に行うように指示した。

快適と最大歩行速度の測定は吉村らの方法に従い測定した。対象者は6mの直進路を快適速度および最大速度で歩行し、その時の所要時間をストップウォッチを用いて行った。測定は快適および最大歩行それぞれ1回ずつ行った。なお対象者への指示は、快適歩行の場合は「普通で歩いてください」、最大歩行の場合は「できるだけ早く歩いてください」と統一した。

さらにアンケート調査として変形性関節症の質問票である Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index (WOMAC)、

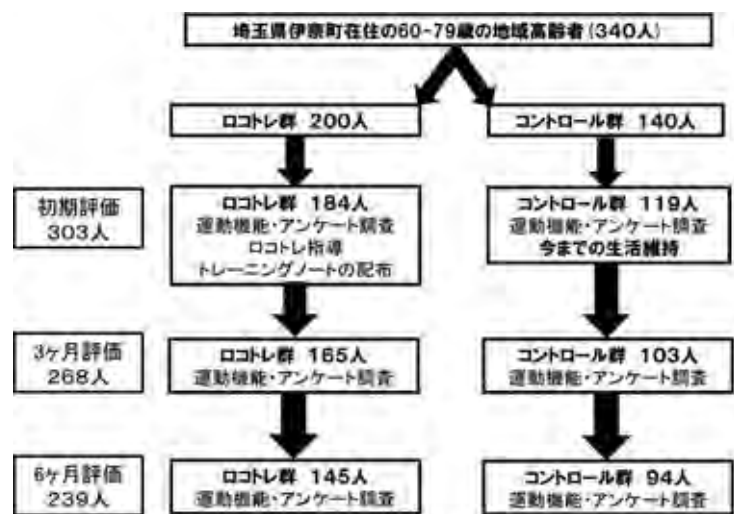


図 研究デザインと両群における対象者の変化

ロコモティブシンドロームの質問票であるロコモ25、QOLの質問票であるEuro QOL (EQ-5D) を聴取した。

初期評価の後、ロコトレ群に対してはロコトレを指導するための講習会を行った。本研究で指導したロコトレはスクワット、片脚立ち、かかと上げの3種類の筋トレとウォーキングとした。講習会はロコトレの方法が記載されたパンフレットを

配布し、30分程度で行った。ロコトレ指導経験のある理学療法士がスクワット、片脚立ち、かかと上げの実技指導とウォーキング方法を指導した。ロコトレ群の対象者は、その後6ヶ月間自宅でロコトレを実施していただく。ロコトレ群には自宅で行った運動を記録するためのトレーニングノートと活動量計を配布した。トレーニングノートには実際に行った運動種目と回数を記載するよう指示した。

一方コントロール群には活動量計のみを配布し、ロコトレに関する説明はなく、6ヶ月間今までの生活を継続していただくこととした。なおコントロール群についてはすべての調査が終了した6ヶ月評価後にロコトレに関する説明を30分程度行っている。

初期評価から3ヶ月後、6ヶ月後に初期評価と同様の項目の測定を行い、ロコトレの効果を検証した。解析は群（ロコトレ群、コントロール群）と介入期間（初期、3ヶ月後、6ヶ月後）の2要因での二元配置分散分析と多重比較を行った。

II 研究の成果

6ヶ月間の介入の結果、両群の変化に交互作用がみられた項目はBMI、体脂肪率、片脚立ち時間、最大歩行速度であり、その他の項目では交互作用はみられなかった。

BMIと体脂肪率についてはロコトレ群において主効果がみられ、初期に比べ3ヶ月後、6ヶ月後に有意に低下している結果となった。また片脚立ち時間はロコトレ群では初期（50.9±39.1秒）に比べ3ヶ月（69.4±41.6秒）、6ヶ月（72.2±42.8秒）と有意に向上した一方で、コントロール群では初期に比べ（57.5±39.7秒）、3ヶ月（48.1

表. 両群における6ヶ月間の介入効果の比較

	ロコトレ群 (n=145)	コントロール群 (n=94)	Between group P value	交互作用 P value
BMI (kg/m²)				
At baseline	23.3±2.9	22.7±2.8	0.150	0.010
3 Months	23.0±2.9	22.6±2.7	0.432	
6 Months	23.0±2.9	22.7±2.7	0.365	
Time effect(P value)	<0.001	0.685		
補正四肢筋肉量(kg/m²)				0.156
At baseline	7.12±1.09	6.82±1.11	0.030	
3 Months	7.21±1.08	6.98±1.13	**	0.244
6 Months	7.12±1.06	6.84±1.09	†	0.213
Time effect(P value)	<0.001	<0.001		
体脂肪率(%)				0.014
At baseline	25.3±8.6	25.7±7.0	0.932	
3 Months	23.9±8.7	24.7±7.5	**	0.700
6 Months	24.4±8.6	25.5±7.0	**、††	0.986
Time effect(P value)	<0.001	<0.001		
握力(kg)				0.634
At baseline	29.8±8.5	28.9±8.6	0.302	
3 Months	30.6±8.8	29.7±9.3	*	0.339
6 Months	31.2±8.7	30.0±8.7	**、†	0.244
Time effect(P value)	<0.001	0.004		
片脚立ち時間(sec)				<0.001
At baseline	50.9±39.1	57.5±39.7	0.231	
3 Months	69.4±41.6	48.1±37.1	**	<0.01
6 Months	72.2±42.8	49.7±36.6	**	<0.001
Time effect(P value)	<0.01	0.022		
FRT(cm)				0.191
At baseline	37.1±5.2	37.6±4.9	0.789	
3 Months	36.1±5.7	35.5±5.4	*	0.257
6 Months	38.3±5.5	37.8±4.9	**、††	0.571
Time effect(P value)	<0.001	<0.001		
快適歩行時間 (m/sec)				0.76
At baseline	1.44±0.23	1.44±0.22	0.986	
3 Months	1.47±0.20	1.46±0.23	*	0.772
6 Months	1.46±0.19	1.47±0.20		0.979
Time effect(P value)	0.088	0.340		
最大歩行時間 (m/sec)				<0.001
At baseline	1.92±0.27	1.93±0.24	0.679	
3 Months	1.97±0.26	1.94±0.26	**	0.395
6 Months	1.99±0.28	1.89±0.23	**	0.002
Time effect(P value)	<0.001	0.088		
膝伸筋力(Nm/kg)				0.115
At baseline	1.48±0.48	1.44±0.42	0.523	
3 Months	1.58±0.50	1.56±0.44	**	0.695
6 Months	1.66±0.48	1.52±0.72	**、††	0.119
Time effect(P value)	<0.001	0.159		
EQ-5D				0.595
At baseline	0.90±0.13	0.90±0.13	0.669	
3 Months	0.92±0.12	0.93±0.12	*	0.765
6 Months	0.92±0.13	0.91±0.13		0.490
Time effect(P value)	0.038	0.021		
WOMAC (点)				0.919
At baseline	2.7±5.4	3.3±6.4	0.483	
3 Months	2.8±5.4	3.5±6.8		0.540
6 Months	2.1±4.2	2.9±5.5	**、††	0.291
Time effect(P value)	0.003	0.410		
ロコモ25 (点)				0.248
At baseline	4.8±6.2	5.1±6.3	0.663	
3 Months	4.3±5.9	4.9±5.7	*	0.530
6 Months	3.7±4.9	4.8±5.9	**、††	0.117
Time effect(P value)	<0.001	0.798		

平均値 ± 標準偏差

BMI, Body mass index; SMI, Skeletal muscle index; FRT, Functional reach test; EQ-5D, EuroQol 5 dimension; WOMAC, Western Ontario and McMaster universities

*:vs At baseline P<.05, **:vs At baseline P<.01

±37.1秒)、6ヶ月(49.7±36.6秒)と有意に低下する結果となった。最大歩行速度はロコトレ群において初期(1.92±0.27秒)に比べ3ヶ月後(1.97±0.26秒)、6ヶ月後(1.99±0.28秒)に有意に向上している結果となった一方で、コントロール群では有意な変化がなかった。以上のことにより、本研究のロコトレの効果としてBMIと体脂肪の減少効果、片脚立ちと最大歩行速度の増加効果があることが明らかとなった。

その他の項目の両群間の比較に関して、握力ではロコトレ群、コントロール群ともに初期に比べ3ヶ月後、6ヶ月後に有意に向上していたが、ロコトレ群のみ3ヶ月後に対して6ヶ月後が有意に向上していた。また膝伸展筋力は両群ともに初期に比べ3ヶ月後に有意に増加していたが、ロコトレ群のみ6ヶ月後まで有意に増加していた。握力と膝伸展筋力に関してはロコトレ群のみ6ヶ月後まで有意な増加がみられた。このことからロコトレは半年程度継続することで、筋力増強効果があることが明らかとなった。

またアンケート調査項目では交互作用はみられなかったが、WOMAC(初期vs 6ヶ月後、3ヶ月後vs 6ヶ月後)とロコモ25(初期vs 3ヶ月後・6ヶ月後、3ヶ月後vs 6ヶ月後)がロコトレ群においてのみ有意に改善している結果となった。WOMACとロコモ25はそれぞれ変形性関節症とロコモティブシンドロームに関連する関節の痛みや生活動作能力を評価する総合的な質問票である。このことからロコトレを6ヶ月間継続することで、変形性膝関節症やロコモティブシンドロームに関わる生活機能が改善することが明らかと

なった。

6ヶ月間の介入の結果、補正四肢筋肉量は両群で同様の変化を示し、群間による違いや交互作用はみられなかった。その理由として対象者の健康度が高いことが考えら

れた。今回の対象者は平均年齢が約70歳と若く、他の運動機能評価の結果をみても比較的運動機能の高い対象者が多かった。そのため元々の筋肉量も高く、介入効果が少なかったと考えられる。

アジア人におけるサルコペニアの診断は握力、歩行速度及び筋肉量で規定される。本研究のロコトレ介入により、ロコトレ群の握力と歩行速度が有意に改善したが、筋肉量の改善はみられなかった。このことからロコトレ介入は筋力や歩行機能の改善効果を示すことが明らかとなり、サルコペニア予防において一定の効果を示す結果となった。

しかし一方で筋肉量の改善効果が得られなかったという課題が残る結果となった。今後は筋肉量を増加するための介入方法を再度検討する必要がある。まず介入対象者については、本研究の対象者より生活機能や身体機能が引く対象者を設定すること、さらに対象者に合わせた介入期間、運動負荷を設定する必要があると考える。また運動だけの介入ではなく栄養介入と合わせた介入方法も検討するべきであると考えられる。

そのため今後は本研究のサブ解析として、運動頻度や元々の運動習慣、活動量、栄養状態を含めた介入効果の検討を行う必要があると考える。これらのサブ解析を行うことでより効果的な筋肉量向上のための介入方法が明らかになると考える。

ヒト骨格筋由来間葉系前駆細胞を用いたサルコペニア治療法の開発

藤田保健衛生大学 総合医科学研究所
難病治療学 講師
上住 聡芳

研究期間 平成26年度（2年計画 1年目）

I 研究活動の概要

研究の目的

加齢に伴う骨格筋の萎縮と機能低下（サルコペニア）は、高齢者の activity of daily living (ADL) および quality of life (QOL) を損なう主要な原因である。超高齢社会を迎えた我が国において、サルコペニアは公衆衛生上極めて重大な問題となっている。

骨格筋組織を構成する筋線維は最も巨大な細胞で長さが数 cm に達するものもあるが、それゆえに構造上不安定な細胞である。さらに収縮により大きな物理的負荷にさらされる。にもかかわらず筋線維が維持されているのは、周囲の間質結合織と機能的に連結し支持されているからであり、結合織の異常は筋線維の恒常性破綻を導く。老化骨格筋では脂肪化や線維化といった間質結合織の異常が認められるが、申請者らはこの脂肪化や線維化の起源となる間葉系前駆細胞の同定に成功している (Uezumi et al., Nat Cell Biol, 2010; Uezumi et al., J Cell Sci, 2011)。間葉系前駆細胞は通常は健全な結合織を構成することで筋線維をサポートしていると考えられている (Uezumi et al., Front Physiol, 2014)。以上から、間葉系前駆細胞の異常により筋線維の維持機構が破綻し、サルコペニアにおける筋萎縮を導いていることが示唆される。

サルコペニアの予防・治療のためにはヒト細胞を用いた研究が望まれる。申請者らはマウスから

得られた研究成果を発展させ、ヒト骨格筋においても間葉系前駆細胞の同定、単離に成功している (Oishi et al., PLoS One, 2013; Uezumi et al., Cell Death Dis, 2014)。ヒト骨格筋に由来する間葉系前駆細胞の利用は、特に創薬研究において臨床有効性予測の観点から強力な研究基盤を提供する。

本研究では、サルコペニアにおける間葉系前駆細胞の加齢変化を解析し、筋萎縮を導く分子機序を明らかにする。また、ヒト間葉系前駆細胞の維持・培養系を最適化し確立する。さらに、間葉系前駆細胞の加齢変化を制御することによるサルコペニアの予防・治療法開発を目指す。

研究活動内容

I) 間葉系前駆細胞を欠損する遺伝子操作マウスの作製

間葉系前駆細胞の骨格筋維持における重要性を明らかにする目的で、間葉系前駆細胞を除去することを試みた。間葉系前駆細胞の特異的マーカーである *Pdgfra* のプロモーターにより *CreER* を発現するマウス (*Pdgfra-CreER*) と、*Cre* が作用すると *DTA* が発現し細胞が死滅するマウス (*R26R-DTA*) を交配し、間葉系前駆細胞をコンディショナルに欠損できる遺伝子操作マウスを作製した。また、*Cre-loxP* による組み替えの効率や特異性を評価するため、*Cre* が作用すると *YFP* が発現するレポーターマウス (*R26R-EYFP*) とも交配を行った。

Pdgfra-CreER/R26R-EYFPマウスにタモキシフェン投与後、YFPの発現を検査し、組み替えの効率、特異性を調べた。Pdgfra-CreER/R26R-DTAマウスにタモキシフェン投与し間葉系前駆細胞を欠損させ、間葉系前駆細胞欠損マウスの表現型（体重、筋力、筋重量、筋線維断面積、筋線維タイプ）を精査し、コントロールマウスと比較・解析した。

II) 老化による間葉系前駆細胞の特性変化解析

老化マウスおよび若齢コントロールマウスの骨格筋から直接的に単離した間葉系前駆細胞のトランスクリプトーム解析を行うことで、老化による間葉系前駆細胞の特性変化を分子レベルで調べた。老化マウスおよび正常若齢マウスの骨格筋を酵素処理し、単核細胞を得た。骨格筋由来単核細胞を間葉系前駆細胞のマーカであるPDGFR α 、筋衛星細胞のマーカSM/C-2.6、血管内皮マーカCD31、血球マーカCD45で染色後、セルソーターを用いて各細胞分画（間葉系前駆細胞：PDGFR α ⁺SM/C-2.6⁻CD31⁻CD45⁻、筋衛星細胞：PDGFR α ⁻SM/C-2.6⁺CD31⁻CD45⁻、血管内皮細胞：PDGFR α ⁻SM/C-2.6⁻CD31⁺CD45⁻、血球細胞：PDGFR α ⁻SM/C-2.6⁻CD31⁻CD45⁺）を単離した。各細胞分画からRNAを精製し、マイクロアレイにより網羅的遺伝子発現解析を行った。

III) ヒト間葉系前駆細胞の維持・培養系の確立

ヒト間葉系前駆細胞を用いてその加齢変化を制御する手法を開発する目的で、ヒト間葉系前駆細胞の維持・培養法の最適化を行った。ヒト骨格筋から間葉系前駆細胞を単離し、種々の増殖因子（bFGF、EGF、IGF-I、IGF-II、LIF、HGF）の下で、また、様々な培養基質上（collagen I、collagen IV、fibronectin、laminin）で培養し、細胞増殖の程度を比較した。最適化された培養条件でヒト間葉系前駆細胞を維持・増殖後、脂肪・骨分化能を調べ

細胞の品質を評価した。

II 研究の成果

I) 間葉系前駆細胞を欠損する遺伝子操作マウスの作製

Pdgfra-CreER/R26R-EYFPマウスにタモキシフェン投与後、筋切片をYFPとPDGFR α で染色し、Cre-loxPの組み替え効率、特異性を調べた。その結果、組み替え効率は63.1 \pm 9.2%で、特異性は99.5 \pm 1.2%であり非常に特異的であることが明らかになった。次に、Pdgfra-CreER/R26R-DTAマウスにタモキシフェン投与後、筋切片をPDGFR α で染色し間葉系前駆細胞の欠損の程度を調べた。Pdgfra-CreER/R26R-DTAマウスではPDGFR α 陽性間葉系前駆細胞数の顕著な減少が確認できた（図1）。

Pdgfra-CreER/R26R-DTAマウスの体重はタモキシフェン投与終了直後から有意な減少が見られ、6週後も体重の低下は続いていた。グリップ試験による筋力測定においてもPdgfra-CreER/R26R-DTAマウスではタモキシフェン投与終了直後から有意な筋力低下が見られ、6週後もそれ

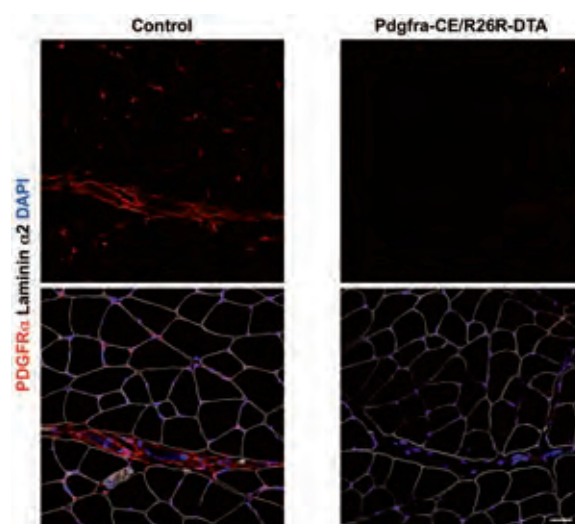


図1 Pdgfra-CreER/R26R-DTAマウスにおける間葉系前駆細胞の減少
Pdgfra-CreER/R26R-DTAマウスおよびコントロールマウスの骨格筋切片をPDGFR α （赤）で染色した。Pdgfra-CreER/R26R-DTAマウスでPDGFR α 陽性間葉系前駆細胞の顕著な減少が確認できる。

は続いていた。

Pdgfra-CreER/R26R-DTA マウスの筋重量は顕著に減少しており、筋線維断面積を測定した結果、顕著な筋萎縮が明らかになった。興味深いことに、Pdgfra-CreER/R26R-DTA マウスの骨格筋は遅筋優位に変化しており、老化骨格筋と似た変化を示した (図2)。

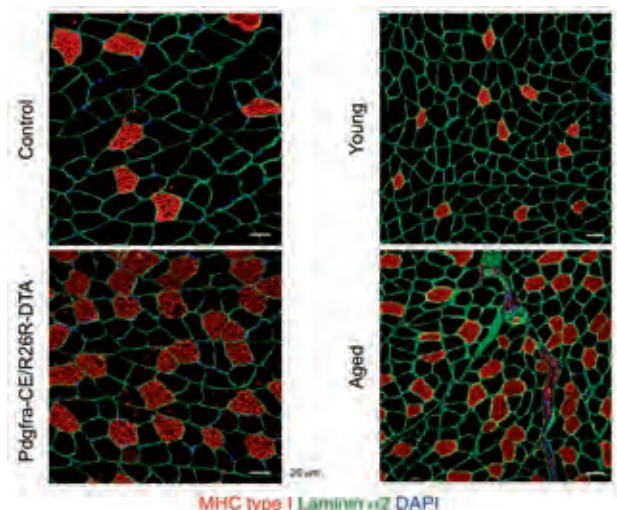


図2 Pdgfra-CreER/R26R-DTA マウスで起こる first-to-slow の筋線維タイプ変化
Pdgfra-CreER/R26R-DTA マウスおよび老化マウスの遅筋線維 (MHC type I: 赤) を染色した。両マウスで類似した変化が観察される。

II) 老化による間葉系前駆細胞の特性変化解析

老化マウスおよび正常若齢マウスの骨格筋からセルソーターを用いて間葉系前駆細胞、筋衛星細胞、血管内皮細胞、血球細胞を単離し、マイクロアレイにより網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、間葉系前駆細胞特異的に老化に伴い発現低下する遺伝子群 (26遺伝子) および発現上昇する遺伝子群 (7遺伝子) を同定した。

III) ヒト間葉系前駆細胞の維持・培養系の確立

ヒト骨格筋から間葉系前駆細胞を単離し、bFGF、EGF、IGF-I、IGF-II、LIF、HGF 添加の下で培養し、増殖に及ぼす効果を調べた。その結果、bFGF が間葉系前駆細胞の増殖を促進することが明らかになった (図3)。また、collagen I、collagen IV、fibronectin、laminin

コーティングの培養容器で培養し、細胞増殖の程度を比較した。その結果、laminin コーティングは間葉系前駆細胞の増殖を低下させた (図3)。以上から、bFGF 添加、collagen I コーティングを最適なヒト間葉系前駆細胞の維持・培養条件として決定した。

最適化された培養条件でヒト間葉系前駆細胞を維持・増殖後、脂肪・骨分化能を調べた結果、旺盛な分化が確認でき高い品質が維持されていることが明らかとなった。現時点で 1×10^8 細胞まで品質を維持し増殖させることに成功している。

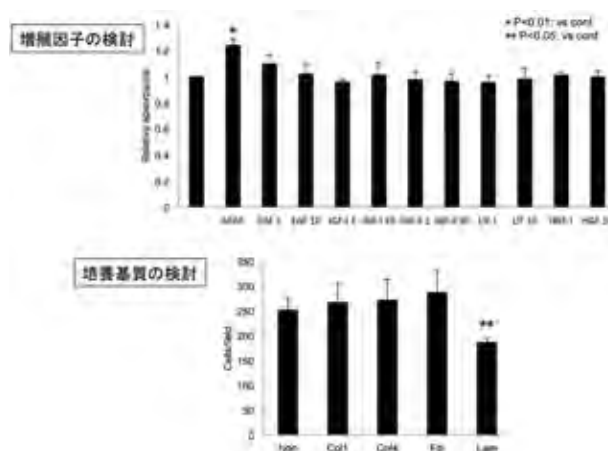


図3 ヒト間葉系前駆細胞の維持・培養条件の最適化
ヒト間葉系前駆細胞の増殖に及ぼす各種増殖因子 (上段) および培養基質 (下段) の影響を調べた。

III 今後と期待される成果

本年度の研究で、間葉系前駆細胞が定常状態の骨格筋の維持に必須で間葉系前駆細胞の欠損がサルコペニア様の筋萎縮を誘導することを明らかにした。また、老化に伴い間葉系前駆細胞で起こる遺伝子発現変化を明らかにした。今後、これら遺伝子の骨格筋維持における機能を解析していく予定である。さらに、ヒト間葉系前駆細胞を性質を維持したまま 1×10^8 細胞まで増殖できる培養条件を決定した。この成果はヒト間葉系前駆細胞を用いてその加齢変化を制御する手法の開発に役立つと期待できる。

口腔乾燥症の発症における唾液粘性物質の役割

国立研究開発法人 国立長寿医療研究センター
研究所

山越 貴水

研究期間 平成26年度（2年計画 1年目）

I 研究活動の概要

[目的]

口腔内へ唾液を分泌する唾液腺組織の加齢に伴う機能低下は口腔乾燥症（ドライマウス）を引き起こすだけでなく、口腔乾燥症を背景とする口腔内汚染と加齢に伴う嚥下障害により高齢者肺炎の殆どを占める誤嚥性肺炎のリスクを高める。しかしながら、加齢に伴い唾液腺組織機能が低下するメカニズムは未だ不明である。

私達はこれまで、インビボイメージングシステムを用いて加齢による唾液腺機能低下のメカニズムを解明するために有用と考えられるモデルマウスを作製し、このモデルマウスを用いて唾液腺の一つである顎下腺組織において、ポリコーム蛋白質であるBmi-1が癌抑制遺伝子として知られるp16の発現抑制を行うことで唾液を分泌する腺房細胞の数を制御することを明らかにしてきた（Yamakoshi et al., Aging Cell, 2015）。大変興味深いことに、研究遂行過程において、私達は以下のことも見出した（未発表）。

- ①加齢に伴い、唾液腺の腺房細胞内に含まれる唾液の漿液性成分と粘性成分の割合が変化し、粘性物質が増加する。
- ②Bmi-1がない唾液腺組織においても類似の現象が認められる。

これらのことから、唾液腺機能低下は唾液の量だけでなく唾液の質をも低下させると考えられ、

唾液の質の低下にはBmi-1による唾液粘性物質合成・調節機構の破綻が関与している可能性が示唆される。

また、近年、加齢により様々な組織でリンパ球浸潤を伴う慢性炎症が生じ組織・臓器の機能障害や治療抵抗性が問題となっている。私達は、加齢により唾液腺組織においてもリンパ球浸潤が生じることを確認しており、唾液腺組織の炎症と加齢による粘性物質増加の関係は大変興味深い。

そこで本研究では、加齢により唾液粘性が増加するメカニズムと唾液粘性の亢進が加齢に伴い生じる組織の慢性炎症を引き起こす仕組みを明らかにすることを目的とする。

[活動内容]

本年度は、加齢により顎下腺で増加する粘性物質の同定と、加齢及びBmi-1遺伝子欠損による顎下腺での炎症性メディエーターレベルの解析を行った。

- (1) 加齢により顎下腺で増加する粘性物質の同定
粘液の主要な糖蛋白質であるムチンはコア蛋白と呼ばれる核となる蛋白質が高グリコシル化された高分子糖蛋白質である。加齢により顎下腺で増加する粘性物質を同定するために、まず、難分析性糖蛋白質を分析するための方法である分子マトリクス電気泳動（SMME）により、ムチンやプロテオグリカン等の分離を行った。その結果、老齢マウスには若齢マ

ウスに見られないスポットが観察された（図1）。次に、老齢マウスにのみ出現したスポットを切り出し、膜状でのアルカリ還元β脱離によりO-グリカンを遊離後、完全メチル化し質量分析（MALDI-TOF MS）の糖鎖分析を行ったところ、O-グリカンの検出を確認すると同時に、酸性糖鎖であるシアロ糖鎖の比率が増加していたことから、加齢により新たな酸性ムチンが発現するようになることが分かった（図2）。



図1 マウス顎下腺の分子マトリクス電気泳動 (SMME) による分析

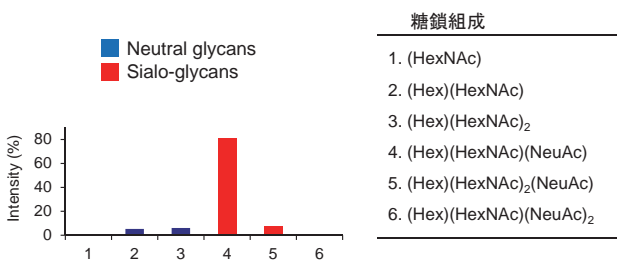


図2 ムチンの糖鎖比較

(2) 加齢及びBmi-1遺伝子欠損による顎下腺での炎症性メディエーターレベルの上昇

私達のこれまでの研究結果から、加齢により野生型マウスの顎下腺組織内の導管周囲にリンパ球が浸潤することが分かっている。老齢マウスの顎下腺における炎症性サイトカインのレベルを調べたところ、若齢マウスに比

べてIL-1β, MCP-1, MIP-1αやTNF-αのレベルが顕著に上昇していた。このことから、加齢により顎下腺では炎症状態が誘導されているものと考えられる。そこで、粘性物質の増加が認められたBmi-1遺伝子欠損マウスの顎下腺についてもリンパ球浸潤や炎症性サイトカインレベルの亢進が認められるかどうかを調べた。その結果、Bmi-1遺伝子欠損マウスの顎下腺では老齢マウスの場合と異なり、リンパ球浸潤を認めなかった。しかし、炎症性サイトカインであるIL-6やGro-αのレベルはBmi-1遺伝子欠損により顕著に上昇した。すなわち、これらの事実は粘性物質の蓄積が炎症を引き起こしている可能性を示唆した。

II 研究の成果

本研究では、加齢により唾液粘性が亢進するメカニズムと唾液粘性増加が加齢に伴う慢性炎症の発生に及ぼす効果の解明を目指し、本年度はまず、加齢により顎下腺で増加する粘性物質の同定と炎症性メディエーターのレベルについて解析を行った。分子マトリクス電気泳動と質量分析を組み合わせた分析の結果、加齢により新たな酸性ムチンが発現するようになることが分かった。ムチンは上皮細胞等から分泌される粘性物質で、コア蛋白と呼ばれる蛋白が無数の糖鎖によって修飾されて生成した巨大分子の総称で、ムチンのコア蛋白をコードする遺伝子はマウスでは少なくとも約20種類存在することが分かっている。加齢に伴い顎下腺で新たに発現するムチン遺伝子を同定することが出来れば、同定されたムチン遺伝子の発現調節機構や加齢過程での発現調節機構の異常を明らかにすることで加齢により唾液粘性が亢進するメカニズムを解明できる可能性があると考えられる。また、同定されたムチンの腺房細胞内における蓄積が炎症を誘導する可能性についての研究を進展させることが期待され、研究の成果は着実に得られた。

ユビキタス時代に即した高齢者のための 自然な視線誘導技術と視認性評価技術の実現

岡山県立大学 情報工学部 情報通信工学科
助教

滝本 裕則

研究期間 平成26年度（1年計画 1年目）

I 研究活動の概要

1. 研究背景と目的

代表的な加齢に伴う眼疾患としては白内障や緑内障が挙げられ、50代の半数以上がなんらかの加齢性白内障の症状を引き起こしているといわれる。このような加齢性の眼疾患は、視野の狭窄や色の見えの変化を引き起こすため、実生活において視覚から得られる情報の欠落が懸念される。近年では、カラーバリアフリーの概念が普及しつつあるが、加齢に伴う眼疾患のタイプや程度は様々であるため、各個人の見え方に全て適応することは困難であり、比較的カラーユニバーサルデザインが考慮されている公共空間での案内表示板や商品パッケージにおいても、情報欠落の危険性が指摘されている。

本研究では、高齢者が安心安全に暮らせるよう日常的な活動を支援する情報提示空間の実現を目指し、自然かつ効果的な視線の誘導を行うため、視覚的顕著性に基づき、無意識的な視覚的注意である誘目性に影響を及ぼす画像の特徴を明らかにし、加齢に伴う眼疾患に応じた誘目性モデルの構築を目的とする。また、得られた誘目性モデルに基づいて視覚刺激を加工し、高齢者の注視を自然に誘導することを目的とする。高齢者の注視を自然かつ効果的に誘導することが可能となれば、近年注目されている「人と調和する情報環境を実現するための新しいデバイス」であるウェアラブル

透過型視覚デバイスやプロジェクタ・カメラ協調システムなどと組み合わせることにより、運転の補助や公共空間での案内表示など様々な場面において自然に注意を促すことが期待される。

2. 高齢者のための視覚的注意モデルの確立

人は、視覚情報の中から重要と思われる情報を瞬時に判断し、効率的かつ選択的に情報を獲得しており、このメカニズムは視覚的注意と呼ばれている。この視覚的注意を視覚メカニズムの初期段階で事前処理として用いることにより、その後の認識や判断などのより高次な処理を簡素かつ高速に実現している。視覚的注意には、ボトムアップ注意とトップダウン注意があり相互に干渉しながら注意を制御している。ボトムアップ注意は、色や明るさなど外発的要因によって刺激され無意識に向けられる注意であり、トップダウン注意は、知識や記憶などの内発的要因によって刺激され意図的に向けられる注意である。

一方、高齢者の色覚を検討するうえで、水晶体の加齢変化、すなわち黄変化や白濁化等を要因とする色覚の劣化は全ての人に起こりうる老化現象であり、非常に重要である。加齢性白内障患者の水晶体の分光透過率は、特に400～500nmの短波長帯域で著しく低下することが知られている。

そこで我々は、水晶体の加齢変化に伴う色覚劣化を考慮した視覚的注意モデル、すなわち、視野内の視覚情報の顕著さである目立ちやすさの空間

分布である視覚的顕著性マップを算出するモデルを提案した。特に、人の視覚的顕著性に寄与するボトムアップの画像特徴として、輝度成分や色成分、空間周波数成分が挙げられるが、我々は、注視の誘導を目的とした視覚刺激の加工を考慮し、輝度と色成分に基づく視覚的顕著性マップモデルと、空間周波数成分に基づく視覚的顕著性マップモデルをそれぞれ提案した。

まず、輝度と色成分に基づく視覚的顕著性マップモデルについて述べる。高齢者の視覚の代表的な変化として、前述のように加齢に伴い水晶体の黄変が生じる。ここで、代表的な水晶体加齢モデルとしてPokornyらのTwo-Factorモデルが知られており、本モデルに基づいて岡島らは高齢者の水晶体の分光透過率特性を明らかにしている。このような先行研究より、高齢者の水晶体分光透過率は、特に短波長側（青色）で著しく低下することが知られている。そこで、これらの知見に基づき、水晶体の黄変を考慮し、輝度と色成分からなる視覚的顕著性マップモデルを提案した。具体的には、視覚刺激である入力画像のRGB成分をCIE $L^*a^*b^*$ 表色系に変換し、青-黄の色差を表す b^* 成分を除いた、輝度を表す L^* 成分と緑-赤

の色差を表す a^* 成分のみからなる視覚的顕著性マップを提案した。提案する視覚的顕著性マップモデルの概要を図1に示す。

一方、加齢による視力低下に伴い、高い周波数成分に対する感度が低下するため、像がボケて知覚されることはよく知られている。そこで、我々は、図2に示すような空間周波数成分に着目した視覚的顕著性マップのモデルを新たに提案した。提案モデルでは、視覚刺激である入力画像をCIE $L^*a^*b^*$ 表色系に変換後、輝度を表す L^* 成分に対して周波数解析手法のひとつであるウェーブレット変換を適用し、サブバンド成分に分解する。なお、信号の周波数-時間軸の解析に用いるマザー・ウェーブレットにDaubechies ウェーブレット基底を用いた。人は特徴のコントラスト（違い）の大きいところに無意識的に注目を向けることが知られている。そこで、異なるサブバンド成分間の差分計算（Center-surround difference 処理）を行うことにより、人が注目しやすい領域を抽出した。なお、視力が低下した高齢者の視覚特性を考慮し、一般的な視覚的顕著性マップよりも低い周波数成分に注目し、それらを用いて視覚的顕著性マップを求めた。詳細なアルゴリズムについては

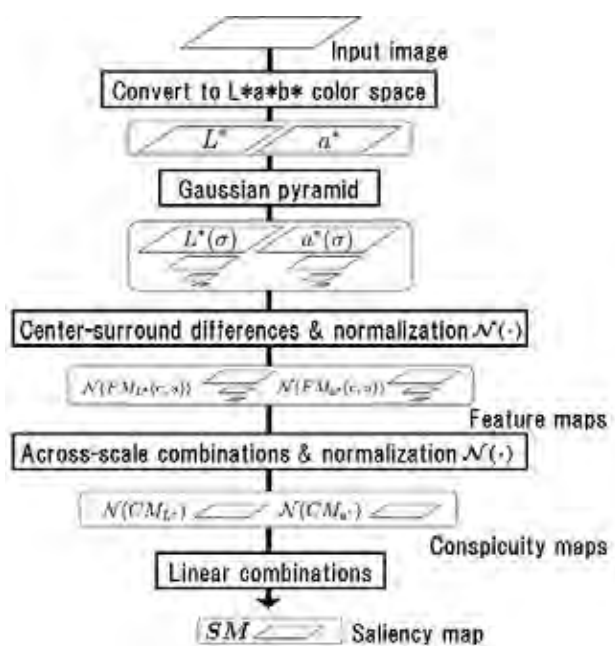


図1 輝度と色成分に基づく視覚的顕著性マップモデル

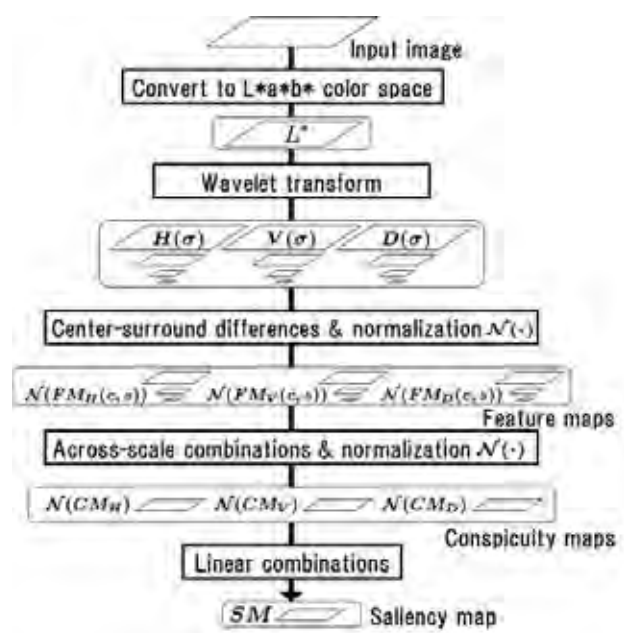


図2 空間周波数成分に基づく視覚的顕著性マップモデル

「Ⅲ 研究成果発表」に記載している文献2～4を参照されたい。

3. 視覚的注意モデルに基づく注視誘導技術の確立

人は、周辺視野内の情報により次に注視すべき対象を検出し、中心視によりその詳細を確認している。このとき、人の興味や目的といった要因を考慮しなければ、視野内で最も視覚的顕著性が高い領域が優先的に注視されると考えられている。この考えに基づき、注視誘導の対象が画像中で最大の視覚的顕著性を示すように画像特徴を調整することで、注視を誘導する手法を提案した。本研究では、高齢者のための視覚的注意モデルとして、特性の異なる「輝度と色成分に基づく視覚的顕著性マップモデル」と「空間周波数成分に基づく視覚的顕著性マップモデル」をそれぞれ提案しているため、各視覚的注意モデルに応じた注視誘導のための画像加工技術を提案した。

まず、輝度と色成分に基づく視覚的顕著性マップモデルを利用した注視誘導技術として、注視を誘導したい領域の視覚的顕著性が最も高くなるように、 $L^*a^*b^*$ 表色系の各成分 (L^* と a^*) を視覚的顕著性マップに基づいて画素ごとに調整した。

一方、空間周波数成分に基づく視覚的顕著性マップモデルを利用した注視誘導技術として、注視を誘導したい領域以外の領域において、高い顕著度を持つ画素に直接影響を与える周波数成分を抑制することで対象領域以外をぼかすことにより、対象領域に注視を誘導する手法を提案した。それぞれの詳細なアルゴリズムについては「Ⅲ 研究成果発表」に記載している文献2～4を参照されたい。

評価実験の設定

提案した視覚的注意モデルと、視覚的注意モデルに基づく注視誘導技術の有効性を検証するために被験者実験を行った。視線計測には、ディテクト社の視線計測システムQG-PLUSを用いた。視線計測の精度向上を目的とし、被験者の頭部は顎

台にのせ、さらに加速度計によって頭部の動きを計測した。また、前方60cmの位置に視覚刺激を提示する液晶ディスプレイを設置した。視覚刺激提示前は画面中央に位置する固視点を注視させ、その後、実験画像を提示し視線の計測を行った。

被験者に関して、加齢に伴う水晶体の黄変化の影響のみを検証するため、正常色覚を有する成人男性5名に高齢者水晶体擬似メガネ (FVG) を装着してもらった。なお、高齢者水晶体擬似メガネによって実験を行う際、背後からの入射光の影響が懸念されるため、暗室内にて標準光D65の環境下で実験を行った。

Ⅱ 研究の成果

図3に、提案法によって得られる「輝度と色成分に基づく視覚的顕著性マップ」と「空間周波数成分に基づく視覚的顕著性マップ」を可視化したものを示す。図3において、(a)と(c)はそれぞれ原画像であり、(b)と(d)は高齢者にとって無意識的に注意を引き付けやすい領域を可視化したものである。なお、より注目を集めやすい、すなわち目立ちやすい領域ほど赤っぽい色で表示している。

また、提案した視覚的注意モデルが注視行動を推定できているか定量的に評価するため、視線計

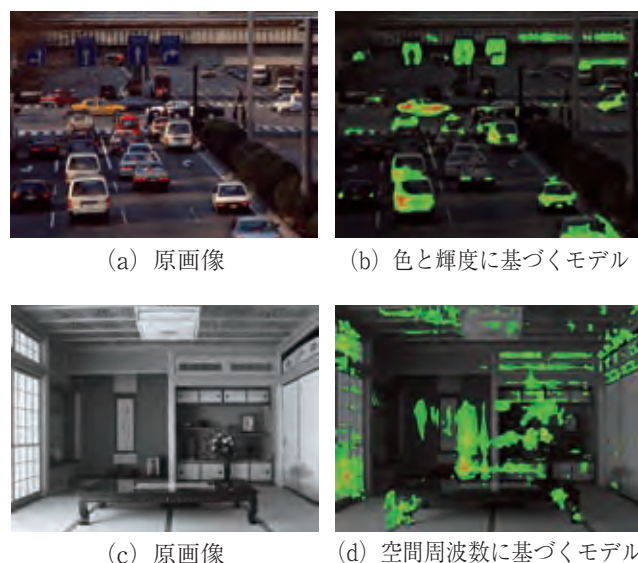


図3 高齢者のための視覚的注意モデルによる目立ち領域の可視化

測の結果を評価指標 Percentile を用いて評価した。Peetersらによって提案された評価指標である Percentile は、視覚的顕著性マップにおいて、ある被験者の視線位置での顕著度が視覚刺激全体においてどの程度の高さであるかを示す尺度である。Percentile 値の結果として、輝度と色成分に基づくモデルでは0.620、空間周波数成分に基づくモデルでは0.625であり、比較的高い精度で注視を推定可能であることを確認した。これらの結果より、高齢者の注視の引き付けやすさを高精度かつリアルタイムで定量的に求めることが可能であることを確認した。

次に、視覚的注意モデルに基づく注視誘導技術の評価について述べる。まず、図4と図5に、各視覚的顕著性マップモデルに基づいて画像加工を行った例を示す。各画像において、(a) は原画像、

(b) は原画像に対して高齢者にとって無意識的に注意を引き付けやすい領域を可視化したもの、(c) は注視を誘導するため画像 (a) を各手法で加工したもの、(d) は画像 (c) の注意を引き付けやすい領域を可視化したものである。なお、注視を誘導する対象は、図4上の例では左上にある標識、図4下の例では左側の看板、図5上の例では画像中央の花、図5下の例では左下の野菜である。これらの図より、注視を誘導したい対象の顕著度が相対的に高くなっており、高齢者の注視を誘導可能であることが確認できた。

また、原画像と提案法によって加工を行った画像に対して視線計測を行った結果 (スキャンパス) を図6に示す。図6において、画像中の数字は注視が移動した順番であり、円の大きさは注視時間の長さを表している。ただし、半径100 pix. の範



(a) 原画像

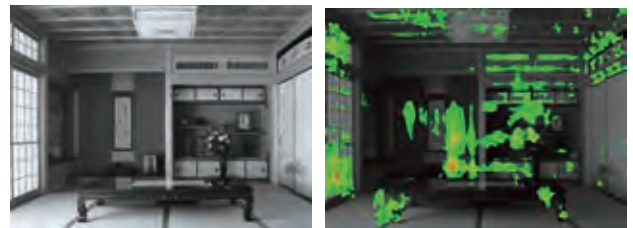
(b) 画像aの顕著性マップ



(c) 加工後の画像

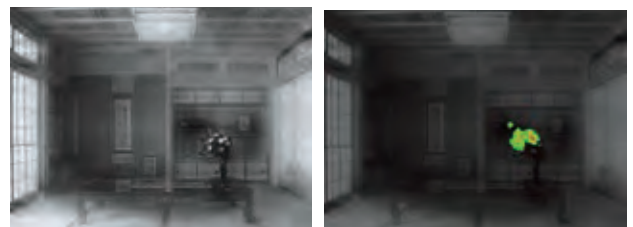
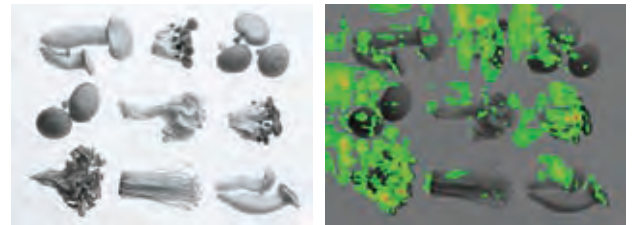
(d) 画像bの顕著性マップ

図4 視覚的顕著性マップ (輝度と色成分) を用いた画像加工の結果



(a) 原画像

(b) 画像aの顕著性マップ



(c) 加工後の画像

(d) 画像bの顕著性マップ

図5 視覚的顕著性マップ (空間周波数成分) を用いた画像加工の結果



図6 視線計測実験の結果（各手法によって加工した画像とスキャンパス）

囲内に100ミリ秒以上視線が停留したものに限り計測した。なお、この例において、注視を誘導したい対象は左側の看板である。結果より、提案手法で加工した画像は、原画像に比べて早い段階で被験者の注視を誘導できていることが確認できた。

今後の課題として、ウェアラブル透過型情報端末などへの応用が挙げられる。近年、ウェアラブル透過型視覚デバイスが注目されており、このような端末が高齢者に対して効果的に注意を促すための視覚補助デバイスとして期待されている。したがって、我々が提案した注視誘導技術をウェアラブル端末に搭載し、実環境下での評価が必要であると考えている。

Ⅲ 研究成果発表

この研究成果の一部について、下記の通り発表を行った。

1. 滝本 裕則：“効果的な広告デザインの検討と視覚障害者福祉の実現に向けた視線誘導技術”，第19回岡山リサーチパーク 研究・展示発表会，(2014.9)
2. 国井 達彦，滝本 裕則，山内 仁，岸原 充佳，大久保 賢祐：“視覚的顕著性に基づく色修正による注視誘導の実現”，ViEW2014 ビジョン技術の実利用ワークショップ 講演論文集，IS 2-23，(2014.12)
3. 人見 修平，国井 達彦，滝本 裕則，山内 仁，岸原 充佳，大久保 賢祐：“周波数成分に基づく視覚的顕著性を用いた注視誘導の検討”，ViEW2014 ビジョン技術の実利用ワークショッ

プ 講演論文集，IS 1-25，(2014.12)

4. S. Hitomi, T. Kokui, H. Takimoto, H. Yamauchi, M. Kishihara, and K. Okubo: “Guiding Visual Attention Using Saliency Map Based on Wavelet Transform,” Proc. of RISP International Workshop on NCSP, pp. 90-93, (2015.3)

細胞老化を制御する long non-coding RNA を用いた細胞老化状態からの回復

国立研究開発法人 国立長寿医療研究センター 研究所
老化機構研究部流動研究員

岩下 雄二

研究期間 平成26年度（1年計画 1年目）

I 研究活動の概要

背景・目的

65歳以上の人の割合が全国民の21%以上を占める超高齢社会を、世界でもっとも早く迎えた日本において、癌、糖尿病、認知症を始めとする、老化関連疾患の病態の理解と、診断・予防・治療法の開発は、長寿を実現するために、社会あるいは研究者が最も優先して取り組み、乗り越えるべき課題の一つである。老化とは、加齢に伴い、身体の機能が低下する現象である。老化の原因として考えられるものは、個体の組織を形成する細胞の種類と量の変化や、細胞における遺伝子発現・機能の変化などであるが、その具体的な仕組みについては不明な点が多い。細胞老化は、ある程度の分裂を繰り返した細胞が、不可逆的に増殖を停止する現象を指し、個体老化の原因の一つと考えられている。一方で、近年になって、細胞老化は無制限に増殖する癌細胞の増殖を防ぐことも分かり、生来備わった癌抑制機構としても注目を集めている。しかし、細胞老化という細胞の運命決定の変化が、どのような仕組みで行われているのか、まだ不明な点が多い。

Long non-coding RNA (lncRNA) は、超並列型DNAシーケンサーにより可能となった、ゲノムワイドな転写物・クロマチン状態の測定により見出された新しいタイプの遺伝子で、タンパク質をコードしていない200 bp以上のRNAと定義

される。現在、タンパク質に翻訳される遺伝子の数がヒトで19881種であるのに対し、lncRNAは15877種が存在している（GENCODE version 21, 2014 June freeze）。ヒトゲノム計画の後継として、アメリカのNHGRIが主導して行ったENCyclopedia Of DNA Elements (ENCODE) プロジェクトにおいても、lncRNAの存在と重要性が強調された。古くから知られるribosomal RNAやtransfer RNAなどと同様に、lncRNAはRNAのままDNA, RNA, タンパク質に作用する機能性RNAであり、クロマチン修飾を通じた遺伝子発現制御を始めとするほぼ全ての酵素反応において、制御的な役割を果たすことが分かりつつある。タンパク質をコードする遺伝子と同様に、lncRNAは組織特異的発現を示し、lncRNAの発現動態の変化が細胞の運命決定に関与する例が報告されている。大量のlncRNAの発見により、これまで主にタンパク質をコードする遺伝子のみを使って検証されてきた既存の生命システムを、lncRNAという機能分子の役割も考慮したうえで、ゲノムワイドに網羅的かつ総合的な解析を通じて、分子ネットワークとして再構築するという、大規模な研究パラダイムの変化が世界中で起こっている。

本研究はMouse Embryonic Fibroblast (MEF) の継代培養による細胞老化モデルと、活性化型RAS癌遺伝子の過剰発現による細胞老化モデルを用いて、新規の老化関連遺伝子、特にlncRNA

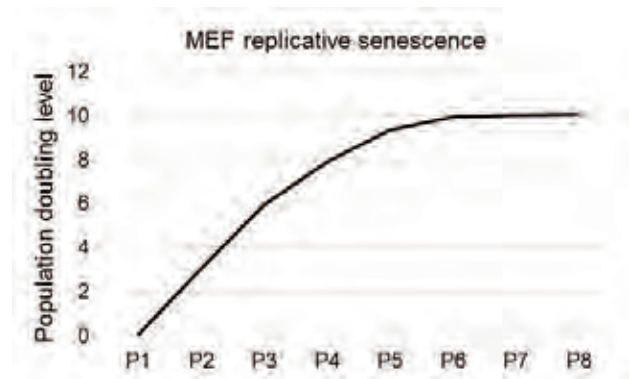
タイプの遺伝子を同定することを目的とする。長寿科学において、同様の解析はタンパク質をコードする遺伝子については少ないながらも例があるが、まだほとんど解析の進んでいないlncRNAに焦点を絞ることで、老化の原因となりうる新しい遺伝子の仕組みを明らかにすることが期待できる。老化に関連するlncRNAが網羅的に同定され、機能が明らかになれば、老化と分子基盤を共有すると考えられる細胞増殖、細胞分化、ガンやその他の病気の原因の解明も進み、それらの診断・治療・予防の方法の開発につながる。この研究の中から同定された特定のlncRNAを過剰発現または発現抑制することで、老化状態に近づけたり、遠ざけたりできるなら、細胞老化の新たなモデルの一つとして有用な研究ツールにもなる。プロジェクト終了後に公開した情報を元に他の研究者が、それぞれ専門とするガン細胞種において、これらのlncRNAの発現を制御し、細胞増殖能を測定するという、同じ方法を用いて材料を変えるだけのシンプルなスキームで、臨床応用に向けた重要な情報を速やかに増やすことができる体制を目指す。

II 研究の成果

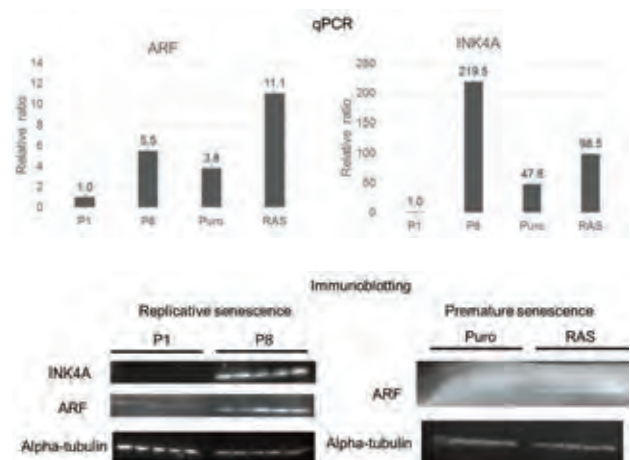
方法・結果

野生型 C57BL/6マウスを交配し、胎生14.5日目の胚の頭部と内臓を除き、トリプシンで細胞をかい離させ、一晚培養させたのち、凍結保存した。凍結した同腹の胎児由来のMEF x5を解凍し、passage 1 (P1) として培養し、total RNA と protein を取得した。3T3 protocolに基づき、3日おきに 1×10^6 cell/100mm dish で培養し、passage 2-8 (P2-P8) とした。Passage ごとの細胞数を数え、培養を開始したときから何倍になったかを、population doubling level (PDL) として計測し、細胞増殖の停止を確認できたP8のtotal RNA と protein を取得した。(replicative senescence)。活性化型RAS変異体と puromycin 耐性遺伝子を持つレンチウイルス (RAS)、また

は puromycin 耐性遺伝子のみを持つレンチウイルス (Puro) を P2 の MEF に感染させ、puromycin による選択を行い、total RNA と protein を取得した (RAS-induced premature senescence)



Replicative senescence と RAS-induced premature senescence を起こした MEF の RNA と protein を用いて、qPCR と immunoblotting を行い、それぞれの細胞老化モデルに伴い、細胞老化マーカー遺伝子である ARF と INK4A 遺伝子の発現が上昇していることを確認した。



Agilent BioAnalyzer を用いて、RNA の品質の指標である RNA Integrity Number (RIN) が高水準 (9.70-10) であることを確認した。全 55821 probes のうち 16252 probes が lncRNA をターゲットとする、Agilent SurePrint G3 Mouse GE microarray を用いて、P1, P8, Puro, RAS (それぞれ n=3) のトランスクリプトームワイドな遺伝子発現変化を測定した。最初に、主にタンパク質をコードする遺伝子を中心に、今回取得した遺伝子発現変化が、replicative senescence に伴う既知の遺伝子発現変化を含むものであることを確認



するために、Molecular Signature Database (MSigDB) に収録されている gene set のうち、Gene Ontology の Biological Process に所属するものを用いて、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) を行った。有意に発現が変化していた gene sets 内の member gene のオーバーラップを統合することのできる Enrichment Map 解析を行うと、青い円で示される replicative senescence において発現の低下していた gene sets の中には、DNA replication, DNA damage, cell cycle, RNA translation, RNA splicing, RNA transcription, nuclear transport などの、広範な細胞機能に関連する遺伝子群が含まれることが分かった。

で発現が増加・減少する遺伝子の数は808-1283であり、そのうち73-246が lncRNA であった。Replicative senescence と premature senescence を比較すると、両方の細胞老化モデルで共通して同じ方向に増加・減少する遺伝子は極めて少なく、特異的な遺伝子発現変化を示していることが分かった。

Ⅲ 考 察

本研究により、細胞老化に伴って発現変化する lncRNA を多数同定することができた。今後、これらの lncRNA の過剰発現または発現抑制を行い、MEF の細胞老化状態を変化させるものを2次スクリーニングする予定である。また、これらの lncRNA が DNA ダメージ、酸化ストレス、放射線照射等、他のストレス環境下においても特異的または普遍的な発現変化を示すか、そして、マウス個体の老化に伴って生体内の組織特異的発現が変化するかを検証する。さらに、細胞老化を制御することが示された lncRNA とともに精製される結合タンパク質をマスマスペクトロメトリーによって同定し、lncRNA がどのようなタンパク質を介して機能しているか明らかにしたい。

All probes: 55821 probes

		Replicative senescence			
		-	up	down	Total
RAS-induced premature senescence	-	51887	1058	1222	54167
	up	781	17	48	846
	down	732	63	13	808
Total		53400	1138	1283	55821

lncRNA: 16252 probes

		Replicative senescence			
		-	up	down	Total
RAS-induced premature senescence	-	15752	231	95	16078
	up	71	1	1	73
	down	87	14	0	101
Total		15910	246	96	16252

次に個別の遺伝子ごとの発現変化に注目し、Welch's t-test の nominal p-value が 0.001 より小さく、fold change が 2 倍以上または 1/2 以下を発現変化の基準とすると、それぞれの細胞老化モデル

長寿科学の最前線

長寿科学研究者支援事業

平成26年度 研究報告集

発行 平成27年7月

発行所 公益財団法人 長寿科学振興財団

〒470-2101 愛知県知多郡東浦町大字森岡字源吾山1-1

あいち健康の森健康科学総合センター4階

TEL : 0562-84-5411 FAX : 0562-84-5414