

加齢に伴う免疫機能低下の分子機構解明に関する基礎研究 (26-22)

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

団塊の世代が長寿社会の多数を占める時期を目前にした我が国においては高齢者の健康状態の維持と共にリスクを負った時の重篤化の回避、あるいは予防が極めて重要な施策である。一方で高齢者の多くをアドホック的に患わず感染症に対する生体防御レベルをどう制御すれば「ちょっとした病気に強い高齢者」を増やすことができるかという命題には免疫系の老化に関しての分子・細胞レベルでの研究が不可避である。本研究では、こうしたウイルス感染が引き金となり重篤化することが毎年のように社会問題になっている高齢者における免疫系の機能低下のしくみを老齢・老化モデルマウスを用いて詳しく解析し、感染に対する防御機構について高齢者(ヒト)に応用できる結果を見いだすことを研究目的の根幹としている。加齢に伴う免疫機能の低下には**生体防御機能**と免疫監視機構の加齢変化(脆弱化)が関わっているとされているが、ここでは前者の変化に注目し、「**加齢に伴う免疫機能低下機構をウイルス感染時に見られる変化として解析し、低下の予防、克服を目指す新たな知見を得る**」までに焦点を絞り、得られた知見を検証し、新たな免疫応答能力の指標作りを提案することで臨床応用への開発につなげることを成果目標に据える。具体的に、これまでの先行研究から免疫系の加齢変化に特異的な細胞集団や遺伝子発現、機能タンパクに注目し、それらの発現変化が生体防御系にどのような機能を持つのか検討してきた。また、臨床研究への展開の方向性をさらに明確するために全体計画として感染症に対する免疫応答による免疫賦活化に課題を限局する。その上で研究期間内に免疫老化関連遺伝子の機能解析、免疫老化機構の脆弱化に関わる分子機能から得られた知見が感染症の罹患とどのように関わり、どのように予防、改善につながるのかという点について機能的連関を提案すること、そして臨床データを吟味したリスクの評価と予防、免疫老化レベルを俯瞰できる新たな指標の策定につなげることを目指している。さらに高齢者に限らず有効な抗ウイルス薬やワクチン等の開発においてこれまで研究の進展が見られていないウイルス(病原体)に対して、本研究で有意義な感染モデルを樹立させることができれば、免疫系の老化メカニズムの解明のみならず、高齢者にとって脅威以外のなにもでもない感染に対する不活性化、消毒法、抗ウイルス薬やワクチン開発といった研究の発展につながる可能性がある。

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

赤津 裕康 名古屋市立大学大学院医学研究科 特任教授

A. 研究目的

「老化の機構に関する研究」の中で、加齢とともに生体防御機能が低下するメカニズムの解明は、高齢者の死因でも常に上位にある感染症に対しても深く関与する機構の解明であり、その重要性、必要性を疑う余地はない。本研究では、「加齢に伴う免疫機能低下機構をウイルス感染時に見られる変化を指標に解析し、低下の予防、克服を目指す新たな知見を得る」までに焦点を絞る。そして、得られた知見を検証し、新たな免疫応答能力の指標作りを提案することで、臨床応用への開発につなげる成果を目指している。主任研究者はこれまでも免疫系の加齢変化に特異的な細胞集団や遺伝子発現、機能タンパクに注目し、そうした変化が生体防御系にどのような機能を与えるのか検討してきた。本研究では臨床研究への展開の方向性をさらに明確するために全体計画として研究開始にあたる 26 年度は具体的に、来年度に向けた①「個体老化に伴う免疫機能低下レベルの分子的研究」と、②「ウイルス感染における老化免疫応答低下レベルの評価システムの開発」に関する研究として、免疫老化関連遺伝子欠損マウスを中心とした免疫応答の解析、分担研究者とともに老化に伴う腸管免疫能低下と腸内フローラの変化との関連に関する解析を行うことを目的とした。

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(Ziz2)を中心とした Zizimin ファミリーの免疫系に関する分子機構を明らかにするために、「感染症を指標にした個体老化の分子的研究」としては免疫老化関連遺伝子として同定した Ziz2 の個体レベルでのウイルス感染時における機能を中心にそのファミリー遺伝子も含めた解析を行った。

B. 研究方法

先行研究より用いている免疫老化関連遺伝子欠損マウス(Ziz2、Ziz3 KO マウス)を用いた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について継続的に検討する。加齢育成した野生型 C57Bl/6 マウスにおける骨髄、脾臓、胸腺、さらにはパイエル板や腸管リンパ節等の免疫組織における加齢変化を分子、細胞レベルでの解析を行う。一方の腸管免疫系の解析については、若齢マウス、老齢マウスの各グループから糞便を採取し、T-RFLP 法、16S rRNA クローンライブラリー法を用いて共生細菌群のプロファイリングを行う。これからは、より網羅的でバイアスのかかりにくい 16S rRNA PCR-DGGE 法を用いて、複数施設で飼育した若齢マウス、老齢マウス糞便の共生細菌群のプロファイリングを行い、比較する。解析が難航する場合は代替案として、盲腸内容物からのゲノムサンプリングを行い、次世代シーケンサーを用いた解析を検討する。

研究協力者として 26 年度は流動研究員の松田、岩下に加え、研究生として名古屋大学大学院医学研究科修士課程の大学院生、さらに共同研究として実験動物を用いたプロバイオティクス介入による高齢者の免疫機能賦活化の可能性についての腸管免疫系解析に関して新井が一部参加した。

(倫理面への配慮)

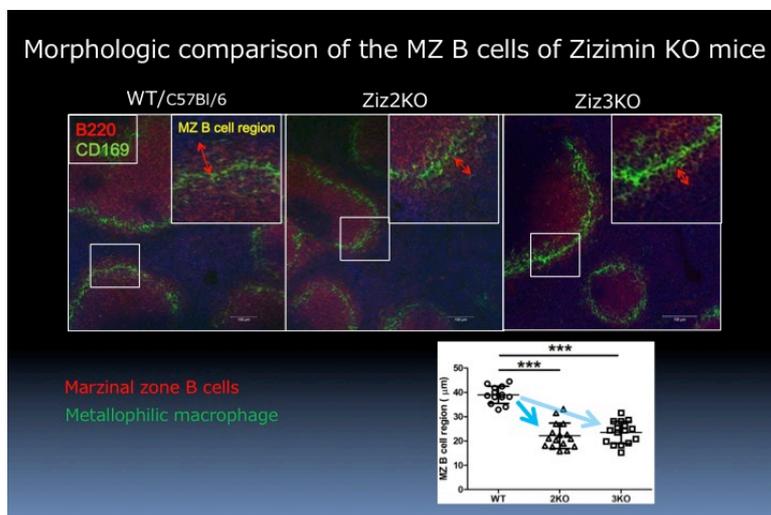
主任研究者の属する施設 (NCGG) ではヒト試料を対象とする研究は実施していな

い。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、的確に管理されたもとで実施した。具体的には実験動物の使用、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、また、遺伝子改変動物の扱いについてはカルタヘナ条約を遵守した適切な拡散防止措置も施した上で、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。さらに機能的老化モデルマウス（免疫老化関連遺伝子欠損マウス）、あるいは MEF 細胞等（初代培養細胞株）への一部のウイルス株（ノロウイルス、あるいはインフルエンザウイルス）を用いた感染実験においては国立長寿医療研究センター 感染実験安全委員会、ならびに動物実験倫理委員会に加えて遺伝子組換え実験委員会による承認を受けた後、適切に実施している。

C. 研究結果

個体老化に伴う免疫機能低下レベルの分子的研究については、先行研究より用いている免疫老化関連遺伝子欠損マウス(Zizimin2、3 KO マウス(Ziz2KO, Ziz3KO))に加えて、加齢育成した野生型 C57Bl/6 マウスにおける骨髓、脾臓、胸腺、さらにはパイエル板や腸管リンパ節等の免疫組織における加齢変化を分子、細胞レベルでの解析を継続し、免疫応答機能を相対化できる指標の探索を始めた。Ziz2KO についてはこれまで明らかにした骨髓の分画 A に含まれる B 細胞の増加に加えて、抹消の成熟 B 細胞である辺縁帯 B 細胞の割合が Ziz2KO で減少している事が明らかになった(図)。

さらに辺縁帯 B 細胞の減少を組織学的に確認する目的で、Ziz2KO マウスから脾臓を採取し、マクロファージ (CD169)と B 細胞 (B220)に対する組織染色を行った結果、辺縁帯 B 細胞が存在する領域の長さが遺伝子欠損マウスで短くなっていることも判明した。



(図)Ziz2KO,Ziz3KO マウスにおける脾臓辺縁帯 B 細胞の形態比較

B 細胞の割合と組織染色による辺縁帯 B 細胞が存在する領域)については Ziz2 同様、免疫担当細胞で発現のある Ziz3KO マウスでも同じような傾向が見られた。

加齢育成動物の解析については、使用するマウスの個体差の問題で若干の遅れが生じた。また、腸管免疫系の解析については、これまでに若齢マウス、老齢マウスの各グループから糞便を採取し、T-RFLP 法、16S rRNA クローンライブラリー法を用いて共生細菌群のプロファイリングを行ってきた。

さらにウイルス感染における老化免疫応答低下レベルの評価システムの開発については、平成 26 年度は、ウイルス感染を指標にした免疫応答（抗体産生、サイトカイン産生）を評価できるマウスモデルシステムの開発を目指した。

また、肺炎球菌感染における老化免疫応答改善の評価システムの一つとして、老齢マウスにおける経鼻ワクチンの効果に関して、腸内フローラとの関連も視野に入れ検討しはじめた。高齢者に対するインフルエンザワクチン接種をはさんでプレ/プロバイオティックスの介入を行い、ワクチン抗体価の変遷、血中サイトカインの変化、便性、便からの腸内細菌叢遺伝子解析によるフローラの変化を検討してきた。高齢者における栄養介入下での腸管免疫機能評価と老齢動物モデルでの検証というアプローチについても赤津を中心に進め、栄養介入試験としては、すでに動物試験において IL-12、IFN- γ など自然免疫指標の活性化やインフルエンザウイルス感染の軽減作用などが報告され高い免疫賦活作用を有する乳酸菌株 (*Lactobacillus paracasei*) を用いたヒトへの介入により腸内細菌叢、獲得免疫能の変遷を解析しており、データの集積を急いでいる。

D. 考察と結論

共生細菌群のプロファイリングに関して、今後はより網羅的でバイアスのかかりにくい 16S rRNA PCR-DGGE 法を用いて、複数施設で飼育した若齢マウス、老齢マウス糞便の共生細菌群のプロファイリングを行い、比較する計画を進めている。しかし、年度初めにはサンプリングを済ませたが、解析が難航し今のところデータ取得には至っていない。代替案として、次世代シーケンサーを用いた解析を検討中であり、この解析用に盲腸内容物からのゲノムサンプリングを終えたところである。

感染における老化免疫応答低下レベルの評価システムの開発においてはマウスにおいて、上気道の粘膜免疫は腸管粘膜免疫に比べ老化の影響を受けにくいことが報告されている。今後はこのことを検証するために、肺炎球菌ワクチンモデルを老齢マウスに適用し、その効果を検証予定である。同時に丸山を中心に加齢育成した野生型 C57Bl/6 マウスへの栄養介入試験を通して、そのメカニズムの解析を行う準備を進めている。これまでに若齢対照個体を用いてプロバイオティックスの介入による腸内環境における分泌型 IgA 量に効果が見られており、今後はそのメカニズムの解明も含めての老齢個体での結果を期待している。また平成 27 年度にかけて、特に高齢者の罹患後の重篤度が深刻なインフルエンザウイルス（呼吸器系）とノロウイルス感染（消化器系）に対する生体防御機能を解析できる実験条件をマウスモデルシステムとして確立し、感染後の免疫応答の変化を解析することで加齢による免疫応答レベルの予防、さらに回復に向けた手立てを考察する

Ziz2KO マウスを解析した結果については、骨髄由来の未成熟な B 細胞のみならず、成熟した濾胞 B 細胞が増加し、辺縁帯 B 細胞が減少していたと言う結果からは辺縁帯 B 細胞数は加齢に伴って減少する事と言う報告 (Shirin Z et.al, J Immunol. 2011) とも考え合わせると、その傾向は同じく Ziz3KO マウスでも見られたということは、Ziz2, 3 が脾臓における B 細胞の成熟過程に関与している可能性のみならず、辺縁帯 B 細胞の形成に関与するという可能性も考察できる。今後はこれまでに明らかにされてきている B 細胞の活性化シグナル経路についても Ziz ファミリーが何らかの関与して

いる可能性を検証すべく Ziz2、3 ダブルノックアウトマウスを用いて、Ziz ファミリーとして関与する免疫老化のメカニズムを明らかにしていきたい。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Kishimoto M, Matsuda T, Yanase S, Katsumi A, Suzuki N, Ikejiri M, Takagi A, Ikawa M, Kojima T, Kunishima S, Kiyoi H, Naoe T, Matsushita T, **Maruyama M.** RhoF Promotes Murine Marginal Zone B Cell Development.

Nagoya Journal of Medical Science. 2014 Vol.76, No.3,4

2) Hayakawa T, Iwai M, Aoki S, Takimoto K, **Maruyama M,** Maruyama W, Motoyama N.

SIRT1 suppresses the senescence-associated secretory phenotype through epigenetic gene regulation.

PLoS One. 2015 Jan 30;10(1):e0116480.

3) Akatsu H, Nagafuchi S, Kurihara R, Okuda K, Kanesaka T, Ogawa N, Kanematsu T, Takasugi S, Yamaji T, Takami M, Yamamoto T, Ohara H, **Maruyama M.**

Enhanced vaccination effect against influenza by prebiotics in elderly patients receiving enteral nutrition.

Geriatr Gerontol Int. 2015 Jan 22. doi: 10.1111/ggi.12454.

4) Matsuda T, Yanase S, Takaoka A, **Maruyama M.**

The immunosenescence-related gene Zizimin2 is associated with early bone marrow B cell development and marginal zone B cell formation.

Immunity and Ageing. 12(1), 2015 Feb 22

5) Yamakoshi K, Katano K, Iida M, Kimura H, Okuma A, Ikemoto-Uezumi M, Ohtani N, Hara E, **Maruyama M.**

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

Ageing Cell. 2015 Mar 31. doi: 10.1111/acel.12337. [Epub ahead of print]

6) 松田剛典、**丸山光生**

老化にともなう免疫能変化 (Variation in immune response with aging)

Surgery Frontier Vol.21 No.3 pp25-29, 2014

2. 学会発表

1) Maruyama M

Functional analysis of Zizimin family in immune response and immunosenescence

2014 Korea-Japan Joint Symposium and Annual Meeting of Korean Society for Gerontology, June 21, 2014, Jeju Island, South Korea

2) Iwashita Y, Harada T, Matsuda T, Sugimoto M, Maruyama M.

Putative function of a cellular senescence-related gene, TARSH/Abi3bp in cell proliferation and cancer metastasis

2014 Korea-Japan Joint Symposium and Annual Meeting of Korean Society for Gerontology, June 21, 2014, Jeju Island, South Korea

3) Maruyama M

Physiological implication of cellular senescence-related gene, TARSH/Abi3bp in cancer proliferation and metastasis.

2014 Mini-symposium on "Aging and Oxidative stress" Oct. 17, 2014, Chunchoen, Gangwon-do Korea

4) Maruyama M

Physiological functional of Immunosenescence-associated gene, Zizimin2

The 4th International Symposium of Asian Society for Aging Research, November 9, 2014, Beijing, China

5) Matsuda T, Yanase S, Hayakawa T, Matsui N, Takaoka A, Maruyama M.

Immunosenescence-associated gene Zizimin2 is involved in marginal zone B cell localization through down-regulating migratory activity towards CXCL13. Molecular Genetics of Aging, **Cold Spring Harbor Laboratory Meeting**, Cold Spring Harbor, NY, USA, September 30, 2014.

6) Iwashita Y, Harada T, Matsuda T, Terauchi K, Shimada J, Sugimoto M, Maruyama M.

Functional role of a cellular senescence-related gene, TARSH/Abi3bp in cell proliferation and cancer metastasis

Molecular Genetics of Aging, **Cold Spring Harbor Laboratory Meeting**, Cold Spring Harbor, NY, USA, September 30, 2014

7) Matsuda T, Yanase S, Hayakawa T, Matsui N, Matsushita T, Takaoka A, Casola S, Maruyama M.

IMMUNOSENESCENCE-RELATED GENE ZIZIMIN2 REGULATES MARGINAL ZONE B CELL LOCALIZATION

The 2015 Ageing Summit, February 11, 2015, London, UK

8) Matsuda T, Yanase S, Iwashita Y, Hayakawa T, Matsui N, Takaoka A, **Maruyama M.**

Zizimin2 Promotes Marginal Zone B Cell Development.

第 79 回インターフェロン・サイトカイン学会, 2014 年 6 月 19 日、北海道

9) 松田剛典、岸本磨由子、築瀬正吾、勝見 章、松下 正、**丸山光生**

マウス RhoF は辺縁帯 B 細胞の形成を促進する

第 79 回インターフェロン・サイトカイン学会, 2014 年 6 月 19 日、北海道

10) 飯田万由, 片野 諭, 木村広美, **丸山光生**, 山越貴水

The role of p16 in the age-related functional decline of the submandibular gland.

第 37 回日本基礎老化学会大会, 2014 年 6 月 27 日, 愛知

11) Matsuda T, Yanase S, Iwashita Y, Hayakawa T, Matsui N, Casola S, **Maruyama M.** Zizimin2 Promotes Marginal Zone B Cell Development

第 37 回日本基礎老化学会, 2014 年 6 月 27 日, 愛知

12) Iwashita Y, Harada T, Matsuda T, Sugimoto M, **Maruyama M.**

Implication of a cellular senescence-related gene, TARSH in cell proliferation and cancer metastasis : The 37th Annual Meeting of Japan Society for Biomedical Gerontology, June 27, 2014, Aichi

13) 岸本磨由子、松田剛典、築瀬正伍、鈴木伸明、池尻 誠、高木明、國島伸治、小嶋哲人、直江知樹、**丸山光生**、勝見 章、松下 正

RhoF の B 細胞分化に関する生体内での機能の解析

第 76 回日本血液学会学術集会 2014 年 10 月 31 日 大阪市

14) Iwashita Y, Harada T, Ishizawa K, Matsuda T, Terauchi K, Shimada J, Sugimoto M, **Maruyama M.**

Implication of a cellular senescence-related gene, TARSH/Abi3bp in cellular proliferation and lung cancer metastasis

第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日、横浜市

15) Ishizawa K, Iwashita Y, Matsuda T, Sugimoto M, **Maruyama M.**

Analysis of functional promoter region of a cellular senescence-related gene, TARSH: 第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 27 日、横浜市

16) Cen Zou, Matsuda T, Iwashita Y, Sugimoto M, **Maruyama M.**

Investigation and Functional Analysis of Promoter Region for Murine Immunosenescence-Associated Gene, Zizimin2: 第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 27 日、横浜市

17) Matsuda T, **Maruyama M**

Zizimin2 and Zizimin3 are Involved in Marginal Zone B Cell Localization through Down-Regulating Migratory Activity Towards CXCL13
日本免疫学会総会、2014 年 12 月 11 日、京都市

18) 岩下雄二、原田種展、石澤和也、松田剛典、寺内邦彦、島田順一、杉本昌隆、**丸山光生** Investigation of a cellular senescence-related gene, TARSH/Abi3bp in cellular proliferation and lung cancer metastasis
第 7 回 NAGOYA グローバルリトリート、2015 年 2 月 13 日、愛知

19) 石澤和也、岩下雄二、松田剛典、杉本昌隆、**丸山光生**

Analysis of functional promoter region of a cellular senescence-related gene, TARSH/Abi3bp
第 7 回 NAGOYA グローバルリトリート、2015 年 2 月 13 日、愛知

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