

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。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重症化予防に繋がる成果を残すことができる。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。本研究は細胞老化における指標遺伝子(p19Arf、p16ink4Aなど)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本柱で研究を推進している。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

保田 朋波流 広島大学 教授
宮本 潤基 東京農工大学 テニュアトラック准教授

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る。高齢者に特有の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を最終ゴールに設定している。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。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系を中心とした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「分子病態制御研究」と「免疫老化機構研究」の二つの大きな柱で全体研究を推進する。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、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。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目的と据える。

B. 研究方法

「分子病態制御研究」に関しては、呼吸器の老化と細胞老化との関連について解析をはじめたが、22年度より分担研究者の異動で当初の申請した研究は中止を余儀なくされ、細胞老化における指標遺伝子 *p16ink4A* をマーカー遺伝子として確立した2種類の老化細胞可視化制御マウスモデルの評価を継続しつつ、炎症をキーワードに個体老化のメカニズムを解明する糸口となる生体機能低下の解析を新たに続けることとした。今年度は新たに丸山が中心となって、もう一方の免疫老化機構研究との接点を目指した。腸管粘膜系の免疫老化機構研究においては主任研究者の丸山が研究全体の統括や研究立案やアドバイスをを行う形で、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、最終的には個体の老化に起こる生体機能低下のメカニズムを腸内環境が関わる炎症、免疫老化の解析を中心に行った。そのために本課題においては腸内栄養環境、炎症、生体防御という異なる分野の研究部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た。

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に関する解析

本研究では野生型老齡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行った。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。

22 年度は、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指した。*hCD2* 発現を指標に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 で解析した。細胞老化が老齡個体の免疫反応低下に関わる知見が集積し、加齢育成マウス、あるいは免疫老化関連遺伝子と我々が考えている *Zizimin2(Dock11)* 欠失マウスを用いたウイルス、細菌感染実験にて防御免疫能や慢性炎症の度合いが野生型とどの程度異なるのか解析を試みた。さらに老化細胞可視化制御マウスを用いて、細胞レベルでの老化細胞が集団 (組織、あるいは個体そのもの) の中で老化細胞を制御することでどのように老齡個体の免疫反応の変化を与えるのか考察した。

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、分担研究者宮本ら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を評価した。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、発現量が変化する遺伝子の特定を試みた。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。

(倫理面への配慮)

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、動物の取り扱いには「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

22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21年度ほどではないが、研究遂行に遅延が生じた。全体研究としては、細胞老化の指標遺伝子座とされる *Cdkn2A* に存在する (*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研究を進めている。呼吸器病態の分子レベルで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」研究については研究一年目の2021年度で中心となる分担研究者の杉本の異動に伴い研究継続を取りやめ、今年度は *p16ink4A* をマーカー遺伝子にした tdTomato マウスモデルの評価に加え、このモデルを用いた皮膚の炎症を含めた加齢に伴う生体機能の分子制御の解析に着手した。一方の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を明らかにする腸管粘膜系の「免疫老化機構」研究の2本柱で推進している。

免疫老化研究においては同じく *p16ink4A* をマーカー遺伝子にマウスには発現しないヒト CD2 表面抗原にもつ *p16ink4ACD2* マウスモデルを用いて、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を解析した。具体的には2021年度、*p16ink4ACD2* マウス由来の脾臓 T、B 細胞集団において *p16INK4a* 陽性細胞の可視化に成功した事に続いて、2022年度は *INK4A*-tdT-DTR マウスにおける DT 投与にみられる可視化した老化細胞の除去について、TRECK 法とは異なる新たなアプローチに成功した。

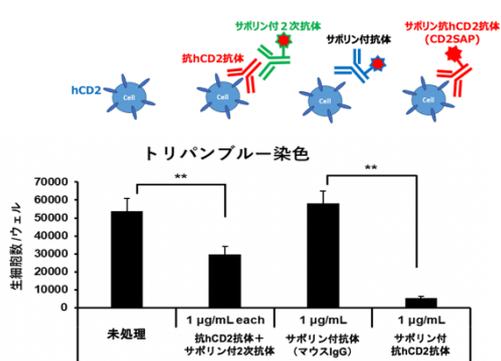


図) hCD2 発現不死化 MEF を用いた hCD2SAP によるイムノトキシン効果の検証

p16ink4ACD2 マウスにおいては *p16ink4A* 遺伝子の発現に併せてその細胞表面にヒト CD2

(hCD2) 分子が発現する。そこで発現した hCD2 分子に対する抗 hCD2 抗体に 28SRNA リポソームの不活性化活性を持つ植物由来のサポリン毒素を結合させる (hCD2SAP) ことで、hCD2 分子を標的としたイムノトキシン法にて老化細胞を除去することにした。まずは *p16ink4ACD2* マウス由来の MEF 細胞から株化した hCD2 を恒常的に発現する不死化細胞 (hCD2 発現不死化 MEF) を *in vitro* で図に示す各種抗体を培養細胞に添加し、

72 時間後にトリパンプルーにて生細胞の割合を解析した。結果は図に示すようにサポリンを含む抗 hCD2 抗体特異的に生細胞数は減少し、直接結合した抗体の方が高い除去効率を示す事も示唆された。細胞表面に発現した hCD2 に対する抗体に植物毒素として知られるサポリンを結合させた anti-hCD2SAP を用いたイムノトキシン法にて可視化できた細胞を除去することに成功した。さらに老化 T 細胞を中心に分化した T 細胞サブセットの老化細胞に対

する解析を継続し、免疫老化における免疫応答の活性化に細胞老化したリンパ球がどのような影響を与えるのかを明らかにして、論文化に成功した。

一方で分担研究者の保田とは *p16ink4A* を指標とした 2 種類の老化細胞可視化制御マウスを用いた共同研究も視野に入れつつ、2022 年度も感染、免疫、アレルギー炎症レベルの解析を中心に参画してもらった。加齢に伴い病態が変化する免疫疾患として知られるアレルギーは、近年腸管免疫との関連が指摘されており、高齢者の場合特に喘息などのアレルギー反応によって合併症を引き起こすことが問題となっている。保田らは食物抗原に対するアナフィラキシーおよびその寛容誘導のマウスモデルを用いて、腸管の抗原暴露に対して全身性の二次リンパ組織に形成された胚中心から IL-17 依存性に IgE が誘導されることを見出した。

また、老化に伴う炎症を引き金とした腸内フローラや腸内環境と免疫応答の変化の解析については 2021 年度までの検討に引き続き、宮本らも継続して野生型及び脂肪酸受容体遺伝子改変マウス (GPR40KO 及び GPR120KO マウス) を加齢させ、1 年 11 ヶ月齢に到達後、4 週間の高脂肪食負荷試験を実施した。野生型マウス (n = 8)、GPR40KO マウス (n = 7-8) 及び GPR120KO マウス (n = 6-8) について、高脂肪食負荷に伴う血液生化学変化を検討した。その結果、若齢期における高脂肪食負荷は、血糖値、遊離脂肪酸 (NEFAs) やコレステロール (T-cho) の有意な上昇が観察された。一方、加齢期においては、コレステロールのみが有意な上昇が観察された一方、血糖値や遊離脂肪酸の若齢期に観察された有意な上昇は消失した。従って、加齢に伴い血糖値や遊離脂肪酸に関連した栄養吸収や生体内代謝に何らかの影響が生じた可能性が示唆された。

D. 考察と結論

「分子病態制御」研究において、これまでの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を含めた呼吸器病態と細胞老化との関連については昨年度までの成果でまとめる形とした。今年度からは細胞老化における指標遺伝子 *p16ink4A* をマーカー遺伝子として確立した 2 種類の老化細胞可視化制御マウスモデルの評価を継続しつつ、炎症をキーワードに個体老化のメカニズムを解明する糸口となる生体機能低下の解析を続ける。

Covid-19 による研究環境の変化の影響は今年度も皆無ではないが、22 年度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、2021 年度に確立した **2 種類の老化細胞可視化制御マウスモデル** を用いて、① **p16ink4ACD2 マウス由来の脾臓老化リンパ球細胞を単離し、抗 CD2_SAP 抗体を用いたイムノトキシン法**にて除去できることを確認した。② **p16ink4AtdT マウス皮膚上皮で老化細胞特異的に炎症抑制機能を有する機能遺伝子のトランスクリプトーム解析**に着手した。

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ジェロサイエンス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血液生化学パラメータやホルモン分泌などの変化が観察された。このことは、本研究を継続することによって、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ものと大いに期待される。このことは、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も予想され、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得る可能性が強く示唆する。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。また、腸管免疫はアレルギーとの関連が指摘されているもののその因果関係や免疫学的な相互作用の実態については現時点では不明な点が多い。高齢者の場合特に喘息などのアレルギー反応によって合併症を引き起こすことが問題ともされるが、IgE 抗体がどの程度加齢に伴う各種疾患と関連するのかは研究が進んでいない。本研究の継続により、小児から高齢者に至るまで、アナフィラキシーを伴う重度のアレルギーの発症要因の解明に向け解明が期待される。特に IgE 産生を担う形質細胞が体内でどのようにして分化発生するのかについて現時点で明確な機序について一定の結論が得られていない。本研究を進めて行くことで外来抗原に対してどのような機序で IgE が産生されるのかが明らかになれば、人類の持続的な健康維持に寄与するものと考えられる。いずれにせよ、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す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) Akatsu H, Hiramatsu K, Tanaka H, Manabe T, Arakawa K, Kanematsu T, Hasegawa C, Kume M, Maruyama M, Nakamura A, Suzuki K, Ohohara H.
A Case of Coronavirus-2019 Infection Suggested by Antibody Titer Measurement.
J.J.A. Inf. D. 96, 204-209, 2022
- 2) Sugiyama Y, Harada T, Kamei Y, Yasuda T, Mashimo T, Nishikimi A, Maruyama M.
A senolytic immunotoxin eliminates p16INK4a-positive T cells and ameliorates age-associated phenotypes of CD4+ T cells in a surface marker knock-in mouse.
Experimental Gerontology 2023, 174, 112130 Epub 2023 Feb 28.
- 3) 丸山光生

栄養ストレスを紐解くジェロサイエンス研究と健康長寿
一般財団法人 医療経済研究・社会保険福祉協会 健康食品フォーラム 健康食品コ
ラム 2022年5月25日公開 健康食品コラム 2022年5月

2. 学会発表

- 1) 杉山悠真、錦見昭彦、丸山光生
p16^{INK4a}-associated CC-chemokine gene cluster expression evokes a diversity in cellular senescence.
第45回日本基礎老化学会大会, 2022年7月27日, 京都市
- 2) 杉山悠真、原田種展、丸山光生
老化細胞可視化制御モデルマウスから紐解く老化のメカニズム
第95回日本生化学大会、2022年11月9日、名古屋
- 3) 丸山光生
Nutri-aging capable to chronic inflammation control～炎症制御につながる Nutri-aging
第42回日本分子生物学会、2022年12月1日、千葉
- 4) 原田種展、杉山悠真、青木優、辻恵子、杉山大二郎、丸山光生
老化細胞可視化・制御モデルマウスを用いた皮膚老化細胞の生理的意義の検証
第45回日本分子生物学会、2022年12月1日、千葉
- 5) Sugiyama Y, Nishikimi A, Maruyama M
Analysis of senescent marker p16INK4a expression-associated cluster gene regulation aroused physiological aging.
第45回日本分子生物学会、2022年12月1日、千葉
- 6) 丸山光生
ジェロサイエンスで紐解く炎症抑制を考える食と免疫, 健康長寿
第20回機能性食品医用学会総会、2022年12月3日、京都
- 7) Sugiyama Y, Fujiwara M, Sakamoto A, Nishikimi A and Maruyama M
Deduced function of DOCK11 in B cells in secondary immune responses with protein antigens
第51回 日本免疫学会総会、2022年12月7日、熊本
- 8) 丸山光生
ジェロサイエンスとファンクショナルフードの接点、炎症抑制と栄養管理
第19回ファンクショナルフード学会学術集会、【基調講演】2023年1月6日、名古屋
- 9) 丸山光生
腸内環境から学ぶ炎症と免疫の加齢変化
第56回日本成人病（生活習慣病）学会、2023年1月14日、東京

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