

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 17 日現在

機関番号：83903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26750350

研究課題名(和文) Ziziminファミリー遺伝子を介した免疫老化機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms underlying Zizimin family gene-dependent immunosenescence

研究代表者

松田 剛典 (Matsuda, Takenori)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・その他部局等・流動研究員

研究者番号：30646477

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：マウス免疫組織内での発現量が減少するZizimin2が、感染症に対する防御機構に関わる脾臓に存在する辺縁帯B細胞ならびに腹腔内に存在するB1b細胞の形成を促進する事が判った。また、高齢マウスから採取した脾臓B細胞や腹腔内B1b細胞では、Zizimin2遺伝子の発現量が減少する事も判った。さらに、染色体上に存在するZizimin2遺伝子の発現量を調節する部位も明らかにした。今後は、Zizimin2遺伝子の発現量を増加させる事で高齢者の免疫機能を賦活化させる事ができるかどうか、調べていく必要がある。

研究成果の概要(英文)：This study revealed that Zizimin2, of which expression level is decreased with aging, increases splenic marginal zone B cell and peritoneal cavity B1b cell number in mice. In addition, the expression level in those cells from aged mice was significantly lower than that from young mice. Importantly, we also demonstrated some regulatory elements for the expression upstream from murine Zizimin2 gene transcription start site. It will be required in the near future if activation of Zizimin2 gene rejuvenates the immunological function of elderly people or mice.

研究分野：免疫学

キーワード：B細胞 老化 免疫 感染

1. 研究開始当初の背景

少子高齢化という社会的な問題は、社会の繁栄と安定を考える上で重要な課題である (Goronzy et al. *Nat Immunol*, 2013)。とりわけ高齢者は、感染症への抵抗力が低下し、感染後においては重篤化し易い事から、WHO (World Health Organization) も、高齢者に対する感染症の予防や症状の緩和が今後の公衆衛生の優先課題であるとしている (Thomas-Crusells et al. *Vaccine*, 2012)。この様な理由から、世界各国では免疫老化に関する研究が盛んに行われており、これまでの研究結果より、加齢に因り造血幹細胞の分化能力に欠陥が生じ、リンパ球の産生が抑えられる為に免疫機能が低下すると報告されている (Linton et al. *Nat. Immunol*, 2004)。しかし、免疫老化の仕組みは未だ完全には解明されていない。加齢に伴った免疫機能の脆弱化は、感染症や腫瘍の悪性化のみならず、体全体の恒常性や組織の再生活動の減退にも関与している為 (Boraschi et al. *Vaccine*, 2010. Boraschi et al. *Sci Transl Med*, 2013. McElhaney et al. *Curr. Opin Immunol*, 2009)、免疫老化の仕組みを明らかにし、高齢者の免疫機能を維持・賦活化する方法を見出す事は、健康長寿社会を構築する上での基盤となり得る。その様な理由から、免疫老化機構の解明は社会的に重要な課題である。

ヒトやマウスの Zizimin (Ziz) ファミリー遺伝子には、3つの構造的相同性を有する遺伝子が明らかにされている (Maruyama, M. et al. *FEBS Lett.* 2005)。機能的にはグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF; Guanine nucleotide exchange factor) として知られており、GTPase に GTP を結合させ、その活性を亢進させる。GTPase は、アクチン細胞骨格や細胞運動、細胞増殖等を制御している為、GEF は GTPase を介して細胞の機能を制御する重要な分子である。

Ziz ファミリー遺伝子は、GEF という共通

の機能を持つ半面、それらの発現パターンが異なるという事を我々は見出している。すなわち、Ziz1 は、脳、肺、腎臓等の非免疫組織で確認されるが、我々の研究グループが単離した Ziz2 は、脾臓や胸腺等の免疫組織特異的な発現パターンを示した (Maruyama et al. *FEBS Lett*, 2005)。また、Ziz3 についても免疫組織における発現が認められた。これらの事から、Ziz2 や Ziz3 が免疫機能に関わっていると考えられた。

実際に、細菌の細胞壁構成成分であるリポ多糖で刺激した免疫細胞 (骨髄由来樹状細胞) では、Ziz2 の発現が上昇し、Cdc42 が活性化され、アクチンの重合が促進される事で、糸状仮足の形成が促進する事が近年明らかとなった (Maruyama et al. *Immun and Ageing*, 2012)。さらに、免疫組織における Ziz2 の発現量が加齢に伴って低下する事から (Matsuda et al. *Nagoya J Med Sci* 2012)、Ziz2 の発現量低下のメカニズムを解析する事で、免疫老化の分子メカニズムの解明に迫れると考えられた。

これまでに我々は、Ziz2 の遺伝子欠失 (KO) マウスを作製・維持する事に成功し、解析を開始した。その結果、Ziz2 KO マウスの骨髄において B 細胞が減少している事が判明した。さらに、Ziz2 KO マウスの脾臓において、成熟 B 細胞である Marginal zone (MZ) B 細胞の数が減少している事も明らかにした。MZ B 細胞は、持続的に微生物抗原への抗体を産生する事に依り感染防御の第一線として機能する。興味深い事に、野生型の高齢マウス (24ヶ月齢) でも、若齢マウスに比べて骨髄における B 細胞の数と脾臓における MZ B 細胞の数が減少していたことから (Matsuda et al. *Nagoya J Med Sci*, 2012)、Ziz2 の発現量低下が、加齢に因る骨髄での B 細胞の形成不全と MZ B 細胞の減少、さらには免疫老化にも関わるのではないかと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、Ziz2 と Ziz3 の B 細胞形成過程における機能を明らかにし、免疫老化との関与を明らかにする事を目的とする。

3. 研究の方法

(1) B 細胞の分化における加齢変化と Ziz ファミリー遺伝子の発現動態

Ziz2 欠失 (KO)、Ziz3KO マウスあるいは高齢マウスの骨髄と脾臓において B 細胞の割合を解析した。Ziz ファミリーの標的分子として想定される Cdc42 や Rac2 の遺伝子欠失マウスでは、骨髄 B 細胞や辺縁帯 (MZ) B 細胞の形成不全となる為 (Guo et al. Blood, 2009. Croker et al. J Immunol, 2002)、Ziz2KO あるいは Ziz3KO マウスにおいてもこれらの形質が現れるかどうかを検証した。高齢マウスでは、骨髄において B 細胞の形成不全が起こる事から (Miller et al. Semin Immunol, 2005)、Ziz2KO や Ziz3KO マウスを解析する事に依り、加齢に因る B 細胞の形成不全における Ziz ファミリー遺伝子の関与を明らかにできると考えた。

(2) B1 細胞の分化における加齢変化と Ziz ファミリー遺伝子の発現動態解析

体内には、B1、B2、MZ の 3 種類の B 細胞が存在する。その内、腹腔内に存在する B1 細胞と MZ B 細胞は感染防御の点では類似の機能を有している。そこで、本研究では、MZ B 細胞のみならず、Ziz2KO や Ziz3 KO や Ziz2 と Ziz3 の両方を欠失させた (DKO; Double KO) マウス、あるいは、高齢マウスの腹腔内に存在する B1 細胞の割合や数を Flowcytometry に依り解析し、B1 細胞の形成過程における Ziz2 や Ziz3 の関与を明らかにした。

(3) 免疫担当細胞の加齢に因る量的変化と Ziz2 の関与

我々のグループでは、マウス脾臓内における Ziz2 遺伝子の発現量が加齢に因って低下する事を明らかにした。しかし、Ziz2 を発現している細胞の数が加齢に因って低下するのか、特定の細胞内における Ziz2 の発現量

が加齢に因り低下するのか、という 2 つの可能性に関しては検討が為されていなかった。そこで今回我々は、まず、若齢マウスと高齢マウスの脾臓内に存在する各種免疫担当細胞の割合を Flowcytometry を用いて解析し、加齢に依る Ziz ファミリー遺伝子発現細胞の量的変化を明らかにした。さらに、上述した 2 つ目の可能性に関して検討する為に、若齢または高齢マウスの脾臓からそれぞれの細胞を Flowcytometry を用いて単離し、Real time PCR を行い、Ziz2 と Ziz3 発現量の加齢に因る変化を解析した。

(4) 抗原刺激後における免疫応答の解析

免疫応答時における Ziz2 あるいは Ziz3 の関与を明らかにする為に、上述した遺伝子欠失マウスに各種抗原を腹腔内投与し、免疫応答を解析した。免疫応答における Ziz ファミリーの機能を明らかにする為に、免疫前、免疫後 7 日目、14 日目の血清を採取し、抗原特異的な抗体価を ELISA に依り解析した。これらの実験を実施し、それぞれのシグナル伝達経路を介した免疫応答における Ziz2 や Ziz3 の機能を明らかにし、免疫老化との関係を明らかにしようと考えた。

(5) Ziz2 の発現制御機構に関する解析

我々はこれまでに、加齢に伴って免疫組織における Ziz2 遺伝子の発現量が低下する事を明らかにしたが、それに関わる因子は解っていないかった。そこで今回は、高齢者の免疫機能賦活化を念頭に、マウス免疫系細胞株 (RAW264.7 細胞) あるいはマウス繊維芽細胞系細胞株 (NIH3T3 細胞) に Ziz2 の (推定された) プロモーター領域を導入し、レポーターアッセイを行う事で、Ziz2 遺伝子発現を制御している cis 制御領域、ならびに、重要な転写因子を明らかにしようと考えた。

4. 研究成果

(1) B 細胞の分化における加齢変化と Ziz ファミリー遺伝子の発現動態

まず、Ziz2KO や Ziz3KO マウスで、野生型

(C57BL/6)マウスよりも、骨髄 B 細胞の割合が低下していた (図 1)。一方で、辺縁帯 B 細胞の割合は、Ziz2KO マウスでのみ、野生型に比べて有意に低下していた (図 2)。さらに、それらの KO マウスの脾臓内では、辺縁帯 B 細胞の、辺縁帯への局在が減少していた。一方で、高齢の野生型マウスでは、若齢の野生型マウスに比べて、骨髄 B 細胞と辺縁帯 B 細胞の両方が低下していた。興味深い事に、加齢に伴って脾臓 B 細胞内における Ziz2 の発現量も低下していた (図 3)。これらの結果より、B 細胞内における、加齢に伴った Ziz2 遺伝子発現量の低下と、辺縁帯 B 細胞の減少との間に何らかの関与が示唆された。

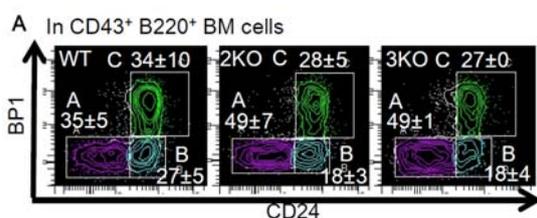


図 1 : 骨髄 B 細胞の解析

図内の数値は、平均 ± 標準偏差を示す。

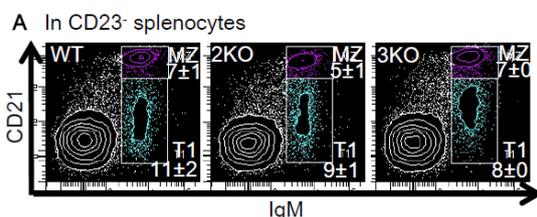


図 2 : 辺縁帯 B 細胞の解析

図中の数値は、平均 ± 標準偏差を示す。

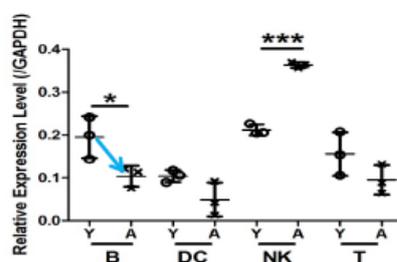


図 3 : 脾臓由来免疫細胞内における Ziz2 遺伝子の発現量と加齢変化

B: B cell, DC: Dendritic cell

NK: Natural killer cell, T: T cell

*: $P < 0.05$ ***: $P < 0.0001$

(2) B1 細胞の分化における加齢変化と Ziz

ファミリー遺伝子の発現動態解析

次に、辺縁帯 B 細胞と類似の機能を有する B1 細胞についても同様の解析を実施した。その結果、Ziz2 と Ziz3 を両方欠失させたマウスでは、腹腔内に存在する B-1b 細胞の数が低下していた (図 4、Matsuda et al. 投稿中)。さらに、高齢マウス腹腔内に由来する B-1b 細胞では、若齢マウス由来のそれらの細胞に比べて、Ziz2 と Ziz3 遺伝子の発現量が有意に低下していた。これらの結果より、Ziz2 と Ziz3 は、類似の機能として、腹腔内 B-1b 細胞の数を増加させる働きがあると考えられた。

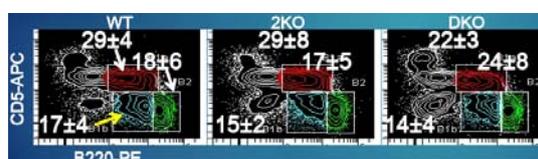


図 4 : B-1 細胞の解析

WT: Wild type, 2KO: Ziz2 KO

DKO: Ziz2 and Ziz3 double KO

(3) 免疫担当細胞の加齢に因る量的変化と Ziz2 の関与

加齢に伴って、B 細胞や T 細胞内において、Ziz2 遺伝子の発現量が低下する傾向が確認された。また、B 細胞、T 細胞、NK 細胞の細胞数が加齢に伴って低下する傾向も確認された。これらの結果より、加齢に伴って Ziz2 を発現する細胞数が低下する可能性があること、ならびに、B 細胞や T 細胞内における Ziz2 遺伝子発現量が低下する事で免疫組織での Ziz2 遺伝子の発現量が低下する可能性が考えられた。

(4) 抗原刺激後の免疫応答の解析

肺炎球菌ワクチンに関して、Ziz2 と Ziz3 の両方を欠失させた DKO マウスにおいて、抗原特異的な抗体価が減少した (図 5、Matsuda et al. 投稿中)。この結果より、Ziz2 と Ziz3 は類似の機能として、腹腔内 B-1b 細胞の肺炎球菌ワクチンに対する抗体の産生に対して促進的な働きを有すると考えられた。

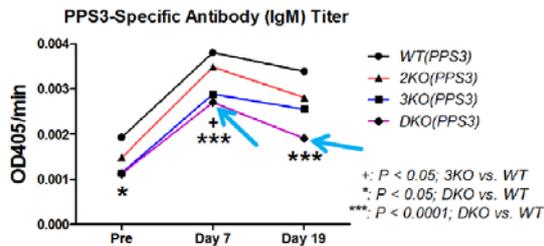


図5：肺炎球菌ワクチンに対する抗原特異的な抗体価の解析

WT: Wild type, 2KO: Ziz2 KO, 3KO: Ziz3 KO, DKO: Ziz2 and Ziz3 double KO

(5) Ziz2の発現制御機構に関する解析

-805 から-680, -542 から-436, さらに-341 から-189 という3つの領域がマウス Ziz2 遺伝子の発現を調節している可能性が示唆された。さらに、欠失変異を導入したプロモーター領域を用いた解析からは、-798~-791 (図6、ZP2-M1、Matsuda et al. 投稿中)と-718~-708 (図6、ZP2-M3)が Ziz2 の転写を制御する重要な領域だという事も判明した。興味深い事に、それらの内、-798~-791 に結合する事が予想された Stat6 遺伝子の発現量が、加齢に伴って脾臓由来 T 細胞で低下する事から (Matsuda et al. 投稿中)、脾臓 T 細胞内における Ziz2 遺伝子発現量の低下に、Stat6 遺伝子の発現量低下が関与しているのではないかと考えられた。

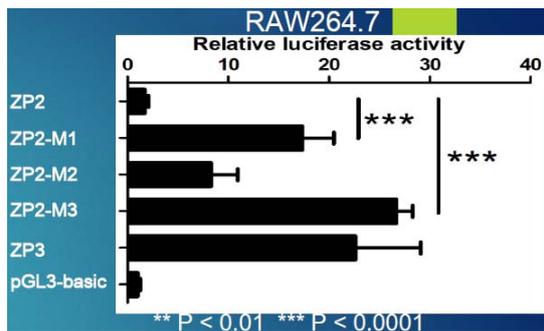


図6：マウス Ziz2 プロモーター領域に対するルシフェラーゼレポーターアッセイ

***: $P < 0.0001$

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

① Kishimoto M, Matsuda T, Yanase S, Katsumi A, Suzuki N, Ikejiri M, Takagi A,

Ikawa M, Kojima T, Kunishima S, Kiyoi H, Naoe T, Matsushita T, Maruyama M, Rhof promotes murine marginal zone B cell development, Nagoya J Med Sci, 76(3-4), 293-305, 2014.

http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medlib/nagoya_j_med_sci/index.html

②松田剛典、丸山光生、老化にともなう免疫能変化、Surgery Frontier, 21(3), 25-29, 2014. http://www.m-review.co.jp/magazine/detail/J0016_2103

③松田剛典、丸山光生、2014 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Molecular Genetics of Aging を終えて、基礎老化研究、39(1), 51-52, 2015.

<http://rnavi.ndl.go.jp/books/2009/04/0000060253.php>

④松田剛典、丸山光生、The 2015 Ageing Summit を終えて、基礎老化研究、39(2)、69-70、2015. <http://rnavi.ndl.go.jp/books/2009/04/000000060253.php>

⑤Matsuda T, Yanase S, Takaoka A, Maruyama M, The immunosenescence-related gene Zizimin2 is associated with early bone marrow B cell development and marginal zone B cell formation, Immun Ageing, 12, 1, 2015.

[10.1186/s12979-015-0028-x28](http://dx.doi.org/10.1186/s12979-015-0028-x28) [pii]

[学会発表] (計 12 件)

① Matsuda T, Yanase S, Iwashita Y, Hayakawa T, Matsui N, Takaoka A, Maruyama M, Zizimin2 Promotes Marginal Zone B Cell Development、第79回インターフェロン・サイトカイン学会、2014年6月19~20日、北海道大学(札幌市)

②松田剛典、岸本磨由子、築瀬正吾、勝見 章、松下 正、丸山光生、マウス RhoF は辺縁帯 B細胞の形成を促進する、第79回インターフェロン・サイトカイン学会、2014年6月19~20日、北海道大学(札幌市)

③ Matsuda T, Yanase S, Iwashita Y, Hayakawa T, Matsui N, Casola S, Maruyama M, Zizimin2 Promotes Marginal Zone B Cell Development、第37回日本基礎老化学会、2014年6月26～27日、あいち健康プラザ (大府市)

④ Matsuda T, Yanase S, Hayakawa T, Matsui N, Takaoka A, Maruyama M、Immunosenescence-associated gene Zizimin2 is involved in marginal zone B cell localization through down-regulating migratory activity towards CXCL13, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting (Molecular Genetics of Aging), 2014年9月30日、Cold Spring Harbor (USA).

⑤ Su S, Matsuda T, Iwashita Y, Sugimoto M, Maruyama M、Investigation and Functional Analysis of Promoter Region for Murine Immunosenescence-Associated Gene, Zizimin2、第37回日本分子生物学会、2014年11月25～27日、パシフィコ横浜 (横浜市)

⑥ Matsuda T, Maruyama M、Zizimin2 and Zizimin3 are Involved in Marginal Zone B Cell Localization through Down-Regulating Migratory Activity towards CXCL13、第43回日本免疫学会、2014年12月11日、国立京都国際会館 (京都市)

⑦ 松田剛典、築瀬正伍、丸山光生、免疫老化関連遺伝子 Zizimin2 は辺縁帯B細胞の形成に関与する、第38回日本基礎老化学会、2015年6月13～14日、パシフィコ横浜 (横浜市)

⑧ 鄒 岑、松田剛典、岩下雄二、杉本昌隆、丸山光生、マウス免疫老化関連遺伝子 Zizimin2 のプロモーター領域における機能的解析、第38回日本基礎老化学会、2015年6月14日、パシフィコ横浜 (横浜市)

⑨ Matsuda T, Takaoka A, Maruyama M、

Immunosenescence-Associated Gene Murine Zizimin2 and Zizimin3 are Involved in B1a Cell Development in Peritoneal Cavity、A Satellite Symposium of the 4th European Congress of Immunology (Immunosenescence - Hot Topics & Interventions)、2015年9月5～6日、ウィーン (オーストリア)

⑩ Matsuda T, Takaoka A, Maruyama M、Murine Zizimin2 and Zizimin3 are Involved in B1 Cell Development in Peritoneum Cavity、第44回日本免疫学会、2015年11月20日、札幌コンベンションセンター (札幌市)

⑪ 鄒 岑、松田剛典、岩下雄二、杉本昌隆、丸山光生、マウス免疫老化関連遺伝子 Zizimin2 のプロモーター領域における機能解析、第38回日本分子生物学会、2015年12月2日、神戸国際展示場 (神戸市)

⑫ Takenori Matsuda, Mitsuo Maruyama、Murine Zizimin2 and Zizimin3 promote peritoneal cavity B-1b cell number and maintain pneumococcal polysaccharide-specific antibody titer in a later phase. 第8回名古屋グローバルリトリート、2016年2月12日、あいち健康プラザ (大府市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

http://www.ncgg.go.jp/department/dma/index_DMA.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 剛典 (MATSUDA, Takenori)

国立長寿医療研究センター・研究所・老化機構研究部・流動研究員

研究者番号: 30646477

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし