

長寿医療研究開発費 平成28年度 総括研究報告

長寿医療研究のためのモデル動物の開発と環境統御との総合評価に関する研究
(27-13)

主任研究者 小木曾 昇 国立長寿医療研究センター 実験動物管理室 (室長)

研究要旨

NCGG で育成しているエイジングファーム動物 (AF 動物) について、老化メカニズムの解明に向けた適正な環境下における老化や老年病モデル動物としての有用性の検証を行った。マウス (C57BL/6N) を生涯飼育することにより老齢化させた。試験項目として、生理 (体重、摂餌量、飲水量、生存率)、行動 (ロータロッド試験、握力試験)、病理・形態 (剖検含む)、血液 (特に白血球) の他、腸内細菌叢について経時的に測定し (最高 36 ヶ月齢) 解析を行った。その結果、生理学的解析から体重は 24 ヶ月齢までは雌雄ともに大きな変化は見られなかったが、雄では 26 ヶ月齢以降急減した。一方、摂餌量および飲水量は、25 ヶ月齢以上になると雌雄ともに増加する傾向であった。全体的な生存率に雌雄差はなく、米国 NIA よりも良好であった。行動学的解析によるロータロッド試験では、雌雄ともに加齢に伴って走行時間の減少が確認され、雄については加齢よりも体重の影響を強く受ける傾向が見られた。形態学的解析から死亡個体による剖検所見として、雄では生殖器の異常の他、雌雄に関係なく脾臓のリンパ腫瘍等が多く認められた。腸内細菌叢は個体差が大きく加齢に伴う菌叢の大きな変動は認められなかったが、33 ヶ月齢の個体で一部の菌叢に変化が見られた。血液学的解析から、加齢に伴い白血球数が減少し、好中球数の割合が増加する一方でリンパ球数が減少する傾向が見られた。今回、生理学、行動学、血液学的解析の一部で個体レベルでの老化マーカーの候補となる加齢変化が認められ、さらなる解析により老化メカニズムの解明に向けたエビデンスの構築、フレイル等の老年病モデル動物の開発に役立つことが期待される。

主任研究者

小木曾 昇 国立長寿医療研究センター 実験動物管理室 (室長)

分担研究者

丸山 光生 国立長寿医療研究センター 副所長
老化機構研究部 (部長 (併))

A. 研究目的

NCGG で育成しているエイジングファーム動物 (AF 動物) の老化のメカニズムと加齢に伴う老化・老年病の老化モデルとしての有用性を検証するとともに、検証を確立する中で自然発症の『フレイル』モデル動物の開発と遺伝子操作技術 (CRISPR/Cas9 システム) を用いた老年病モデル動物開発のための検討を行う。また、モデル動物の長期飼育 (1 年以上) における Refinement (苦痛の軽減) に配慮した適正な飼育環境を設定するためのエビデンス集積に努め、ヒトへの外挿を含め、遺伝子からタンパク、細胞、個体レベルでの網羅的な解析による老化メカニズムを総合的に評価することを目的とする。

B. 研究方法

日常の動物飼育環境が長期飼育によって寿命だけでなく老年病疾患の症状や発症等に起因し、動物実験に影響していることが示唆されるため、複数の環境条件 (①床敷き材、②飲水、③環境エンリッチメント、④動物ケア) を設定し、タンパクから個体レベルについて、4 週齢の C57BL/6NCrSlc マウス (雄 90 匹、雌 30 匹) を 3 ヶ月ごとに導入し、生涯飼育 (エイジングファーム動物、AF マウスと略す) することにより老齢化させて以下のような網羅的な解析を計画し解析を進めた。

1. 生理学的解析 (体重、摂餌量、飲水量、生存率)
2. 行動学的解析 (ロータロッド試験、前肢握力試験、行動観察等)
3. 病理・形態学的解析 (剖検、MRI 撮像、組織学的観察)
4. 生化学・免疫学的解析 (腸内細菌叢)
5. 血液学的解析 (血算、白血球の形態)

a) 生理学的解析

AF マウスを用いて、月齢ごとに体重、摂餌量および飲水量 (1 日の平均摂取量) を測定した。

b) 行動学的解析

運動機能を評価するため 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 ヶ月の個体にロータロッド試験および握力試験 (前肢) を実施した。ロータロッド試験はマウス用ロータロッド装置 (MK-610A, Muromachi) により行い、条件設定等は理研 BRC のマウス表現型解析プロトコル (Rota-rod test v1) に従った。握力試験は小動物握力測定装置 (GPM-100B, MELQUEST) を用いて行った。

c) 病理・形態学的解析 (組織)

飼育中に死亡した個体を剖検し、各臓器の病変の肉眼的観察を行った。一部の個体 (3~33 ヶ月齢) については、加齢変化の組織学的データ蓄積のため、小動物用 MRI 装置 (PharmaScan, Bruker BioSpin) によって脳の MRI 撮像を実施した後、4% PFA/0.1M PB による灌流固定を行った。合わせて常法に従って主要臓器の組織切片を作製し、HE 染色を行った。また、8 ヶ月齢および 27 ヶ月齢のマウスを用いて神経筋シナプスとその関連組織に関する形態学的に解析 (蛍光染色) した。

d) 生化学・免疫学的解析

腸内細菌叢の経時的変化を調査するため、6, 12, 18, 21, 24, 33 ヶ月齢の個体 (♂のみ, 各月齢 n=3) から採取した糞便からビーズフェノール法により DNA を抽出し、16SrDNA を対象とした T-RFLP 解析およびフラグメント解析を行った。主要な分類群について ICLAS 構築のマウス腸内細菌叢データベースに基づき簡易的に推定した。

e) 血液学的解析

3, 15, 27 ヶ月の雄個体頸静脈より採血を行い、一般血液検査 (赤血球数、白血球数、白血球分画) を実施した。

(倫理面への配慮)

主任研究者を含むすべての研究に関わる動物実験に関しては実験動物の福祉 (5Rs) を順守し、動物愛護上の配慮を踏まえ、的確に管理を行った。さらに一部、実験動物の使用、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、動物愛護管理法、厚生労働省基本指針、日本学術会議ガイドライン、および国立研究開発法人国立長寿医療研究センター動物取扱規程、国立大学法人動物実験施設協議会指針等に基づき、また、遺伝子改変動物の扱いについてはカルタヘナ条約を遵守した適切な拡散防止措置も施した上で、当該研究施設の倫理委員会で承認を受けた後に各研究機関が定めた動物実験ガイドラインに則って実施した。

C. 研究結果

a) 生理学的解析

体重は雄が 18 ヶ月齢前後 (約 45.0g)、雌は 19 ヶ月齢前後 (約 37.0g) においてピークに達し、24 ヶ月齢まで大きな変化は雌雄ともに見られなかったが、雄では 26 ヶ月齢以降体重が急減した ($44.1 \pm 7.7 \rightarrow 39.3 \pm 6.7$ g) (平均値 \pm 標準偏差)。生存率は雌雄間で大きな違いはなく、ともに 18 ヶ月齢前後で減少し、28 ヶ月齢では雄で $69.1 \pm 13.5\%$ 、雌で $63.5 \pm 1.6\%$ であり、アメリカ国立老化研究所 (NIA) よりも良好な値を示した。現在のところ、雄が 36 ヶ月齢で NCGG として最高の寿命を遂げた。

摂餌量および飲水量は 3~24 ヶ月齢まで明瞭な加齢に伴う変化や雌雄差は見られなかったが、25 ヶ月齢以上になると摂餌量、飲水量が雌雄ともに増加する傾向が見られた。現在のところ、SAM (Senescence Accelerated Mouse; SAM) マウスの老化度判定 (反応性、受動性、毛の光沢や目の状態、外傷等の外観) に使用される老化度スコアを用いて月齢ごとの評価を進めているところである。

b) 行動学的解析

ロータロッドでは雌雄ともに加齢に伴って走行時間が減少し、雄では加齢よりも体重の影響を強く受ける傾向が見られた。一方、前肢握力試験では雌雄ともに握力の減少等の明瞭な加齢変化は認められなかった。

c) 病理・形態学的解析 (組織)

死亡個体を剖検した結果、25 ヶ月齢以上の雄に精嚢腺貯留が多発した。雌については脾臓肥大 (脾腫) が多く観察された。その他、肝臓肥大や肺のうっ血、腋窩リンパ節腫大が見られた。

神経筋シナプスとその関連組織に関する形態学的な解析から、27ヶ月齢のマウスに神経シナプスの構造（脱神経、前シナプスあるいは後シナプスの断片化、軸索の膨潤）が認められた。行動（運動）機能解析による運動機能低下と神経筋シナプスの構造異常の相関性が確認できた。

その他、加齢に伴う脳の萎縮や加齢に伴う病変（神経細胞萎縮や変性）、細胞増殖を検出するための一般染色（H.E.染色）をはじめとした抗リン酸化 α シヌクレイン抗体染色の他、関連標識（例. Sirtuin、Mitoracker、Merge、p53）等について解析を進めている。

脳のMRI撮像では、雌の下垂体腫瘍の1例以外、加齢による大きな変化（大脳皮質、海馬領域の変性や萎縮等）は観察されなかった。

d) 生化学・免疫学的解析

腸内細菌叢の解析結果から、個体差が大きく加齢に伴う菌叢の大きな変動は認められなかったが、33ヶ月齢の個体では他の月齢と比較して *Mucispirillum* および *Lactobacillus* が増加し、Clostridiales が減少する傾向が見られた。また、各個体における菌叢の比較解析を行った結果、24ヶ月齢のみ菌叢の構成が比較的類似していた。

e) 血液学的解析

加齢に伴い白血球数は減少し、好中球の割合が増加する一方、リンパ球については減少する傾向が見られた。赤血球についても加齢に伴い血球数が減少し、ヘマトクリット値も低下する傾向が認められた。

D. 考察と結論

本研究結果から高齢雄マウスにおける体重減少、運動機能低下、腸内細菌叢や白血球組成の変化など、個体レベルでの老化マーカーの候補となる加齢変化がいくつか認められた。

行動学および生理学的な解析結果から、月齢に伴う運動量の減少が雄は3ヶ月齢、雌は6ヶ月齢頃から顕著に示すのに対して体重および前肢握力試験との相関が弱い結果となり、ヒトの加齢に伴う変化と異なるものであった。また、形態学的解析結果（神経シナプス構造異常）との比較から、例数も少ないことから加齢に伴う運動量との老化現象を捉えることができなかった。

摂餌量や飲水量については加齢に伴う大きな変化は見られなかったが、25ヶ月齢以上で急激に体重減少の理由付けとは真逆に増加する傾向であったことから、咬合力の低下による食べ（飲み）こぼし等の老化に関わる症状が現れた可能性が推察された。ヒトの加齢に伴う食事量とは異なる現象であることから、加齢育成動物の長期飼育には飼料の成分についても今後検討する必要があると考えられた。

ヒトの一般的な腸内細菌叢については、*Lactobacillus* をはじめとした乳酸菌類は加齢に伴い全菌叢の占める割合が減少すると考えられているが、本研究では高齢個体で若干の減少が認められたものの大きな変動は見られなかった。

今回の結果から個体レベルでの明瞭な加齢変化は認められなかったが、若齢個体を含めた月齢単位に例数を増やして多面的な解析を行うことにより新たな老化の指標となるパラメーターの探索を行う計画である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 加藤恒雄, 小林英治, 高野聡美, 六車香織, 小木曾昇
ラックの耐震固定時に発生予測される残留リスクへの対策
実験動物と環境 47(24):5-11 (2016)
- 2) Mori T, Murasawa Y, Ikai R, Hayakawa T, Nakamura H, Ogiso N, Niida S,
Watanabe K
Generation of a transgenic mouse line for conditional expression of human IL-6
Experimental Animals. 65:455-463, (2016)

2. 学会発表

- 1) 小木曾昇, 六車香織, 富田耕平, 高野聡美, 山口一路, 松井直美, 丸山光生
老化メカニズムの解明に向けたマウス育成と加齢変化
第 63 回日本実験動物学会総会 2016 年 5 月 19 日 川崎市
- 2) 富田耕平, 山口一路, 高野聡美, 六車香織, 小木曾昇
加齢・老化モデルラットにおける飼育環境が及ぼす影響について
第 63 回日本実験動物学会総会 2016 年 5 月 19 日 川崎市
- 3) 釘田雅則, 吉原大輔, 加藤由布, 小木曾昇, 下村恭代, 西田修, 長尾静子
多発性嚢胞腎症モデル動物の腎臓におけるレチノイド X 受容体の解析
第 63 回日本実験動物学会総会 2016 年 5 月 19 日 川崎市
- 4) 小木曾昇, 六車香織, 富田耕平, 高野聡美, 山口一路, 松井直美, 丸山光生
国立長寿研における老化モデルマウスの育成と加齢変化
第 39 回日本基礎老化学会大会 2016 年 5 月 27 日 伊勢原市
- 5) 山田祐輝, 山口一路, 富田耕平, 高野聡美, 六車香織, 小木曾昇
糖尿病モデルマウスにおける適正な飼育環境の検討
第 50 回日本実験動物技術者協会総会 2016 年 9 月 30 日 川崎市
- 6) 小木曾昇, 六車香織, 富田耕平, 高野聡美, 山口一路, 松井直美, 丸山光生
加齢・老化モデルマウス育成のための適正な飼育環境の設定とその難しさ
第 50 回日本実験動物技術者協会総会 2016 年 10 月 1 日 川崎市
- 7) 富田耕平, 山口一路, 田邊元, 高野聡美, 六車香織, 小木曾昇
ラットの長期飼育時における飼育環境が与える影響について
第 50 回日本実験動物技術者協会総会 2016 年 10 月 1 日 川崎市
- 8) 山口一路, 富田耕平, 高野聡美, 六車香織, 小木曾昇
飼育器材における光触媒技術の有用性について
第 50 回日本実験動物技術者協会総会 2016 年 10 月 1 日 川崎市

9) 加藤恒雄, 小林英治, 高野聡美, 六車香織, 小木曾昇
耐震対策におけるユーザーのリスクアセスメントの重要性
—アイランド設置 IVC ラック導入 3 年の使用報告—
第 50 回日本実験動物技術者協会総会 2016 年 10 月 1 日 川越市

10) Ogiso N, Muguruma K, Tomita K, Takano S, Yamaguchi K, Matsui N,
Maruyama M
Breeding mice and their various changes with aging: Toward clarifying the
mechanisms of senescence
67th AALAS National Meeting, 2 November, Charlotte, USA

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