

運動器疾患研究部

(1) 構成員

室長

骨代謝制御研究室 竹下 淳

骨細胞機能研究室 渡辺 研

流動研究員

小原 幸弘

研究・事務補助員

鈴木 三恵

猪飼 理奈

(2) 平成 28 年度研究活動の概要

超高齢化社会に突入した我が国において認知症のみならず骨粗鬆症の診断薬および治療薬の開発は急務である。近年、骨代謝を制御するメカニズムの中でも破骨細胞や骨芽細胞などの細胞間相互作用によるシグナル分子に注目が集まっている。当研究室では、骨吸収から骨形成へのカップリング機構が骨リモデリングの基本原則であり、加齢に伴う骨構造の脆弱性や骨代謝生理機能の破綻においてカップリングの機能低下が主因であると考え、破骨細胞から分泌される液性因子に焦点を絞りカップリング因子の同定と機構解明を目指している。これまでの結果、カップリング因子として遺伝子の網羅的発現解析により Cthrc1 を、生化学的手法により補体成分 C3a を同定した (Takeshita et al. JCI 2013、Matsuoka et al. JBMR 2014)。Cthrc1 は活性化破骨細胞が骨吸収するときに産生・分泌し、骨芽細胞に作用し骨形成を促進する。骨芽細胞

や全身で Cthrc1 を過剰発現するマウスは骨形成が促進し骨量が増加し、加齢による骨量減少が抑制されることから Cthrc1 刺激をミミックする薬剤は骨粗鬆症の有効な治療薬となる可能性が期待された。そこで、Cthrc1 の受容体を同定し、遺伝学的手法を用いて受容体ノックアウトマウスを作出し骨解析を行ったところ、Cthrc1 と同様にカップリング機能を制御する重要な分子であることがわかった。そこで、現在、受容体に対するモノクローナル抗体を作成し、骨芽細胞分化を刺激し骨形成を促進する抗体のスクリーニングを行っている。

カップリング機能解明の一環として破骨細胞機能不全マウスの代表である Src KO 及び Rankl KO マウスの血清成分及び骨の組織学的解析を行い、Src 欠損破骨細胞の骨吸収機能や Rankl 欠損マウスにおける骨細胞の新たな制御メカニズムを見出した。

さらに、新しいカップリング因子を同定するためにマクロファージが産生・分泌し骨芽細胞の遊走を刺激する活性成分を生化学的手法を用いて分離・精製し、種々の分泌タンパクを特定した。現在、遺伝子をクローニングし、動物細胞での発現・精製、及び骨芽細胞の遊走活性の確認を行い、マウスの遺伝学的手法を用いてカップリング因子としての機能解析を行う予定である。

小原 幸弘、鈴木 三恵、竹下 淳

破骨細胞が分泌し骨芽細胞に作用するカップリング因子の機能解明

骨粗鬆症をターゲットとしたこれまでにない創薬開発を目的とし、骨吸収から骨形成へのカップリング機構に着目し、新たなカップリング因子の同定と機能解明により新規治療薬の開発を目指している。我々が発見したカップリング因子 Cthrc1 の受容体として同定した Waif1 のシグナル伝達機構、及びマウスの遺伝学の手法を用いて骨芽細胞特異的に Waif1 をノックアウトしたマウスを作成し骨代謝における Waif1 の機能解明を試みた。

Osx1-cre を用いた骨芽細胞特異的 Waif1 コンディショナル KO (cKO) マウスを作成し、3ヶ月齢のマウスをマイクロCTで解析したところcKOマウスは野生型に比べ約 20%ほど高骨量を示した。また、骨形態計測法により組織学的に解析したところ、骨形成のみならず骨吸収も低下していることがわかった。インビトロの解析から骨芽細胞で Waif1 を欠損すると Cthrc1 による ALP 活性の上昇が消失することから骨形成の低下が確認された。そこで、骨吸収低下の原因を解析したところ cKO マウスの骨において Rankl の発現が野生型に比べ有意に低下していることが分かった。また、CRISPR/Cas9 により ST2 細胞で Waif1 を欠損したところ Rankl の発現が低下し、Waif1 を再び強制発現すると Rankl の発現が上昇することから

Waif1 が Rankl の転写を制御することが判明し、骨芽細胞における Waif1 の欠損が Rankl の発現低下を介して骨吸収が減少し骨量が増加したことが示唆された。すなわち、骨芽細胞において Waif1 は Cthrc1 からの骨形成シグナルを授与する受容体として働くだけでなく、Waif1 の発現そのものが Rankl の発現を介して骨吸収を制御するカップリング因子の受容体分子であることが明らかとなった。

そこで、リコンビナント可溶性 Waif1 タンパクを発現・精製し、これを免疫源としてマウスに免疫し、モノクローナル抗体を作出した。現在、骨芽細胞分化を促進する抗体のスクリーニングを行っている。

カップリング機能を解明するために破骨細胞機能不全 Src KO マウスと Rankl KO マウスを詳細に解析し、Src KO マウスでは Rankl 発現の上昇により破骨細胞が増加しマウスの生体内では骨吸収活性が検出されること、及び Rankl 欠損マウスでは骨細胞が増加していることを見出した。

参考文献

Takeshita S, Fumoto T, Ito M, Ikeda K
Serum CTX levels and histomorphometric analysis in Src versus RANKL knockout mice. **J Bone Miner Metab** in press

小原 幸弘、鈴木 三恵、竹下 淳

マクロファージが産生・分泌し骨芽細胞に作用する 新しいカップリング因子の同定と機能解析

骨リモデリングは、破骨細胞の分化成熟による吸収相からはじまり、逆転相を経て骨芽細胞による骨形成により吸収された骨が新しく形成される形成相ののち、休止相で一連の骨の改造が完了する。逆転相では破骨細胞は消失し、骨芽細胞の分化成熟までの間にマクロファージが出現することが知られているが、リモデリングにおけるマクロファージの役割や意義についての詳細は分かっていない。

当研究室では、これまでに破骨細胞が産生し骨形成を促進するカップリング因子として Cthrc1 と補体成分 C3a を同定し、それらのカップリング機能を実証した。本研究課題では、これまでに報告されてない新しいカップリング因子としてマクロファージが産生・分泌し骨芽細胞の遊走活性を促進するタンパクを生化学的、及び分子生物学的手法を駆使し原因分子の同定を試みる。

マウス骨髄由来マクロファージ(BMM)を M-CSF 存在下で培養し、その培養上清を骨髄ストローマ細胞株 ST2 に添加して培養すると遊走活性が上昇することが分かった。そこで、BMM を大量に培養しその培養上清を調整したのち、イオン交換カラムを用いて骨芽細胞の遊走活性を指標に活性成分を分離・濃縮した。濃縮したタ

ンパクを SDS-PAGE で展開し、各サイズのタンパクを切り出し、LC-MS/MS 解析によりアミノ酸分析を行った。その結果、分泌タンパクとして Fibronectin、 α 2 Macroglobulin、Thrombospondin 1、Murinoglobulin 1、Semaphorin 5B、Emilin 2、Fibulin 2、Pigment epithetium-derived factor(PEDF)、Cathepsin B、 α -centractin などを検出した。次に、マクロファージ、破骨細胞や骨芽細胞における各遺伝子発現を RT-PCR により解析したところ Emilin 2 と Cathepsin B がマクロファージにおいて発現特異性が高いことが分かった。

一方、クロドロネートリポソーム(Clo-lip)をマウスに投与すると骨髄中のマクロファージが死滅し骨芽細胞数が減少することが知られている(Blood, 2010)。そこで、この現象がカップリング機能の低下によるものかどうかを検討した。その結果、マウスに Clo-lip を投与すると、骨や骨髄ではマクロファージのみならず破骨細胞も減少することが分かった。興味深いことに、Clo-lip 処理により骨における Emilin 2 の発現は上昇した。今後、この系がマクロファージによるカップリング機能解析に有効かどうかを検討する。

miRNA 解析による腰部脊柱管狭窄症における 黄色靱帯の変性肥厚に関わるパスウェイの探索

高齢者の ADL を損なう腰部脊柱管狭窄症(LSS)は、臀部から下肢への痺れや間欠跛行を特徴とする運動器疾患である。本症の一因として黄色靱帯の肥厚が挙げられるが、その原因となる分子情報はほとんど得られていない。当センターの酒井らは、MRI T2 の横断面画像から得られる黄色靱帯/脊柱管面積比(LSAR)を利用した形態計測値と臨床的観察を用いることで、本症の発症要因を靱帯性あるいは非靱帯性の患者群に分類する手法を開発した(1)。本研究では、LSAR に基づく分類と黄色靱帯中の miRNA プロファイルから、本症における黄色靱帯の肥厚に関与する分子経路情報を集積した。

LSAR に基づき分類した、NCGG バイオバンク登録の靱帯性 LSS (n=10; 疾患群)および、非靱帯性 LSS あるいは腰部椎間板ヘルニア症(n=10, 対照群)の患者の黄色靱帯から Total RNA を抽出し、miRNA マイクロアレイに供した後、データ解析およびパスウェイ解析を行った。

LSAR は、対照群と比較して、靱帯性 LSS を罹患した疾患群が優位に高かった。miRNA マイクロアレイにより、疾患群において発現量が優位に変化した 10 個の miRNA が抽出された。抽出された miRNA のうち、

miR-423-5p、miR-4306、miR-516b-5p、および miR-497-5p は LSAR と関連したが、年齢との相関はなく、加齢性の退行性変性と病的肥厚の分子病態が異なる可能性が考えられた。靱帯性 LSS において発現が増減していた miRNA のパスウェイ解析の結果、AHR シグナル、Wnt/ β -catenin シグナル、および insulin receptor シグナル経路が黄色靱帯肥厚に関与する可能性が示された。

本研究により、MRI を用いた形態計測値に基づく分類が、黄色靱帯の肥厚を研究する上でも有用であることが明らかになった。さらに、今まで黄色靱帯で記述されていなかった経路が、その変性肥厚に関与する可能性を示し(2)、今後、臨床情報やモデル実験を含め詳細な検討を進めていく予定である。

本研究は当センター病院整形外科とメディカルゲノムセンターとの共同で行った。

1) Sakai et al. Clinical outcome in patients after classification of lumbar spinal stenosis according to hypertrophy of the ligamentum flavum. **J.Orthop.Sci.** 22, 27-33, 2017.

2) Mori et al. MicroRNA transcriptome analysis on hypertrophy of the ligamentum flavum from patients with lumbar spinal stenosis. **SSRR in press**

研究業績（運動器疾患研究部）

I. 論文発表

1. 原著

Takeshita S, Fumoto T, Ito M, Ikeda K

Serum CTX levels and histomorphometric analysis in Src versus RANKL knockout mice.

J Bone Miner Metab in press

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.

Exp. Anim. 65, 455-463, 2016.

Sakai Y, Ito S, Hida T, Ito K, Harada A, Watanabe K.

Clinical outcome in patients after classification of lumbar spinal stenosis according to hypertrophy of the ligamentum flavum.

J. Orthop. Sci. 22, 27-33, 2017.

2. 総説

竹下 淳

破骨細胞が産生するカップリング因子 特集 骨リモデリングの制御機構

THE BONE メディカルビュー社 Vol.30 No.2 p163-1, 2016

竹下 淳

RANKL-RANK 系と骨リモデリング・カップリングのメカニズム

骨・臓器ネットワークとオステオサイト 第1章 骨細胞に関する基礎知識

メディカルレビュー社、第4節 p35-43, 2016

3. 著書

Watanabe K, Duque G.

Animal models for senile osteoporosis.

in Osteoporosis in Older Persons: Pathophysiology and Therapeutic Approach, 2nd Ed.

Duque, Gustavo & Kiel, Douglas P. Eds. Springer-Verlag London Ltd. , 2016

4. その他

竹下 淳

新しい骨代謝制御機構の解明と新規骨粗鬆症治療薬開発への応用 公益財団法人鈴木謙三記念医科学応用研究財団 医科学応用研究財団研究報告 2015 vol.34 p116-119, 2017

竹下 淳

海外文献紹介 Bone 66:146-154, 2014; Trends Mol Med 20:449-459, 2014.
THE BONE メディカルビュー社 Vol.30 No.1 p95, 2016

5. 新聞・報道,等

6. 特許申請、取得状況

II. 学会・研究会等発表

1. シンポジウム、特別講演

2. 国際学会発表

Takeshita S, Fumoto T, Ito M, Ikeda K

Serum CTX levels and histomorphometric analysis in Src versus RANKL knockout mice.

The 38th Annual Meeting of the American Society for Bone & Mineral Research. 2016 年 9 月 19 日 Atlanta, Georgia, USA

Mori T, Murasawa Y, Sakai Y, Harada A, Niida S, Watanabe K.

Possible function of PAX9 in ligamentum flavum.

2017 Annual meeting of Orthopaedic Research Society 2017 年 3 月 21 日 San Diego, California, USA.

3. 国内学会発表

森 大気、村澤裕介、酒井義人、原田 敦、新飯田俊平、渡辺 研

ヒト黄色靭帯における PAX9 の機能解析：PAX9 は FGF18 の発現量を亢進す

ることで軟骨分化の抑制に寄与する

第 48 回日本結合組織学会学術大会 2016 年 6 月 24 日 長崎

4. その他、セミナー等

III. 競争的資金獲得実績

1. 日本医療研究開発機構

渡辺 研（分担） 400 万円

ゲノム医療実用化推進研究事業

メディカル・ゲノムセンター等におけるゲノム医療実施体制の構築と人材育成に関する研究

2. 厚生労働省

3. 文部科学省

竹下 淳（代表） 195 万円（総額 195 万円）

基盤研究 C

骨カップリング因子Cthrc1の骨形成促進機構の解明と創薬への応用

4. 財団、その他

再生再建医学研究部

(1) 構成員

部長	橋本 有弘
室長	
組織再生再建研究室	下田 修義
細胞再生研究室	上住 円
流動研究員	大久保 咲 坂口 和弥
開発費研究員	龍 訥
事務補助員	加藤 記代美

(2) 平成 28 年度研究活動の概要

平成 17 年 3 月に橋本が部長として着任し、再生再建医学研究部を立ち上げた。その後、平成 17 年 3 月に下田が研究室長として、平成 18 年 1 月に上住（池本）が研究員として着任した（その後、細胞再生室長に昇任）。平成 27 年 4 月からは、大久保咲、坂口和弥が流動研究員として、平成 28 年 4 月からは、龍 訥が、開発費研究員として加わり、研究を進めてきた。

平成 28 年度は、再生再建医学研究部設立 12 年目であったが、年度末近くに上住（池本）室長が東京都健康長寿医療センターに転出し、研究員の大久保と龍も就職が決まってそれぞれ転出したため、図らずも本年度は、当研究部にとって、一つの区切りの年になった。

本年度は、以下の課題を中心に研究を進めた。

- ① ヒト筋前駆細胞の特性解明に関する研究
- ② ヒト膀胱平滑筋細胞の不死化とそ

の特性解明

③ マウスをモデルとしたサルコペニアの発症または進行に関わる因子の探索

④ 加齢に伴うエピジェネティック変化の研究

本年度は、新たな研究テーマとしてヒト膀胱平滑筋細胞の不死化に取り組んだ。結果として、世界で初めて、高い増殖分化能を保ったまま、ヒト平滑筋細胞を不死化することに成功した。この細胞培養系は、平滑筋細胞生物学に新たな展開をもたらすブレークスルーツールとなるものであり、その有用性はたいへん高い。

平成 28 年度の論文発表に関しては、満足できるレベルとは言えなかった。上住室長、下田室長らの積年の研究成果が評価され、研究費については着実に獲得できているにもかかわらず、研究成果が目に見える形にならなかったことは、おおいに反省すべき点である。着実に研究データが積み重ねられていることを考えると、論文発表に対するよりいっそう強い意識を持つことが求められている。

平成 28 年度に蓄えられた研究成果が、次年度以降、どのような形で世に出るのか、期待したい。

当センター病院（泌尿器科、整形外科）および外部研究機関（国立がん研究センター、国立循環器病研究センター、京都大学、徳島文理大学、熊本大

学、神戸学院大学、大阪大学、日本医大、カリフォルニア大学など）との共同研究によって、着実に研究成果が得られており、順調に論文発表につながっている。

橋本らが確立した不死化ヒト筋前駆細胞については、その有用性が、国内外の研究者に認められ、平成 28 年度も多くの分与依頼を受けた。開発者

としては、日本発の「ヒト筋前駆細胞の標準株」として、国内外を問わず、広く筋細胞研究に用いられることを望んでいる。次年度中に、公的細胞バンクに寄託し、自由に供与可能な状況を作りたいと考えている。

再生再建医学研究グループ： 橋本有弘、大久保咲、龍訥

不死化ヒト膀胱平滑筋細胞の樹立とその性質解明： 加齢による性質変化について

平滑筋細胞の機能障害は、血管、膀胱、子宮など、様々な器官における疾病発症の原因となる。従来の平滑筋研究は、血管平滑筋を解析対象とすることが多く、内臓平滑筋の性質に関しては、まだ不明の点が多い。内臓平滑筋のひとつである膀胱平滑筋細胞の機能障害は、排尿障害の原因のひとつと考えられている。特に、尿失禁、過活動膀胱などは、高齢者のQOLへの影響がおおきいため、喫緊の解決が求められている。

(1) 不死化ヒト膀胱平滑筋細胞の樹立

平滑筋細胞が、著しい可塑性（形質転換能）を有することは、血管再生過程の病理学的解析および初代培養平滑筋細胞の解析によって示されてきた。分化した平滑筋細胞は、分離、培養すると細胞分裂を再開する。しかし、速やかに分化形質を失い、再び分化能を獲得することはできない。このような形質変化は、「脱分化」と呼ばれ、動脈硬化発症機序との関連性が議論されてきた。したがって、これまでの平滑筋を対象とした細胞生物学的研究は、脱分化前の培養初期の初代培養平滑筋細胞を用いて行われてきた。しかし、細胞調製方法の違い、細胞培養過程における性質変化の程度など、解析に用いる初代培養平滑筋細胞の性

質の異同については、不明の点が多い。さらに、ヒト平滑筋細胞には、初代培養すると速やかに増殖能を失うという問題があった。

そこで、我々は、ヒト膀胱平滑筋細胞の増殖分化機構および細胞応答性を解明するために、ヒト骨格筋細胞の不死化法（参考文献参照）を平滑筋細胞に応用して、ヒト膀胱平滑筋細胞株hBS11を樹立した。hBS11は、高い増殖活性を示し、平滑筋分化マーカー、 α -smooth muscle actin, MYH11, calponinを発現していた。分化条件を至適化すると、 α -SMAおよびcalponinの発現は増大し、平滑筋特異的なh-caldesmonの発現が誘導された。

したがって、hBS11は、脱分化細胞ではなく、分化能を保持した未分化平滑筋細胞であると考えられる。

(2) 不死化ヒト膀胱平滑筋細胞の可塑性

成体平滑筋組織中の平滑筋細胞は、未分化増殖状態と収縮可能な分化状態とを相互に行き来できる性質を有している。この性質は、可塑性あるいは形質転換(phenotypic modulation)と呼ばれ、平滑筋細胞に特徴的な性質であると考えられている。したがって、平滑筋細胞の分化は、「最終分化」ではない、と考えられる。しかし、未分化平滑筋細胞の分化、および分化細胞

の未分化細胞への転換（逆行性分化 reverse differentiation）については、その制御機構のみならず、現象としての実体に関しても、不明の点が多い。その理由として、平滑筋の（前向きな）分化および逆行性分化を再現できる培養細胞系が確立されていないことがあげられる。

不死化ヒト膀胱平滑筋細胞 hBS11 を、至適分化条件下で培養することによって得られた分化細胞は、アセチルコリン受容体アゴニスト calbachol 刺激および細胞外の高濃度カリウムにตอบสนองして、カルシウムを取り込む結果、細胞内カルシウムが上昇した。また、カルシウムイオノフォア A23187 によって細胞内カルシウム濃度を急激に上昇させると、収縮が誘導された。したがって hBS11 細胞は、分化マーカーの発現のみならず、機能的な意味でも平滑筋細胞に分化したと考えられる。

分化した hBS11 細胞を、再び成長因子等を豊富に含む増殖培地で培養すると、分化細胞は形態を変化させ、細胞分裂を再開した。

以上の結果は、平滑筋分化の可逆性を、直接的に示したこれまでに報告されたことのない知見である。不死化ヒト膀胱平滑筋細胞 hBS11 を用いることによって、これまでは解析困難であった、成人由来平滑筋細胞の分化・逆行性分化の仕組みを解明することが可能になる。

hBS11 は、これまでは解析困難だった、平滑筋細胞の性質解明に新たな局

面を拓く、break through tool となることが期待できる。

参考文献

1. Hashimoto, N, et al.
Immortalization of human myogenic progenitor cell clone retaining multipotentiality.
Biochem Biophys Res Commun 348(4): 1383-1388, 2006.
2. Hashimoto, N, et al.
Osteogenic Properties of Human Myogenic Progenitor Cells.
Mech Dev, 125 : 257-269, 2008.
3. Shiomi, K., et al.
Cdk4 and cyclin D1 allow human myogenic cells to recapture growth property without compromising differentiation potential.
Gene Therapy 18:857-866, 2011.

細胞再生研究室：上住 円

サルコペニアの発症または進行に関わる因子の探索

現在、我が国では平均寿命と健康寿命の間に約 10 年の乖離があり、健康的に老いることの重要性が高まっている。骨格筋は身体活動を司る組織であるため、その機能低下は QOL (quality of life) や ADL (activities of daily living) の低下に直結する。特に、高齢者における筋量や筋機能の低下（サルコペニア）は転倒や骨折を誘発し、それらによって被る長期間の不活動は、さらなる要介護状態や寝たきりを引き起こす要因となる。よって、サルコペニアを予防・治療することは健康長寿実現の鍵となるが、サルコペニアの発症メカニズムはよく分かっておらず、有効な治療法も無いのが現状である。

我々は、サルコペニアの発症や進行に関わる因子を探索するため、老化マウス（25 ヶ月齢）と若齢マウス（3 ヶ月齢）の下肢骨格筋を用いてサイトカインの発現をタンパクレベルで網羅的に調べ、老化で発現変動する因子をいくつか同定した。このうち、老化で最も発現増加していた因子に着目し、解析を進めた。

まず、ELISA や Western blot により発現の再現性を確認した。次に、この因子の骨格筋における局在を調べるために、免疫組織染色を行った結果、老化マウス骨格筋の血管と神経筋接合部で異常に高発現・蓄積しているこ

とが分かった。さらに、この分子の発現増加がサルコペニアの発症原因となり得るのか否かを調べた。6,9,12,15,18,21,24,28 ヶ月齢のマウスを用いて（各 n=5-10）、老化過程のどの時期からこの分子の異常蓄積および筋重量の減少が見られるのかを経時的に調べた。その結果、下肢筋重量の有意な減少は 24 ヶ月齢以降で見られるのに対し、この分子の蓄積は少なくとも 18 ヶ月齢で既に認められることが分かった。このことから、この分子の蓄積は筋重量の減少に先行して起こることが明らかとなり、サルコペニアの発症原因となる可能性が示された。

最近の研究から、サルコペニアは筋細胞（筋線維や筋衛星細胞）自体の異常というよりは、むしろ骨格筋を構成する筋細胞以外の要素の異常によって起こることが明らかにされている。特に、血管や神経筋接合部の加齢変化はサルコペニアに強く関与すると考えられているが、その分子メカニズムは不明である。我々の同定したこの分子が血管や神経筋接合部の加齢変化に直接関与するのか否か精査する必要がある。

組織再生再建研究室：下田修義、坂口和弥

エピジェネティックドリフトの基礎と応用研究

はじめに

古くから人やマウスの加齢に伴い、DNA メチル化が変動するということが報告されていたが、私達は以前、ゼブラフィッシュの加齢に伴い、ゲノムの中の「CpG アイランドショア」という領域のDNA メチル化が特異的に低下することを見出した。したがって加齢に伴うDNA メチル化の変動は脊椎動物に広く生じる現象であることが示唆された。高齢者疾患最大のリスクファクターは加齢であることから、私たちは加齢に伴うDNA メチル化の変動が高齢者特有の疾患の下地を作っているのではないかと推測し、昨年度、アルツハイマー病の発症と関連する幾つかの遺伝子に対し、加齢に伴うメチル化レベルの易変異性領域変化「CpG アイランドショア」のメチル化を調べたところ、健常者集団にくらべ罹患者集団の方で、わずかではあるが有意に低下していることを発見した。この結果から、血液DNAのメチル化解析によるアルツハイマー病早期診断法の開発への手がかりを見いだせたと期待している。

結果及び考察

(1) 血液を用いたアルツハイマー病の早期診断法の開発

侵襲性の低い血液サンプルからメチル化を利用したアルツハイマー病

の早期診断法を開発する目的で、NCGG バイオバンクよりアルツハイマー病患者及び高齢健常人の血液DNAを46名ずつ入手し、メチル化レベルに差のあるゲノム領域(DMR: Differentially Methylated Region)をイルミナ社のマイクロアレイ(450k および EPIC)により網羅的に検索している。今後、DMRが見つかり次第、この結果の再現性を別の解析手法(パイロシーケンス法)で確認する。

(2) 老化の一因としてのエピジェネティック異常

加齢に伴うゲノムの特定領域に起こるDNA メチル化の減少、あるいは増加はエピジェネティックドリフト(漂流)と呼ばれ、最近、老化及び老年病の原因として注目されている。しかしながら未だこの現象と老化との因果関係は認められていない。私たちはこの点を解明するためのモデルシステムとしてゼブラフィッシュを採用し、ゲノム編集技術を用いて、DNA メチル化酵素遺伝子の機能喪失型アレルを複数得ることに成功した。今後、作製した変異体のトランスクリプトーム解析や表現型解析を行い、メチル化標的部位を探索するとともに、メチル化の異常が発生・分化、および老化に与える影響を解析する予定である。

研究業績（再生再建医学研究部）

I. 論文発表

原著

Masashi Naito, Masaki Mori, Masayo Inagawa, Kohei Miyata, Naohiro Hashimoto, Sakae Tanaka, Hiroshi Asahara

Dnmt3a Regulates Proliferation of Muscle Satellite Cells via p57Kip2

PLOS Genetics, 12: e1006167. 10.1371/journal.pgen.1006167.

Atsushi Nishida, Ayaka Oda, Atsuko Takeuchi, Tomoko Lee, Hiroyuki Awano, Naohiro Hashimoto, Yasuhiro Takeshima, Masafumi Matsuo

Staurosporine allows dystrophin expression by skipping of nonsense-encoding exon.

Brain & Development, 38: 738-45. 10.1016/j.braindev.2016.03.003

Weihua Zeng, Shan Jiang, Xiangduo Kong, Nicole El-Ali, Alexander R. Ball, Jr, Christopher I-Hsing Ma, Naohiro Hashimoto, Kyoko Yokomori, and Ali Mortazavi

Single-nucleus RNA-seq of differentiating human myoblasts reveals the extent of fate heterogeneity.

Nucleic Acids Research, 2016, (on line) doi: 10.1093/nar/gkw739

Yoshitaka Ohno, Yusuke Matsuba, Naohiro Hashimoto, Takao Sugiura, Yoshinobu Ohira, Toshitada Yoshioka, Katsumasa Goto

Suppression of myostatin stimulates regenerative potential of injured antigravitational soleus muscle in mice under unloading condition.

International Journal of Medical Sciences, 2016, 13(9),680-685

doi:10.7150/ijms.16267.

Shinohara, Mayuka; Sumino, Yasuhiro; Sato, Fuminori; Kiyono, Tohru; Hashimoto, Naohiro; Mimata, Hiromitsu

Tumor Necrosis Factor-Alpha Inhibits Differentiation of Myogenic Cells in Human Urethral Rhabdosphincter

International Journal of Urology, *in press*.

Yukiya Sako, Kensuke Ninomiya, Yukiko Okuno, Masayasu Toyomoto, Atsushi Nishida, Yuka Koike, Kenji Ohe, Isao Kii, Suguru Yoshida, Naohiro Hashimoto, Takamitsu Hosoya, Masafumi Matsuo, and Masatoshi Hagiwara

Development of an orally available inhibitor of CLK1 for skipping a mutated dystrophin exon in Duchenne muscular dystrophy.

Scientific Reports. *in press*.

Uezumi A, Nakatani M, Ikemoto-Uezumi M, Yamamoto N, Morita M, Yamaguchi A, Yamada H, Kasai T, Masuda S, Narita A, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Fukada S, Nishino I, Tsuchida K

Cell surface protein profiling identifies distinctive markers of progenitor cells in human skeletal muscle.

Stem Cell Reports, 7(2): 263-78, 2016.

II. 学会・研究会等発表

1. シンポジウム、特別講演

橋本有弘

「ヒト筋サテライト細胞の性質解明をめざして-不死化ヒト筋前駆細胞を用いた解析」

日本筋学会第2回学術集会、シンポジウム、2016年8月6日 東京

Ikemoto-Uezumi M.

Two aspects of skeletal muscle aging –primary sarcopenia and aged muscle regeneration-

Symposium at Stem Cell Institute in University of Minnesota Medical School, “Cardiac and Skeletal Muscle Stem Cell and Regeneration”, August 1, 2016, NM, USA.

2. 国際学会発表

Ikemoto-Uezumi M, Uezumi A, Hashimoto N. MFG-E8 aberrantly accumulates at the arteries and the neuromuscular junction with age. FASEB Science Research Conference: Skeletal Muscle Satellite Cells and Regeneration, July 24-29, 2016,

Keystone, Colorado.

3. 国内学会発表

上住 円、上住聡芳、橋本有弘

「サルコペニアの発症または進行に関与する因子の探索」 第2回
日本筋学会第2回学術集会、2016年8月5-6日、東京

龍 訥、橋本有弘

不死化ヒト膀胱平滑筋細胞の樹立および平滑筋分化誘導系の確立
第39回日本分子生物学会年会
2016年11月30日-12月2日、パシフィコ横浜、横浜

大久保咲、橋本有弘

不死化ヒト膀胱平滑筋細胞の可逆的な分化
第39回日本分子生物学会年会
2016年11月30日-12月2日、パシフィコ横浜、横浜

上住 円、上住聡芳、橋本有弘

MFG-E8 aberrantly accumulates at the arteries and the neuromuscular junction with age.
第4回 若手による骨格筋細胞研究会、2016年11月14日、名古屋

坂口和弥、新飯田俊平、橋本有弘、下田修義

「血中 DNA のメチル化を指標としたアルツハイマー病早期診断法の開発」
第10回日本エピジェネティクス研究会年会、2016年5月19日、豊中

坂口和弥、新飯田俊平、橋本有弘、下田修義

「アルツハイマー病の発症を血中 DNA のメチル化から予測する」
第39回日本基礎老化学会大会 伊勢原市民文化会館 2016年5月27日

坂口和弥、新飯田俊平、橋本有弘、下田修義

A genome-wide search for diagnostic- and progression-epigenetic markers of AD
第9回 Nagoya グローバルリトリート 2017年2月10日 東浦

4. その他、セミナー等

橋本有弘

「骨格筋の再生と筋幹細胞（筋サテライト細胞）：筋幹細胞の細胞生物学」
大分大学医学系研究科、2016 年 6 月 29 日、大分

III. 競争的資金獲得実績

1. 日本医療研究開発機構

上住 円（分担）195 万円

難治性疾患実用化研究事業

遺伝性筋疾患に対する新たな高効率細胞移植治療法の開発

下田修義（分担）588 万円

ゲノム医療実用化推進研究事業

メディカル・ゲノムセンター等におけるゲノム医療実施体制の構築と人材育成
に関する研究

2. 文部科学省

橋本有弘（代表）170 万円

科学研究費助成事業（基盤研究 C 一般）

ヒト骨格筋幹細胞の機能は加齢と共に低下するか？：サルコペニア治療のための細胞解析

上住 円（代表）140 万円

科学研究費助成事業（基盤研究 C 一般）

Pro-IGF-II シグナルを利用した安全性の高い老化筋再生促進治療法の開発

下田修義（代表）170 万円

科学研究費助成事業（基盤研究 C 一般）

ゼブラフィッシュ胚で可視化されるトランスジーンサイレンシングに関する研究

3. 財団、その他

橋本有弘（分担）100 万円

国立精神・神経疾患医療研究センター

精神・神経疾患研究開発費

筋ジストロフィーモデル動物を用いた新たな治療法の開発

上住 円（代表）100 万円

公益財団法人 赤枝医学研究財団 研究助成

高齢者の筋再生能力改善のための基礎的研究

幹細胞再生医療研究部

(1) 構成員

部長 中島 美砂子
室長 庵原 耕一郎
流動研究員
Endrawan Pratama
外来研究員
渥美 優介
中本 和希
研究生
中山 英典
大桑 雄太
研究補助員・事務補助員
富永 三千代
長井 綾乃
廣川 順子
山口 共子
山田 準一

(2) 平成 28 年度研究活動の概要

歯髄幹細胞自家移植による歯髄・象牙質再生治療の臨床研究の長期フォローアップを行い、今後実用化するための問題点を明らかにし、以下のさらなる研究を行った。

細胞移植前に歯内（根管内）の細菌を完全に除去するため、歯科用ナノバブル発生装置を開発し、さらに利便性を考えた改良を加えた。イヌ感染根管歯モデルにおいてナノバブルを用いた根管内薬剤導入後、歯髄幹細胞を自家移植して歯髄および根尖部歯周組織が再生されることを明らかにした。

同種移植による歯髄・象牙質再生治療を行うため、歯髄幹細胞を安定に増幅する最適な細胞源、最適な培養法（微小重力、低酸素）を検討した。

中高齢者にも歯髄・象牙質再生治療を適用するため、高齢者の組織再生を促進させる因子 RSF (regeneration stimulating factor) 候補因子 1 (CCL11 中和抗体, CCR3 アンタゴニスト) あるいは候補因子 2 (トリプシン) をそれぞれ高齢マウスあるいはイヌの歯に適用し、歯髄再生促進に成功した。その再生促進メカニズムとして、老化歯根膜細胞の活性化および高齢象牙質の再生抑制因子の阻害効果が示唆された。

他疾患の再生医療へ歯髄幹細胞の適用を拡大すべく、ラット坐骨神経挫滅モデルへ移植し、それぞれ有効性を検討した。

幹細胞を簡便、安全に分取し、高機能化増幅する膜分取装置の製品化のための開発研究を行った。

歯髄幹細胞を用いた歯髄・象牙質再生に関する研究

まず、先の臨床研究において安全性が確認されたヒト歯髄幹細胞を用いた抜髄後の歯髄再生治療 (1)に関して、長期フォローアップにより今後実用化を進めるにあたり主に2つの問題点が明らかとなった。すなわち、細胞移植前の根管内の完全除菌および微小漏洩による再感染を防止する再生歯髄を完全に被覆する象牙質形成の促進法の開発である。

第一点目については、昨年より開発を進めてきた歯科用閉鎖系ナノバブル発生装置にさらに改良を加え、最適な使用条件を決定し、利便性を向上させた。また、イヌ感染根管歯モデルにおいてナノバブルを用いて根管内に抗生剤を導入すると短時間に除菌が可能となり、さらに歯髄幹細胞を自家移植すると歯髄および根尖部歯周組織が再生されることを明らかにした。現在、バイオフィルムに対する効果、根管治療用の最適薬剤の選択の検討を進め、近くナノバブルを用いた感染根管治療の非臨床研究を行う予定である。

第二点目については、象牙細管に類似した細孔を有する焼成体を作製し、再生歯髄を細管象牙質で早期に被覆し再感染と破折を防止する研究を行っている。

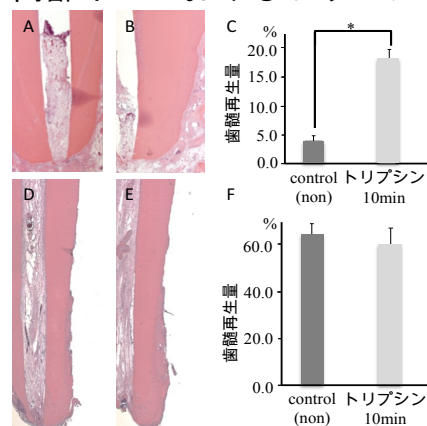
さらに、自家移植について、中高齢者では患者自身の不用歯の供給、そこから得られる歯髄幹細胞の全身疾患による影響、安全性・品質検査によるコストなどの問題から、現在、同種移植による歯髄・象牙質再生治療の開発を進めている。すでにイヌにおいて歯髄

幹細胞の DLA タイプが不一致で根管内に移植した場合、一致で移植した場合と量的および質的に同様の歯髄組織が再生された。よって現在、最適な歯髄幹細胞の供給源および安定に安全に増幅させる最適な培養法（微小重力、低酸素）を検討している。

さらに、中高齢者では再生が遅延することに対して、高齢者の歯髄・象牙質再生を促進させる因子 RSF

(regeneration stimulating factor) を同定した。そのうち、候補因子 1 (CCL11 中和抗体, CCR3 アンタゴニスト) あるいは候補因子 2 (トリプシン) は高齢個体において歯髄再生を促進し、さらに併用効果も示唆された。その再生促進メカニズムとして、老化歯根膜細胞の活性化および高齢象牙質の再生抑制因子の阻害効果が示唆された。

図 高齢イヌにおけるトリプシンに



による歯髄再生促進効果 (A-C) 高齢イヌ, (D-F) 若齢イヌ, (A, D)トリプシン前処理 10 分, (B, E)生食コントロール

参考文献

Nakashima M. *et al.*, **Stem Cell Res. Therapy.** 8:61, 2017.

研究業績 (幹細胞再生医療研究部)

I. 論文発表

1. 原著

Miyashita S, Ahmed NE, Murakami M, Iohara K, Yamamoto T, Horibe H, Kurita K, Takano-Yamamoto T, Nakashima M

Mechanical forces induce odontoblastic differentiation of mesenchymal stem cells on three-dimensional biomimetic scaffolds.

J Tissue Eng Regen Med, 11: 434-446, 2017.

Kawamura R, Hayashi Y, Murakami H, Nakashima M

EDTA soluble chemical components and the conditioned medium from mobilized dental pulp stem cells contain an inductive microenvironment, promoting cell proliferation, migration and odontoblastic differentiation.

Stem Cell Res Ther, 7: 77, 2016.

Hirose Y, Yamaguchi M, Kawabata S, Murakami M, Nakashima M, Gotoh M, Yamamoto T

Effects of extracellular pH on dental pulp cells in vitro.

J Endod, 42: 735-741, 2016.

Ahmed NE, Murakami M, Hirose Y, Nakashima M

Therapeutic potential of dental pulp stem cell secretome for Alzheimer's disease treatment: an in vitro study.

Stem Cell Int, Volume 2016, Article ID 8102478, 2016.

Ahmed NE, Murakami M, Kaneko S, Nakashima M

The effects of hypoxia on the stemness properties of human dental pulp stem cells (DPSCs).

Sci Rep, 6: 35476, 2016.

Nakayama H, Iohara K, Hayashi Y, Okuwa Y, Kurita K, Nakashima M.

Enhanced regeneration potential of mobilized dental pulp stem cells from immature teeth.

Oral Dis, 2016, Dec 14. doi: 10.1111/odi.12619 (in press)

Nakashima M, Iohara K, Murakami M, Nakamura H, Sato Y, Aiji Y, Matsushita K
Pulp regeneration by transplantation of dental pulp stem cells in pulpitis: A pilot clinical study.

Stem Cell Res Therapy, 8: 61, 2017.

2. 総説

中島美砂子

歯髄・象牙質再生治療の現状と未来 歯界展望特別号—歯科医療 未来と夢—
医歯薬出版 校正中

3. 著書、Chapters

なし

4. その他

なし

5. 新聞・報道, 等

なし

6. 特許申請、取得状況

特許出願

発明者：島垣昌明、鈴木孝尚、渥美優介、中島美砂子

発明の名称：細胞分取培養増殖容器及び細胞分取培養増殖方法

出願年月日：国内出願 平成 27 年 12 月 26 日

国際出願 平成 28 年 12 月 26 日

出願番号：特願 2015-255511（国内）

PCT/JP2016/088597（国際）

出願人：東レ・メディカル株式会社、ネッパジーン株式会社

国立長寿医療研究センター（共願人として名義変更予定）

発明者：中島美砂子、庵原耕一郎、渡辺秀人

発明の名称：歯科用前処理材及び歯組織再生キット

出願年月日：国内出願 平成 28 年 3 月 31 日

国際出願 平成 29 年 3 月 31 日

出願番号：特願 2016-072306（国内）

PCT/JP2017/13572（国際）

出願人：国立長寿医療研究センター、学校法人愛知医科大学

特許取得

発明者：中島美砂子、庵原耕一郎

発明の名称：間葉系幹細胞を含んでなる根管充填材及びこれを用いた歯組織再生方法

出願日：国内出願 平成 23 年 2 月 28 日

出願番号：特願 2011-042862

登録日：平成 28 年 5 月 27 日（国内）

特許証：特許第 5939559 号

権利者：国立長寿医療研究センター

発明者：中島美砂子、中村洋

発明の名称：薬剤、歯科材料、及びスクリーニング方法

出願日：平成 20 年 4 月 7 日

国際出願日：平成 21 年 4 月 6 日

出願番号：200980112243.1

登録日：平成 28 年 8 月 31 日（中国）

特許証：特許第 ZL200980112243.1 号

権利者：国立長寿医療研究センター

発明者：中島美砂子、庵原耕一郎、山田和正、島垣昌明、長部真博

発明の名称：膜分取培養器、膜分取培養キット、およびこれを用いた幹細胞分取方法、ならびに分離膜

出願番号：特願 2013-507806

出願日：平成 24 年 3 月 30 日

登録日：平成 28 年 10 月 7 日（国内）

特許証：特許第 6016785 号

権利者：国立長寿医療研究センター、東レ株式会社

発明者：中島美砂子、立花克郎

発明の名称：歯科用超音波薬剤導入システム及び歯科用超音波薬剤導入方法

出願番号：特願 2009-285068（国内）

出願日：平成 21 年 12 月 16 日

PCT 出願：平成 22 年 12 月 16 日

出願番号：PCT/JP2010/007315（W02011/074268A1）

登録日：平成 28 年 9 月 27 日（米国）

特許証：特許 US9, 452, 036 2B2

権利者：国立長寿医療研究センター、学校法人福岡大学

発明者：中島美砂子、庵原耕一郎

発明の名称：根管充填材

出願日：平成 26 年 6 月 12 日

PCT 出願日：平成 21 年 3 月 12 日

出願番号：特願 2014-121165

登録日：平成 28 年 11 月 4 日（国内）

特許証：特許第 6031658 号

権利者：公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

発明者：中島美砂子、庵原耕一郎

発明の名称：非抜歯根管充填材及び非抜歯による歯組織再生方法

出願日：平成 22 年 9 月 10 日

PCT 出願番号：201080040308.9

登録日：平成 28 年 10 月 12 日（中国）

特許証：特許 ZL201080040308.9

権利者：国立長寿医療研究センター

II. 学会・研究会等発表

1. シンポジウム、特別講演

Nakashima M

Clinical Translational Research on Dental Pulp Regeneration

Total pulp regeneration by autologous transplantation of mobilized dental pulp stem cells: pilot clinical study.

94th General Session and Exhibition of International Association for Dental Research (IADR)/3rd Asia Pacific Region (APR), June 23, 2016, Soul.

Nakashima M, Iohara K

Session V: Clinical Application

Clinical study on pulp regeneration by transplantation of mobilized dental pulp stem cells in patients with irreversible pulpitis.

International Association for Dental Research (IADR) Pulp Biology and Regeneration Group (PBRG) Symposium2016, June 28, 2016, Nagoya.

庵原耕一郎、中島美砂子

歯内療法領域における再生医療.

歯髄幹細胞を用いた抜髄後歯髄再生治療臨床研究の報告.

日本歯内療法学会, シンポジウム, 2016 年 7 月 24 日, 名古屋.

中島美砂子

歯髄・象牙質再生治療の現状と未来.

第 23 回日本歯科医学会総会, 講演, 2016 年 10 月 22 日, 福岡.

中島美砂子

歯髄・象牙質再生治療の現状と展望.

九州臨床再生歯科研究会, 講演, 2016 年 12 月 10 日, 福岡.

中島美砂子

人工神経による末梢神経再生治療の現状と将来展望.

第 16 回日本再生医療学会, 2017 年 3 月 9 日, 仙台.

2. 国際学会発表

Nakayama H, Nakashima M

Characterization of human mobilized dental pulp stem cells (MDPSCs) from the pulp of immature third molar tooth compared to colony-derived dental pulp stem cells (DPSCs) .

94th General Session and Exhibition of International Association for Dental Research (IADR)/3rd Asia Pacific Region (APR), June 23, 2016, Korea.

Ahmed N, Murakami M, Kaneko S, Nakashima M

Optimizing oxygen conditions for expansion of human dental pulp stem cells (DPSCs) under controlled oxygen concentration.

International Association for Dental Research (IADR) Pulp Biology and Regeneration Group (PBRG) Symposium 2016, June 28, 2016, Nagoya.

Fujita M, Iohara K, Horiba N, Nakata K, Nakashima M

Pulp regeneration after complete disinfection of root canal system by enhanced delivery of medicaments using nanobubbles in a canine periapical disease model.

International Association for Dental Research (IADR) Pulp Biology and Regeneration Group (PBRG) Symposium 2016, June 28, 2016, Nagoya.

Hayashi Y, Ishizaka R, Fukuta O, Nakashima M

CXCL14 and MCP1 are potent trophic factors associated with cell migration and angiogenesis leading to higher regenerative potential of dental pulp side population cells.

International Association for Dental Research (IADR) Pulp Biology and Regeneration Group (PBRG) Symposium 2016, June 28, 2016, Nagoya.

Iohara K, Nakashima M

The safety and efficacy of autologous transplantation of mobilized dental pulp stem cells (MDPSCs) into the pulpectomized tooth: A preclinical study in dog.

International Association for Dental Research (IADR) Pulp Biology and Regeneration Group (PBRG) Symposium 2016, June 28, 2016, Nagoya.

Yamada K, Iwama Y, Iohara K, Nakashima M

Three dimensional modeling and qualitative identification of enamel, periodontal ligament, dentin and newly formed dentin by using commercial dental CBCT and engineering CT images.

International Association for Dental Research (IADR) Pulp Biology and Regeneration Group (PBRG) Symposium 2016, June 28, 2016, Nagoya.

Yamada S, Yamamoto K, Matsuura T, Capati MLF, Nakazono A, Nakashima M, Hayashi Y

Fish collagen peptide induces differentiation of human dental pulp stem cells to osteoblasts.

International Association for Dental Research (IADR) Pulp Biology and Regeneration Group (PBRG) Symposium 2016, June 28, 2016, Nagoya.

Hayashi Y, Yamamoto K, Yanagiguchi K, Yamada S, Iohara K, Nakashima M
Pulp regeneration using fish collagen as scaffold in dog teeth.

International Association for Dental Research (IADR) /AADR/CADR General Session & Exhibition, March 25, 2017, San Francisco.

国際学会開催主催

International Association for Dental Research, Pulp Biology and Regeneration Group Symposium 2016 “Dental Regenerative Medicine Realizing Healthy

Longevity” , June 28, 2016, Nagoya.

3. 国内学会発表

大桑 雄太、中山 英典、林 勇輝、栗田 賢一、中島美砂子

歯髄幹細胞を用いたラット末梢神経挫滅モデルにおける再生治療の開発.

第 27 回日本末梢神経学会学術集会, 2016 年 8 月 26 日～27 日, 大阪.

中山英典、大桑雄太、栗田賢一、中島美砂子

幹細胞治療における細胞源としてのヒト若齢根未完成智歯由来膜分取歯髄幹細胞の有効性.

第 61 回 (公社) 日本口腔外科学会総会・学術大会, 2016 年 11 月 25 日～27 日, 千葉.

林勇輝、石坂亮、福田理、中島美砂子

高齢マウスにおける抗 C C L 1 1 抗体の持続投与による歯髄再生量回復メカニズムの検討.

第 16 回日本再生医療学会総会, 2017 年 3 月 8 日, 仙台.

4. その他、セミナー等

中島美砂子

歯髄・象牙質再生医療の現状と展望.

明海大学歯学部セミナー, 2016 年 4 月 19 日, 坂戸.

中島美砂子

歯の延命化による健康長寿を目指した歯髄・象牙質再生治療法の現状と展望.

日本歯科大学歯学会大会・総会, 2016 年 6 月 4 日, 東京.

中島美砂子

歯髄の再生療法.

香川デンタルスタディグループ, 講演, 2016 年 7 月 16 日, 高松.

中島美砂子

ナノバブル薬剤導入法による歯内除菌と感染根管歯の歯髄・象牙質再生医療への応用.

先端医療振興財団，講演，2016 年 7 月 21 日，神戸．

中島美砂子

歯髄・象牙質再生治療の現状と未来．

長崎大学大学院セミナー，2016 年 9 月 8 日，長崎．

III. 競争的資金獲得実績

1. 日本医療研究開発機構

なし

2. 厚生労働省

なし

3. 文部科学省

中島美砂子（代表）240 万円（総額 312 万円）

科学研究費助成事業

基盤研究（B）

DNA 損傷の形態学的品質評価法を用いた歯髄幹細胞の最適培養法の開発

中島美砂子（分担）150 万円（総額 195 万円）

科学研究費助成事業

基盤研究（C）

歯髄幹細胞を用いた新しい末梢神経損傷治療法の開発

中島美砂子（分担）40 万円（総額 52 万円）

科学研究費助成事業

基盤研究（C）

歯髄・骨髄・脂肪幹細胞培養上清の再生能比較による細胞遊走因子の同定

4. 財団、その他

中島美砂子（分担）190 万円（総額 247 万円）

中小企業経営支援等対策費補助金

幹細胞を簡便、安全に分取し、高機能化増幅する革新的器具の開発

口腔疾患研究部

(1) 構成員

部長 松下 健二

室長

口腔機能再生研究室

口腔感染制御研究室 四釜 洋介

流動研究員

王 静舒

研究生

高田 鮎子

浮田 万由美

研究補助員・事務補助員

小暮 宏実

蒔田 千夏

杉浦 優子

外来研究員

須磨 紫乃

石田 直之

客員研究員

渡邊 裕

(2) 平成 28 年度研究活動の概要

当研究部は、口腔感染制御研究室と口腔機能再生研究室の 2 室で構成されており、総勢 11 名の構成員で研究活動を行っている。当研究部では、高齢者における歯の喪失の問題を血管生物学的、細菌学的、免疫学的、再生歯学的、アプローチにより総合的、統合的に解決することを目指している。また、口腔機能の改善、向上による高齢者の QOL 向上の取り組みを行なっている。

松下部長の研究グループは、歯周病と老年病との因果関係を明らかにする研究を行い、歯周病がアルツハイマー病の増悪因子になりえることをマウスモデルで明らかにするとともに、福岡県久山町の住民データの解析結果から、歯周病の炎症強度と認知機能の低下が負の相関関係を示すことを明らかにした。

また、高齢マウスの歯周組織の解析結果から、粘膜のバリア機能を担うタンパク分子の発現の低下や局在の変化が若齢マウスと比べて見られることを明らかにした。また、歯周病関連細菌である *Porphyromonas gingivalis* がアレルギー関連タンパクの誘導を介して、口腔粘膜バリアの低下を来すこと、また高濃度グルコースが上皮バリアタンパク質の発現を増強することを明らかにした。全国 6 校の歯科大学に連携講座を開設し、教育・研究の連携を推進している。

口腔感染制御研究室の四釜室長は平成 28 年 10 月に着任した。当該年度は当研究室で実験を行う為のセットアップに時間を費やした。次年度から本格的に糖脂質代謝異常と顎顔面領域疾患の関連性、特にドライマウスや歯周病に焦点をあてた研究を開始する予定である。

口腔疾患研究部：松下健二

王静舒、高田鮎子、浮田万由美、小暮宏実

口腔感染症の制御による健康寿命延伸の試み

1. アルツハイマー病の増悪因子としての歯周病の解析

超高齢社会に突入した我が国では認知症患者数は460万人を越え、MCIを含めると800万人を超えると推計されている。認知症の発症予防・治療法開発は急務であるが、その半数以上を占めるアルツハイマー病（AD）の根本的な予防・治療法はない。病因分子Aβ沈着は認知機能の正常な高齢者にも認められること、最近のアミロイド・イメージング研究から、認知機能障害発症前に脳内Aβ蓄積が出現することが明らかになり、ADをAβ蓄積の慢性疾患として捉えることが可能となっている。こうした考え方に一致して、近年孤発性ADの後天的危険因子として糖尿病・脂質異常症や歯周病といった生活習慣病との関連性が指摘されている。我々は、これまでAD病態形成における歯周病の関与に着目し、脳外に病態の首座を持つ歯周病が脳内AD分子病態に関与する可能性についてマウスモデルで検討してきた。その結果、歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* の接種によって歯周病を発症したAPP-Tgマウス

において、認知機能が低下するとともに、脳内Aβ沈着の増加および炎症性サイトカインの増加が認められることを明らかにし、歯周病がアルツハイマー病を増悪する可能性を確認した。加えて、*P. gingivalis* が脳内に移行して、炎症を惹起する可能性が示唆された。さらに、福岡県久山町の住民データの解析結果から、歯周病の炎症強度と認知機能の低下が負の相関関係を示すことを明らかにした。

2. 加齢変化が歯周病の病態に及ぼす影響の検討

歯周病は加齢にともなって発症する疾患であるが、加齢あるいは老化が歯周病の病態形成にいかに関わっているか不明である。そこで、歯周病の病因の一つとして、加齢あるいは老化に伴う歯周組織の脆弱化が関与するといった作業仮説をもとに解析を行っている。具体的には、20ヶ月齢の老齢マウスの歯周組織および口腔粘膜組織から総RNAを抽出し、発現する遺伝子を若齢マウスのそれと網羅的に比較検討した。その結果、タイトジャンクションを形成する数種類の

分子や自然免疫応答に関連する分子の発現が若齢マウスにおける発現と比べ増減があることが認められた。また、それらの分子の歯周組織におけるタンパク質発現を免疫染色法で解析した結果、若齢マウスにおける発現と比較して、発現量およびその局在に相違が認められた。現在、それらの分子の発現変化が歯周病等の口腔感染症の病態にどのように関連するかを詳細に検討している。また、老齢マウスの顎関節の性状を若齢マウスのそれと比較検討中である。

3. アレルギー疾患としての歯周病病因論の解明

歯周病は、歯周病原細菌がその発症や進行に関与する慢性炎症性疾患であることは周知の事実であるが、その病態形成にアレルギー応答が関与するとの報告が最近散見される。そこで、され始めている。そこで、*P. gingivalis* によるアレルギー炎発症の可能性を検討した。その結果、*P. gingivalis* が産生するトリプシン様プロテアーゼ gingipain が肥満細胞、好塩基球、好酸球、Th2 リンパ球といったアレルギー関連細胞を活性化する IL-33 の発現を増強し、歯周組織におけるアレルギー炎発症を惹起する可能性を示した。また、同酵素は IL-31 に産性を促し、歯肉上皮の接着因子 claudin-1 の発現レベルを低下させて、口腔粘膜のバリア機能を減弱することで、歯周病原細菌や口腔内の易害性抗原の侵入

を容易にすることで、歯周炎の発症や進行を助長する可能性があることを明らかにした。さらに、高濃度グルコースの局所投与が上皮バリア機能を担う claudin-1 や filaggrin の発現を増強し、歯周病や慢性皮膚炎などの慢性炎症を制御できる可能性を *in vitro* およびマウスモデルで明らかにした。

4. 試作紫外線 LED を用いた歯科治療用機器の評価

当センターの角保徳部長との共同研究として、試作した紫外線 LED 歯科治療用機器を用いて、310nm UVB の口腔内細菌と対する殺菌作用を *in vitro* の実験系で検討した。その結果、310nm 紫外線 LED を 1050mJ/cm² 照射することによって、*P. gingivalis* が 90%以上殺菌されること、Vitamin K を添加することで殺菌作用が 20%程度増強されること、またその殺菌機序として Pyrimidine dimer や活性酸素種の生成が関与することが明らかとなった。なお、今回用いた線量は皮膚科の臨床で用いられる線量よりも少ないため、口腔粘膜に照射しても十分安全であると考ええる。以上の結果から、紫外線 LED は口腔内殺菌用に応用可能であることが明らかとなった。

口腔感染制御研究室：四釜洋介

脂質代謝と唾液腺疾患に関する研究

口腔は全身の健康に深く関与し、生きて行く為に必要な「食」や「会話」などに唾液は重要な役割を担っている。超高齢社会を迎えた日本は、潜在的な口腔乾燥症患者が 800~3,000 万人とも言われており、今もなお増加傾向にある。また老化に伴い、唾液腺だけでなく、様々な細胞や組織に機能障害が生じ、糖尿病や脂質異常症、動脈硬化といった老化関連疾患のリスクが上昇し、糖尿病患者の合併症として大唾液腺である耳下腺の肥大や口腔乾燥症を呈することも知られている。これらの疾患はメタボリックシンドロームの構成疾患であり、主な発症リスク要因として脂肪組織の機能障害がある。脂肪組織はエネルギー貯蔵庫としてだけではなく、生理活性物質（アディポカイン）を産生する内分泌器官である事が明らかになっている。近年、過食や運動不足等生活習慣の乱れから肥満による内臓脂肪の増大や脂質異常を認める日本人が多くなってきており、この様な変化は脂肪組織における過剰な遊離脂肪酸などのアディポカインの分泌異常を引き起こし、糖脂質代謝異常や動脈硬化等の老化関連疾患を促進すると考えられている。

口腔乾燥症状をきたす原因不明の自己免疫疾患としてシェーグレン症候

群が知られている。シェーグレン症候群は唾液腺涙腺特異的に慢性炎症を惹起し、60-70 歳代の女性を中心に口腔乾燥症状やドライアイを主症状とし、臨床研究ではシェーグレン症候群患者は糖尿病や脂質異常症を合併している割合が高いという報告もあるが、その分子基盤は明らかになっていない。

以上背景、およびこれまで発表してきた下記論文をふまえ、シェーグレン症候群モデルマウスおよび老齢マウスを用いて、シェーグレン症候群および加齢による唾液分泌減少に対する脂質代謝異常の影響を明らかにしていく予定である。

参考文献

Shikama Y, *et al.*, Title. **J Dent Res.**, 92:540-546, 2013.

Shikama Y, *et al.*, Title. **J Cell Physiol.**, 230:732-742, 2015.

Shikama Y, *et al.*, Title. **J Cell Physiol.**, 230:2981-2989, 2015.

研究業績（口腔疾患研究部）

I. 論文発表

1. 原著

Takada A, Matsushita K, Horioka S, Furuichi Y, Sumi Y

Bactericidal effects of 310 nm ultraviolet light-emitting diode irradiation on oral bacteria.

BMC Oral Health, in press

Tada H, Shimizu T, Matsushita K, Takada H

Gingipains from *Porphyromonas gingivalis*-induced IL-33 down-regulate hCAP-18/LL-37 production in human gingival epithelial cells.

Biomed Res, in press

Nakashima M, Iohara K, Murakami M, Nakamura H, Sato Y, Arijji Y, Matsushita K

Pulp regeneration by transplantation of dental pulp stem cells in pulpitis: a pilot clinical study.

Stem Cell Res Ther, 8(1):61, 2017.

Umeki K, Watanabe Y, Hirano H

Relationship between Masseter Muscle Thickness and Skeletal Muscle Mass in Elderly Persons Requiring Nursing Care in North East Japan.

Int J Oral-Med Sci, Vol.15 (2016) No.3-4, P152-159, 2017.

Yu Z, Saito H, Otsuka H, Shikama Y, Funayama H, Sakai M, Murai S, Nakamura M, Yokochi T, Takada H, Sugawara S, Endo Y

Pulmonary platelet accumulation induced by catecholamines: Its involvement in lipopolysaccharide-induced anaphylaxis-like shock.

International Immunopharmacology, Volume 43, Pages 40–52, 2017.

Tokudome Y, Okumura K, Kumagai Y, Hirano H, Kim H, Morishita S, Watanabe Y

Development of the Japanese version of the Council on Nutrition Appetite Questionnaire and its simplified versions, and evaluation of their reliability, validity, and reproducibility.

J Epidemiol, pii:S0917-5040(17)30001-1, doi:10.1016/j.je.2016.11.002, 2017.

Naujok O, Bandou Y, Shikama Y, Funaki M, Lenzen S.

Effect of substrate rigidity in tissue culture on the function of insulin-secreting INS-1E cells.

J Tissue Eng Regen Med, 2017 Jan;11(1):58-65. doi: 10.1002/term.1857. PubMed PMID: 24399617.

Watanabe Y, Hirano H, Arai H, Morishita S, Ohara Y, Eda Hiro A, Murakami M, Shimada H, Kikutani T, Suzuki T

Relationship Between Frailty and Oral Function in Community-Dwelling Elderly Adults.

J Am Geriatr Soc, Jan;65(1):66-76, doi:10.1111/jgs.14355. Epub 2016 Sep 22, 2017.

Yoshitake J, Soeda Y, Ida T, Sumioka A, Yoshikawa M, Matsushita K, Akaike T, Takashima A

Modification of Tau by 8-Nitroguanosine 3',5'-Cyclic Monophosphate (8-Nitro-cGMP): Effects of Nitric Oxide Linked Chemical Modification on Tau Aggregation.

J Biol Chem, 291:22714-22720, 2016.

Tada H, Matsuyama T, Nishioka T, Hagiwara M, Kiyoura Y, Shimauchi H, Matsushita K

Porphyromonas gingivalis Gingipain-Dependently Enhances IL-33 Production in Human Gingival Epithelial Cells.

PLOS ONE, 11:e0152794, 2016.

白部麻樹、平野浩彦、小原由紀、枝広あや子、渡邊裕、吉田英世、大淵修

—

都市部在住高齢者を対象とした歯周疾患実態調査.

老年歯科医学, Vol.31 (2016) No.1 p.18-27, 2016

2. 総説

松下健二、石田直之、石原裕一、多田浩之、王静舒、高田鮎子、石田和人、
道川 誠

歯周病がアルツハイマー病の分子病態ならびに認知機能障害を増悪させる
機序の解明.

エンドトキシン・自然免疫研究 **19**, p33-37, 2016.

多田浩之、高瀬 彩、松下健二、高田春比古

Porphyromonas gingivalis ジンジパインによるヒトマスト細胞からの IL-31
の誘導.

エンドトキシン・自然免疫研究 **19**, p38-41, 2016.

渡邊 裕、本川佳子

口腔機能とフレイル

Geriatric Medicine, 55, p45-49, 2017.

3. 著書、Chapters

なし

4. その他

なし

5. 新聞・報道等

本年度 4 月に Plos One に掲載された以下の論文が、科学情報サイト“World
Biomedical Frontiers”で紹介された。

<http://biomedfrontiers.org/ep-2016-8/>

Tada H, Matsuyama T, Nishioka T, Hagiwara M, Kiyoura Y, Shimauchi H,
Matsushita K *Porphyromonas gingivalis* gingipain-dependently enhances
IL-33 production in human gingival epithelial cells.

PLos One 11(4):e0152794, 2016.

6. 特許申請、取得状況

なし

II. 学会・研究会等発表

1. シンポジウム、特別講演

渡邊 裕

オーラルフレイルから高齢者の栄養を考える.

高齢者の低栄養予防対策研修会, 2017 年 3 月 26 日, 松江

渡邊 裕

高齢期における口腔機能低下の特徴.

口腔ケア研修会, 2017 年 3 月 5 日, 秋田

渡邊 裕

第 6 回在宅歯科医療講習会.

静岡県歯科医師会, 2017 年 2 月 26 日, 静岡

渡邊 裕

口腔機能向上.

神奈川県介護予防従事者研修会, 2017 年 1 月 29 日, 横浜

渡邊 裕

オーラルフレイルとは 歯科医が行うフレイル対策.

全道行政歯科技術職員研修会, 2017 年 1 月 26 日, 札幌

松下健二

長生きを享受するための口腔の重要性.

広島大学歯学部歯周病学特別講義, 2016 年 11 月 21 日, 広島.

松下健二

歯周病病因論の新展開: 上皮バリア破綻による慢性炎症の発症とその制御の可能性.

広島大学歯学部大学院セミナー, 2016 年 11 月 21 日, 広島.

2. 国際学会発表

Ayuko T, Kenji M, Satoru H, Yasushi F, Yasunori S

Bactericidal effects of 310 nm ultraviolet light-emitting-diode Irradiation on oral bacteria.

Annual Meeting of American Academy of Periodontology. Sep 12, 2016, San Diego, USA.

Suma S, Watanabe Y, Arai H, Matsushita K, Sakurai T, Hirano H, Edahiro A, Ohara Y

Differential factors affect the appetite in AD and MCI patients.

The 12th International Conference of Asian Academy of Preventive Dentistry, May 27, 2016, Tokyo

3. 国内学会発表

須磨紫乃、古田美智子、竹内研時、富岡未記子、岩佐康行、山下喜久
口腔内湿潤度が肺炎発症に及ぼす影響.

日本疫学会学術総会, 2017 年 1 月 27 日, 甲府.

本川佳子、安田純、枝広あや子、白部麻樹、田中弥生、平野浩彦、渡邊 裕
要介護高齢者の転帰と栄養関連指標の関係 ～特別養護老人ホームにおける長期観察研究～.

第 32 回日本静脈経腸栄養学会学術集会, 2017 年 2 月 23-24 日, 岡山.

多田浩之、沼崎研人、西岡貴志、松下健二、高田春比古

歯周病関連細菌による好中球の neutrophil extracellular traps 産生を介した炎症反応の誘導.

第 22 回 日本エンドトキシン・自然免疫研究会, 2016 年 12 月 2 日, 鹿児島.

王 静舒、山田きよ子、指宿敦子、金蔵拓郎、松下健二

高濃度グルコース局所塗布による皮膚損傷改善の分子メカニズム：皮膚バリア分子 Filaggrin および Claudin-1 発現誘導.

第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日, 横浜.

山田きよ子、王 静舒、指宿敦子、松下健二、金蔵拓郎

高濃度グルコース局所塗布による Claudin-1 および Filaggrin の発現誘導：皮膚バリア修復による炎症改善の可能性.

The 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Dermatoallergy and Contact Dermatitis, 2016 年 11 月 5 日-6 日, 東京.

沼崎研人、西岡貴志、松下健二、多田浩之

Fusobacterium nucleatum によるヒト好中球からの neutrophil extracellular traps 誘導.

第 58 回 歯科基礎医学会学術大会, 2016 年 8 月 25 日, 札幌.

須磨紫乃、渡邊 裕、松下健二、森下志穂、小原由紀、白部麻樹、本川佳子、枝広あや子、平野浩彦

アルツハイマー型認知症 (AD) と軽度認知機能障害 (MCI) の特性の比較検討.

日本老年歯科医学会 第 27 回総会・学術大会, 2016 年 6 月 18 日, 徳島.

4. その他、セミナー等

渡邊 裕

オーラルフレイルに口腔・栄養・運動への複合的介入.

Medical Tribune, Vol.50 No.7, 2017 年 3 月 2 日

III. 競争的資金獲得実績

1. 厚生労働省

なし

2. 文部科学省

松下健二 (代表) 367 万円 (総額 387 万円)

平成 28 年度科学研究助成事業 (基盤研究 B)

アルツハイマー病の病態増悪に関与する歯周病分子機構の解明

松下健二 (分担) 20 万円

平成 28 年度科学研究助成事業 (基盤研究 B)

「食」を契機とする在宅療養高齢者の生活支援モデルの構築

松下健二 (分担) 10 万円

平成 28 年度科学研究助成事業 (基盤研究 C)

歯周病原細菌によるマスト細胞の IL-31 を基軸とした歯肉上皮バリア破綻機序の解明

四釜洋介（代表）120 万円

平成 28 年度科学研究助成事業（研究活動スタート支援）

シェーグレン症候群の病態に対する食事由来の脂質の影響：新規治療法の確立にむけて

3. 財団、その他

四釜洋介（代表）25 万円

公益財団法人金原一郎記念医学医療振興財団 第 31 回研究交流助成金

老化機構研究部

(1) 構成員

部長 丸山 光生

室長

代謝研究室 山越 貴水

免疫研究室 杉本 昌隆

流動・研究開発研究員

岩下 雄二 (～12 月)

玻名城 隼

保田 朋波流 (2 月～)

三河 隆太

金 湘殷

坂本 明彦

特任研究員

川口 耕一郎 (7 月～)

外来研究員

赤津 裕康

客員研究員

石神 昭人 山田 潤

島田 順一 勝見 章

本山 昇 南山 誠

研究生

石澤 和也 新井 聡

桐浴 隆嘉 城内 健太

森田 悠治 駒野 悠太

研究補助員・事務補助員

岡山美和子 長坂 真有

松井 直美 木村 広美

飯田 万由 太田 祐子

山田あかね 近藤 麻衣

矢田 智子 (～9 月)

十鳥 タ子 (10 月～)

(2) 平成 28 年度研究活動の概要

代謝、免疫室長グループに部長グループを加えて、それぞれのミッションで加齢に伴って変化する生体機能や老化のメカニズムについて、分子、細胞、組織、個体レベルでの基礎研究を進めることができた。今年度は研究員レベルでの新旧メンバーの交替も多く、新たな体制作りの一年でもあったが、具体的に以下のような成果を示すことができた。①Ziz2 遺伝子欠損マウス(KO)における腹腔内 B-1 細胞の機能の変化に注目し、Ziz ファミリー遺伝子と IgM 自然抗体産生、維持と細菌感染に対する生体防御の関係を解析した。②細胞老化関連遺伝子 TARSH/Abi3bp の細胞増殖と肺組織恒常性における機能解析を行い、TARSH KO マウスでは中高年にあたる肺の弾性指標が対照群に比べて低値を示し、TARSH が肺機能の恒常性に関与する知見を得た。③代謝研究室では老化に伴い生じる口腔乾燥症状の原因について、老齢マウスを用いて老化により唾液腺の一つである顎下腺において新たなムチンが発現することやシアロ糖鎖をもつムチンの割合が増えることを示唆する結果を見出した。④免疫研究室では呼吸器の加齢性変化が疾患に及ぼす影響について、細胞老化の視点から解明を目指し、気腫や転移性肺癌などの動物モデルを確立し、老化細胞を除去したときの病態の変化について解析した。

部長グループ：丸山光生、坂本明彦、川口耕一郎、保田 朋波流
加齢に伴う免疫機能低下の分子機構の解明に関する研究

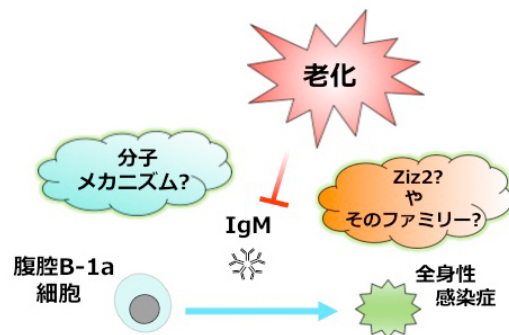
研究目的と背景

老化に伴う免疫機能低下が高齢者の抱え込む多くの疾患の罹患率や経過、予後とどのように関わっているかが高齢社会の抱える喫緊の課題の一つにもなっている。近年、高齢者の健康寿命の延伸につながる生体機能の維持については感染症を含む各種疾患との関連性だけに言及しても、獲得免疫系、自然免疫系が相互的に機能することで腸管粘膜免疫系が注目されている。具体的にはこうした生体内の種々の免疫系に特異的な細胞集団やその細胞が発現する遺伝子や分泌するサイトカインの変化からそのメカニズムを検討し、高齢者の免疫力維持、さらには栄養介入を視野に入れた腸管免疫の加齢変化と生体防御機能の改善に関する基礎研究を推進する事は健全な高齢化社会を築く上でも不可欠な研究と位置づけている。

研究結果と考察

今年度は食品素材が個体老化に伴う生体機能低下、とりわけ免疫老化に与える影響に関する研究とこれまでより注目している新規グアニンヌクレオチド交換因子(GEF)であり、T細胞依存的抗原刺激後のマウス脾臓胚中心成熟 B リンパ球で高発現する免疫老化関連遺伝子として我々が同定した Zizimin2(Ziz2) 遺伝子の分子機能を免疫老化との関連を中心に解明した。食品素材を用いた研究ではマウスの自然加齢に伴う炎症

反応に与える影響について、老齢、若齢(16ヶ月齢、1ヶ月齢)C57BL/6 マウスに、長期間に及ぶ食品素材の摂取後の血中炎症性サイトカイン等をバイオブレックスにて網羅的に解析し、脾細胞の炎症性サイトカインの発現が老齢マウスは標準食群で若齢マウスに比べて有意に高くなったが、食品成分摂取で若齢マウスと同じ程度に抑制されていた。一方、Ziz2 遺伝子欠損マウス(KO)、さらには Ziz2,3 遺伝子欠損マウス(ZizDKO)を用いた個体老化、とりわけ免疫老化との関連に注目し、すでに論文化した辺縁帯 B 細胞と同様の T 細胞非依存的免疫応答に深く関与する腹腔内 B1a B 細胞に注目した。結果、Ziz2、ZizDKO マウスとも B1a B 細胞集団の IgM 抗体産生能に減少傾向が見られたことから、Ziz2 遺伝子が自身の発現変化することで、高齢者を患わず細菌感染症等に対する自然抗体の産生能を免疫応答制御の一部に関与している可能性を示唆する結果を得ることができた。



(図) 加齢に伴う腹腔B1a細胞の機能低下とZiz2の関係

部長グループ：丸山光生、杉本昌隆、玻名城隼、金 湘殷
細胞老化関連遺伝子の個体老化における生理的意義に関する研究

研究目的と背景

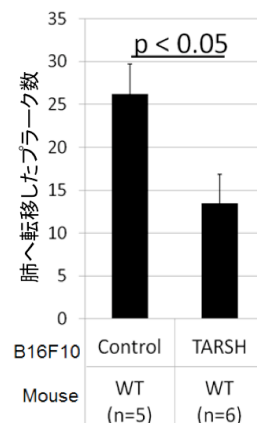
私たちの体を構成する細胞の分裂回数には寿命があり、細胞老化と呼ばれる不可逆的な増殖停止状態に陥ることが知られている。生理学的には p53 をはじめとするがん抑制遺伝子の機能そのものが細胞増殖、細胞老化や細胞周期の停止と関連づける報告も多く、細胞のがん化と細胞老化には共通した細胞の増殖調節機構が関与している可能性が示唆されている。本研究ではこうした細胞老化と個体老化との関連も含め、マウス胚性繊維芽細胞(MEFs)の継代培養から細胞老化早期に一過的に強発現する細胞老化関連遺伝子として同定した TARSH (target of NESH/Abi3bp) タンパク質の増殖、転移能等を含めた癌抑制メカニズムにおける役割を明らかにし、細胞老化と個体老化を絡めた生体内での生理的意義を明らかにすることを目的としている。今年度は特に TARSH/Abi3bp の細胞増殖と肺組織恒常性における機能を中心に考察した。

研究結果と考察

TARSH は NESH の SH3 ドメインに会合する分子として単離され、ヒト及びマウス TARSH 遺伝子は正常肺特異的に発現すること、がんや悪性甲状腺がんの患者で顕著な発現低下を示すことが報告されている。一方で、TARSH 遺伝子の発現を抑制した MEF は細胞増殖能が低下し、p53 依存的なアポトーシス経路の活性化を示すことから、TARSH

が細胞老化のみならずがん化にも関与する分子であることが我々の手によって示唆されてきた。今年度はまず TARSH が関連する細胞増殖能の解析に TARSH を過剰発現させた B16F10 メラノーマ細胞株を樹立し、対照株と比較して細胞増殖が低下したことを確認した。また過剰発現させた B16F10 メラノーマ細胞株をマウス尾静脈より移入して転移能と TARSH の発現との関連を解析したところ、こちらも対照群に比べ肺への転移癌の生着率に有意な減少が確認できた(図)。

さらに TARSH の生理的機能と個体老化との関連を明らかにする目的で一般に老化とともに高くなる TARSH 遺伝子欠損マウスにおける肺の静的肺コンプライアンスを解析したところ、ヒトで中年にあたる 12 ヶ月齢肺の弾性を示す値が野生型マウスと比較



して、明らかに低い値を示すことを見いだした。今後は TARSH の肺での発現細胞の同定を含めてさらに生理的個体老化との関連を解析する。加齢に伴う TARSH の発現が、肺組織ホメオスタシスの維持と関連し得ることを彷彿とさせる。

代謝研究室：山越貴水、飯田万由、木村広美

口腔乾燥症状の原因究明に関する基礎研究

高齢者の多くは口腔乾燥症状（ドライマウス）を示すことが様々な研究により明らかになっている。口腔乾燥症状は高齢者のQOLを低下させるだけでなく、口腔乾燥症を背景とする口腔内汚染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、老化に伴い生じる口腔乾燥症状の原因についてはあまりよく分かっていない。

私達は、老齢マウスを用いた前年度の研究結果から、老化により唾液腺の一つである顎下腺において新たなムチンが発現することやシアロ糖鎖をもつムチンの割合が増えることを示唆するデータを得た。ムチンは高分子糖蛋白質の一つで取り扱いが難しく、他の巨大な糖蛋白質と分離するための方法である分子マトリクス電気泳動（SMME）の条件設定にも難航したことから、今年度、新たにマウスの個体数を増やしてムチンの発現とムチン糖鎖解析に関する再現性を確かめた。その結果、前年度の解析結果と同様、老齢マウス由来のサンプルから、酸性ムチンが泳動される位置に老化特異的なバンドが確認され、このバンドからムチン型糖鎖が検出された。従って、老化により、マウスの顎下腺では、新たな酸性ムチンが発現すると考えら

れる。そこで、老化により新たに発現すると考えられるムチンのコア蛋白質の同定を試みるべく qPCR によるムチン遺伝子の発現解析を行い8遺伝子にまで絞り込み、SMMEにより作製したメンブレンを用いて候補となるムチンを認識する抗体によりブロットした。現在までのところ、ムチンの種類を特定できていないが、今後、ムチン抗体の種類を増やすなどして老化により新たに発現するムチンを特定する予定である。また、今回の糖鎖解析結果から、老化によりマウス顎下腺ムチンのシアロ糖鎖が増えることの再現性が得られた。そこで、糖鎖構造を推測し、働いている可能性のあるシアル酸転移酵素遺伝子の発現レベルについて調べたところ、幾つかのシアル酸転移酵素遺伝子の発現が老齢マウスにおいて有意に上昇していた。このことから、老化により、幾つかのシアル酸転移酵素遺伝子の発現が上昇することによってシアロ糖鎖をもつムチンの割合が増えるものと考えられる。

以上のことから、老化により顎下腺で起こる変化が、口腔乾燥症状の大きな特徴の一つとして知られる唾液粘性増加の原因となっていることが示唆された。

免疫研究室：杉本昌隆、三河隆太

呼吸器の加齢性変化と疾患メカニズムに関する研究

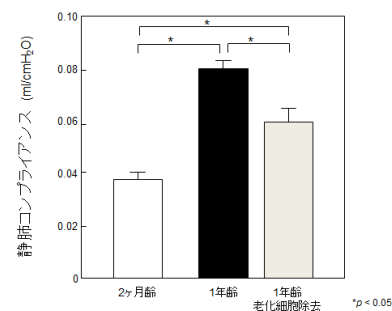
ヒトを含む哺乳動物の殆どの体細胞は、ストレスを受けると細胞老化と呼ばれる恒久的な細胞増殖停止状態に陥る。細胞老化は、生体において細胞老化は極めて重要な癌抑制機構として機能することが明らかになっているが、一方で個体の老化現象に細胞老化がどのように関与するのかについては不明な点が多く残されている。しかしながら近年、細胞老化が加齢に伴って生じる生体機能の変化に関与する可能性が指摘され、改めて細胞老化と個体老化との関連が注目を浴びている。

細胞老化を起こした細胞（老化細胞）は、増殖停止とともに SASP（senescence- associated secretory phenotype）と呼ばれる、特異的な分泌表現型を示す。現在では SASP を介した老化細胞の細胞非自律的機能が加齢に伴う生体機能の変化に関与すると考えられている。

平成 28 年度に本研究室は、独自に樹立した老化細胞除去マウスを用いて、呼吸器の加齢性変化に細胞老化が関与することを報告した（参考文献）。肺組織は加齢により組織弾性を失い、その結果 1 秒量（FEV1）の低下が起こる。しかし老齢個体の肺組織から老化細胞を排除すると、組織弾性の顕著な回復が見られることから（図）、細胞老化が肺組織の老化に重要な役割

を持つことが強く示唆された。

図. 老化細胞除去による肺組織弾性の回復



肺組織の老化は、気腫や癌など様々な呼吸器疾患のリスクを増大させるが、その機構に関しては不明な点が多く残されている。そこで本年度は、呼吸器の加齢性変化が疾患に及ぼす影響について、細胞老化の視点から解明を目指し、気腫や転移性肺癌などの動物モデルを確立し、老化細胞を除去したときの病態の変化について解析を開始した。次年度以降も引き続き解析を進め、細胞老化が呼吸器疾患の有効な治療標的となるのか調べる。

参考文献

Hashimoto M, et al., Elimination of p19^{ARF}-expressing cells enhances pulmonary function in mice. **JCI insight** 1: e88057. 2016.

研究業績（老化機構研究部）

I. 論文発表

1. 原著

Vandenberg CJ, Motoyama N, Cory S
FoxO3 suppresses Myc-driven lymphomagenesis.
Cell Death Dis, 2016; 6:e2046.

Gokare P, Navaraj A, Zhang S, Motoyama N, Sung SS, Finnberg NK
Targeting of Chk2 as a countermeasure to dose-limiting toxicity triggered by
topoisomerase-II (TOP2) poisons.
Oncotarget, 2016; 7(20): 29520-29530.

Sakamoto A, Tsukamoto T, Furutani Y, Sudo Y, Shimada K, Tomita A, Kiyoi H,
Kato T, Funatsu T
Live-cell single-molecule imaging of the cytokine receptor MPL for analysis of
dynamic dimerization.
J Mol Cell Biol, 2016 doi: 10.1093/jmcb/mjw027.

Hashimoto M, Asai A, Kawagishi H, Mikawa R, Iwashita Y, Kanayama K,
Sugimoto K, Sato T, Maruyama M, Sugimoto M
Elimination of p19^{ARF}-expressing cells enhances pulmonary function in mice.
JCI insight 1: e88057. 2016.

Takagi Y, Shimada K, Shimada S, Sakamoto A, Naoe T, Nakamura S, Hayakawa
F, Tomita A, Kiyoi H
SPIB is a novel prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma that mediates
apoptosis via the PI3K-AKT pathway.
Cancer Sci, 2016, doi: 10.1111/cas.13001.

Yamada J, Ueno M, Toda M, Shinomiya K, Sotozono C, Kinoshita S, Hamuro J
Allogeneic Sensitization and Tolerance Induction After Corneal Endothelial Cell
Transplantation in Mice.
Invest Ophthalmol Vis Sci. 2016, 57(11):4572-4580.

Toda M, Ueno M, Yamada J, Hiraga A, Tanaka H, Schlzer-Schrehardt U, Sotozono C, Kinoshita S, Hamuro J
The Different Binding Properties of Cultured Human Corneal Endothelial Cell Subpopulations to Descemet's Membrane Components.
Invest Ophthalmol Vis Sci. 2016, 57(11): 4599-4605.

Wizeman JW, Nicholas AP, Ishigami A, Mohan R
Citrullination of Glial Intermediate Filaments is an Early Response in Retinal Injury. **Mol. Vis.** 22, 1137-1155 (2016)

Lee KM, Lee Y, Chun HJ, Kim AH, Kim JY, Lee JY, Ishigami A, Lee J
Neuroprotective and anti-inflammatory effects of morin in a murine model of Parkinson's disease. doi: 10.1002/jnr.23764.

Masutomi H, Kawashima S, Kondo Y, Uchida Y, Jang B, Choi EK, Kim YS, Shimokado K, Ishigami A
Induction of peptidylarginine deiminase 2 and 3 by dibutyryl cAMP via cAMP-PKA signaling in human astrocytoma U-251MG cells.
J Neurosci Res. 2016 doi: 10.1002/jnr.23959.

Yamawaki T, Ito E, Mukai A, Ueno M, Yamada J, Sotozono C, Kinoshita S, Hamuro J
The Ingenious Interactions Between Macrophages and Functionally Plastic Retinal Pigment Epithelium Cells.
Invest Ophthalmol Vis Sci. 2016, 57(14):5945-5953.

Aoki T, Shimada K, Sakamoto A, Sugimoto K, Morishita T, Kojima Y, Shimada S, Kato S, Iriyama C, Kuno S, Harada Y, Tomita A, Hayakawa F, Kiyoi H
Emetine elicits apoptosis of intractable B-cell lymphoma cells with MYC rearrangement through inhibition of glycolytic metabolism
Oncotarget 2016, doi: 10.18632/oncotarget.14393

Shuto T, Kamei S, Nohara H, Fujikawa H, Tasaki Y, Sugahara T, Ono T, Matsumoto C, Sakaguchi Y, Maruta K, Nakashima R, Kawakami T, Suico MA, Kondo Y, Ishigami A, Takeo T, Tanaka KI, Watanabe H, Nakagata N, Uchimura K,

Kitamura K, Li JD, Kai H

Pharmacological and genetic reappraisals of protease and oxidative stress pathways in a mouse model of obstructive lung diseases.

Sci Rep. 2016, 6:39305. doi: 10.1038/srep39305.

Koizumi M, Kondo Y, Isaka A, Ishigami A, Suzuki E

Vitamin C impacts anxiety-like behavior and stress-induced anorexia relative to social environment in SMP30/GNL knockout mice.

Nutr Res. 2016. 36(12):1379-1391.

Okada S, Shimada J, Kato D, Tsunetzuka H, Inoue M.

Prolonged air leak following lobectomy can be predicted in lung cancer patients.

Surg Today. 2017. doi: 10.1007/s00595-016-1467-5.

Sase T, Arito M, Onodera H, Omoteyama K, Kurokawa MS, Kagami Y, Ishigami A, Tanaka Y, Kato T

Hypoxia-induced production of peptidylarginine deiminases and citrullinated proteins in malignant glioma cells.

Biochem Biophys Res Commun. 2017, 482(1):50-56.

Sato Y, Uchida E, Aoki H, Hanamura T, Nagamine K, Kato H, Koizumi T, Ishigami A

Acerola (Malpighia emarginata DC.) Juice Intake Suppresses UVB-Induced Skin Pigmentation in SMP30/GNL Knockout Hairless Mice.

PLoS One. 2017, 12(1):e0170438.

Umeda N, Matsumoto I, Tanaka Y, Kawaguchi H, Ebe H, Kagami Y, Ishigami A, Sumida T

Anti-cyclic citrullinated glucose-6-phosphate isomerase peptide -7 (CCG-7) antibodies were suppressed by biologics treatment and deposited to citrullinated proteins in CD68-positive cells in the RA synovium.

Mod Rheumatol. 2017 Jan 4:1-7.

Okada S, Shimada J, Kato D, Tsunetzuka H, Inoue M.

Prolonged air leak following lobectomy can be predicted in lung cancer patients.

Surg Today. 2017 Jan 13. doi: 10.1007/s00595-016-1467-5.

Kunimura Y, Iwata K, Ishigami A, Ozawa H

Age-related alterations in hypothalamic kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin neurons and in pulsatile LH release in female and male rats.

Neurobiol Aging. 2017, 50:30-38.

Okada S, Shimada J, Ito K, Ishii T, Oshiumi K.

Surface-processing technology of a microgrooving and water-repellent coating improves the fusion potential of an ultrasonic energy device.

Surg Endosc 2017; 31, 887-893

Amano A, Kondo Y, Noda Y, Ohta M, Kawanishi N, Machida S, Mitsunashi K, Senmaru T, Fukui M, Takaoka O, Mori T, Kitawaki J, Ono M, Saibara T, Obayashi H, Ishigami A

Abnormal lipid/lipoprotein metabolism and high plasma testosterone levels in male but not female aromatase-knockout mice.

Arch. Biochem. Biophys. 2017, S0003-9861(17)30177-30177

2. 総説

山越 貴水

細胞老化と慢性炎症

日本老年医学会雑誌, 53 (2), 88-94, 2016.

3. 著書、Chapters

杉本昌隆、丸山光生（日本語共訳）

ハリソン内科学 第5版脳と栄養. 加齢医学 老化の生物学

福井次矢・黒川 清 監修, メディカルサイエンスインターナショナル, 94e, 465, 2017.

丸山光生

総論Ⅱ 高齢者の易感染性 加齢に伴う生体防御機構の変動

高齢者感染症 長高齢社会の課題と特徴、光山正雄（編）、医薬ジャーナル社、p59-68、2016

玻名城隼、丸山光生

2016 Cold Spring Harbor Laboratory Mechanism of Aging Meeting 参加報告記

基礎老化研究 41 (1) ; 37-38 , 2017

4. その他

なし

5. 新聞・報道, 等

なし

6. 特許申請、取得状況

なし

II. 学会・研究会等発表

1. シンポジウム、特別講演

Sugimoto M

Pathophysiological roles of p19ARF in pulmonary aging.

第 39 回日本分子生物学会年会シンポジウム, 2016 年 11 月 30 日, 横浜

杉本昌隆

呼吸器の加齢性変化における癌抑制タンパク質 ARF の役割

第 9 回 Symphony, 2016 年 9 月 18 日, 東京

Maruyama M

Immunosenescence-related gene Zizimin2(Dock11) and its family.

The Second ICAH-NCGG Symposium, 15 Apr, 2016, Taipei

Sugimoto T

Pathophysiological roles of senescent cells in pulmonary organ.

The Second ICAH-NCGG Symposium, 15 Apr, 2016, Taipei

Maruyama M

Zizimin2 and Immunosenescence.

2016 Spring International Conference of the Korean Society for Gerontology,

16 Jun, 2016, Korea

Yamakoshi K

Dysregulation of the Bmi-1/p16Ink4a pathway provokes an aging-associated decline of submandibular gland function.

2016 Spring International Conference of the Korean Society for Gerontology, 16 Jun, 2016, Korea

Ishigami, A

Citrullinated glial fibrillary acidic protein in Alzheimer's diseased brains.

2016 Spring International Conference of the Korean Society for Gerontology and the 15th Korea-Japan Gerontologist Joint Meeting, 16 Jun, 2016, Korea

Maruyama M

Standing on the bridge toward the gerontology from immunology

Symposium "New Scales", November 4, 2016, Berlin, Germany

Maruyama M

Cellular senescence and aging research from the standpoint of host defense or immune system. 丸の内 MY PLAZA ホール 2016 年 11 月 17 日

丸山光生

免疫系からみた健康長寿をめざす基礎老化研究の取り組み

東京理科大 TRRC シンポジウム 2017 年 1 月 21 日 東京

Maruyama M、Sakamoto A

Concomitant deletion of Zizimin2 and 3 for mimicking impaired protective immunity against pneumococcal infection in aged mice.

Asian Society for Aging Research Symposium2017. 2 March 2017, Sapporo

2. 国際学会発表

Yamawaki T, Yamada J, Ito E, Kinoshita S, Sotozono C, Hamuro J

Inflammatory vicious cycle between retinal pigment epithelium (RPE) and macrophages reduces the phagocytic function of RPE

88th Annual meeting of the ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology), 1 May, 2016, Seattle

Yamada J, Ueno M, Toda M, Shinomiya K, Sotozono C, Kinoshita S, Hamuro

J Allogeneic sensitization and tolerance induction post corneal endothelial cell injection into the anterior chamber. 88th Annual meeting of the ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology), 4 May, 2016, Seattle

Kondo Y, Kasahara Y, Ishigami A
SMP30/SOD1-double knockout mice manifest increased oxidative stress, hepatic steatosis, and premature death.
The American Aging Association's 45st Annual Meeting, 2-5 Jun, 2016, Seattle

Amano A, Kondo Y, Kasahara Y, Ishigami A.
Disruption of Cyp19 gene leads to hepatic steatosis in male aromatase-knockout mice. The American Aging Association's 45st Annual Meeting, 2-5 Jun, 2016, Seattle

Matsuda T, Zou C, Takaoka A, Maruyama M
Putative physiological function of Zizimin2 and immunosenescence
Cell Symposia Aging and Metabolism, 11 July, 2016, Sitges, Spain

Matsuda T, Zou C, Hanashiro J, Sakamoto A, Sugimoto M, Takaoka A, Maruyama M
Gene regulation of Zizimin2 and its impact on immunosenescence
Cold Spring Harbor Laboratory Meeting (Mechanism of Aging), 27 SEP, 2016, Cold Spring Harbor, NY, USA

Iwashita Y, Sugimoto M, Maruyama M
Exploration and functional analysis of cellular senescence-associated long non-coding RNAs Cold Spring Harbor Laboratory Meeting (Mechanism of Aging), 27 SEP, 2016, Cold Spring Harbor, NY, USA

Aoki T, Shimada K, Sakamoto A, Sugimoto K, Morishita T, Kojima Y, Shimada S, Kato S, Iriyama C, Kuno S, Harada Y, Nakamura S, Tomita A, Hayakawa F, Kiyoi H
Emetine elicits apoptosis of intractable B-cell lymphoma cells with MYC rearrangement through inhibition of glycolytic metabolism 58th ASH Annual Meeting. Dec 4, 2016. San Diego, CA, USA

Maruyama M, Sakamoto A, Matsuda T

Both Zizimin2 and 3 double knockout mouse represents impaired protective immunity against pneumococcal infection with immunosenescence.

The Scripps Research Institute, 23 Jan 2017, Florida, U.S.A.

Shimada J

Surgical Equipments for Uniportal VATS: Novel Curved Porous Polyethylene Dissector with Surgical Smoke Evacuation System and Mirror Surface Forceps ASCVTS2017 SEOUL The25 Annual Meeting of the Asian Society for Cardiovascular and Thoracic Surgery, Mar 24,2017, Seoul

Shimada J

Continuous Education Using E-learning System for Women Thoracic Surgeons on Maternity Leave ASCVTS2017 SEOUL The25 Annual Meeting of the Asian Society for Cardiovascular and Thoracic Surgery, Mar 24,2017, Seoul

Shimada J

Uniportal Video Assisted Thoracoscopic Lobectomy Using Mirror Surface Forceps and Porous Polyethylene Tip Dissector during Dissecting Pulmonary Vessels ASCVTS2017 SEOUL The25 Annual Meeting of the Asian Society for Cardiovascular and Thoracic Surgery, Mar 24,2017, Seoul

Shimada J

Successful Treatment with Afatinib for Pancreatic Metastasis from Lung Adenocarcinoma: A Case Report
ASCVTS2017 SEOUL The25 Annual Meeting of the Asian Society for Cardiovascular and Thoracic Surgery, Mar 24,2017, Seoul

3. 国内学会発表

山脇敬博、伊東瑛子、山田潤、木下茂、外園千恵、羽室淳爾
加齢黄斑変性における炎症増悪と、RPE 機能変性についての検討
第 120 回日本眼科学会総会、2016 年 4 月 7 日、仙台市

高橋経太、柳井修一、下門顕太郎、石神昭人

コーヒーの摂取が老化に及ぼす影響.

第 70 回日本栄養・食糧学会, 2016 年 5 月 13-15 日, 神戸

天野晶子、近藤嘉高、石神昭人

シトルリン化タンパク質を検出する臨床検査試薬の開発.

TOBIRA 第 5 回研究交流フォーラム, 2016 年 5 月 23 日, 東京

近藤嘉高、増富裕文、野田義博、小澤裕介、高橋経太、半田節子、丸山直記、
清水孝彦、石神昭人

ダブルノックアウトマウスは酸化ストレスが増加して脂肪肝を呈する.

日本基礎老化学会第 39 回大会, 2016 年 5 月 27-28 日, 神奈川

天野晶子、近藤嘉高、野田義博、町田修一、尾林博、石神昭人

エストロゲン合成酵素であるアロマターゼ (Cyp19) の遺伝子欠損による脂質代謝への影響.

日本基礎老化学会第 39 回大会, 2016 年 5 月 27-28 日, 神奈川

岩下雄二、杉本昌隆、丸山光生

細胞老化関連 long non-coding RNAs の探索と機能解析

第 39 回日本基礎老化学会大会, 2016 年 5 月 28 日、伊勢原市

丸山光生

一般口演 14 免疫・炎症・血管 座長

第 16 回日本抗加齢医学会総会, 2016 年 6 月 11 日、横浜市

河島早紀、永田喜三郎、吉田雅幸、斉藤紀克、大澤肇、栗田克己、石神昭人
経皮吸収したビタミン C による紫外線 (UVB) 細胞傷害の抑制効果.

日本ビタミン学会第 68 回大会, 2016 年 6 月 17-18 日, 富山

國村有弓、岩田衣世、石神昭人、小澤一史

雌雄ラットの加齢に伴う LH パルス分泌機構の変化

第 33 回内分泌代謝学サマーセミナー, 2016 年 7 月 9-11 日、福岡

Masutomi H, Kawashima S, Shimokado K, Ishigami A

Dibutyryl-cAMP induced PAD expressions via PKA pathway in human astrocytoma U-251MG cells.

第 39 回日本神経科学大会、パシフィコ横浜、神奈川、2016 年 7 月 20-22 日

國村有弓、岩田衣世、石神昭人、小澤一史

雌雄ラットにおける LH パルス分泌機構の加齢変化

第 109 回日本繁殖生物学会大会、麻布大学、神奈川、2016 年 9 月 12-15 日

天野晶子、近藤嘉高、野田義博、町田修一、尾林博、石神昭人

アロマターゼノックアウトマウスを用いたエストロゲン欠乏が肝臓での脂質代謝に及ぼす影響

第 89 回日本生化学会大会、仙台、2016 年 9 月 25 日

河島早紀、永田喜三郎、佐藤安則、吉田雅幸、石神昭人

ヒト培養表皮を用いた紫外線照射による細胞傷害に対するビタミン C の効果

第 89 回日本生化学会大会、仙台、2016 年 9 月 25 日

成田昂平、近藤嘉高、増富裕文、吉田雅幸、石神昭人

マウス骨格筋でのペプチジルアルギニンデアミナーゼ 2 (PAD2) の局在性

第 89 回日本生化学会大会、仙台、2016 年 9 月 25 日

近藤嘉高、石神昭人

SOD1 欠損とアスコルビン酸不足が脂質代謝に及ぼす影響

フォーラム：加齢性疾患とスーパーオキシドジスムターゼ (SOD)

第 89 回日本生化学会大会、仙台、2016 年 9 月 27 日

滝沢晶子、天野晶子、町田修一、相垣敏郎、石神昭人

ビタミン C 合成不全マウスを用いたビタミン C の欠乏が骨格筋に及ぼす影響

第 89 回日本生化学会大会、仙台、2016 年 9 月 27 日

青木 智広、島田 和之、坂本 明彦、森下 喬允、早川 文彦、富田 章裕、清井 仁

糖代謝の抑制が myc 陽性 DLBCL 腫瘍のアポトーシスを誘導する

第 75 回日本癌学会学術総会、横浜、2016 年 10 月 7 日

南山 誠

気管腕頭動脈ろう回避の内科的試み

第 3 回筋ジストロフィー医療研究会、2016 年 10 月 14 日、名古屋

國村有弓、岩田衣世、石神昭人、小澤一史

雌雄ラットにおける加齢による LH パルス分泌機構の変化

第 43 回日本神経内分泌学会学術集会、浜松、2016 年 10 月 14-15 日

青木 智広、島田 和之、坂本 明彦、森下 喬允、原田 靖彦、入山 智沙子、
早川 文彦、富田 章裕、清井 仁

Discovering the novel drug targeting tumor-microenvironment for intractable lymphoma

第 78 回日本血液学会学術集会、横浜、2016 年 10 月 15 日

石神昭人、河島早紀

ヒト培養表皮を用いた紫外線傷害に対するビタミン C の効果

第 151 回ビタミン C 研究委員会、東京、2016 年 10 月 29 日

滝沢晶子、相垣敏郎、石神昭人

ビタミン C の欠乏が骨格筋に及ぼす影響

首都大バイオコンファレンス 2016、東京、2016 年 11 月 18 日

近藤嘉高、成田昂平、石神昭人

新規に開発した抗化学修飾シトルリン化モノクローナル抗体を用いた脳におけるシトルリン化タンパク質の検出

第 39 回 日本分子生物学会年会、横浜、2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日

河島早紀、永田喜三郎、佐藤安訓、吉田雅幸、石神昭人

ヒト培養表皮を用いた紫外線照射によるビタミン C の細胞傷害抑制効果

第 39 回 日本分子生物学会年会、横浜、2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日

成田昂平、近藤嘉高、増富裕文、吉田雅幸、石神昭人

マウス骨格筋におけるペプチジルアルギニンデアミナーゼ 2 (PAD2) の生化学的解析 第 39 回日本分子生物学会年会、横浜、2016 年 11 月 30 日

Iwashita Y, Sugimoto M, Maruyama M

Exploration and functional analysis of cellular senescence-associated long non-coding RNAs

第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月 1 日、横浜

坂本 明彦、玻名城 隼、高岡 晃教、丸山 光生

Concomitant deletion of Zizimin2/3 for mimicking impaired protective immunity in aged mice

第 45 回日本免疫学会学術集会、2016 年 12 月 5 日、沖縄

玻名城 隼、坂本 明彦、丸山 光生

The murine immunosenescence-associated gene Zizimin2 promoter region and its transcriptional regulation with aging

第 45 回日本免疫学会学術集会、2016 年 12 月 6 日、沖縄

島田順一、阿部かおり、古谷 竜男、岡田 悟、常塚 啓彰、加藤 大志朗、井上匡美

Uniportal VATS 用の手術器具：湾曲型吸引付き剥離子と強弯ミラー鉗子の開発
第 29 回 日本内視鏡外科学会、2016 年 12 月 10 日 横浜

4. その他、セミナー等

Ishigami, A

Abnormal protein citrullination in Alzheimer's disease.

11th Asia-Pacific Microscopy Conference (APMC11) INVITED SYMPOSIUM:
A-8 Cognitive Science, 23-27 May, 2016, Phuket, Thailand

杉本昌隆

Rejuvenation of pulmonary organ by eliminating ARF-expressing senescent cells (呼吸器の加齢性変化における細胞老化の役割)

首都大学東京、2016 年 5 月 26 日、東京都

Maruyama M

Immunosenescence related gene, Zizimin2 and its family.

Chulalongkorn University, 3 June, 2016, Bangkok, Thailand

丸山光生

B 細胞応答と免疫記憶

名古屋大学医学部講義「免疫と生体防御」2016 年 6 月 7 日、名古屋市

丸山光生

分子・細胞レベルにおける老化のしくみの解明をめざして

分子総合医学専攻 老化基礎科学講座 平成 28 年度名古屋大学大学院医学系研究科修士課程入試説明会 2016 年 6 月 25 日 名古屋市

Maruyama M

Our latest research findings in the field of ageing and immunity

Max Planck Institute of Psychiatry, 14 July, 2016, Munich, Germany

丸山光生

基礎老化研究の最前線について

大阪大学大学院医学系研究科附属最先端医療イノベーションセンター、2016 年 8 月 24 日、吹田市

丸山光生

研究所がすすめている老化研究とは

第1回NCGGサマリーサーチセミナー、2016年8月10日

岩下雄二

細胞老化関連 long non-coding RNAs の探索と機能解析

第1回NCGGサマリーサーチセミナー、2016年8月10日

三河隆太

ヒト血清におけるアミロイド β 分解活性の性状解析

第1回NCGGサマリーサーチセミナー、2016年8月10日

南山誠

遺伝性筋疾患の分子遺伝学

第 6 回鈴鹿病院夏季筋セミナー、2016 年 8 月 23 日、鈴鹿市

南山誠

デュシェンヌ型筋ジストロフィーの呼吸機能障害と心機能障害

三重県特別支援学校教職員平成 28 年度研修講座、2016 年 8 月 25 日、鈴鹿市

杉本昌隆

呼吸器の加齢性変化における癌抑制タンパク質 ARF の役割

第 9 回 Symphony、2016 年 9 月 18 日、東京

Maruyama M

Immunosenescence-related gene Zizimin2 (Dock 11) and its family

IFOM, 16 September, 2016, Milan, Italy

Maruyama M

Putative function of immunosenescence related gene, Zizimin2 (Dock11) and its family, Pasteur Institute, 19 SEP, 2016, Paris, France

丸山光生

免疫系の老化

中部大学 老化基礎医科学 第9・10時限 2016年10月6日 春日井市

丸山光生

栄養、代謝と老化

中部大学 老化基礎医科学 第9・10時限 2016年10月20日 春日井市

丸山光生

癌と老化

中部大学 老化基礎医科学 第9・10時限、2016年10月27日 春日井市

丸山光生

生体防御論

至学館大学 健康科学部栄養学科3年講義、2016年11月15日、大府市

石神昭人

ビタミンCの基礎研究から臨床応用に向けて

癌・炎症と抗酸化研究会（CIA研究会） 特別講演、大分、2016年11月26日

石神昭人

ビタミンCと生活習慣病

第14回日本機能性食品医用学会総会、東京、2016年12月1日

III. 競争的資金獲得実績

1. 日本医療研究開発機構

2. 厚生労働省

なし

3. 文部科学省

山越 貴水（代表）481 万円（総額 481 万円）

学術研究助成基金助成金(基盤研究 C(一般))

糖鎖シグナルを介した発癌防御機構の解明

杉本昌隆（代表）370 万円（総額 370 万円）

文部科学省科研費 基盤研究（C）

細胞の老化に起因する肺組織の病態解明

岩下雄二（代表）143 万円（総額 143 万円）

若手 B 研究経費

脂肪組織の老化に特異的な lncRNA の同定と発現制御による糖尿病態からの回復

丸山光生（分担）3 万円

基盤研究（C）

血管老化におけるリポキシゲナーゼの細胞内局在制御システムの役割

4. 財団、その他

杉本昌隆（代表）170 万円（総額 170 万円）

長寿科学振興財団

呼吸器の加齢性変化と疾患機序の解明

丸山光生（代表）100 万円（総額 100 万円）

不二たん白質研究振興財団

腸管免疫系の加齢変化における大豆関連成分摂取効果に関する研究

丸山光生（分担）523 万円

IFOM（分子腫瘍学財団研究所）

Epigenetics of immune dysregulation in aging.

丸山光生（代表）36.5 万円（総額 36.5 万円）

北海道大学一般共同研究

感染、炎症に対する自然免疫系の加齢変化と獲得免疫系における影響の解析

老化制御研究部

(1) 構成員

部長 今井 剛

室長

遺伝子治療研究室 中西 章

流動研究員

吉田 和央

津川 陽司

実験補助員

金森久美子

堤 元佐

ドクマイコイ

(2) 平成 28 年度研究活動の概要 要約；査読付き学術論文 1 報。

前年度に行ったセットアップもほぼ終了し、通常に研究活動ができるようになった。まだ、必要な機器は存在するが、一応実験が行えるようになった。また、研究所 4 階の老化制御研究部実験室以外の実験場所として共通実験施設が本研究所には存在する。即ち、放射線実験施設や実験動物施設等である。感染実験室も含めて、種々の申請等の業務をこなし、これら共通実験

も滞りなく行えるようになった。

また、機関内共同研究や、機関外共同研究も徐々にはじまった。

機関内共同研究としては、独自性の高い、ナノテクノロジーを用いて精製した、種々のタンパク質を「共同利用推進室 渡辺淳室長」との共同研究により同タンパク質の同定を行ったことがあげられる。

機関外共同研究としては東京工業大学小林教授との共同研究で、世界的に合成が難しいといわれるプロスタグランジン誘導体の合成を行っていたき、その解析を行っている。東京大学病院・工学部との共同研究も行っている。さらには、部長は平成 27 年度も東京医科大学客員教授・中部大学客員教授として研究・教育等を行うことになった。

また、研究テーマはとして

①新規糖代謝制御シグナル

②認知症治療に関するデリバリー担体

この 2 種の研究に関して成果が得られた。詳しい内容は後述する。

今井グループ: 津川陽司、堤元佐、ドクマイコイ、今井剛

新規糖代謝制御シグナルに関する研究

要約 ; 寝たきりの最も多い要因である骨粗鬆症の新規予防・治療法の開発につながる基盤研究が進んでいる。内在性ホルモンである PGJ2 の新規標的因子を同定・解析した。同因子遺伝子改変マウスは骨代謝異常を示した。

はじめに ; 加齢に伴う疾患で、なおかつ介護が必要な寝たきりの主な要因であるものは骨粗鬆症である。

よって、骨粗鬆症の予防・治療法の開発は極めて重要である。

足腰がしっかりしていれば、実際の年齢よりも若返ることも可能で、老化も制御できるであろう。

よって、国立長寿医療研究センター老化制御研究部としては、全てに満足のいくテーマであると考えている。

東京工業大学小林教授が合成した PGJ2 誘導体を用いて、種々の解析を行った。ちなみに、PGJ2 は標的細胞において、転写因子核内受容体 PPAR- γ に結合して、転写を制御すると考えられている。PPAR- γ 作動薬コントロールとして Rosiglitazone を用いた。Rosiglitazone は高い親和性型 PPAR- γ アゴニストとして知られており、抗糖尿病薬である。TZD 骨格化合物の一つである。他のものは武田薬品工業の Pioglitazone 等が知られている。

骨芽細胞株 MC3T3-E1 に

PPRE-luciferase vector をトランスフェクションし、Rosiglitazone、PGJ2 誘導体を加えたところ、全ての化合物において PPRE 依存的転写量の増大が見られた。PGJ2 誘導体に関してはその増大量の最も大きい物は内因性 15d-PGJ2 であり、最も小さい物を PGJ2-4 と命名した。

次に、骨芽細胞分化マーカーであるオステオカルシンの転写の解析を行った。方法は PPRE と同様に OG2-luciferase vector を MC3T3-E1 にトランスフェクションした。また、平行して、他の骨芽細胞マーカーであるアルカリフォスファターゼ活性も測定した。その結果、PPAR- γ のリガンドである Rosiglitazone は影響がなく、一方 PGJ2 誘導体は全て OG2 転写、アルカリフォスファターゼ共に有意に抑制した。よって、2つのことが判明した。一つは PGJ2 誘導体は骨芽細胞を抑制すること。もう一つは PGJ2 誘導体の骨芽細胞における標的因子は PPAR- γ ではないこと。

そこで、PGJ2 の骨芽細胞における標的因子の同定に成功した。さらには、同因子の遺伝子改変マウスを作成したところ、同マウスは予想通り骨代謝異常であった。

老化制御研究部遺伝子治療研究室：中西章、吉田和央、金森久美子

認知症治療に関するデリバリー担体の開発研究

要約；認知症用治療薬剤の血液脳関門（BBB）通過促進を目指した新規デリバリー担体開発として、BBB 通過モチーフのスクリーニングを行った。また、アルツハイマー病に対する経口ワクチン担体作成のため腸管ウイルスを利用したベクターの作製に対する基盤研究を行った。

はじめに

アルツハイマー病に対する免疫療法の治療効果改善のため、2 種のアプローチを行っている。一つは、抗 A β 抗体等の受動免疫療法の際に問題となる血液脳関門 (BBB) 透過性について、その向上を目指した BBB 通過モチーフスクリーニングの開発研究、もう一つは A β 等の能動免疫療法等の応用を目指した、粘膜免疫用の腸管ウイルスベクター開発研究である。

結果

近年の研究によりトランスフェリン受容体 (TfR) に対する抗体は BBB を効率的に通過できることが知られている。昨年度作成した新規ディスプレイプラットフォームによって提示されたランダムペプチドライブラリーを利用し、組換え TfR に結合できるペプチドモチーフをスクリーニングした。これらのモチーフより BBB 通過モチーフ候補をスクリーニングするた

め、本年度は in vitro BBB モデルを利用して、能動的な経内皮細胞輸送（トランスサイトーシス）活性を検出できる実験系を新たに開発した。この方法では、BBB 透過能が報告されている既存の抗 TfR 抗体の高いトランスサイトーシス活性を検出できるが、抗 A β 抗体など BBB を通過できないとされている抗体ではその活性がほぼ無いことを確認している。この実験系を用い昨年度単離した組換え TfR に結合するモチーフのトランスサイトーシス活性を解析し、BBB 透過モチーフ候補の最適化を行った。

養護施設等での集団感染で大きな問題となっているヒトノロウイルスは、細胞培養系が無いためにウイルス学的な種々の手法でワクチン・抗ウイルス剤開発ができない。国立感染症研究所などとの共同研究により、ノロウイルスモデルとして使用されているマウスノロウイルスのレセプターを同定した（論文発表）。この発見により、ヒトノロウイルスの培養細胞株系の開発推進が期待できる。

また、培養細胞で良く増殖するマウスノロウイルスを基本骨格としたベクター作成の為の基盤研究を行った。今年度は、ルシフェラーゼ遺伝子を挿入できるウイルスゲノム領域の特定を行い、外来遺伝子の発現を確認した。

研究業績（老化制御研究部）

I 論文発表

1. 原著

Haga K, Fujimoto A, Takai-Todaka R, Miki M, Doan YH, Murakami K, Yokoyama M, Murata K, Nakanishi A, and Katayama K.

Functional receptor molecules CD300lf and CD300ld within the CD300 family enable murine noroviruses to infect cells.

Proc.Natl.Acad.Sci.USA.113: E6248-E6255, 2016.

2 総説

該当なし

3 著書、Chapters

該当なし

4 その他、新聞・報道等

Imai T.

Editorial Board Member of International Journal of Chemistry

Reviewer of Drug Design, Development and Therapy (2013-)

Reviewer of Nanotechnology, Science and Applications (2013-)

Reviewer of Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy (2013-)

Reviewer of Journal of Receptor, Ligand and Channel Research (2013-)

Editorial Board Member of Pharmacologia (2014-2016)

Guest editor of Letters in Applied NanoBioScience

Marquis Who's Who Publication 2013, 2014, 2015, 2016

5 特許申請、取得状況

取得特許

新たに同定したインスリン分泌制御因子を用いた抗糖尿病薬剤のスクリーニング法

発明人：今井剛、半田宏

出願人：国立大学法人東京工業大学

出願番号：特願 2010-196952

開示日：2010年11月1日

出願日：平成 23 年 9 月 2 日
出願番号：特願 2012-531980
登録日：平成 28 年 2 月 12 日
特許番号：特許第 5881065 号
PCT 出願番号：PCT/JP2011/070067
国際公開番号：WO2012/029958
米国にて特許成立 2015 年 5 月 12 日
特許登録第 9109043 号(H27.8.18)
欧州（英・独）審査中

出願特許

発明者：芳賀 慧、藤本 陽、戸高玲子、片山和彦、中西 章、三木元博、関根盛、大塚浩史、三森重孝

発明の名称：ノロウイルスが増殖可能な遺伝子組換え細胞、及び、その用途

出願年月日：国際出願：2017 年 2 月 1 日

出願番号：PCT/JP2017/3539

出願人：国立感染症研究所、デンカ株式会社

(国立長寿医療研究センターも共願人として名義変更予定)

II 学会・研究会等発表

1. 国際学会招待講演

該当なし

2. 国際学会発表

Yoshida K, Takai-Todaka R, Katayama K, Nakanishi A

Functional role of Murine Noroviral VP2 during the viral life cycle

American Society for Virology June 19, 2016, Blacksburg, Virginia, USA

Nakanishi A, Yoshida K, Katayama K, Takai-Todaka R, Zhou Y

Genetic approach to examine the role of murine noroviral VP2 during the viral infectious cycle.

6th International Calicivirus Conference, Oct. 11, 2016, Savannah, Georgia, USA

3. 国内学会発表

中西 章、金森 久美子、片山 和彦、戸高 玲子、芳賀慧、藤本陽、加藤 晶子、

吉田 和央

ノロウイルスの複製複合体に集積する核膜孔タンパク質

第 37 回日本分子生物学会 2016 年 12 月 2 日 横浜

4. その他、セミナー等

該当無し

III 競争的資金獲得実績

1. 日本医療研究開発機構

中西 章（分担）140 万円

感染症実用化事業 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業
培養細胞感染系の確立されていない病原体の実験技術の開発と予防診断法に関する研究

中西 章（分担）300 万円

感染症実用化事業 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業
下痢症ウイルスの分子疫学と感染制御に関する研究

2 文部科学省

中西 章（分担）120 万円

日本学術振興会 基盤研究（B）

ヒトノロウイルス感受性細胞の樹立とレセプターの探索

津川陽司(代表) 143 万円(総額 273 万円) 平成 28 年度

文部科学省科研費 研究活動スタート支援

膵β細胞自己増殖のメカニズム解明に基づいた糖尿病治療の開発

3 財団、その他

今井 剛（主任 70 万円、総額 70 万円）

群馬大学生体調節研「内分泌・代謝学共同研究拠点」主任研究者（70 万円）Akita
マウスを用いた新規インスリン分泌制御因子の同定と創薬への応用

統合加齢神経科学研究部

(1) 構成員

部長 田口 明子

室長

生理学研究室 徳永 暁憲
神経内分泌学研究室 多田 敬典

流動研究員

田之頭 大輔

客員研究員

大澤 匡弘 (平成 29 年 2 月～)
(名古屋市立大学薬学部准教授)

研究生

今井 萌乃 (平成 29 年 2 月～)
(金城学院大学薬学部 4 年)

研究補助員・事務補助員

佐治 多美子
柏田 舞波
新村 美希

(2) 平成 28 年度研究活動の概要

本研究部は、平成 27 年 1 月に新設研究部として発足したが、センター内における研究部のスペースは同年 5 月に決定され、さらに 6～8 月の実験室内の工事を経て、研究部のセットアップを開始した。また、平成 27 年 9 月に生理学研究室長、平成 28 年 1 月に神経内分泌学室長がそれぞれ着任し、

平成 28 年 4 月には流動研究員も新たに加わり、研究体制が整ったため、平成 28 年度から本格的に研究活動を開始した。

本研究部では、認知症のリスク要因として注目される糖尿病が、認知機能障害を誘導するメカニズムを明らかにすることを介して、認知症発症の根本的な分子機序に迫ることを目的として研究を行っている。

2 型糖尿病による認知機能障害誘導過程の中でも、軽度認知機能障害 (MCI) の前過程とされる臨床前段階アルツハイマー (AD) / 前認知症に注目し、その潜在的モデル動物として利用を確立した生理的 2 型糖尿病モデルマウスを用いて解析を行い、当該マウスの認知機能障害に脳インスリンシグナルが関与し、さらにこれらの変化には体系的要因が連関することを明らかにした。

さらに、2 型糖尿病に加え、不良な血糖値制御が起因とされる 1 型糖尿病に伴う認知機能障害にも関心が高まっているため、本研究部では、従来の薬剤誘導性の 1 型糖尿病モデルマウスの使用に加え、新規の遺伝的 1 型糖尿病モデルマウスを新たに作製した。これら 2 種の 1 型糖尿病モデルマウスと 2 型糖尿病モデルに見られる変化との比較として、同様の解析を行い、興味深い結果を得た。

統合加齢神経科学研究部（生理学研究室・神経内分泌学研究室）：
田口明子、徳永暁憲、多田敬典、田之頭大輔、今井萌乃、
佐治多美子、柏田舞波

糖尿病に伴う認知機能障害誘導機構の解明

本研究に使用するマウスを含む全マウス系統の移動が浄化後搬入となったため、昨年 H27 年 10 月より、各系統の凍結精子を用いた体外受精を順次行い、平成 28 年 1 月までに完了した。以後、各々系統の仔マウスの遺伝子型の解析から系統作製の成功を順次確認後、繁殖を開始し、平成 28 年 7 月から実験に使用可能なマウスの数が徐々に揃ってきた。我々は、本研究に用いる生理的 2 型糖尿病モデル（DIO）マウスの認知機能と連動する脳インスリンシグナルの変化が 6 ヶ月齢から観察されることを明らかにしていた。しかしながら、本センターで繁殖した同齢 DIO マウスの認知機能および脳インスリンシグナル変化は、これまで観察されたものより弱いものであったため、複数のタイムポイントを設定し観察を行った。結果的に、これまでと同レベルの表現型を観察するためには、6 ヶ月以上の時間を必要とすることが判った。以前とは異なったタイムポイントで同様の変化が見られたが、結果の傾向は同じであっても変化の割合が低い場合があり、依然として表現型が安定では無い。飼育環境の違いの 1 つであるケージサイズについては、マウスの一部を一般サイズケージに移動し、繁殖・維持を行っている。マウ

スの数が揃い次第、6 ヶ月齢を中心に複数のタイムポイントで解析を行い、表現型の安定性について精査する予定である。一方、低血糖の頻発による不良な血糖値制御が起因と示唆される 1 型糖尿病に付随する認知機能障害にも関心が高まっている。1 型糖尿病に伴う認知機能障害にも DIO マウスで観察される脳インスリンシグナルの変化が同様に付随するかについて検討するため、薬剤（ストレプトゾトシン）投与によりインスリン欠損型の 1 型糖尿病モデル（STZ）マウスを作製し解析を行った。その結果、認知機能の衰退を呈する STZ マウスの脳インスリンシグナルは、DIO マウス同様に变化することを見出した。しかしながら、STZ は膵 β 細胞に限らず脳にも直接的な影響を与えることが最近報告され、脳の解析結果の解釈が難しい。この問題を解決するため、我々は、当研究部で作製した floxed-stop-DTA マウスと新規膵 β 細胞特異的 Ins1-Cre マウスの交配により、インスリン欠乏型の新たな遺伝的 1 型糖尿病モデル（Ins1-DTA）マウスを作製した。予備実験結果から、本マウスの脳インスリン様シグナルも、DIO および STZ マウス同様に变化することが判った。現在繁殖を行っており、数が集まり次第、詳細な解析を行う予定である。

研究業績（統合加齢神経科学研究部）

I. 論文発表

1. 原著

Takahashi M, Tsukamoto Y, Kai T, Tokunaga A, Nakada C, Hijiya N, Uchida T, Daa T, Nomura T, Sato F, Mimata H, Matsuura K, Moriyama M
Downregulation of WDR20 due to loss of 14q is involved in the malignant transformation of clear cell renal cell carcinoma.
Cancer Sci.107(4):417-23, 2016.

Tada H, Tokunaga A, Tanokashira D, Kurata E, Taguchi A
Role of metabolic signaling in the regulation of cognitive functions.
Biomedical Gerontology, 40(2) 9-14, 2016.

Hijiya N, Tsukamoto Y, Nakada C, Tung NL, Kai T, Matsuura K, Shibata K, Inomata M, Uchida T, Tokunaga A, Amada K, Shirao K, Yamada Y, Mori H, Takeuchi I, Seto M, Aoki M, Takekawa M, Moriyama M
Genomic loss of DUSP4 contributes to the progression of intraepithelial neoplasm of pancreas to invasive carcinoma.
Cancer Res. 76: 2612-2625, 2016.

Kai T, Tsukamoto Y, Hijiya N, Tokunaga A, Nakada C, Uchida T, Daa T, Iha H, Takahashi M, Nomura T, Sato F, Mimata H, Ikawa M, Seto M, Matsuura K, Moriyama M
Kidney-specific knockout of Sav1 in the mouse promotes hyper-proliferation of renal tubular epithelium through suppression of the Hippo pathway.
J Pathol. 239(1):97-108, 2016.

Tada H, Miyazaki T, Takemoto K, Takase K, Jitsuki S, Nakajima W, Koide M, Yamamoto N, Komiya K, Suyama K, Sano A, Taguchi A, Takahashi T
Neonatal isolation augments social dominance by altering actin dynamics in the medial prefrontal cortex.
PNAS, 113(45): E7097-E7105, 2016

Fujimori K, Tezuka T, Ishiura H, Mitsui J, Doi K, Yoshimura J, Tada H, Matsumoto T, Isoda M, Hashimoto R, Hattori N, Takahashi T, Morishita S, Tsuji S, Akamatsu W, Okano H

Modeling neurological diseases with induced pluripotent cells reprogrammed from immortalized lymphoblastoid cell lines.

Mol Brain, 9(1):88. DOI 10.1186/s13041-016-0267-6, 2016.

Takemoto K, Iwanari H, Tada H, Suyama K, Sano A, Nagai T, Hamakubo T, Takahashi T

Optical inactivation of synaptic AMPA receptors for artificial memory erasure.

Nat Biotechnol, 35(1):38-47, 2017

Tanokashira D, Mamada N, Yamamoto F, Taniguchi K, Tamaoka A, Lakshmana MK, Araki W

The neurotoxicity of amyloid β -protein oligomers is reversible in a primary neuron model.

Mol Brain.; 10(1):4. 1186/s13041-016-0284-5, 2017

2. 総説

多田敬典、高橋琢哉. :ストレスと認知機能.

生体の科学 67(1) 47-50, 2016.

3. 著書、Chapters

田口明子. : 脳インスリン様シグナル.

脳内環境事典 メディカルドゥ社 P 74-75, 2016

4. その他

5. 新聞・報道, 等

6. 特許申請、取得状況

II. 学会・研究会等発表

1. シンポジウム、特別講演

田口明子

認知機能障害に伴う中枢神経系特異的インスリンシグナルの変容.

第 51 回糖尿病学の進歩 2017 年 2 月 17-18 日、京都市、日本

2. 国際学会発表

Akiko Taguchi

Altered hippocampal insulin-like signaling correlates with diabetes-related cognitive decline.

Memory Mechanisms in Health and Disease, Zing Conferences, Dec 5-8, 2016, Tampa, Florida, USA.

3. 国内学会発表

田之頭大輔、福岡屋航、川邊健士朗、徳永暁憲、多田敬典、柏田舞波、佐治多美子、倉田栄子、田口明子

アルツハイマー病発症における海馬インスリン様シグナルの関与.

第 31 回日本糖尿病合併症学会 2016 年 10 月 7-8、仙台、日本

田之頭大輔、田口明子

糖尿病に伴う認知機能低下と海馬 IRS2 シグナルとの関連.

第 35 回認知症学会学術集会, 2016 年 12 月 1-3、東京、日本

田之頭大輔、徳永暁憲、多田敬典、柏田舞波、佐治多美子、田口明子

アルツハイマー病発症における海馬 IRS2 シグナルの関与.

第 31 回日本糖尿病・肥満動物学会 2017 年 2 月 10-11 日、横浜市、日本

多田敬典、徳永暁憲、田之頭大輔、佐治多美子、柏田舞波、田口明子

糖尿病に伴う認知機能障害における前頭葉・海馬神経ネットワーク制御機構の解析.

第 31 回日本糖尿病・肥満動物学会 2017 年 2 月 10-11 日、横浜市、日本

徳永暁憲、多田敬典、田之頭大輔、佐治多美子、柏田舞波、田口明子

糖尿病随伴認知機能障害の発症過程における海馬インスリン様シグナルの変容.

第 31 回日本糖尿病・肥満動物学会 2017 年 2 月 10-11 日、横浜市、日本

Hirobumi Tada, Akinori Tokunaga, Daisuke Tanokashira, Mana Kashiwada,

Tamiko Saji, Akiko Taguchi

Mechanisms of cognitive impairment induced by altering the insulin-like signaling in the prefrontal cortex of diabetic model mice.

第94回日本生理学会大会 2017年3月28-30日、浜松市、日本

4. その他、セミナー等

Akiko Taguchi

Link between Diabetes mellitus and Alzheimer's disease-Inductive mechanism of Alzheimer's disease through interactions between neural insulin-like signaling and systemic metabolic change.

Eli Lilly 2nd Innovation Day in Japan, Sep 9, 2016, Tokyo, Japan

III. 競争的資金獲得実績

1. 日本医療研究開発機構

2. 厚生労働省

3. 文部科学省

田口明子（代表） 403 万円（総額 1677 万円）

文部科学省科研費 基盤研究（B）

慢性的高脂肪食摂取による学習記憶障害誘導経路の同定と解析

田口明子（代表） 143 万円（総額 364 万円）

文部科学省科研費 挑戦的萌芽研究

体系的認知機能調節機構の解明

徳永暁憲（代表） 120 万円（総額 390 万円）

文部科学省科研費 基盤研究（C）

神経系における NMD 依存的 RNA 分解機構の生理的意義

徳永暁憲（分担） 10 万円

文部科学省科研費 基盤研究（C）

アデノウィルスベクター及び CRISPR を用いた受精卵遺伝子組換えの効率化

多田敬典（代表） 120 万円（総額 290 万円）

文部科学省科研費 挑戦的萌芽研究

成熟期社会性獲得に影響をおよぼす若年期優劣性交互関係の神経ネットワーク
メカニズム

多田敬典（分担） 5 万円

文部科学省科研費 基盤研究（B）

社会的隔離動物の脳皮質回路形成の解析

4. 財団、その他

共同利用推進室

(1) 構成員

室長 渡邊 淳

客員研究員

脇田 英明

外来研究員

吉田 裕孝

研究補助員

松崎 三記子

(2) 平成28年度研究活動の概要

当研究室の役割である長寿医療研究を推進していく上で必要な様々な共同利用機器の円滑かつ効率的な管理運用及び共同利用スペースの整備を行った。

本年度は、既に導入されており、使用頻度も非常に高い共用機器である共焦点レーザー顕微鏡 LSM700、LSM780の講習会を再度行った。また、カールツァイスマイクロコピー共焦点レーザー顕微鏡、ゲノム編集 CRISPR-Cas9 Gene Engineering のテクニカルセミナーを通して、最新技術に関する情報提供を行った。さらに、当センターの各研究部・室及び外部の研究機関から依頼されたサンプルの質量分析等の研究支援を行った。

研究に関しては、昨年度に引き続きバイオバンクから提供して頂いたアルツハイマー病患者及び認知機能正常者等の血漿タンパク質の網羅的解析及び ApoE の解析を行った。

血漿タンパク質の網羅的解析：アルツハイマー病 (AD) 患者と認知機能正常者 (Normal) 以外にも軽度認知障害者 (MCI) や血管性認知症 (VaD) 患者の血漿を当センターのバイオバンクから提供して頂き解析を行った。検体は男女比、年齢層を出来るだけ合わせた症例を用いた。また、AD の危険因子 ApoE4 も偏りが無い検体で解析を行った。

前年度同様得られたサンプルはアルブミン、IgG、IgA、 α 1-アンチトリプシン、トランスフェリン、ハプトグロビン、フィブリノゲン、 α 2-マクログロブリン、 α 1-酸性糖タンパク質、補体タンパク質 C3、IgM、アポリポプロテイン AI、アポリポプロテイン AII、トランスサイレチンといった血液中に高濃度に含まれる主要な 14 種類のタンパク質の抗体が固定化されたアフィニティーカラムを用いて、液体クロマトグラフィーで分離を行った。素通り画分と吸着した画分に分けた後、各々の画分は、それぞれ直接トリプシンで消化を行った。各消化物は低流量で流せる HPLC を用いた nanoLC/MS/MS によるショットガン分析に供した。各画分の質量分析によって得られたデータはスコアをもとにタンパク質のリストを作成した。現在、さらにサンプル数を増やし、リストアップされたタンパク質について違いがないか解析している。

アルツハイマー病患者及び認知機能正常者のApoEの解析：アルツハイマー病患者と認知機能正常者の血漿を、血液中に高濃度に含まれる主要なタンパク質の抗体が固定化されたアフィニティーカラムを用いて分画し、それぞれの画分について、ApoE抗体を用いたウエスタンブロットによって解析すると、ApoEのC末の抗体を用い

た場合に、アルツハイマー病の危険因子であるApoE4保有者と非保有者で変化が見られることが判明し、変性したApoEが観察された。このことから、ApoE4のC末で何らかの変化が見られないか質量分析を用いて解析を試みている。これらの違いを明らかにすることで、アルツハイマー病の早期診断ができないか検討している。

研究業績（共同利用推進室）

I. 論文発表

1. 原著

Funato H, Miyoshi C, Fujiyama T, Kanda T, Sato M, Wang Z, Ma J, Nakane S, Tomita J, Ikkyu A, Kakizaki M, Hotta-Hirashima N, Kanno S, Komiya H, Asano F, Honda T, Kim SJ, Harano K, Muramoto H, Yonezawa T, Mizuno S, Miyazaki S, Connor L, Kumar V, Miura I, Suzuki T, **Watanabe A**, Abe M, Sugiyama F, Takahashi S, Sakimura K, Hayashi Y, Liu Q, Kume K, Wakana S, Takahashi JS, Yanagisawa M.

Forward-genetics analysis of sleep in randomly mutagenized mice.

Nature, 539, 378-383, 2016.

2. 総説

該当なし

3. 著書、Chapters

該当なし

4. その他

該当なし

5. 新聞・報道, 等

該当なし

6. 特許申請、取得状況

該当なし

II. 学会・研究会等発表

1. シンポジウム、特別講演

該当なし

2. 国際学会発表

該当なし

3. 国内学会発表

渡邊 淳

アルツハイマー病患者の血漿中のApoEの解析

第35回日本認知症学会学術集会, 2016年 12月, 東京

吉田裕孝

タウの細胞外放出機構についての解析

第 35 回日本認知症学会学術集会, 2016 年 12 月, 東京

4. その他、セミナー等

該当なし

III. 競争的資金獲得実績

1. 日本医療研究開発機構

該当なし

2. 厚生労働省

該当なし

3. 文部科学省

吉田裕孝（主任） 117 万円

科学研究費補助金 挑戦的萌芽研究

4. 財団、その他

該当なし

実験動物管理室

(1) 構成員

室長 小木曾 昇

流動・研究開発研究員

六車 香織

研究補助員

高野 聡美

秋山 彩子

エンス財団による外部検証を受検し、その結果を NCGG の HP に公開した。

1) 実験動物施設棟の利用実績

平成 28 年度の実験動物施設棟の利用者はのべ 3,111 人（前年比 12.0% 増）であった。

(2) 平成 28 年度実験動物管理・運営の概要

実験動物管理室では、前年度と同様、NCGG 内で実施される動物実験の適正化に向けた指導や助言の他、実験動物施設棟のマウスやラット、エイジングファーム動物（AF 動物）の飼育等を中心とする施設の適切な管理・運営に努めた。

また、研究支援業務として生殖工学技術を利用した技術支援（マウスのクリーン（SPF）化、配偶子凍結保存等）および動物実験手技（経口、尾静脈投与等）の指導を行った。

動物施設棟内にある行動実験装置に加えて、動物実験に関わるイメージング装置（MRI）の管理を脳機能プロジェクト（文科省）の終了とともに新たに引き継ぐことになった。

「実験動物の飼養および管理並びに苦痛の軽減に関する基準」（平成 25 年）および「厚生労働省の所轄に関する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」（平成 27 年）の一部改正に伴い、7 月にはヒューマンサイ

2) 実験動物の搬出入

ブリーダーや他の研究機関から 114 件（マウス 95 件 2,409 匹（前年比 26.9% 増）、ラット 19 件 217 匹（前年比 20.5% 減）の動物の搬入があった。また、他の研究機関から供与されるマウスに微生物学的な問題が散見されたことから、必要に応じて凍結精子や受精卵による導入を行った。一方、動物の搬出については、マウス 8 件（162 匹）と減少（前年比 0.6% 減）した。

3) 技術支援業務

熊本大学 CARD が開発した精巣上体尾部の冷蔵輸送、抗インヒビン抗体（IAS）超過排卵誘起法、凍結精子等における受精能の向上を目的とする培地類（CARD 法）を日常業務に取り入れることで、生殖工学に関わる技術支援が多様化した。特に超過排卵誘起法により体外受精に用いる雌マウスの使用数削減（Reduction）につながり、精巣上体尾部の低温輸送を行うことで比較的簡便に個体の導入が可能になったのは非常に有用である。さら

に生年月日や匹数がそろった計画的な動物の生産（大量な凍結胚作製、融解・胚移植による産仔作製）の他、CRISPR/Cas 9 システムを利用した遺伝子組換えマウスの作製（エレクトロポレーション（デモ機）、マイクロインジェクション）を行った。

実際の技術支援業務としては6 研究部・室から 46 件（前年比 43.8%増）の依頼があった。凍結胚からの蘇生 19 件（20 系統）、精子凍結保存 9 件（9 系統）、マウスクリーン化等（凍結精子や冷蔵輸送された精巢上体尾部由来の精子の蘇生、凍結精子の受精能確認を含む）による体外受精 18 件（18 系統）を行った。その中でも海外を含む 4 研究機関から、マウス個体 1 系統、凍結精子 3 系統、精巢上体尾部由来の精子 7 系統のクリーン化を実施した。

その他、マウスの実験動物手技に関する技術支援（指導含む）3 件（尾静脈投与 2 件、経口投与 1 件）を行った。

4）実験動物施設棟の設備機器等のトラブルへの対応

エアシャワーの微酸性水噴霧による庫内の腐食や R0 水製造装置の R0 膜劣化の進行、ガス消毒装置（URM）のヒーター故障が発生し、必要に応じて修理を行った。

5）実験動物施設棟の環境衛生整備

新棟完成（平成 24 年 8 月）から懸案となっている AF 動物の（長期）飼育に適切な環境の整備について、①空調ダクトの構造（真菌類が発生しやす

い）、②クリーンおよびダーティ廊下の空調設備（一般エアコンによる温度調整のみ）③飼育室内の照度（標準的な照度の 3 倍以上の明るさ）等の問題点が挙げられていたが、本年度は財務経理課との打ち合わせのみで実施には至らなかった。次年度も引き続き、適正な飼育環境の整備を理事長、所長を通じて打診していきたい。

6）動物実験に関わるセンター内業務

動物実験倫理委員会で審査した動物実験計画申請書の申請件数は 51 件（承認 51 件、非承認および非該当 0 件）あった。

動物実験取扱規程による動物実験講習会（教育訓練）を 11 回開催し 108 名（新規 24 名、継続 84 名）の受講があった。

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：

NCGG で育成している自然老化動物（AF 動物）の老化・老年病モデル動物としての有用性を検証するために、昨年度に続き以下の検討を行った。また様々な検証を進める中で、長期飼育に適切な環境の探索および自然発症の

『フレイル』モデル動物の開発についても合わせて実施した。

1. 行動学的解析（ロータロッド試験、握力試験、長期活動計測、行動観察等）

2. 生理学的解析 (生存率、体重測定、体温、心拍数計測等)
3. 形態学的解析 (Sirtuin や p53 等の加齢・老化遺伝子発現部位や発現量、MRI 撮影による観察)
4. 生化学・免疫学的解析 (IL 等の炎症性サイトカイン、*Bifidobacterium*、*Lactobacillus* 等の腸内細菌叢の変動)

4 週齢の C57BL/6NC r Slc (雄 90 匹、雌 30 匹) を 3 ヶ月毎に購入して (行動解析用に別途雌雄各 20 匹購入)、AF 動物として長期飼育を行い、各月齢において以下の解析を実施した。

a) 行動学および生理学的解析

体重は雄が 18~19 ヶ月齢、雌は 16~17 ヶ月齢においてピークとなり、25 ヶ月齢まで減少は見られなかったが、雄については 26 ヶ月齢以降減少傾向を示した。摂餌量および摂水量については 3~24 ヶ月齢まで加齢に伴う変化や雌雄差は観察されなかった。一方、加齢に伴って脱毛や脱色が目立つ個体が増加する傾向にあった。生存率は、雌雄ともに 18 ヶ月齢以降減少傾向が見られ、24 ヶ月齢で雄 $81.2 \pm 6.9\%$ 、雌 $75.5 \pm 12.8\%$ であり、アメリカ NIA と比較しても (24 ヶ月齢雄 75%、25 ヶ月齢雌 50%) 良好であった。ロータロッド試験では、雄では 3 ヶ月齢、雌

では 6 ヶ月齢をそれぞれピークとして、加齢に伴う体重増加に依存して運動機能 (走行時間) が低下した。雌の方が全体的に走行する時間が長い傾向が見られたが、18 ヶ月齢以降は明瞭な雌雄差は認められなかった。同様の試験を実施している理研 BRC の 12 週齢における基礎データ (雄 135 sec、雌 235 sec) とは異なる値を示した (雄 213sec, 雌 195sec)。握力試験では、25 カ月齢まで加齢に伴う筋力に大きな変動は認められなかった。現在マウスの外部形態の加齢変化を示す客観的な指標として、SAM (Senescence Accelerated Mouse; SAM) マウスの老化度判定に使用される老化度スコア (反応性、受動性、毛の光沢や目の状態、外傷等の外観) を用いて月齢ごとの評価を進めている。

b) 病理・形態学的解析 (組織)

自然死 (雄 92 匹、雌 51 匹) による剖検から、雄では精嚢腺肥大 (貯留) の 52%をはじめとした脾腫 (17.4%) および肝腫瘍 (16.3%)、雌では脾腫 (35.3%)、肝腫瘍 (21.6%) が比較的多くの個体で観察されたが、生理学的な老化の所見となる臓器の顕著な萎縮等は認められなかった。今回観察された雄の精嚢腺貯留をはじめとした様々な病理所見は、老人研 (現東京都健康長寿医療センター) ・仲村ら

(1992) も B6 マウスに認められる自然発症型の加齢性病変として報告している。また運動機能の加齢性変化の形態学的な指標として、8、27、30 ヶ月齢のマウスを用いて横隔膜筋における神経筋接合部 (NMJ) の構造解析 (蛍光免疫染色) を行った。その結果、8 ヶ月齢ではほぼ全ての NMJ が正常な形態だったに対し、27 ヶ月齢では 4 割前後、30 ヶ月齢ではおおよそ半数の NMJ が異常な形態 (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) を示したことから、加齢に伴う運動機能の低下と NMJ の構造異常との相関性が示唆された。

その他、加齢に伴って生じる脳の萎縮や病変 (神経細胞萎縮や変性) を検出するための MRI 撮像を含めた形態学的解析 (抗リン酸化 α シヌクレイン抗体染色等) の他、老化関連遺伝子 (例、Sirtuin, p53) 等の発現量や発現部位についても解析を進めている。

c) 生化学・免疫学的解析

6~33 ヶ月齢の雄個体における腸内細菌叢の構成について T-RFLP 解析を用いて解析した結果、個体差が大きく加齢に伴う菌叢の明瞭な変動は認められなかったが、33 ヶ月齢において *Mucispirillum* および *Lactbacillus* が増加し、*Clostridiales* が減少する傾向が見られた。一般的には *Lactbacillus* を

はじめとする乳酸菌類は加齢に伴い減少する報告が多いが、本研究では逆の傾向を示した。今後は個体数を増やし、本属をはじめとした特定の菌種に対し Real-time PCR を行い全菌種に対する各菌群の相対量の加齢変化を解析する予定である。

AF ラット (F344/NS1c) は 4 週齢の個体 (雄 30 匹、雌 8 匹) の長期飼育を行った。

生存率は 13 ヶ月齢前後から減少しはじめ、17 ヶ月齢で約 60.0% であった。体重では 12 ヶ月齢においてほぼピークに達し (約 400.0 g)、24 ヶ月齢まで明瞭な変動は認められなかった。また摂餌量、摂水量は 3 ヶ月齢~20 ヶ月齢まで加齢に伴わずかに減少するが、有意な変動は見られなかった。自然死した個体を剖検した結果、肺の病変が 90% 以上の個体で認められたことから、現在血液生化学検査等を実施し、これらの死亡動物の死因究明を行っている。

以上の解析結果から、それぞれの検証において個体差が大きく個体レベルでの明瞭な加齢性変化は認められなかった。しかしながら老齢雄における体重減少と生残率の低下、加齢に伴う運動機能の低下 (ロータロッド走行時間の減少および異常 NMJ 割合の増加) や老齢個体における腸内細菌叢の変化、また性別や加齢に伴う変動する病

変の発生頻度等、今後老化の指標となりうる結果が一部得られた。今後はこれらの項目について若齢個体を含め各月齢の例数を増やしさらに多面的な解析を行う。なお摂餌量（特に自由摂取）については、ヒトで見られるような加齢に伴う食事量の減少は認められなかったことから、摂餌量の変化を老化の指標とするのは難しい可能性がある。また、AF 動物の飼料は全ての月齢で同じものを使用しており、今後は飼料の成分についても検討を行う予定である。なお餌を切り替える場合はそのタイミングについても詳細

に検討を行う。またこれまでの報告で動物種や系統によって加齢に伴う老化の進行、自然発症する疾患の種類が異なることが知られている。そのため実験を行う場合はその実験系に適した動物種や臓器等のサンプルを選択する必要がある、これまでに蓄積された AF 動物に関する膨大な基礎データは加齢動物を用いて研究を行う上で非常に有益な情報となり得る。将来の老化・老年病モデル動物のバイオリソースとして今後もこれらのデータを蓄積し、外部へ向け発信し続けることが今後の課題である。

研究業績（実験動物管理室）

I. 論文発表

1. 原著

- 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. 総説

なし

3. 著書、Chapters

なし

4. その他

なし

5. 新聞・報道, 等

なし

6. 特許申請、取得状況

なし

II. 学会・研究会等発表

1. シンポジウム・特別講演

なし

2. 国際学会発表

- 1) 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

3. 国内学会発表

- 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 川越市

- 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 川越市

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 川越市

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 川越市

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

4. その他、セミナー等

1) 小木曾昇

実験動物学入門 —アマからプロへの道のり—

日本実験動物技術者協会実技講習会, 2016 年 7 月 23 日, 豊明

III. 競争的資金獲得実績

1. 厚生労働省

なし

2. 文部科学省

なし

3. 財団、その他

なし

ラジオアイソトープ管理室

(1) 構成員

室長 中西 章

流動研究員

北本卓也

外来研究員

奥野海良人

客員研究員

滝川 修

吉見達也

研究補助員

高柳亜紀子

加藤晶子

岸 智美

管理補助員

今井康雄（千代田テクノル）

(2) 平成 28 年度研究活動の概要

研究所放射線管理：

当センターの放射線障害予防規定に従い、放射線障害防止のため定期講習会（教育訓練）を平成 28 年 4 月 22 日 14：00～16：00 に開催した。本年度の研究所放射線業務従事新規登録者は 9 名であり、再登録者は 27 名であった。前半 1 時間は京都大学原子炉実験所 副所長 高橋千太郎先生による講演、後半は新規登録者のみ、放射性同位元素等の安全な取扱いなどについて講習を実施した。

また、「放射性同位元素等による放射線障害の防止に関する法律」に基づ

き、平成 28 年 6 月 22 日、23 日と 2 日間にわたり、原子力安全技術センターによる放射性同位元素等取扱施設としての定期検査・定期確認が行われた。検査・確認の結果として、適正に管理されている旨の報告があった。

また、平成 28 年 12 月 8 日には原子力規制庁よりの臨時監査が行われた。書類・検査態勢などについて、数点問い合わせがあった。最終的な監査結果については、年度明けに確定となる。

研究活動：

認知症等の治療薬・治療法開発にあたり対象薬剤の導入法は特に重要である。本研究室では、認知症治療に関するデリバリー担体の開発研究として、中枢神経系への生体高分子浸透性の促進を可能にするデリバリー担体の開発、そして粘膜免疫経路での能動免疫による各種治療アプローチの検討のため、腸管ウイルスを基にしたデリバリーベクターの開発を行っている。また近年、免疫機構を通じての腸管微生物と中枢神経系とのクロストークが注目されている中で、微生物由来多糖が老齢マウスの免疫機能に及ぼす影響についても検討を加えた。

デリバリー研究グループ：中西章、北本卓也、加藤晶子、岸智美

認知症治療に関するデリバリー担体の開発研究

要約：認知症用治療薬剤の血液脳関門（BBB）通過促進を目指した新規デリバリー担体開発として、BBB 通過モチーフのスクリーニングを行った。また、アルツハイマー病に対する経口ワクチン担体作成のため腸管ウイルスを利用したベクターの作製に対する基盤研究を行った。

結果：近年の研究によりトランスフェリン受容体（TfR）に対する抗体は BBB を効率的に通過できることが知られている。昨年度作成した新規ディスプレイプラットフォームによって提示されたランダムペプチドライブラリーを利用し、組換え TfR に結合できるペプチドモチーフをスクリーニングした。これらのモチーフより BBB 通過モチーフ候補をスクリーニングするため、本年度は *in vitro* BBB モデルを利用して、能動的な経内皮細胞輸送（トランスサイトーシス）活性を検出できる実験系を新たに開発した。この方法では、BBB 透過能が報告されている既存の抗 TfR 抗体の高いトランスサイトーシス活性を検出できるが、抗 A

β 抗体など BBB を通過できないとされている抗体ではその活性がほぼ無いことを確認している。この実験系を用い昨年度単離した組換え TfR に結合するモチーフのトランスサイトーシス活性を解析し、BBB 透過モチーフ候補の最適化を行った。

養護施設等での集団感染で大きな問題となっているヒトノロウイルスは、細胞培養系が無いためにウイルス学的な種々の手法でワクチン・抗ウイルス剤開発ができない。国立感染症研究所などとの共同研究により、ノロウイルスモデルとして使用されているマウスノロウイルスのレセプターを同定した（論文発表）。この発見により、ヒトノロウイルスの培養細胞株系の開発推進が期待できる。また、培養細胞で良く増殖するマウスノロウイルスを基本骨格としたベクター作成の為の基盤研究を行った。今年度は、ルシフェラーゼ遺伝子を挿入できるウイルスゲノム領域の特定を行い、外来遺伝子の発現を確認した。

老化と腸管細菌叢研究グループ：中西章、高柳亜紀子、吉見達也、奥野海良人、滝川修

微生物由来多糖が老齡マウスの免疫機能に及ぼす影響

免疫力は加齢とともに低下することが知られている。微生物由来菌体外多糖類（ECP）は特に腸管免疫を賦活化することにより、免疫力を高め、結果として寿命の延伸の効果のあることが期待される。この仮説を検討するために、3月齢時、もしくは12月齢時よりICRマウス（♀）にE2%ECP添加食餌で飼育して寿命の変化を検討した。18月齢時においては、3月齢時よりECPを投与したマウス群では餌含量依存性に寿命の短縮の傾向が観察された。一方、12月齢より投与したマウスでは寿命延長の傾向が認められた。3月齢、12月齢でのECP投与開始による反応が異なる点については、理由は明かでは無い。

しかしながら、24ヶ月まで、ICRマウスに2%ECP添加食餌で飼育し延命効果を検討した結果、添加開始齢が3月齢または12月齢であってもともに、

統計学的（カプランマイヤー法による生存曲線解析）に有意な延命効果を観察することができなかった。また、老化で自然死亡したマウス解剖所見にも特に差異を認めなかった。

【結論】

マウスにおいては、2%ECP添加食では延命効果を示さないし、寿命を縮めるような副作用もない。

【展望】

マウスとヒトとの種差は大きく、今回の結果をヒトへと外挿するには注意が必要である。今後はヒトによる検証が必要である。

研究業績（ラジオアイソトープ管理室）

I. 論文発表

1. 原著

Haga K, Fujimoto A, Takai-Todaka R, Miki M, Doan YH, Murakami K, Yokoyama M, Murata K, Nakanishi A, and Katayama K.

Functional receptor molecules CD300lf and CD300ld within the CD300 family enable murine noroviruses to infect cells.

Proc.Natl.Acad.Sci.USA.113: E6248-E6255, 2016.

2. 総説

該当なし

3. 著書、Chapters

該当なし

4. その他、新聞・報道等

該当無し

5. 特許申請、取得状況

発明者：芳賀 慧、藤本 陽、戸高玲子、片山和彦、中西 章、三木元博、関根盛、大塚浩史、三森重孝

発明の名称：ノロウイルスが増殖可能な遺伝子組換え細胞、及び、その用途

出願年月日：国際出願：2017 年 2 月 1 日

出願番号：PCT/JP2017/3539

出願人：国立感染症研究所、デンカ株式会社

(国立長寿医療研究センターも共願人として名義変更予定)

II. 学会・研究会等発表

1. シンポジウム、特別講演

該当無し

2. 国際学会発表

Yoshida K, Takai-Todaka R, Katayama K, Nakanishi A

Functional role of Murine Noroviral VP2 during the viral life cycle

American Society for Virology June 19, 2016, Blacksburg, Virginia, USA

Nakanishi A, Yoshida K, Katayama K, Takai-Todaka R, Zhou Y

Genetic approach to examine the role of murine noroviral VP2 during the viral infectious cycle.

6th International Calicivirus Conference, Oct. 11, 2016, Savannah, Georgia, USA

3. 国内学会発表

中西 章、金森 久美子、片山 和彦、戸高 玲子、芳賀慧、藤本陽、加藤 晶子、吉田 和央

ノロウイルスの複製複合体に集積する核膜孔タンパク質

第 37 回日本分子生物学会 2016 年 12 月 2 日 横浜

4. その他、セミナー等

該当無し

III. 競争的資金獲得実績

1. 日本医療研究開発機構

中西 章（分担）140 万円

感染症実用化事業 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業
培養細胞感染系の確立されていない病原体の実験技術の開発と予防診断法に関する研究

中西 章（分担）300 万円

感染症実用化事業 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業
下痢症ウイルスの分子疫学と感染制御に関する研究

2. 厚生労働省

該当無し

3. 文部科学省

中西 章（分担）140 万円

日本学術振興会 基盤研究（B）

ヒトノロウイルス感受性細胞の樹立とレセプターの探索

3 財団、その他

該当無し

バイオリソース研究室

(1) 構成員

室長 矢澤 生

流動研究員

佐々木飛翔

特任研究員

橋本 成花

研究生

中山 貴美子

客員研究員

岩瀬 環

(2) 平成 28 年度研究活動の概要

高齢者が健やかな加齢(Aging Well)を享受するために、国立長寿医療研究センター（以下「センター」という）は加齢に伴う疾患の克服に関する研究の基盤として、バイオリソースに関する研究を行う。バイオリソース研究室では、認知症等に起こる神経変性の発病機構の解析のために、中枢神経系病理組織のバイオリソースの蓄積及び活用する研究を行った。病理解剖に由来する病理組織である「病理組織バイオリソース」では、収集する病理試料が死体組織であることから死体解剖保存法を遵守しご遺族等からの病理組織の返却に対応するために連結可能匿名化による収集を行った。病理組織の活用研究に関して、平成 26 年から、センター利益相反・倫理委員会の承認を得て実施している。

バイオリソースに関する研究では生命倫理だけでなく、時代背景にあった社会的なコンセンサスを十分に配慮する必要がある。近年、病理解剖の

減少、急速な在宅医療の推進、病理医の不足等により「病理組織バイオリソース」の研究はより困難になっている。そこでこれらの問題を解決するために、地域の病院間で連携し病理医が勤務しない病院であっても病理組織の活用研究が可能となるシステムの構築をめざした。地域の病院間でそれぞれの病理解剖や組織診断に関する得意分野を生かし、病理解剖の役割を分担することにより、病理解剖の情報を相互に活用できる組織診断ネットワークの構築を検討した。さらに、認知症で取り組みが進んでいる在宅医療への対応や介護関連施設との連携の取り組みなどの検討も行っている。

「病理組織バイオリソース」の活用研究として、認知症等の原因となる神経変性に対する根本的な治療法開発に取り組んである。バイオリソース研究室では、広報活動としてセンターホームページを活用し、「病理組織バイオリソース」に関する情報提供を行った。組織活用研究においては、インターネットを使って個別の難病相談を実施し、海外からも問い合わせがあり患者家族に研究成果を報告した。平成 26 年度から開始した、民間企業と連携する組織活用研究に関する研究成果を、神経変性に対する創薬研究として具体化し、治療標的を明確にした。今後、研究成果を科学的な論文として発表することに留まらずに、患者様に届く神経変性の治療薬を開発するためである。

1) 神経病理解剖診断ネットワークの構築

近年、病理解剖の症例数が大きく減少する一方で、症例数を維持又は増加している病院がある。愛知県では福祉村病院（豊橋市）や名古屋市厚生院等である。これらの病院の特徴は、高齢者の介護などの施設を併設することである。バイオリソース研究室では関連施設との連携を積極的におこない、神経病理診断などの病理解剖の基本情報の交換を定期的に行っている。今日、社会的なニーズが大きくなっている、高齢者のための病院・施設では大病院との連携が行われている。これらの施設では認知症における正確な病理解剖診断が実施されていることから、認知症診断の次世代の担い手であることが予想される。認知症の研究者は関連施設との連携を深め、相互に協力関係を構築する必要がある。施設間の連携により、臨床医の側には正確な確定診断が可能になり、精度の高い診療が行える効果がある。加えて、病理解剖診断を実施する側にも詳細な臨床情報が提供され診断が行いやすくなる利点があり、相互に相乗的な効果を生む。今後の課題として、臨床病理学的な診断について国民の理解を得るために、病理解剖組織に関するバイオリソースを活用して成果を、広く発信することが重要である。バイオリソース研究室では明快な成果を発信するために、神経変性疾患の治療法開発に取り組んでいる。

2) 「病理組織バイオリソース」の活用に関する研究

「病理組織バイオリソース」の活用研究では、病理解剖で得られた神経変性疾患に関する新知見を、細胞・動物モデルに反映させ、それらの解析を行い神経変性疾患に対する治療法を確立する。すなわち、ヒトの病理解剖で明らかになる病態解析から、疾患の新しい治療法開発や創薬研究へと連続することを示すことにより、病理解剖に関する国民の理解に繋げ重要性を発信する。組織形態や組織診断学だけではなく、生化学や分子生物学などの幅広い分野で研究を行い、病理組織バイオリソースから得られた発病機構などの研究情報を、生きたモデル細胞や動物を解析することにより、ヒト試料活用研究を疾患モデル研究と並行して行うことにより、効率的な治療法開発研究を実施することを可能にする。さらに、疾患モデル研究は「病理組織バイオリソース」におけるヒト病態と比較検討することにより効果的な治療研究へと展開できるようになる。

バイオリソース研究室では認知症の原因となるタンパク質の一つである alpha-synuclein について、その蓄積による神経変性の機序を解明し、さらに蓄積に対する分子標的を検討した。認知症において中枢神経の病気の中で「脳の神経細胞が徐々に脱落する」病態を神経変性と呼ぶが、多くの神経変性は神経細胞にタンパク質が

異常に蓄積することが原因であることが知られている。パーキンソン病や多系統萎縮症などの神経変性疾患について病気で死亡した患者脳組織を調べることにより、中枢神経の病変では神経細胞やグリア細胞に alpha-synuclein タンパク質が蓄積して神経細胞が脱落し、運動機能障害や認知機能低下の症状が起こることが明らかになった。本研究では神経変性に対する根本的な治療法開発を目指し、ヒト脳組織の解析から得られた知見から、治療の標的となる分子の同定や変性過程の解析を行った。我々の過去の動物モデルの実験などから、alpha-synuclein は神経細胞で微小管形成タンパク質のチューブリンと結合して不溶化、蓄積することを明らかにした。次に、マウス脳の初代培養の研究から、微小管と結合し蓄積する alpha-synuclein の蓄積ではオリゴデンドロサイト（グリア細胞）から発するシグナル分子としてシスタチンが引き金になることを同定した。シスタチンなどの細胞間シグナルを分子標的として alpha-synuclein 蓄積抑制の方法を検討している。

神経変性に対する根本的な治療法開発をめざして、alpha-synuclein の蓄積を抑制するリード化合物の特定を行っている。本研究に類する神経変性における創薬研究では、民間企業との連携が不可欠である。バイオリソース研究室では患者様に届く治療研究へと展開している。病理組織バイオリソースが疾患の治療研究に役立つこ

とを具体的に示し、病理解剖の重要性を国民へと発信している。

研究業績（バイオリソース研究室）

I. 論文発表

1. 原著

Oyanagi K, Kinoshita M, Suzuki-Kouyana E, Inoue T, Nakahara A, Tokiwai M, Arai N, Satoh JI, Aoki N, Jinnai K, Yazawa I, Arai K, Ishihara K, Kawamura M, Ishizawa K, Hasegawa K, Yagisita S, Amano N, Yoshida K, Terada S, Yoshida M, Akiyama H, Mitsuyama Y, Ikeda S.

Adult onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia (ALSP) and Nasu-Hakola disease: Lesion staging and dynamic changes of axons and microglial subsets.

Brain Pathology

2. 総説 なし

3. 著書、Chapters なし

4. 新聞・報道等 なし

5. 特許申請、取得状況 なし

II. 学会・研究会等発表

1. シンポジウム、特別講演 なし

2. 国際学会発表 なし

3. 国内学会発表

佐々木 飛翔、鈴木康予、橋本成花、矢澤生.

オリゴデンドロサイト由来液性因子の神経細胞 alpha-synuclein 蓄積における機序 Effects of signaling molecules from oligodendrocytes on neuronal alpha-synuclein accumulation

第 89 回日本生化学会大会 2016 年 9 月 26 日（月）仙台国際センター 仙台市

小柳清光、木下通亨、鈴木絵美、井上輝彦、中原亜紗、新井信隆、佐藤準一、青木直哉、陣内研二、矢澤 生、新井公人、石原健司、河村 満

腫大軸索を伴う優性遺伝性白質脳症（HDLS）と那須-ハコラ病の病理学的ステージとミクログリアの変化

第 57 回日本神経病理学会総会学術研究会、2016 年 6 月 2 日 弘前市

岩瀬環、水野友之、吉田真理、

高度な脳内石灰化を認めたアルツハイマー病高齢者の剖検例

第 57 回日本神経学会学術大会 2016 年 5 月 20 日 神戸市

岩瀬環、水野友之、吉田真理

超高齢発症の認知症の百寿者の 1 剖検例

第 57 回日本神経病理学会総会学術研究会 2016 年 6 月 2 日 弘前市

岩瀬環、水野友之、吉田真理

脳血管障害を繰り返し、閉塞性動脈硬化症で両下肢を失い、経管栄養 10 年で 100 歳に至った高齢者の 1 剖検例

第 57 回日本神経病理学会総会学術研究会 2016 年 6 月 2 日 弘前市

4. その他、セミナー等

III. 競争的資金獲得実績

1. 日本医療研究開発機構 なし

2. 厚生労働省 なし

3. 文部科学省 なし

4. 財団、その他

1. 矢澤生（代表）100 万円

公益法人精神神経科学振興財団

パーキンソニズム・認知症の医療支援プロジェクト

2. 矢澤生（代表）450 万円

公益財団法人三菱財団自然科学研究助成

細胞間相互作用の制御による神経変性の蛋白蓄積に対する抑制方法の開発

組織恒常性研究プロジェクトチーム

(1) 構成員

プロジェクトリーダー

赤木 一考 (5 月～)

流動研究員

Lucas Trindade (10 月～)

研究補助員

田口 真弓 (7 月～)

本田 美佐緒 (7 月～)

(2) 平成 28 年度研究活動の概要

5 月よりプロジェクトリーダーとして赤木が本研究所に着任した。7 月より研究補助員 2 人が加入し、10 月より Lucas Trindade 博士が流動研究員として赴任した。

腸管の恒常性は、加齢や腸疾患、または糖尿病などの代謝疾患等によって損なわれることが知られている。近年、腸の恒常性維持が個体の寿命に大きく影響することが明らかにされてきた。一方、栄養制限 (Dietary restriction: DR) は、多くの種に渡って寿命を延長させる方法であることが知られている。また、DR は寿命延長だけでなく、神経変性疾患、ガン、糖尿病、循環器系疾患などの様々な老化に関連した疾患の予防にも役立つ事が明らかにされている。しかし、DR と腸の機能性、恒常性との関係およびその分子機構はほとんど明らかにさ

れていない。

本プロジェクトチームでは、DR によって寿命が延長する分子メカニズムについて、特に腸管の恒常性維持機構に着目し、モデル生物であるキイロショウジョウバエを用いて研究を行っている。今年度は、研究室の立ち上げのために時間を要したものの、10 月以降には研究を行える環境を整えることができた。そして、ショウジョウバエの腸管恒常性維持機構について研究を行い、以下のような成果を示すことができた。

①腸管で dMyc の発現を低下させたショウジョウバエでは、腸内細菌が体液中に移行し感染症の原因となっていることが明らかにした。②腸管における dMyc 発現低下細胞の除去が細胞死によるものであることを示す結果を得た。③腸管における dMyc 発現低下細胞の除去が DR 条件だけでなく、高栄養条件においても起こることを明らかにした。

組織恒常性研究プロジェクトチーム：赤木一考、Lucas Trindade、田

口真弓、本田美佐緒

細胞競合による栄養依存的な腸上皮恒常性と寿命の維持に関する研究

研究目的と背景

我々は、ショウジョウバエ腸管において転写因子 dMyc の発現を抑制すると、細胞死の増加、腸透過性の上昇によって、寿命が短縮することを明らかにしている。また、腸上皮組織恒常性の維持に細胞競合 (Cell competition) の機構が関与していることを示唆する結果を得ている。細胞競合とは、遺伝的な変異を持つなどの適応度の低い細胞が、正常な細胞と隣接した際に組織から除去される機構で、近年では、哺乳類においても同様の機構が観察されている。しかし、細胞競合と老化、または栄養シグナルとの関係は、ほとんど明らかにされていない。よって、本研究では、腸管における細胞競合の機能と役割を解析することにより、腸上皮恒常性の維持と寿命との関係を分子レベルで解明することを目指している。

研究結果と考察

腸管で dMyc の発現を抑制した個体は、腸透過性の上昇が観察されるが、その際に腸内細菌が体液中に移行しているかどうかは不明であった。そのことを調べるため、体液中の細菌数を

調べたところ、dMyc の発現を抑制した個体では、腸内細菌が体液中へ移行し、感染症を起こしていることが明らかになった。

我々は、遺伝学的モザイク解析を用いて、DR 条件で飼育した若いショウジョウバエ個体の腸管に dMyc 発現低下細胞を作成すると、それらの細胞は細胞死によって除去されること明らかにしていた。このことを裏付けるため、dMyc 発現低下細胞にアポトーシスを抑制する因子を同時に発現するクローン細胞を作成した。その結果、クローン細胞の除去が見られなかったことから、dMyc 発現低下細胞の除去は、アポトーシスによるものであることが強く示唆された。また、dMyc 発現低下細胞の除去が、高栄養条件においても起こるのかどうかを調べた。その結果、dMyc 発現低下細胞の除去は、高栄養条件においても観察された。したがって、栄養非依存的に dMyc 発現レベルの低下が細胞死の引き金になっていることが示唆された。今後は、加齢が dMyc 発現低下細胞の除去にどのように影響するのか、詳細に解析を進める。

研究業績（組織恒常性研究プロジェクトチーム）

I. 論文発表

1. 原著

Akagi K, Sarhan M, Sultan S. AR, Nishida H, Koie A, Nakayama T, Ueda H.
A biological timer in the fat body comprising Blimp-1, β Ftz-f1 and Shade
regulates pupation timing in *Drosophila melanogaster*.
Development,143: 2410-2416, 2016.

2. 総説

なし

3. 著書、Chapters

なし

4. その他

なし

5. 新聞・報道, 等

なし

6. 特許申請、取得状況

なし

II. 学会・研究会等発表

1. シンポジウム、特別講演

赤木 一考

Intestinal cellular fitness is required for gut barrier function and lifespan
extension upon dietary restriction.

第9回 NAGOYA グローバルリトリート, 2017年2月10日, 大府市

2. 国際学会発表

なし

3. 国内学会発表

赤木 一考

“Intestinal Homeostasis and Aging in *Drosophila*”

The 1st MORPHOMEOSTASIS Meeting, 2016 年 6 月 26 日, 三島市

Kazutaka Akagi, Subhash D. Katewa, Kenneth A. Wilson, Mauricio Ortega,
Jesse Simmons, Subir Kapuria, Heinrich Jasper, Pankaj Kapahi.

Dietary restriction improves intestinal cellular fitness through *dMyc* to enhance
gut barrier function and lifespan in *D. melanogaster*.

12th Japanese Drosophila Research Conference, 2016 年 9 月 11 日, 東京

Kazutaka Akagi, Subhash D. Katewa, Kenneth A. Wilson, Mauricio Ortega,
Jesse Simmons, Subir Kapuria, Heinrich Jasper, Pankaj Kapahi.

Dietary restriction improves intestinal cellular fitness through *dMyc* to enhance
gut barrier function and lifespan in *D. melanogaster*.

Frontiers in aging research toward healthy longevity, 2016 年 11 月 17 日, 東京

Kazutaka Akagi, Subhash D. Katewa, Kenneth A. Wilson, Mauricio Ortega,
Jesse Simmons, Subir Kapuria, Heinrich Jasper, Pankaj Kapahi.

栄養制限は dMyc の発現を介して腸管での細胞適応度を上昇させ、腸管バリア機能
および寿命を向上させる

第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 12 月 1 日, 横浜市

Haruka Nishida, Kazutaka Akagi, Hitoshi Ueda.

The advantages of repressor usage for a precise timer system

第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 12 月 1 日, 横浜市

4. その他、セミナー等

なし

III. 競争的資金獲得実績

1. 日本医療研究開発機構

なし

2. 厚生労働省

なし

3. 文部科学省

なし

4. 財団、その他

なし