

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 (28-39)

主任研究者 丸山 光生 国立長寿医療研究センター 副所長

研究要旨

本指定研究は国立長寿医療研究センター (NCGG) における基礎から応用までの老化に関連した研究を集約、発展させ、国内外で急速に展開し始めた老年学研究への貢献をめざすものとして「a 老化の機構に関する研究」を研究対象として推進している。総括研究報告としては老化そのものを疾患と捉えることなく、28 年度は 29 年度に引き継ぐ形で **I. 老化の要因、II. 老化レベルの定量化、可視化**を細胞、組織における代謝機能、恒常性の維持を指標にした老化関連疾患の新規ターゲットやバイオマーカーの探索を手掛けた。さらに、感染予防や炎症予防を指標にした **III. 生理的な老化メカニズムの解明**を通して、老化やフレイルの分子機構の解明に挑んだ。主任研究者としての分担研究課題として、本年は共同研究で見出した食品成分を長期間摂取した C57/Bl6N マウス の自然加齢に伴う炎症反応に与える影響について検討し、脾臓の炎症性サイトカイン、血中炎症性サイトカイン濃度の変化から、摂取した食品成分は自然加齢マウスの老化に伴う炎症反応を抑制することで、個体の免疫老化についても低下を遅延させる可能性を示唆することができた。

主任研究者

丸山 光生 国立長寿医療研究センター 副所長

分担研究者

橋本 有弘	国立長寿医療研究センター	再生再建医学研究部 (部長)
松下 健二	国立長寿医療研究センター	口腔疾患研究部 (部長)
小木曾 昇	国立長寿医療研究センター	実験動物管理室 (室長)
杉本 昌隆	国立長寿医療研究センター	老化機構研究部 (室長)
山越 貴水	国立長寿医療研究センター	老化機構研究部 (室長)
本山 昇	椋山女学園大学	生活科学部 (教授)

A. 研究目的

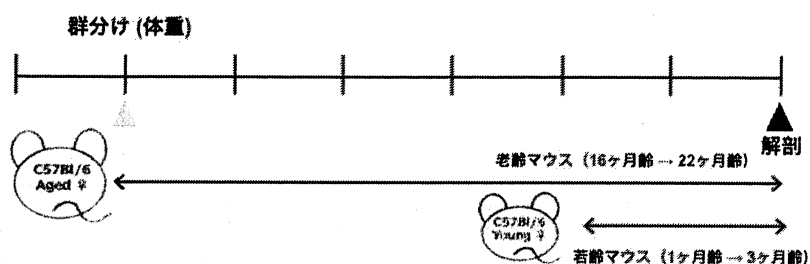
老化は、時間経過に伴って不可逆的に進行し、すべての細胞、組織、臓器の恒常性と再生能力の低下が付随した形態的・生理的な衰弱現象であるだけでなく、癌や心臓病、認知症を含む様々な老化関連疾患のリスクとなる。すなわち、老化機構の解明ならびに老化を制御することは、健康寿命の延伸という観点から社会的にも極めて重要である。本研究では加齢により体内に蓄積する DAMPs (Damage associated Molecular patterns) が炎症性サイトカインの産生を誘導することで慢性炎症の引き金になっているという報告に注目し、この加齢と免疫の関連性について栄養調節が免疫機能を制御しうるかどうかを明らかにする目的で共同研究を通して見出した食品成分を長期間摂取した C57/Bl6N マウス の自然加齢に伴う炎症反応に与える影響

について検討した。

B. 研究方法

16ヶ月齢の C57/Bl6N マウスを老齢雌マウスとして標準食摂取群(11匹)、標準食+食品成分摂取群(10匹)の2群で6ヶ月間自由摂取させた。併せて1ヶ月齢 C57/Bl6N マウスを若齢雌マウス(5匹)として標準食摂取群、標準食+食品成分摂取群(5匹)の2群で6ヶ月間自由摂取させた。

評価項目としては、食品成分摂取開始時を含め、介入時から6ヶ月後の介入終了時の①餌摂取量及び、体重推移を測定した。②血中サイトカインの変動については試験終了時点での血中炎症性サイトカインをバイオプレックスで網羅的に測定した。③さらに脾臓の IL-1 β 遺伝子の発現変動を試験終了時点で採取した脾臓細胞から mRNA を調整し、cDNA を用いてリアルタイム RCR にて測定、解析した。



研究スケジュール

(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分担研究者を含め、行わない。他施設における臨床研究に絡む事案については生命倫理面、および個人情報管理面ではヘルシンキ宣言の内容、遺伝子検査に関するガイドライン (遺伝医学関連眼科医等 10 学会及び研究会、平成 15 年 8 月)、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (文部科学省、厚生労働省、経済産業省、平成 13 年 4 月 1 日施行) および、疫学研究に関する倫理指針 (上記 3 省、平成 14 年 7 月 1 日施行) に準拠した。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て確実に管理した。さらに一部、免疫老化関連遺伝子欠損マウス、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) あるいは細菌株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、適切に実施した。その他、移動等を伴う遺伝子組換え体の扱いについてはカルタヘナ議定書に基づく「遺伝子組換え生物等の使用に規則による生物多様性の確保に関する法律」に従って遂行した。本研究はいくつかの組み換え DNA 実験と動物実験より構成されるので、我が国の感染症新法とカルタヘナ条約の批准による組み換え生物拡散防止に関する法の 2 つの法令に沿って計画・準備した。

C. 研究結果

① 餌摂取量及び、体重推移

標準食摂取群、ならびに標準食+食品成分摂取群において、各々の摂餌期間では若齢マウス老齢マウスとも、餌摂取量、体重変化に有意差は認められなかった。

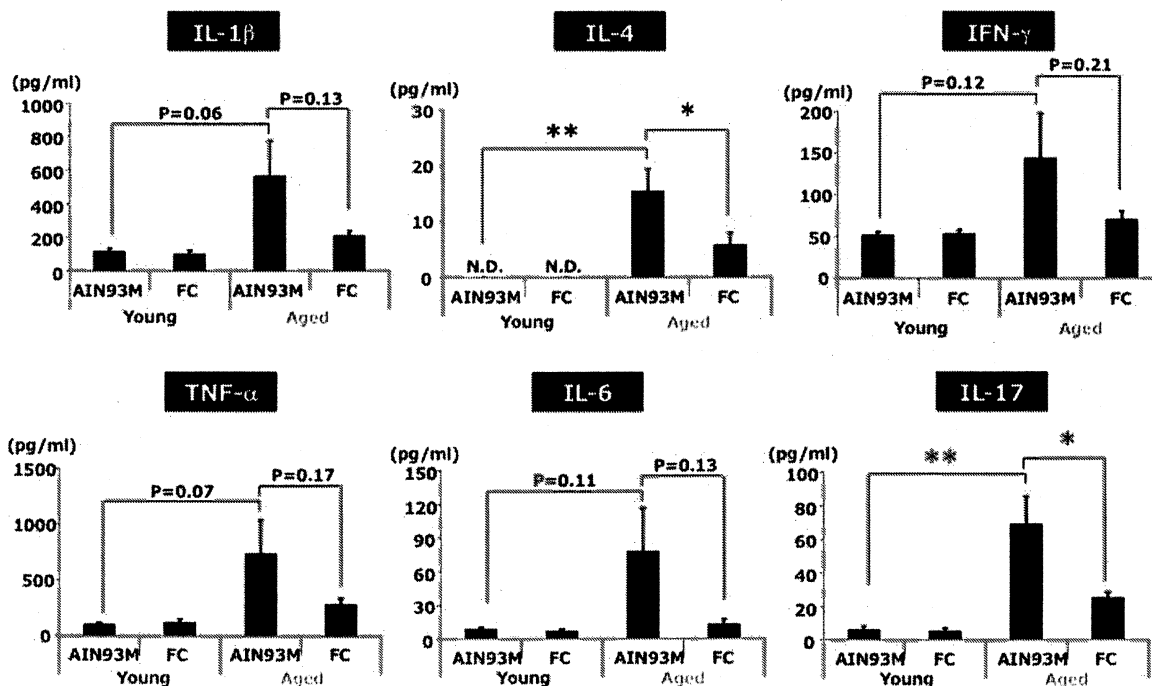
② 血中サイトカインの変動

標準食摂取群では、若齢マウスと比較して老齢マウスで血中炎症サイトカイン濃度が有意に高かったが、食品成分摂取群ではそれぞれ解析した炎症性サイトカイン間で程度の差は認められるが、下図に示すように IL-4、IL-17 等においては統計学的有意差も認められるほど、老齢マウスにおいても若齢マウスと同程度に抑制されていた。さらにここではデータに示さないが、IL-13 に加えて IL-12p40、IL-12p70 においても若齢個体、老齢個体の比較において若齢個体では見られない食品成分摂取群の効果が老齢個体ではむしろ発現が低下することを明らかにした。

③ 脾臓細胞の IL-1 β 遺伝子の発現変動

qRT-PCR による脾臓細胞の炎症性サイトカインである IL-1 β 遺伝子の遺伝子発現解析においても、血中と同様に老齢マウスの標準食群では若齢マウスに比較して有意に高くなり、食品成分摂取で老齢マウスにおいても若齢マウスと同程度まで抑制されることを見出した。さらに脾臓細胞における IL-1 β 遺伝子の遺伝子発現上昇は脾臓の中でもマイナー分画である CD11c 陽性細胞で顕著であることも確認した。

血中炎症性サイトカイン産生の解析



図中 AIN93M は標準餌、FC は標準食に食品成分を加えた餌を摂取した群を示す。

D. 考察と結論

今年度は加齢と免疫の関連性について栄養調節が免疫機能を制御しうるかどうかを明らかにする目的で企業との共同研究を通して見出した食品成分を長期間摂取した C57/Bl6N マウスの自然加齢に伴う炎症反応に与える影響について検討した。まず我々が本研究で用いた加齢育成マウス (C57/Bl6N マウス) の自然加齢に伴う免疫の変化はこれまで文献等で示されてきている脾臓由来の樹状細胞の分画で CD8 α 陽性、CD11b 陽性樹状細胞の割合や MHC classII とした活性化マーカーの発現低下、さらには CD4 陽性 T 細胞に見られる PD-1 高発現細胞の増加が見られ、加齢による炎症が助長されているのが確認できた。こうした免疫系の加齢変化として、これまで文献で明らかにされてきた樹状細胞、T 細胞の変化が確認できたので、食品成分 X の介入によって、これらの免疫系の加齢変化に対する影響を上記の方法で考察した。摂餌量や個体の体重変化については与えた食品成分の影響に優位な差は見られなかったが、介入 6 ヶ月後の血中に存在する炎症性サイトカインの産生については結果に示したように若齢個体では見られない食品成分摂取群の効果が老齢個体では顕著に確認することができた。このことは食品成分 X の介入によって、老齢個体においては慢性炎症の引き金とも考えられる炎症性サイトカイン産生が抑制されることを示唆している。またデータには示していないが、ヒト好中球に走化性を示す Interleukin-8 (IL-8) の機能的ホモログであることが知られている CXC ケモカイン、Macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) や Keratinocyte-derived chemokine (KC) も老齢個体ではともに産生が食品成分摂取群で有意に抑えられていることを確認することができた。炎症初期のマウスの好中球の遊走や浸潤には、こうした CXC ケモカインが重要な役割を担っていることを考えると、食品成分の介入によって、樹状細胞の老化形質を抑制することを介して、炎症を抑制する可能性が考えられた。また、食品成分介入前後の若齢、老齢個体由来の脾臓細胞より調整した mRNA から、加齢に伴い脾臓細胞の IL-1 β 遺伝子の発現が上昇するのを確認できたが、この発現上昇が見られた脾臓の中の画分の CD11c 陽性細胞で顕著であることから介入した食品成分 X のターゲットは樹状細胞である可能性がここでも検証されたと考える。今後はこうした免疫系の加齢変化 (老化) で担う炎症性サイトカインの機能について、Senescence-associated secretory phenotype (SASP)との関連等、細胞レベルでの老化のメカニズムがどのように個体の老化のプロセスに関連するのかについても研究を継続していきたい。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hashimoto M, Asai A, Kawagishi H, Mikawa R, Iwashita Y, Kanayama K, Sugimoto K, Sato T, Maruyama M and Sugimoto M
Elimination of p19ARF-expressing cells enhances pulmonary function in mice, **JCI Insight**1: e88057. 2016
- 2) Omata Y, Tharasegaran S, Lim YM, Yamasaki Y, Ishigaki Y, Tatsuno T, Maruyama M, Tsuda L. Expression of amyloid- β in mouse cochlear hair cells causes an early-onset auditory defect in high-frequency sound perception **Aging** (Albany NY).

8(3):427-439 2016

- 3) Tsuchiya Y, Naito T, Tenno M, Maruyama M, Koseki H, Taniuchi I, Naoe Y.
ThPOK represses CXXC5, which induces methylation of histone H3 lysine 9 in
Cd40lg promoter by association with SUV39H1: implications in repression of CD40L
expression in CD8+ cytotoxic T cells. **Leukoc Biol.**100(2):327-338, 2016

2. 学会発表

- 1) Maruyama M
Zizimin2 and Immunosenescence, 2016 Spring International Conference of the
Korean Society for Gerontology, 16 Jun 2016, Korea
- 2) Matsuda T, Zou C, Takaoka A, Maruyama M
Putative physiological function of Zizimin2 and immunosenescence, Cell Symposia
Aging and Metabolism, July 11, 2016, Sitges, Spain
- 3) Maruyama M
Our latest research findings in the field of ageing and immunity, Max Planck
Institute of Psychiatry, July 14, 2016, Munich, Germany
- 4) Matsuda T, Zou C, Hanashiro J, Sakamoto A, Sugimoto M, Takaoka A, Maruyama M
Gene regulation of Zizimin2 and its impact on immunosenescence, Cold Spring
Harbor Laboratory Meeting (Mechanism of Aging), 27 SEP, 2016, Cold Spring
Harbor, NY, USA
- 5) Iwashita Y, Sugimoto M, Maruyama M
Exploration and functional analysis of cellular senescence-associated long
non-coding RNAs, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting (Mechanism of Aging),
27 SEP, 2016, Cold Spring Harbor, NY, USA
- 6) Maruyama M
Immunosenescence-related gene Zizimin2 (Dock 11) and its family, IFOM, 16
September 2016, Milan, Italy
- 7) Maruyama M
Putative function of immunosenescence related gene, Zizimin2(Dock11) and its
family, Pasteur Institute, 19 SEP, 2016, Paris, France
- 8) Maruyama M
Cellular senescence and aging research from the standpoint of host defense or
immune system, RIKEN BSPO Aging symposium, 17 Nov, 2016, Tokyo
- 9) Maruyama M, Sakamoto A, Matsuda T
Both Zizimin2 and 3 double knockout mouse represents impaired protective
immunity against pneumococcal infection with immunosenescence.
The Scripps Research Institute 23 January 2017, Florida, U.S.A.
- 10) 岩下雄二、杉本昌隆、丸山光生
細胞老化関連 long non-coding RNAs の探索と機能解析
第 39 回日本基礎老化学会大会、2016 年 5 月 28 日、伊勢原市
- 11) 岩下雄二、杉本昌隆、丸山光生

- Exploration and functional analysis of cellular senescence-associated long non-coding RNAs、日本分子生物学会、2016年12月1日、横浜市
- 12) 坂本明彦、坂名城隼、高岡晃教、丸山光生
Concomitant deletion of Zizimin2/3 for mimicking impaired protective immunity in aged mice、第45回日本免疫学会学術集会、2016年12月5日、沖縄
- 13) 坂名城隼、坂本明彦、丸山光生
The murine immunosenescence-associated gene Zizimin2 promoter region and its transcriptional regulation with aging、第45回日本免疫学会学術集会、2016年12月6日、沖縄

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

発明者：森田悠治、城内健太、藤原大介、丸山光生

発明の名称：乳酸菌を有効成分とする加齢による網膜細胞死を抑制するための組成物

出願日：2016年9月9日

出願番号：特願2016-177056

出願人：国立長寿医療研究センター、小岩井乳業株式会社、
キリン株式会社 R & D 本部健康技術研究所

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし