

長寿医療研究開発費 平成 30 年度 総括研究報告（総合報告及び年度報告）

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

2 年間全体について

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した。ストレスの原因となるサイトカイン（SASP 因子を含む）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であると考えました。

平成 30 年度について

野生型マウスの妊娠・出産によるストレスを調べるために、前年度までに、野生型マウスの性周期が加齢に伴って変化するかを調べました。平成 30 年度は、雌マウスの加齢に伴う卵の受精能の変化や、炎症性サイトカインおよびストレスレベルの変化を調べました。

妊娠中のマウスではストレスレベルが増加するものの、加齢によってそれが変化することは認められませんでした。しかし、高齢期マウスの産仔数が減少することは事実であるので、炎症性サイトカインやストレスホルモン量では評価できなかった何らかの変化が起きていると考えられます。

※複数年度の研究期間全体について記載し、その後当該年度の分を記載すること。

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

分担研究者

なし

※研究開始当初より研究者に変更があった場合には、それぞれいつの年度に研究を行った研究者か分かるように記載すること。年度途中に変更があった場合には「(平成〇〇年〇月〇〇日～平成〇〇年〇月〇〇日)」と記載しても差し支えないこと。

研究期間 平成 29 年 4 月 1 日～平成 31 年 3 月 31 日

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、長期の加齢育成には飼育環境や食餌より受けるストレスが個体の老化と深く関わっているのではないかと、いう事が明らかにされてきています。そこで本研究では、主任研究者が管理面、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、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しました。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することで、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たいと考えました。

※複数年度の研究期間全体について記載すること。

B. 研究方法

2年間全体について

本研究では、野生型マウスの妊娠、出産によるストレス指標タンパク質の加齢に伴う変化を解析しました。雌個体を若齢期（6～8週齢）、成熟期（12～16週齢）、高齢期（17週齢以上）の3期に分けるにあたり、この群分け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 C57BL/6 マウスの雌個体の性周期を膣スメアテストにより調べました。

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にホルモン投与による過排卵処理を行い、採取した卵の個数、受精率および発生率を調べました。

妊娠に伴うストレスにより炎症が引き起こされているのかを知るために、当研究部で継代飼育している野生型マウスについて、免疫系炎症指標タンパク質として知られる炎症性サイトカインを定量しました。また、マウスがストレスを感じると増加することが知られているホルモンであるコルチコステロン量を測定しました。

平成30年度について

成熟期と高齢期の雌個体の交配前、妊娠中、出産後の授乳中、離乳後の4期において、末梢血から血清を調製し、SASP因子としても知られる代表的な炎症性サイトカインである TNF α 、IL-6 および IL-1 β タンパク質の発現量を ELISA 法により調べました。また、マウスがストレスを感じると増加することが知られているホルモンであるコルチコステロン量を ELISA 法により測定しました。野生型マウスの雌個体を若齢期、成熟期、高齢期の3期に分け、成熟期の雄と自然交配させました。交配前と、膣栓の目視による妊娠確認後、1週間ごとに尿を採取し、尿中のコルチコステロンを定量しました。

※複数年度の研究期間全体について記載し、その後に当該年度の分を記載すること。

（倫理面への配慮）

2年間全体について

本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管理しました。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。実験動物の管理、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。

※複数年度の研究期間全体について記載し、その後に当該年度の分を記載すること。

全体を通じてのみの記載で支障がない場合は、特に分けて記載する必要はない。

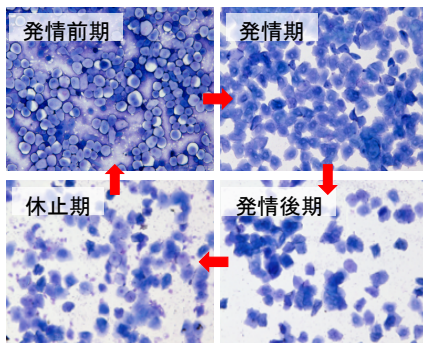
C. 研究結果

2年間全体について

野生型マウスの性周期と卵の受精能の加齢に伴う変化

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ました。雌個体を若齢期（6～8週齢）、成熟期（12～16週齢）、高齢期（17週齢以上）の3期に分けるにあたり、この群分け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 C57BL/6 マウスの雌個体の性周期を膣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。結果、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性周期を示す個体の割合が高くなりました（図1）。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、少なくとも性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。

A. マウスの性周期による膣スメアの変化



B. C57BL/6雌の性周期の加齢変化

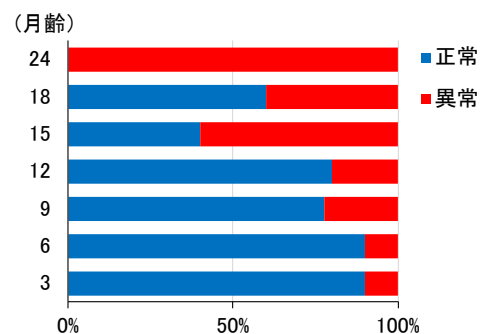


図1. 膣スメアテストによる性周期の加齢変化

次に、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ました。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。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でも受精率の低下は見られませんでした（図2）。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認められないと考えました。

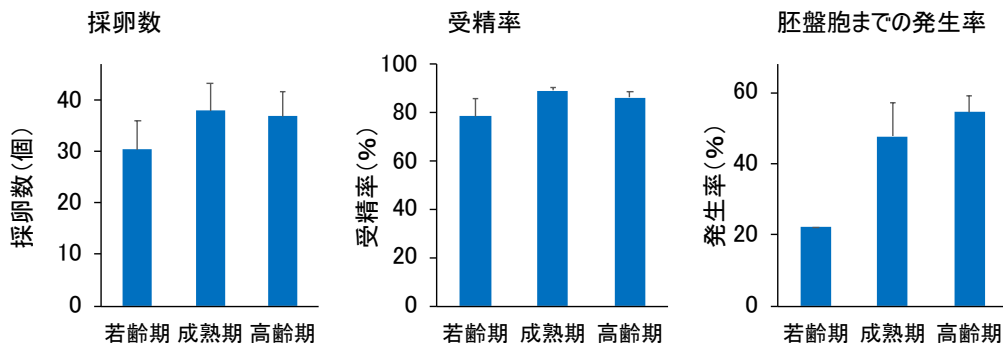


図2. 採卵数と生殖能の加齢変化

平成 30 年度について

ELISA 法を用いた炎症性サイトカインおよびストレス指標ホルモンの発現解析

妊娠に伴うストレスにより炎症が引き起こされているのかを知るために、当研究部で継代飼育している野生型マウスについて免疫系炎症指標タンパク質として知られる炎症性サイトカインを定量しました。成熟期と高齢期の雌個体の交配前、妊娠中、出産後の授乳中、離乳後の 4 期において、末梢血より血清を調製し、SASP 因子としても知られる代表的な炎症性サイトカインである $TNF\alpha$ 、IL-6 および IL-1 β タンパク質の発現量を ELISA 法により調べました。しかしどのサイトカインについても、妊娠によって増加する傾向は見られませんでした。また、週齢による変化も観察されませんでした。そのため、成熟期はもとより高齢期の雌個体においても、妊娠に伴って受けるストレスは炎症を引き起こすほどのレベル、あるいは測定できる程の持続的なものではなく一過的なものなのかも知れないと考えました。

次に、マウスがストレスを感じると増加することが知られているホルモンであるコルチコステロン量を測定しました。この実験には、当研究部で維持交配している、繁殖に関して野生型と変化のない系統のマウスを用いました。交配前、妊娠中、出産後の授乳中という 3 期に分けた雌個体 (13~18 週齢、各期少なくとも 3 匹) から尿と末梢血を採取し、ELISA 法により定量しました (図 3)。その結果、尿中のコルチコステロン量が妊娠に

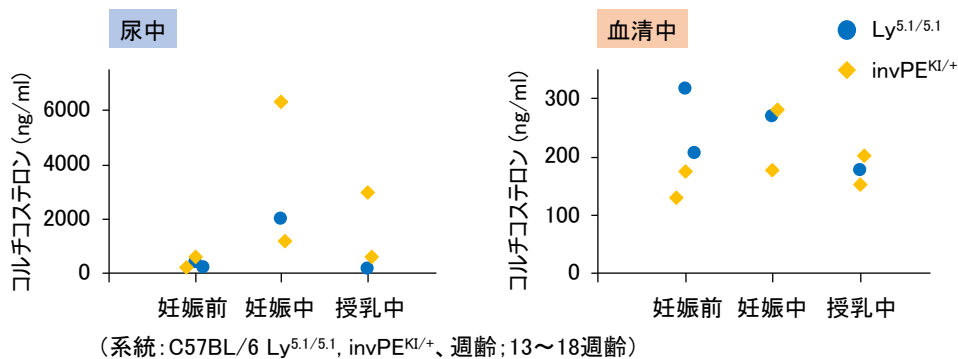


図3. 自然交配におけるストレスホルモン量の変化

よって増加する傾向、すなわちストレスが蓄積される傾向が見られました。一方、末梢血中のコルチコステロン量は妊娠前に比べて、妊娠中や授乳中に増加しませんでした。末梢血におけるコルチコステロン量はサンプリングする際の保定等、妊娠とは無関係の物理的拘束によるストレスを一過的に反映することもあるということから、今回群分けした3期に特異的な変化は検出しにくいと考えました。

尿でコルチコステロン量が測定できることがわかったため、野生型マウスの雌個体を若齢期、成熟期、高齢期の3期に分け、成熟期の雄と自然交配させました。交配前と、膣栓の目視による妊娠確認後、1週間ごとに尿を採取し、尿中のコルチコステロンをELISA法により定量しました(図4)。その結果、どの週齢のマウスでも、尿中のコルチコステロン量が妊娠によって増加する傾向が見られました。しかし、週齢による増加、または減少は見られませんでした。このことから、妊娠によりストレスレベルは増加するものの、加齢に伴いより強いストレスを感じているわけではないことが分かりました。

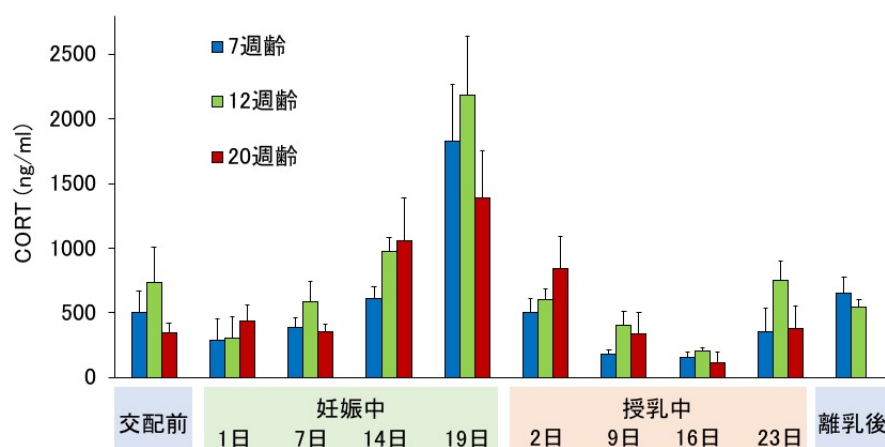


図4. 週齢の異なる雌における妊娠、授乳期のストレスホルモン(CORT)量

※複数年度の研究期間全体について記載し、その後当該年度の分を記載すること。

D. 考察と結論

※「D. 考察」、「E. 結論」としても差し支えないこと。

2年間全体について

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ました。若齢期(6~8週齢)、成熟期(12~16週齢)、高齢期(17週齢以上)と群分けした雌個体では、成熟期と高齢期の違いは見られず、少なくとも性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。また、採卵数や、卵の受精率や発生率も、本研究で定義する成熟期から高齢期の間で減少しませんでした。妊娠中の雌マウスでは尿中のコルチコステロン量が増加し、ストレスを

感じていることが示されましたが、加齢による変化は見られませんでした。当研究部で17週齢よりも加齢した雌マウスを系統維持のための交配に用いることはまれですが、しかし、高齢期マウスでは産仔数が減少することは事実として起こっています。もしかすると、炎症性サイトカインやストレスホルモン量では評価できなかった何らかの変化が起こっていると考えられます。例えば着床後の胎児の出生率の減少や、出産後の母乳量の減少であるかもしれません。特に、野生型マウスではなく遺伝子組換えマウスで顕著に加齢による出生数の低下が見られるので、そのような系統のマウスと野生型マウスを比較すると加齢による変化が見られるかもしれません。加齢に伴う産仔数の低下を引き起こす原因が分かれば、飼育環境や栄養状態を整えるといった具体的な対策を取れるようになることが期待されます。

※複数年度の研究期間全体について記載し、その後に当該年度の分を記載すること。
※全体を通じてのみの記載で支障がない場合は、特に分けて記載する必要はない。

E. 健康危険情報

なし

※該当がある場合には年度別に記載すること。(班のすべての健康危険情報について記載すること。該当がない場合には年度区分をしないで「なし」と記載すること。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

※発表誌名、巻号・頁・発行年等も記載すること。

※年度別に記載すること。

2. 学会発表

平成 29 年度

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, Korea

平成 30 年度

1) 松井直美, 亀井優香, 小木曾昇, 丸山光生

妊娠、授乳期マウスの持続的ストレスと SASP 因子の加齢変化に関する研究

第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年 11 月 29 日 横浜市

※年度別に記載すること。

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

※予定を含めて記載すること。

※年度別に記載すること。

※該当がない場合には「なし」と記載すること。