長寿医療研究開発費　平成 25 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（24－8）

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

未曾有な長寿社会を目前にした我が国には例年、流行が懸念されるインフルエンザウイルスや近年冬期に多発するノロウイルスの集団感染、あるいはその 7 割は誤嚥が関与すると言われる肺炎等によって多くの高齢者が命の危険に曝されている。こうした、高齢者が患う感染症のリスクの軽減や予防には、老化に伴う免疫機能低下のしくみを明らかにすることが極めて重要な課題である。本研究のゴールは分子、細胞、あるいは動物個体レベルで免疫老化機構を制御しうる基盤分子情報を基礎的な研究成果として積み上げ、高齢者の生体防御能の賦活化という形で臨床研究につなげる**橋渡し研究**として成果を上げることである。具体的に、主任研究者として本研究では臨床研究への展開の方向性をさらに明確するために全体計画として感染症に対する免疫応答と栄養介入による免疫賦活化に課題を限局させている。その上で、本研究課題の研究期間内に免疫老化関連遺伝子の機能解析、免疫老化機構の脆弱化に関わる分子機能から得られた知見が感染症の罹患とどのように関わり、さらに栄養介入によってどのように改善されるのかという点について機能的連関を提案すること、そして臨床データを吟味したリスクの評価と予防、免疫老化レベルを俯瞰できる新たな指標の策定につなげることを目指している。なかでも腸管をはじめとする粘膜免疫の老齢化における変化については、一部の現象論的結果が報告されているのみで老化における腸内フローラの変化と粘膜免疫への影響等、その詳細に関しては全く解明されていない。それゆえ、これらはヒトで得られた知見の一つでも多くが動物実験によって、介入、検証される必要があることは明白であり、本研究でも腸内細菌叢と宿主との共生関係を中心に、粘膜免疫の老化と腸内恒常性の関係に着目する。本研究が担う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老化に伴う身体機能の脆弱化の中でも特に生体防御系の機能低下において、そのメカニズムを理解し、克服し、重篤化を予防する臨床応用を目指した基礎研究として健全な高齢化社会を築く上でも不可欠な研究である。

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
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
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

本研究は分子、細胞、あるいは動物個体レベルで免疫老化機構を制御する基盤分子情報を基礎的な研究を通して成果を積み上げ、低下する高齢者の生体防御能の賦活化させる臨床研究につなぐ橋渡し研究としての成果を目指している。主任研究者はこれまでの先行研究から免疫系の加齢変化に特異的な細胞集団や遺伝子発現、機能タンパクに注目し、そうした変化が生体防御系にどのような機能を与えるのか検討してきた。本研究では臨床研究への展開の方向性をさらに明確するために全体計画として感染症に対する免疫応答と栄養介入による免疫賦活化に課題を中心に解析をはじめた。３年間と考えて開始した研究期間内に免疫老化関連遺伝子の機能解析、免疫老化機構の脆弱化に関わる分子機能から得られた知見が感染症の罹患とどのように関わり、さらに栄養介入によってどのように改善されるのかという点を明らかにすること、そして臨床データを吟味したリスクの評価と予防、免疫老化レベルを俯瞰できる新たな指標の策定につなげることを達成可能な目的と考えていたが、研究開始後２年間で終了課題となったことは大変残念に考えている。この間、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、「感染症を指標にした個体老化の分子的研究」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行った。今後は新たな研究課題において、より出口戦略の明確な研究の柱を設定し、集約した研究テーマで結果として高齢者を中心とした栄養管理、栄養介入時によって高齢者の免疫機能改善、感染防御の方策の検討を目指したい。

Ｂ．研究方法

昨年からの継続研究項目として Ziz2 遺伝子欠損マウス（Ziz2KO）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検討を続けた。Ziz2 は、Ｔ細胞依存的抗原刺激後のマウス脾臓胚中心成熟Ｂリンパ球を含む免疫系の組織や細胞に特異的に発現し、また加齢に伴いその発現が低下する免疫老化関連新規グアニンヌクレオチド交換因子(GEF)である。同じく免疫系に発現する Zizimin3（Ziz3）を含めこれら Zizimin ファミリーが免疫老化にどのように関わっているのか Ziz2 ならびに Ziz3 遺伝子欠損マウス(Ziz2、Ziz3KO あるいは Ziz2/3DKO マウス)を用い、*in vivo* における機能解析を中心に基礎的な検証を始めている。具体的には、自然免疫系における免疫応答として、インフルエンザウイルス感染、LPS を用いた敗血症モデル実験等の解析している。平成 25 年度は獲得免疫応答の解析において辺縁帯Ｂ細胞を標的としたＴ細胞非依存的な抗原に対する免疫応答において、Ziz2KO と野生型マウスと比較する方法で解析を進めた。

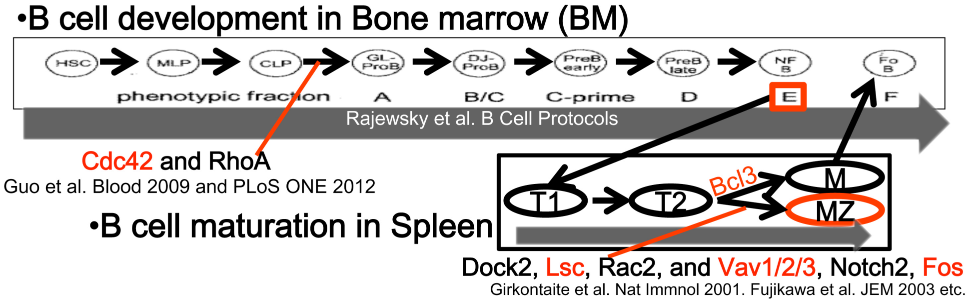
研究協力者として 25 年度は流動研究員の松田に加え、研究生として昨年度からの継続研究である実験動物を用いたプロバイオティクス栄養介入による高齢者の免疫機能賦活化の可能性についてその解析に関して芦田が一部参加した。

（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、的確に管理した。さらに一部、インフルエンザウイルスを用いる感染実験については NCGG 感染実験安全委員会に加え、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、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。

C．研究結果

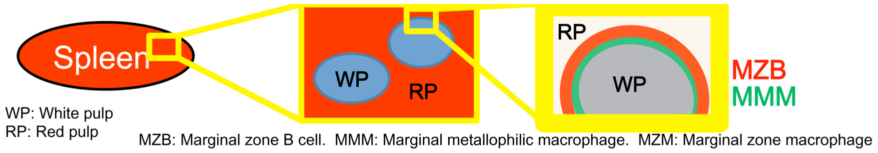
今年度 Ziz2 や Ziz3 との関連を解析した辺縁帯Ｂ細胞は、他のＢ細胞と同様に骨髄由来造血幹細胞に由来する。一般的にＢリンパ球は骨髄で形成された未熟なＢ細胞として、脾臓へ移動し、そこで成熟したＢ細胞や辺縁帯Ｂ細胞に分化するとされる(図１)。辺縁帯Ｂ細胞は、他のＢ細胞とは異なり、微生物等に対する抗体を独自の受容体を経由して産生し、感染症への罹患を防ぐことが知られており、加齢という観点からは辺縁帯構成細胞の減少と組織構造的な変化に因り、高齢者の肺炎球菌等への罹患率が上



(図 1)骨髄、脾臓における B 細胞の分化と関わる機能分子

昇するのではないかと考えられている。また、辺縁帯Ｂ細胞の脾臓組織内における白脾と呼ばれるＴ細胞やＢ細胞が集まった領域の端にマクロファージなどと共に存在している(図 2)。こうした加齢に伴った辺縁帯Ｂ細胞や骨髄 B 細胞の形成不全ならびに

(図２)脾臓組織内における辺縁帯 B 細胞の分布領域の模式図



免疫老化において、Ziz2 ファミリーが関与するという仮

説を立て、Ziz2KO、Ziz3KO マウスを用いた検証を進めた。それぞれの KO マウスでは野生型との比較で骨髄細胞や脾臓細胞の数に有意な変化は認められなかったので、Ziz2 あるいは 3KO マウスの骨髄、或いは脾臓から細胞を調製し、フローサイトメトリーを用いて各分化段階にある B 細胞の割合を解析したところ、骨髄の未熟Ｂ細胞（Fr.E）の割合が Ziz2KO マウスで減少していた。さら成熟 B 細胞における変化を脾臓内で解析した結果、Ziz2KO マウスにおいて成熟した濾胞Ｂ細胞の割合が上昇し、一方で、もう一方の成熟Ｂ細胞である辺縁帯Ｂ細胞の割合、Ziz2KO が減少している事が明らかになった。
さらに辺縁帯Ｂ細胞の減少を組織学的に確認する目的で、Ziz2KO マウスから脾臓を採取し、マクロファージとＢ細胞に対する組織染色を行った結果、辺縁帯Ｂ細胞が存在する領域の長さが遺伝子欠失マウスで短くなっていることが判明した。
これらの傾向(辺縁帯 B 細胞の割合と組織染色による辺縁帯 B 細胞が存在する領域)については Ziz2 同様､免疫担当細胞で発現のある Ziz3KO マウスでも同じような傾向が見られた。

Ｄ．考察と結論

Ziz2KO マウスを解析したところ、骨髄由来の未成熟なＢ細胞であるＥ画分が減少していたことは骨髄におけるＢ細胞の数は加齢に伴って減少する事と言う報告（Guo et al. Blood 2009 and PLoS ONE 2012、Girkontaite et al. Nat Immnol 2001. Fujikawa et al. JEM 2003 etc.）もあることから免疫老化関連遺伝子としての Ziz2 遺伝子機能を示唆するものと考えられる。また、Ziz2KO マウスでは、成熟した濾胞Ｂ細胞が増加し、辺縁帯Ｂ細胞が減少していたと言う結果からは辺縁帯Ｂ細胞数は加齢に伴って減少する事と言う報告（Shirin Z et.al, J Immunol. 2011）とも考え合わせると、その傾向は同じく Ziz3KO マウスでも見られたということは、Ziz2､3 が脾臓におけるＢ細胞の成熟過程に関与している可能性のみならず、辺縁帯Ｂ細胞の形成に関与するという可能性も考察できる。また、予備的な実験として辺縁帯Ｂ細胞を標的とした抗原(TNP-LPS)での Ziz2KO マウスを刺激したところ、抗原特異的な抗体産生能力に変化が見られたと言う結果を得た。こうした現象についてはこれまでに明らかにされてきている B 細胞の活性化シグナル経路についても Ziz ファミリーが何らかの関与しているではないかと示唆しており、今後はそれらのシグナル経路を調べ、Ziz2 とＢ細胞の形成ならびに免疫応答との関係を明らかにし、Ziz ファミリーとして関与する免疫老化のメカニズムを明らかにしていきたい。

Ｅ．健康危険情報

なし

Ｆ．研究発表

１．論文発表

1) Akatsu H, Iwabuchi N, Xiao J, Matsuyama Z, Kurihara R, Okuda K, Yamamoto T, **Maruyama M**: Clinical effects of probiotic *Bifidobacterium longum* BB536 on immune function and intestinal microbiota in elderly patients

receiving enteral tube feeding. ***JPEN J Parenter Enteral Nutr.*** 37(5): 631-640, 2013

2) Akatsu H, Arakawa K, Yamamoto T, Kanematsu T, Matsukawa N, Ohara H, **Maruyama M**: Lactobacillus in jelly enhances the effect of influenza vaccination in elderly individuals. ***J Am Geriatr Soc***. 61(10):1828-1830, 2013

3) Taniguchi K, Takii T, Yamamoto S, Maeyama JI, Iho S, **Maruyama M**, Iizuka N, Ozeki Y, Matsumoto S, Hasegawa T, Miyatake Y, Itoh S, Onozaki K: Reactivation of immune responses against Mycobacterium tuberculosis byboosting with the CpG oligomer in aged mice primarily vaccinated with Mycobacterium bovis BCG. ***Immun Ageing***, (1):25, 2013

4) Age-associated decline in the immune system
Maruyama M: ***Nihon Rinsho. review*** 71(6): 993-998, 2013.

２．学会発表

1) Takii T, Taniguchi K, Yamamoto S, Maeyama J, Iho S, **Maruyama M**, Iizuka N, Ozeki Y, Matsumoto S, Itoh S, Onozaki K: Boosting effect of Oligo-B in super aged mice primarily vaccinated with Mycobacterium bovis BCG on the protection activity against Mycobacterium tuberculosis infection
Front Range Mycobacteria Conference 2013, Jun. 21, 2013, Colorado, USA.

2) Ashida K, Ogawa S, Hayakawa T, Matsuda T, Yamaji T, Takahashi T, Akatsu H, **Maruyama M**: The effect of an enteral formula containing prebioticson intestinal environmentsin aged F344 rats, The 20th IAGG World Congress of Gerontology and Geriatrics, Jun 26, 2013, Seoul, Korea

3) **Maruyama M**, Matsuda T, Hayakawa T, Takaoka A: Putative physiological function of a novel GEF, Zizimin family in immunosenescence., Gordon Research Conferences Aging, Biology of, Lucca, Aug. 13 and 15, 2013, Pisa, Italy

4) Miyazaki T, Nakagawa H, Hosoya T, Moriya T, Sakai F, Nakayama Y, **Maruyama M**: Identification of the critical genes to regulate life span and senescence, Gordon Research Conferences Aging, Biology of, Lucca, Aug. 13 and 15, 2013, Pisa, Italy

5) Matsuda T, Oguri S, Hayakawa T, **Maruyama M**: The Functional Analysis of Zizimin Family Genes in Immune Responses and Immunological Aging. 15th International Congress of Immunology (Satellite Meeting 3. Aging and the Immune System). Aug. 20 and 21, 2013. Milan, Italy.

6) Akatsu H, Kanematsu T, Arakawa K, Yamamoto T, Matsukawa N, Kurihara R, Ohara H, **Maruyama M**: Interventional trial to enhance effect of Influenza vaccination in eldery with jelly. The 35th ESPEN Congress on Clinical Nutrition &

Metabolism, Sep. 1, 2013, Leipzig, Germany.

7) **Maruyama M**: Putative role of Zizimin family genes in immune responses and immunosenescence, 2013 Mini-symposium on Mitochondria and Aging, Oct. 19, 2013, New Taipei, Taiwan.

8) **Maruyama M**: Putative role of cellular senescence related gene, TARSH/ Abi3bp in lung cancer.
Asian Association of Aging Research (AAAR2013), Nov. 9, 2013, Seoul, Korea.

9) 原田種展、松田剛典、杉本昌隆、寺内邦彦、島田順一、**丸山光生**:
老化関連因子TARSHの細胞老化と癌抑制に関する機能解析
第36回日本基礎老化学会　2013年6月5日　大阪

10) 松田剛典、小栗沙織、早川朋子、**丸山光生**:
免疫老化におけるZiziminファミリーの機能解析
第36回日本基礎老化学会　2013年6月6日　大阪

11) 山越貴水、片野諭、木村広美、**丸山光生**、van Louizen M:
加齢過程での顎下線組織機能低下における$p16^{Ink4a}$の役割
第65回日本細胞生物学会大会　2013年6月21日　名古屋

12) **丸山光生**:
高齢者サルコペニアの栄養管理基礎と臨床　遺伝子発現からみる老齢実験動物を用いた栄養介入の効果について 第55回日本老年学会学術集会　2013年6月4日　大阪

13) 原田種展、松田剛典、下村雅律、寺内邦彦、島田順一、杉本昌隆、**丸山光生**:
細胞老化関連分子TARSHの肺癌における機能解析
第36回日本分子生物学会　2013年12月４日　神戸

14) Naoe Y, Naito T, Tenno M, **Maruyama M**, Koseki H, Taniuchi I:
Cxxc5, ThPOK target gene, suppresses $CD4^+$ helper T cell functions during $CD8^+$ cytotoxic T differentiation, The 42nd Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, Dec.11. 2013, Chiba.

15) Matsuda T, Harada T, Takaoka A, **Maruyama M**:
The Functional Analysis of Zizimin Family Genes in the Immune Response
The 42nd Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, Dec.12. 2013, Chiba.

16) 赤津裕康、下野智弘、山本孝之、大原弘隆、**丸山光生**:
乳酸菌（殺菌）配合ゼリー摂取が高齢者のインフルエンザワクチン接種に及ぼす影響
日本静脈経腸栄養学会　2014年2月28日　横浜

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