

感染・炎症制御を目指す腸内環境と免疫応答の加齢変化に関する研究 (20-5)

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

人生 100 年時代を意識できるほど世界的にも際立つ超高齢化社会の到来に対して、高齢者の定義や QOL に関する議論に加えて、平均寿命に重なるほどの健康寿命の延伸を期待できる社会を如何に構築していくのかが我が国においては、喫緊の課題である。換言すれば、高齢者が患う認知症や骨粗鬆症などの老年疾患の直接の引き金とはならずとも、生体機能全般、とりわけ生体防御機能が低下するという老化の機構解明は高齢者の死因でも常に上位にある感染症に深く関与する機構でもあり、疾患の克服だけに限らず高齢者の生活の質(QOL)を高め、健康寿命の延伸にもつながる重要な課題である。長寿医療研究開発費取扱細則第 2 条に示された「老化の機構に関する研究」の中で生体防御機能の低下の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深く関与する機構である。事実、主任研究者はこれまでの先行研究で、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)が関わっていることを明らかにしてきた。本研究課題ではこれまでの病原体による感染に加えて加齢とともに持続する炎症を腸内環境と免疫応答がどのように制御するのかという事に注目し、「基盤的な老化研究として①**個体老化に伴う免疫機能下と腸内フローラとの相関**、臨床への橋渡し研究として②**感染あるいはそれに伴う炎症を引き金とした腸内環境と免疫応答の変化**、さらには、評価システムの開発研究として③**栄養摂取を介した加齢に伴う炎症制御、免疫・代謝機能制御**とその評価モデル系の開発」の 3 点に焦点を絞る。さらに 20 年度に WHO よりパンデミック宣言がなされた新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の感染拡大は我が国においても特に高齢者の罹患後の重篤化が重大な問題となり、感染を制御すべき免疫系の加齢に伴う機能低下との関連が注目されている。そこで本研究ではこれまでの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や炎症に対する免疫応答による免疫賦活化に加えて、SARS-CoV-2 感染の高齢者に対する重篤化のメカニズムの解明に関する課題の推進準備を進めた。まずは SARS-CoV-2 感染時の宿主側スパイク分子ヒト ACE2 を遺伝子組み換え技術により発現させた加齢育成モデルマウスを作製し、SARS-CoV-2 感染による、免疫系の変化を考察する。本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適切に管理する。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) や野生型マウスへの一部のウイルス株 (インフルエンザ、SARS-CoV-2 ウイルス株など) あるいは肺炎球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、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ており、適切に準備、実施を開始することができた。さらに ACE2 遺伝子に関するウイルスベクター、遺伝子組み換えマウス

については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機関承認に加え、文部科学省大臣申請についても2020年度末までに承認を受けることができた。

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

錦見 昭彦 国立長寿医療研究センター

バイオセーフティ管理・研究室

赤木 一考 国立長寿医療研究センター

組織恒常性研究プロジェクトチーム

保田 朋波流 広島大学

赤津 裕康 名古屋市立大学

木村 郁夫 京都大学 (2020年8月31日までは東京農工大学)

佐藤 慎太郎 大阪大学

A. 研究目的

我が国に限らず世界的にも健康寿命の延伸を目指す長寿先進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。本研究の「研究の対象範囲」は長寿医療研究開発費取扱規定第2条に示された「老化の機構に関する研究」に属する。高齢者が患う認知症や骨粗鬆症などの老年疾患の直接の引き金とはならないまでも、加齢とともに生体防御機能が低下する老化の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深く関与する機構でもあり、疾患の克服だけに限らず高齢者の生活の質(QOL)を高め、健康寿命の延伸にもつながる重要かつ喫緊の課題でありその重要性、必要性を疑う余地はない。本研究課題はこれまでの感染に加えて加齢とともに持続する炎症を腸内環境と免疫応答がどのように制御するのかという視点から注目し、継続的に進めてきた先行研究の集約をはかる時期にあると考えている。最終的には加齢による免疫機能低下の機構を終末高齢期の重篤感染症に対する予防、克服につなげる事に特化し、個体の老化に起こる生体機能低下のメカニズムを多面的に解析する事を目指している。

全体としては新規採用課題の一年目として個々の分担研究者を中心としては以下の研究内容を3本柱として時系列的に研究を進める事を目標に設定した。

① 個体老化に伴う免疫機能の低下と腸内フローラとの相関に関する研究

② 感染あるいはそれに伴う炎症を引き金とした腸内環境と免疫応答の変化

③ 栄養摂取を介した加齢に伴う炎症制御、免疫・代謝機能制御とその評価モデル系の開発

主任研究者は研究班全体の総括をするとともに「高齢者の感染ならびに炎症に対する免疫制御機能に関する基礎研究」の一部として、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、Ziz2の個体レベルでのウイルス、病原体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この研究班でも引き続き行う。また、実際には年度中途にて分担研究者の錦見と主任研究者を中心に「SARS-CoV-2 感染高齢個体における病態解析と重篤化に関する免疫応答

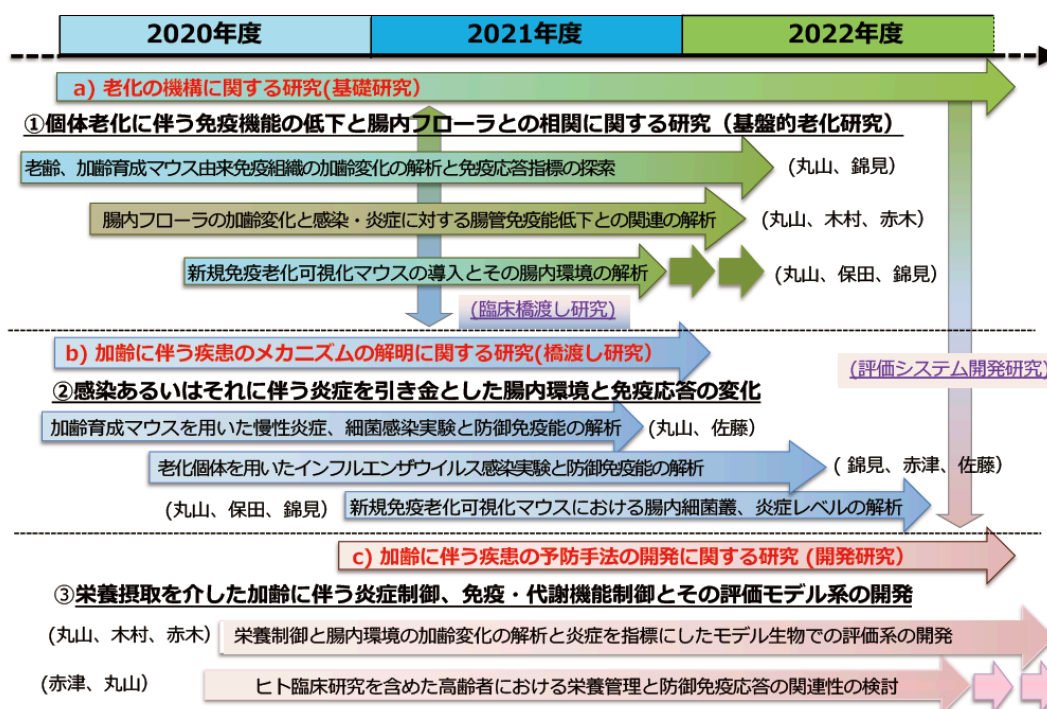
の解析」の準備を開始したので、「感染あるいはそれに伴う炎症を引き金とした腸内環境と免疫応答の変化」に加えた4本のテーマでの研究を遂行する結果となった。詳細は研究結果の項を参照。

B. 研究方法

本研究課題は最終的には加齢による免疫機能低下の機構を終末高齢期の重篤感染症に対する予防、克服につなげるという点に特化し、個体の老化に起こる生体機能低下のメカニズムを多面的に解析するためには、研究対象としても、老化モデル生物の、ショウジョウバエ、マウスに加えてヒトにおける臨床研究も視野に入れた上で、食物栄養、ウイルス・細菌感染、粘膜（腸管）免疫、炎症・生体防御という異なる分野のセンター内外の精鋭研究者を含めた班構成を組むことが必須で、唯一の成果につながる提案と考えている。研究の流れ図として以下に内容に示したように①基盤的な老化の**基礎研究**としての「老化の機構に関する研究」、②臨床への**橋渡し研究**としての②「加齢に伴う疾患のメカニズムの解明に関する研究」、そして評価システムの**開発研究**として③「加齢に伴う疾患の予防手法の開発に関する研究」という3本の柱を中心に研究を推進した。②「感染あるいはそれに伴う炎症を引き金とした腸内環境と免疫応答の変化」に主任研究者と分担研究者の錦見を中心に「SARS-CoV-2感染高齢者における病態解析と重篤化に関する免疫応答の解析」、具体的にはSARS-CoV-2感染の高齢者に対する重篤化のメカニズムの解明に関する課題の準備を開始した。そして、得られた知見を総合的に集約して、新たな感染・炎症の制御に関わる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目指した。

「感染・炎症制御を目指す腸内環境と免疫応答の加齢変化に関する研究」（年次計画）

赤字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」



① 個体老化に伴う免疫機能の低下と腸内フローラとの相関に関する研究

：(木村・保田・赤木・錦見・丸山)

野生型老齢個体あるいは免疫老化関連遺伝子欠損マウスとそのファミリーである Ziz2、3KO マウスにおける免疫応答の低下について丸山が分担する。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する。保田は老化細胞可視化マウスの免疫系の老化細胞を 1 細胞レベルで可視化することを目的として、tdTomato 発現老化細胞がどのような免疫細胞サブpopulationで、またどのような頻度で生じるのか、B 細胞、T 細胞、造血幹細胞などについて FACS で調べる。佐藤はマウスに馴化したインフルエンザウイルス (A/California/7/2009 [H1N1]) またはマウスノロウイルスを若齢 (8 週齢) と老齢 (14~18 ヶ月齢) マウスに感染させ、感染前後における糞便中の細菌叢について次世代シーケンサーを用いた 16S 解析により同定し、比較する。錦見は若齢、あるいは加齢マウスより採取した免疫細胞を解析し、加齢に伴って増加する免疫細胞のサブセットを同定する。これらの細胞について遺伝子発現を解析し、発現量が増加する遺伝子を特定する。木村は加齢に伴う栄養利用変化、腸内細菌叢変化と腸管代謝変化に着目した研究として加齢時特異的に上昇する腸内細菌代謝脂肪酸に関して、各種脂質受容体群安定発現株を用い、脂肪酸受容体に対する親和性を評価する。一方で赤木は遺伝的な変異を持つなどの適応度の低い細胞 (loser cell) が、正常な細胞 (winner cell) と隣接した際に組織から除去される細胞競合として知られる機構が組織恒常性維持にどのようにして重要な役割を持つと考えられるかという視点で研究を進める。具体的には加齢に伴い腸管における細胞競合能力が低下することを示す結果をもとに腸管における細胞競合能力と腸管免疫機能との関係を解明する。

② 感染あるいはそれに伴う炎症を引き金とした腸内環境と免疫応答の変化

：(佐藤・保田・赤津・錦見・丸山)

新規免疫老化可視化マウスにおける腸内細菌叢、炎症レベルの解析については、保田を中心に丸山、錦見も加わってレポーター発現細胞が老化細胞であることを確認するために、既に知られている各種細胞老化マーカー (SA- β ガラクトシダーゼ、Arf, Ink4a, Ets など) の発現についてレポーター発現細胞と相関するかを確認する。若齢、あるいは加齢マウスより採取した免疫細胞を解析し、加齢に伴って増加する免疫細胞のサブセットを同定する。これらの細胞について遺伝子発現を解析し、発現量が増加する遺伝子の特定を試みる。また、これらサブセットの抗原やサイトカイン等に対する応答についても検討する。SARS-CoV-2 感染老齢個体における病態解析と重篤化に関する免疫応答の解析に関しては、丸山、錦見が中心となって、NCGG 施設内の SARS-CoV-2 の保管並びに実験に用いるスペース、さらにはマウスでの感染モデル作成に必要な感染実験、動物実験等申請に加え、遺伝子組み換え実験については文部科学省大臣申請の手続き等、ゼロからの準備を試みる。具体的には Covid-19 感染症の原因ウイルスである SARS-CoV-2 ウイルスの感染にはヒト上気道を始めとする粘膜組織の上皮細胞に発現しているアンジオテンシン変換酵素 2 (angiotensin-converting enzyme2, ACE2) を受容体として結合し、細胞膜に存在するセリンプロテアーゼ Transmembrane protease

serine 2, TMPRSS2)が必須であることがすでに報告されている。この SARS-CoV-2 は遺伝子組み換え技術を用いてヒト ACE2(hACE2) 受容体を発現させたモデルマウスには感染し、感染後の病態や重篤化についてもすでに数多くの報告がされている。このマウスの導入を前提に研究方法を議論し、まずはアデノ随伴ウイルスベクター (AAV ベクター) を用いて hACE2 を特異的に発現させた加齢育成動物に SARS-CoV-2 ウイルスを感染させ、罹患率や発症の過程を SASP や I 型 IFN など老化あるいは炎症に伴う分子レベルでの生体機能の変化に注目し、重傷化のメカニズムを考察する。

③栄養摂取を介した加齢に伴う炎症制御、免疫・代謝機能制御とその評価モデル系の開発

：(赤木・木村・赤津・丸山)

赤木は、腸内細菌の有無が腸管での loser cell 除去に与える影響について解析を行う。そのために、ショウジョウバエを無菌飼育し、若齢個体と老齢個体の腸管において loser cell の除去効率について検討する。次に、老齢個体の腸管に誘導した loser cell における TRRs の活性について免疫組織化学的手法を用いて調べる老齢個体腸管の loser cell において TRRs の活性が低いことが明らかになった場合、loser cell 特異的に TRRs を強制発現させ、loser cell の除去効率が回復するかどうか検討する。さらに、その際の寿命への効果についても解析を試みる。また木村を中心にして加齢に伴う腸管の代謝変化と栄養介入に関する基礎老化研究として、脂肪酸受容体が作用する各種免疫細胞や内分泌細胞株を用いて、加齢時特異的に上昇する腸内細菌代謝脂肪酸添加による in vitro 活性を評価する。加齢に伴う栄養・腸内変化による腸管免疫系から全身性の免疫系、あるいは恒常性機能への関与について解析を試みる。赤津は高齢者の免疫機能低下予防と栄養介入に関する研究と言う視点で認知症患者への腸内細菌介入を主テーマとし、ヒト介入研究を進めるためのコホート研究体制構築をめざす。研究協力者として 2020 年度は、研究開発費研究員の坂本が 10 月までそれ以降は兼本と杉山が中心となって参加した。

(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ない。分担研究者の行うすべての臨床研究は血液検査を含め、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」(平成 26 年文部科学省・厚生労働省告示第 3 号)に従うと共に、所属施設、病院倫理委員会で定められたインフォームド・コンセントに基づいた審査、承認の後、研究目的、危険性、個人情報に関する配慮については詳細に説明し、理解を得た上で書面にて本人、家族より承諾を得て行う。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、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」(平成 26 年文部科学省・厚生労働省告示第 3 号)に準拠する。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適切に管理する。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(インフルエンザウイルス株など)あるいは肺炎球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、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。2020年度追加した SARS-CoV-2 ウイルス感染実験計画分についてはまだ実施されていないが、上記3委員会には現在新規申請中であり、当該研究開始前には必ず、所定の手続きを申請、審査終了後の承認を得る。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

開始一年目の20年度に至っては Covid-19 のパンデミック宣言を受ける形で大学を研究の場とする分担研究者の一部においては予想をはるかに上回るレベルでの研究遂行に遅延が生じており、この年度末の研究報告においても赤津の「高齢者の免疫機能低下予防と栄養介入に関する研究」と佐藤の「ウイルス感染を指標にした老化に伴う腸管免疫機能変化に関する研究」においては期待する進捗を示すことができない結果となっている。一方で全体研究としては「感染あるいはそれに伴う炎症を引き金とした腸内環境と免疫応答の変化」に

「SARS-CoV-2 感染高齢個体における病態解析と重篤化に関する免疫応答の解析」を加えた以下4本の柱での研究を遂行した（研究目的、研究方法の項を参照）。

とりわけ、②「感染あるいはそれに伴う炎症を引き金とした腸内環境と免疫応答の変化」については hACE2 を特異的に発現させた加齢育成動物に SARS-CoV-2 ウイルスを感染させ、罹患率や発症の過程を SASP や I 型 IFN など老化あるいは炎症に伴う分子レベルでの生体機能の変化に注目し、重篤化のメカニズムを考察する準備をはじめた。その他、免疫老化の基礎研究としては細胞老化すると細胞表面にヒト CD2 を発現するマウスを樹立し、このマウスを用いた解析により、加齢とともに細胞老化した T 細胞や B 細胞が増加することを明らかにした。ヒト CD2 を指標として、このマウスの脾臓やリンパ節から老化 T 細胞および B 細胞を単離し、次世代シーケンサーを用いて発現遺伝子の解析を行った（丸山・錦見）。その結果、老化 T および B 細胞で発現が上昇している因子を複数同定した。さらに免疫系の老化細胞を1細胞単位で可視化する事を目的に Cre-loxP マウス遺伝子組換え系を用い、分化した B 細胞特異的な CreERT2 発現マウスと Cre 依存的蛍光タンパク質発現レポーターを組み合わせる事で任意の時期に成熟 B 細胞を蛍光タンパク質で不可逆標識し生涯にわたって細胞を追跡可能なマウス(Mb1CreERT2; R26EYFPflSTOP マウス)を作成した（保田）。一方で③に関しては赤木を中心にショウジョウバエ成虫に X 線を照射することで、遺伝毒性ストレスによって誘導される様々な分子応答、生理的变化を遺伝学的に解析できる実験系を樹立した。興味深いことに、X 線を照射したショウジョウバエでは、脳や筋肉ではなく、腸管が最も重篤なダメージを受けており、腸管バリア機能の破綻と寿命の短縮が観察された。今後は新たに樹立したこの実験系を用いて、遺伝毒性ストレスが腸管恒常性と免疫応答に与える影響について解析を進めていく。また栄養摂取と腸内環境の代謝に関する加齢変化については栄養状態に対応しておこる代謝機能変化と各種脂肪酸の受容体である G タンパク質共役受容体 (GPCR) の関連性についての研究を木村が中心に進めている。具体的には加齢期の脂肪酸受容体の重要性を明らか

にするために、脂肪酸受容体（GPR40, GPR120）を欠損した加齢マウスと野生型マウスに高脂肪食を負荷させた時の体重変化や代謝、運動量の変化について解析を始めた。

最後に SARS-CoV-2 感染の高齢者に対する重篤化のメカニズムの解明に関する課題に関しては加齢による免疫機能の低下が見られる高齢者に感染するとどのようなメカニズムで感染後の重篤化を引き起こすのか、また重篤化を制御する因子は何かという報告はされていない。そこで我々はアデノ随伴ウイルスベクター（AAV ベクター）を用いて hACE2 を特異的に発現させた加齢育成動物に SARS-CoV-2 ウイルスを感染させ、罹患率や発症の過程を SASP や I 型 IFN など老化あるいは炎症に伴う分子レベルでの生体機能の変化に注目し、重症化のメカニズムを考察する準備を進めている。

D. 考察と結論

本研究は「老化の機構に関する研究」のみにならず、中期計画における「加齢に伴う疾患等の本態解明」、すなわち老化に伴う身体機能の脆弱化の中でも、多くの老年疾患の引き金となる生体防御系の機能低下について、そのメカニズムを理解し、克服し、重篤化を予防することが期待される。それゆえ本研究を推進することで高齢者における免疫機能が栄養摂取による改善や賦活化につながる有効な方策を検討していくことができると考える。健常高齢者においても日常生活の中で最大の脅威である感染症に対する免疫能の低下を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、日和見感染等に対するリスクの軽減に大いに期待される。さらにワクチンに対しても期待と並行してリスクを軽減していくために高齢者に特異的な免疫機能の低下を老化やそれに伴う炎症に結びつけることができれば Covid-19 感染症をはじめとする様々な感染症に対しても予防あるいは罹患後の抵抗力のある高齢者を増やす社会の実現にも一翼を担うものと考えられる。いずれにせよ、本研究は、研究の専門性が感染免疫、免疫老化、栄養介入にも絡めた地域医療とバランス良く広がっており、継続する事で相互的な研究が発展的に期待できる。また Covid-19 感染症の高齢者に対する重篤化のメカニズムの解明は現在、まだ確立されていないワクチンの効果や ADE によるリスクの評価、あるいは細胞性免疫においても重要な記憶 T, B 細胞の維持される機構についても重要な知見が明らかにされていく事が大いに期待される。

今や世界的大流行感染を引き起こしている SARS-CoV-2 感染高齢者の重篤化の予防や軽減につながる知見が得られれば、介護負担を含めた医療費全般の軽減につながるだけでなく、特に基礎疾患や高齢、加齢による免疫機能に脆弱性が見られる感染者の感染早期に対する治療法を確立していく上でも大きな成果が期待できる不可欠な研究と考えている。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakamoto A, Maruyama M
Contribution of DOCK11 to the Expansion of Antigen-Specific Populations among Germinal Center B Cells.
Immunohorizons. 2;4(9):520-529, Sep, 2020
- 2) Akatsu H, Manabe T, Kawade Y, Tanaka H, Kanematsu T, Arakawa K, Masaki Y, Hishida C, Kanesaka T, Ogawa N, Hashizume Y, Tsuneyama K, Ohara H, Maruyama M, Yamamoto T.
Iron deposition in autopsied liver specimens from older patients receiving intravenous iron infusion.
PLoS One. 4;15(8): e0237104, Aug, 2020.
- 3) 錦見昭彦、丸山光生
老化が免疫系に及ぼす影響
医学のあゆみ, 273 (13) : 535-540, 2020
- 4) 錦見昭彦, 丸山光生 リンパ球の老化と SASP 老年内科 2 : 631-637, 2020

2. 学会発表

- 1) Yamakoshi K, Kameyama A, Nishijima R, Maruyama M
Analyses of mucins in submandibular gland during aging in mic.
第 71 回日本電気泳動学会総会, 2020 年 11 月 12 日, 東京, (Web 開催)
- 2) 坂本明彦、丸山光生
老齢マウスの液性免疫不良における DOCK11 の寄与
第 43 回日本基礎老化学会大会, 2020 年 5 月 27-28 日, 長崎 (誌面開催)
- 3) 亀井優香、川口耕一郎、渡辺憲史、錦見昭彦、松田一成、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 43 回日本基礎老化学会大会, 2020 年 5 月 27-28 日, 長崎 (誌面開催)
- 4) 渡辺憲史、亀井優香、五十嵐美樹、杉本昌隆、木村郁夫、丸山光生
自然加齢マウスにおける水溶性イソフラボン摂取とその効果
第 43 回日本基礎老化学会大会, 2020 年 5 月 27-28 日, 長崎 (誌面開催)
- 5) 川口耕一郎、古茂田かおり、三河隆太、丸山光生、浅井あづさ、杉本昌隆
Alveolar senescence promotes lung metastasis of melanoma cells.
第 43 回日本基礎老化学会大会, 2020 年 5 月 27-28 日, 長崎 (誌面開催)
- 6) 錦見昭彦、丸山光生
新規老化細胞可視化マウスの作製と老化細胞における糖鎖の発現パターン
第 93 回日本生化学会大会, 2020 年 9 月 16 日, (Web 開催)

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