

個体老化に結びつく加齢に伴う炎症と免疫機構の老化に関する研究 (24-9)

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「一 老化の機構に関する研究」を根幹に慢性炎症の蓄積を起端にする「二 加齢に伴う疾患のメカニズムの解明に関する研究」、さらには免疫機構の賦活化、加齢に伴う炎症の抑制をめざす「三 加齢に伴う疾患の予防手法の開発に関する研究」を広く網羅した。

加齢とともにリスクの高まる老化関連疾患の中でも特に免疫機構の低下が原因とされる感染症は常に高齢者の死因でも常に上位にある。この点でも疾患の克服だけに限らず機能低下のメカニズムの解明は高齢者の生活の質(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。今回、単年研究課題として提案した本研究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し、感染症をはじめとする免疫機構の老化がリスクとなる疾患の緩和や予防に繋がる成果をあげることを目指したものであった。すなわち先行研究で得られたモデルとそれらを用いて積み上げた知見を限られた 1 年という研究期間で業績に結びつけることを最優先した。

具体的には本研究は加齢に伴う「炎症の蓄積と制御」をキーワードに免疫機構の老化との関連を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用いた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、基礎研究として不可避なメカニズムの解明に加えて、高齢者を対象とした社会実装を目指した相乗的な研究成果の創出を考えて遂行した。それぞれの課題はこれまでの先行研究を発展させる形で分担研究者との連携で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た。炎症の制御に関わる免疫応答機構の解析を継続し、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む免疫機構の老化の分子メカニズムがどのように関連するのかを解明することに注心した。

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、適切に実施することができた。

主任研究者

丸山 光生 国立長寿医療研究センター 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 広島大学大学院 医系科学研究科 (教授)

宮本 潤基 東京農工大学大学院 農学研究院 (テニユアトラック准教授)

A. 研究目的

先行研究におい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を明らかにし、感染症をはじめとする老化が危険シグナルとなる疾患の緩和や予防に繋がる成果を残すことを目指してきた。加齢に伴って生体機能全般、なかでも生体防御機能が低下する。こうした免疫系の老化機構の解明は昨今の新型コロナウイルス感染症をはじめ、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メカニズムの解明でもあり、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。本研究ではこうした先行研究での知見、結果を整理し、積み残しの成果を一つでも多く実績に残すため、課題終了までの1年間の計画として設定にすることを明確にした。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、細胞レベルでそれらの標的を捉える事が可能だと考えた。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された。そして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が組織老化の一因であること、また加齢性疾患の発症のリスクや頻度を高めること、さらに病態を増悪化する因子の解明を急ぎつつ、我々独自のモデルマウスを用いて組織老化から個体老化、寿命研究にもつながる炎症や免疫系の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している点は本研究の無比な特色であると確信した。さらに本研究の独創的な点としても、本研究を長寿医療研究開発費で実施する最も重要な理由が、主任研究者の属するジェロサイエンス研究センターが研究所の所掌事務のうち、「加齢に伴って生ずる心身の変化及び加齢に伴う疾患の発症の要因やメカニズム等、本態の解明を目指し、予防、診断、治療法の開発につながる基盤的な調査及び研究を行うことをつかさどる」ところであり、本センターに所属する炎症・免疫機構研究部においてもジェロサイエンス研究センターの所掌事務のうち「加齢に伴って生ずる心身の変化及び加齢に伴う疾患において炎症・免疫機能の機構に関する調査及び研究を行うことをつかさどる」部署であることを鑑みて、所掌事務に完全に一致する部署での研究ということで、長寿医療研究開発費で実施する事が相応しいと考えている。

B. 研究方法

今回、遂行する研究は先行研究において得られた知見の中で、とりわけ主任研究者が推進する「免疫機構の老化」研究に関して、研究員の年度中の離職に伴った研究の遅延が原

因で成果に結びつけていない部分を中心に可能な限り、積み残しなく成果に結びつける事を達成目標として全体計画とした。

我々はこれまでに本研究の先行研究として、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用いた老化細胞可視化制御マウスモデルを動物実験モデルとして分子・細胞レベルで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、個体老化とどのように関わるのかについて「腸管粘膜系の免疫老化機構」を中心に進めた。

本研究ではこれに加えて、我々が独自に作出に成功した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：図 1) を用いることで、加齢に伴う全身性の炎症の制御、あるいは感染防御の分子機構についてもどのように個体の老化につながるのかの検討として「炎症と免疫機構の老化」の 2 本柱で研究を進めることにした。とりわけ、炎症の蓄積と免疫応答との関連については若齢、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する。そして発現量が変化する遺伝子が特定できれば、さらにその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することにした。

本研究開始時にはすでに論文作成を開始した ink4A-dTomato_DTR ノックインマウスに関しては追加データの作成を急ぐ計画を最優先した。先行研究にてすでに第一報を論文化できたセノリティックイムノトキシン法による老化免疫細胞除去に成功した ink4A-hCD2 ノックインマウスに関しては、本モデルマウスを用いた免疫老化研究について、積み残すことなく炎症との関わりについての論文作成に努めた。

具体的には我々が独自に開発した *p16* 陽性老化細胞を標的とする新しいセノリティックモデルマウスを用いることで、生体内の生理的老化の基礎となる慢性炎症の蓄積と免疫老化のメカニズム解明への応用を目指した。本申請の 1 年間にこの技術により高齢モデルマウスを用いてフローサイトメトリによる *hCD2* 陰性あるいは陽性細胞の分取を行うことができれば、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トランスクリプトーム解析については一部解析を外注して、安定したデータの取得と論文

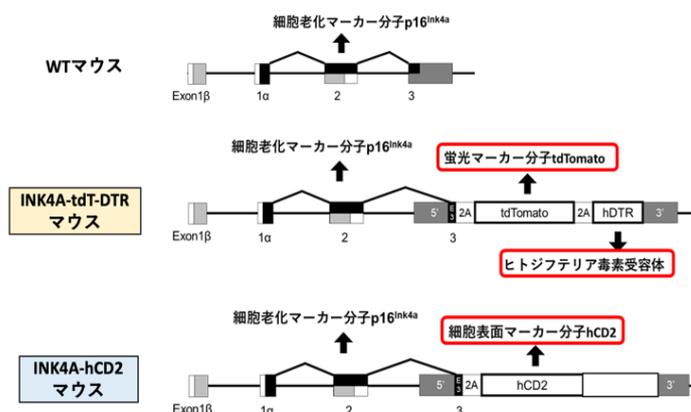


図 1) 2 種類の老化細胞可視化制御マウスの *CDKN2A* 遺伝子座

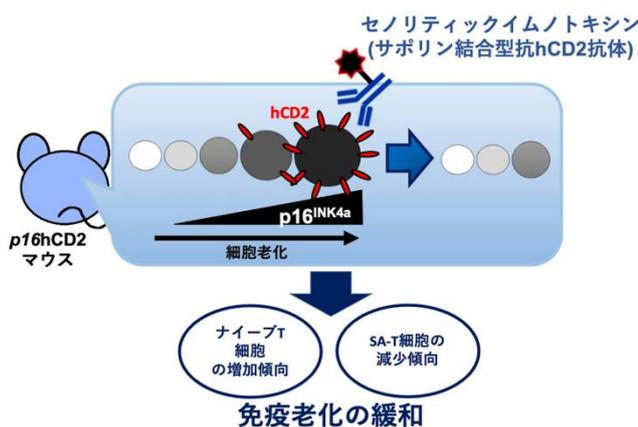


図 2) INK4A-hCD2 マウスモデルを用いたセノリティックイムノトキシン法による老化免疫細胞除去とその効果

化を考える有効な老化研究解析ツールとして貢献できる。

(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

本研究は先行研究以来、作出に努めた老化研究モデルマウスとそれらを用いて積み上げた知見を限られた 1 年という研究期間で成果に結びつけることを根幹に研究を遂行した。

【Project 1】

加齢に伴う炎症と腸管粘膜系を含めた免疫機構の老化に関する研究

* 老化細胞可視化制御マウスを用いた炎症の蓄積と個体老化に伴う免疫機構の老化に関する解析

主任研究者の丸山と研究協力者で先行研究より p16ink4A を細胞老化マーカー遺伝子にマウスでは発現しないヒト CD2 表面抗原にもつ ink4A-hCD2 マウスモデル(図 1)を用いて、加齢に伴う老化免疫細胞の状態と機能についての解析を論文発表した (Sugiyama Y, et al. 2023)。具体的には免疫応答の活性化に細胞老化したリンパ球が免疫老化そのものにどのような影響を与えるのかを明らかにした。本研究では老化 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た。先行研究より加齢育成を継続している ink4A-hCD2、ink4A-dTomato_DTR 高齢モデルマウスを用いてフローサイトメトリによる hCD2 陰性/陽性細胞の分取を行うことができ、再現性の取れる画分のリンパ球の老化におけるトランスクリプトーム解析が分子レベルで可能にすることができた。自然免疫系とのクロストーク制御についても RNA ウイルス感染(疑似感染を含む)にて感染と炎症の蓄積についても、論文化を目指すデータを蓄積することができた。

* 新規モデルマウスを用いた免疫老化、炎症レベルの解析

主任研究者の推進する研究の進捗としては、今年度の研究開始直後から論文投稿を目指していた ink4A-dTomato_DTR ノックインマウスに関してマウス個体に対しての皮膚細胞への DT(ジフテリア毒素)連続投与による老化皮膚細胞の除去の前後で発現する遺伝子変化を網羅的解析し、脂質代謝関連因子を中心に DT 投与の老化細胞除去後に発現が上昇する遺伝子に注目し、皮膚老化を制御する機能(一部機能の回復)が考察できた。すなわち、皮膚老化と免疫老化の関連を検証することで皮膚上皮老化細胞の蓄積することで発現が抑制され

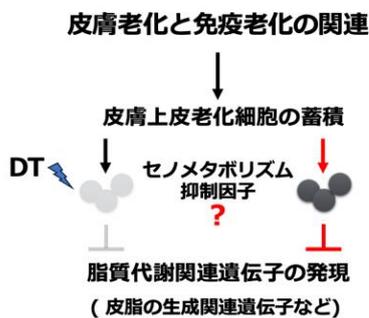


図3)皮膚の老化細胞と脂質代謝に関連する遺伝子サブセット発現の関係

具体的には免疫老化との関係性を明らかにする目的で、腸管免疫寛容の破綻でアナフィラキシーを誘発するモデルマウスを若齢及び高齢で比較するとともに、免疫老化可視化マウス (ink4A-hCD2 マウス) を用いて炎症性アレルギー状態にある腸管の Th17 細胞や IgE 産生に関わっている B 細胞における免疫老化状態を明らかにするとともに、老化細胞マーカーを発現する細胞の除去によってどのように病態が変化するのか解析する体制が整った。具体的にはこれまでの実験結果から、抗原に対して産生される抗体が胚中心反応を経由したものであり、高親和性抗体が産生される機序として知られる体細胞変異を多く認める抗体を特定した。特定された抗体の解析から IgE 産生抗体の多くが IgG1 とクローンを同一にしていたことから、アナフィラキシーを引き起こすとされる高親和性 IgE 抗体は、変異した IgG1 陽性胚中心 B 細胞もしくは IgG1 記憶 B 細胞より形成されることが示唆された。これらの生理的意義を確認するため、特定した抗体のモノクローナル抗体を作成し、同一クローンの高親和性 IgG1 と高親和性 IgE、低親和性 IgG1 と IgE をそれぞれ作成した。

さらに PRC2 コアサブユニット Eed を T 細胞特異的に欠損するマウスの解析においては Eed 欠損マウスでは iNKT 細胞数、特に NKT1 細胞と NKT17 細胞が大幅に減少した一方で、conventional T 細胞と NKT2 細胞の数は正常であった。Eed 欠損により iNKT 細胞の分化が阻害され、アポトーシスが誘導されやすいことが明らかとなり、H3K27me3 レベルの大幅な減少と Zbtb16、Cdkn2a、Cdkn1a の異常発現が認められた。Eed 欠損マウスは iNKT 細胞依存的にアセトアミノフェン誘発性の肝臓障害および炎症に非常に感受性が高く、肝臓常在 iNKT 細胞における Eed を介したヒストンメチル化の重要な役割が示された。

【Project 2】

加齢炎症の蓄積と制御が免疫応答の老化にもたらす影響に関する研究。

* 加齢に伴う栄養代謝シグナル変化を介した基礎老化研究

ていた脂質代謝関連遺伝子が DT によるセノリシスで発現上昇がみられたということから、我々は皮膚上皮老化細胞にはセノメタボリズム抑制因子 (seno-metabolic suppressor) の存在を想定した (図 3)。ink4A-dTomato_DTR ノックインマウスに関して、皮膚老化細胞と脂質代謝に関連する遺伝子サブセット発現の関係 (図 4) で Genes to Cells 誌に投稿し、受理された。

分担研究者の保田とは、先行研究で明らかにされた知見を集積しつつ、感染、免疫、アレルギー炎症レベルの解析を中心に連携を密に研究を進めた。

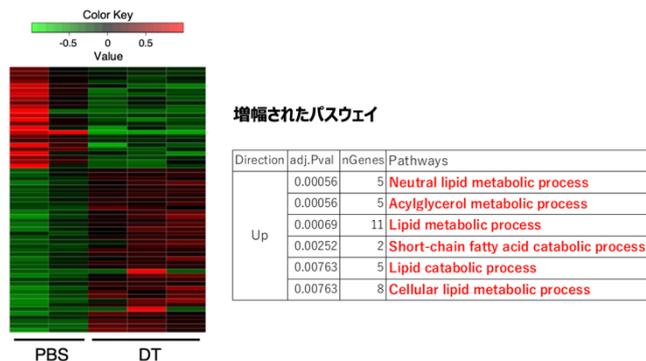


図4) p16tdT-DTR マウスを用いた皮膚における老化細胞除去後の DEG 解析と増幅された脂質代謝関連パスウェイ

分担研究者の宮本と連携し、先行研究で明らかになった知見を集積しつつ、栄養・腸内環境変化による腸管免疫系からの全身恒常性機能への関与を炎症レベルの解析を中心に研究を進めた。我々が口にする食事にも多く含まれる多価不飽和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対する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炎症の蓄積等の変化を継続して検討した。本研究を一年継続したことによって、加齢に伴う栄養素、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免疫系の老化の新たな調節メカニズムの解明に繋がる知見が蓄積された。さらに、これまでに加齢マウス依存的な特定の腸内細菌代謝物の蓄積が脂肪酸受容体を介して腸管における生理機能に影響を及ぼす影響について、脂肪酸受容体の遺伝子改変マウスの老齢化や、若齢期における特定の腸内細菌代謝物の精製物の過剰な投与が老齢期と類似した腸管の生理機能と密接に関与することを見出した。このメカニズムに焦点をあてることにより、引き続き、加齢に伴う炎症を制御、免疫老化の賦活化に繋がる新たな知見を提供できるものと大いに期待できる結果になった。限られた研究期間のうちに連携した論文を発表することを第一目標に老齢期における特定の腸内細菌代謝物が腸管の生理機能に及ぼす分子機序の解明に関する研究を推進した。

D. 考察と結論

主任研究者グループとしては新規モデルマウスを用いた免疫老化、炎症レベルの解析を中心に①p16ink4AtdT マウス皮膚上皮で老化細胞を DT 特異的に除去することで、p16ink4A 依存的な老化細胞が個体老化に与える影響を考察した。②p16ink4AtdT マウス皮膚上皮における皮膚老化と免疫老化の関連を解析し、セノメタボリズム抑制因子の存在を考察した。③p16ink4AtdT マウス、p16ink4ACD2 マウス由来の MEF 細胞を継代培養して、同じ継代数における細胞老化の多様性と免疫応答の関連を考察した。加齢に伴って低下する生体機能の恒常性の破綻が原因の一つとされる炎症や免疫機能の老化について、単年度の計画を遂行し、そのメカニズムの一端を解明することで、高齢者を苦しめる老化疾患の予防や治療に結びつけようとした。すなわち、老化・老年病を対象とした研究拠点である NCGG の長寿医療研究開発費の研究対象範囲の核心となったと研究とその成果であったと考察している。研究分担者との共同研究を鑑みると、加齢に伴うアレルギー反応のメカニズムについてアナフィラキシーを引き起こすとされる高親和性 IgE 抗体を中心により深く理解することで、加齢性アレルギーに対する新しい治療法や個別化医療の開発や進展が期待できる。本研究終了後もこれら抗体の大量精製に成功した場合、in vivo 投与実験を実施し、高親和性抗体の生理的意義を明らかにすることができると考察する。

一方、東京農工大の宮本とは加齢期における高脂肪食負荷によって、腸内細菌の変化に伴う特定の腸内細菌代謝物が 2 種類、蓄積していることを見出した。また若齢マウスへの腸内細菌代謝物の投与は老齢マウスと類似した表現型を示すことを見出し、これら腸内細菌代謝物の蓄積と相関して、小腸における絨毛の短縮が観察された。さらにそれは生体内における栄養素の吸収が阻害されている可能性がこれまでに判明した。そこで小腸の絨毛の短縮における分子機序を詳細に明らかにするために、炎症に着目して検討を実施した。その結果、加齢に伴う炎症 (inflammaging) は通常食負荷マウスで観察され、さらに、腸内細菌代謝物が蓄積した高脂肪食負荷老齢マウスではさらに、炎症が亢進していることを明

らかにした。加えて、この炎症亢進は、若齢期における過剰な蓄積においても同様に観察されたことから、腸内細菌代謝物の蓄積に伴う GPR40/GPR120 シグナルの阻害が腸管における炎症制御に寄与している可能性が考察できた。このような加齢変化を基盤にした腸内細菌由来代謝物研究においては、今後腸内環境を標的とした新規機能性食品や治療薬の開発に発展することが期待される。しかし、当該研究の申請期間が 1 年間であったことから、まずは積み残している知見や成果を論文、学会発表実績に繋げることを優先し、遅延無きように成果を積み上げることに精進した。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sugiyama Y, Kawabe Y, Harada T, Aoki Y, Tsuji K, Sugiyama D, Maruyama M.
Elimination of physiological senescent cutaneous cells in a novel p16-dependent senolytic mouse model impacts lipid metabolism in skin aging.
Genes Cells. 2024 Sep 16. doi: 10.1111/gtc.13163.
- 2) Sato N, Terashima Y, Sugawara M, Unno R, Asao H, Iwasaki M, Watanabe T, Uno T, Maruyama M.
Continuous high-soy protein soymilk intake affects ordinary walking speed in the Japanese pre-frail and frail elderly: a randomized controlled trial
BMC Geriatrics. 2025 Jan 15;25(1):35.
- 3) Watanabe K, Kamei Y, Igarashi M, Shibuya S, Shimizu T, Kimura I, Maruyama M.
Impact of a water-soluble soy extract on inflammation and gut microbiota in physiologically aged mice
Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 2025 doi: 10.1093/bbb/zba032
- 4) 丸山光生
免疫系の老化とフレイル・ロコモ
フレイル・ロコモのグランドデザイン 日本医事新報社 2 章 8、p75-80、
2024 年 8 月 14 日
- 5) 丸山光生 島田裕之
健康寿命を延ばす方法
人生 100 年時代の元気になる言葉 (TJMOOK) ムック 宝島社 p44-47、
2024 年 9 月 26 日

2. 学会発表

- 1) 丸山光生
新しい“若い”の研究、ジェロサイエンス研究のお話~一人ひとりの健康長寿
日本お笑い学会 中部支部 新春笑例会 2025 年 1 月 26 日、名古屋
- 2) 丸山光生

- Introduction, シンポジウム：[2PS-13] Nutri-aging が制御するジェロサイエンス研究
第 47 回日本分子生物学会年会、2024 年 11 月 27 日、福岡
- 3) 丸山光生
ジェロサイエンス研究における栄養介入と炎症抑制、シンポジウム：[2PS-13]
Nutri-aging が制御するジェロサイエンス研究 第 47 回日本分子生物学会年会、
2024 年 11 月 27 日、福岡
- 4) Maruyama M
Interrelation between immunosenescence and inflammation in perspective of
senescence elements, Symposium [2S05e] Diversity of age-related diseases in
perspective of senescence elements, The 97th Annual Meeting of the Japanese
Biochemical Society, 2024 Nov. 7, Yokohama, Japan
- 5) 丸山光生
豆乳と老化予防～健康長寿への道～
第 71 回日本栄養改善学会学術総会、2024 年 9 月 8 日、大阪市
- 6) 原田種展、杉山悠真、川邊揚一郎、丸山光生.
Application of senescent cell removal model mice (tdTomato/human HBEGF knock-in
mice) as a tool for aging research.
第 47 回日本基礎老化学会、2024 年 6 月 15 日、東京.
- 7) 杉山悠真、川邊揚一郎、丸山光生
Diversity of SASP factors and their physiological roles in cellular senescence
process.
第 47 回日本基礎老化学会、2024 年 6 月 15 日、東京.
- 8) 野畑重教、原田種展、岡 健太、西村 聡、太田裕子、丸山光生
慢性炎症の制御をめざす温泉藻類抽出物 RG92 の抗炎症作用の解析
第 24 回日本抗加齢医学会総会、2024 年 5 月 31 日、熊本

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