

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、本指定研究は長寿医療研究開発費取扱細則第 2 条に示された研究開発費で行う研究の対象範囲「a 老化の機構に関する研究」と合致する。加えて、「b 加齢に伴う疾患のメカニズムに関する研究」「c 加齢に伴う疾患の予防手法の開発に関する研究」の発展が大いに期待できる研究である。老化そのものを疾患と捉えることなく、29 年度は 28 年度に引き続き「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行った。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発展させる。NCGG 内の分担研究者間との連携を最重要課題とし、研究班としての達成目標を明確にするために、軌道修正、班員の流動性にも配慮した。具体的には分担研究者に中枢性老化・睡眠制御研究プロジェクトチームの佐藤亜希子プロジェクトリーダーを加え、「NCGG で行う基礎老年学としての**研究テーマの集約化**」と「**出口戦略の明確化**」を最大限意識し、以下の研究内容を 3 本柱として時系列的に研究を進めた。

- ①老化の要因、細胞老化、癌抑制、サルコペニア等の分子機構解明に関する基礎老化研究
 - ②加齢に伴う生体機能変化とその虚弱 (フレイル)、低下に関する個体老化の基礎老化研究
 - ③実験モデル生物を用いた栄養、炎症制御を介する老化疾患の制圧に繋がる基礎老化研究
- 特に、基礎老年学研究の拠点化に必須な NCGG の実験動物施設棟に固有の加齢育成動物を個体としての供給に留めず、研究所内、将来的には国内外の老化関連遺伝子改変マウスの加齢研究の対照動物としての組織、細胞、遺伝子の維持、解析を進めることで、「**実験動物を用いた老化・加齢研究の均てん化**」にも積極的に取り組んでいる。

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)
佐藤亜希子	国立長寿医療研究センター	中枢性老化・睡眠制御研究 PT(PL)
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。「NCGG で行う基礎老年学としての研究テーマの集約化」と「出口戦略の明確化」を最大限意識し、以下の研究内容を上記「研究要旨」に掲げた①～③の3本柱において、この2年、時系列的に研究を進めている。全体研究ではモデル動物(マウス)、あるいは樹立培養細胞株を用い、加齢に伴う免疫応答、骨格筋、歯周組織の低下メカニズムについて NCGG 内での連携した研究の進捗を常に確認しながら、推進している。老齢個体における免疫応答の低下と細胞老化との関連についての解析では、特に免疫応答低下の原因の可能性として細胞老化に着目し、CDKN2A 遺伝子座にコードされる INK4A/ARF タンパク質の発現によって誘導されるエピジェネティックな制御が果たす役割を、個体老化との関連に注目して解析を始めた。不死化成人ヒト筋樹立細胞および高齢者筋細胞を用いて、分化状態およびストレス刺激存在下で、ヒト筋細胞が産生する分泌因子の全容を明らかにする事を目指している。加えて、サルコペニア患者骨格筋組織から、筋幹細胞の分離・培養、さらには不死化を試み、DNA および抗体アレイ解析等の網羅的スクリーニングを行い、遺伝子タンパク質の発現、機能解析を通して、その性質を成人および高齢者筋細胞と比較した。歯周組織の加齢変化に関しても、老齢個体を用いた遺伝子発現プロファイルの解析、老化関連遺伝子の同定と歯周病病態への関与について検討している。また、薬剤によるドライマウス誘発性を in vitro および in vivo の実験系で検証を行う。また、国内外の老化関連遺伝子改変マウスの加齢研究、寿命研究の基盤にすべく、実験動物施設棟においては老齢、老化モデルマウスの飼育環境、管理に関して、まずは野生型 C57Bl/6 マウスの自然加齢変化に伴う遺伝子、細胞、組織レベルの変化を縦断的に解析することを目的に開始した。

基礎老年学研究拠点の形成(28-29) H28、29年度



B. 研究方法

当該実験動物施設棟内の飼育環境と老化研究に関する基礎データを集約し、マウスを用いた老化研究における老化関連遺伝子、細胞、組織レベルでのアノテーション作りを通して、本施設で飼育している加齢育成動物を種々の遺伝子改変老化研究モデルマウスの対照となりうる飼育環境、品質管理においてオーサライズするものであり、基礎老年学研究の拠点化にも必須な研究として研究者全員で開始した。昨年度より引き続き、C57BL/6N マウス雌雄各 10 個体より 3 ヶ月毎に組織（大脳、小脳、胸腺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、空腸、精巣もしくは卵巣）を採取し、保存した。平成 30 年 4 月末時点で、3、6、9、12、15、18 ヶ月齢のマウス組織サンプルを採取している。研究資源としてマウスの組織を保管・管理するマウス臓器バンクの設立に向けた基礎データとしても大変有用だと考えている。マウス組織サンプリングと並行して、杉本を中心に C57BL/6N 系統の肺組織の加齢性変化について、スパイロメトリーによる計測を行った。雄性マウスにおいては現時点では経時変化はほとんど観察されないが、雌性マウスにおいては 15 ヶ月齢までの間に徐々に組織弾性が失われる傾向が見られている。肺組織の老化は、気腫発症のリスク因子であるが、雌性マウスが雄よりも気腫を発症しやすいのは肺組織の加齢性変化が大きいことに起因する可能性が考えられている。また丸山は同じく採取した脾臓リンパ球を解析することで加齢性に变化する B 細胞集団、T 細胞集団について FACS を用いて解析しているが、大きな変化は見られていないので、引き続き加齢サンプルを継続解析する。

①老化の要因、細胞老化、癌抑制、サルコペニア等の分子機構解明に関する基礎老化研究
(丸山、杉本、橋本)

平成 28 年度から開始した「基礎老年学研究拠点の形成に必須な分子老化機構解明に関する基礎研究」の総括を進めながら、前述した野生型 C57BL/6 マウスの自然加齢変化に伴う遺伝子、細胞、組織レベルの変化を縦断的に解析する計画においては小木曾を中心として全ての分担研究者の協力のもと、2016 年 11 月より向こう約 2 年間(24 ヶ月齢)の計画で開始した。

②加齢に伴う生体機能変化とその虚弱（フレイル）、低下に関する個体老化の基礎老化研究
(橋本、松下、山越、佐藤)

平成 29 年度より、「実験モデル生物を用いた視床下部の加齢変化と睡眠制御機構に関する基礎老化研究」として佐藤を新たに加え、脳部位(視床下部、視床、海馬、小脳、大脳皮質、脳幹)を採取し、RNA サンプルを抽出する。老齢サンプルが揃った時点で、網羅的遺伝子発現プロファイリング解析を実施する。「細胞培養を中心としたサルコペニアの分子機構解明に関する基礎研究」として、サルコペニアの分子機構を解明するための基盤情報をうるために、80 歳以上の高齢者由来のヒト骨格筋細胞を含む複数の不死化ヒト筋細胞を樹立し、それらに関する遺伝子発現解析データを蓄積し、ヒト筋細胞の加齢に伴う変化を遺伝子発現レベルで明らかにする。口腔感染症に係る加齢に伴う口腔機能低下に関する研究については老齢マウス上皮において発現の変化する遺伝子の解析を松下が進める。また、山越は分子マトリクス電気泳動(SMME)を用いて、加齢によるヒト唾液粘性の変化を調べた。

③実験モデル生物を用いた栄養、炎症制御を介する老化疾患の制圧に繋がる基礎老化研究
(本山、小木曾、丸山)

「老化の要因、細胞老化の分子機構解明と炎症制御を介する老化疾患の制圧につながる老化研究」として、寿命および老年病発症に密接に関与する細胞老化および細胞老化付随分泌現象(SASP)のメカニズム解明を試みる。また SASP 因子の発現に対して p53 が抑制的に作用す

ることが知られているが、そのメカニズムは明らかにされていないので、特に p21 との関連についての解析も行った。一方「老齡、老化モデルマウスの飼育環境、管理に関する基礎老化研究」という事では全体での研究計画で記載したように施設棟内加齡育成動物(マウス)の飼育環境、管理に関する基盤整備と NCGG 内の老化モデルマウスの加齡研究に関する実態、希望の調査・検討を継続した。

(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老化の要因、細胞老化、癌抑制、サルコペニア等の分子機構解明に関する基礎老化研究 (丸山、杉本、橋本)

「実験モデル生物を用いた老化の要因、細胞老化、癌抑制の分子機構解明に関する基礎老化研究」としては、杉本を中心に哺乳動物細胞の分裂寿命はストレスシグナルによる CDKN2A 遺伝子座の制御に依存するところが大きい事に注目し、これまでに CDKN2A 遺伝子座の制御に関わる因子の探索系を樹立した。この系を用い、CDKN2A 遺伝子座を介して細胞分裂寿命に影響を与える因子の同定を行う。

②加齡に伴う生体機能変化とその虚弱(フレイル)、低下に関する個体老化の基礎老化研究 (橋本、松下、山越、佐藤)

「細胞培養を中心としたサルコペニアの分子機構解明に関する基礎研究」として、サルコペニアの分子機構を解明するための基盤情報に関する遺伝子発現解析データを蓄積し、ヒト筋細胞の加齡に伴う変化を遺伝子発現レベルでこれまでのデータを比較解析した結果、高齢者にのみ共通に見られる遺伝子発現変化は同定されなかった。その一方で培養下におけるヒト筋細胞の筋分化過程で、これまでに報告されていないプロスタグランジン D2 合成酵素、FNDC5、SIRT2 の 3 遺伝子は、分化条件で培養すると、急激かつ著しい発現が増大する事を見いだした。「口

腔感染症に係る加齢に伴う口腔機能低下に関する研究」としては松下が中心に老齢マウス上皮において、接着分子の Claudin-1、Occludin および E-cadherin の発現が低下すること明らかにした。山越は分子マトリクス電気泳動(SMME)を用いて、加齢によるヒト唾液粘性の変化を調べる予備実験としてまず、マウス顎下腺サンプルを使用して検討を進めた。これまでに顎下腺に含まれる高分子糖蛋白質をうまく分離することに成功した。

③実験モデル生物を用いた栄養、炎症制御を介する老化疾患の制圧に繋がる基礎老化研究
(本山、小木曾、丸山)

寿命および老年病発症に密接に関与する細胞老化および細胞老化付随分泌現象 (SASP) のメカニズム解明に関して、具体的には DNA 損傷・酸化ストレス・クロマチンリモデリングを誘導する因子による細胞老化誘導条件を樹立した。29 年度は細胞老化誘導因子である細胞周期抑制因子 p21 の細胞老化および SASP における役割を検討した結果、p21 は細胞老化誘導には必須ではないことを明らかにした。さらに p53 によって発現誘導される p21 が SASP を抑制している可能性を明らかにしつつある。また、SASP 発現抑制作用を持つ SIRT1 が細胞老化誘導に伴う p21 の発現上昇に必須であることを明らかにした。小木曾を中心としては具体的に前述の C57BL/6j マウス雌雄の組織収集のみならず加齢に伴う生体変化や老年病の発症時期について個体レベルを中心に生理学的、行動学的、病理・形態学的な解析による老化のメカニズムの解明を進めた。特に今年度は行動学的解析からロータロッド試験において月齢に伴う変化が観察された。

D. 考察と結論

①「老化の要因、細胞老化、癌抑制、サルコペニア等の分子機構解明に関する基礎老化研究」においては「実験モデル生物を用いた老化の要因、細胞老化、癌抑制の分子機構解明に関する基礎老化研究」として CDKN2A 遺伝子座の制御に関わる因子の探索系を用い、CDKN2A 遺伝子座を介して細胞分裂寿命に影響を与える因子の同定を行うことを考えている。具体的には細胞老化と加齢に伴う免疫細胞の CDKN2A 遺伝子座の発現変化について、若齢および老齢マウスから免疫応答細胞を採取し、CDKN2A 遺伝子の発現変化を調べ、また同遺伝子座のエピジェネティック状態を解析する。CDKN2A 遺伝子に変化が見られなかった場合には、他の細胞周期制御因子・経路の解析を行い、免疫反応性が低下する原因を探る。サルコペニアに関する研究成果については若齢者由来と高齢者由来の筋細胞の増殖要求性を比較し、細胞密度や酸化ストレス等に対する細胞応答に違いを見いだしている。高齢者由来筋細胞においても、筋ジストロフィー筋細胞にみられるような応答性の違いがみられる可能性についても今後検討していくべきであるが、分担研究者の橋本が今年度で離職することから、継続に関しては困難な面が予想される。

②加齢に伴う生体機能変化とその虚弱 (フレイル)、低下に関する個体老化の基礎老化研究「口腔感染症に係る加齢に伴う口腔機能低下に関する研究」については酸化ストレスの促進に関与する Vnn1 やマクロファージのエンドトキシン耐性を促進する Irg1 などの分子の発現増加などが確認されており、今後、組織染色による局在や、細胞培養系におけるそれらの変化の意義について検討を続ける。また山越はさらに老齢マウスを用い、腎臓と膵臓において糖鎖に着目した老化のマーカーを見つけることを目的とし、前述 3 ヶ月毎にマウス組織のサンプリングを行い、老化の継時的変化を追って解析することを計画している。

③「実験モデル生物を用いた栄養、炎症制御を介する老化疾患の制圧に繋がる基礎老化研究」
今後は今年度までに樹立した DNA 損傷・酸化ストレス・クロマチンリモデリングを誘導する因子による細胞老化誘導条件下で食品由来因子および天然物の細胞老化誘導および SASP 発現における影響の検討を開始する。具体的には線虫およびマウスにおいて寿命延長効果を示すグルコサミン、ポリフェノールを豊富に含むローズ花びら抽出物、豆味噌由来イソフラボン抽出物、リコペンの細胞老化および SASP における影響の検討を進めていく。加齢と免疫の関連性については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腸内フローラと免疫老化の関連については、自然加齢マウス個体から採取した糞便を用いてのメタゲノム解析や腸内細菌代謝産物に焦点を当てたメタボローム解析等のシステム生物学的手法を駆使し、免疫機能改善の指標となる栄養、老化によって変化する腸内細菌の探索についても「老化の指標作り」の一環として、丸山を中心に今後の研究として議論していく。最後に、「老齡、老化モデルマウスの飼育環境、管理に関する基礎老化研究」では加齢に伴う生体変化や老年病の発症時期について個体レベルを中心に生理学的、行動学的、病理・形態学的な解析による老化のメカニズムの解明を目指す。今後は特に小木曽を中心に形態学的（例、NMJ の変化）な解析を含めた加齢変化の評価を行っていきたいと考える。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakamoto A, Matsuda T, Kawaguchi K, Takaoka A, Maruyama M. Involvement of Zizimin2/3 in the age-related defect of peritoneal B-1a cells as a source of anti-bacterial IgM. *Int Immunol*. 2017 Nov 1; 29(9): 431-438.
- 2) 丸山光生 特集：「老年医学を支える基礎老化研究」、*Geriatric Medicine 老年医学* Vol.55 (5):469-470, 2017
- 3) 坂本明彦、丸山光生 「細胞老化と個体老化」*病理と臨床* 36(2): 98-101, 2018

2. 学会発表

- 1) Yamakoshi K, Iida M, Kimura H, Kameyama A, Maruyama M. Bmi-1 controls cancer cell motility and invasion through the glycosyltransferase C2GnT2. *Keystone Symposia*, 18 May, 2017, Yokohama, Japan
- 2) Maruyama M, Sakamoto A, Matsuda T, Matsui N, Takaoka A. Concomitant deletion of Zizimin2/3 to mimic impaired protective immunity in aged mice. *Gordon Research Conferences (Aging Biology of)*, July 11, 2017. Les Diablerets, Switzerland
- 3) Yamakoshi K, Iida M, Kimura H, Kameyama A, Maruyama M Bmi-1 controls cancer cell motility and invasion through the glycosyltransferase C2GnT2. *Gordon Research Conferences(Aging Biology of)*, July 11, 2017. Les Diablerets, Switzerland
- 4) Maruyama M, Jounai K, Sakamoto A, Morita Y, Kirisako T, Matsuda T, Fujiwara D. A novel food constituent potentially mitigates inflammation in physiologically aged

- mice. IAGG 2017 World Congress. July 24, 2017. San Francisco, CA, USA
- 5) Akatsu H, Arai S, Tanaka T, Kamiya A, Arakawa K, Masaki Y, Tanaka H, Kanematsu T, Ohara H, Inoue K, Xia J-Z, Maruyama M, Investigation on the effect of aminolevulinic acid on intestinal environment of aging mice 39th ESPEN CONGRESS. Sep 10, 2017. Hague, Nederland
 - 6) Maruyama M, Sakamoto A, Takaoka A Zizimin2-deficient mice showing defective production of natural antibacterial immunoglobulin M and interruption in B-cell development 19th GCC. Sep 14, 2017. Venice, Italy
 - 7) Muguruma K, Ogiso N, Tomita K, Takano S, Yamaguchi K, Matsui N, Maruyama M Search for definitive senescence biomarkers in mice: What changes will occur in naturally-aged mice? 68th AALAS National Meeting, Oct 17, 2017. Austin, USA
 - 8) Ogiso N, Muguruma K, Tomita K, Takano S, Tamura S, Tanii S, Maruyama M Development of naturally-aged rats and elucidation of aging mechanism
 - 9) Sakamoto A, Takaoka A, Maruyama M Putative function of Zizimin2/3 in Immunosenescence of peritoneal B-1a cells as a source of natural antibacterial IgM KEYSTONE SYMPOSIA, Feb 27, 2018, Austin, TX, USA
 - 10) Hayakawa T, Kimura Y, Nagasaki M, Nagata M, Morimoto R, Maruyama M, Motoyama N. p21 negatively regulates DNA damage-induced pro-inflammatory response during senescence. "Aging, Inflammation and Immunity", Keystone Symposia, Feb 27, 2018, Austin, TX, USA.
 - 11) 三河隆太、鈴木洋平、丸山光生、佐藤 匡、杉本昌隆
Clearance of senescent cells ameliorates emphysema-associated pathologies in mice
第 30 回日本老年学会・第 40 回日本基礎老化学会合同大会、2017 年 6 月 15 日、名古屋
 - 12) Yamakoshi K, Iida M, Kimura H, Kameyama A, Maruyama M: Bmi-1 controls cancer cell motility and invasion through the glycosyltransferase C2GnT2
第 30 回日本老年学会・第 40 回日本基礎老化学会合同大会、2017 年 6 月 15 日、名古屋
 - 13) 坂本明彦、松田剛典、高岡晃教、丸山光生 Involvement of Zizimin2 in the defective antibody production by aged peritoneal B-1a B cells、
第 30 回日本老年学会・第 40 回日本基礎老化学会合同大会、2017 年 6 月 16 日、名古屋
 - 14) 城内健太、森田悠治、松田剛典、桐浴隆嘉、坂本明彦、藤原大介、丸山光生 : Effects of food constituents on immunosenescence in physiological aged mice
第 30 回日本老年学会・第 40 回日本基礎老化学会合同大会、2017 年 6 月 16 日、名古屋
 - 15) 丸山光生 基礎老化研究の最前線と健康長寿社会への取り組み 第 13 回加齢皮膚医学研究会, 2017 年 4 月 29 日, 福島市
 - 16) 長友涼介, 岡田泰毅, 筒井陽仁, 赤津裕康, 丸山光生, 井之上浩一 ピコリルアミン誘導体化 LC-MS/MS を用いた腸内細菌叢解析を目指した短鎖脂肪酸の網羅的分析法の開発 日本医用マススペクトル学会第 42 回年会 2017 年 9 月 15 日 東京
 - 17) Kawaguchi K, Sugiyama D, Maruyama M : The analysis of molecular mechanisms underlying inflammatory reactions in chronological skin aging 第 40 回日本分子生物学会年会 2017 年 12 月 5 日 神戸
 - 18) 川出義浩、赤津裕康、丸山光生、大原弘隆 : ペクチン含有濃厚消化態流動食 (ハイネ

イーゲル®)の長期投与が栄養状態および消化管に及ぼす影響第 33 回日本静脈経腸栄養学会学術集会、2018 年 2 月 22 日、横浜市

- 19) 岡田泰毅, 長友涼介, 赤津裕康, 丸山光生, 井之上浩一 Pattern analysis of branched-chain short-chain fatty acids by derivatized LC-MS/MS 誘導体化 LC-MS/MS 法によるマウス便中の分岐鎖短鎖脂肪酸のパターン解析
日本薬学会第 138 年会 2018 年 3 月 27 日 金沢市

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

発明者：丸山光生、坂本明彦、森田悠治

名称：ラクトバシラス・パラカゼイ乳酸菌を有効成分とする加齢による身体活動量低下を抑制するための組成物

出願日：2017 年 11 月 30 日

出願人：国立長寿医療研究センター、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