

加齢育成動物の飼育レベルの向上をめざすストレスの加齢変化と SASP に関する研究
(29-40)

主任研究者 松井 直美 国立長寿医療研究センター 研究補助員

研究要旨

すべての生体機能は、今の自分の状態(恒常性)をできるだけ維持しようとしませんが、その維持能力は健康であっても加齢とともに低下していくと考えられています。筋力や視力、聴力などと同じように、免疫機能や神経機能、あるいはホルモンなどの内分泌機能も、老化に伴って徐々に低下します。しかし、このような生体機能の低下は、年格好と同じように個人差が大きいのが特徴です。この個人差は、老化そのものに影響する要因(ストレスや不適切な生活習慣、また環境、遺伝的な素因の持続的な蓄積)によって大きくなると考えました。

これらのメカニズムには、ストレスに対する感受性や抵抗性が加齢に伴って変化することが関係していると考えました。そこで本研究では、主任研究者が管理面、材料精製の手技的にも経験を積んだマウスの系において、妊娠、出産の際に母体が受けるストレスを時間軸とともに解析することで、妊娠・出産を通じたストレスレベルと免疫力の加齢変化を解析します。ストレスの原因となるサイトカイン(SASP因子を含めた)が分かれば、これまで様々な短期ストレス刺激では見つけられなかった長期にわたる持続的なストレス刺激と、サイトカインの発現を通じた老化との因果関係を調べることも可能と考えます。

主任研究者

松井 直美 国立長寿医療研究センター 研究補助員

A. 研究目的

寿命を制御するしくみや老化の機構を分子や遺伝子のレベルで明らかにする研究には、実験モデル生物の果たす役割が大変重要になっています。事実、本研究所の実験動物施設棟でも、マウス、ラットをモデル動物として長期飼育し、老化や老年病の研究に役立つ

てています。一方で栄養学や医学の進歩により、長期の加齢育成では飼育環境や食餌により受けるストレスが個体全体の老化と深く関わっているのではないかと、という事が明らかにされてきています。

そこで本研究では、主任研究者が管理、材料精製の手技的にも経験を積んだマウスの系を用いて、長期にわたる持続的なストレス刺激によるサイトカインの発現と老化との因果関係を調べたいと考えました。長期にわたる持続的なストレスとなり得る妊娠から出産における母体の変化を経時的に調べることで、様々な短期ストレス刺激では見つけられなかった、ストレスレベルと免疫力の加齢変化を解析します。

B. 研究方法

1. 野生型マウスの加齢に伴う性周期の変化

加齢による群分けの設定の科学的根拠を確かめるために、膣スメアテストにより性周期を調べました。通常、雌個体の性周期（発情周期）は発情前期、発情期、発情後期、休止期の順に4～5日で一巡します。実験動物施設棟で飼育しているC57/BL6マウスの雌個体から膣スメアを採取し、ギムザ染色後、顕微鏡下で観察しました。図1に示すように、有核細胞が見られたら発情前期、角化細胞が見られたら発情期、死滅しかけた有核細胞のまわりに白血球が見られたら発情後期、見られる細胞数が減少したら休止期と判断しました。

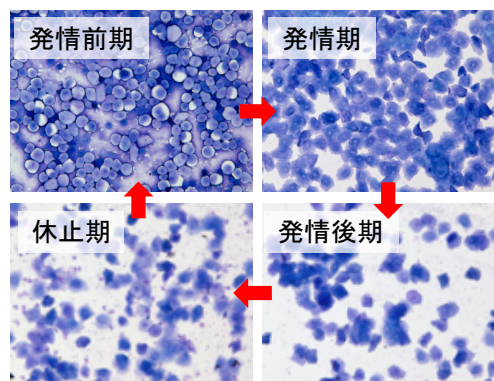


図1 マウスの発情周期による膣スメアの変化

2. 野生型マウスの加齢に伴う受精能の変化

交配予定の週齢の雌個体から採取した卵の受精能を調べました。採卵日の3日前に過剰排卵誘起剤（CARD HyperOva）を、1日前にヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（ゴナトロピン3000）を雌マウスの腹腔に投与しました。採取した卵は成熟期の雄個体から採取した精子と混合し、媒精から5～6時間後に2つの前核が見えた卵、または1日後に2細胞に分裂した卵を受精卵として数えました。また、受精卵をKSOM培地中で4～5日間培養し続け、胚盤胞まで正常に発生した胚の数を、培養を続けた胚の数で割り、発生率としました。

（倫理面への配慮）

研究に関わるすべての動物実験に関しては、実験動物の福祉を遵守し、動物愛護上の配慮を踏まえ、的確に管理するように心がけました。動物実験の実施に関しては、日本学術会議より出された「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」を遵守して、社会的理解を伴った動物実験を実施しました。

具体的には実験動物の福祉を遵守し、3Rをはじめとする動物愛護上の配慮を踏まえて的確に管理し、使用及び処分に関しても、苦痛の軽減等、倫理上の問題はすべて、国立長寿医療研究センターの動物実験倫理委員会で承認を受けた後に、実験動物管理委員会から指導される動物実験ガイドラインに則って実施しました。

C. 研究結果

1. 野生型マウスの加齢に伴う性周期の変化

本研究では、継代飼育されている異なる週齢の野生型マウスの雌個体を雄個体と自然交配させ、妊娠・出産によるストレスと加齢との関係性を調べようとしています。雌個体を若齢期（6～8週齢）、成熟期（12～16週齢）、高齢期（20～24週齢）の3期に分けるにあたり、この群分けの設定の科学的根拠を確かめるために、施設棟内で飼育されている野生型C57/BL6マウスの雌個体の発情周期を陰スメアテストにより調べました。用いた雌個体は3、6、9、12、15、18、24ヶ月齢で、各月齢10匹ずつです。なお必要に応じて、実験動物管理室小木曾昇室長、老化機構研究部丸山光生部長に研究そのものへの助言や指導をいただきました。結果は図2に示す通り、6ヶ月齢までは約90%の雌個体が正常な周期を示すのに比べて、9ヶ月齢以降はほぼ段階的に異常な発情周期を示す個体の割合が高くなりました。このことから、本研究で設定した加齢に伴う群分けにおいて、成熟期（3～4ヶ月齢）と高齢期（5～6ヶ月齢）の違いは見られず、少なくとも発情周期に関しては安定しているということが示されました。

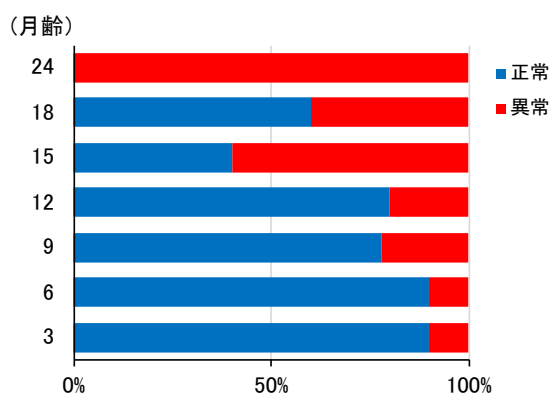


図2 C57/BL6雌個体の発情周期の加齢変化

2. 野生型マウスの加齢に伴う受精能の変化

雌個体を自然交配させる前に、加齢が卵に悪影響を及ぼしているかを知るために、自然交配を予定している週齢の雌個体から採取した卵の受精率を調べました。用いた雌個体は若齢期が6匹、成熟期が11匹、高齢期が5匹です。この実験では過排卵処理を行い

表1 体外受精による採卵数と受精率

週齢	匹数	採卵数(/匹)	受精率(%)	発生率(%)
6~8	6	30.3 ± 5.7	78.4 ± 7.3	22.2 (N=9)
12~16	11	37.9 ± 5.4	88.9 ± 1.2	44.5 (N=200)
20~24	5	36.8 ± 4.9	86.2 ± 2.2	52.6 (N=133)

ましたが、一匹の雌個体から採取できた卵の数はどの群でも平均約 30~40 個でした (表 1)。また、受精率はどの群でもほぼ等しく 80~90%程度であり、本研究で定義する高齢期 (20~24 週齢) でも受精率の低下は見られませんでした。さらに受精卵を 4~5 日培養した後、胚盤胞まで正常に発生する割合も、成熟期から高齢期の間で減少しませんでした。したがって、母体に持続するストレスがかからない今回のような条件では、加齢による卵への影響はないようだと考えました。

D. 考察と結論

初年度の結果から、本研究で自然交配を計画している C57/BL6 マウスの週齢において、発情周期と卵の受精能および発生能へ加齢による影響は現れていないことが示されました。今後、妊娠・出産という長期のストレスと加齢との関係を考察する上で、24 週齢までを高齢期として扱うことの妥当性が示されたと考えます。今後は実際に、若齢、成熟、高齢の 3 期 C57/BL6 マウスを自然交配させます。週齢によってマウスが受けるストレスにどのような違いがあるのかを知るために、SASP 因子を含め (抗) 炎症に関わる種々のサイトカインを ELISA 法により定量します。各雌個体について、交配前、妊娠中、出産後の授乳中、離乳後の 4 期で末梢血より血清を調製する予定です。それらの変化が加齢軸においても一定の共通な変化を示すのかも明らかにしたいです。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 小木曾昇, 六車香織, 高野聡美, 富田耕平, 山口一路, 松井直美, 丸山光生
国立長寿研における自然老化マウスの基礎データの蓄積
第 64 回日本実験動物学会総会 2017 年 5 月 25 日 郡山市
- 2) Ogiso N, Muguruma K, Takano S, Tomita K, Yamaguchi K, Matsui N, Maruyama M
Age-related changes found in naturally-aged mice in NCGG
第 40 回日本基礎老化学会大会 2017 年 6 月 15 日 名古屋市
- 3) Sakamoto A, Matsui N, Takaoka A, Maruyama M
Involvement of Zizimin2 in the defective natural antibacterial antibody
production by aged peritoneal B-1a B cells.
2017 Aging Seminar between Korea and Japan, 24 August 2017, Koria

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし