

加齢に伴う炎症ならびに分子病態制御と腸管粘膜系の免疫老化機構に関する研究 (21-2)

主任研究者 丸山 光生 国立長寿医療研究センター ジェロサイエンス研究センター長

研究要旨

本研究の「研究の対象範囲」は長寿医療研究開発費取扱規程第2条に示された「老化の機構に関する研究」に属する。生体機能、特に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かつ喫緊の課題である。そこで、免疫老化研究としては加齢に伴う炎症を制御することで、個体老化のメカニズムを分子レベルでその一端が明らかにできれば、感染症をはじめとする老化がリスクとなる疾患の緩和や予防に繋がる成果を残すことができ、さらに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た。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。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できる。また加齢とともに罹患率が増加するCOPD の主要病態である肺気腫に関して、現時点で確立されていない治療法、治療モデルの達成を目指して研究することも「分子病態制御」研究として本研究課題の一つの成果と位置づける。

このように本研究は細胞老化における指標遺伝子 (p19Arf, p16ink4A) をマーカー遺伝子として用いた老化細胞可視化制御マウスモデルを共通の動物実験モデルとして分子レベルでの呼吸器病態の解明と老化細胞を標的とした治療モデルの確立を目指す「分子病態制御」グループと食物をはじめ栄養を取り込む腸管における粘膜免疫系が腸内細菌叢やその代謝産物の加齢変化によって、どのように個体老化に関わるのか、加齢に伴う全身性の炎症の制御、あるいは腸管以外の粘膜系を含めた感染防御の分子機構につながるのかの検討を進める「腸管粘膜系を中心とした免疫老化機構」グループの2本柱で研究を開始した。

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してきた。さらに機能的老化モデルマウス、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や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、適切に実施できた。

主任研究者

丸山 光生 国立長寿医療研究センター ジェロサイエンス研究センター長

分担研究者

杉本 昌隆 国立長寿医療研究センター 炎症・免疫機構研究部 副部長
木村 郁夫 京都大学 教授
保田 朋波流 広島大学 教授

A. 研究目的

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かつ喫緊の課題である。一方では国内外において、近年、肺や腸管等の粘膜免疫系も加齢に伴う機能低下を示すことや加齢とともに免疫機構の脱制御が炎症やそれを引き金とするストレスを惹起し、加齢性疾患の病態増悪化に関与することが強く注目されている。本研究ではこうした喫緊かつ極めて重要な課題に分子レベルで老化研究を推進することで病態やそれらの治療モデルの解明に遺伝子レベル、細胞レベルで標的を捉える事が可能だと考えている。我々の細胞はストレスを受けると「細胞老化」という恒久的な増殖停止状態に陥ることが明らかになり、細胞老化を起こした細胞（老化細胞）は加齢とともに様々な組織に蓄積し、組織老化や加齢性疾患の一因とされている。先行研究からも私たちは、任意の時期に生体から老化細胞を排除可能な遺伝子改変マウスを樹立、利用する研究を複数、進めており、本研究では老化細胞は組織老化の一因であること、また加齢性疾患の発症を早め、さらに病態を増悪化する因子の解明を急ぎつつ、組織老化から個体老化、寿命研究にもつながる腸管粘膜免疫系を一つの標的とした制御因子やメカニズムの解明をめざすことを目的の大黒柱と考えている。

具体的には本研究は分子病態制御グループと免疫老化機構グループの二つの大きな柱で全体研究を推進し、互いの課題において複数の老化細胞可視化制御(除去)マウスをツールとして用いることで、相乗的な研究成果の創出を考えている。「分子病態制御」グループにおいては、呼吸器の老化と細胞老化との関連について解析を続け、肺気腫および転移性肺がんのふたつの呼吸器疾患モデルを用いて病態の解明、さらに老化細胞を標的とした革新的治療モデルの確立を目指す。「免疫老化機構」グループにおいては腸管を含む粘膜免疫系の加齢に伴う機能低下と腸内細菌の宿主免疫機能制御に注目して、炎症の制御に関わる免疫応答機構の解析を続け、加齢による腸内細菌叢やその代謝産物の変化や栄養介入を通して、全身性の炎症制御、あるいは腸管以外の粘膜系を含めた感染を含む生体防御の分子機構がどのように関連するのかを解明することを目指す。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機能解析、とりわけ Ziz2 の個体レベルでの免疫応答低下に関わる B 細胞解析をこの研究課題の中でも引き続き行った。

B. 研究方法

本研究においては細胞老化における指標遺伝子（p19Arf、p16ink4A）をマーカー遺伝子として用いた老化細胞可視化制御マウスモデルを共通の動物実験モデルとして分子レベルでの呼吸器病態の解明と老化細胞を標的とした治療モデルの確立を目指す「分子病態制御」グループと食物をはじめ栄養を取り込む腸管における粘膜免疫系が腸内細菌叢やその代謝産物の加齢変化によって、どのように個体老化に関わるのか、加齢に伴う全身性の炎症の制御、あるいは腸管以外の粘膜系を含めた感染防御の分子機構につながるのかの検討を進める「腸管粘膜系の免疫老化機構」グループの2本柱で推進した。

分担研究者であり、分子病態制御研究グループを統括する杉本らは以前に、生体から任意の時期の老化細胞を排除可能なマウス（ARF-DTR マウス）を樹立した。この ARF-DTR マウスを用いて老化細胞が肺気腫病態を増悪化させる因子であることを報告した（Mikawa et al. 2018; Mikawa et al. 2020）。本研究報告ではこれ以降の総括研究報告内での「B. 研究報告」から「G. 知的財産権の出願・登録状況」については後述する分担研究報告の項に詳細を記載したので、以下各項については「免疫老化機構研究」を中心に報告していく。

加齢に伴う炎症と腸管粘膜系免疫機構の老化に関する研究

I. 老化細胞可視化制御マウスを用いた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解析

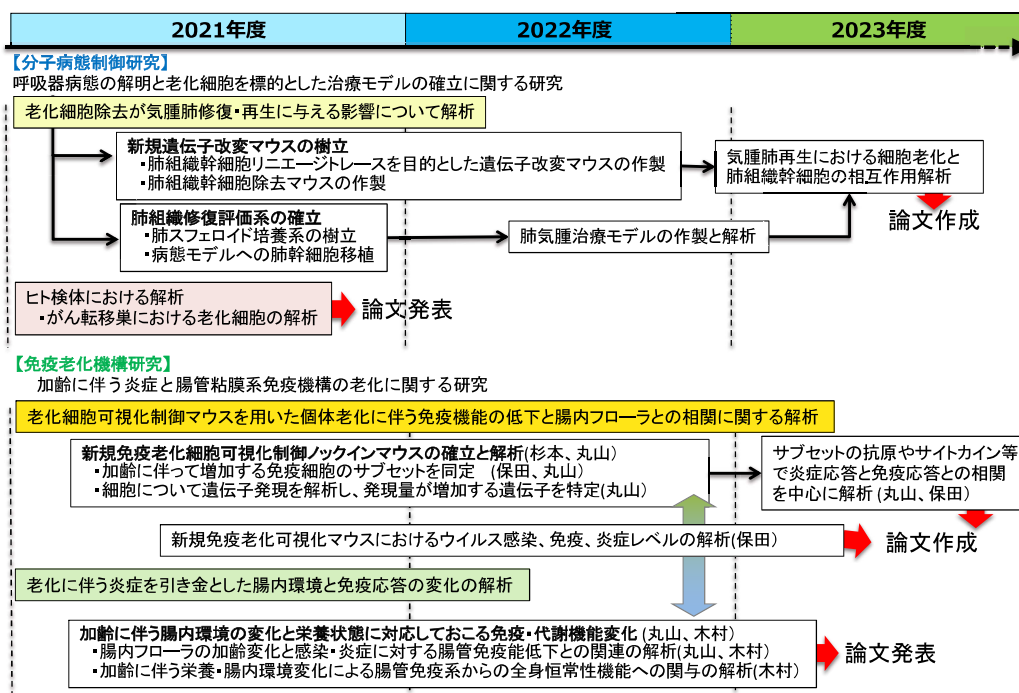
本研究では野生型老齢個体あるいは我々が独自に作成している老化細胞可視化制御マウス（ink4A-dTomato_DTR, ink4A-hCD2 ノックインマウス）における免疫応答の低下についてマウス個体に対する病原体の感染に対する生体防御能を中心に加齢とともに見られる免疫応答低下の原因に関する解析を開始した。可能性として細胞老化に着目し、CDKN2A 遺伝子座にコードされる INK4A/ARF タンパク質の発現によって誘導されるエピジェネティックな制御が果たす役割を個体老化との関連に注目した解析を行った。さらに栄養介入等、腸内環境に変化を与えることで可視化モデルマウスを用いて老化細胞集団を集団で単離した後、細胞レベルでのトランスクリプトーム解析を次世代シーケンス解析によって行い、ヒト臨床研究を含めた高齢者における栄養管理と防御免疫応答の関連性を議論できる研究への発展を目指した。

II 老化に伴う炎症を引き金とした腸内環境と免疫応答の変化の解析

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を中心に行った。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特異的に上昇する腸内細菌が代謝する脂肪酸に関して、分担研究者木村の研究室で有する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の評価を試みた。さらには、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 活性の評価を進める。また免疫応答との変化については若齢、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し、これらの細胞について特に炎症に関わるサイトカインや SASP（老化関連分泌表現

型) 関連遺伝子発現を解析し、発現量が増加する遺伝子の特定を行った。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検討した。

「加齢に伴う炎症ならびに分子病態制御と腸管粘膜系の免疫老化機構に関する研究」(年次計画)



(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かった。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当該研究施設の動物実験倫理委員会で承認を受けた後に動物実験ガイドラインに則って適切に管理、実施した。実験上必要とされる遺伝子サンプル、動物の取り扱いは「生物の多様性に関する条約のバイオセーフティに関するカルタヘナ議定書」に基づく「遺伝子組み換え生物等の使用等の規則による生物多様性の確保に関する法律」を遵守した。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(インフルエンザウイルス株など)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、適切に実施した。

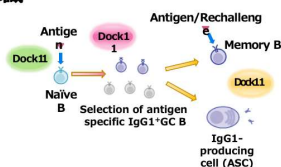
C. 研究結果

研究課題の再編後の新たな開始一年目の 21 年度においては Covid-19 の影響が続いた研究環

境の変化を引き続き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

Dock11/Zizimin2 の推定される関与

- * 胚中心B細胞の積極的な選択
- * B細胞の固有抗原(intrinsic antigen)認識
- * 記憶B細胞の安定な維持機構
- 抗原への再遭遇(二次免疫応答) ?
免疫老化??



B細胞におけるDock11の役割
獲得免疫系の免疫応答に加えて、免疫老化にも積極的な関与

図1 免疫老化関連遺伝子Zizimin2 (Dock11)の機能

のメカニズムの解析が注目されている。我々もまず、前述の老化細胞可視化制御マウスモデル由来のMEFを用いることで、細胞老化によって見られる細胞集団内における個々の細胞老化の進行を解析し、個体老化の免疫系における多様性につながる知見を得ることにした。

まずは主任研究者が免疫老化関連遺伝子の1つである

Zizimin2(Ziz2)の個体レベルでの免疫応答低下に関わるB細胞解析について、図1に示したように記憶B細胞、あるいは抗原との再遭遇、さらには免疫老化にも積極的に関与することを

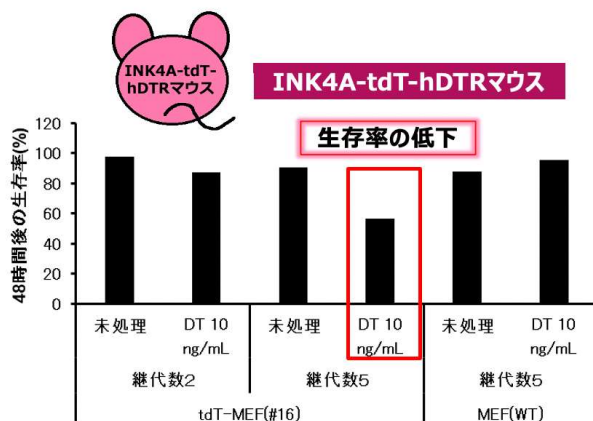


図3 ジフテリア毒素によるtdT-MEFの生存率への影響

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保田の「新規免疫老化可視化マウスを用いた免疫老化、炎症レベルの解析研究」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た。一方で全体研究としては、免疫系に限らず、高齢者の老化に伴う機能の低下には老化そのものの多様性が関わると考えられており、そ

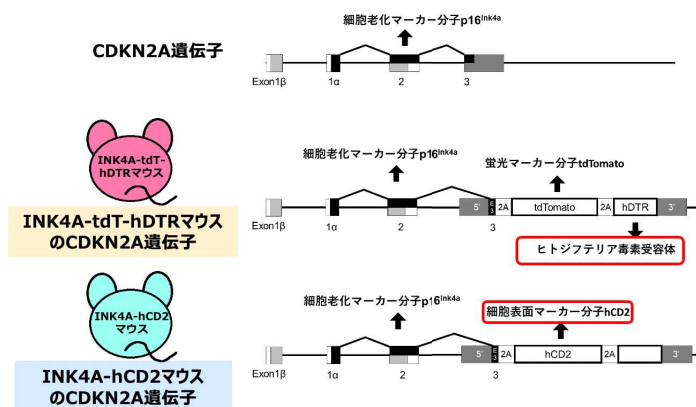


図2 INK4A-hCD2マウス、INK4A-tdT-hDTRマウスのCDKN2A遺伝子

を示唆するデータを成果としてまとめる事ができた(論文発表2)。前述の老化細胞可視化制御マウスモデルを用いた研究成果については、細胞老化によって見られる細胞集団内における個々の細胞老化の進行を解析し、個体老化の免疫系における多様性につながる知見を得ることにした。図2に2種類のモデルマウスの老化細胞可視化制御に関するCDKN2遺伝子座を示した。先行研究から得られた予備検討を元に今年度は、tdTomatoマウス由来のMEF細胞を用

いて、その発現(tomato 遺伝子の発現)が細胞老化にリンクしていること、また ink4A 遺伝子の発現が相関していること、さらに図 3 に示すようにジフテリア毒素による除去も確認することができた。同じように ink4A 遺伝子の発現に依存して細胞表面にヒト CD2 抗原を発現する老化細胞可

視化制御マウス、

p16ink4ACD2

マウスにおいて

も MEF を用い

た細胞老化の集

団が継代回数に

伴って、ink4A

遺伝子の発現と

ヒト CD2 表面

抗原の発現が見

られることに成

功した(図 4)。

その上で、今年度の成果として、個体老化との関連を免疫細胞サブポピュレーションで、またどのような頻度で生じるのか FACS 解析を行った。その結果は図 5 で示すように老化マウス個体脾臓からのリンパ球では T 細胞、B 細胞で老化細胞の可視化に成功した。

現在、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も試みている。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。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

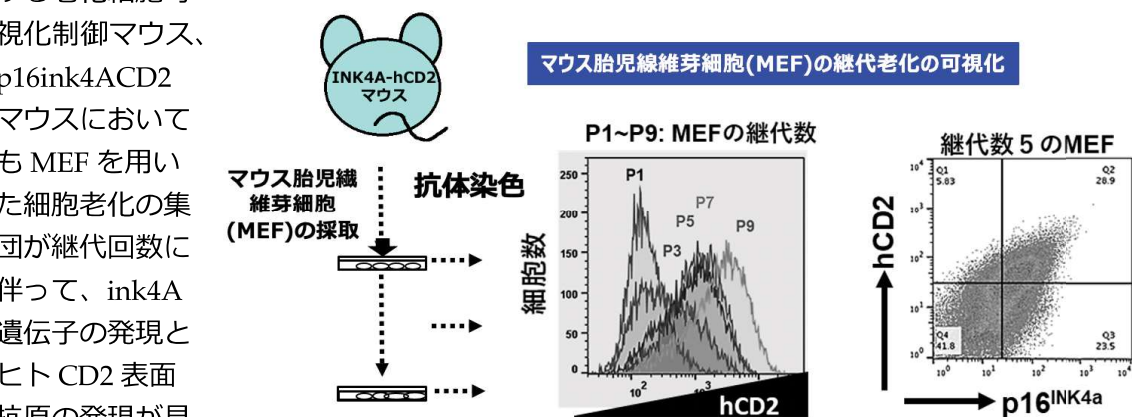


図4 INK4A-hCD2マウス由来のMEFを用いた継代老化の可視化

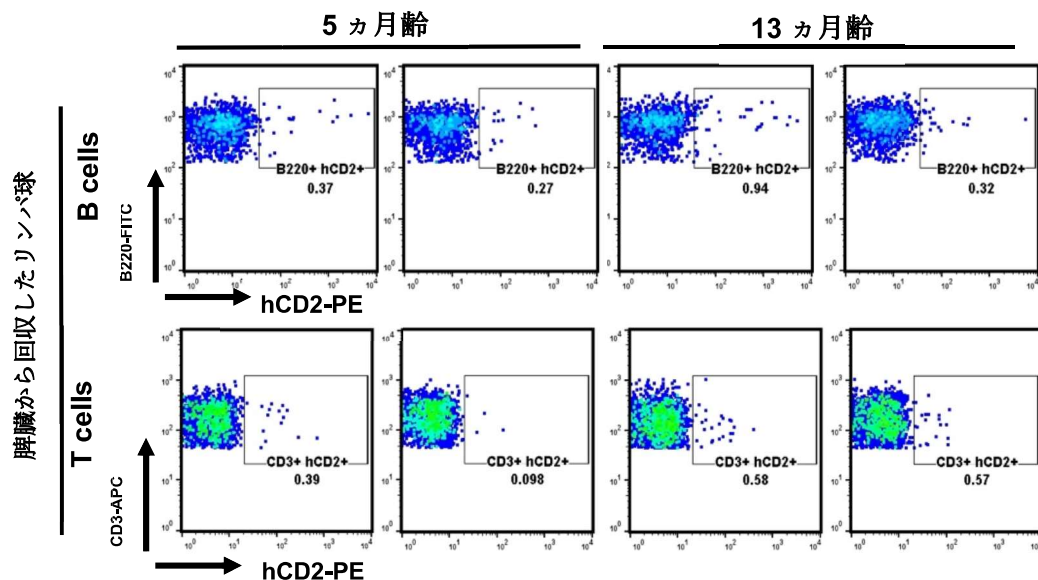


図 5 リンパ球における p16INK4a 陽性細胞集団の可視化

応答について特に加齢に伴う炎症に関連する分子を中心に検討しはじめている。

また分担研究者の木村らとの共同研究で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については加齢に伴う腸内環境の変化と栄養状態に対応しておこる免疫・代謝機能変化について、加齢マウスと若齢マウスの各組織における各種脂肪酸受容体の発現比較も開始した。さらに加齢マウスと若齢マウスを用いて高脂肪食負荷試験を行い、エネルギー代謝機能変化を検討するとともに、腸内細菌叢とその代謝物の解析を行った各種脂肪酸の受容体である G タンパク質共役受容体 (GPCR) の関連性の検討も進めているので、その詳細は木村の項の記載を参照されたい。

D. 考察と結論

免疫老化機構研究グループとして 2021 年度は研究課題の再編を経ての研究開始の一年目とする新規研究課題であり、事業申請書にも記載した予定で 3 年計画の一年目の報告となる。Covid-19 による研究環境の変化の影響は皆無ではないが、これまで第一年目の進捗については特に今後の研究遂行に関する不安は見いだせず、各分担研究者もそれぞれの計画に則って、着実に成果を残していると認識している。特に主任研究者に限ってのこの一年間の進捗と成果に関しては①**2 種類の老化細胞可視化制御マウスモデルを確立**した。②p16ink4ACD2 マウス MEF を用いた細胞老化集団が継代に伴って、**ink4A 遺伝子発現に依存したヒト CD2 表面抗原の発現に成功**した。③**老化 p16ink4ACD2 マウス脾臓 T、B 細胞で老化細胞可視化に成功**した。④**炎症抑制機能を有する腸内細菌の長期栄養介入後のメタボローム解析結果をまとめ論文化**したが挙げられる。とりわけ、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 あるいはヒト CD2 発現マウス老化細胞がどのような免疫細胞サブポピュレーションで、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 解析を行うこと、あるいは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 など)の発現ついてレポーター発現細胞と関連するかを確認することは極めて重要で老化マウス個体脾臓からのリンパ球では T 細胞、B 細胞で老化細胞の可視化に成功したことは今後の研究推進につながる大きな成果と言える。またこのことは今後、この技術をより高齢モデルマウスを用いて FACS による hCD2 陰性/陽性細胞の分取を行うことができ、その結果、再現性の取れる画分のリンパ球の老化における分子レベルでの解析であるトランスクリプトームが可能になる点でも意義は大きい。

本研究は「老化の機構に関する研究」のみに留まらず、本研究を継続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ている。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を提唱することで高齢者の QOL を改善するだけでなく、疾患療養中の高齢者にも、日和見感染等に対するリスクの軽減につながるなど医療政策的にも大いに期待できる。加えて本研究は、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。

実際に栄養関係では食用油を構成する長鎖脂肪酸を認識する受容体である GPR40 や GPR120 の遺伝子欠損マウスに関して加齢期における高脂肪食摂取により、野生型マウスと比較して体重増加などの代謝異常が確認できた。このことは、本研究によって、老化に伴う栄養素、特に食用油中の長鎖脂肪酸の受容機構の変化とそれに伴う生体恒常性の新たな調節メカニズムの解明に繋がることが予想され、さらには、このメカニズムに焦点をあてることにより、食用油摂取を調節することによる抗老化に繋がる新たな知見を提供できる。さらに免疫系の老化研究は、免疫応答の機能変化が免疫担当細胞ごとに暦年齢では縦切りの困難な多様性を有しており、機能面中心の解析がますます要求されてくる。主任研究者はこれらの老化の多様性を免疫機能においてもモニター、解析できるマウスモデルとしてすでに保田を中心とした研究でも加齢に伴い、リンパ球の産生能力が大きく低下すること、またリンパ球の産生は骨髄の部位によっても大きく異なることが示唆された。ヒトの加齢個体では腸管に造血幹細胞が移行し、造血の場を変えうることが示唆されており、本研究をさらに推し進めることで免疫機能を担うリンパ球が加齢に伴ってどのように産生維持されているのかその全容解明に貢献しうるものと考えている。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Morita Y, Jounai K, Tomita Y, Maruyama M.
Long-term intake of *Lactobacillus paracasei* KW3110 prevents age-related circadian locomotor activity and changes in gut metabolism in physiologically aged mice.
Exp Gerontol. 2021 Oct 1; 153:111477.
- 2) Sugiyama Y, Fujiwara M, Sakamoto A, Tsushima H, Nishikimi A, Maruyama M
The immunosenescence-related factor DOCK11 is involved in secondary immune responses of B cells.
Immunity & Ageing. 2022 Jan 3;19(1):
- 3) 杉山悠真、丸山光生
細胞老化と肺がん発生
医学のあゆみ, 277 巻 2 号 医歯薬出版 2021
- 4) 渡辺憲史, 亀井優香, 木村郁夫, 丸山光生
加齢変化における水溶性大豆イソフラボン Soyaf Flavone HG の抗炎症効果と腸内細菌叢との関連 大豆たん白質研究, vol.23 (41) ; 1-9, 2021
- 5) 丸山光生

第 44 回日本基礎老化学会大会が残すもの～基礎老化研究と学術集会を再考した集い～
基礎老化研究, vol.45 (3) ; 45-46, 2021

6) 丸山光生

健康長寿につながるフードスタイルとジェロサイエンス研究
Food style leading to healthy longevity and Geroscience research
FOOD STYLE 21 2022 年新春号 特別企画 p29

2. 学会発表

1) Sugiyama Y, Nishikimi A, Maruyama M

Diversity of p16INK4a-associated chronological senescence in MEF culture.
第 44 回日本基礎老化学会大会, 大府, 2021 年 6 月 12 日

2) Goto A, Hashimoto M, Endo Y, Yokogawa S, Maruyama M, Yamashita H

CREG1 enhances muscle function in mice.
第 44 回日本基礎老化学会大会, 大府, 2021 年 6 月 12 日

3) 丸山光生

基礎老化研究から見た免疫系の加齢変化
第 21 回日本抗加齢医学会総会 専門医 指導士共通プログラム,
京都, 2021 年 6 月 27 日

4) 丸山光生

炎症抑制につながる栄養介入と個体老化
第 43 回日本臨床栄養学会総会・第 42 回日本臨床栄養協会総会、シンポジウム
Web 開催、2021 年 10 月 3 日

5) Maruyama M, Sugiyama Y, Tsushima H, Nishikimi A

生体防御系の加齢変化と個体老化
第 94 回日本生化学会大会、シンポジウム「老化と生体防御システム」
Web 開催、2021 年 11 月 5 日

6) 丸山光生

知っておきたい高齢者の免疫と栄養の関係～健康長寿への道～
日本基礎老化学会第 2 回市民フォーラム 「人生 100 年時代の健康意識
in 山陽小野田」山陽小野田市民館、山口 2021 年 11 月 27 日

7) Maruyama M

Inflammaging, taking lessons from history
Workshop Organizer and Closing Remarks, The 44th Annual Meeting of the Molecular
Biology Society of Japan, Yokohama, Dec 2nd, 2021

8) 杉山悠真、津島博道、錦見昭彦、丸山光生

細胞老化における p16INK4a の発現に付随した CC ケモカインクラスター遺伝子
発現様式 ワークショップ：炎症老化"inflammaging"の深化と展開
第 44 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2021 年 12 月 3 日

9) 丸山光生

加齢に伴う炎症抑制を考える食と免疫

脳心血管抗加齢研究会第 17 回学術大会・日本抗加齢協会第 5 回学術フォーラム、
シンポジウム「食と免疫」 大阪、2021 年 12 月 17 日

10) 丸山光生

慢性炎症と免疫老化のメカニズム

日本抗加齢医学会専門医・指導士認定委員会主催講習会、ハイブリット開催
2022 年 2 月 20 日、大阪

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