

長寿科学の最前線

Vol.1

長寿科学研究者支援事業
平成25年度 研究報告集

公益財団法人 長寿科学振興財団

はじめに

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

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

このたび、平成25年度に実施しました長寿科学研究者支援事業において、研究助成を行いました10名の研究者から、提出された研究実績報告書を取りまとめて研究報告集を作成いたしました。

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

平成26年10月

公益財団法人 長寿科学振興財団

理事長 祖父江 逸郎

目 次

はじめに	1
I. 長寿科学研究者支援事業	
助成実績	7
採択者一覧（平成 25 年度～平成 20 年度）	9
II. 平成 25 年度 研究実績報告書	
① 高齢者の転倒リスクに対する自覚・受容能力の評価に関する研究 国立長寿医療研究センター	17 近藤 和泉
② 高齢者にも安全に用いる事が可能な薬剤含有可食性フィルムを用いた新たな歯科治療法・ 薬剤投与法・ドラッグデリバリーシステム（DDS）の開発研究 国立長寿医療研究センター	21 小澤 総喜・角 保徳
③ 血液脳関門の機能を制御する人工遺伝子エレメントの作成 国立長寿医療研究センター	27 中西 章
④ 高齢者施設における皮膚真菌症治療の適正化および効率化を目指した 治療プロトコルの立案 東京女子医科大学	33 常深 祐一郎
⑤ オートファジー制御がタウ病態に与える影響の解析 国立長寿医療研究センター	39 吉池 裕二
⑥ 認知症脳内タウ病理蓄積物の解析とタウを標的とした免疫療法の 開発に関する研究 国立長寿医療研究センター	43 吉田 裕孝
⑦ 免疫老化制御による加齢関連疾患治療戦略に関する研究 慶応義塾大学	47 新村 健
⑧ 疾患特異的 iPS 細胞と百寿 iPS 細胞を用いた認知症の病態解明と創薬への展開 慶応義塾大学	51 伊東 大介
⑨ 骨格筋萎縮における鉄の意義の解明 徳島大学大学院	53 池田 康将
⑩ 超長寿・がん化耐性齧歯類ハダカデバネズミを利用した 新規老化／癌化予防機構の解明 北海道大学	57 三浦 恭子

I 長寿科学研究者支援事業
助成実績
採択者一覧

長寿科学研究者支援事業 助成実績

年度	採択研究者数 (単位:人)	助成額 (単位:円)	継続・新規別 採択数
25年度	10	17,035,229	継続:5 新規:5
24年度	10	15,731,242	継続:6 新規:4
23年度	7	15,076,633	継続:4 新規:3
22年度	7	18,800,000	新規:7
21年度	0	0	都合により 実施せず
20年度	4	17,012,600	新規:4
合計	38	83,655,704	

平成25年度 長寿科学研究者支援事業 採択者一覧

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

平成24年度 長寿科学研究者支援事業 採択者一覧

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

平成23年度 長寿科学研究者支援事業 採択者一覧

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

平成22年度 長寿科学研究者支援事業 採択者一覧

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

平成21年度 長寿科学研究者支援事業

都合により、平成21年度の支援事業は実施しなかった

平成20年度 長寿科学研究者支援事業 採択者一覧

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

Ⅱ 平成25年度 研究実績報告書

研究実績報告書

1. 研究代表者

所属・職名 : 独立行政法人国立長寿医療研究センター・部長
氏 名 : 近藤 和泉

2. 研究期間

平成25年4月1日 ～ 平成26年3月31日

3. 研究課題

高齢者の転倒リスクに対する自覚・受容能力の評価に関する研究

4. 研究活動の概要

<研究目的>

通常の場合、転倒は重大な事故には至らないが、高齢者の場合、転倒して受ける外力に対する防衛機転が十分に働かず、骨折や頭蓋内の出血など重大な損傷を招く危険性が高い。転倒はさらに心理的な負担も増大させる。すなわち、再び転倒することに対する恐怖から、身体を動かすこと全体に対する意欲を減少させる。意欲低下は不活動につながり、さらに不活動は廃用を引き起こす。廃用は筋力低下および骨の脆弱化をまねき、さらに骨折のリスクを増大させる。したがって、高齢障害者において転倒・転落を未然に防ぐことは、外傷を予防するだけではなく、その後の廃用性の変化を防ぐ上で非常に重要な意味を持つことになる。

転倒に関係するのは上記に加えて、覚醒レベル、眠剤などの薬物使用、管理のあり方などがあげられるが、最も大きな位置をしめるのは、立位バランス保持の能力である。バランスを保持する能力が健常であれば、そこに他の要因が加わったとしても、転倒のリスクは低くなる。例えば重度の認知症患者でも、立位バランス能力が保たれていれば転倒には至らない。逆に、立位バランス能力の障害がある場合、自分に転倒リスクがあることへの自覚および他者からの指摘に対し、それを受け入れる能力(コンプライアンス)が必要となる。立位バランス能力が低くても、コンプライアンスが高ければ危険を回避することができる。したがって、立位バランス能力とコンプライアンスは相補的であり、片方の障害が重度であっても、他方が健常であれば、転倒は起こらない。

高齢者は、認知症の合併、難聴および年寄り特有の頑固さなどによって、予知できる危険を回避するための周囲からの忠告・助言を無視することが多く、コンプライアンスは低下していると考えて良い。そこでコンプライアンスを評価しそれを考慮した上での介入および環境整備が必要となる。

本研究の目的は、このコンプライアンスを評価するための尺度を考案し、それを投入した場合の効果を検証することである。このような評価尺度を病棟での安全管理に導入できれば、転倒事故を減らすことにつながると考える。

<概要>

本研究は、Phase I～IV の4段階で構成される。

Phase I: 研究参加医療機関における転倒・転落インシデントの情報をまとめその特性を調べる。(半年)

Phase II：研究者らが考案し標準化の作業が終了している立位バランス評価尺度である standing test for imbalance and disequilibrium (SIDE)およびその他の既存の転倒・転落アセスメントを用いて転倒・転落予測の精度を比較する。(1年)

Phase III：SIDEに加えて、コンプライアンス評価を投入し、予測精度を検討する。(半年)

Phase IV：SIDEにコンプライアンス評価を加えた場合のカットオフ値を超えて転倒リスクの高い患者に対して、積極的な介入および環境整備を行い転倒の発生数をPhase I およびPhase II, Phase IIIと比較検討する。(1年)

<対象>

長寿医療研究センター病院および、七栗サナトリウム回復期リハビリテーション病棟に入院した高齢患者とする。

<方法>

Phase I

後ろ向きに1年間の長寿医療研究センター病院および、七栗サナトリウム回復期リハビリテーション病棟の入院患者を抽出し、記録から入院時の状態および入院期間中の転倒歴を電子カルテシステムの看護記録、リハビリ記録、インシデントレポートから取得する。得られた情報を整理し、入院患者全体、および転倒患者の特性、転倒の傾向を解析する(調査に半年間)。

Phase II

前方視的に1年間の患者の入院時にSIDE、STRATIFY、研究参加医療機関の転倒アセスメントシートを用いた評価を行い、入院後転倒が発生した場合には、インシデントレポートの情報に加え発生状況について聞き取り調査を行う。得られた情報から、それぞれのリスクアセスメントのROC曲線を作成しROC曲線下面積(AUC: area under the curve)およびYouden indexを用いてcut off値を決定し、予測精度を評価する。

同時に、consensus methodのnominal group discussion technique(NGD)を用いて多職種による検討を行い、コンプライアンスの評価方法およびそれをSIDEと組み合わせて使った場合の管理(介入および環境整備)方法について決める。このNGDによるコンプライアンス評価の方法の策定および、SIDEと組み合わせて使った場合の管理方法が、この研究の主要な部分となる。両者の方法が策定された段階で、全国の各施設に評価シートを送付し、賛同が得られた施設に対し研究方法などの解説を行った上で、次のフェーズで多施設共同研究の準備をする(目標施設200)。

Phase III

Phase IIで得られたcut off値に対して、SIDEおよびコンプライアンス評価で得られた転倒危険度毎の管理方法を適用する多施設共同研究を行う(半年間)。転倒発生事例については、Phase IIと同様の情報収集を行う。再度SIDEにコンプライアンス評価によるROC曲線を作成しROC曲線下面積(AUC: area under the curve)およびYouden indexを用いてcut off値を決定する。

Phase IV

多施設共同研究を継続し、Phase IIIで得られたcut off値を基準とした管理を行い(1年間)、転倒発生頻度の変化をphase I、phase II、phase IIIと比較する。

昨年度までの段階で、Phase IIのコンプライアンス評価の方法の策定が完了しておらず、Phase IIIの開始が、平成25年度後半にずれこむものと予想される。このためPhase IVのデータ収集期間を半年間に短縮して、結果を出すことを想定している。

5. 研究の成果

Phase I では、転倒事例を動作管理方法から分析し求められる転倒危険度評価を検討した。対象は1年間に藤田保健衛生大学七栗サナトリウム回復期リハビリテーション病棟を退棟した患者513名とした。方法は入院期間中の転倒発生の有無、転倒があった場合は、入棟後期間および動作管理方法による決定木分類を用いて分析を行った。転倒発生時期は15日刻みで検討した。その結果、入棟中の転倒者数は120名、転倒発生件数は163件であった。転倒発生率は4.65(%)で、複数回転倒症例は30例であった。また、発生時期は、入棟後15日以内が有意に多かった。動作管理方法による決定木分類では、抑制やセンサーをすり抜けての発生(62件)や、抑制やセンサーを使用していない患者の予想外の行動で発生(55件)、許可された動作で発生(26件)が多かった。

Phase II として、転倒回避のための指示に対する Adherence の評価方法の考案を nominal group discussion(expert panel)の手法を使って行った。二回の panel において初回は、「行動制約時に約束を守れない患者、危険行動を行って患者とは、どんな患者か」を検討し、参加者は、医師1名、PT2名、OT2名、ナース2名、コーディネータ1名であった。二回目の panel では「行動制約時に約束を守れない人、危険行動を行ってしまう人を見つける評価法」を考案した。この参加者は医師1名、PT2名、OT2名、ナース2名、コーディネータ1名であった。その結果、別紙に示す様な Adherence の評価用紙が完成し、Phase IV での検討を行った。

同じく七栗サナトリウム回復期リハビリテーション病棟において前方視的な検討を行った。アウトカムメジャーは、SIDE, Stratify、回復期リハビリテーション病棟協会の転倒アセスメントシートおよび七栗サナトリウム独自のものを使用した。対象は、558名で、検討期間中の全転倒数は103回であった。入院中の全期間および入院から2週間までの期間の転倒事象に関して、Stratify、回復期リハビリテーション病棟協会の転倒アセスメントシートおよび七栗サナトリウム独自のアセスメントシートの入院時所見を下にROCカーブを描いたが、その全てでいわゆる左上方凸のROCカーブを得ることが困難で、cut-off値の設定は不可能であった。それに対して、SIDEによるスクリーニングでは、全期間中の転倒で79.3%が、入院から2週間以内の転倒で100%がSIDE level 2a以下であり、転倒予測に関するSIDEの実効性が立証された。

Phase IV では、Phase II で開発した Adherence の評価用紙を用いて、国立長寿医療研究センターの回復期リハビリテーション病棟における転倒予測を行った。対象は40名で、その内7名で転倒が発生したが、Adherenceの側面において、この7名に共通した特徴を見いだすことができず、今後、さらに対象を増やしての検討を行うか、評価シート自体の改変が必要と考えられた。

Adherence評価用紙

検査日 _____ 検査ID _____ 患者氏名 _____
 年齢 _____ 性別 _____

転倒発生時の聞き取り

転倒者ID _____
 発生日 _____
 発生時間 _____
 発生場所 _____
 内容 _____

● **メタ認知の項目**
 ○ ・ x
 SIDEを予測させる、過大評価したら ×
 あなたは、どれならできると思いますか？
 IV 片足立ちを30秒できる



III 継ぎ足立位が両方5秒以上できる



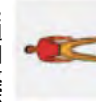
IIb 継ぎ足立位が片方だけ5秒以上できる



IIa 足を閉じて5秒以上立っていられる



I 開脚立位が保持できる



0 何かにつかまらなくては立ってはいられない



メタ認知SIDE level _____
 実際のSIDE level _____

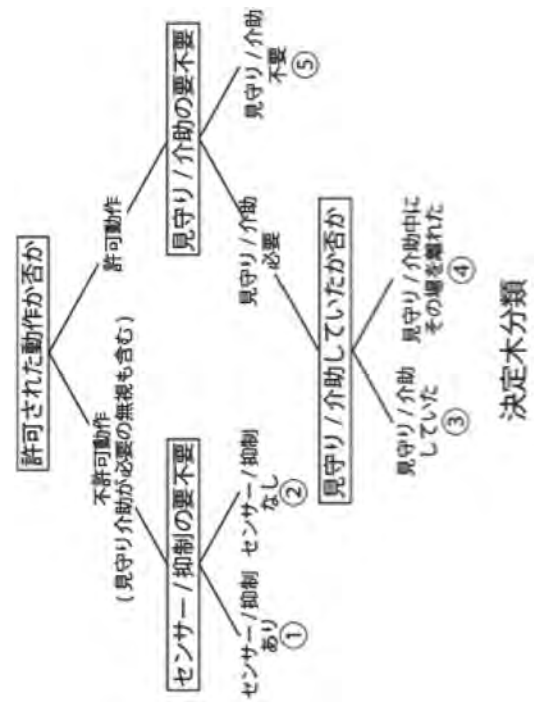
● **指示遵守の項目**
 できる・できない 私の姿が見えなくなったらナースコールを押しして検査が終わりましたと言ってもらう。

● **衝動性の項目**
 できる・できない 前を向いたまま、振り返らないで下さいと伝へ、後ろで鈴の音を出し振り返らずにいられる。

● **性格の項目**
 できる・できない 家族に遠慮がち・せっかち・我慢できない・人かを聞く。

x、または、できないが1つでもあれば陽性 adherence項目 陽性・陰性

転倒の分類



研究実績報告書

1. 研究代表者

所属・職名 : 独立行政法人 国立長寿医療研究センター・
歯科口腔先進医療開発センター 歯科口腔先端診療開発部
氏 名 : 角 保徳、小澤 総喜

2. 研究期間

平成25年4月28日 ～ 平成26年3月31日

3. 研究課題

高齢者にも安全に用いる事が可能な薬剤含有可食性フィルムを用いた
新たな歯科治療法・薬剤投与方法・ドラッグデリバリーシステム (DDS)
の開発研究

4. 研究活動の概要

<研究背景>

我が国は世界に類を見ない高齢社会を迎えつつあり、高齢化の進展、疾病構造の変化、医療技術の進歩等により、医療に求められるものが、高度化・多様化してきている。急速な高齢化に伴い、摂食・嚥下機能や認知機能が低下した高齢者が年々増加している。摂食・嚥下機能低下を認める高齢者では、「錠剤やカプセルの誤嚥」、「薬剤残留による食道炎」、「散剤の口腔内停留」などが散見される。認知機能低下を認める高齢者では、薬剤コンプライアンスの低下は著しい。これらの高齢者でも安全かつ快適に実施できる新たな薬剤投与方法が求められている。

口腔は病変に直接薬剤を投与可能な領域であるものの、歯周組織炎等の口腔疾患の薬剤治療では、内服や注射などで治療薬を全身投与する事が一般的である。その際、適量の治療薬を投与した場合においても、下痢などの消化管症状や皮膚の薬疹、肝機能障害といった薬剤の副作用が発現する場合がある。これらの副作用は濃度依存性である事が多く、予備力が低下している高齢者では、発現の頻度が高い傾向にあり、その症状の重症化も散見される。そのため治療薬の総投与量を少なくかつ病変部の有効濃度を維持可能とする新たな口腔疾患への Drug Delivery System (DDS) が求められている。

<研究目的>

本研究では、安全な食品から構成され無害な可食性フィルムを用いた高齢者にも安全に用いる事が可能な歯科治療法・薬剤投与方法・DDS を開発する事を目的とする。

可食性フィルムは、口腔粘膜によく張り付き、溶解時間を数十秒から数時間で設定可能である。そのため摂食・嚥下機能低下を認める高齢者においても誤嚥などの心配なく実施可能である。さらに複数の薬剤を混和したフィルムを患者毎にオーダーメイドすることで、多剤内服を必要とする高齢者においても薬剤コンプライアンスの向上が期待できる。可食性フィルムによる新たな DDS は、既存の口腔用軟膏と異なり投与後すぐに唾液で洗い流される事は無く、持続的に口腔粘膜から薬剤が吸収され、継続的な薬剤効果を期待できる。

<平成 23 年度（初年度）の成果のまとめ>

初年度、本研究では評価が明瞭である表面麻酔用可食性フィルムを第一号と決定し、麻酔薬含有可食性フィルムの開発を開始した。予備的な検討として、リドカイン含有の可食性フィルムを開発したところ、口腔粘膜に付着を認め麻酔効果も高く、製品化に耐えうる期待が得られた。より早い製品化を目指し、すでに口腔粘膜の表面麻酔薬として販売実績のある薬剤の剤形変更を行う事となった。倫理委員会承認の下、表面麻酔用可食性フィルムの試作品の臨床応用を行った。対象は健常者 6 名とし、方法は手順①歯科麻酔の必要な部位に、表面麻酔用薬剤含有可食性フィルム（7×7mm 方形、厚さ 300 μm、麻酔薬含有量 7.7mg）を張り付ける、手順②表面麻酔用薬剤含有可食性フィルムを貼り付けた 1, 3, 6, 9, 12, 15 分後に、33G 注射針で上記の貼付部位の歯肉に 2 mm まで刺入し、痛みの大きさを、VAS (Visual Analogue Scale)、PRS (Pain Rating Score)、NRS (Numerical Rating Score) にて被検者が記載する方式で評価を行った。（※コントロールには既存の剤形を使用して評価を行った。）結果、既存の薬剤と同等の麻酔効果を認めたが、いくつかの改善点が明らかになった。

<平成 24 年度（2 年度）の成果のまとめ>

初年度の研究にて得られた表面麻酔用可食性フィルムの試作品の問題点を改善した。問題点の項目は、①付着性、②薬剤含有量、③溶解時間、④品質保持（乾燥防止）であった。表面麻酔用可食性フィルムの付着性を向上させるため、口腔粘膜に高い付着性を有するフィルム素材を複数選び出し、その中でも含有させる麻酔薬が溶解する溶媒と親和性が高い素材を選択することで対応した。薬剤含有量は剤形変更申請の基準を遵守することとなった。薬剤含有量は、既存薬と同等である事が求められるため、十分な麻酔効果を代替するため表面麻酔用可食性フィルムの溶解時間をさらに短い時間に設定する工夫を図った。フィルム基剤および溶媒の選定と作成時の条件と包装方法を検討することで、問題点の克服を図った。

<平成 25 年度（3 年度）の報告>

初年度・2 年度で抽出された問題点をフィードバックし、麻酔薬含有試作可食性フィルムについて、薬事申請を目指した開発研究および安定性試験を実施した。前年度の検討で①付着性、②薬剤含有量、③溶解時間について良好な結果を得られた、ポビドンベースフィルムおよび PVA ベースフィルムの安定性試験を実施した。

1： 表面麻酔用薬剤含有ポビドンベースフィルムの安定性試験

表面麻酔用薬剤含有ポビドンベースフィルム（基剤：ポビドン（59.74%）、ショ糖脂肪酸エステル（20%）、濃グリセリン（4%））に市販されている表面麻酔剤の成分を含有させ、薬剤含有可食性フィルムを試作した。そのフィルムを安定性試験（40℃・6 ヶ月）に供した。

結果：

①性状、外観

作成直後、硬めの張りのある性状で白色のフィルムであったが、40℃・1 ヶ月保管後は柔らかい、べたつきがある微黄色のフィルムに変化した。

保管前



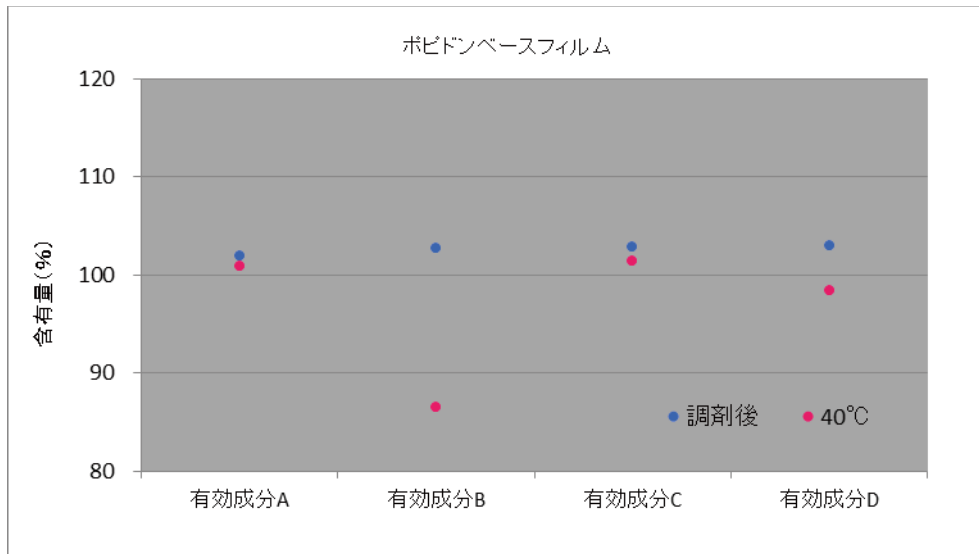
40°C
1ヵ月後



1/4 折りの状態

②有効成分の含有量

表示量に対する含有率（単位：％）



成分	有効成分 A	有効成分 B	有効成分 C	有効成分 D
調剤後	101.9	102.8	102.9	103.0
40°C保管	100.9	86.5	101.4	98.4
含有率	99.0	84.2	98.6	95.6

40°C・1ヵ月保管後、有効成分 B は大きく減少した。

上記の如く、表面麻酔用薬剤含有ポビドンベースフィルムは薬事申請にそぐわないことが確認された。

2：表面麻酔用薬剤含有 PVA ベースフィルムの安定性試験

表面麻酔用薬剤含有 PVA ベースフィルム（基剤：PVA（58.74％）、シヨ糖脂肪酸エステル（20％）、マクロゴール 400（5％））に市販されている表面麻酔剤の成分を含有させ、薬剤含有可食性フィルムを試作した。そのフィルムを安定性試験（40°C・6ヵ月）に供した。

結果：

①性状，外觀

40℃，2 ヶ月保管後、コントロールとした冷蔵保管品と性状に差異は認められなかった。色調もわずかに黄色味を帯びていると感じる程度で大きな変化はなかった。

2 ヶ月保管後

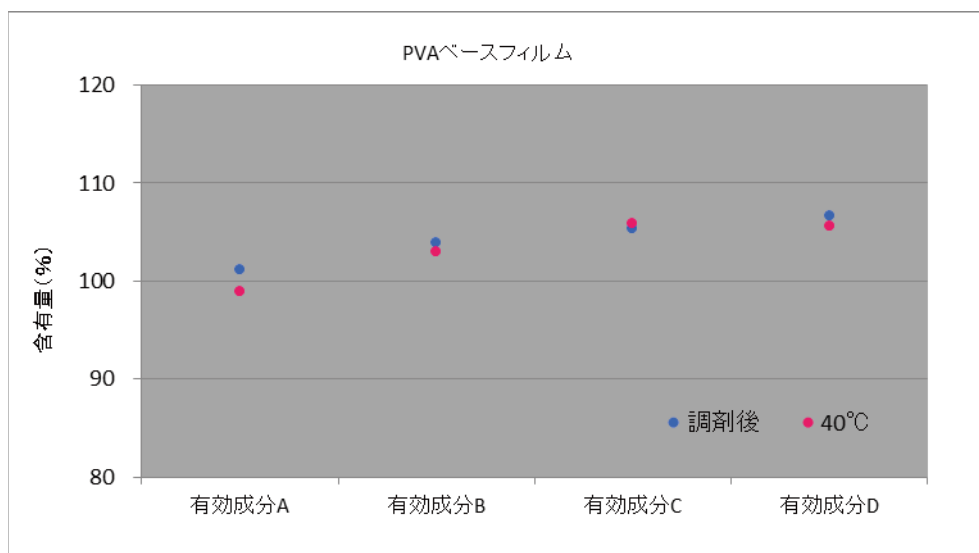


冷蔵保管

40℃保管

②有効成分の含有量

表示量に対する含有率（単位：％）



成分	有効成分 A	有効成分 B	有効成分 C	有効成分 D
冷蔵保管品	101.2	103.9	105.4	106.7
40℃保管品	98.9	103.0	105.9	105.7
含有率	97.7	99.1	100.5	99.0

40℃・2 ヶ月保管後も有効成分含有量に大きな変化はなかった。

上記の如く、表面麻酔用薬剤含有 PVA ベースフィルムは2 ヶ月経過したところであるが、安定していることが判明した。

考察

上記の結果、表面麻酔用薬剤含有 PVA ベースフィルムが安定性に優れ、有効であることが確認された。今後、同フィルムの安定性試験を6 ヶ月まで継続し、同時に、生物学的同等性試験を行う予定である。その結果を踏まえて、平成 26 年度を目処に医

薬品医療機器総合機構に薬事相談を行い、今後の製品化に向けて着実に前進する予定である。

<今後の課題>

表面麻酔用薬剤含有 PVA ベースフィルムにて、医薬品医療機器総合機構に薬事相談を行うとともに、薬事申請に必要なデータを収集し、製品化を目指す。さらに歯周病・抜歯手術後用可食性フィルムの開発のための情報収集など検討を開始する。

5. 研究の成果

特許出願中：麻酔用可食性フィルム

研究実績報告書

1. 研究代表者

所属・職名：独立行政法人 国立長寿医療研究センター
老化制御研究部 遺伝子治療研究室・室長
氏 名：中西 章

2. 研究期間

平成 25 年 4 月 1 日 ～ 平成 26 年 3 月 31 日

3. 研究課題

血液脳関門の機能を制御する人工遺伝子エレメントの作成

4. 研究活動の概要

I. 背景

アルツハイマー病を含む認知症の予防・治療において、脳実質への直接投与が可能であれば効果が期待できる薬剤は多数ある。しかし、これらの多くは脳実質への物質輸送を制御している血液脳関門(Blood Brain Barrier: BBB)によってその脳内導入が阻害され、結果的にその投与効果が消失してしまうことが問題となっている。本研究は、この BBB の主体となる脳毛細(微小)血管内皮細胞(Brain Microvascular Endothelial Cells: BMVEC)の機能制御を目的として、当該細胞特異的かつ強力に遺伝子発現を誘導できる発現調節領域(発現プロモーター)の作成を試みる。

BMVEC 特異的な発現を誘導する遺伝子発現調節領域の解析は、既に幾つかの血管内皮細胞特異的とされる種々のプロモーターで行われている。しかし、いずれも BMVEC に特異的かつ強力な発現を達成しているものはみられない。外来遺伝子発現に際しては、天然のプロモーター・エンハンサーの活性では十分な発現量を確保できないのが一般的であり、人工的に遺伝子エレメントを再構成して強力な遺伝子発現調節領域を作成することが欠かせない。我々はポリオーマウイルスを用いたエンハンサートラップ法を利用することにより、細胞特異的に遺伝子発現調節ができる人工遺伝子エレメントの作成を試みる。ポリオーマウイルスには、短い転写因子結合断片がコンパクトかつ稠密に凝縮された発現調節領域が存在し、ウイルス DNA からの転写そしてウイルス DNA 複製両方に対するエンハンサーとして機能している。この領域はまた変異しやすいことが知られており、過去の研究では細胞内でのウイルス増殖の過程で外来 DNA 断片を容易に取り込んで新規の発現調節領域を作り出せることが報告されている(Weber et al. Cell 36:983-992, 1984; Günther et al. J. Virol. 86:3135-3142, 2012)。

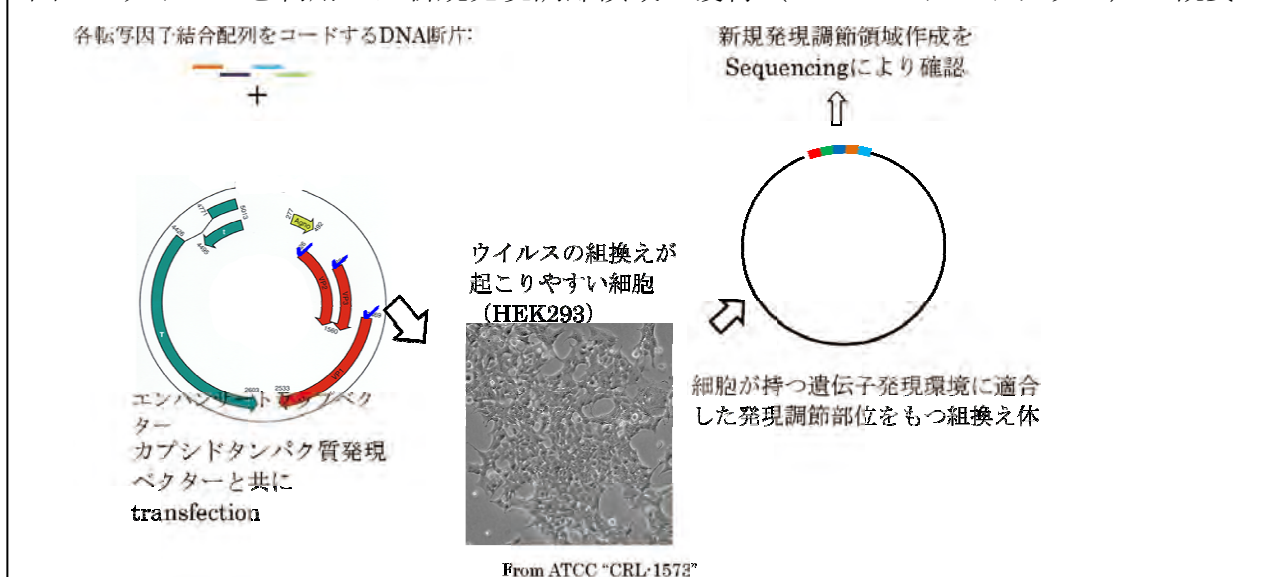
BMVEC 特異的な発現調節領域が作成できれば BBB 機能発現に対する研究分野で様々

な新しいアプローチを作り出すことが可能である。具体的には、BMVEC で特異的な機能遺伝子の発現または発現抑制が可能になることによって、BBB の疾患に関する実験動物モデル創成などの実験システムの開発、それを利用した血液脳関門をターゲットとした創薬、そして BBB 通過を目指したデリバリー担体開発に活用できるアッセイ系の開発などが期待でき、認知症等の中枢神経系疾患への治療薬開発に大きな助けとなる可能性がある。

II. 結果

本実験は、BMVEC 特異的な発現調節領域をウイルスエンハンサートラップ法で作成することを目的とする。具体的には、BMVEC 特異的に発現する遺伝子のプロモーター内に見つかる各種の転写因子結合領域の DNA 断片を二本鎖オリゴ DNA 断片として作成し、これらをポリオーマウイルス DNA と共に BMVEC に導入、当該細胞内で増殖するウイルス DNA を解析する (図 1)。用いるウイルス DNA は、転写因子結合断片が挿入されないと、増殖ができないように発現調節領域を欠損させる。このため、転写因子結合断片がうまく組み合わされ BMVEC での増殖に適応した発現調節領域を獲得できたウイルス DNA のみが増殖できる。このようなエンハンサートラップ法による新規の発現調節領域作成が可能かどうか実証実験を行った。発現調節領域を欠損したウイルス DNA の作成には、ポリオーマウイルスの一種 SV40 のウイルス DNA (SV40VPs-) を鋳型にして、PCR により 144bp の発現調節配列 (SV40 配列 151-293) を欠いたウイルス DNA (5099bp)、Enh(-)SV40DNA、を増幅した。この際、鋳型に用いた SV40VPs- は構造タンパク質 Vp1、Vp2/3 の開始コドンに欠失しており、自立増殖可能な組換えウイルスが発生することはない。

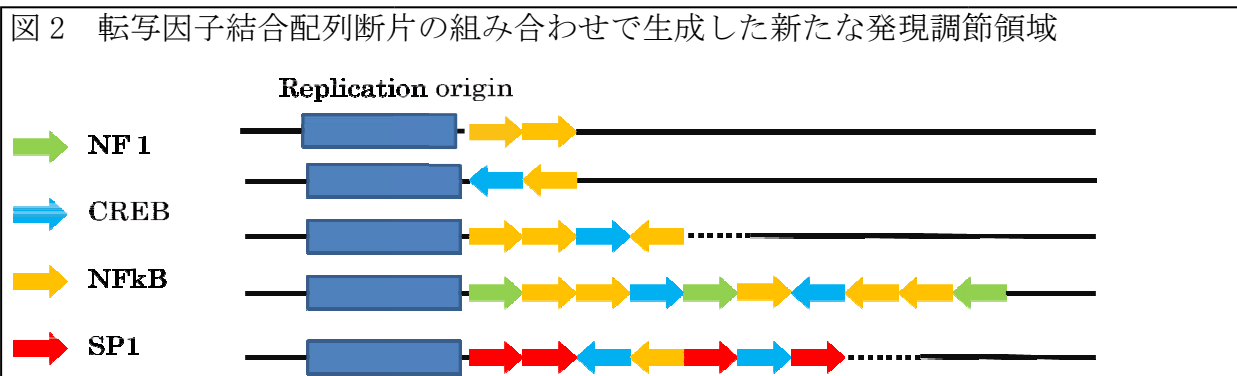
図 1 ウイルスを利用した新規発現調節領域の獲得 (エンハンサートラップ) の概要



Enh(-)SV40DNA と共に、対象細胞で機能していると思われる種々の転写因子の結合領域をコードする二本鎖オリゴを共に細胞に導入する。例えば、どの細胞でも発現を誘導できる発現調節領域を作成するためには、CREB, SP1, NF-1, NF- κ B、などの一般的

とされる転写因子の結合部位をコードする二本鎖オリゴを用いる。一方、BMVEC に特異的な発現を誘導できる発現調節部位の作成を期待するためには、当該細胞特異的に機能すると考えられる転写因子結合部位をコードする二本鎖オリゴを使用する。

Enh(-)SV40DNA と一般的な転写因子、NF-1, NFκB, CREB, SP1、をコードする二本鎖オリゴを共に HEK293 細胞へリン酸カルシウム法を用いてトランスフェクションを行った。その後 modified Hirt DNA 抽出法(Biotechniques. 1998; 24(5): 760-2)によってウイルス DNA 画分を抽出した。このウイルス DNA を鋳型にして、発現調節領域を含む断片を PCR で増幅し、Mighty Cloning kit (Takara) で pUC118 にクローニングし、各コロニーから DNA を抽出、シーケンス解析を行い、発現調節領域にあたる配列を確認した。この実験の結果、新たな発現調節部位を獲得した組換えウイルスは 5 種検出できた (図 2)。各発現調節部位は、転写因子結合領域が 2~10 連結しており、向きも一定では無かった。一部の領域ではシーケンスが非常に困難で (図 2 での点線部分)、DNA 自体が高度な 2 次構造を取っている可能性が考えられた。



同様に、ヒト BMVEC である hCMEC/D3 細胞を用いて、BMVEC で機能する発現調節領域の作成を試みた。hCMEC/D3 細胞に対して、Enh(-)SV40DNA と一般的な転写因子結合部位をコードする二本鎖オリゴ、あるいは BMVEC 特異的に機能すると考えられた転写因子をコードする二本鎖オリゴと共導入する実験を 3 回 (18 実験区) 行ったが、新たな発現調節領域を持った組換え体の検出が困難であった。組換えウイルス DNA の検出感度をあげるため、Exonuclease IV (Plasmid safe; Epicenter) と Phi29 DNA polymerase (TempliPhi; GE HealthCare) をもちいてウイルス DNA の特徴である環状 DNA のみを増幅したところ、1 実験区のみで環状 DNA を検出できた (図 3)。現在この DNA より発現調節部位の増幅・解析を試みている。

本研究は組織特異的な人工遺伝子による発現調節を実験動物レベル (マウス) 確認することも視野に入れているため、Murine Polyomavirus (MPyV) を利用しての人工遺伝子エレメントの作成を試みた。SV40 を使用した場合と異なり、自立増殖が可能な組換えウイルス DNA (MPyV DNA) を使用出来るように、遺伝子組換え実験の物理的封じ込めレベルを大臣確認申請により確認を行った (25 受文科振第 2118 号)。MPyV の発現調節エレメント 5057-5293 を欠損したウイルス DNA、Enh(-)MPyV を PCR で作成し、先に使用した CREB, SP1, NF-1, NF-κB 等の転写因子結合部位をコードする二本鎖オリゴ、または BMVEC 特異的と考えられた転写因子結合部位をコードする二本鎖オリゴ

と共にマウス脳血管内皮細胞 bEnd. 3 あるいはマウス繊維芽細胞 3T6 に導入した。これらの細胞に加え、新生児マウスより BMVEC を採取・不死化した細胞を作成したが (Burek et al. J. Vis. Exp. 66, e4022, 2012)、DNA 導入までは至らなかった。bEnd. 3、3T6 についてはトランスフェクションの後 3 週間細胞を継代し、modified Hirt 法によってウイルス DNA を抽出した。ウイルス DNA と考えられる DNA が抽出できた場合は、これを鋳型として発現調節領域を増幅・クローニングしその塩基配列を決定した。3T6 細胞を用いた実験では、12 の実験区のうち 8 つでウイルス DNA が検出できたが、塩基配列決定の結果いずれも野生型のウイルス DNA であり、新規の発現調節領域の生成は確認できなかった (図 3)。野生型が検出された理由としては 3T6 細胞自身が野生型ウイルスの増殖に極めて適しているため、実験上の非常にわずかな野生型 DNA の混入によっても野生型が増殖してしまったと考えられる。一方 bEnd. 3 細胞を用いた場合は、24 の実験区いずれについてもウイルス DNA が検出できなかった。これらの場合も hCMEC/D3 細胞の場合ように環状 DNA のみを増幅したところ、2 実験区で環状 DNA を検出できた (図 3)。しかしこの DNA からの発現調節部位の増幅は困難であり、その発現調節部位の解析ができなかった。

図 3 エンハンサートラップによる新規発現調節エレメント挿入の検討

エンハンサートラップベクター	導入した細胞	増殖クローン/実験回数
Murine Polyomavirus	bEnd.3	2/24
SV40	hCMEC/D3	1/18
Murine Polyomavirus	3T6	8/12

5. 研究の成果

本研究では、BBB の主体である BMVEC に特異的な発現プロモーターの作成をめざし、ウイルス-エンハンサートラップ法を利用した新規な発現調節部位の作成が可能か検討した。今回の研究結果は、エンハンサートラップ法によって新規の発現調節領域の獲得が十分可能であることを示したが、同時にエンハンサートラップが容易な細胞に限られていることも明らかにした。この原因としては、(1)二本鎖オリゴを再構成してウイルス DNA に取り込ませる為に必要な機能 (Non-homologous end joining 機構) が強く働いていない、(2)細胞内でウイルス増殖が阻害されている、などの可能性が考えられるが、(2)については、hCMEC/D3、bEnd. 3 共に対象ウイルスの遺伝子を発現しており、ウイルス DNA 複製の阻害は考えにくい。(1)が原因の場合は、DNA 修復応答などの当該機能が增強される刺激を細胞に加えるなどの方法も考えられる。あるいは細胞内での組換えに依存しないように、予めランダムな転写因子結合配列の組み合わせ配列を発現調節領域に持つ組換えウイルスライブラリーを *in vitro* で作成して、BMVEC で増殖可能なものを選択するといったアプローチも考えられる。

また、本研究を遂行する過程で BMVEC 特異的に機能亢進しているとされる転写因子群を予想することができた。実験的証明を経ない仮想的な候補であるが、これらの中

には既に血管内皮細胞での特異的な機能発現が証明されている転写因子が含まれており、他の転写因子も BMVEC で知られている種々の機能発現に関わる因子であり、これまでの知見と矛盾はない。もちろん今後の研究で BMVEC の機能発現・維持における当該転写因子の役割について実験的な証明を行うことが必要であるが、BMVEC の機能制御メカニズムの解明に一助となる結果である。

今回の研究では本来の目的を完結できるまでには至らなかったが、BBB の主体である BMVEC 特異的な発現調節領域の作成に向かっての足がかりを構築できたと考えている。

研究実績報告書

1. 研究代表者

所属・職名 : 東京女子医科大学皮膚科 准教授
氏 名 : 常深祐一郎

2. 研究期間

平成25年4月1日 ～ 平成26年3月31日

3. 研究課題

高齢者施設における皮膚真菌症治療の適正化および効率化を目指した
治療プロトコールの立案

4. 研究活動の概要

背景

我が国では高齢化が進み、高齢者施設や在宅での医療が重要となっている。高齢者は自立度が低下し、入浴や清拭も不十分になり、尿や便の失禁も多い。免疫能も低下する。このため足白癬や爪白癬をはじめとした真菌症やいわゆる「おむつ皮膚炎」（ここではおむつと接する部位に生じる紅斑、丘疹・小水疱、浸軟・鱗屑、びらん等よりなる病変とする）の頻度が高くなる。高齢者施設に皮膚科医が常勤でいることは稀で、皮膚科を専門としない医師や看護師等の判断で対応がなされているのが現実であり、やむを得ないとはいえ、結果として不適切な処置や治療となっている。足の鱗屑や爪の混濁は白癬以外の多くの疾患が原因となる。「おむつ皮膚炎」にも真の湿疹・皮膚炎とカンジダ等による真菌感染症が含まれる。しかし真菌症を心配し視診のみで判断されて抗真菌薬が塗布されていることが多い。真菌症と他の疾患は視診だけの鑑別は難しく、真菌症でなければ抗真菌薬で改善しない。しかも抗真菌薬には刺激性があるため、さらなる悪化も少なくない。また、抗真菌薬を使用すると真菌検査の検出率が低下し、皮膚科専門医であっても診断が困難となる。このような事情から足白癬や爪白癬、「おむつ皮膚炎」は看護上の重要な疾患であり、対策を講じる上でその実態を把握することが必要となる。また、皮膚科医が不在の環境下で施設の医師でも診断が可能となる簡便な手段や、施設の看護職員が対応する際の治療アルゴリズムの確立が望まれている。

目的

高齢者施設において、足白癬や爪白癬、「おむつ皮膚炎」の現状を把握し、簡便に診断することができる手段を検討し、現在と比較してより精度の高い診断及びより適切な治療が現場で行える方法を確立することを目的とする。

(1) 高齢者施設の足白癬及び爪白癬ならびに「おむつ皮膚炎」の疫学データの取得
高齢者施設入所者の足および臀部の診察を行い、直接鏡検を行うことにより、足白癬や爪白癬、臀部の真菌症（白癬及びカンジダ症）の疾患の疫学データを得る。

(2) 糸状菌検出試験紙の性能の評価

糸状菌に対するモノクローナル抗体を用いてクロマトグラフィーの原理によって糸状菌を簡便に検出できる試験紙が研究試薬として開発された。この試験紙は検査手技が簡便であり、特殊な検査機器を必要としないうえ、結果の判定が肉眼で容易にできるため、皮膚科専門医不在の施設での活用が期待される。しかし研究試薬であるため臨床データはわずかであり、

本研究ではその有用性を検討する。

(3)「おむつ部皮膚炎」の治療アルゴリズムの検証

研究責任者の臨床経験と予備調査からおむつ部については皮疹があっても真菌症ではなく湿疹の頻度が高いことが推測されたため、「おむつ部皮膚炎」に対して最初にステロイドを塗布し、改善しない場合に皮膚科医による真菌学的検査を行うという治療手順を設定し、このアルゴリズムの妥当性を検証する。

(4)足白癬・爪白癬および「おむつ皮膚炎」の簡易診断・治療方法の確立

上記(1)-(3)の結果を統合し、施設の医師でも診断が可能となる手段や皮膚科医の診察が受けられるまでに看護職員によって実施可能な対応方法を考案する。

方法

(1)施設

東京都練馬区および東京都大島町の複数の高齢者施設において本研究を実施する。薬剤を使用する「おむつ皮膚炎」治療の研究については外部の倫理委員会の承認を得ている。

(2)調査チーム

研究代表者である常深祐一郎（医学博士、日本皮膚科学会認定皮膚科専門医、日本医真菌学会認定医真菌専門医）を責任者として東京女子医科大学皮膚科（主任：川島 眞教授）所属の皮膚科医と、高齢者の看護および疫学調査に精通した東京大学大学院医学系研究科老年看護学／創傷看護学分野（主任：真田弘美教授）の看護師研究者より構成する。なお特定非営利活動法人皮膚の健康研究機構および合同会社EBC&Mより事務局としての協力を得て行う。

(3)調査研究手順

①高齢者施設の足白癬及び爪白癬、「おむつ皮膚炎」の疫学データの取得

高齢者施設において、入所者全員の足および臀部を診察し、趾間、足底、爪、臀部の所見を記録し、各箇所より検体を採取して直接鏡検を実施する。

②糸状菌検出試験紙の性能の評価

直接鏡検で使用したものと同一の検体を試料とし、糸状菌検出試験紙を用いて白癬菌の有無を判定する。直接鏡検の結果と糸状菌検出キットの結果を比較する。

③「おむつ部皮膚炎」の治療アルゴリズムの検証

使用する薬剤はエキザルベ（混合死菌浮遊液/ヒドロコルチゾン配合剤で、二次感染を伴う湿疹・皮膚炎群を適応疾患とするステロイド含有製剤）とアスタット軟膏（ラノコナゾールを含有する軟膏で、白癬やカンジダなどの真菌に幅広く効果を有する）である。エキザルベを1日2回「おむつ皮膚炎」の皮疹部に塗布する。評価を行って改善がみられた場合エキザルベの塗布を継続する。不変または悪化の場合、真菌鏡検を行い陽性の場合、外用薬をアスタットに変更する。陰性の場合、引き続きエキザルベを塗布する。毎週写真撮影を行い、調査担当医師が肉眼所見と写真を合わせて評価を行う。皮疹スコアを0（なし）、1（軽度）、2（中等度）、3（高度）、皮疹の面積スコアを0（なし）、1（ $<50\text{cm}^2$ ）、2（ $50\text{--}200\text{cm}^2$ ）、3（ 200cm^2 ）とする。重症度スコアは皮疹スコアと面積スコアの合計（0-6点）とする。

④足白癬・爪白癬および「おむつ皮膚炎」の簡易診断・治療方法の確立

上記の①～③で得られた結果を統合し、高齢者施設において皮膚科医が不在の環境下で、足およびおむつ部の皮疹に対して、皮膚科専門医の診療を受けるまでに施設の医師や看護師にも可能な診断や治療方法についてのアルゴリズムを作成する。

(4)倫理面への配慮

本調査はヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則、及び臨床研究に関する倫理指針（平成20年7月31日全部改正、厚生労働省）に従う。調査の実施については調査対象施設の外部に設

置された倫理委員会で審査・承認されている。

5. 研究の成果

結果

(1) 高齢者施設の足白癬及び爪白癬ならびに「おむつ皮膚炎」の疫学データの取得
 臀部では何らかの皮疹が72.5%に観察されたが、そのうち白癬が4.8%、カンジダ症が2.4%であった。同様に趾爪では何らかの異常が96.5%にみられ、そのうち白癬が58.3%を占めていた。同様に趾間ではそれぞれ90.2%、22.5%、足底では72.3%、31.4%であった。

(2) 糸状菌検出試験紙の性能の評価

爪白癬に関しては、感度97.8% (89/91)、特異度78.4% (58/74)、陽性適中率84.8% (89/105)、陰性適中率96.7% (58/60)、一致率89.1% ((89+58)/165)であった。

表 1a：鏡検を基準とした糸状菌検出試験紙の爪白癬に対する検出性能

		直接鏡検		
		+	-	計
糸状菌 検出試験紙	+	89	16	105
	-	2	58	60
	計	91	74	165

足白癬に関しては、感度81.3%(39/48)、特異度78.4%(69/88)、陽性的中率67.2%(39/58)、陰性的中率88.5%(69/78)、一致率79.4%((39+69)/136)であった。

表 1b：鏡検を基準とした糸状菌検出試験紙の足白癬に対する検出性能

		直接鏡検		
		+	-	計
糸状菌 検出試験紙	+	39	19	58
	-	9	69	78
	計	48	88	136

(3) 「おむつ部皮膚炎」の治療アルゴリズムの検証

重症度スコア3-6点の割合が試験開始時の80.0%から3週間後には20.7%に減少した。

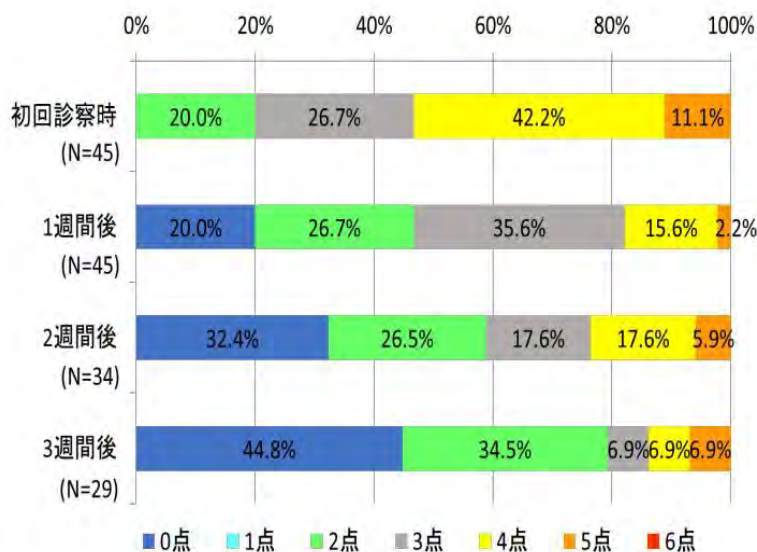


図 1：おむつ部の重症度スコア（皮疹スコアと面積スコアの合計）の推移

(4) 足白癬・爪白癬および「おむつ皮膚炎」の簡易診断・治療方法の確立

① 足白癬と爪白癬

足白癬と爪白癬は足や爪に所見を有する中で一定の割合を占めているものの白癬でない割合は大きいので治療開始前に真菌学的検査を行う必要がある。今回の検討において糸状菌検出試験紙の性能は高く、これが利用可能である。足や爪に所見を有する場合、糸状菌検出試験紙を用いて白癬菌の有無を判断し、陽性の場合には抗真菌薬を塗布する。陰性の場合には白癬ではないと判断して抗真菌薬は使用しない。一般的に白癬でない場合湿疹の可能性が高いのでステロイドを外用する。これにより改善がみられない場合に皮膚科医の診察を依頼する(図2a)。ステロイドの外用は鏡検に影響しないため問題ない。

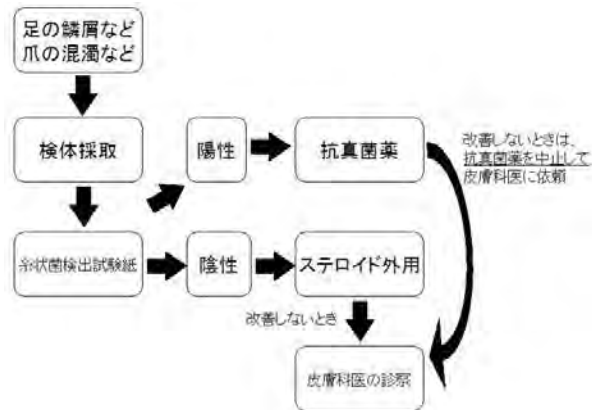


図2a 皮膚科医不在の環境下における足白癬・爪白癬の診断と治療のアルゴリズム

② 「おむつ皮膚炎」

「おむつ皮膚炎」の症状がみられても真菌が検出されることは非常に少ないことが今回の研究で確認された。さらに今回検証したプロトコールの有効性が確認されたため、そのまま利用することができる。つまり、「おむつ皮膚炎」がみられた場合、多くの場合湿疹であるから、まずエキザルベを塗布する。改善しない場合には真菌の可能性があるので皮膚科医の診察を依頼し、真菌検査を行い、真菌症であればアスタットを塗布する(図2b)。

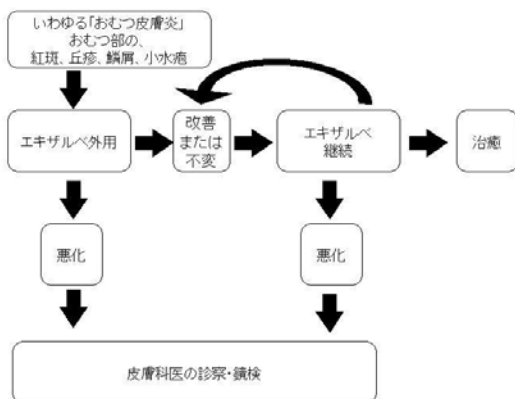


図2b 皮膚科医不在の環境下における「おむつ皮膚炎」治療のアルゴリズム

考察

今回の研究で、足および爪には高頻度で臨床症状がみられた。そのうち白癬が一定の割合を占めているものの、およそ半数以下である。しかし現状では足や爪に生じる異常は視診のみで足白癬や爪白癬であるとみなされて自動的に抗真菌薬が使用されているのを頻繁に目にする。おむつ部においては所見があっても真菌症である頻度は非常に低く、むしろ大半が湿

疹であることが判明した。「おむつ皮膚炎」ではさらに高頻度に抗真菌薬が塗布されているが、多くが誤診ということになる。糸状菌検出試験紙は糸状菌抗原に対するモノクローナル抗体を利用してクロマトグラフィーの原理で糸状菌抗原を検出する。爪や鱗屑を付属の溶解液で5分ほど溶解し、試験紙を入れて2-3分で判定ラインが着色する。特別な器具や技術を要さず、短時間で判定ラインの有無で肉眼的に判定できるため、皮膚科医が不在の現場でも使用可能である。今回の検討で、糸状菌検出試験紙の性能が高いことが判明した。足と爪に関しては、臨床症状があっても白癬の場合とそうでない場合のいずれの可能性もあるため、治療開始前に真菌学的検査を行う必要がある。皮膚科医が不在の環境下では糸状菌検出試験紙を用いて白癬菌の有無を判断することを提案する。糸状菌検出試験紙で陽性の場合には白癬と判断して抗真菌薬を塗布する。糸状菌検出試験紙は特に陰性適中率が高いため、陰性の場合には白癬ではないと判断して抗真菌薬は使用しない。一般的に白癬でない場合湿疹の可能性が高いのでステロイドを外用する。これにより改善がみられない場合に皮膚科医の診察を依頼する。ステロイド外用は鏡検に影響しないため問題ない。本調査において臀部の皮疹は高率にみられたが真菌症の割合は極めて低率であった。つまり大部分は湿疹等であると考えられる。よって臀部の皮疹がみられた際には抗真菌薬ではなくステロイドを塗布することが妥当である。湿疹等であればステロイド塗布により改善するし、改善しない場合でも真菌検査は可能だからである。ステロイドを外用した後改善しなければ皮膚科医にコンサルトする。今回このようなプロトコールを実際に検証したが、3週間後には約80%の症例が点数2点以下、すなわち皮疹は消失もしくは軽度でその範囲も50cm²以下という狭い面積となり、その有用性が確認された。以上のようなアルゴリズムで対応すれば真菌症を恐れるあまり抗真菌薬が不適切に使用されている現状を改善させることができる。さらに、皮膚科医の診察をすぐには受けられない状況は現状のままであっても、施設の医師や看護師による診断や治療の正確性や効率を高めることができる。「おむつ皮膚炎」について、現在検証を行っている研究が、エキザルベを塗布しても改善しない症例に関して、鱗屑を採取して、KOH溶液で溶解し、顕微鏡に取り付けたデジタルカメラで撮影し、それをメール等で転送して皮膚科医が真菌症を診断するという手順である。現段階ではエキザルベを塗布して改善しない場合、皮膚科医の診察を受けることになっているが、データとして転送できれば、往診よりも迅速性を増すことができる。おむつ部の鱗屑は採取が容易なうえ、厚さが薄いためKOHでの溶解もはやく、また湿度が高いため多くの場合菌要素も多い。よって、施設の医師でもこれらの操作を行うことが可能である。ただし、菌要素を的確に判断することは難しいため、多くの写真を撮影し、PCでデータを圧縮して転送し、皮膚科医が診断するという流れにする。デジタルカメラを接続した顕微鏡とPCを1台ずつ設置するだけのため、設備もコストも小規模で済む。また、この真菌症の診断・診療アルゴリズムを実際に運用してその評価を行うことが今後の課題である。

この研究の成果の一部は下記の論文で発表している。

Nakagami G, Takehara K, Kanazawa T, Miura Y, Nakamura T, Kawashima M, **Tsunemi Y**, Sanada H. The prevalence of skin eruptions and mycoses of the buttocks and feet in aged care facility residents: a cross-sectional study. Arch Gerontol Geriatr 58: 201-4, 2014.
Tsunemi Y, Takehara K, Miura Y, Nakagami G, Sanada H, Kawashima M. Screening for Tinea Unguium by Dermatophyte Test Strip. Br J Dermatol 170: 328-31, 2014.

研究実績報告書

1. 研究代表者

所属・職名 : (独) 国立長寿医療研究センター・プロジェクトリーダー
氏名 : 吉池 裕二

2. 研究期間

平成25年4月1日 ~ 平成26年3月31日

3. 研究課題

オートファジー制御がタウ病態に与える影響の解析

4. 研究活動の概要

アルツハイマー病は加齢に伴って生じる病気であり、高齢者の認知機能低下にはじまり記憶障害へといたる進行性の認知症である。その病理学的特徴の一つ神経原線維変化の出現頻度は認知機能低下の度合いとよく相関することが知られている。このため神経原線維変化を形成するプロセスに認知機能低下を引き起こす原因があるのではないかと考えられている。神経原線維変化とはタウタンパク質が線維状に凝集してできたものである。タンパク質の恒常性は生成と分解のしくみで維持されているが、分解の異常は凝集を促進させると考えられる。そこでこれまでに私たちはタンパク質分解を担うシステムであるオートファジーを制御することでタウの代謝へ与える影響を解析した。その結果、確かにオートファジーの促進はタウの代謝を促進することがわかった。しかし実際にオートファジー促進によってタウ代謝を促進することで凝集化を抑制したとき、タウ蓄積によって生じる機能の異常を改善することが出来るかどうかを今年度は解析した。

オートファジーは細胞が飢餓状態に置かれたときに細胞内の分子や器官を分解してその分解産物をエネルギー産生に利用する機構である。アルツハイマー病をはじめとする多くの疾患の共通した病理的特徴としてタンパク質が凝集して蓄積するという現象がみられる。この蓄積したタンパク質にも生理学的な機能があるとする説もあるが、大方は不要であるかまたは毒性を生じる原因物質であると考えられている。オートファジーは特定のタンパク質を標的とした代謝機構ではなく、生体にとって不要なモノ全てを標的にすると考えられる。従って様々な疾患に見られる異なるタンパク質から出来た凝集物をそれぞれ分解することでそれら疾患全ての克服につながるのではないかと期待されている。一方、オートファジーの基質非特異性はその過剰な促進が生理活動に必要なモノまで分解してしまう可能性もある。オートファジーの発動機構については多くのことがわかってきており、オートファジー促進剤としてうたわれている化合物すら存在する。このような薬剤を用いてオートファジーの活性度合いを調整して過剰なオートファジーの発動を抑えるといったことが考えられる。オートファジーに関わる特定の分子を標的にしたこのような化合物を用いることは、化学的にはオートファジー促進以外の副作用を避けられると期待できる。しかしもともと生体に備わったオートファジーという機構が何らかの理由で不要なタンパク質の凝集物を分解除去しない状態にあって、これを外部から人為的に発動させるということを考えてみると予想もつかない反作用が生体に生じる可能性がある。生物学的見地からこのような反作用を考慮に入れ

たオートファジー促進方法を模索することにした。

生体の作用・反作用として良く知られるのはストレスである。その中でも老化と関連が深い酸化ストレスに私たちは着目してきた。酸化ストレスは老化を促進すると考えられており、また老化はアルツハイマー病の最大の危険因子であることから酸化ストレスはアルツハイマー病の原因と考えられている。しかし最近では軽度の酸化ストレスがせん虫の寿命を延ばすなど、必ずしも老化を促進するだけでなく逆に老化を抑制するような報告も幾つか出ている。そこで軽度の酸化ストレスはアルツハイマー病のタウ病態に対してどのような影響があるかを解析した。アロキサンという化合物はげっ歯類などに投与すると活性酸素が発生し、これがすい臓のβ細胞を特異的に破壊して糖尿病を引き起こすことが知られている。アロキサンを投与しても糖尿病を生じない濃度を同定し、タウの遺伝子改変マウスに投与した。低濃度のアロキサンを投与したマウスの脳では酸化ストレスマーカーが僅かながら有意に増加しており、また凝集し不溶化したタウが減少した。これらのことから軽度の酸化ストレスはタウの病態を改善するという報告をした。興味深かったのは低濃度アロキサン投与の結果不溶性画分のタウだけでなく可溶性のタウも減少したことである。これについて明確な機構を示すことは出来なかったが種々の間接的な証拠から代謝ではないかと推測した。その後全く別の分野から、酸化ストレスがオートファジーを促進する機構について報告された。そこで私たちは酸化ストレスを制御することでオートファジーによるタウ代謝促進を検討することにした。

他のストレス同様、酸化ストレスは酸化というストレスラーによって引き起こされる生体の応答である。オートファジー促進による生体の反作用とは酸化をそのきっかけとした場合、酸化ストレスそのものということになる。しかし酸化ストレスは老化やアルツハイマー病の原因であるという考え方は広く受け入れられており、酸化剤を治療に用いようなどという考えは一見、非現実的なように見える。しかしエキササイズはどうであろうか。アルツハイマー病に対して唯一有効性が認められているエキササイズをすると活性酸素が発生し酸化ストレスを生じる。しかしエキササイズにはその他の効果もあってどの作用がタウ病態の改善につながったのか同定することは難しいし、また寝たきりの患者に対してエキササイズの有効性を議論することは出来ない。化合物によって酸化がタウ病態を改善する可能性を検証する根拠を探した結果、抗タウ治療薬として唯一第 II 相臨床試験を突破したメチレンブルーに着目した。メチレンブルーはもともと *in vitro* でタウタンパク質の凝集を抑制することが 20 年以上も前に報告された。しかしその機序についてはわかっていなかった。昨年初頭メチレンブルーはタウを酸化修飾することでその凝集を抑制するという報告が出た。メチレンブルーは確かに酸化活性を有しており、その性質によって微生物の駆除に用いられている。一方、メチレンブルーはオートファジーを促進することでタウ病態を改善するという報告もある。メチレンブルーは FDA 設立以前から使用されてきた薬であり、長年の使用実績が一定の安全性を証明している。しかしそれでもメチレンブルーのタウ病態に対する機能改善という意味での有効性が *in vivo* で完全に示されたわけではなく、また毒性についても第 II 相臨床試験で高濃度において毒性が見られたことを勘案すればこの化合物の作用機序を解析する意義がある。

本研究ではショウジョウバエのタウ病態モデルにメチレンブルーや同様の性質をもつ化合物を投与し、タウ蓄積と機能に与える影響を解析するとともに毒性の評価なども行った。

5. 研究の成果

実験対象にショウジョウバエを用いる利点は寿命がおおよそ 3 ヶ月と比較的短いこと、遺伝

子操作が容易であること、安価であることなどが挙げられる。特に本研究計画の期間内に計画した研究を遂行しようとするればマウスなどであっても時間が足りなくなる恐れがあったためショウジョウバエを用いた。ヒト野生型タウをハエの複眼もしくは脳全域に発現させたハエを使用した。タウを複眼に発現させると目の表面は変形し、内部では視神経細胞の変性が起こる。またハエには重力に逆らって動く性質（負の重力走性）があるが、脳にタウを発現させたハエではこの性質に異常が生じる。このような2種類のハエをモデル動物として使用した。

薬剤は餌となる寒天培地を作製する過程で溶液を混ぜることによって投与した。生後1～3日のハエに薬剤入りの餌を与えて一月間飼育する。その後ハエの頭部を切断回収してすりつぶし、TBSに可溶性画分とサルコシルという界面活性剤に不溶性の画分に分ける。タウタンパク質は凝集すると難容性を獲得するため、界面活性剤に不溶性の画分には凝集したタウが存在すると考えられる。タウを発現させたショウジョウバエが開発されたときに注目を浴びた一つの特性は、神経原線維変化の形成が見られないにも関わらず神経変性が認められたことである。このことは神経原線維変化を形成する凝集・不溶化したタウ以外にも可溶性のタウに神経変性を生じる性質があることを示している。少なくとも私たちがタウを発現させたハエの頭部から抽出したサルコシル不溶性画分にはヒトのタウを検出することができた。すなわちハエモデルではヒト脳に見られるような神経原線維変化までは形成されなくともタウの凝集・不溶化は生じたことが示唆される。

メチレンブルーを一月間与えたタウ発現ショウジョウバエの頭部から採集したサルコシル不溶性のタウは通常の餌を与えた群に比べて有意に減少していた。このことはメチレンブルーの *in vitro* におけるタウ凝集抑制効果がショウジョウバエでも示されたと考えられる。メチレンブルーはオートファジーを促進してタウ病態を改善するといった報告もある。オートファジーの基質非特異性を考えたとき、メチレンブルーによるオートファジー促進が全体的なタンパク質代謝を促進した結果タウの蓄積抑制につながった可能性が考えられる。残念ながら生化学的にはオートファジー発動の分子マーカーの変化をメチレンブルーを投与したハエの試料から検出できていない。今後、発現量の解析や病理学的な検索からそのような薬理機構の可能性を検証する。

タウ発現ショウジョウバエにメチレンブルーを投与すると野生型、タウ発現変異型に関わらず、ハエの生存率を著しく低下させることがわかった。これらの結果はメチレンブルー生体投与時の毒性を現していると考えられる。そこでメチレンブルーと同様の性質を持ちながら毒性の低い化合物はないか検索した。もしメチレンブルーの酸化活性が起点となってオートファジーを誘導することがタウ病態の改善につながるとすれば、高い酸化活性があつて安全性の高い化合物ということになる。該当する既存の化合物が一つ見つかったためメチレンブルーと同様の実験を行った。この化合物がメチレンブルーに続くような薬の候補となるかどうか今後も研究を続ける予定である。

研究実績報告書

1. 研究代表者

所属・職名 : 独立行政法人国立長寿医療研究センター・
NC・企業連携共同研究部薬理学研究室長
氏名 : 吉田 裕孝

2. 研究期間

平成25年4月1日 ~ 平成26年3月31日

3. 研究課題

「認知症脳内タウ病理蓄積物の解析とタウを標的とした免疫療法の開発」
に関する研究

4. 研究活動の概要

[目的]

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

- ① 凝集核 (シード) を必要とする。一次病理物質の形成機構ならびにその実体が不明である。
- ② 凝集核タンパクと宿主内発現タンパクの同一性が必要である。
- ③ 連鎖伝播性物質が不明。そしてその細胞外への放出を必要とする。
- ④ 神経回路にしたがった伝播か不明である。
- ⑤ 病理伝播の神経活動・神経細胞死への影響が不明である。

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

- ① どのようなタウ (モノマー、オリゴマーあるいはタウ凝集体) が認知症発症に関与するのか？
 - ② タウ病理はどのようにして拡大し、認知症発症に関与するのか？
- という未解決の問題を明らかにする必要がある。

従来タウを標的とした認知症治療を目的とした研究では、タウのリン酸化、凝集・線維化を抑制する阻害剤の開発と投与が主な戦略であった。しかし、本来細胞内蛋白質であるタウが、タウ病理伝播能を有し細胞外に放出されることが明らかになれば、細胞外タウを標的と

した治療が可能である。したがって、細胞外タウの性質ならびに細胞外への放出機構を解析することにより、①病理伝播型タウの特異的な排除、②病理伝播型タウの細胞外放出の抑制、および③病理伝播型タウの細胞内取り込みの抑制により本疾患の進行を抑える戦略にもとづく新規治療ならびに創薬に結びつけられるものと期待される。

本研究課題では、培養細胞系ならびに野生型あるいは認知症モデルマウスを用いて

- ① タウ病理伝播性タウ（あるいは細胞外タウ）の同定と解析
- ② タウ病理伝播性タウ（あるいは細胞外タウ）の生物学的機能の解析
- ③ タウの細胞外放出機構の解明

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

[活動内容]

生化学的手法、細胞生物学手法を用いて大腸菌で発現したリコンビナント・タウ、培養細胞で発現したタウならびに脳マイクロダイアリシス法によりマウス脳から回収したタウ（神経細胞外のタウ）の分子動態について解析を行なった。

(1) 大腸菌発現リコンビナント・ヒトタウタンパク質の解析

大腸菌で発現し精製したリコンビナント・タウをヘパリン存在下あるいは非存在下で37℃にて48時間インキュベート後、SDS電気泳動およびネイティブ電気泳動に供し、CBB染色によりゲル上の移動度、泳動パターンを観察した。SDS電気泳動ゲル上ではヘパリン存在下あるいは非存在下で処理したタウの主要なバンドは55kDa付近にみられ、ヘパリン存在下で処理したタウはわずかながらゲルトップにも検出された。未変性状態のタウを解析した結果、ヘパリン存在下で処理したタウのほとんどはゲルトップに検出された。これに対し、ヘパリン非存在下で処理したタウは、単量体だけでなく複数のオリゴマーとしても検出された。

(2) ニューロブラストーマ SHSY 5Y 細胞発現タウの解析

ヒトタウを発現するニューロブラストーマ SHSY 5Y 細胞株を樹立し、これを本実験に使用した。細胞密度が80%コンフルエント時に培養液（10%FBSを含むDMEM-F12培養液）の交換を行ない、24時間後培養液を回収し、この培養上清より生化学的に精製したタウ画分を分析に供した。培養細胞はTriton X-100（1%）を含むPBSで可溶化し、遠心後可溶性画分を回収し分析に供した。これらの試料を(1)と同様に解析した結果、SDS電気泳動後イムノブロット法により、細胞抽出液のみならず細胞培養液からの画分にもタウが検出され、タウが細胞外に放出されることが確認された。さらに未変性状態のタウを解析した結果、両画分に含まれるタウはともにオリゴマー状であることが明らかとなった。

(3) マウス脳マイクロダイアリシス回収液中タウの解析

2、3および27ヶ月齢のマウスから脳マイクロダイアリシス法により得られた回収液を(1)、(2)の実験と同様の手法を用いて解析した。マウス脳マイクロダイアリシス法により回収された神経細胞外液中のタウはオリゴマー状であること、タウ量は加齢とともに増加することが明らかとなった。

5. 研究の成果

本研究においてタウを発現する培養細胞ならびにマウス脳において細胞外にタウが放出されること、そしてこの現象とタウ・オリゴマーの形態が関連する可能性が示唆された。細胞外タウの詳細な性質の解析とタウ・オリゴマーの形成と細胞外タウ放出メカニズムの解明

を行なうことにより、細胞外タウを標的とした治療法への応用が可能性であると期待される。

本研究結果は生理学研究所研究会「電子顕微鏡機能イメージングの医学・生物学への応用」(2013年11月13-14日, 岡崎市)においてポスター発表された。

研究実績報告書

1. 研究代表者

所属・職名： 慶應義塾大学医学部内科学（老年）・専任講師
氏名： 新村 健

2. 研究期間

平成25年4月1日～平成26年3月31日

3. 研究課題

「免疫老化制御による加齢関連疾患治療戦略の確立」に関する研究

4. 研究活動の概要

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

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

今年度は、加齢関連疾患として2型糖尿病・インスリン抵抗性を対象とした基礎研究を行った。

①まず加齢マウスを用いて、加齢に伴う耐糖能異常、インスリン抵抗性の出現においてPD-1 陽性記憶型 T細胞が担う役割を検討した。若年齢マウスを対照として加齢マウスにおいて経口糖負荷試験、経静脈インスリン負荷試験を施行した。ELISAキットを用いて血清レプチン、アディポネクチン、インスリン濃度を測定した。脾臓と内臓脂肪から抽出した白血球系細胞におけるPD-1 陽性記憶型 (CD44 陽性 CD62L 陰性) T細胞の割合をflow cytometryにより解析した。さらにT細胞分画でFoxp3を発現する制御性T細胞の割合、マクロファージ分画でCD11c 陽性 CD206 陰性のM1タイプマクロファージの割合をflow cytometryにより解析した。内臓脂肪組織標本を作製し、脂肪細胞サイズと王冠様構造数を評価した。次に抗老化療法であるカロリー制限(CR)が、加齢に伴うPD-1 陽性記憶型 T細胞増加と耐糖能異常・インスリン抵抗性に及ぼす影響を検討した。PD-1 陽性記憶型 T細胞を選択的除去することにより、加齢に伴うPD-1 陽性記憶型 T細胞増加とインスリン抵抗性発症の因果関係を

確認することを目的として、抗 PD-1 抗体による治療効果を検討した。

②肥満は老化過程を促進するものと考えられている。その要因は、インスリン抵抗性に伴う高インスリン血症と、内臓脂肪蓄積による慢性炎症が推測されている。そこで次に我々は、食事性肥満に伴う 2 型糖尿病・インスリン抵抗性発症においても循環血中または内臓脂肪組織における PD-1 陽性記憶型 T 細胞増加が重要な役割を担っているかを、高脂肪食負荷マウスモデルを用いて検討した。高脂肪食負荷による食事性肥満・2 型糖尿病マウスにおいて経口糖負荷試験、経静脈インスリン負荷試験を施行した。脾臓と内臓脂肪組織から抽出した白血球系細胞における PD-1 陽性記憶型 T 細胞の割合を flow cytometry により解析した。さらに T 細胞分画で Foxp3 を発現する制御性 T 細胞の割合、マクロファージ分画で CD11c 陽性 CD206 陰性の M1 タイプマクロファージの割合を flow cytometry により解析した。内臓脂肪組織標本を作製し、脂肪細胞サイズと王冠様構造数を評価した。次に PD-1 陽性記憶型 T 細胞を選択的に除去することにより、食事性肥満に伴う PD-1 陽性記憶型 T 細胞増加とインスリン抵抗性発症の因果関係を確認することを目的として、抗 PD-1 抗体による治療効果を検討した。

③PD-1 陽性記憶型 T 細胞による内臓脂肪組織での炎症惹起の分子メカニズムを解明する目的で、食事性肥満加齢マウスの脾臓または内臓脂肪組織から抽出した PD-1 陽性記憶型 T 細胞を用いた *in vitro* 実験を行った。PD-1 陽性記憶型 T 細胞の増殖能、サイトカイン発現レベルを PD-1 陰性記憶型 T 細胞、PD-1 陰性ナイーブ T 細胞と比較した。さらに PD-1 陽性記憶型 T 細胞をマクロファージと共培養することで PD-1 陽性記憶型 T 細胞によるマクロファージ刺激能を評価し、PD-1 陰性記憶型 T 細胞、PD-1 陰性ナイーブ T 細胞と比較した。T 細胞における PD-1 発現誘導のメカニズムを検討する目的で、adoptive transfer 実験を実施した。若年マウスから採取した PD-1 陰性 T 細胞を CFSE で標識し、若年マウスまたは食事性肥満加齢マウスへ細胞移植を行った。2 週間後脾臓から CFSE 陽性 T 細胞を抽出し、PD-1 発現率を両群間で比較した。

5. 研究の成果

(1) 加齢マウスにおける PD-1 陽性記憶型 T 細胞増加とインスリン抵抗性

我々は加齢に伴い脾臓細胞のみならず、内臓脂肪組織においても PD-1 陽性記憶型 T 細胞の割合が有意に増加することを見出した。100 週齢の加齢マウスでは、11 週齢の若年マウスと比べ、体重と内臓脂肪重量の増加が認められ、耐糖能異常とインスリン抵抗性を示した。まず CR が、加齢に伴う PD-1 陽性記憶型 T 細胞増加とインスリン抵抗性に及ぼす影響を検討した。52 週齢マウスを 2 群に分け、1 群は食事自由摂取条件で、他群は食事自由摂取時の 60% に摂取カロリーを制限する -40%CR を 6 カ月間行った。CR は、加齢マウスの体重と内臓脂肪重量を減少させ、耐糖能とインスリン抵抗性を改善した。CR は、加齢マウスの内臓脂肪において脂肪細胞サイズを縮小し、王冠様構造数を減少した。CR は内臓脂肪における PD-1 陽性記憶型 T 細胞数、M1 タイプマクロファージ数を有意に減少させた。加齢マウスにおいて抗 PD-1 抗体またはコントロール IgG の週 3 回腹腔内注射を 77 週齢から 3 週間継続したところ、抗 PD-1 抗体治療群では 80 週齢の時点で、食事摂取量、体重、内臓脂肪重量を変えずに、耐糖能異常とインスリン抵抗性を有意に改善した。

(2) 食事性肥満マウスにおける PD-1 陽性記憶型 T 細胞増加とインスリン抵抗性

4 週齢から開始した高脂肪食飼育群では、著明な体重増加と内臓脂肪重量増加がみられ、18 週齢の時点で通常食飼育群と比べ耐糖能異常とインスリン抵抗性を示した。高脂

肪食負荷に伴い脾臓細胞、内臓脂肪組織ともにPD-1 陽性記憶型 T 細胞の割合が増加していた。抗 PD-1 抗体またはコントロール IgG の週 3 回腹腔内注射を 18 週齢から 3 週間継続したところ、抗 PD-1 抗体治療は食事性肥満マウスにおいて食事摂取量、体重、内臓脂肪重量を変えずに、耐糖能異常とインスリン抵抗性を有意に改善した。抗 PD-1 抗体治療は内臓脂肪において M1 タイプマクロファージを減らし、制御性 T 細胞を増やし、脂肪組織での炎症性サイトカイン発現を減少させた。

(3) PD-1 陽性記憶型 T 細胞による炎症促進の分子メカニズム

PD-1 陽性記憶型 T 細胞は、PD-1 陰性 T 細胞と比べ増殖能が低下していたが、osteopontin と IL-6 を有意に発現していた。PD-1 陽性 CD44 陽性 T 細胞をマクロファージと共培養した場合、PD-1 陰性 CD44 陰性 T 細胞や PD-1 陰性 CD44 陽性 T 細胞と共培養した特と比べ有意にマクロファージの遊走を増加させ、マクロファージにおける炎症性サイトカインの発現を促進した。これらのマクロファージ刺激効果は、抗 osteopontin 抗体、抗 IL-6 抗体をメディアウムに加えることで遮断された。若年マウスから採取した PD-1 陰性 T 細胞を CFSE で標識し、食事性肥満加齢マウスに移植をしたところ、2 週間後若年マウスと比べ有意に PD-1 陽性 T 細胞の割合が増加していた。

研究実績報告書

1. 研究代表者

所属・職名 : 慶應義塾大学医学部神経内科・専任講師

氏名 : 伊東 大介

2. 研究機関

平成25年5月1日から平成26年3月31日

3. 研究課題

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

4. 研究活動の概要

わが国の20年後には、65歳以上の人口が総人口のおよそ3分の1を占めるようになるとされる。85歳以上の4人に一人が認知症であると報告されており、画期的な治療法・予防法が出現しない限り認知症患者の数は増加し、2030年には約350万人に達すると予測されている。疾患の診断、病態解明・治療法開発には、患者自身の障害組織を用いた研究が最も望ましいが、脳組織の場合その入手は侵襲性、技術的な問題により困難であり、神経疾患診断、解析の大きな障壁となっている。2006年、山中らは体細胞を用いて、ES細胞に匹敵する多分化能を有する induced pluripotent stem (iPS)細胞の樹立に成功した。この技法を応用して患者由来 iPS 細胞を樹立することができれば、その多能性を基に、疾患に関連した臓器を含む種々の組織を誘導することができる。本研究では、孤発性ADとくに、apoE ε4キャリアADや他の認知症疾患 (Tauopathy, TDP-43 proteinopathy, α-synucleinopathy) に注目し、iPS細胞を戦略的に作成し、表現型の確認とAβ、tau、α-synucleinの分解、蓄積機構を解析、iPS細胞を用いた分子病態の解明、薬剤スクリーニング系そして脳生検に代わる診断法の確立を目標とする。この際、正常コントロールiPS細胞として研究室が作成、報告している健康長寿であった百寿者(Yagi T, et al. PLoS One. 2012; 7(7):e41572.)から作成したiPS細胞を用いることにより信頼性の高い研究成果が期待できるとともに脳の老化のメカニズムにも研究を展開することが可能である。

5. 研究の成果

当研究室では、家族性AD由来iPS細胞 (PS1変異(A246E)とPS2変異(N141I)) では、毒性の高いamyloid β42の産生が亢進していることをすでに報告している (Yagi T, et al. Hum Mol Genet.(2011)20:4530-4539.)。新規治療ターゲットの確立には、このamyloid βから神経原線維変化そして神経細胞死への分子メカニズムの解明が不可欠である。さらに、頻度の高い孤発性ADにて疾患モデル細胞を確立することは重要である。本年度は、疾患iPS細胞の作製が研究活動の主な中心となる。

apoEの遺伝子多型を考慮して4症例 (Coriell Cell Repositories AG21158: AD; apoE2/4, AG11368: AD; apoE4/4, AG10788: AD; apoE4/4) の皮膚線維芽細胞よりiPS細胞を作成している。(Fig.1) 近年の研究で、amyloid βの分子病態に関して、不溶性のアミロイド線維ではなくその前段階のamyloid β数分子が重合したオリゴマー、ターン構造を有する毒性の配座異性体や

pyroglutamyl 化した amyloid β がシナプス障害、神経細胞への毒性に重要とする報告が増えてきている。本研究では、分泌された amyloid β のオリゴマーを Anti Oligomer (A11) (Invitrogen) で、毒性の配座異性体を Anti-Human Amyloid β E22P(11A1)(IBL) で、pyroglutamyl amyloid β を Anti-Oligo Pyro-Glu A β , Mouse-Mono(9D5)(Synaptic) を用いて検討した。方法は、分化誘導後2週間の培養液を nitrocellulose membrane を用いドットブロット (Biorad) . ELAISA にて検出をこころみた。分化誘導後 2 週間の時点では、オリゴマー、毒性の配座異性体や pyroglutamyl 化 amyloid β いずれもは培養液中には検出されなかった。今後は、培養時間の延長、細胞内の異常 amyloid β の検出を検討している。本プロジェクトでは、頻度高い孤発性 AD 由来の生神経細胞を用いた病態解析、薬剤開発が現実のものとなるとともに、新規の診断法の確立が期待できる。

一方、他の認知症の疾患 iPS 細胞研究をさらに展開するため、TDP-43 proteinopathy として Inclusion body myopathy associated with Paget's disease of bone and frontotemporal dementia(Coriell Cell Repositories:GM22394: Valosin-containing protein mutation: LEU198TRP)(Fig.2)、Tauopathy として進行性核上性麻痺、ピック病、 α -synucleopathy として多系統萎縮症 よりの皮膚線維が細胞をもちいて iPS 細胞を作成している。とくに、Inclusion body myopathy associated with Paget's disease of the bone and fronto-temporal dementia (IBMPFD)由来 VCP 変異 iPS 細胞を樹立した。本疾患は、TDP-43 proteinopathy として前頭側頭葉認知症を引き起こすのみならず、封入体筋炎、骨ペーজেット病も合併し外胚葉をこえた表現型をしめし multisystem proteinopathy という新しい疾患概念に含まれる。神経変性疾患を考える上で極めて重要な疾患とされる。原因遺伝子 VCP は、多機能蛋白として知られその詳細な分子病態は依然不明である。今後、分化誘導後神経細胞の表現型 (突起伸展、細胞死、封入体形成) を正常コントロールとして百寿者 iPS 細胞と比較検討している。本プロジェクトにより AD 以外の認知症における病態解析、薬剤開発の展開が可能となる。また我々は、本理研バイオリソースセンター(BRC)に疾患 iPS 細胞 12 株を本年度寄託し本邦の幹細胞研究に大きな貢献をはたした。

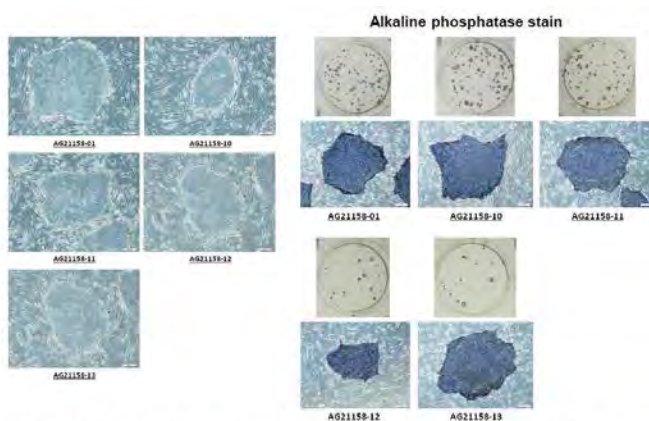


Fig.1 Generation of sporadic Alzheimer disease iPS cells

孤発性AD線維芽細胞をOct4, Sox2, Klf4, Nanog Lin28 (Human iPS Cell Generation™ Vector Set (Takara))にてリプログラミングした。

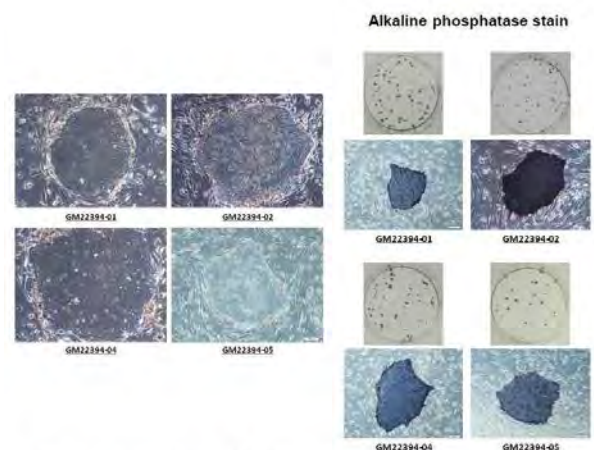


Fig.2 Generation of IBMPFD iPSCs

研究実績報告書

1. 研究代表者名

所属・職名：徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部
薬理学分野・准教授
氏名：池田康将

2. 研究期間

平成25年4月1日 ～ 平成26年3月31日

3. 研究課題

骨格筋萎縮における鉄の意義の解明

4. 研究活動の概要

筋萎縮 (サルコペニア) は、高齢者の運動能機能をはじめとする全身機能の低下に関与する。我が国では今後さらに高齢化社会が進むため、サルコペニアの病態解明および筋肉量低下の抑制は高齢者の ADL・QOL の維持・改善につながる重要な課題である。

鉄は必須微量元素元素である一方で、Fenton/Haber-Weiss 反応を触媒して酸化ストレス産生にも関与する。一般に生体内鉄量は加齢に伴って上昇することが知られている。筋肉量と鉄の関係について、各種の動物モデルによる検討では、老齢ラットでは若齢ラットよりも骨格筋鉄濃度が高値であり、筋肉鉄濃度と筋肉量は負の相関があること (Exp Gerontol. 2008)、廃用性萎縮骨格筋における組織鉄濃度が増加していること (Exp Gerontol. 2008)、筋萎縮における酸化ストレス増加は鉄キレート剤で抑制され、萎縮も軽減されること (Pflugers Arch. 1992)、鉄投与は骨格筋酸化ストレス増加と運動耐容能低下を引き起こすこと (Exp Physiol. 2009) など、骨格筋萎縮と鉄-酸化ストレスの連関が示唆されている。しかしながら加齢に伴う骨格筋鉄蓄積のメカニズムや鉄-骨格筋萎縮に関わる因子やその経路の詳細は未解明のままである。

筋萎縮に関わる因子として、ユビキチンリガーゼである Atrogin-1 や muscle ring finger protein-1 (MuRF1) に代表される atrogenes が注目されている。筋萎縮状態では筋肉タンパク分解が促進しており、Atrogin-1, MuRF1 がタンパク分解に関与することが知られている。よって筋肉への鉄蓄積は atrogenes 発現の増加につながり筋萎縮を引き起こす可能性が示唆され、鉄制御は筋萎縮抑制につながる可能性がある。

本研究では、骨格筋萎縮における鉄の役割、特に鉄-atrogenes 発現機構との関連を明らかにすることを目的とした。鉄による atrogenes 発現機構への解析のために、マウス鉄過剰モデルを作製して骨格筋萎縮やその関連遺伝子・タンパク質発現を調べた。また鉄-atrogenes 制御経路を検討するために培養骨格筋細胞を用いた。

5. 研究の成果

8週齢の雄性 C57BL6/J マウスを用いて、デキストラン鉄を 10mg/mouse/day 連日投与群 (Fe 群) と等量の vehicle 投与群 (Veh 群) の 2 群で検討した。体重について、開始時には差を認めなかったが、2週間後は Fe 群で若干高値を示した。ELISA 法による血清フェリチン値測定では

フェリチンは3日目以降上昇がみられ、骨格筋鉄濃度についても3日目以降に増加していた。ウエスタンブロットによる骨格筋フェリチン発現も3日目以降に上昇する傾向が認められた。骨格筋重量について、1週間目においてFe群の腓腹筋、ヒラメ筋、前頸骨筋はVeh群と比較して低値を示した(Table 1)。

Table.1 Characteristics of Body weight and skeletal muscles weight

	Pre		7 days		14 days	
	Vehicle	Fe	Vehicle	Fe	Vehicle	Fe
Body weight (g)	22.4 ± 0.2	22.7 ± 0.2	23.3 ± 0.4	24.0 ± 0.4	23.3 ± 0.3	25.0 ± 0.4**
Gastrocnemius muscle (mg)	—	—	139.8 ± 3.0	125.1 ± 2.8**	135.9 ± 3.8	122.5 ± 1.8**
Soleus muscle (mg)	—	—	8.2 ± 0.2	6.3 ± 0.3**	8.3 ± 0.3	7.0 ± 0.2**
Tibialis anterior muscle (mg)	—	—	69.6 ± 3.5	64.1 ± 2.3	68.9 ± 3.6	58.1 ± 2.1*

Data are the mean ± SEM, n = 10–18, as indicated. *P < 0.05, **P < 0.01 vs. vehicle treatment at the same time

病理組織像における骨格筋線維断面積の検討においては、重量同様に1週間、2週間ともにFe群で平均筋断面積の縮小が認められた。また骨格筋断面積分布はFe群で左方移動しており、全体的に骨格筋線維径が縮小していることが確認できた(図1)。Fe群では、全身の酸化ストレスマーカーである尿中8-OHdG排泄量の増加がみられ、ジヒドロエチジウム(DHE)染色による骨格筋局所の酸化ストレス評価では、Fe群で骨格筋DHE輝度上昇が認められた。骨格筋萎縮に関わるユビキチンリガーゼE3の発現をリアルタイムPCRで検討した。Atrogin-1とMuRF1発現はFe群において3日目まで有意に増加しており、それは1週間目、2週間目でも同様であった(図2)。Atrogin-1とMuRF1発現の制御に関わるAktとFOXO3のリン酸化、発現についてウエスタンブロットで調べた。FOXO3のリン酸化はFe群において3日目で低下して1週間ではほぼ抑制されたが2週間目で回復した。FOXO3タンパク発現には差がみられなかった。一方、Aktのリン酸化はFe群には1日目で増加するも1週間目では抑制されていた。Aktタンパク発現も1週間目で抑制を認めた(図3)。鉄によるatrogin-1, MuRF1発現増加メカニズムの詳細を調べるためにマウス由来C2C12細胞を筋管細胞に分化させた後に用いた。Atrogin-1, MuRF1発現はFe負荷後8時間でピークを認めた。またAkt, FOXO3のリン酸化はFeSO₄100μM負荷後60分で抑制されていた。培養骨格筋の萎縮評価を行ったとこ

図1

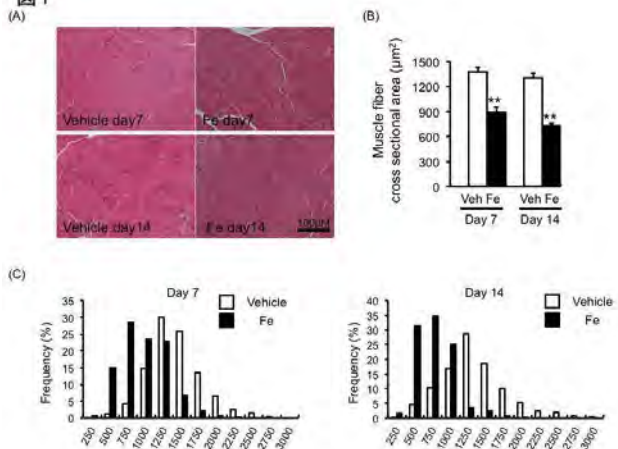


図2

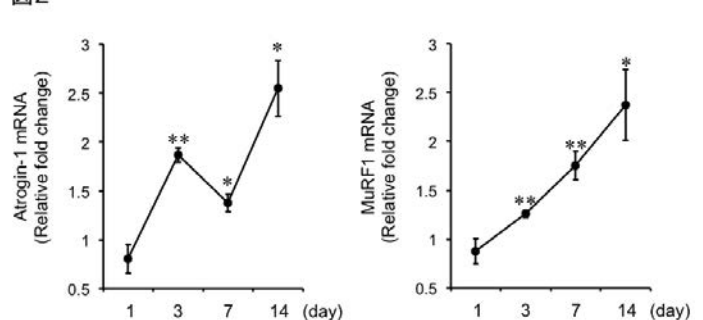
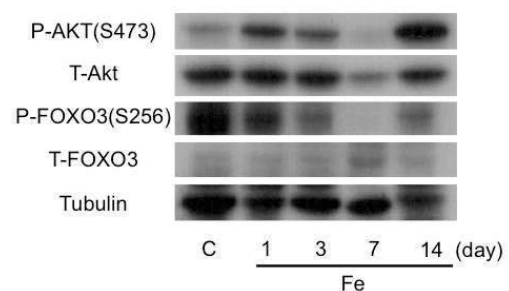
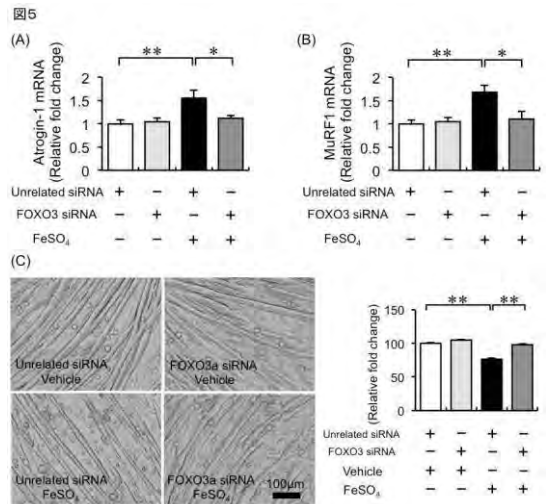
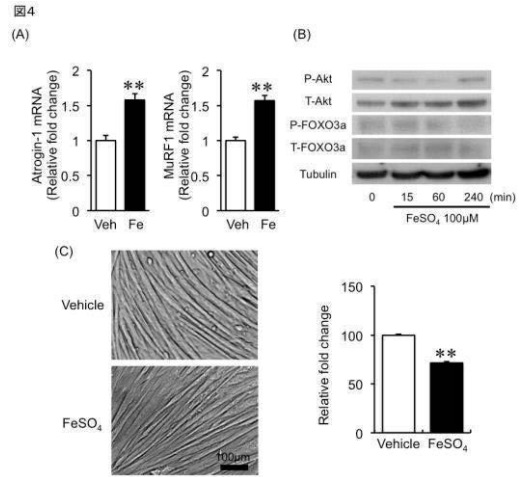


図3



ろ、Fe 負荷 48 時間後において、Fe 群は対照群と比較して骨格筋横径は約 75% に抑制されていた (図 4)。鉄による atrogen-1, MuRF1 発現増加に Akt-FOXO3 経路が関与しているかを調べるために FOXO3 siRNA を C2C12 細胞に導入して mRNA、タンパク質とも約 50% 強抑制されることを確認の後、前述と同様に FeSO₄100μM 負荷を行った。鉄による atrogen-1, MuRF1 発現の増加は、FOXO3 siRNA 導入によってほぼ抑制された。また鉄負荷によって誘発される骨格筋細胞萎縮も FOXO3 siRNA 導入によって抑制された (図 5)。以上の結果から、骨格筋への鉄蓄積は骨格筋萎縮を引き起こす原因となり、その機序として Akt-FOXO3 経路を介した atrogen-1, MuRF1 発現の関与することが示唆された。



研究実績報告書

1. 研究代表者

所属・職名 : 北海道大学 遺伝子病制御研究所 動物機能医科学研究室 講師
氏名 : 三浦 恭子

2. 研究期間

平成25年4月1日 ~ 平成26年3月31日

3. 研究課題

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

4. 研究活動の概要

ハダカデバネズミ (DEBA) は、マウスと同等の大きさながら異例の長寿 (平均寿命 28 年) かつ生存期間の約八割の間は老化の兆候を示さない、老化耐性哺乳類である。また、自発的な腫瘍形成が一切確認されていない (N=800)。これらの特徴から DEBA は、新規の老化・がん化耐性機構の解明、将来の老化・がん化予防薬の開発のための新たなモデル動物として極めて有効である。申請者らは、2010 年度から日本初の DEBA の分子生物学的研究体制を立ち上げ、飼育室の設立・繁殖方法の確立・iPS 細胞など様々な細胞株の樹立・次世代シーケンサーを用いたゲノム・遺伝子発現ブラウザの作成 (岩手医科大学・清水厚志・八谷剛史と共同) (未発表データ) など基礎情報の取得を行い、研究基盤整備を進めてきた。

申請者らの目標は、DEBA の老化耐性・がん化耐性の機構・関与因子を明らかとし、最終的に、耐性因子を導入することにより、マウス個体において DEBA の老化耐性・がん化耐性の特徴を再現することである。本年度は、①ハダカデバネズミ iPS 細胞に動物種特異的な腫瘍化耐性機構が存在すること、そして、その耐性機構が遺伝子 X によって制御されることを見出した。②ハダカデバネズミ遺伝子 X の coding sequence と発現制御領域を含む DNA 配列を導入した遺伝子改変マウス作出に向けての準備として、ハダカデバネズミ BAC ライブラリの構築準備を進めた。また③ハダカデバネズミ特異的に高発現する遺伝子 DeBAT1 (DEBA-associated transcript 1) について解析を進めたので、これらの内容について報告する。

①ハダカデバネズミ iPS 細胞の腫瘍化耐性機構

申請者らはがん化耐性齧歯類であるハダカデバネズミから iPS 細胞を作成し、その造腫瘍性について検証を行ったところ、造腫瘍性の無い多能性幹細胞の作出につながり得るメカニズムの発見に至った。

申請者はハダカデバネズミ成体皮膚線維芽細胞から iPS 細胞を作成した。解析を進めた結果、驚くべきことに、DEBA-iPS 細胞は *in vitro* での多能性幹細胞としての性質 (三胚葉への分化能力を持ち長期継代維持が可能) を有するにも関わらず、ヒト・マウス iPS 細胞の特徴



図1. ハダカデバネズミ (DEBA)

である造腫瘍性（奇形腫形成能）・腫瘍細胞様の急速な増殖パターンを示さなかった。遺伝子発現解析を行った結果、ハダカデバネズミでは、種特異的に、樹立過程後期から一貫して遺伝子 X の発現抑制が生じないことを見出した。そこで樹立後の DEBA-iPS 細胞において遺伝子 X のノックダウンを行ったところ、細胞増殖速度が上昇し、*in vitro* での造腫瘍性の指標となる足場非依存性増殖能を獲得すること、および免疫不全マウスへの移植時に腫瘍を形成することが判明した。一方で、興味深いことに、遺伝子 X の抑制により DEBA-iPS 細胞の樹立効率は上昇しなかった。以上の結果から、DEBA-iPS 細胞においては、動物種特異的な遺伝子 X の発現制御機構が存在することにより造腫瘍性が負に制御されると考えられる（論文投稿準備中）。

将来的には、本研究で明らかになった多能性幹細胞における造腫瘍性の抑制機構をさらに詳細に解明してヒト iPS 細胞へと応用することにより、より安全な造腫瘍性の低いヒト iPS 細胞を開発できる可能性がある。

②ハダカデバネズミ BAC ライブラリの作製

遺伝子 X の CDS および発現制御領域を含む BAC を導入した遺伝子組換えマウスを作出するために、BAC ライブラリ構築を開始した。手技の習得のため、東京大学農学部 浅川修一教授の技術指導を受け、HEK293T 細胞のゲノムを制限酵素処理し、pulse field 電気泳動後に 150kbp 断片を取得し、BAC ベクターを用いてクローニングを行った。次に、ハダカデバネズミ線維芽細胞のゲノムについて、上記と同様の方法で、150kbp 断片の取得を行った。今後、ハダカデバネズミゲノム BAC ライブラリ構築成功後に、遺伝子 X の領域をハダカデバネズミ化したマウスの作製を行う。

③ハダカデバネズミ特異的高発現遺伝子 DeBAT1 の機能解析

次世代シーケンサーを用いてハダカデバネズミの心臓および肝臓の全 mRNA のシーケンシングを行い、ヒト、マウスおよびラットの同組織データと比較することでハダカデバネズミに特異的に高発現する遺伝子群 DeBATs (DEBA-associated transcripts)の同定を試みた。結果として、心臓においてハダカデバネズミで特異的に高発現する抗酸化酵素 DeBAT 1 を同定した（未発表データ）。DeBAT 1 は通常肝臓で発現し、血液中に分泌される抗酸化酵素である。これまでに報告のある動物種のなかで DeBAT 1 が心臓で高発現しているのは、ハダカデバネズミのみであった。そこで申請者らは、Real-time PCR による発現確認後に、各動物種の血中における DeBAT1 の酵素活性について比較解析を行った。ハダカデバネズミ、マウス、ヒトおよびウサギ（報告されている動物のなかで最も酵素活性が高いとされている）の血清を用いて DeBAT 1 の酵素活性を測定した結果、当初の予想に反して、ハダカデバネズミの血清中の DeBAT 1 の酵素活性は、測定限界値以下であった。DeBAT 1 はカルシウム依存性の酵素活性を有することが知られているため、ハダカデバネズミの血中カルシウム濃度を測定したところ、驚くべきことに血中カルシウム濃度は検出限界値以下の超低濃度であった。野生下のハダカデバネズミはアフリカ東部の地中に生息し、コレカルシフェロール（ビタミン D）合成系が存在しない独自のカルシウム代謝機構を有するという報告が存在することから（*Br J Nutr.* 1993）、ハダカデバネズミの血中カルシウム濃度が低いことで、DeBAT 1 の血中酵素活性が極めて低くなっている可能性が考えられる。今後、マウスやヒトとは異なるカルシウム非依存的なハダカデバネズミ特有の DeBAT1 の機能を有する可能性を踏まえて、ハダカデバネズミの生体組織（心臓、肝臓）における DeBAT 1 の生理機構について解析を進める予定である。

長寿科学の最前線

長寿科学研究者支援事業
平成 25 年度 研究報告集

発行 平成 26 年 10 月

発行所 公益財団法人 長寿科学振興財団

〒 470-2101 愛知県知多郡東浦町大字森岡字源吾山 1-1

あいち健康の森健康科学総合センター 4 階

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

