

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15188

研究課題名（和文）老化細胞マーカーp16INK4aによる腸管免疫および腸内フローラの老化機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the role of p16INK4a in aging process of gut immune system and microbiota

研究代表者

河本 新平（Kawamoto, Shimpei）

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：40612081

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：我々の腸管内腔には莫大な数と種類の細菌によって構成される腸内フローラが形成されている。以前より、加齢に伴って腸内フローラのバランスに乱れが生じることが知られていたものの、その発生機序は明らかとなっていなかった。本研究により、加齢に伴いT細胞もしくはB細胞においてp16INK4aの発現が増加することにより、パイエル板の免疫グロブリンAの産生機構に変化が生じ、腸内フローラのバランスの乱れにつながる事が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通して、加齢に伴う腸内フローラのバランスの乱れの原因が、T細胞およびB細胞の老化に伴う免疫グロブリンAの機能変化であることが示唆された。今まで明らかとなっていなかった加齢に伴う腸内フローラの破綻機構の一端が明らかになったとともに、加齢に伴う腸内フローラの破綻の予防もしくは回復を人為的に行える可能性が示された。従って、本研究は、腸内フローラの破綻が影響していることが知られる加齢性疾患の新たな予防法や治療法の開発につながる事が期待される。

研究成果の概要（英文）：The human gastrointestinal tract harbours a complex community of microorganisms, called the gut microbiota. Although it has known that an imbalance of gut microbiota, named dysbiosis is generated through aging, its mechanism has not been clarified. This study revealed that the increase of p16INK4 expression in T or B cells through aging affects the immunoglobulin A production in Peyer's patches, leading to dysbiosis of gut microbiota.

研究分野：免疫学

キーワード：細胞老化 腸内フローラ 免疫グロブリンA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々の腸管内腔には、莫大な数と種類の細菌で構成される腸内フローラが形成されている。腸内フローラは、ただ一層の上皮細胞層により宿主と隔てられているため、宿主と密接な相互作用を形成しつつ、宿主の健康維持に寄与している。しかし、腸内フローラの乱れが生じると、様々な疾患の発症や病態悪化につながる事が報告されている。以前より、加齢に伴うヒトの腸内フローラの乱れと加齢性疾患との関連が指摘されているものの、加齢に伴う腸内フローラの乱れの発生機序に関しては未だに明らかとなっていない。

一方で、腸内フローラの共生関係を維持するため、宿主は腸管免疫系を発達させてきた。免疫グロブリン A (IgA) を欠損したマウスは、腸内フローラの乱れと、それに伴う腸管免疫系の異常な活性化を示す。従って、IgA を中心とした獲得免疫系が、腸内フローラとの共生関係を維持する上で重要な役割を果たしていると考えられている。実際に、我々は腸内フローラのバランスを維持する上で、腸内細菌に特異的に結合する IgA が必要であり、その産生部位として小腸のパイエル板が非常に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。さらに、加齢に伴い、腸内細菌に対する IgA に変化が生じていることを見出した。これらの結果は、パイエル板の機能、すなわち IgA の産生能が、加齢に伴い変化していることを示唆するものの、そのメカニズムに関しては未だ不明である。

細胞は、発癌の危険性のある修復不可能な DNA 損傷を生じると、不可逆的な増殖停止状態 (細胞老化) を誘導する。細胞老化は重要な癌抑制機構の一つとして、宿主にとって正の機能を持つ一方で、負の機能もあわせ持つ。すなわち、細胞老化を起こした細胞 (老化細胞) は、加齢に伴って組織内に蓄積するとともに、炎症性サイトカインなどの様々な分泌タンパク質を産生し慢性的な炎症反応を惹起することで、組織の正常な機能を阻害すると考えられている。実際に、老化細胞の腫瘍な分子マーカーとして知られる p16<sup>INK4a</sup> の発現を可視化できるイメージングマウスを用いると、加齢に伴う老化細胞の組織内蓄積が観察される。興味深いことに、組織の中でもパイエル板において p16<sup>INK4a</sup> 発現細胞の蓄積が顕著であることを我々は見出した。この結果は、老化細胞の蓄積によって組織機能障害が起こり、加齢に伴いパイエル板の機能が変化していることを示唆している。しかしながら、加齢に伴うパイエル板における老化細胞の蓄積がパイエル板の組織機能にどのような影響を与えているのかに関しては明らかとなっていない。

### 2. 研究の目的

本研究は、パイエル板において、加齢に伴って蓄積する p16<sup>INK4a</sup> 発現細胞を同定し、p16<sup>INK4a</sup> の発現が細胞およびパイエル板の機能に与える影響、また、そうした変化が IgA の機能や腸内フローラに与える影響を明らかにしていくことを目的とした。これにより、未だに解明されていない腸管免疫系および腸内フローラの老化機構の一端を明らかにすることを目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 加齢に伴ってパイエル板に蓄積する p16<sup>INK4a</sup> 発現細胞の細胞種の同定

若齢もしくは老齢マウスのパイエル板から様々な免疫細胞をセルソーターにより単離し、qPCR を用いて p16<sup>INK4a</sup> の発現を確認した。

#### (2) 移植マウスを用いた p16<sup>INK4a</sup> 発現細胞の細胞種の確認及び組織分布の検討

正常マウスにガンマ線を照射することにより骨髄を破壊したマウスもしくは T 細胞及び B 細胞を持たない Rag 欠損マウスに、p16<sup>INK4a</sup> の発現をルシフェラーゼの発光によりイメージングできるマウス (p16Luc マウス) から採取した骨髄を移植し、一部の免疫細胞のみ p16<sup>INK4a</sup> 発現を可視化できるマウスを構築した。この移植マウスを用いることで、どの免疫細胞が p16<sup>INK4a</sup> を発現しているのか、またそれらの発現細胞がどの組織に主に分布しているのか検討した。

さらに、宿主の環境が p16<sup>INK4a</sup> 発現細胞の組織分布や p16<sup>INK4a</sup> の発現にどのような影響を与えるのかを明らかにするため、若齢もしくは加齢の Rag 欠損マウスもしくはガンマ線照射マウスを準備し、これらのマウスに若齢の p16Luc マウスの骨髄を移植した。同時に、免疫細胞自体の老化が p16<sup>INK4a</sup> 発現及び免疫細胞の組織分布にどのような影響を与えるのかを明らかにするため、加齢 p16Luc マウスの骨髄も同様のマウスに移植した。

#### (3) 免疫細胞の若返りによる IgA 及び腸内フローラの変化の検討

若齢マウス及び加齢マウスをパラビオーシス (並合結合) し、2 匹間で循環血液を共有させることで、加齢マウスにおける免疫細胞の若返りを行い、IgA の機能及び腸内フローラにどのような影響を与えるのかを検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 加齢に伴ってパイエル板において p16<sup>INK4a</sup> を発現する T 細胞及び B 細胞が増加する

若齢マウスもしくは老齢マウスのパイエル板より、T 細胞、B 細胞及びその他の免疫細胞をセルソーターにより単離し、それぞれの p16<sup>INK4a</sup> 発現変化を qPCR により検討した。その結果、免疫細胞の中でも T 細胞及び B 細胞が p16<sup>INK4a</sup> を発現していることが明らかとなった。パイエル板を主に構成している免疫細胞は、T 細胞及び B 細胞であることから、両細胞における p16<sup>INK4a</sup> の発現上昇がパイエル板の機能に影響を与えていることが示唆された。

(2) p16<sup>INK4a</sup>を発現したT細胞及びB細胞がパイエル板や腸間膜リンパ節に集積し、宿主の生体環境によってp16<sup>INK4a</sup>の発現に変化が生じる

パイエル板におけるp16<sup>INK4a</sup>発現細胞がT細胞及びB細胞であるのかを確認するため、正常マウスにガンマ線を照射した正常マウスもしくはT細胞及びB細胞を持たないRag欠損マウスに、p16Lucマウスから採取した骨髄を移植し、T細胞及びB細胞のみp16<sup>INK4a</sup>発現を可視化できるマウスを作製した。その結果、これらの移植マウスのパイエル板や腸間膜リンパ節においてルシフェラーゼによる発光が検出された。この発光分布パターンは、通常のp16Lucマウスと同じパターンを示していたことから、パイエル板や腸間膜リンパ節において検出されるp16<sup>INK4a</sup>発現由来の発光はT細胞及びB細胞に由来するものと考えられた。また、老齢のp16Lucマウスから採取した骨髄をガンマ線照射正常マウスもしくはRag欠損マウスに移植した場合には、若齢のp16Lucマウスから採取した骨髄を移植したマウスよりもp16<sup>INK4a</sup>の発光シグナルが強かった。もともと、加齢マウスの骨髄のp16<sup>INK4a</sup>の発現が高いことから、免疫系の老化に伴うp16<sup>INK4a</sup>の発現上昇がパイエル板におけるp16<sup>INK4a</sup>の発現上昇につながっていることが示唆された。さらに、宿主の生体環境がT細胞及びB細胞のp16<sup>INK4a</sup>発現にどのような影響を与えるのかを明らかにするため、加齢したRag欠損マウスもしくはガンマ線を照射した加齢正常マウスにp16Lucマウスより採取した骨髄を移植したところ、若齢のRag欠損マウスやガンマ線照射若齢マウスに比べ、加齢させたRag欠損マウスやガンマ線照射加齢マウスをレシピエントに使用した移植マウスの方がp16<sup>INK4a</sup>の発光シグナルが強かった。この結果は、宿主の加齢に伴う生体環境の変化が、T細胞及びB細胞のp16<sup>INK4a</sup>の発現上昇に影響を与えていることを示しており、免疫細胞の老化だけでなく、免疫細胞を取り巻く周囲の老化に伴う変化が免疫細胞の老化を促進させていることが示唆された。

(3) T細胞及びB細胞の一部若返りによりIgAの機能及び腸内フローラの改善がみられる

若齢マウスと老齢マウスをパラビオーシスにより結合することにより、2匹間で循環血液を共有させ、老齢マウス内における免疫系の若返りを試みた。老齢マウスと結合した若齢マウスにおいては、パイエル板におけるp16<sup>INK4a</sup>の発現が上昇していたのに対して、逆に、若齢マウスと結合した老齢マウスでは、パイエル板におけるp16<sup>INK4a</sup>の発現が減少していた。実際に、若齢マウスと結合した老齢マウスのパイエル板においては、50%以上のT細胞及びB細胞が若齢マウス由来の細胞に置き換わっていた。また、同老齢マウスの小腸の粘膜固有層においては、IgA産生形質細胞も一部、若齢マウス由来の細胞に置き換わっていることが明らかとなった。

そこで、若齢マウスと結合した老齢マウスにおけるIgAの機能変化を検討した。パラビオーシスを行う前の老齢マウスにおいてはIgAが結合した腸内細菌の割合が高かったのに対し、若齢マウスとパラビオーシスを行った後においては、IgAが結合した腸内細菌の割合が減少し、若齢マウスのもつ割合と同程度まで減少した。これまでの我々の研究から、腸内細菌に対するIgAの特異性が低いとIgAが結合する腸内細菌の割合が高くなる傾向にあることが明らかとなっている。従って、老齢マウスはIgAの腸内細菌に対する特異性が低いが、パラビオーシスを行い免疫系の一部若返りを行うことで、その特異性が若齢マウスの持つIgAと同程度まで回復することが示唆された。

さらに、パラビオーシス前後における腸内フローラの変化を16S rRNAシーケンス解析により検討した。その結果、腸内フローラの組成は若齢マウスと老齢マウスにおいて大きく異なるが、若齢マウスと結合した老齢マウスにおいては、腸内フローラの組成が若齢マウスの組成に近づくことが明らかとなった。

従って、パラビオーシスによりパイエル板におけるT細胞及びB細胞の一部若返りを行うことで、パイエル板のp16<sup>INK4a</sup>の発現が減少し、IgAの腸内細菌に対する結合性の変化と腸内フローラの若返りが生じることが明らかとなった。

以上の結果から、加齢に伴うパイエル板におけるp16<sup>INK4a</sup>発現T細胞及びB細胞の蓄積による腸管免疫系及び腸内フローラの老化機構の一端が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masahiro Wakita, Akiko Takahashi, Osamu Sano, Tze Mun Loo, Yoshinori Imai, Megumi Narukawa, Hidehisa Iwata, Tatsuyuki Matsudaira, Shimpei Kawamoto, Naoko Ohtani, Tamotsu Yoshimori & Eiji Hara	4. 巻 1935
2. 論文標題 A BET family protein degrader provokes senolysis by targeting NHEJ and autophagy in senescent cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-15719-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河本新平
2. 発表標題 腸内細菌による細胞老化を介した発がん促進機構
3. 学会等名 第47回日本臨床免疫学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 植村憲、河本新平、脇田将裕、原英二
2. 発表標題 皮膚腫瘍の悪性化に関わる皮膚細菌の単離同定
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

〔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