

老化に伴う免疫機能低下に関する研究 (22-11)

主任研究者 丸山 光生 国立長寿医療研究センター 研究所 (老化機構研究部長)

**研究要旨**

近年、若年と老年層を比較する手法でリンパ球を中心とした細胞レベルからマウス、ヒトといった個体レベルで加齢に伴う生体機能変化の一つとしての免疫能低下のメカニズムについての研究が注目されている。本研究班は「免疫老化機構の解明」というミッションで種々の免疫系に特異的な細胞集団や遺伝子の発現変化、あるいはサイトカイン等の分泌タンパクの変動からそのメカニズムを検討し、そうした変化が高齢者によく見られる老年疾患（感染症を含む）や栄養介入にどのような影響を及ぼし、及ぼされているのかを明らかにすることを目指している。昨年度スタートした研究班で東日本大震災の影響（海老原）あるいは所属の移動に伴った研究テーマの変更（宮崎）で分担研究者の一部で変化のあったもの高齢者の免疫応答機能低下という命題について、Zizimin2(丸山光), SMP30 (丸山直)等、老化関連遺伝子として同定された因子の免疫老化メカニズムの解明や腸管免疫の加齢変化(佐藤)を中心とした基盤的な研究と高齢者を対象とした臨床研究(中山、赤津)の橋渡しとして、感染動物モデルを用いた人獣共通感染症リサーチセンターの研究者(澤)が参加することで、ヒト高齢者の調査と動物実験の結果を適正に判断/評価できる体制を整備した。とりわけ、主任研究者は高齢者の免疫機能低下の分子機構に関する研究として Zizimin2 遺伝子を中心に老化に伴う免疫機能低下に関する分子レベルの基礎研究をメカニズムの解明を検討する。

主任研究者

丸山 光生 国立長寿医療研究センター研究所 部長

分担研究者

佐藤慎太郎 東京大学医科学研究所 助教

丸山 直記 東京都健康長寿医療センター研究所 副所長

澤 洋文 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター 教授

中山 勝敏 東京慈恵会医科大学 准教授

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

A. 研究目的

近年、獲得免疫系、自然免疫系に加えて、腸管免疫系（腸内フローラと自己免疫疾患、生活習慣病、感染症を含む各種疾患との関連性）が注目されており、本研究においても加齢に伴う免疫機能低下においても腸内フローラの変化を含めた免疫動態を客観的に評価し、その予防や賦活化に有効な方策を検討していくことは喫緊の課題と

考えられる。健常高齢者においても日常生活の中で免疫能の低下が予防する手立てが提唱できれば医療政策的に、高齢者のQOLを改善できるばかりでなく、疾患療養中の高齢者にとっても、感染等に対するリスクの軽減が大いに期待される。いずれにせよ、本研究における感染症に対する免疫力賦活化や栄養介入による生体防御機能の改善に関する試みは政策的にも介護負担の軽減につながり、今後、間接的に在宅医療の推進を図れる等、健全な高齢化社会を築く上でも不可欠な研究として位置づけられ、まさに本研究班全体の目的と考えている。主任研究者は研究班全体の総括をするとともに、免疫老化関連遺伝子の1つである Zizimin2 の免疫系に関する分子機構を明らかにするために、今年度も引き続き、加齢に伴う免疫力の低下により、高齢者にとって重篤化する症例が多いことが知られているインフルエンザウイルス感染による重篤化と加齢軸との関連に注目し、ウイルス感染と生体防御における免疫老化関連分子 Zizimin2 の機能を Zizimin2 遺伝子欠失(Ziz2KO)マウスの作出を通して、個体レベルで検討する。

## B. 研究方法

新規グアニンヌクレオチド交換因子であり、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解明する過程で、今年度はZiz2KOマウスを用いての個体レベルでの免疫応答について、Ziziminファミリー遺伝子の機能的補完の可能性、T、Bリンパ球の質や量的な変化、あるいは獲得免疫系における抗原刺激後の免疫グロブリン産生等を中心に検討するとともに、高齢者に重篤な影響を及ぼすことが知られているインフルエンザウイルスによる感染に対するZiz2の役割についてZiz2KOマウスを用いたウイルス感染と生体防御におけるZiz2の役割を検討しはじめた。研究協力者として今年度は流動研究員(原田、坂部)と直江(国立長寿医療研究センター・室長)等が参加した。具体的には、Ziz2遺伝子の発現特異性とウイルス感染との関連を中心に北海道大学人獣共通感染症リサーチセンターとも協同して解析を進めた。

Ziz2KO マウスまたは野生型(WT)マウスに、PBS で希釈したインフルエンザ A ウイルス(A/PR/8/34 (H1N1))1000 あるいは 100pfu/head をイソフルラン麻酔下で経鼻的に投与した。その後、ウイルス感染後の体重変化及びマウス生存率を観察し、インフルエンザウイルス感染後の症状の重篤化や惹起される炎症に対する Ziz2 の関与を検討・評価した。また、Ziz2KO マウスに関しては、10 日間の観察後、各個体の肺胞洗浄液を採取し、肺組織における免疫担当細胞の割合を定量評価する事により、インフルエンザウイルス感染後の生体防御反応の動向を解析した。さらに、肺胞洗浄液内の特定の免疫担当細胞集団の解析を行う事により、インフルエンザウイルス感染後の自然免疫応答に対する Ziz2 の役割についても検討を加えた。

### (倫理面への配慮)

平成 23 年度においても、主任研究者の属する当施設ではヒト試料を対象とする研究は実施しなかった。一方、すべての研究に関わる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、的確に管理した。さらに一部、本研究におけるインフルエンザウイルスを用いる感染実験については北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター病原性微生物等安全管理委員会および北海道大学人獣共通感染症リサ

ーチセンター特殊空調施設運営委員会ですでに第二種使用等に係る実験等と拡散防止措置については機関承認実験として申請・承認を受けている（承認番号：21(46)）。その他、実験動物の使用、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、独立行政法人国立大学実験動物施設協議会指針等に基づき、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

Adult C57Bl6 WT マウスと Ziz2KO マウスにインフルエンザ A ウイルス(A/PR/8/34 (H1N1)) を高用量( $1 \times 10^3$  pfu/head)鼻腔内投与して、10 日間の体重変化と生存率の比較をしたところ、WT マウスと比較して、インフルエンザ A ウイルス感染後の Ziz2KO マウスの生存率の低下が観察された。しかしながら、インフルエンザ A ウイルス感染後の体重変化に関しては、2 群間での有意な差は認められなかった。

ウイルス感染後の Ziz2KO マウスにおける免疫系でどのような変化が見られるのか詳細を解析する目的で同じくインフルエンザ A を低用量( $1 \times 10^2$  pfu/head)投与し、ウイルス感染 3, 5 日後の気管支肺胞洗浄液 (BALF : PBS 1ml x 3) における全細胞の割合を比較したところ、PR8 を感染させた Ziz2KO マウスでは WT マウスに比べてその数が減少していた。さらにこれらの細胞集団についてフローサイトメトリー解析を行った結果、特定の免疫担当細胞の集団で WT の 30%程度に減少していることが明らかになった (未発表データ)。

### D. 考察と結論

高用量のインフルエンザウイルス PR-8 感染においては WT マウスと比較して、Ziz2 KO マウスでは感染後の生存率の低下が認められたものの、体重変化に顕著な差は認められなかった。この結果は、インフルエンザ A ウイルスの初回感染の際に、Ziz2 は重篤化に対する生体防御機構に関連している可能性が示唆されるものの、インフルエンザウイルス感染初期において、Ziz2KO マウスでは、WT においては顕著に見られる肺での炎症細胞の浸潤が減少していることが HE 染色により確認できた (未発表データ)。ウイルス感染における病原体の排除には、生体内での獲得免疫応答が重要であると言われている一方で、感染局所周縁の組織傷害を誘導し、症状を重篤化させるという観点からは感染初期の自然免疫応答が非常に大きな役割を果たすと考えられる。今回の実験結果からは、インフルエンザウイルス感染の力価と期間から Ziz2KO マウスにおいては、感染初期の自然免疫応答において何らかの機能低下が考えられ、それゆえ病原体の排除がうまく行われず、重篤化されることにより、生存率の低下が生じたという可能性が考えられた。今後、ウイルスの感染部位である肺組織を用いて Ziz2KO マウスでの重篤化の原因について詳細な解析を進めていくとともに獲得免疫系をはじめとする他の免疫系と老化との関連についても考察する必要があると考えている。

### E. 健康危険情報

なし

### F. 研究発表

## 1. 論文発表 (総説等も含む)

1) Nakamura H, Kawagishi H, Watanabe A, Sugimoto K, **Maruyama M**, Sugimoto M: Cooperative Role of the RNA-Binding Proteins Hzf and HuR in p53 Activation. **Mol Cell Biol.** 31(10): 1997-2009, 2011

2) Akatsu H, Toyama Y, Yamamoto T, **Maruyama M**: Attempt to Improve the Intestinal Microflora in Elderly Patients with an Enteral Nutrition Formula Containing Fructooligosaccharides. **Clinical Nutrition**, 6 (suppl.1): 33, 2011

3) Sato K, Iwai A, Nakayama Y, Morimoto J, Takada A, **Maruyama M**, Kida H, Uede T, Miyazaki T: Osteopontin is critical to determine symptom severity of influenza through the regulation of NK cell population. **Biochem Biophys Res Commun.** 417(1): 274-279, 2012

4) Sakabe I, Asai A, Iijima J, **Maruyama M**: Age-related guanine nucleotide exchange factor, mouse Zizimin2, induces filopodia in bone marrow-derived dendritic cells. **Immunity & Ageing** 9(2), 2012

5) Miyazawa M, Okubo K, Shiraki K, **Maruyama M**, Yamada J, Yamada H: Immunological approaches for healthy longevity. **Anti-Aging Medicine** 9 (1): 52-59, 2012

## 2. 学会発表(海外発表、招待講演、シンポジウムも含む)

### 1) **Maruyama M**:

Putative role of age-related functional GEF, Zizimin2 in immunosenescence  
The 1st Tri-Nations' Aging Symposium, Guangdong Medical College, Dongguan, China, April 29, 2011

2) Yamada J, Yokoi N, Hamuro J, Terai K, **Maruyama M**, Kinoshita S: Possible involvement of oxidative mechanism in dry eye evaluated by intracellular glutathione.  
83th Annual meeting of the ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology). Fort Lauderdale. Florida. U.S.A. May 2, 2011

### 3) **Maruyama M**:

A novel GEF, Zizimin2/Dock11 and aging in immune system  
The 21st International Conference of the Korean Society for Gerontology. Busan, Korea. July 9, 2011

- 4) Akatsu H, Toyama Y, Yamamoto T, **Maruyama M**:  
Attempt to Improve the Intestinal Microflora in Elderly Patients with an Enteral Nutrition Formula Containing Fructooligosaccharides.  
The 33rd ESPEN Congress, Sep 4, 2011, Gothenburg, Sweden.
- 5) Muto N A, Sunden Y, Hattori T, Fujikura D, Nakayama Y, Miyazaki T, **Maruyama M**, Kimura T, Sawa H:  
Pathological Examination of Lung Tissues in Influenza A Virus-infected Aged Mice. The 3rd international Young Researcher Seminar for Zoonosis Control, Sep 16, 2011, Sapporo, Japan
- 6) Iijima J, Nakayama Y, Sakabe I, Naoe Y, Miyazaki T, **Maruyama M**:  
Functional analysis of an age-related novel GEF, Zizimin2/Dock11 in immunosenescence.  
Ninth Asia/Oceania Regional Congress of Gerontology and Geriatrics, 25 October 2011, Melbourne, Australia.
- 7) **丸山光生**  
「最先端医学研究の現在・未来」  
名古屋大学医学部 第16回鶴舞公開セミナー 2011年4月8日 名古屋
- 8) 山田潤、羽室淳爾、古泉英貴、寺井和都、**丸山光生**、木下茂  
チオールレドックス制御による網膜色素上皮細胞からの VEGF 産生抑制. 第 115 回日本眼科学会総会, 東京, 2011 年 5 月 13 日
- 9) 山田潤, 羽室淳爾, 古泉英貴, 寺井和都, **丸山光生**, 木下茂  
加齢黄斑変性制御にむけた、チオールレドックス制御による VEGF 産生抑制. 第 11 回日本抗加齢医学会総会, 京都, 2011 年 5 月 27 日
- 10) 直江吉則、坂部勇、**丸山光生**  
加齢に伴う免疫低下メカニズムの解析 第 11 回日本抗加齢医学会総会 研究助成受賞講演, 京都, 2011 年 5 月 28 日
- 11) **丸山光生**  
Zizimin2 遺伝子からみた免疫老化研究. シンポジウム 27「健康長寿のための免疫学的アプローチ」 第 11 回日本抗加齢医学会総会, 京都, 2011 年 5 月 29 日
- 12) **丸山光生**  
NCGG で見つけた老化関連遺伝子達.  
長崎大学大学院医歯薬総合研究科大学院セミナー. 2011 年 5 月 30 日、長崎

- 13) 飯島順子、坂部勇、中山洋佑、宮崎忠昭、**丸山光生**  
新規 GEF、Zizimin2/DOCK11 の機能と免疫老化における役割の解析  
第 34 回日本基礎老化学会年会, 東京, 2011 年 6 月 17 日
- 14) 坂部勇、嶋田貴志、飯島順子、本田三男、直江吉則、**丸山光生**  
老化関連因子 Zizimin2/Dock11 の獲得免疫系における機能解析  
第 34 回日本基礎老化学会年会, 東京, 2011 年 6 月 17 日
- 15) 赤津裕康、遠山友紀子、**丸山光生**、山本孝之  
経管栄養管理高齢者への DHA・EPA 配合流動食介入による炎症指標および脂質・鉄代謝への影響 第 53 回日本老年医学会学術集会, 東京, 2011 年 6 月 17 日
- 16) **Maruyama M:**  
Aging and Immune system  
MIH, Technical University of Munich, August 31. 2011, Munich, Germany
- 17) **Maruyama M:**  
A novel GEF, Zizimin2/Dock11 and immune senescence  
MIH, Technical University of Munich, September 2. 2011, Munich, Germany
- 18) **丸山光生**  
老化関連遺伝子で探る分子レベルの 2 つの老化研究  
第 33 回日本基礎老化学会シンポジウム 2011 年 10 月 9 日、千葉
- 19) Nakayama Y, Harada T, Asai A, Miyazaki T, **Maruyama M:**  
A putative role of novel GEF, Zizimin2/DOCK11 in immune defense and its involvement in immunosenescence.  
第 40 回日本免疫学会学術集会 2011 年 11 月 29 日、千葉.
- 20) 嶋田貴志、坂部勇、本多三男、直江吉則、**丸山光生**  
老化関連因子 Zizimin2/Dock11 のアレルギー誘発好酸球集積における影響  
第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会ミニシンポジウム 2011 年 11 月 12 日、東京
- 21) **Maruyama M:**  
A novel GEF, Zizimin2/Dock11 and functional decline in the Immunosenescence. Invited lecture, NYU, MIH, Nanyang Technological University, 31 October 2011, Singapore
- 22) 坂部 勇, 浅井あづさ, 原田種展, **丸山光生**  
Zizimin2 CZH2 ドメインの細胞遊走における効果の検討

第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 15 日、横浜

23) **丸山光生**

「新規 GEF 分子、Zizimin2/Dock11 の生体防御経緯における役割と老化との関連について」北海道大学遺伝子病制御研究所セミナー

2012 年 2 月 1 日 札幌

24) 赤津裕康、栗原リナ、奥田研爾、山本孝之、**丸山光生**

高齢経腸栄養患者へのビフィズス菌長期投与による腸内細菌叢の検討

第 27 回日本静脈経腸栄養学会 2012 年 2 月 23 日 神戸

25) 赤津裕康、遠山友紀子、**丸山光生**、山本孝之

経管栄養管理高齢者における EPA・DHA 配合流動食介入によるアディポサイトカインへの影響 第 27 回日本静脈経腸栄養学会 2012 年 2 月 23 日 神戸

26) 赤津裕康、永淵真也、山地健人、川島昭浩、遠山友紀子、高橋毅、山本孝之、**丸山光生** 乳酸菌発酵成分およびプレバイオティクス配合流動食が経腸栄養患者の腸内菌叢および獲得免疫に及ぼす影響

第 27 回日本静脈経腸栄養学会 2012 年 2 月 24 日 神戸

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし