

長寿医療研究開発費 平成 22 年度 総括研究報告

老化に伴う免疫機能低下に関する研究 (22-11)

主任研究者 丸山 光生 国立長寿医療研究センター 研究所 (老化機構研究部長)

研究要旨

近年、若年と老年層を比較する手法でリンパ球を中心とした細胞レベルからマウス、ヒトといった個体レベルで加齢に伴う生体機能変化の一つとしての免疫能低下のメカニズムについての研究が注目されてきた。本研究班は「免疫老化機構の解明」というミッションで種々の免疫系に特異的な細胞集団や遺伝子の発現変化、あるいはサイトカイン等の分泌タンパクの変動からそのメカニズムを検討し、そうした変化が高齢者によく見られる老年疾患 (感染症) や栄養介入にどのような影響を及ぼし、及ぼされているのかを明らかにすることを目指している。高齢者の免疫応答機能低下という命題について、Zizimin2 (丸山光), SMP30 (丸山直) 等、老化関連遺伝子として同定された因子の免疫老化メカニズムの解明や腸管免疫の加齢変化 (佐藤) を中心とした基盤的な研究と高齢者を対象とした臨床研究 (海老原、中山、赤津) の橋渡しとして、感染動物モデルを用いた人獣共通感染症リサーチセンターの研究者 (宮崎、澤) が参加することで、ヒト高齢者の調査と動物実験の結果を適正に判断できる体制を整備した。とりわけ、主任研究者は高齢者の免疫機能低下の分子機構に関する研究として Zizimin2 遺伝子を中心に老化に伴う免疫機能低下に関する分子レベルの基礎研究をメカニズムの解明を検討した。

主任研究者

丸山 光生 国立長寿医療研究センター研究所 部長

分担研究者

佐藤慎太郎	東京大学医科学研究所	助教
丸山 直記	東京都健康長寿医療センター研究所	副所長
宮崎 忠昭	北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター	教授
澤 洋文	北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター	教授
中山 勝敏	東京慈恵会医科大学	准教授
海老原孝枝	東北大学加齢医学研究所	助教
赤津 裕康	医療法人さわらび会福祉村病院長寿医学研究所	副所長

A. 研究目的

近年、獲得免疫系、自然免疫系に加えて、腸管免疫系 (腸内フローラと自己免疫疾患、生活習慣病、感染症を含む各種疾患との関連性) が注目されている。とりわけ

加齢に伴う免疫機能低下に注目し、腸内フローラの変化を含めた免疫動態を客観的に評価し、その予防や賦活化に有効な方策を検討していくことは喫緊の課題と考えられる。健常高齢者においても日常生活の中で免疫能の低下が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、感染等に対するリスクの軽減が大いに期待される。いずれにせよ、本研究における感染症に対する免疫力賦活化や栄養介入による生体防御機能の改善に関する試みは政策的にも介護負担の軽減につながり、今後、間接的に在宅医療の推進を図れる等、健全な高齢化社会を築く上でも不可欠な研究として位置づけられ、まさに本研究班全体の目的と考えている。なかでも主任研究者は研究班全体の総括をするとともに、免疫老化関連遺伝子の1つである Zizimin2 の免疫系に関する分子機構を明らかにするために、今年度は Zizimin2 遺伝子欠失(Ziz2KO)マウスを用いて、加齢に伴う免疫力の低下により、高齢者において重篤化する症例が多いことが知られているインフルエンザウイルス感染における重篤化と加齢軸との関連を個体レベルで検討した。

B. 研究方法

獲得免疫系における免疫老化関連遺伝子として我々が同定した Zizimin2(Ziz2)遺伝子の分子機能を解明する過程で、22年度は Ziz2KO マウスを用いた個体レベルでの免疫応答について、Zizimin ファミリー遺伝子の機能的補完の可能性、T、B リンパ球の質や量的な変化、あるいは獲得免疫系における抗原刺激後の免疫グロブリン産生、サイトカイン産生等を中心に検討しはじめた。研究協力者として 22年度は流動研究員(飯島、坂部)と直江(国立長寿医療研究センター・室長)等が参加した。具体的には、Ziz2 遺伝子の発現特異性とウイルス感染との関連を中心に分担研究者(宮崎)とも協同して解析を進めた。

Ziz2KO マウスまたは野生型(WT)マウスに、PBSで1,000pfu/50mlに希釈したインフルエンザ A ウイルス(A/PR/8/34 (H1N1))をイソフルラン麻酔下で経鼻的に投与した。その後、ウイルス感染後の体重変化及びマウス生存率を観察し、インフルエンザウイルス感染後の症状の重篤化に対する Ziz2 の関与を検討・評価した。また、Ziz2KO マウスに関しては、10日間の観察後、各個体の脾臓を採取し、脾細胞における T、B 細胞の割合を定量評価する事により、インフルエンザウイルス感染後のリンパ球の動向を解析した。さらに、Influenza nucleoprotein(NP)テトラマーを用いて、脾臓内の Influenza NP 特異的 CTL 集団の定量を行う事により、インフルエンザウイルス感染後の T 細胞免疫応答に対する Zizimin2 の役割について検討を行った。

(倫理面への配慮)

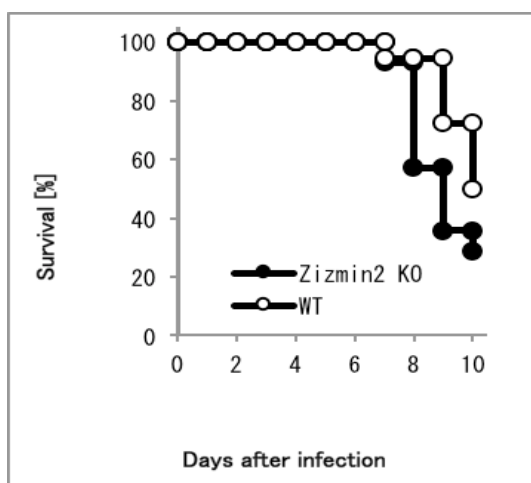
当該年度において、主任研究者の属する当施設ではヒト試料を対象とする研究は実施しなかった。また他機関における分担研究者の行うすべての臨床研究は血液検査を含め、平成20年厚生労働省告示第415号 臨床研究に関する倫理指針(平成21年4月1日施行)に従うと共に、所属病院倫理委員会で定められたインフォームド・コンセントに基づいて審査、承認の後、研究目的、危険性、個人情報に関する配慮については詳細に説明し、理解を得た上で書面にて本人、家族より承諾を得て行った。一方、すべての研究に関わる動物実験に関しては実験動物の福祉を順守し、動物愛護上の配慮を踏まえ、

的確に管理した。さらに一部、本研究におけるインフルエンザウイルスを用いる感染実験については北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター病原性微生物等安全管理委員会および北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター特殊空調施設運営委員会ですでに第二種使用等に係る実験等と拡散防止措置については機関承認実験として申請・承認を受けている（承認番号：21(46)）。その他、実験動物の使用、及び処分に関しても苦痛の軽減等、倫理上の問題はすべて、独立行政法人国立大学実験動物施設協議会指針等に基づき、当該研究施設の倫理委員会で承認を受けた後に各研究機関が定めた動物実験ガイドラインに則って実施した。

C. 研究結果

WT マウスと比較して、インフルエンザ A ウイルス感染後の Zizimin2 KO マウスの生存率の増悪化が観察された。（下図、左）しかしながら、インフルエンザ A ウイルス感染後の体重変化に関しては、2 群間での有意な差は認められなかった。（下図、右）

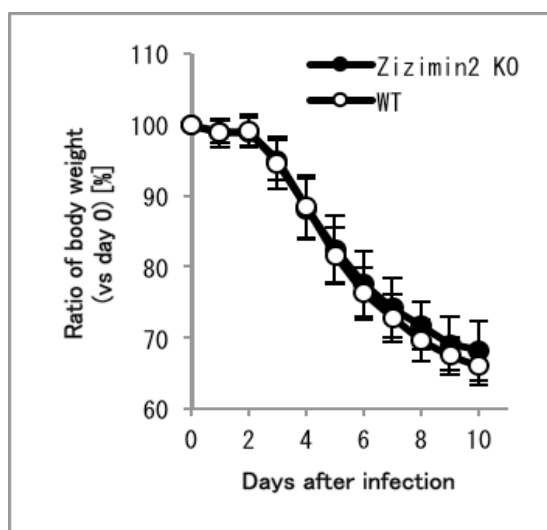
マウス生存率



Zizimin2 KO 群 14 匹

WT 群 18 匹

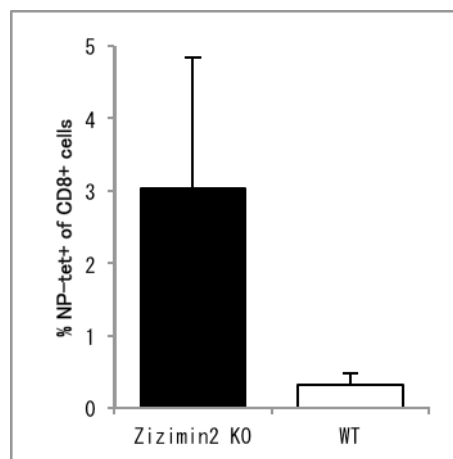
マウス体重変化



ウイルス感染 10 日後の脾細胞における T, B 細胞の割合、並びに CD4、CD8 陽性 T 細胞の割合を計測したが、両群間で有意な差は認められなかった。しかしながら、Influenza nucleoprotein(NP)テトラマーを用いて、脾臓内の Influenza NP 特異的 CTL 集団の定量を行ったところ、Zizimin2 KO マウスにおいて、Influenza NP 特異的 CTL 集団が増加している事が確認された。（右図）

Zizimin2 KO 群 3 匹

WT 群 6 匹



D. 考察と結論

WT マウスと比較して、Ziz2KO マウスではインフルエンザウイルス感染後の生存率の低下が認められた。すなわち、インフルエンザ A ウイルスの初回感染の際に、Ziz2 は重篤化に対する生体防御機構を有している可能性が示唆された。また、インフルエンザウイルス感染後の Ziz2KO マウス脾細胞において、インフルエンザ NP 特異的 CTL の誘導亢進が認められた。この結果は、Ziz2 には抗原特異的な CTL の誘導を負に制御する働きがある事を示唆するものである。インフルエンザウイルス感染において、Ziz2 KO マウスでは、CTL の誘導亢進等、ウイルス抗原に対する免疫応答が強く誘導されている可能性が考えられる。ウイルス感染における病原体の排除には、生体内での自然免疫応答並びに獲得免疫応答が重要であると言われている一方で、抗原に対する過剰な免疫応答は、感染局所周縁の組織傷害をも誘導し、症状を重篤化させる、という報告もなされている。従って、Ziz2KO マウスにおいては、過剰な免疫応答が誘導されることにより、生存率の低下が生じた、という可能性が考えられた。今後、ウイルスの感染部位である肺組織を用いて、肺中ウイルス量、炎症性サイトカインの産生量の測定、並びに各種炎症細胞浸潤の程度を評価する事により、Ziz2KO マウスでの重篤化の原因について詳細な解析を進めていく必要がある。また、非致死量のウイルスを 1 度感染させた Ziz2KO マウスを用いて、ウイルス再感染時の免疫応答に対する Ziz2 の役割、特にメモリー細胞産生・機能解析を中心に、更なる検討を進めていく必要があると考えられる。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表 (総説等も含む)

1) Nakamura H, Kawagishi H, Watanabe A, Sugimoto K, **Maruyama M**, Sugimoto M. Cooperative Role of the RNA-Binding Proteins Hzf and HuR in p53 Activation. **Mol Cell Biol.** 2011 31(10):1997-2009.

2) Kawagishi H, Nakamura H, **Maruyama M**, Mizutani S, Sugimoto K, Takagi M, Sugimoto M. ARF suppresses tumor angiogenesis through translational control of VEGFA mRNA **Cancer Res.** 2010 70(11): 4749-4758

3) Ito T, Takii T, **Maruyama M**, Hayashi D, Wako T, Asai A, Horita Y, Taniguchi K, Yano I, Yamamoto S, Onozaki K: Effectiveness of BCG vaccination to aged mice. **Immun Ageing**, 7:12-12,2010

4) Kawagishi H, Nakamura H, **Maruyama M**, Mizutani S, Sugimoto K, Takagi M, Sugimoto M: ARF suppresses tumor angiogenesis through translational control of VEGFA mRNA. **Cancer Research**, 70(11): 4749-4758, 2010

5) Jia YJ, Asai A, Sakabe I, **Maruyama M**: Rat Monoclonal Antibodies against

New Guanine Nucleotide Exchange Factor (GEF), mouse Zizimin2. *Hybridoma*, 29(3): 205-209, 2010

6) Maruyama M : 214I9 against mouse Zizimin2 C-terminal-half fragment. *Hybridoma*, 29(3): 273-273, 2010

7) Nakamura H, Asai A, Maruyama M and Sugimoto M : Production of Rat Monoclonal Antibodies Against RNA-binding Protein, Hzf. *Hybridoma*, 29(1):7-11, 2010

8) 川岸裕幸、丸山光生、高木正稔、杉本昌隆
癌抑制・細胞老化因子ARFが引き起こす血管新生抑制及び疾患との関わり.
基礎老化研究, 34(3);19-21,2010

9) 坂部 勇、飯島順子、丸山光生
完全版マウス・ラット疾患モデル活用ハンドブック
「第6部 老化 32章 老化促進モデル」秋山徹・奥山隆平、河府和義編、
羊土社、500-514、2010

2. 学会発表(海外発表、招待講演、シンポジウムも含む)

1) Maruyama M

Struggling researches in molecular mechanism of Aging
2010 Japan-Korea Joint Research Project Symposium, Tokyo, June 21, 2010

2) Maruyama M, Sakabe I, Asai A, and Iijima J

Functional analysis of a novel GEF, Zizimin2/DOCK11, and its role of immunosenescence
10th Korea-Japan Gerontologist Joint Meeting, Daejeon, Korea, July 1, 2010

3) Maruyama M, Sakabe I, Iijima J, and Naoe Y

Molecular mechanisms of functional decline in the immunosenescence
Asian Aging Core for Longevity Research and Education 2010 Jeju Conference,
Jeju, Korea, August 23, 2010

4) Maruyama M, Sakabe I, Asai A, and Iijima J

Characterization of a novel GEF, Zizimin2/DOCK11
and its putative role in immunosenescence
Molecular Genetics of Aging, Cold Spring Harbor Meeting,
New York, USA, September 30, 2010

5) Nakamura H, Kawagishi H, Watanabe A, Maruyama M and Sugimoto M

Post-transcriptional regulation of the p53 tumor suppressor
Molecular Genetics of Aging, Cold Spring Harbor Meeting,
New York, USA, September 30, 2010

6) Akatsu H, Nagafuchi S, Kurihara R, Okuda K, Takasugi S, Yamaji T, Takami

M, Yamamoto T and **Maruyama M**

Effects of an enteral nutrition containing prebiotics on influenza vaccination in the elderly. Clinical Nutrition Week 2011, American Society for Parenteral and Enteral Nutrition meeting Vancouver, Canada, January 30, 2011

7) **Maruyama M**

Immunological regulation between aging and cell death
Virginia Commonwealth University, Virginia, USA, October 4, 2010

8) **Maruyama M**

TARSH/Abi3bp, its putative role in tumor suppression or cellular senescence
Virginia Commonwealth University, Virginia, USA, January 27, 2011

9) **丸山光生**

「難病の克服に向けて」
名古屋大学第 15 回鶴舞公開セミナー 2010 年 4 月 23 日. 名古屋

10) 飯島順子、Yan Jun J, 坂部 勇、浅井あづさ、**丸山光生**

新規 GEF, Zizimin2/Dock11 の in vitro における機能解析と老化との関わりについて 第 33 回日本基礎老化学会 2010 年 6 月 17 日 名古屋

11) 坂部 勇、飯島順子、直江吉則、**丸山光生**

免疫老化関連因子 Zizimin2/Dock11 の in vivo における機能解析
第 33 回日本基礎老化学会 2010 年 6 月 17 日 名古屋

12) **丸山光生**

「老化と癌化の最新の話—細胞老化関連遺伝子 TARSH の臨床応用と肺癌の臨床研究」 金沢医科大学病院 第 29 回がん診療連携拠点病院研究会
2010 年 8 月 6 日 金沢

13) **丸山光生**

「動物実験が教えてくれる老化と免疫のお話し」
日本実験動物協同組合研修会 2010 年 9 月 25 日. 東京

14) Iijima J, Sakabe I, Asai A, **Maruyama M.**

Functional analysis of novel GEF, Zizimin2/DOCK11 and its putative role in immunosenescence. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 BMB2010 2010 年 12 月 9 日 神戸

15) 赤津裕康、山本孝之、**丸山光生**

経腸栄養管理高齢者へのプレバイオティクス介入のインフルエンザ抗体価に及ぼす影響 第 33 回日本基礎老化学会 2010 年 6 月 17 日 名古屋

16) 赤津裕康、永瀧真也、栗原リナ、奥田研爾、山地健人、高見正雄、山本孝之、**丸山光生**

経腸栄養成分が高齢者の獲得免疫／インフルエンザ抗体価に及ぼす影響
第 26 回 日本静脈経腸栄養学会 フェローシップ受賞者講演
2011 年 2 月 17 日 名古屋

17) 赤津裕康、清水金忠、松山善次郎、栗原リナ、小川康一、奥田研爾、山本孝之、
丸山光生
プロバイオティクスの経腸栄養管理高齢者への応用～ビフィズス菌長期投与による
生体防御改善 第 26 回 日本静脈経腸栄養学会 2011 年 2 月 17 日 名古屋

18) 山田潤、横井則彦、羽室淳爾、**丸山光生**、寺井和都、木下茂
ドライアイにおける結膜上皮障害と細胞内グルタチオンとの関連 第 35 回角膜カン
ファレンス・第 27 回日本角膜移植学会 2011 年 2 月 17 日 東京

19) 赤津裕康、山本孝之、**丸山光生**
高齢経腸・静脈栄養管理患者における腸内菌叢及びインフルエンザ抗体価と栄養状
態の検討 第 26 回 日本静脈経腸栄養学会 2011 年 2 月 18 日
名古屋

20) 赤津裕康、遠山友紀子、**丸山光生**、山本孝之
高齢者経管栄養管理におけるフラクトオリゴ糖（FOS）介入による腸管環境改善の
試み 第 26 回 日本静脈経腸栄養学会 2011 年 2 月 18 日
名古屋

F. 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