

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11011

研究課題名（和文）加齢ならびに栄養代謝時に生じる酸化ストレス障害の蓄積が免疫老化に及ぼす影響の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the effect of the oxidation stress on immunosenescence, exerting from nutritional metabolism or aging

研究代表者

石川 祐子 (ISHIKAWA, Yuko)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・ユニット長

研究者番号：40353940

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、摂取カロリーの過多あるいは栄養源のバランスを欠いた状態等由来する食餌性酸化ストレス、あるいは、加齢等により生体内に蓄積される酸化ストレスが免疫老化に与える影響を明らかにし、免疫老化の抑制や、免疫機能の回復を可能とする栄養条件の確立を目的とした。食餌性酸化ストレスモデルとして高脂肪食および高スクロース食を用い、これらの食餌が免疫応答の変化に与える影響と加齢により低下する免疫応答性の作用機序に共通する変化を検討した。また、抗酸化性の高い食餌の摂取により生体内酸化ストレスを低減することで、免疫応答性の回復が図れる可能性についても明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国における高齢者の死亡要因の上位にある肺炎・感染症などの疾病は、免疫機能の低下に起因するところが大きい。健康寿命の延伸には高齢者における免疫機能の回復・向上が極めて重要である。T細胞のエフェクター機能発現には酸素呼吸によりエネルギーを生産する電子伝達系から生じるROSや解糖系の活性化が必要であるが、それに伴う最終糖化産物や酸化ストレス傷害の蓄積が免疫老化の主要因であると推測した。そこで、加齢に伴う免疫老化と栄養代謝に伴う酸化ストレス由来の慢性炎症を介した免疫機能低下に共通するメカニズムを明らかにし、栄養摂取のコントロールにより免疫老化を抑制、回復しうる可能性を検討した。

研究成果の概要（英文）：Immuno-senescence which shows lowering immune responses on elderly person, is thought to bring on infectious disease. The major cause of immuno-senescence is accumulation of oxidative stress inside a living body from aging. We formulate a hypothesis that the similar mechanism of oxidative stress accumulation between aging and over-nutrition. The aims of this research are, 1. clarification of the common mechanism brought immuno-senescence of aging and over-nutrition. 2. establishment the nutritional proposal to reduce the oxidative stress which is able to recover the immune responses.

The influence of aging and over-nutrition from high-fat/sucrose diet on immune responses are examined by antigen specific production of cytokine, antibody, and cell-proliferation on splenocyte, anaphylactic dermal reaction, and fecal IgA concentration. Several indices changed by aging or over-nutrition. And consumption of high antioxidant food shows to recover the immune deficiency by aging.

研究分野：食品免疫学

キーワード：免疫老化 生体内酸化ストレス 終末糖化産物 栄養過剰

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 我が国における高齢者の死亡要因の上位にある肺炎・感染症などの疾病は、免疫機能の低下に起因するところが大きいため、健康寿命の延伸には高齢者における免疫機能の回復・向上が極めて重要と考えられる。「免疫老化」と呼ばれる高齢者の免疫機能低下は、加齢に伴う胸腺の退縮によって新しい T 細胞の供給が減少し、老化関連 T 細胞 (Senescence-related T cells: Tsen) が蓄積することで誘導されるとされている (Shimatani et al. 2009)。一方で、近年酸化ストレス等が慢性炎症の誘導を介して生活習慣病を誘発すること (Kellow et al. 2015) が示され、過剰な活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) が T 細胞の機能を損なう (Di Mitri et al. 2011) など、生体内酸化ストレスと T 細胞活性低下との関連を示唆する報告も増えている。

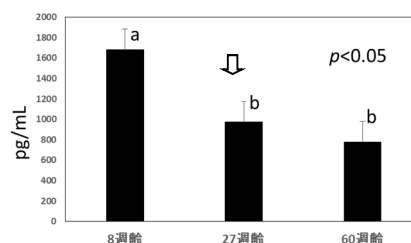


図1 加齢による抗原特異的サイトカイン産生の減少

(2) 応募者らはマウスにおいて、Tsen 細胞の出現に先立ち、抗原特異的に産生される T 細胞由来サイトカインに産生の減少が認められることを *ex vivo* 培養系で確認しており (未公表、図 1) 免疫老化は Tsen 細胞の出現より早い時期に始まると考えられた。また、現在のところ、栄養状態と免疫老化の関連を示す知見はほとんど存在しないが、近年、T 細胞のエフェクター機能発現には酸素呼吸によりエネルギーを生産する電子伝達系から生じる ROS (Sena et al. 2013) に加え、それに続く解糖系の活性化による物質生産が必須であること (Chang et al. 2013) が明らかとなった。解糖系は、その活性化に伴い酸化ストレス源となる最終糖化産物 (AGEs) が生じることから、解糖系活性化のたびに免疫系に酸化ストレス傷害が発生すると考え、この蓄積により細胞機能が徐々に損なわれることが免疫老化の主要因であると推測した。さらに、これらのストレス障害は栄養代謝に伴って生じることから、加齢に伴う免疫老化と酸化ストレスに由来する慢性炎症を介した免疫機能低下には共通のメカニズムが存在し、免疫老化は摂取する栄養の量やバランスをコントロールすることによって抑制、回復しうるのではないかと着想した。

## 2. 研究の目的

本研究では、「加齢による Tsen 細胞の出現前に、生体内酸化ストレスによる免疫老化は始まっており、そのストレスはエネルギー代謝に由来する」、すなわちエネルギー代謝の過程で生じる解糖系由来の酸化ストレス、特に栄養的なアンバランスに起因する酸化ストレス障害の蓄積が免疫老化を誘導するという仮説に基づき、モデル動物を用いて、加齢、あるいは栄養状態の異なる個体を比較解析し、免疫老化の原因や進展機序の解明に取り組む。そのため、卵白アルブミン (OVA) に特異的な T 細胞レセプターを発現する DO11.10 マウスを用い、老齢および栄養過剰状態による食餌性酸化ストレスを付与し、その類似性について検証する。本マウス系統は BALB/c 由来であり、肥満モデルとして使用される C57BL/6 などと比較すると、肥満しにくく脂肪組織での炎症が起きにくいことから、栄養を過剰に与えても脂肪組織を介した間接的影響が少なく、栄養状態が免疫系に及ぼす直接的な影響を観察しやすい。さらに、未感作状態においても OVA 特異的に応答する T 細胞を発現しているため、免疫増強剤や抗原感作を用いることなく、未感作免疫細胞の抗原特異的応答を観察できるという点においても優位性を持つ。

上記マウスを用い、加齢ならびに栄養摂取のアンバランスが生体内酸化ストレスに与える影響を明らかにしこれらの類似性について検証することにより、炭水化物、タンパク質、脂質等の

主要栄養素を中心とする栄養摂取の適正化、生体内酸化ストレスの低減による免疫老化の軽減を目指す。

### 3. 研究の方法

そこで、本研究では栄養摂取のバランスを欠く食餌性酸化ストレス、あるいは加齢等により生体内に蓄積される酸化ストレスが免疫老化に与える影響を検討するために、以下の方法を用いる。

(1) 加齢による酸化ストレスがマウスの免疫応答性に与える影響と栄養過剰状態における免疫応答性との比較

卵白アルブミン(OVA)に特異的なT細胞を発現するトランスジェニックマウス (DO11.10)を用い、週齢の違いによる免疫応答性を検討し、加齢による影響を検討する。また、食品の三大栄養素のうち脂質および炭水化物が過多となる食餌を投与することで、摂取カロリーが高く、またその摂取源に偏りが発生している栄養的にアンバランスな状態のモデルを作成し、加齢マウスとの免疫応答性の比較を行う。

#### 加齢に伴う免疫応答性への影響

マウスにおいて、加齢による免疫応答性の低下は、一般に“老化”マウスとされる時期よりかなり早い段階から認められる。そこで、加齢に伴う抗原特異的免疫応答として、全身性の免疫状態を代表する脾臓細胞を調整し、未感作状態における免疫担当細胞の抗原特異的免疫応答性(脾臓細胞の増殖活性、サイトカイン、抗体産生量)をELISA法などにより検討する。また、この応答性の低下について、週齢の異なるDO11.10マウスにOVAを経口感作したときの皮膚アナフィラキシー反応という表現系としても認められるかについても検証する。さらに、課題担当者らが開発した、加齢に伴い変動することが確認されている新たな免疫老化指標を用い、本指標の動物モデルにおける検証を行う。

#### アンバランスな栄養状態のモデルにおける免疫応答性の評価

脂質由来の高カロリー食餌(High fat diet :HFD)として、高脂肪食 60kcal%ラードを含む餌(D12492:リサーチダイエツト社)およびそのコントロール食(D12450J:同、7kcal%)、炭水化物由来の高カロリー食餌としては(High sucrose diet :HSD)、高スクロース食(D07042201 70Kcal%:同)およびそのコントロール食を摂取させることにより、アンバランスな栄養状態モデルの作成を行い、それぞれの食餌が免疫応答性に与える影響についてと同様に評価する。具体的にはNMF粗飼料(オリエンタル酵母)で飼育した15~17週齢のDO11.10マウスに上記試料を摂取させ、摂餌量、飲水量、体重のモニタリングを行う。投与期間終了後に解剖、全身性免疫担当細胞である脾臓細胞を調製し、ex vivoでの抗原特異的免疫応答性を評価する。

(2) 抗酸化物質の摂取が免疫応答性に与える影響の解析

酸化ストレスの蓄積が免疫老化を引き起こすという仮説に基づき、抗酸化能の高い食餌により生体内酸化ストレスの低減をはかり、免疫老化を抑制しうる可能性についての検討を行う。抗酸化物質を豊富に含有する農産物として親水性酸素ラジカル吸収能(H-ORAC値)の高いイチゴを選び、イチゴの凍結乾燥粉末を混餌した試料を摂取させた際に、加齢により低下する免疫応答性への影響を確認する。具体的には、通常餌(AIN-93G精製飼料)およびイチゴの凍結乾燥粉末を4%(W/W)混餌した試料(AIN-93Gベース、コーンスターチとの置き換え)を18週齢のDO11.10マウスに12週間投与し、摂餌量、飲水量、体重のモニタリングを行う。投与終了後に解剖し、全身性免疫担当細胞として脾臓細胞を調製しex vivoでの抗原特異的免疫応答性を評価

する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 加齢による酸化ストレスがマウスの免疫応答性に与える影響と栄養過剰状態における免疫応答性との比較

###### 加齢マウスにおける免疫応答性の評価

全身性の免疫に係る脾臓細胞の抗原特異的応答性については、27週齢の段階で既に加齢による低下が認められることが確認されていた(図1)ことから、それに加え、アレルギーモデルとして用いられる皮膚アナフィラキシー反応性への影響も合わせて検討することとした。その結果、40週齢のマウスでは20週齢よりもアナフィラキシー反応による血管透過性の亢進(血漿漏出量として評価)が低下する傾向にあり(図2)加齢による免疫応答性が表現系としても認められることを明らかにした。また、加齢に伴い変化する免疫指標として、糞便中のIgA抗体の量が利用できる可能性についても検討を行い、図1に示した脾臓細胞の抗原特異的応答性と同様に、16週齢から28週齢という12週間でIgA量が減少することを確認した(図3)。この結果より、加齢に伴う免疫応答性の低下(免疫老化)を非侵襲で評価しうる可能性を明らかにした。

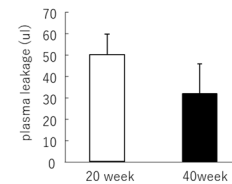


図2 マウスの週齢が皮膚アナフィラキシー反応に与える影響

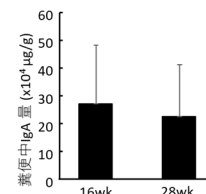


図3 加齢に伴う糞便中IgA量の変化(16週齢から28週齢)

###### アンバランスな栄養状態のモデルにおける免疫応答性の評価

アンバランスな栄養状態のモデルとして脂質過多の高脂肪食(HFD)および炭水化物(スクロース)過多の高スクロース食(HSD)を用い、高脂肪食の摂取が免疫応答性に与える影響を検討するために、15週齢前後のマウスを用い投与試験を行った。

###### - 1 高脂肪食投与が免疫応答性に与える影響の評価

一般に、加齢に伴い抗原特異的な免疫応答性は低下するとされているが、栄養バランスを欠いた食餌として、高脂肪食(HFD)を投与した。HFD投与群の体重はコントロールに比べ、やや増加し、アンバランスな栄養状態であると想定されたが、脾臓細胞の抗原特異的サイトカイン・抗体産生・増殖活性に対する影響を検討したところ、サイトカインや増殖にはほとんど変化は認められなかったが、一部の抗体産生が低下の傾向にあった。高脂肪食投与による生体内酸化ストレスの蓄積は免疫老化に影響を与える可能性が示唆された。

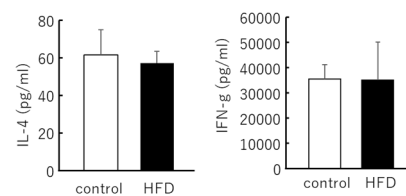


図4 高脂肪食摂取がサイトカイン産生に与える影響

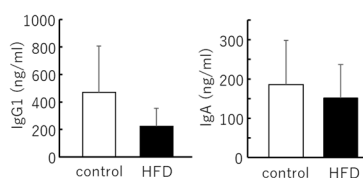


図5 高脂肪食摂取が抗体産生に与える影響

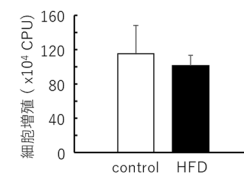


図6 高脂肪食摂取が抗原特異的増殖活性に与える影響

###### - 2 高スクロース食投与が免疫応答性に与える影響の評価

高スクロース食の投与では、抗原特異的な抗体産生量、サイトカイン産生量、細胞増殖活性のいずれも、コントロールに比べ応答性が有意に高い、もしくは高い傾向が認められた。特に、サイトカイン産生等においては、細胞性免疫を誘導する Th1 型偏位の傾向が見受けられ、栄養過剰によるストレスは栄養源によって異なる作用を示す可能性が示唆された。また、加齢マウスで見られたような、皮膚アナフィラキシー反応の低下も認められず、高スクロース食は高脂肪食に比べ、免疫系に与える影響は高くないと想定された。

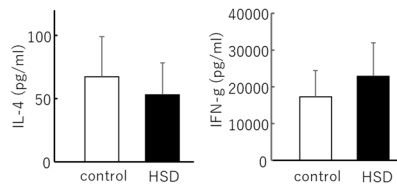


図7 高スクロース食摂取がサイトカイン産生に与える影響

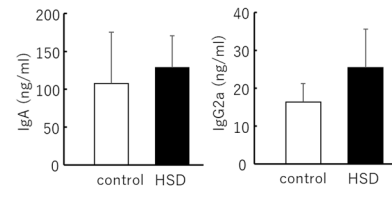


図8 高スクロース食摂取が抗体産生に与える影響

## (2) 抗酸化物質の摂取が免疫応答性に与える影響の解析

酸化ストレスが免疫応答性を減弱させる可能性が示唆されたことから、生体内酸化ストレスを低減することにより、免疫老化の抑制をはかれると考え、その検証のため、体外から抗酸化物質を摂取させて、免疫応答を評価することとした。抗酸化能の高い食品の選択を行うため、課題担当者らが妥当性確認を行った酸素ラジカル吸収能 (ORAC) 評価法 (Watanabe et. Al. 2012) をもちいて、親水性 ORAC 値の高いイチゴを選び、凍結乾燥粉末 (382.5 μmol TE/g 乾燥重) を混餌した食餌を摂取させた際に、加齢により低下する免疫応答性への影響を確認した。全身性免疫担当細胞である脾臓細胞の抗原特異的免疫応答性については、これまでの結果から加齢に伴い低下することが認められていたが、抗酸化能の高い飼料の投与により、抗原特異的な IgG1、IgA 抗体の産生量や IL-2、IFN-γ 等のサイトカイン産生量、脾臓細胞増殖活性のいずれにおいても免疫応答性の回復傾向が認められた。

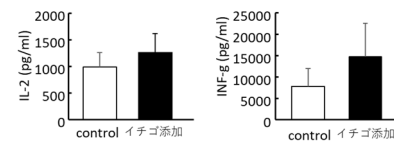


図9 抗酸化能の高い食材 (イチゴ) 摂取が加齢マウスのサイトカイン産生に与える影響

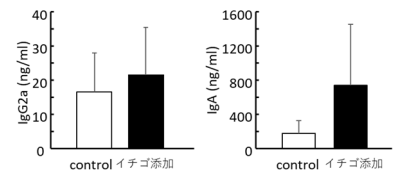


図10 抗酸化能の高い食材 (イチゴ) 摂取が加齢マウスの抗体産生に与える影響

### <引用文献>

- 1) K. Shimatani, et.al. PD-1+ memory phenotype CD4+ T cells expressing C/EBPalpha underlie T cell immunodepression in senescence and leukemia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106(37), 15807-15812 (2009)
- 2) N.J. Kellow and M. T. Coughlan, Affiliations expand Effect of diet-derived advanced glycation end products on inflammation. Nutr. Rev., 73(11), 737-59 (2015)
- 3) D. D. Mitri, Reversible senescence in human CD4+CD45RA+CD27- memory T cells. J. Immunol., 187 (5), 2093-2100 (2011)
- 4) L. A. Sena et al. Mitochondria are required for antigen-specific T Cell activation through Reactive Oxygen Species signaling. Immunity, 38(2), 225-236 (2013)
- 6) C. H. Chang et al., Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. Cell, 153(6), 1239-1251 (2013)
- 7) J. Watanabe et. al., Method validation by interlaboratory studies of improved hydrophilic oxygen radical absorbance capacity methods for the determination of antioxidant capacities of antioxidant solutions and food extracts. Anal. Sci., 28(2), 159-165, (2012)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	後藤 真生  (GOTO Masao)  (30302590)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・上級研究員    (82111)	
研究分担者	若木 学  (WAKAGI Manabu)  (50710878)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・主任研究員    (82111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関