

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：37303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580476

研究課題名(和文) 加齢に伴う免疫老化の分子基盤および抗老化に向けたシグナル機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of signaling mechanism for the anti-aging and the molecular basis of the immune senescence with ageing

研究代表者

藤木 司 (Fujiki, Tsukasa)

長崎国際大学・薬学部・講師

研究者番号：00420612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：免疫老化に関わる老化関連遺伝子の網羅的解析により抽出した遺伝子群とその機能について重鎖および軽鎖抗体遺伝子(19遺伝子)、白血病関連因子(3遺伝子)、腸管免疫抗体産生因子(1遺伝子)の関与が明らかとなった。発現の増加する遺伝子群として免疫グロブリン重鎖関連遺伝子(4遺伝子)、脂肪組織発達関連因子(2遺伝子)、神経記憶関連カルモジュリン結合因子、ヒストンクラスター関連遺伝子、LDL(low density lipoprotein)スカベンジャー遺伝子、結腸直腸ガン転移関連因子等(各1遺伝子ずつ)の関与が明らかとなり加齢性疾患との関連性を示唆する可能性のある多岐にわたる遺伝子群に変化が観察された。

研究成果の概要(英文)：Their functions genes were extracted by the comprehensive analysis of senescence-associated genes involved in immune senescence, Involved light chain antibody genes (19 genes), leukemia-related factors (gene 3), intestinal immune antibody production factor of (1 gene) has become a clear and heavy chain. As a group of genes that increase in expression, immunoglobulin heavy chain-related genes (4 genes), adipose tissue development-related factors (2 genes), nerve memory associated calmodulin-binding factor, histone cluster-related genes, LDL (low density lipoprotein) scavenger gene, involvement colorectal cancer metastasis-related factors, and the like of (each one gene) becomes clear, changes were observed in the group of genes a wide range that suggest possible the association between age-related disease.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：細胞老化 TERT p38

1. 研究開始当初の背景

加齢・老化にとともに低下する免疫老化は、現在のところ免疫老化がどのようなプロセスでもたらされるのかについては不明な点が多く、免疫関連遺伝子の多型性、リンパ球を中心とする免疫担当細胞レベル、ストレスシグナル、神経系と免疫系の連携相互作用など多岐におよぶメカニズムに注目が集まっている。現在のところ免疫老化がどのようなプロセスでもたらされるのかについては不明な点が多く、免疫関連遺伝子の多型性、リンパ球を中心とする免疫担当細胞レベル、ストレスシグナル、神経系と免疫系の連携相互作用など多岐におよぶメカニズムに注目が集まっている。免疫老化はこれまでに疫学的な観点から様々な研究等がなされているが、詳細なメカニズムと制御機構に関しては未だ不明な点が多い。個体老化は複雑な表現型である故、原因となるターゲットを絞った解析がきわめて困難であるので、細胞老化という視点から個体老化に対してアプローチを行うことに意義があり、また近年、テロメラーゼは大腸ガンに關与することが知られる Wnt-カテニンシグナルにおいて転写因子コファクターとして転写調節に關与し、分化、発生に影響を及ぼすなどの報告がありテロメア配列付加以外の機能についても注目が集まっていることから、本研究において免疫老化を規定するシグナル解析により新たな機能が見出された場合学術的にも有意義であると考えられる。一度ストレスによって生じた免疫老化細胞群とそれらから産生される老化誘導サイトカインカクテルが全身を循環することで生活習慣病・加齢性疾患(慢性炎症、糖尿病、発ガン、動脈硬化、アルツハイマー病など)を誘発・増悪すると考えられるため、本研究において得られる抗免疫老化ターゲットに關する結果によって、免疫老化に対する早期予防・早期診断・早期治療にむけた老年医学、抗加齢医学への寄与とともに予防医薬の開発、QOLの向上に向けて貢献出来ると予想される。本研究は、加齢に伴う恒常性維持にとって重要である免疫老化制御機構の解明を目指し、アンチエイジング・抗加齢医学・抗加齢医薬への基礎的研究と位置づける。

2. 研究の目的

加齢に伴う免疫力の低下(免疫老化:immunosenescence)に關する分子メカニズムの解明を目指し、これまでに高齢者においてストレス応答性 MAPK p38 活性化に依存した MHC class II 抗原(HLA-DR)の発現低下を觀察しており、さらに細胞老化を規定することが知られるテロメラーゼの免疫老化への影響について高齢者B細胞においてp38活性化に依存したテロメラーゼ発現の抑制を觀察した。高齢者(65歳)と若年者(22歳)より採取

したB細胞をEBウイルスにより不死化した株(EBV-B細胞)を免疫老化細胞モデルとし、様々なストレスシグナル因子をはじめ獲得免疫系に關する表面抗原等に關して比較検討を行った結果、高齢者における炎症性シグナル因子 NF- κ B 活性化、ストレス性 MAPK p38 活性化、さらにはB細胞の抗原提示能力の低下(HLA-DR 発現低下)を觀察し、HLA-DR 発現低下は p38 活性化に依存することが明らかとなった。また、様々なサイトカインを添加した条件下で抗原感差を行う体外免疫法では、高齢者B細胞を用いた場合、若年者と比較して抗原感差効率の低下が觀察され、加齢に伴うストレスシグナルの活性化は獲得免疫における抗原感差感受性を低下させる可能性が示唆された。将来的には免疫老化特異的マーカーによる加齢性疾患や慢性炎症疾患の予防・診断を可能にすることを目的とする。本研究では、免疫老化におけるテロメラーゼがもたらす機能について検証する為に、細胞老化に係わる指標(老化特異的ガラクトシダーゼ活性、サイトカイン産生、老化マーカー発現)を用いた評価系を構築し、ストレス応答因子活性化による表現型への影響を中心に解析を行い、抗免疫老化シグナルの探索を目指す。

3. 研究の方法

hTERT 発現が免疫老化に与える影響について検証する。高齢者および若年者 EBV-B細胞へのレトロウイルスベクターを用いた *hTERT* 高発現・ノックダウン株を作製後、ヒト(高齢者/若年者)、老齡マウス/老化促進マウス/糖尿病マウス由来末梢血リンパ球へのストレス付加(炎症シグナル、酸化ストレス)、ストレス応答因子阻害剤処理を行い細胞老化の指標についてフローサイトメーターおよびインセルアナライザーによる1細胞定量・局在解析、体外免疫法(in vitro Immunization:IVI)を用いた抗原感差に対する感受性を検証する。また、NF- κ B についても同様に阻害実験を行い、免疫老化への寄与について検証を行う。*hTERT* の關与について一定の成果が得られた場合は、DNA マイクロアレイによる *hTERT* 高発現・抑制時、ストレスシグナル付加・阻害時におけるマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現動向、ChIP-on-Chip などをを用いた共役・ターゲット因子の探索を行い、得られた情報をもとに候補因子の選定および *in vitro* 細胞モデル検証系で絞り込み、モデルマウスにおける *in vivo* 検証系により抗免疫老化因子の同定を行う。

4. 研究成果

本研究では、様々な老化表現型への影響について検証を行いストレス応答因子の活性化から免疫老化表現型にいたるシグナル経路の解明を目指す。そこで高齢者および

若年者から採取した B リンパ球における mRNA 発現解析を行うために、約 34,000 種類の転写産物を搭載した Agilent 社 Whole Human Genome オリゴ DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行い、そこから得られた遺伝子発現に関する情報を統計学的手法を用いたソフトウェアを利用し、生活習慣病をはじめとする加齢性疾患などに関連する情報をクラスタリングすることによって抽出した。これらの結果から加齢性疾患との関連性を示唆するシグナル伝達分子における変化が観察され、さらにアノテーションによるクラスタリングからある程度の数にまで絞り込みを行った。免疫老化に関わる老化関連遺伝子の網羅的解析により抽出した遺伝子群とその機能について、重鎖および軽鎖抗体遺伝子 (19 遺伝子)、白血病関連因子 (3 遺伝子)、腸管免疫抗体産生因子 (1 遺伝子) の関与が明らかとなった。発現の増加する遺伝子群として、免疫グロブリン重鎖関連遺伝子 (4 遺伝子)、脂肪組織発達関連因子 (2 遺伝子)、神経記憶関連カルモジュリン結合因子、ヒストンクラスター関連遺伝子、LDL (low density lipoprotein) スカベンジャー遺伝子、結腸直腸ガン転移関連因子等 (各 1 遺伝子ずつ) の関与が明らかとなり、加齢性疾患との関連性を示唆する可能性のある多岐にわたる遺伝子群に変化が観察された。これらの遺伝子発現についてサンプルとして使用した高齢者および若年者における EB ウィルス不死化 B 細胞での発現をリアルタイム PCR において定量的な解析を試みたところ、すべての遺伝子において相関が得られるわけではなかったが、その傾向が見られるものいくつか存在した。今後は細胞老化に関わる評価系についてこれまでの正常線維芽細胞やガン細胞などにおける接着系細胞で得られた SA-β-ガラクトシダーゼ活性に基づく評価法が機能しないことについては更なる検討が必要であると思われる。また、SASP (Senescence Associated Secretory Phenotype) に関する検証系をはじめとする評価系に加え、本研究における MHC class II 抗原の発現強度変化をトレースすることで評価できるようにさらなる検証を行う必要があると考えられる。また、浮遊系の細胞における老化表現型の構築は、接着系細胞と比較するとその条件検討は困難であると思われるため、より詳細な検討を重ねる必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

藤木司、片倉喜範、岸原健二、Function of MAPKp38 in aging-associated phenotypic changes of B cells、2011 第 14 回国際免疫学会、2010 年 8 月 22 日、神戸ポートピアホテル

藤木司、片倉喜範、岸原健二、加齢に伴う B 細胞機能変化における MAPKp38 の関与、第 29 回日本薬学会九州支部大会、2012 年 12 月 8 日、熊本大学薬学部

藤木司、岸原健二、片倉喜範、Function of MAPKp38 in aging-associated phenotypic changes of B cells、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 日、福岡マリンメッセ

藤木司、片倉喜範、岸原健二、加齢に伴う B 細胞機能変化における MAPKp38 の関与、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 25 日、東北大学川内北キャンパス

藤木司、片倉喜範、岸原健二、加齢に伴う B 細胞機能変化における MAPKp38 の関与、第 30 回日本薬学会九州支部大会、2013 年 12 月 8 日、長崎国際大学薬学部

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者 ()

研究者番号：

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：