

基礎老年学研究拠点の育成・強化 (19-1)
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

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、世界水準の基礎老年学研究拠点として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、2019 年度はこれまでの 3 年間の研究を引き継ぐ形で **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。基礎老年学研究拠点 NCGG で行う基礎老年学としての 2016 年度からの基礎老年学研究拠点の形成期 (~2018 年度の 3 年間) に積み上げた基盤のもとに 研究内容の成熟と社会実装研究の促進を最大限意識して、以下の研究内容を 3 本柱において時系列的に研究を推進した。

- 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の変化とその虚弱 (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つながる基礎老化研究**

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

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)
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)
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)
清水 孝彦	国立長寿医療研究センター	老化ストレス応答研究 PT (PL)
本山 昇	椋山女学園大学	生活科学部 (教授)
山下 均	中部大学	健康科学部 (教授)

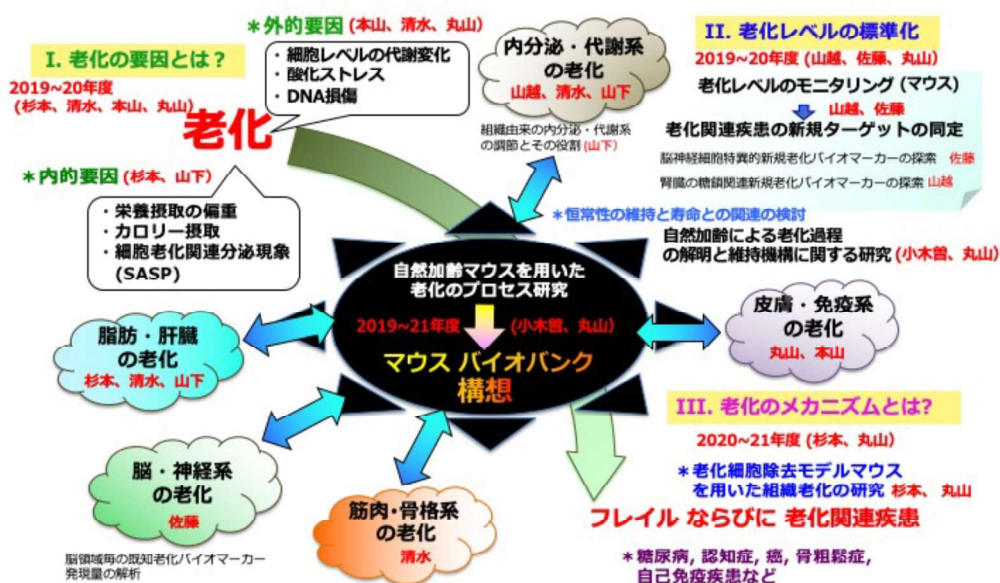
A. 研究目的

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に付随した形態的・生理的な衰弱現象であるだけでなく、癌や心疾患、動脈硬化性疾患や代謝疾患、認知症等を含む様々な老化関連疾患の最大のリスクと捉えられている。すなわち、一旦、疾患と切り分けて老化そのもののプロセスやメカニズムの解明やエビデンスを元に老化

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。一方で老化現象として捉えられる表現型は組織間で大きく異なり、ゲノム、エピゲノム研究を含めた老化の分子メカニズムに関する統合的な理解が求められる。本指定研究の研究対象、並びに目的としては「老化の機構に関する研究」に属し、「I.老化の内的、外的要因の解明」、「II.老化レベルの定量化、可視化」について様々な細胞、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、あるいは組織、細胞の老化と個体老化そのものに関する新規ターゲットやバイオマーカーの探索を行う。さらに感染予防や炎症予防を指標に老化やフレイルの分子機構の解明を含めた「III.生理的な老化メカニズムの解明」につなげる事を目的に据える。具体的には NCGG で行う基礎老年学として「研究内容の成熟」と「社会実装研究の促進」を最大限意識して以下の研究内容を3本柱において時系列的に研究を進めたい。

- 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の変化とその虚弱（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つながる基礎老化研究**

基礎老年学研究拠点の育成・連携強化(19-1) 2019~2021年度



B. 研究方法

全体研究では、前期に自然加齢モデルマウスとして C57Bl6 野生型マウス(雌雄)3 ヶ月ごとに3 ヶ月齢から24 ヶ月齢まで8群にわけて継時的に組織(大脳、小脳、胸腺、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、空腸、生殖器(卵巣、精巣))のサンプリングを行った。2019年度からこれら採取した試料を用いて老化(自然加齢マウス)の指標候補となる遺伝子、分子、組織レベルの解析を開始した。具体的には、マイクロアレイ・RNAseq 解析、凍結切片組織を用いた HE、免疫染色による個体老化の指標、プロセスの解析を通して、外部への資料の提供、情報の公開を目指している。一方で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加齢育成個体の提供、さらには個体の一括加齢育成を目指し、引き続き、老齢、老化モデルマウスの飼育環境、管

理に関する研究、整備を継続する。

(倫理面への配慮)

本指定研究第二期においても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、ヒト試料を対象とする研究は含まれていない。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する。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、適切に実施する。本申請研究全体については2019年度研究開始前には全て所定の手続きを申請、審査終了後の承認を得て遂行した。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」に従って遂行する。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・準備されている。

C. 研究結果

① 遺伝子発現レベルの分析

自然加齢モデルマウスとして C57Bl6 野生型マウス(雌雄)3ヶ月ごとに3ヶ月齢から24ヶ月齢まで8群にわけて採取したサンプルの中から継時的に3ヶ月齢、12ヶ月齢、18ヶ月齢、24ヶ月齢のポイントについて組織(脾臓、腎臓、空腸、生殖器(卵巣、精巣))のサンプリングを行った。2019年度からこれら採取した試料を用いて老化(自然加齢マウス)の指標候補となる遺伝子、分子、組織レベルの解析を開始した。具体的には、マイクロアレイ・RNAseq解析、凍結切片組織を用いたHE、免疫染色による個体老化の指標、プロセスの解析を通して、外部への資料の提供、情報の公開を目指している。今年度は加齢に伴う免疫組織の遺伝子発現変化を考察する目的で脾臓組織の遺伝子発現変化について調べるために、RNAの網羅的発現解析を行なった。3、12、18、24ヶ月齢の雄性マウス(C57BL/6N)脾臓組織(各月齢それぞれ3匹)から全RNAを抽出し、RNAシーケンスを行った。まずは異なるグループ間での遺伝子発現レベルの分析を差次的発現遺伝子の全体の分布を俯瞰しやすい火山図による解

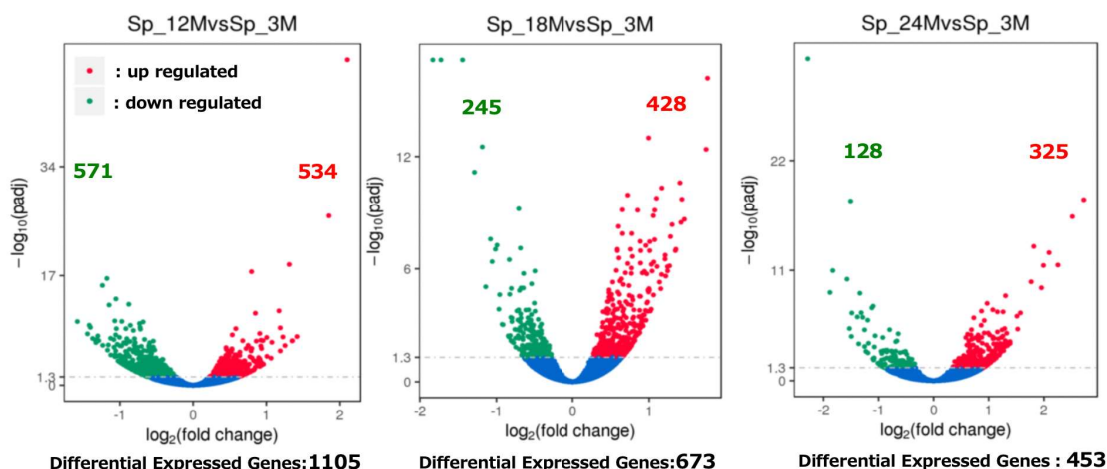


図1 火山図による差次的遺伝子発現解析のグループ間比較

析で行った。今回は図 1 に示すように脾臓における自然加齢の遺伝子発現変化について 3 ヶ月齢を固定して、12 ヶ月齢、18 ヶ月齢、24 ヶ月齢との比較することで異なるサンプルにおける遺伝子の変化倍率を横軸に示して、遺伝子発現レベルの統計的に有意な変化の度合いが縦軸を見て解析した。点は遺伝子を表し、青い点は遺伝子に有意差がないことを示し、赤い点は上方制御された差次的発現遺伝子を示し、緑色の点は下方制御された差次的発現遺伝子を示す。

②各グループ間での遺伝子発現の相関係数分析

一般的に網羅的遺伝子発現解析においては、実験そのものの信頼性を担保するためにグループ間の相関関係を検証することは必須である。そこで次に各月齢グループにおけるサンプル間のばらつきを RNA 発現の相関係数を調べることで解析した (図 2)。

各サンプル群間の比較はピアソン相関係数の 2 乗 (R^2) が 0.92 以上を示している (通常は 0.8 以上でないと信頼性を評価できない) ので、サンプル間のばらつきはかなり低い、精度の高い実験結果であることを担保している。

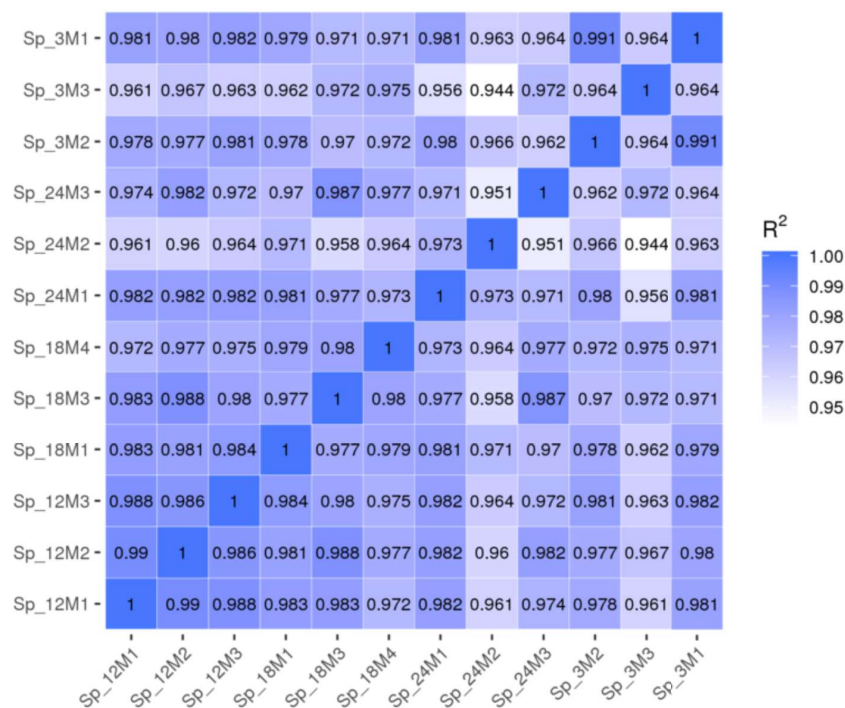


図 2 各グループ間の遺伝子発現のピアソン相関係数解析

図 2 の結果は老化そのものの傾向は 12 ヶ月齢以降の時点では 3 ヶ月齢と遺伝子発現に違いが見受けられるので、脾臓の RNA 遺伝子発現は 12 ヶ月齢で老化の傾向が確認できる点と 18 ヶ月齢以降で用いた 3 つのサンプル間でのばらつき (個体差) が大きくなりなりそれは 24 ヶ月齢の 3 つのサンプル間でより鮮明になることが確認できた。

③脾臓における差次的発現遺伝子のクラスター分析

各月齢グループ間の遺伝子発現パターンの変化について、クラスター分析による解析を行った (図 3)。図中、赤は高発現遺伝子、青は低発現遺伝子を表して 色は赤から青に降順で、大か

ら小に $\log_{10}(\text{FPKM}+1)$ を示している。その結果、3ヶ月齢と12ヶ月齢サンプルとの比較は顕著な変化を見ることができ一方、18ヶ月齢+24ヶ月齢と12ヶ月齢サンプルを比較すると大きな変化は認められない。

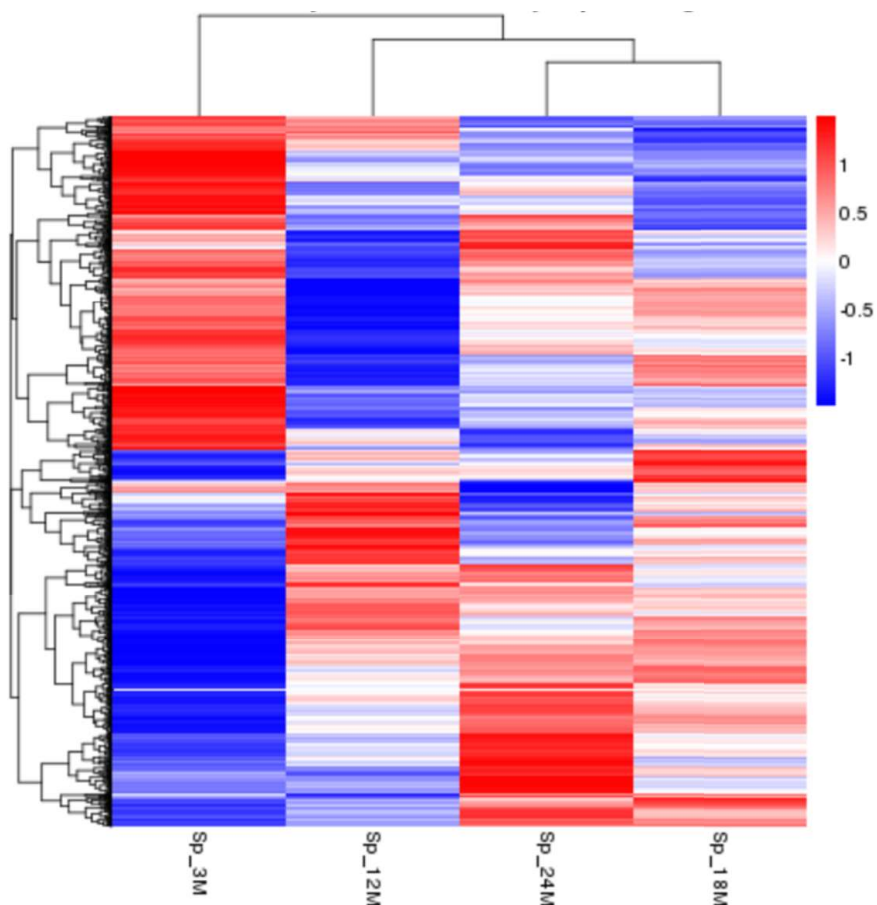


図3 差次的発現遺伝子のクラスター解析

④ ジーンオントロジーを用いた脾臓における発現遺伝子分析

さらに、脾臓における自然加齢による遺伝子発現変化を遺伝子情報分野で広く使用されている分類システムである Gene Ontology を用いて、細胞間の比較、分子機能、生物学的プロセスの3つの観点から解析を試みた。今回はその中で BP と記される生物学的プロセス

(Biological process) に関する視点でどのような遺伝子が脾臓の加齢変化に応答しているのかを表1に示した。結果はそれぞれのオントロジーで差次的に発現している遺伝子の数とデータベース全体で差次的遺伝子発現が見られるものの比較を表す GeneRatio と差次的遺伝子発現に限らずバックグラウンドGOデータベースで全て遺伝子に対して、該当する生物学的プロセスに関連する全ての遺伝子の比率を意味する BgRatio の双方で確認したところ、「抗原の修飾や提示」、「細胞接着」、「T細胞の活性化」に関連する遺伝子発現が脾臓の自然加齢変化の影響を受けていることが明らかになった。

表1 ジーンオントロジーエンリッチメント分析

Category	ID	Description	GeneRatio	BgRatio
BP	GO:0019882	antigen processing and presentation	35/1014	98/20349
BP	GO:0048002	antigen processing and presentation of peptide antigen	25/1014	62/20349
BP	GO:0007159	leukocyte cell-cell adhesion	55/1014	328/20349
BP	GO:0030099	myeloid cell differentiation	59/1014	373/20349
BP	GO:0022407	regulation of cell-cell adhesion	60/1014	389/20349
BP	GO:1903037	regulation of leukocyte cell-cell adhesion	51/1014	298/20349
BP	GO:0042110	T cell activation	66/1014	472/20349
BP	GO:0019884	antigen processing and presentation of exogenous antigen	15/1014	25/20349
BP	GO:0002250	adaptive immune response	56/1014	366/20349
BP	GO:1903706	regulation of hemopoiesis	56/1014	370/20349

D. 考察と結論

今年度は加齢と免疫の関連性について C57/Bl6N マウス の自然加齢に伴う脾臓組織由来の遺伝子発現 (トランスクリプトーム) 解析について検討した。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樹状細胞、T 細胞の変化が確認できていたので、今回の表 1 のジーンオントロジーエンリッチメント分析において、「T 細胞の活性化」に関連する一連の遺伝子発現が、加齢変化 (老化) の影響を受けるという結果が得られたことは実験の精度を確認する上でも意義深い。一方、今脾臓における自然加齢の遺伝子発現変化について 3 ヶ月齢とそれぞれ 12 ヶ月齢、18 ヶ月齢、24 ヶ月齢との比較することで、脾臓における差次的遺伝子発現が見られる遺伝子の数はすでに 12 ヶ月齢との比較で 1105 と最も多く、加齢とともに 673 (18 ヶ月齢)、453 (24 ヶ月齢) とその数は減少する。一方で遺伝子発現のレベルの比較については 18 ヶ月齢をピークにして発現レベルについては差が小さくなる傾向が確認できた。このことは免疫応答においてはその反応に関わる遺伝子発現のピークも 18 ヶ月齢前後でそれ以降は免疫機能の低下も加速されることを示唆するもので我々も注目している。今回は炎症に関連した遺伝子は特に目立つものがなかったが、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変化について、Senescence-associated secretory phenotype (SASP) との関連等、他の臓器における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) Kawaguchi K, Kim SE, Sugiyama D, Sugimoto M, Maruyama M
Age-associated alterations in murine dermis through inflammatory response with mitochondrial DNA deletions. *Geriatrics & Gerontology International*. 19: 451–457, 2019
- 2) Kim SE, Kawaguchi K, Hayashi H, Furusho K, Maruyama M

Remission Effects of Dietary Soybean Isoflavones on DSS-Induced Murine Colitis and an LPS-Activated Macrophage cell Line. *Nutrients* 11, 1746, 2019

- 3) Maruyama M, Sakamoto A, Morita Y, Takaoka A
Immunosenescence: The Forefront of Infection and Trophic Control
Yakugaku Zasshi. 2020 ; 140(3): 391-393.
- 4) 古庄克宏 丸山光生
免疫系の老化-Inflammaging における核酸センサーの役割を中心に-
Geriatric Medicine 老年医学 57(8):787-790, 2019
- 5) 古庄克宏 丸山光生 三宅健介
TLR 7/8 による核酸認識機構およびそれらの関連する炎症病態
炎症と免疫 9月号 vol.27no.5:2-6(358-362), 2019
- 6) 亀山昭彦、松野裕樹、飯田真由、丸山光生、渡邊淳、山越貴水
分子マトリックス電気泳動で解明する唾液腺ムチンの老化に伴う変化
電気泳動, 2019 年 63 巻 2 号 p. 55-61, 2019
- 7) 坂本明彦、丸山光生
決定版 阻害剤・活性化剤ハンドブック, p64, 羊土社, 2019 年 09 月 25 日

2. 学会発表

1. Maruyama M. Infrastructure and Platform Building for Geroscience in Japan Asian Geroscience Conferences 25 May, 2019 Shenzhen China
2. Maruyama M. Infection and tropic control on Immunosenescence 2019 Spring International Conference of the Korean Society for Gerontology and Korea-Japan Joint Symposium 27 June, 2019 Seoul Korea
3. Akatsu H, Kawabe Y, Arakawa K, Masaki Y, Tanaka H, Kanematsu T, Hashizume Y, Tsuneyama K, Manabe T, Ohohara T, Maruyama M, Fukushima NST team
How Risky of Intravenous Iron Administration ? (Analysis of Iron Deposition By 157 Pathological Liver Tissues) 41st ESPEN Congress on Clinical Nutrition & Metabolism Sep 2 2019 Krakow, Poland
4. Kawaguchi K, Kim SE, Sugiyama D, Sugimoto M, Maruyama M. Age-associated alterations in murine skin involving inflammatory response with mitochondrial DNA deletions ICSA 2019 in Conference Sep 11 2019 Athens, Greece
5. Kawaguchi K, Kim SE, Sugiyama D, Sugimoto M, Maruyama M. Age-associated alterations in murine dermis through inflammatory response with mitochondrial DNA deletions 11th IAGG AOR congress Oct 26 2019 Taipei, Taiwan
6. Maruyama M. Current Aging Research and Society in Japan The 2nd International Conference on Biomedical Health in Beijing, UNESCO, Dec 16 2019 Beijing, China
7. Kim SE, Morita Y, Sakamoto A, Maruyama M. Inflammation and trophic control on immunosenescence The 42nd Annual Meeting of the MBSJ, workshop, Dec 4 2019, Fukuoka Japan
8. Maruyama M. The nutritional interventions on the basic mechanisms of aging and

age-related diseases. Conclusion The 42nd Annual Meeting of the MBSJ, workshop Dec 4 2019, Fukuoka Japan

9. 亀井優香、川口耕一郎、金湘殷、保田朋波流、真下知士、杉本昌隆、丸山光生
老化細胞可視化除去マウスの作製と免疫老化機構の解明 第 42 回日本基礎老化学会大会 2019 年 6 月 7 日 仙台市
10. 金湘殷、亀井優香、木村郁生、國澤 純、丸山光生
水溶性大豆イソフラボンが腸内細菌叢に与える影響と加齢変化
第 42 回日本基礎老化学会大会 2019 年 6 月 7 日 仙台市
11. 山越貴水、亀山昭彦、西島里咲、飯田万由、丸山光生
ポリコームタンパク質 Bmi-1 による顎下腺ムチン糖鎖構造の制御
第 42 回日本基礎老化学会大会 2019 年 6 月 8 日 仙台市
12. 坂本明彦、丸山光生
B 細胞の免疫応答における DOCK11 の関与
第 42 回日本基礎老化学会大会 2019 年 6 月 8 日 仙台市
13. 川口耕一郎、金湘殷、杉山大二郎、杉本昌隆、丸山光生
皮膚の自然老化における慢性炎症の分子機構解析
第 42 回日本基礎老化学会大会 2019 年 6 月 8 日 仙台市
14. 坂本明彦、錦見昭彦、高岡晃教、丸山光生 抗原特異的 B 細胞の増殖における
DOCK11 の寄与 第 42 回日本分子生物学会年会 2019 年 12 月 6 日 福岡市
15. 亀井優香、川口耕一郎、小谷祐子、松田一成、保田朋波流、真下知士、杉本昌隆、丸山
光生 老化細胞可視化除去モデルマウスを用いた皮膚老化解析への試み第 42 回日本分
子生物学会年会 2019 年 12 月 6 日 福岡市
16. Sakamoto A. Maruyama M. Contribution of DOCK11 to the expansion of antigen-
specific B-cell populations. The 48th Annual Meeting of the JSI Dec 12 2019 Hamamatsu,
Japan
丸山光生「日本の高齢者は優等生」～きんさんぎんさん 元気の秘訣はなんだったのか？
～日本笑い学会中部支部 第 21 回新春笑例会 2020 年 1 月 26 日 名古屋市

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

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし