

長寿医療研究開発費 2019年度 総括研究報告

加齢に伴う液性免疫機能低下のメカニズムとその予防法の開発（19-52）

主任研究者 錦見 昭彦 国立長寿医療研究センター 研究所  
バイオセーフティ管理・研究室（室長）

研究要旨

ワクチンによる予防接種は、予め投与された抗原の情報を免疫系が記憶する性質を利用したものであり、実際に病原体が侵入した際に迅速に応答して大量の抗体を産生することで個体を感染から防御している。しかしながら、加齢に伴って抗体産生能や免疫記憶形成能が低下するため、ワクチンが高齢者に対して十分に機能しない可能性が指摘されている。本研究は、抗体産生を中心とした液性免疫を担う B 細胞に着目し、加齢や細胞老化に伴う機能的な変化や免疫記憶形成機構を分子レベルで解明し、その理解に立脚して加齢に伴う B 細胞の機能低下を抑制する方法を開発することを目的としている。本年度の研究により、抗原に応答した B 細胞の活性化、増殖、選択の場である胚中心の B 細胞において、セリンスレオニンキナーゼ MELK が高発現していることを見出した。また、老化細胞インジケーターマウスを樹立し、脾臓およびリンパ節より老化した T 細胞および B 細胞を分取することに成功した。これら分取した老化細胞は、次年度に遺伝子発現解析を行う予定である。

主任研究者

錦見 昭彦 国立長寿医療研究センター研究所バイオセーフティ管理・研究室（室長）

分担研究者

なし

A. 研究目的

液性免疫を担う B 細胞の加齢や細胞老化に伴う機能的な変化や免疫記憶形成機構を分子レベルで解明し、その理解に立脚して加齢に伴う B 細胞の機能低下を抑制する方法を開発することを目的としている。具体的には、個体の加齢や細胞老化にともなって B 細胞での発現が変化する因子について解析し、老化することで増加する B 細胞のサブセットを同定する。これらの B 細胞サブセットの性質を解析することにより、個体の液性免疫応答が加

齢に伴って低下するメカニズムを解明する。同時に、B細胞が記憶細胞に分化する分子機構を明らかにし、加齢に伴ってB細胞を介した免疫記憶形成能が低下するメカニズムを解明する。得られた成果に基づいて、個体レベルで加齢に伴う液性免疫応答の変化を抑制したり、加齢個体において免疫記憶誘導を促進したりする技術を開発する。これらの技術をもとに、ワクチンの効果を最大限に発揮して、感染症の脅威から高齢者を防御する予防法を確立することを目指す。

## B. 研究方法

抗原投与したマウスより脾臓の細胞を単離し、胚中心B細胞とそれ以外のB細胞を分取し、胚中心B細胞で高発現している因子を同定した。同定した因子について、定量RT-PCRにより発現量の比較を行った。また、B細胞を抗原刺激した際の発現量の比較を、遺伝子、タンパクレベルで行った。

老化機構研究部で樹立が進められていた、p16<sup>Ink4a</sup>遺伝子の下流にヒトCD2遺伝子をノックインしたマウスについて解析し、老化細胞のマーカージェン型であるp16<sup>Ink4a</sup>の発現依存的にヒトCD2を発現することを確認した。このマウスより脾臓とリンパ節の細胞を単離し、T細胞とB細胞について、ヒトCD2陽性細胞と陰性細胞に分取した。

### (倫理面への配慮)

マウスの飼育や実験は、「動物の愛護及び管理に関する法律」に準じて、苦痛の緩和等の適切な処置を講じた。動物実験ならびに遺伝子組換え実験については、それぞれ、国立長寿医療研究センター動物実験倫理委員会および遺伝子組換え実験安全委員会で、研究実施の妥当性について承認された方法で行った。

## C. 研究結果

胚中心B細胞とそれ以外のB細胞で発現する遺伝子について比較し、特にシグナル伝達因子に着目して検討したところ、セリンスレオニンキナーゼであるMELKを同定した。これらの細胞を用いて、MELK特異的なプライマーを用いて発現量を比較したところ、胚中心B細胞においてその発現量が大幅に上昇していた(図1)。また、単離したB細胞を抗IgM抗体で刺激したところ、刺激依存的にMELKの発現量が遺伝子レベルならびにタンパクレベルで増加した(図2)。B細胞の分化、活性化、生存におけるMELKの生理的な役割を解明するにあたり、MELK欠損マウスを樹立中である。

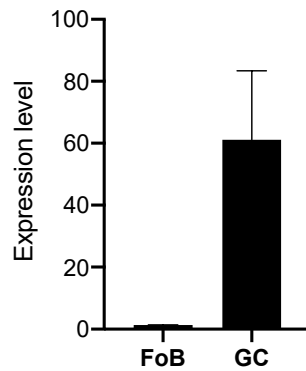


図1 胚中心 B 細胞 (GC) とそれ以外の B 細胞 (FoB) における遺伝子発現量の比較

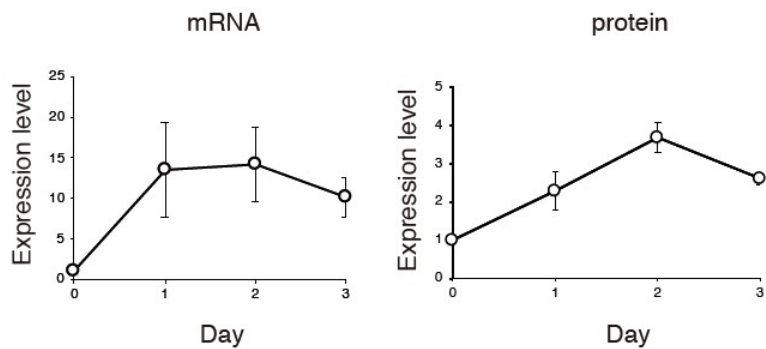


図2 抗原受容体した B 細胞における MELK 遺伝子 (mRNA) とタンパク (protein) の発現量の経時的変化

p16<sup>Ink4a</sup> 遺伝子の下流にヒト CD2 遺伝子をノックインしたマウスより採取した胎児繊維芽細胞について、p16<sup>Ink4a</sup> とヒト CD2 遺伝子の発現をフローサイトメトリーにより検討したところ、継代数依存的に p16<sup>Ink4a</sup> とヒト CD2 遺伝子の発現が上昇していた。このことから、このマウスが老化細胞特異的に細胞表面にヒト CD2 遺伝子を発現することが確認できた。このマウスの脾臓およびリンパ節より単離した T 細胞および B 細胞について、それぞれヒト CD2 の発現の有無を指標に老化細胞と非老化細胞を分取することができた (図 3)。

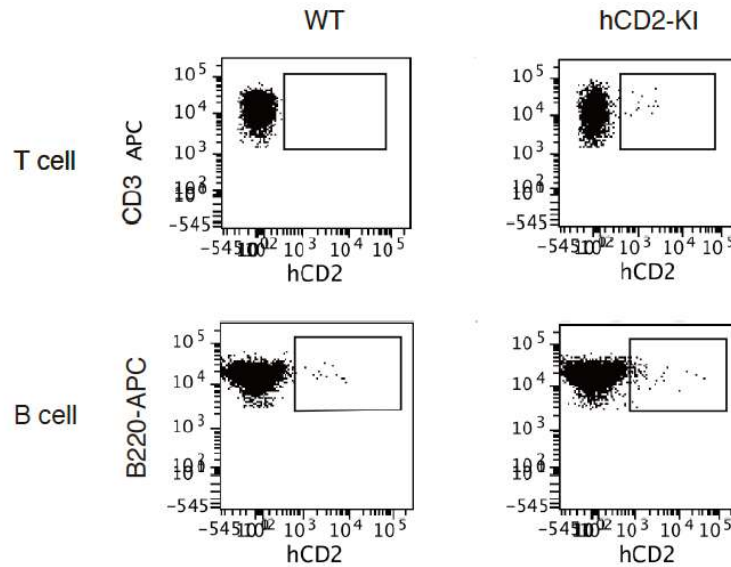


図3 野生型 (WT) およびヒト CD2 ノックイン (hCD2-KI) マウスの脾臓 T 細胞および B 細胞におけるヒト CD2 の発現

#### D. 考察と結論

本年度の研究において、マウスの胚中心 B 細胞で高発現しているシグナル因子を探索したところ、未感作 B 細胞と比較して MELK の発現が上昇していることが明らかになった。B 細胞が生体内で抗原刺激を受けるとプラズマ細胞に分化して生体防御おける機能を発揮するとともに長寿命を獲得して記憶細胞に分化するなどして生体内を監視することが知られている。本研究で同定した MELK は様々ながん細胞において発現の上昇が認められ、特にがん幹細胞において生存性と増殖能を亢進させていることが示されている。リンパ球が長寿命を獲得する過程は、特に T 細胞で解析が進んでおり、幹細胞様記憶細胞、中枢記憶細胞、エフェクター記憶細胞と分化し、幹細胞様の細胞が形成された後、必要に応じてこれらが増殖、分化することが示されている。このように、抗原刺激を受けたリンパ球とがん細胞は類似した分化、増殖の過程を経ること、どちらにおいても MELK の発現上昇が見られることから、両者の増殖、分化が部分的に同じシグナルによって制御されていることが示唆される。これらのことから、人為的に記憶細胞を作製し、高齢者に免疫記憶を導入するにあたり、B 細胞の記憶細胞への分化における MELK の役割を解明する意義は大きいと考えられる。

老化細胞インジケーターマウスについても樹立が進み、ヒト CD2 の発現を指標に老化細胞を可視化するマウスを作製することができ、B 細胞と T 細胞において老化細胞を単離することに成功した。これらについて遺伝子発現の差異を比較することにより、同一固体中での老化細胞と非老化細胞の性質の違いを明らかにできることが期待できる。また、単離した細胞の抗原応答性などを検討することにより、これらの細胞が老化することによる個

体の免疫機能への影響を明らかにすることができ、高齢者の獲得免疫機能低下の予防法開発に向けたメカニズム解明により一層の理解が深まることが期待できる。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 坂本明彦、錦見昭彦、高岡晃教、丸山光生、抗原特異的 B 細胞の増殖における DOCK11 の寄与、第 42 回日本分子生物学会年会、2019 年 12 月 6 日、福岡

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