

物質が持つ個体の“健康寿命”への 影響を短期間で調べる技術



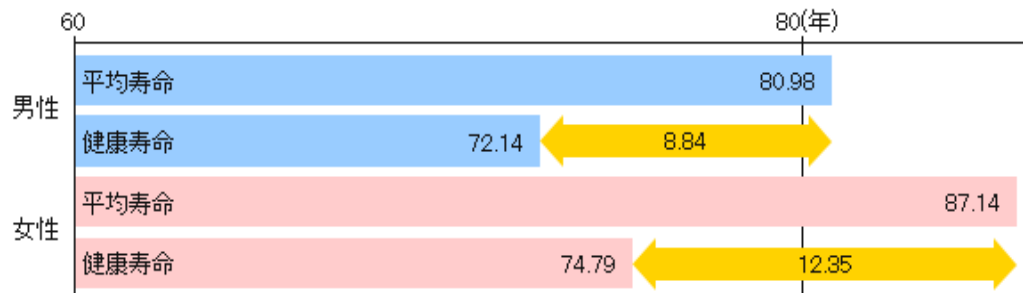
熊本大学 大学院生命科学研究部附属
グローバル天然物科学研究センター
准教授 首藤 剛

令和2年9月24日

- ✓ 健康寿命とは、平均寿命から日常的・継続的な医療・介護に依存して生きる期間を除いた期間のことを指し、その割合が高いほど、寿命の質が高い。
- ✓ 一般に、ヒトや実験動物等を用いて健康寿命を評価しようとすると、相当な時間を要することや、評価の指標が曖昧であるなどの問題がある。
- ✓ 私たちは、実験動物である”線虫”の経日的な画像変化に基づいた行動解析から、線虫の寿命さらには健康寿命を簡便に、評価できる手法を見出した。(首藤剛ほか, 特願2019-142502, 線虫を用いた個体レベルの健康寿命の評価系)
- ✓ 本技術は、本邦を含む世界各国の国策である健康寿命延伸のための基盤的技術を提供するものであり、健康寿命の延伸を企図した創薬または健康食品の開発への応用が期待される。

- ✓ **健康寿命**とは、WHOが2000年に提唱した概念で、平均寿命（0歳時における平均余命）から日常的・継続的な医療・介護に依存して生きる期間を除いた期間のことを指し、国民の健康状態を反映する重要な指標である。

日本人の寿命と健康寿命



厚生労働省「第11回健康日本21（第二次）推進専門委員会資料」（平成30年3月）

- ✓ 国民の生活の質 (QOL) の維持のみならず医療経済負荷の軽減の観点からも、**国民の健康維持は、社会の最重要課題**である。分子や薬学などの科学の視点から"健康寿命"を捉えることが課題解決の糸口となると考えられるが、健康寿命を実験的に紐解く場合、実験動物や細胞の何をもって"健康寿命"というのか!?、について明確な解答はない。さらには、健康寿命に影響をあたえる因子を、客観的、かつ、高速に解析する (HTS) 技術は未確立である。

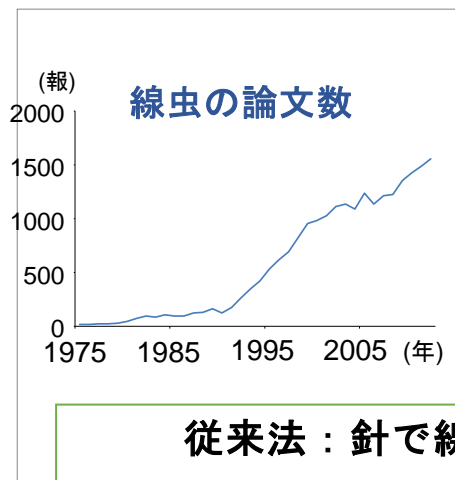
- ✓ 線虫は、極めて単純な動物であるにも関わらず、神経、骨格筋、消化管といった分化された臓器をもち、多くの哺乳類動物関連遺伝子が保存されているという観点から、**遺伝学・分子生物学の有用なツール**として、未だに最先端研究で活用されており、特に**“寿命”の研究では、歴史ある信頼性の高い実験動物**である。



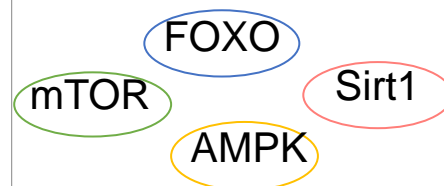
全長 約 1 mm

特徴

- ✓ 透明で全長 1mm の非寄生性動物
- ✓ 細胞内シグナル伝達が**シンプル**
- ✓ ヒトと相同性がある
- ✓ ライフサイクルが**短い**
- ✓ 神経, 骨格筋, 脂肪細胞などの臓器を有する
- ✓ 変異型の入手が容易
- ✓ 寿命が短い
- ✓ 100 以上の個体数を用いた**寿命研究**が可能



寿命を制御する因子



(Uno M & Nishida E, *NPJ Aging Mech Dis*, 2016)

従来法：針で線虫の応答を測定



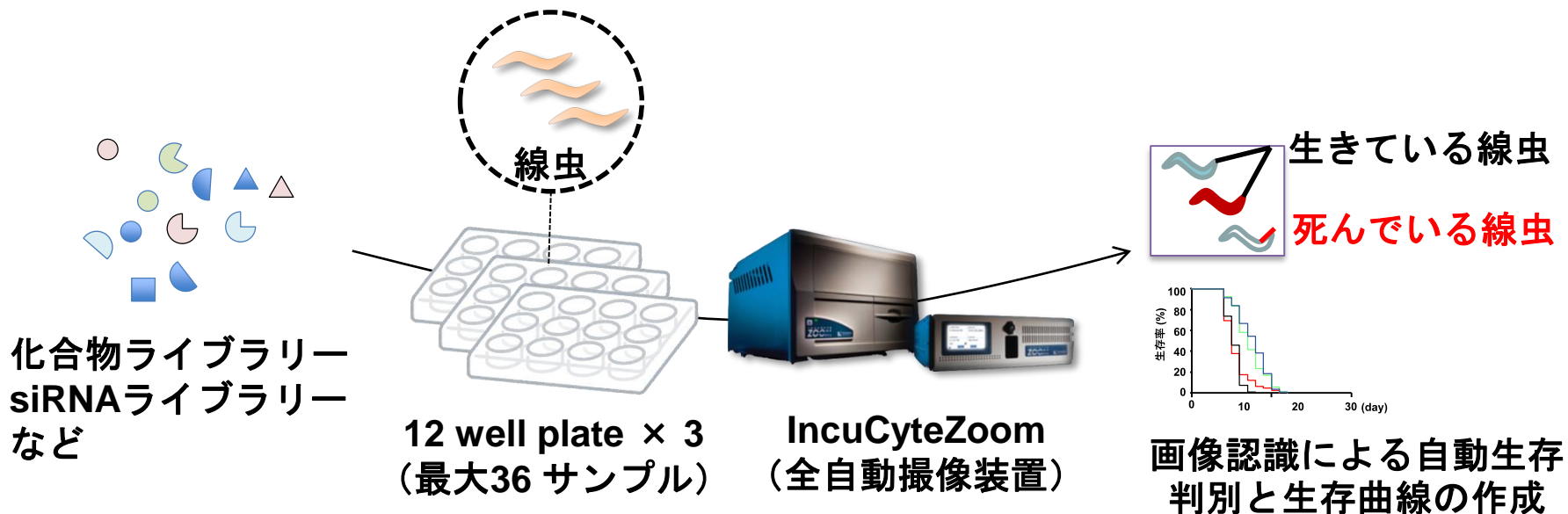
- ・ 侵襲的な刺激で生存率測定
- ・ 実験データを数値だけで記録
- ・ 研究者への負担 (毎日測定)

線虫が動かなくなった時を測定するため、死線虫しか測定できない

線虫寿命測定における従来技術の欠点

- ✓ 線虫を用いる寿命研究の優位性を維持しつつ、前述の問題点を解決することにより、**線虫を用いた新たな"健康寿命"評価系**を構築できるのではないかと考えた。
- ✓ 結果、培養細胞の生細胞**イメージングシステム**IncuCyte (ザルトリウス) に着目し、線虫生存の自動測定のための最適条件 (線虫の匹数、培養温度、培地の厚さ、食餌条件、撮像間隔、生存判定法) を独自に精査し、線虫の生存を、非侵襲的に、かつ、自動で多数検体 (現段階で36検体まで) 測定することを可能とする線虫全自動寿命測定システム (C-LAS: C. elegans Life span Auto-monitoring System) の開発に成功した。

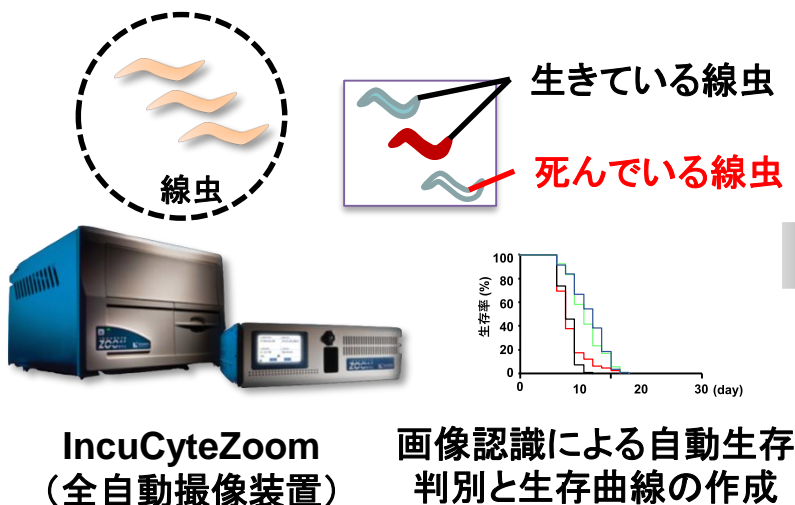
C-LAS: C. elegans Life span Auto-monitoring System



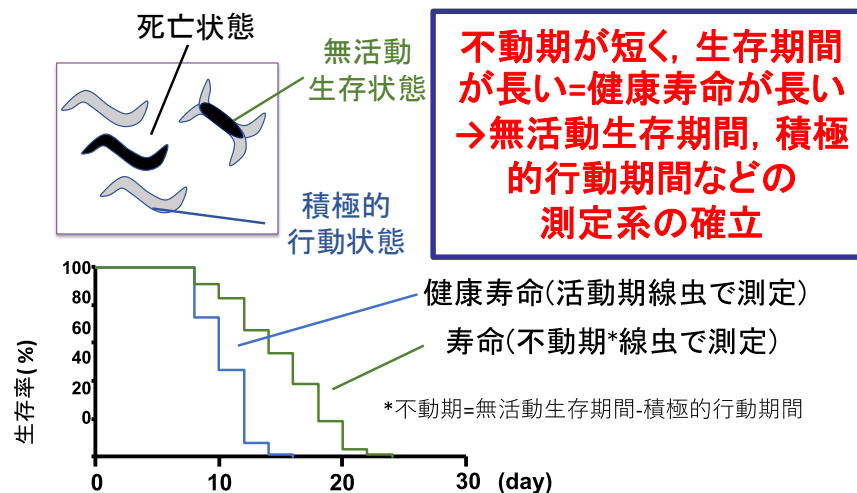
- ✓ C-LASを基盤として、**線虫の行動状態**を観察することにより、線虫には「**積極的行動状態**、**無活動生存状態**、**死亡状態**」が存在することを見出した。
- ✓ このことを受け、“**無活動生存期間-積極的行動期間**”を「**不動期**」と定義し、上記分類を**画像上で判別可能**とするアルゴリズムを確立し、全寿命期間における不動期の占める割合の少なさを健康寿命として評価する新システムC-HAS (C-HAS: C. elegans Health life span Auto-monitoring System)を確立した(特願2020-123805)。

C-HAS (C. elegans-Health life span Auto-monitoring System)

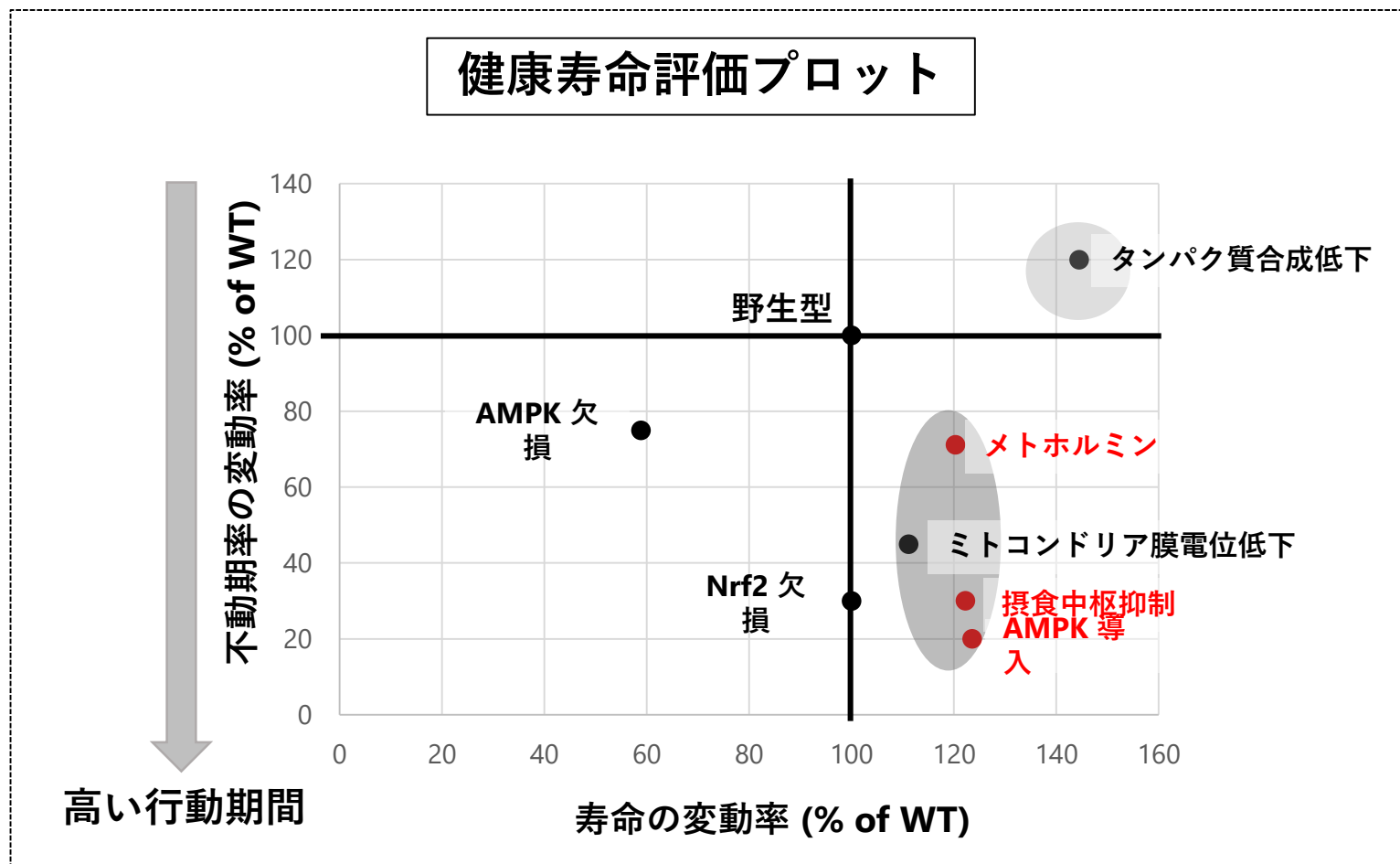
C-LAS



C-HAS



- ✓ 健康寿命の新指標「**健康寿命評価プロット**」を構築し、線虫の遺伝子改変や線虫への投与実験により、本指標が信頼性の高い指標であることを証明した。
- ✓ 事実、本プロット中で、右下に位置すると、健康寿命が延伸（寿命延長、不動期率を改善）することを意味し、これまで、**摂食中枢抑制**や**AMPKの導入**または**AMPKの活性化（メトホルミン）**が右下に位置し、健康寿命の延伸によいとされる過去の報告と一致している。



■ 線虫の寿命解析の問題点

- 1) 線虫を室温下で観察することによる各種刺激による**侵襲性**。
- 2) 毎日の測定に要する**実験時間**。
- 3) 実験者の手技により異なる結果が得られるという**客観性**の乏しさ。
- 4) 多検体を同時測定する**スループット性**の乏しさ。
- 5) 上記条件を克服して評価できる**“健康寿命”の指標**の欠如。

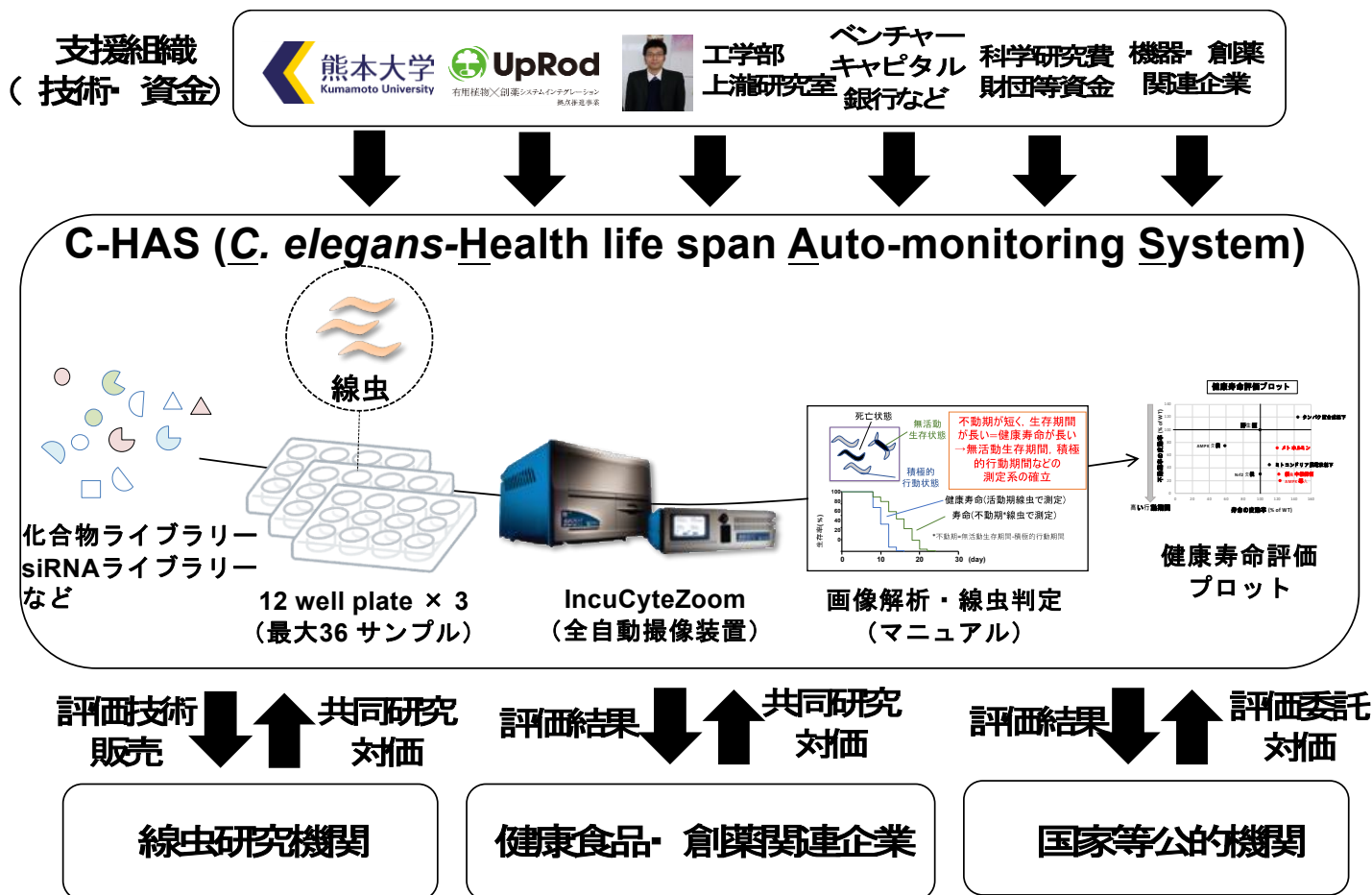
■ 当該技術 (C-HAS) が克服した点

- 1) 線虫生存の自動測定のための最適条件 (線虫の匹数、培養温度、培地の厚さ、食餌条件、撮像間隔、生存判定法) の確立。
- 2) **約30日間で線虫の寿命の測定 (最大36検体/回) が可能**。
- 3) 定温条件下での自動画像取得の達成により、**寿命測定期間の線虫の世話が不要**。
- 4) **客観性・測定時間・測定検体数・再現性などの優越性**。
- 5) **“不動期線虫”概念の導入による線虫健康寿命の新指標の構築**。
- 6) **寿命調節因子 (遺伝子) や物質の評価系として活用可能**。

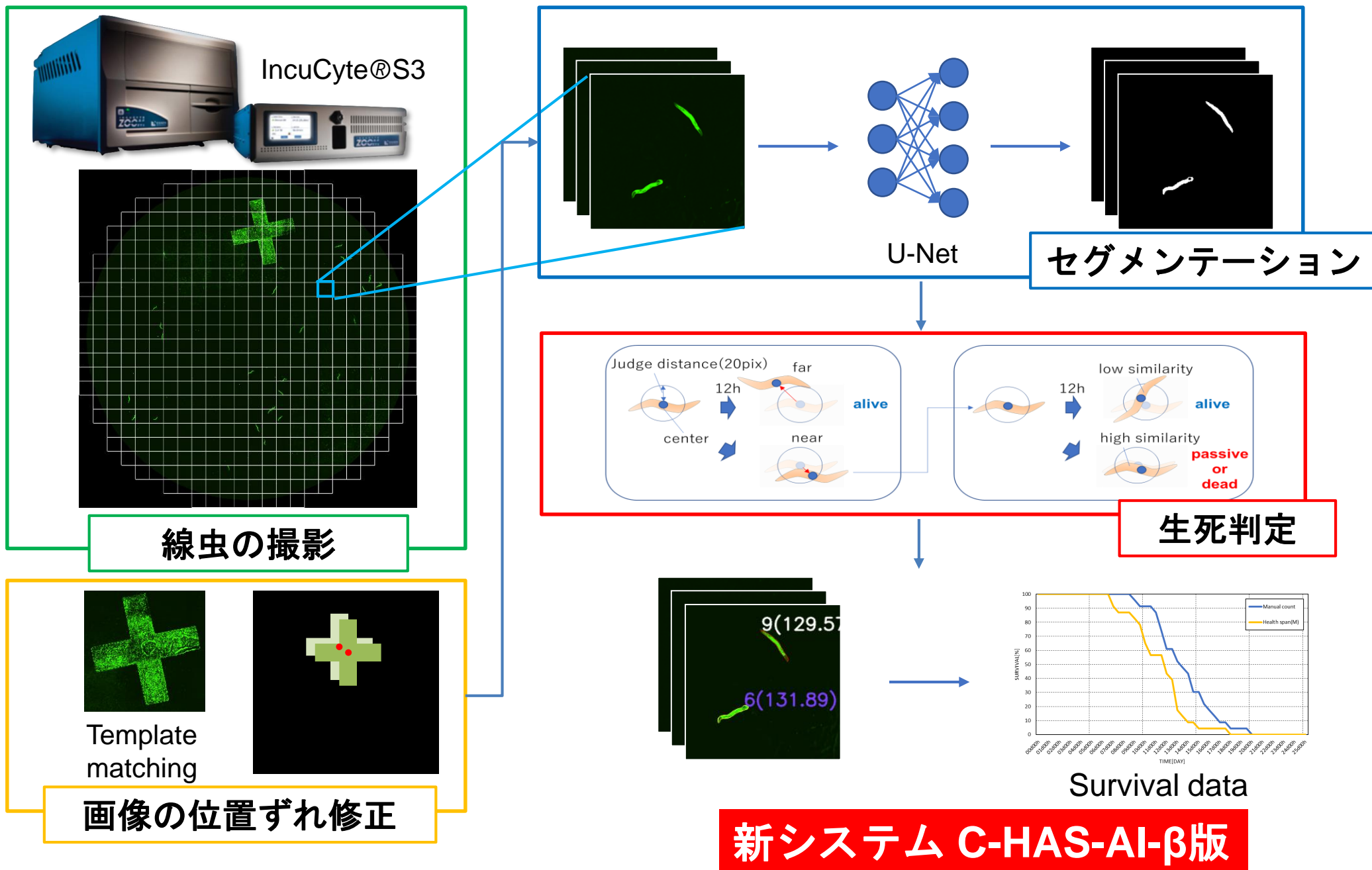
- ✓ C-HASは、従来技術と比較して**ベネフィット**（高い客観性・再現性、測定時間・手間の短縮化、同時測定検体数の多さ、高い信頼性・外挿性）と**ユニークさ**（不動期線虫からの健康寿命評価）を有する。

	当該技術 (C-HAS)	マウスなどの実験 動物を用いた方法	線虫強制水泳 行動量を用いた方法 (Bansal et al., PNAS, 2015)	線虫の餌への 到達度を用いた方法 (Kawamura et al., G3, 2019)
① 客観性	○	○	△	○
② 手間	○	×	△	△
③ 総作業時間 (1群あたり)	116時間 2時間×40日 +36時間	最低 730時間 2時間×365日	196時間 4時間×40日 +36時間	196時間 4時間×40日 +36時間
④ 同時測定検 体(群)数	36	最大6-8	10程度	10-20程度

- ✓ C-HASは、**化合物・siRNAライブラリーを用いたスクリーニング**を実施することを可能にするとともに、既存の健康食品や機能性成分の健康寿命に対する効果を謳うための客観指標（健康寿命評価プロット）を与えることにつながり、創薬研究・健康食品産業へのビジネス展開が期待される。
- ✓ C-HASの活用により、これからの**予防医療を支える創薬や健康食品産業**への協業ビジネスへの展開が期待され、その成功の暁には、本邦のみならず多くの国々の人々の持続的な健康社会の形成に寄与するものとなると思われる。



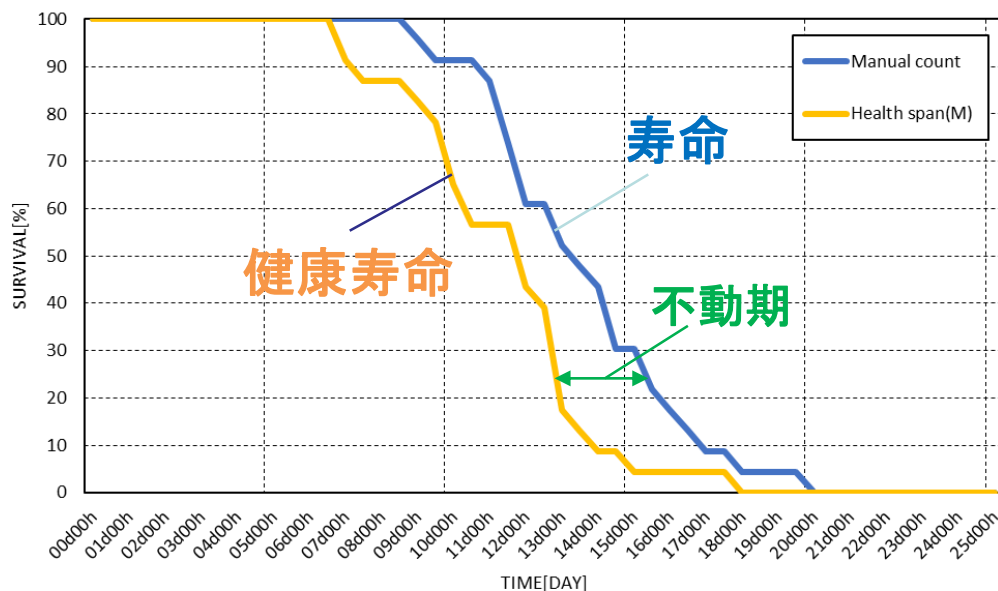
- **C-HAS**を活用すれば、従来、ヒトやマウスで実施することが困難であった健康寿命を調節する因子（遺伝子）や物質の探索が可能となり、健康産業や製薬業界に新たなプラットフォームを提供できる。
- 現状として、下記**3つの技術的課題**を解決することで、実用化に近づくことと考えている。
 - C-HASで検出できる無活動生存状態の「不動期線虫」の分子生物学的特徴が不明。
 - 「不動期線虫」の妥当性と信頼性を向上させるための基礎研究の実践
 - C-HASを用いた遺伝子や化合物スクリーニングの実施例数が少ない。
 - 健康寿命に影響を与える因子（遺伝子）のスクリーニングの実施
 - 線虫撮像の期間の自動化は達成したが、撮像後のデータ解析が手動であり、手間と時間を要する。
 - 深層学習を用いた画像からの線虫の自動判別システムの開発



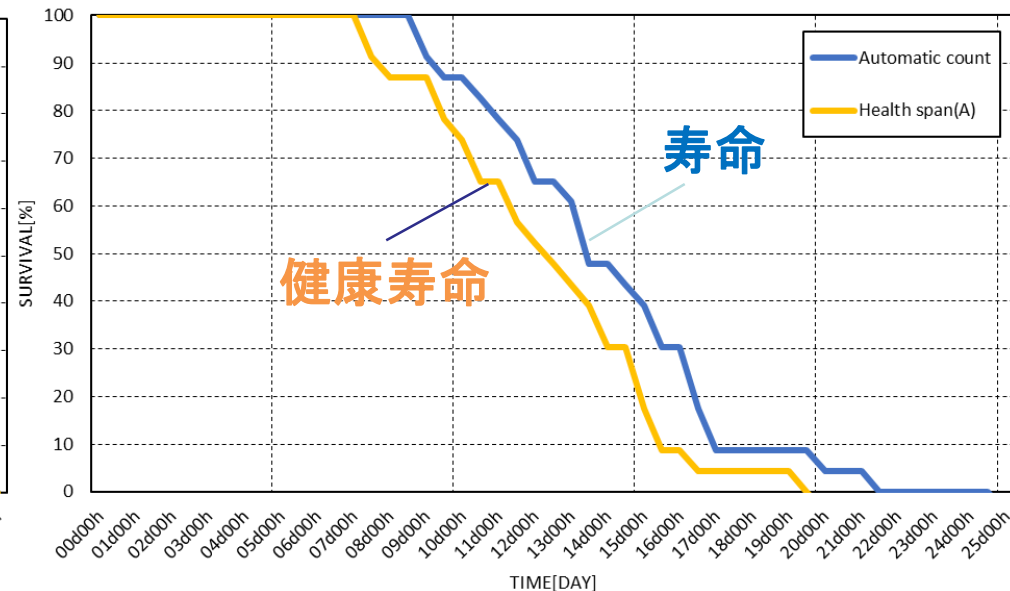
深層学習を用いた画像からの線虫の 自動判別システム (C-HAS-AI) の実践例

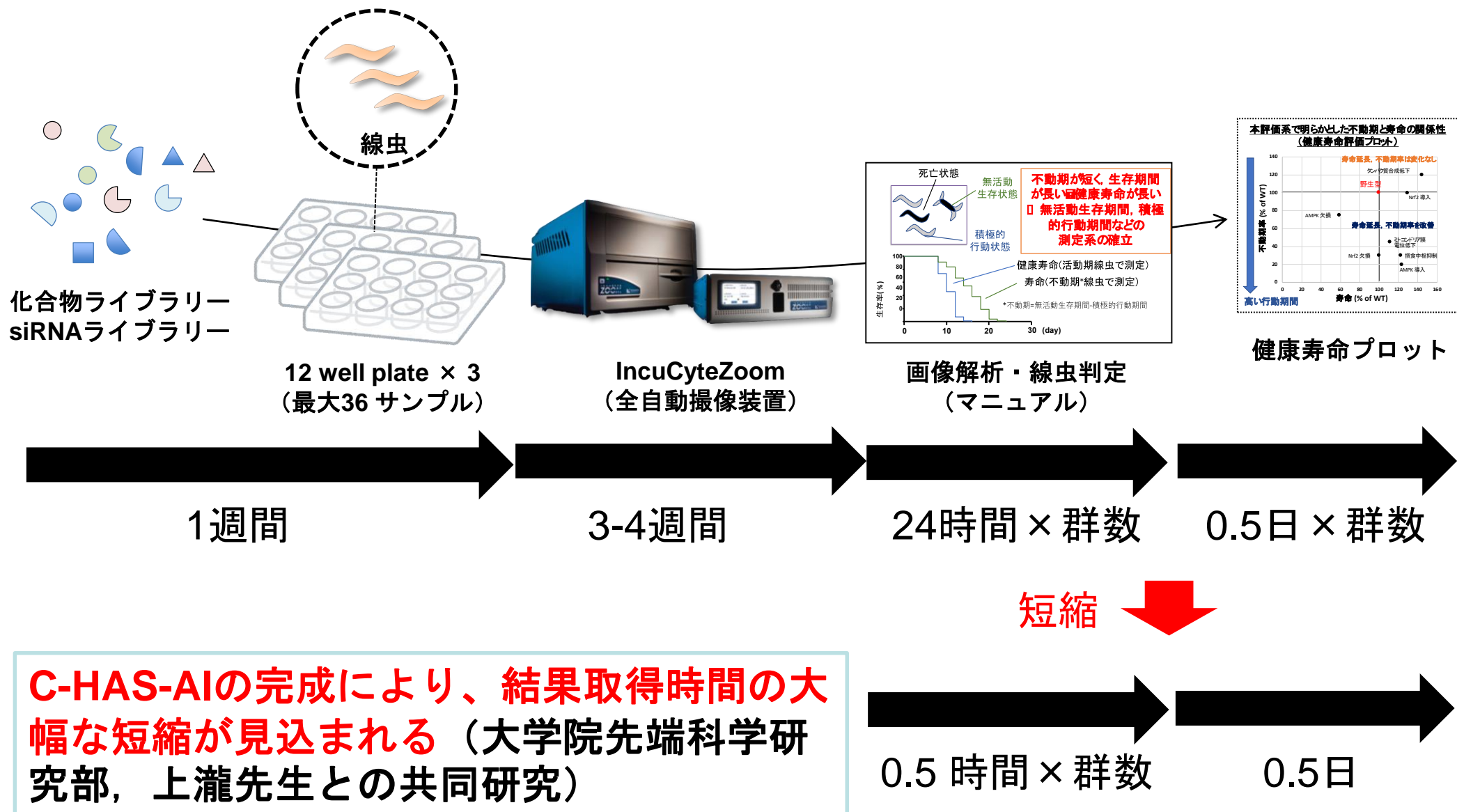
- ✓ **深層学習 (Deep learning)** を用いた画像からの線虫の自動判別および生存曲線自動演算アルゴリズムの作成システムのプロトタイプ (C-HAS-AI-β版) を活用し生存率測定を行った。
- ✓ C-HAS-AIによる測定の**寿命曲線 (Automatic count)** を、C-HASの**寿命曲線 (Manual count)** と比較したところ、同等の結果を得ることに成功した。

C-HASの寿命曲線
(Manual count)



深層学習システム (C-HAS-AI-β版) の寿命曲線
(Automatic count)





	C-HAS	C-HAS-AI プロトタイプ (C-HAS-AI -β版)	C-HAS-AI 完成版	マウスなどの 実験動物を用 いた方法	線虫強制水 泳行動量を用 いた方法 (Bansal et al., PNAS, 2015)	線虫の餌へ の到達度を用 いた方法 (Kawamura et al., G3, 2019)
① 客観性	○	○	◎	○	△	○
② 手間	○	◎	◎	×	△	△
③ 総作業時間 (1群あたり)	116時間 2時間×40日 +36時間	15.5時間 2時間×7日 +1.5時間	15.5時間 2時間×7日 +1.5時間	最低 730時間 2時間×365日	196時間 4時間×40日 +36時間	196時間 4時間×40日 +36時間
④ 同時測定検 体(群)数	36	36	36	最大6-8	10程度	10-20程度

今後の課題克服により進展

- 当該技術は、下記の視点を有する企業等との協業により、さらなる応用展開が期待できる。
- ✓ 特定の健康食品や機能性成分の健康寿命に対する効果をC-HASを活用して検証することを望む創薬研究・健康食品関連企業等との協業。
- ✓ 化合物・siRNAライブラリーを用いたスクリーニングを実施し、新たな健康延伸効果を有する化合物や分子の探索・同定・応用を実施したい企業等との協業。
- ✓ 熊大オリジナル天然物バンク（世界の様々な国々の有用植物やきのこ類、国内の有用植物・海洋微生物（真菌・放線菌・乳酸菌など）由来の成分を含む約8,000種類のエキスを含有）により、新たに見出された新規健康寿命調節成分の開発に関する研究支援と出口化支援を実施可能な企業等との協業。
- ✓ C-HASおよびC-HAS-AIの技術向上（撮像技術、システム構築など）や技術応用（当該技術を活用した別視点への応用展開など）を実施可能な企業等との協業。

- 発明の名称 : 線虫を用いた個体レベルの健康寿命の評価系
- 出願番号 : 特願2020-123805
- 出願人 : 国立大学法人熊本大学
- 発明者 : 首藤剛、甲斐広文、森内将貴、中野義雄、上瀧剛

- 2010年-2011年 株式会社A社と共同研究実施、商品開発
- 2017年- 文部科学省 地域イノベーション・エコシステム形成プログラム事業、熊本大学「有用植物×創薬システムインテグレーション拠点推進事業 (UpRod)」プロジェクトマネージャー
- 2019年 大学発ベンチャーくまもとファーマ設立支援
- 2020年 B社、C社とのUpRod事業での共同研究を実施中

* その他、複数案件で、企業との共同研究の多数実施

熊本創生推進機構 イノベーション推進部門

研究コーディネーター

合志 圭

TEL 096-342-3247

FAX 096-342-3300

e-mail liaison@jimukumamoto-u.ac.jp