

長寿医療研究委託事業

総合研究報告書

高齢者における生体防御機能低下の予防法と免疫老化レベルの標準化に関する研究

研究代表者 丸山 光生

国立長寿医療センター 研究所 部長

研究要旨： 加齢に伴う免疫応答機能は、リンパ球を中心とする免疫担当細胞の量的変化と質的变化の複雑に絡み合った結果、低下していくと考えられている。本研究班では、免疫担当細胞を中心に若年、成年層と比べて何が違うのかという比較を中心に生体防御系の機能低下に導く老化の分子機構を考察し、インフルエンザ等のウイルス感染に対する抵抗性の亢進、感染症の罹患後の合併症併発頻度の低下、予後の改善、認知症発症の予防等の臨床応用に直結した研究に発展させることを目指している。さらに、高齢者一人一人の免疫系における老化レベルを俯瞰できる指標の開発に関しては、栄養を鑑みた高齢者のインフルエンザワクチンに対する免疫学的反応性の検討ならびに高齢者生体防御機能に寄与する要因とそれに基づく治療戦略の策定に関する研究を推進している。今年度も引き続き、こうした基盤的な加齢研究から得られる知見を健やかな高齢化社会の構築実現に向けた臨床研究に結びつけようという目的意識の極めて高い研究を手掛けている。

研究分担者 清水 淳 (H19 年度のみ)
国立長寿医療センター 室長
内村健治
国立長寿医療センター 室長
宮崎忠昭
北海道大学 教授
澤 洋文
北海道大学 教授
赤津裕康
医療法人さわらび会福祉村病院
長寿医学研究所 副所長
中山勝敏
東京慈恵会医科大学 准教授
小笠原康悦 (H21 年度より)
東北大学 教授
丸山直記 (H21 年度より)
東京都健康長寿医療センター
副所長

A. 研究目的

加齢に伴う免疫応答機能は、リンパ球を中心とする免疫担当細胞の量的変化と質的变化の複雑に絡み合った結果、低下していくと考えられている。本研究では、免疫担当細胞を中心に若年、成年層と比べて何が違うのかという比較を中心に生体防御系の機能低下に

における老化機構を考察し、インフルエンザ等のウイルス感染に対する抵抗性の亢進、感染症の罹患後の合併症併発頻度の低下、予後の改善、認知症発症の予防等の臨床応用に直結した研究に発展させるとともに、高齢者一人一人の免疫系における老化レベルを俯瞰できる指標の開発にも手掛けていく。

B. 研究方法

本研究班は加齢に伴う免疫機能の変化について、H19年度には老齢、若齢マウス由来の免疫担当細胞における免疫老化関連遺伝子の発現動態を網羅的に解析する一方で、加齢に伴って顕著になる低応答性CD4T細胞の刺激培養条件について抗原提示細胞の種類等検討した。さらに複数の単球細胞株やマクロファージ株を用いて脳移行性細胞集団を見だし、脳実質内への血行性移入をin vivoで確認し、それらに関わる接着分子を同定できる系の確立を目指した。20年度以降は獲得免疫系については老齢、若齢マウス由来の免疫担当細胞における発現動態の変化から免疫老化関連遺伝子として Zizimin2遺伝子に注目し、遺伝子欠失マウス、単クローン抗体を樹立してZizimin2分子の免疫担当細胞における機能について解析を続けた。自然免疫系においてはNK細胞活性を指標に酸化ストレスに

よる加齢変化を検討し始めた。また加齢に伴い生体機能の低下は免疫系と神経、内分泌系との相関に帰する可能性を検討するためにビタミンCの合成系にかかわるSMP30の加齢性に減少する発現がカテコールアミン産生に与える影響や生体内ビデオ蛍光顕微鏡を用いたマウスミクログリア細胞(BV2)の血管内ローリングをアルツハイマー病モデルマウス脳内で観察した。インフルエンザウイルス感染モデル動物の研究では、若齢マウスと老齢マウスにおいて、感染後の肺組織における細胞外マトリックスとその分解酵素群の遺伝子発現変化を解析し、インフルエンザウイルス感染に関する病態形成、あるいは重篤化と加齢軸との関連を免疫担当細胞が産生するサイトカインの発現を指標に考察した。高齢者における臨床研究としてはH20、21年度を通じて、承諾を得られた健常若年ボランティアと健常高齢ボランティアに加えて、経管栄養管理患者や中心静脈栄養患者を対象に、インフルエンザワクチン接種前後一ヶ月の免疫能、抗体価の影響を栄養状態別に客観的に調査した。老化の機構に関する臨床研究としては今後につなげるものとしてウイルス感染に対する抗脂血症・抗炎症薬スタチンの効果とTGF- β による気道上皮細胞の加齢変化についても検討した。

(倫理面への配慮)

他機関における分担研究者の行なうすべての臨床研究は血液検査を含め、所属病院倫理委員会で定められたインフォームドコンセントに基づいて審査、承認の後、研究目的、危険性、個人情報に関する配慮については詳細に説明し、理解を得た上で書面にて本人、家族より承諾を得て行った。また研究目的の検査を含め、得られた全ての個人情報はカルテ内にまとめて病棟、あるいは個人情報管理室にて連結可能な形で管理とし、いずれの場合も個別に情報を抽出する場合は、匿名化の義務を設け、個人のプライバシーの保護には特段の配慮を行ってきた。研究等によって生ずる個人への不利益については穿刺時の痛み、血液の損失が挙げられるが、研究目的に沿った結果が得られ、高齢者における免疫機能の低下のメカニズムの一端が明らかになれ

ば、その生体防御機能低下の予防法等の開発や高齢者の免疫力の標準化の指標作りへの大いなる貢献につながる可能性があり、医学上の発展は大いに期待できる。また、動物実験に関しては実験動物の福祉を順守し、動物愛護上の配慮を踏まえ、的確に管理する。また使用、及び処分に関しても苦痛の軽減等、倫理上の問題はすべて、当該研究施設の倫理委員会で承認を受けた後に各研究機関が定めた動物実験ガイドラインに則って実施した。

C. 研究結果と考察

H19年度には獲得免疫応答の活性化の指標とされる脾臓胚中心で高発現する遺伝子として見いだした免疫老化関連遺伝子Zizimin2について、抗原刺激後の胚中心におけるリンパ球の遊走性との関係を明らかにし、CD4T細胞においては、亜集団の中で抗原による刺激や酸化ストレスが関与しなくても増加する低応答性の亜集団があることを見いだした。さらにZizimin2遺伝子については、翌20年度にはC末CZH2ドメイン部分に対する単クローン抗体(214I9)を樹立し、免疫担当細胞におけるZizimin2遺伝子の機能を強制発現系において検討したところ、フィロポディアの形成に関与すること、また、樹状細胞を用いた活性化実験ではTLR4やFc γ Rの下流でZizimin2が機能することが明らかにできた。3年目の21年度は待望のZizimin2遺伝子欠失マウスを用いて、マウス個体レベルにおける加齢変化と免疫機能について考察をはじめた。これまでに老齢マウスの脾臓においてはリンパ球数の変化に比べてZizimin2タンパクの発現が著しく減少していることが確認できたので現在作出したZizimin2遺伝子欠失マウスの加齢を待つて次回の研究班では個体レベルの免疫老化のメカニズムを解明して行きたい。併せて本研究班の発展性を考慮して21年度より自然免疫系の老化についても検討をはじめ、NK細胞に紫外線によるストレスあるいは酸化ストレスを与えることで細胞障害性が低下することを明らかにできた。このことより獲得免疫系のみならず自然免疫系についても加齢に伴う免疫応答の質的な変化が起こりうるという点で重要な成果となった。またSMP30欠損モデルマウスを

用いたカテコールアミン産生とビタミンCの相関から、ビタミンC低値群の血中・副腎中のドーパミンレベルは対照群と比較し高値であったが、noradrenalinとadrenalineは血中・副腎中において低値であった。この結果は血中ビタミンC量がカテコールアミン産生量に影響を与え、傷害個体のストレス応答に影響を与えることを示唆している。さらにE-セレクトリンリガンドを高発現するBV2ミクログリア細胞を末梢投与し、生体内ビデオ蛍光顕微鏡法により解析し、アルツハイマーモデルマウス脳血管内では、血管内ローリングが顕著に見られた。H20年度にはすでにアルツハイマーモデルマウス脳血管内では、投与した細胞が野生型に比べてより強固に接着する傾向を見いだしていたので、こうした変化が加齢性にも見られるのか否か、今後の結果に期待したい。ウイルス感染を刺激とした生体防御反応の加齢性低下のメカニズムと課題ではインフルエンザウイルスA/PR/8 (H1N1型)を接種して体重、死亡率、鼻腔ぬぐい液中のIgA、血中IgGや肺でのウイルスtiter等をH20年度より測定した。感染後生存した8週齢、32週齢の若齢マウスでは接種後9日目程を境に体重変化が低下から増加に向うが、老齢マウス(108週齢)では、体重変化が低下から増加に転じるのは感染後16日前後であった。また、各週齢のマウスの肺での種々のサイトカインのmRNAの発現においていくつかの相違が認められた。さらに、病原性の異なるインフルエンザウイルスを感染させた研究では強毒株を感染させた動物において感染局所への炎症細胞浸潤や、肺組織傷害、組織リモデリングに重要なMMP-8,12, TIMPが亢進しており細胞外マトリックスとその分解酵素群の遺伝子発現が、インフルエンザの病態形成に関わることが示唆された。高齢者におけるインフルエンザワクチン抗体価と免疫応答に関する臨床研究においては、毎年投与が行われている背景であるにもかかわらずワクチン接種前に抗体価の差異を認めたことは、ワクチン接種に加えて何らかの基礎的免疫力の改善策が高齢者に講じ得る可能性があるものとする。また栄養状態別にみて、経管栄養、中心静脈栄養管理の入院構成者間においてもプレバイオティクス製剤群で、便性の改善、腸内細菌叢の改善、IL7の変化、インフ

ルエンザ抗体価の維持が認められた。一方で免疫老化レベルの標準化に関する研究としては非BCG接種歴でツベルクリン反応陽性者である高齢者集団を2年間フォローし、呼吸器感染症や入院の事象に対する関連を検討すべくデータを集計し、20年度にはBMI要因追加、生存曲線解析施行を新たに加えた。これまでにロジスティック解析における死亡・入院、cox回帰解析における死亡でツ反陰性化が有意な要因であったこと、さらには高齢者において、細胞性免疫の低下はウイルス感染の発症頻度ではなく、感染の重篤化、二次性肺炎発症や死亡に影響を与える可能性が示唆された。最後に、ライノウイルス(RV)感染に対する抗脂血症/抗炎症薬スタチンの効果について、用量は対照に比し約 10^3 分の1に抑制された。ICAM-1発現、炎症性サイトカイン産生は有意に抑制されたが、酸性エンドソーム抑制効果は認められなかったが、TGF- β は気道組織の老化との関連についてはSIRT6強制発現によりp21発現・老化が抑制され、SIRT6抑制によりp21発現・老化が増強されることを見いだした。

D. 結論

高齢者における免疫機能の低下のメカニズムを分子的な質的变化や量的変化に注目して解明することで高齢者の免疫力維持につながる予防と感染症に対する免疫老化レベルの標準化については介入試験も含めたデータを元に今後の方向性をある程度示せた点では研究が予定通り進んだと考えている。研究班全体としては獲得免疫系に限らず、自然免疫系においても加齢に伴う機能低下が見られたことや動物実験においてはウイルス感染に対しての防御反応の経時変化に若齢、老齢に違いが見られた点、またヒトにおいてもワクチン接種前後での抗体価において高齢者間で有意な差が見られることから、基礎的免疫力の改善が高齢者に免疫応答を制御し得る可能性が示唆できた点等、この研究班として新たに見いだせた成果は大いに評価できると考える。今後は基盤的な加齢研究から得られる知見が健やかな高齢化社会の構築実現に向けた臨床研究につながるより大きなトランスレーショナルリサーチとして引き続き発展させて

いきたいと切望している。そのためには今回の研究班では研究費の限りもあり手の届かない研究域ではあったが、次回、これに続く形での研究体制を構築できるチャンスが与えられたならば、より大きなフィールドを視野に入れて積み上げる臨床データを疫学や統計学者も加わってもらい、最終的には数値にたとえる評価として本省等にも政策提言できる基礎-臨床融合研究班を目指していきたいと考えている。具体的には本研究班の成果として明らかになった免疫系に特異的な細胞集団や遺伝子の発現の変化、あるいはサイトカイン等の分泌タンパクの変動が高齢者によく見られる老年疾患(感染症)にどのような影響を及ぼしているのかをリスクの評価と予防という観点から一つ一つ明らかにしていきたいと考えている。

E. 健康危険情報 該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

(専門学術雑誌への発表:総数 108 件)

Wakoh T, Uekawa N, Terauchi K, Sugimoto M, Ishigami A, Shimada J and Maruyama M
Implication of p53-dependent cellular senescence related gene, TARSH in tumor suppression.

Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009, 380, 807-812.

Jia YJ, Asai A, Sakabe I and Maruyama M
Rat Monoclonal Antibodies against New Guanine Nucleotide Exchange Factor (GEF), mouse Zizimin2,
Hybridoma, 2010, in press

Hossain MM, Hosono-Fukao T, Tang R, Sugaya N, van Kuppevelt TH, Jenniskens GJ, Kimata K, Rosen SD, Uchimura K. Direct detection of HSulf-1 and HSulf-2 activities on extracellular heparan sulfate and their inhibition by PI-88., *Glycobiology*. 20:175-186. 2010

Li, H.M., Fujikura, D., Harada, T., Uehara, J., Kawai, T., Akira, S., Reed, J.C., Iwai, A., Miyazaki, T., IPS-1 is crucial for DAP3-mediated anoikis induction by caspase-8 activation., *Cell Death Differ.*, 16(12):1615-1621, 2009

Suzuki T, Orba Y, Okada Y, Sunden Y, Kimura T, Tanaka S, Nagashima K, Hall WW, Sawa H: The human polyoma JC virus agnoprotein acts as a viroporin. *PLoS Pathogens*, 2010, in press

Orba Y, Suzuki T, Makino Y, Kubota K, Tanaka S, Kimura T, Sawa H: Large T antigen promotes JC virus replication in G2-arrested cells by inducing ATM- and ATR-mediated G2 checkpoint signaling. *J Biol Chem*, 2010, in press

Hata S, Fujishige S, Araki Y, Kato N, Araseki M, Nishimura M, Hartmann D, Saftig P, Fahrenholz F, Taniguchi M, Urakami K, Akatsu H, Martins RN, Yamamoto K, Maeda M, Yamamoto T, Nakaya T, Gandy S, Suzuki T. Alcadein cleavages by APPa- and g-secretases generate small peptides p3-Alcs indicating Alzheimer disease-related g-secretase dysfunction. *J Biol Chem*. 284(52): 36024-36033,2009

高カロリー輸液にて栄養管理している高齢者における栄養・微量元素の推移に関する研究
赤津裕康 伊苺弘之, 松山善次郎, 小橋修, 瀬藤光利, 山本孝之 *新薬と臨床*, 58(11) : 1921-1930, 2009.

皆川俊介、荒屋潤、弓野陽子、野尻さと子、小島淳、原弘道、沼田尊功、河石真、中山勝敏、桑野和義 気道上皮細胞の老化における SIRT6 の役割 分子呼吸器学 vol 14, No 1, p 89-91, 2010

Maruyama N, Ishigami A, Kondo A Pathophysiological significance of senescence

marker protein-30 *Geriatrics & Gerontology International*, in press, 2010

2. 学会発表
(学会での講演、発表:総数 186 件)

Maruyama M Molecular-based analysis of functional decline in immune system.
IFOM- FIRC Institute of Molecular Oncology Foundation, Milan, Italy July 13, 2009

丸山光生「老化と免疫～免疫力ってご存じですか？」あいち健康長寿産業クラスター形成事業 国立長寿医療センター県民講座「豊かな長寿社会のために」 2009年11月6日 大府

.G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得 (総数 8 件)

抗JCウイルス剤及び進行性多巣性白質脳症治療剤(特願 2008-276126)。発明者:大場靖

子、澤洋文。出願年月日 2009年9月30日

ウイルスの感染を抑制する物質のスクリーニング方法およびウイルス感染抑制剤

発明者:大場雄介、宮崎忠昭 出願日:2009年10月14日

インフルエンザウイルス感染症の治療剤 発明者:宮崎忠昭、守屋直幸、守屋祐生子、二川安弘、草野妃里、西野太見子 出願日:2009年10月8日

インフルエンザへの感染防御能を有する栄養組成物(申請中) 発明者:高見正雄、永渕真也、高杉諭、赤津裕康。出願年月日:2009年12月10日

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし