

加齢に伴う腸内環境の変化と防御免疫機能低下に関する研究 (29-26)

主任研究者 丸山 光生 国立長寿医療研究センター 副所長・老化機構研究部長

**研究要旨**

我が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、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。その中で特に本研究課題では、「加齢に伴う免疫機能低下機構を腸内環境に関わる粘膜、腸管免疫系に見られる変化を中心に解析し、低下の予防、克服を目指す新たな知見を得る」までに焦点を絞るを研究目的の根幹としている。これまで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。一方では国内外において、近年、腸管を含む粘膜免疫系も加齢に伴う機能低下を示すことや腸内細菌が宿主のリンパ球系免疫機能を制御してウイルスや細菌感染時の免疫応答の維持に関与することが強く注目されている。そこで、本研究課題では腸内環境の加齢変化に注目し、基礎老化研究として感染と深く関わる「①防御免疫機能の低下機構と腸内フローラとの相関に関する研究」を根幹として、臨床への橋渡し研究として「②ウイルス、細菌感染あるいは炎症時に見られる腸内フローラや免疫応答の変化」に関する研究を、さらには評価システムの開発研究として「③加齢に伴う栄養摂取を介した恒常性維持への免疫・代謝機能変化とその評価モデル系の開発」の 3 点に焦点を絞って研究を進めていく。

本研究に関わるすべての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、的確に管理する。さらに一部のウイルス株を用いた感染実験においては感染実験安全委員会、ならびに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。

主任研究者

丸山 光生 国立長寿医療研究センター 副所長・老化機構研究部 (部長)

分担研究者

赤木 一考 国立長寿医療研究センター 組織恒常性 PT (PL)

佐藤慎太郎 大阪大学微生物病研究所

BIKEN 次世代ワクチン協働研究所 (特任准教授)

赤津 裕康 名古屋市立大学 大学院医学研究科 (教授)

木村 郁夫 東京農工大学 農学研究院 (特任准教授)

## A. 研究目的

世界的にも長寿先進国である我が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。その中でこれまで先行研究により得られた知見を元に29年度開始の本研究課題では、全体計画としては「加齢に伴う免疫機能低下機構を腸内環境に関わる粘膜、腸管免疫系に見られる変化を中心に解析し、低下の予防、克服を目指す新たな知見を得る」までに焦点を絞ることを研究目的の根幹としている。そしてさらに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防御免疫機能の低下機構と腸内フローラとの相関に関する研究

②ウイルス、細菌感染あるいは炎症時に見られる腸内フローラや免疫応答の変化

③加齢に伴う栄養摂取を介した恒常性維持への免疫・代謝機能変化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、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、「高齢者の感染に対する防御免疫機能低下に関する基礎研究」の一部としては免疫老化関連遺伝子として同定した 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。

## B. 研究方法

先行研究により得られた知見を元に29年度開始の本研究課題では、具体的には29,30年度に「老齢、老化モデルマウス由来免疫組織の加齢変化の解析と免疫応答指標の探索」と「加齢に伴う腸内フローラの変化と腸管免疫能低下との関連の解析」を行い、30,31年度を中心に「モデルマウスを用いた慢性炎症、細菌感染実験と防御免疫能の解析」、「モデル生物での腸管内脂質受容体群の発現変化と腸内代謝物の脂溶性メタボローム解析評価」をはじめすることで免疫機能改善の指標となる栄養、老化によって変化する腸内細菌の探索を行う。

①防御免疫機能の低下機構と腸内フローラとの相関に関する研究

: (木村・佐藤・赤津・丸山)

免疫老化関連遺伝子である Zizimin2 遺伝子の機能解析においては腹腔 B1-a 細胞における解析を中心に丸山が担当している。具体的には先行研究以来用いている免疫老化関連遺伝子欠損マウス(Ziz2、Ziz3 KO、さらには Ziz2,3DKO 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について継続的に検討する。佐藤は今回、これまで用いてきた PR8 は感染効率において安定性にかける知見が得られたことから、よりマウス感染に最適化されたインフルエンザウイルス、A/California/7/2009 (H1N1) pdm 株を用いて、若齢・老齢マウスに感染させる。

②ウイルス、細菌感染あるいは炎症時に見られる腸内フローラや免疫応答の変化

：(佐藤・丸山)

感染前、感染後42日目にそれぞれのマウスから血清を調製し、そこに含まれる total IgG と抗原 (HA) 特異的 IgG 量を測定した。また、感染前、感染後7, 10, 14, 28 日後における糞便を採取し、そこに含まれる total IgA と HA 特異的 IgA 量を測定すると共に、次世代シーケンサーを用いた 16S rRNA 解析を行い、それぞれのマウス群における腸内細菌叢の変動を解析する。

③加齢に伴う栄養摂取を介した恒常性維持への免疫・代謝機能変化とその評価モデル系の開発

：(赤木・木村・丸山)

赤木は NF-KappaB のショウジョウバエ相同遺伝子である Relish の変異株 (RelE20) における腸内フローラの加齢変化についての研究を開始する。一方で木村を中心にして近年、食物繊維等の食事由来多糖類の腸内細菌主要代謝産物である短鎖脂肪酸や、食事由来の長鎖脂肪酸である $\omega$ 6 脂肪酸、 $\omega$ 3 脂肪酸等の腸内代謝脂肪酸が、各種脂肪酸受容体群を介し、腸管免疫系に深く関与することで宿主側の恒常性維持機構に多大な影響を与えることが明らかになりつつある。この中で、加齢に伴う栄養摂取を介した恒常性維持への免疫・代謝機能変化の影響もまた、これら各種脂肪酸受容体群の関与が予想される。そこで、加齢に伴う栄養利用変化および腸内細菌叢変化からの腸管代謝変化に着目し、加齢マウスと若齢マウスを用い、腸管での各種脂質受容体群の発現変化比較および腸内代謝物の脂溶性メタボローム解析比較を行い、変動が見られる脂質、特に脂肪酸代謝物や宿主側脂肪酸受容体群の特定を試みる。

一方、腸管免疫系における加齢変化の解析については、先行研究として若齢マウス、老齢マウスの各グループから糞便を採取し、これまで T-RFLP 法、16S rRNA クローンライブラリー法を用いて共生細菌群のプロファイリングを行ってきた。本研究課題においては、より網羅的で安定した結果が期待できる次世代シーケンサーを用いた解析系の立ち上げを一刻も早く行い、複数施設で飼育した若齢マウス、老齢マウス糞便からのゲノムサンプリングを行う。

研究協力者として 29 年度は研究開発費研究員の坂本に加え、研究生として 29 年度は共同研究として実験動物を用いたプロバイオティクス介入による高齢者の免疫機能賦活の可能性についての腸管免疫系解析に関して KIRIN 株式会社(森田)が一部参加した。

(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ていない。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、的確に管理されたもとで実施した。具体的には実験動物の使用、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、また、遺伝子改変動物の扱いについてはカルタヘナ条約を遵守した適切な拡散防止措置も施した上で、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。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 (ノロウイルス、あるいはインフルエンザウイルス) 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、ならびに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。また本

研究はいくつかの遺伝子組み換え 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した。

## C. 研究結果

### ① 防御免疫機能の低下機構と腸内フローラとの相関に関する研究

この株は老齢マウスにおいて感染 10 日後をピークとして体重減少が認められ、それに伴う振戦も認められた。老齢マウスでも感染後に死亡しない感染量を求めた。結果、15 ヶ月齢の C57BL/6J を用いて検討し、老齢マウスでは  $1.0 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/mL、 $5.0 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/mL の 2-dose で感染をさせることとした。

### ② ウイルス、細菌感染あるいは炎症時に見られる腸内フローラや免疫応答の変化

若齢マウスとして 8 週齢（4 週間老齢マウスと同一施設で飼育）、老齢マウスとして 16 か月齢のものを用いて、感染を実施した。体重変化を見ると、予備実験の時とは多少異なるが、感染後 10 日をピークに、若齢、老齢マウスで共に顕著な体重減少を認め、その後回復傾向を見せた。

### ③ 加齢に伴う栄養摂取を介した恒常性維持への免疫・代謝機能変化とその評価モデル系の開発

これら脂肪酸代謝物群に対し、ハイスループットスクリーニングによる各種脂肪酸受容体群に対する親和性評価と *in vitro* による免疫系機能への影響の検討を行う。具体的に今年度は加齢マウスと若齢マウスを用いた腸管での各種脂質受容体群の発現比較の結果、加齢に伴い短鎖脂肪酸受容体 GPR41, GPR43, Olfr78 共に特徴的な変動がみられることを確認した。今年度はさらに多価不飽和脂肪酸受容体 GPR120 の加齢による発現変化を調べるために、定量 RT-PCR を行った。

加齢マウスと若齢マウスで脂肪蓄積に関与する白色脂肪組織での発現量に大きな変化はみられなかったが、加齢マウスの褐色脂肪組織においては腸管内分泌細胞に発現する多価不飽和脂肪酸受容体 GPR120 の発現量が有意に減少する事を見いだした。このことは、加齢マウスでは GPR120 を介した褐色脂肪細胞における熱産生量が減少している可能性が考えられ、それに伴い代謝機能が低下している事が予想される。また、下垂体においても GPR120 の発現が加齢マウスにおいて半減していることから、加齢に伴った GPR120 - 食事性脂質を介した下垂体ホルモン分泌に何らかの影響を与えていることが予想された。丸山が NCGG 動物実験施設棟内で飼育されている加齢育成動物（老齢群 20~25 ヶ月齢と若齢群 6 週齢とともに雌 6 個体）より採糞し、腸内細菌叢の変化の解析において指標の一つとされるそれらの代謝産物である短鎖脂肪酸の解析を木村とともにガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC/MS) を用いて解析した。今、現在 C57BL/6 における糞便中の短鎖脂肪酸の加齢変化として得られている結果は大変興味深いことに酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸においては有意に、またここで解析したそれ以外のイソ酪酸やイソ吉草酸においても加齢個体の方が多くなる、つまり加齢とともに糞便中に含まれる短鎖脂肪酸の量は増える傾向が明らかになった。一般的には短鎖脂肪酸の多い方が炎症抑制や代謝機能といった生理機能としては良い方向を示すことが知られているが、加齢による変化としては短鎖脂肪酸における変化は腸内細菌叢の変化に繋がっている可能性が極めて高く、今後の腸内フローラ解析の結果が期待される。

## D. 考察と結論

本研究は「老化の機構に関する研究」のみならず、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。研究開始初年度ですでに加齢に伴い、多価不飽和脂肪酸受容体の発現が低下することが明らかにされ、GPR120 発現低下に伴い腸管ホルモン分泌が低下し、それが宿主の代謝機能低下や免疫系においてもマクロファージを介した脂肪組織慢性炎症の抑制に関わることの一因に繋がっている可能性が示唆された。一方で、近年、獲得免疫系、自然免疫系が巧みなバランスで働くことで生体を防御することが明らかになった粘膜・腸管免疫系（腸内フローラと感染症を含む各種疾患との関連性）が注目されている。すなわち、加齢に伴う免疫機能が低下する原因として、腸内フローラの変化を通じた腸管免疫系の免疫動態を客観的に評価することが注目されており、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に大いに期待される。いずれにせよ、本研究における腸内環境の変化に注目した感染症に対する免疫力賦活化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る。

## E. 健康危険情報

なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Sakamoto A, Matsuda T, Kawaguchi K, Takaoka A, Maruyama M. Involvement of Zizimin2/3 in the age-related defect of peritoneal B-1a cells as a source of anti-bacterial IgM. *Int Immunol*. 2017 Nov 1; 29(9): 431-438.
- 2) 丸山光生 特集：「老年医学を支える基礎老化研究」、*Geriatric Medicine 老年医学* Vol.55 (5):469-470, 2017
- 3) 坂本明彦、丸山光生 「細胞老化と個体老化」*病理と臨床* 36(2): 98-101, 2018

### 2. 学会発表

- 1) Yamakoshi K, Iida M, Kimura H, Kameyama A, Maruyama M.: Bmi-1 controls cancer cell motility and invasion through the glycosyltransferase C2GnT2. *Keystone Symposia*, 18 May, 2017, Yokohama, Japan

- 2) Maruyama M, Sakamoto A, Matsuda T, Matsui N, Takaoka A.: Concomitant deletion of Zizimin2/3 to mimic impaired protective immunity in aged mice. Gordon Research Conferences (Aging Biology of), July 11, 2017. Les Diablerets, Switzerland
- 3) Yamakoshi K, Iida M, Kimura H, Kameyama A, Maruyama M: Bmi-1 controls cancer cell motility and invasion through the glycosyltransferase C2GnT2. Gordon Research Conferences(Aging Biology of), July 11, 2017. Les Diablerets, Switzerland
- 4) Maruyama M, Jounai K, Sakamoto A, Morita Y, Kirisako T, Matsuda T, Fujiwara D.: A novel food constituent potentially mitigates inflammation in physiologically aged mice. IAGG 2017 World Congress. July 24, 2017. San Francisco, CA, USA
- 5) Akatsu H, Arai S, Tanaka T, Kamiya A, Arakawa K, Masaki Y, Tanaka H, Kanematsu T, Ohara H, Inoue K, Xia J-Z, Maruyama M: Investigation on the effect of aminolevulinic acid on intestinal environment of aging mice 39th ESPEN CONGRESS. Sep 10, 2017. Hague, Nederland
- 6) Maruyama M, Sakamoto A, Takaoka A: Zizimin2-deficient mice showing defective production of natural antibacterial immunoglobulin M and interruption in B-cell development 19th GCC. Sep 14, 2017. Venice, Italy
- 7) Muguruma K, Ogiso N, Tomita K, Takano S, Yamaguchi K, Matsui N, Maruyama M: Search for definitive senescence biomarkers in mice: What changes will occur in naturally-aged mice? 68<sup>th</sup> AALAS National Meeting, Oct 17, 2017. Austin, USA
- 8) Ogiso N, Muguruma K, Tomita K, Takano S, Tamura S, Tanii S, Maruyama M: Development of naturally-aged rats and elucidation of aging mechanism
- 9) Sakamoto A, Takaoka A, Maruyama M: Putative function of Zizimin2/3 in Immunosenescence of peritoneal B-1a cells as a source of natural antibacterial IgM KEYSTONE SYMPOSIA, Feb 27, 2018, Austin, TX, USA
- 10) Hayakawa T, Kimura Y, Nagasaki M, Nagata M, Morimoto R, Maruyama M, Motoyama N: p21 negatively regulates DNA damage-induced pro-inflammatory response during senescence. "Aging, Inflammation and Immunity", Keystone Symposia, Feb 27, 2018, Austin, TX, USA.
- 11) 三河隆太、鈴木洋平、丸山光生、佐藤 匡、杉本昌隆 : Clearance of senescent cells ameliorates emphysema-associated pathologies in mice 第30回日本老年学会・第40回日本基礎老化学会合同大会、2017年6月15日、名古屋
- 12) Yamakoshi K, Iida M, Kimura H, Kameyama A, Maruyama M: Bmi-1 controls cancer cell motility and invasion through the glycosyltransferase C2GnT2 第30回日本老年学会・第40回日本基礎老化学会合同大会、2017年6月15日、名古屋
- 13) 坂本明彦、松田剛典、高岡晃教、丸山光生 Involvement of Zizimin2 in the defective antibody production by aged peritoneal B-1a B cells、第30回日本老年学会・第40回日本基礎老化学会合同大会、2017年6月16日、名古屋
- 14) 城内健太、森田悠治、松田剛典、桐浴隆嘉、坂本明彦、藤原大介、丸山光生 : Effects of food constituents on immunosenescence in physiological aged mice 第30回日本老年学会・第40回日本基礎老化学会合同大会、2017年6月16日、名古屋

- 15) 丸山光生 基礎老化研究の最前線と健康長寿社会への取り組み 第13回加齢皮膚医学研究会, 2017年4月29日, 福島市
- 16) 長友涼介, 岡田泰毅, 筒井陽仁, 赤津裕康, 丸山光生, 井之上浩一 ピコリリアミン誘導体化 LC-MS/MS を用いた腸内細菌叢解析を目指した短鎖脂肪酸の網羅的分析法の開発 日本医用マススペクトル学会第42回年会 2017年9月15日 東京
- 17) Kawaguchi K, Sugiyama D, Maruyama M : The analysis of molecular mechanisms underlying inflammatory reactions in chronological skin aging 第40回日本分子生化学会年会 2017年12月5日 神戸
- 18) 川出義浩, 赤津裕康, 丸山光生, 大原弘隆: ペクチン含有濃厚消化態流動食 (ハイネーゲル®) の長期投与が栄養状態および消化管に及ぼす影響第33回日本静脈経腸栄養学会学術集会, 2018年2月22日, 横浜市
- 19) 岡田泰毅, 長友涼介, 赤津裕康, 丸山光生, 井之上浩一 Pattern analysis of branched-chain short-chain fatty acids by derivatized LC-MS/MS 誘導体化 LC-MS/MS 法によるマウス便中の分岐鎖短鎖脂肪酸のパターン解析 日本薬学会第138年会 2018年3月27日 金沢市

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

発明者: 森田悠治、城内健太、藤原大介、丸山光生

発明の名称: 乳酸菌を有効成分とする加齢による網膜細胞死を抑制するための組成物

出願日: 2016年9月9日

出願番号: 特願 2016-177056

出願人: 国立長寿医療研究センター、小岩井乳業株式会社、

キリン株式会社 R & D 本部健康技術研究所

発明者: 丸山光生、坂本明彦、森田悠治

名称: ラクトバシラス・パラカゼイ乳酸菌を有効成分とする加齢による身体活動量低下を抑制するための組成物

出願日: 2017年11月30日

出願人: 国立長寿医療研究センター、キリン株式会社 R & D 本部健康技術研究所

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし