

長寿医療研究開発費 2020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 バイオセーフティ管理室（室長）

研究要旨

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、リンパ球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。細胞老化に伴って細胞膜上にヒト CD2 (hCD2) を発現するノックインマウスに、サポリンを標識した抗 hCD2 抗体（イムノトキシン）を投与したところ、細胞老化した T 細胞と B 細胞がほぼ消失することが示された。また、次世代シーケンサーを用いた網羅的な解析により、老化に伴って T 細胞や B 細胞の表面に発現する分子を同定し、これら分子に対するイムノトキシンにより、野生型マウスにおいて老化リンパ球を除去できることが示唆された。また、抗原刺激に応答して発現する MELK について、胚中心 B 細胞での発現が認められたが、MELK 欠損 B 細胞は野生型と同等の免疫応答を示すことが明らかになった。

主任研究者

錦見 昭彦 国立長寿医療研究センター バイオセーフティ管理室（室長）

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。加齢や細胞老化にともなって B 細胞を含むリンパ球での発現が変化を解析し、老化することで増加する因子やリンパ球のサブセットを同定する。これら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

發揮して、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

細胞老化に伴って細胞膜上にヒト CD2 (hCD2)を発現するノックインマウス (hCD2 ノックインマウス) の静脈に、サポリン標識した抗 hCD2 抗体 (hCD2 イムノトキシン) を投与した。脾臓およびリンパ節から細胞を単離し、B 細胞および T 細胞における hCD2 の発現をフローサイトメトリーで解析した。

hCD2 ノックインマウスの T 細胞と B 細胞について、ヒト CD2 陽性細胞 (老化細胞) と陰性細胞 (非老化細胞) に分取した。それぞれの画分について次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析を行い発現する遺伝子を比較した。細胞表面に発現する分子に着目して比較し、老化リンパ球で発現が上昇しているものを選択し、実際の細胞での発現をフローサイトメーターで解析した。また、RNA-seq 解析により得られた結果に基づき、老化リンパ球の性質を検討した。

刺激に応答して発現量が上昇する MELK について、MELK 依存的に β ガラクトシダーゼが発現するレポーターマウスを作製した。抗原投与したマウスより脾臓と骨髄より単離した細胞をフローサイトメーターで解析した。B 細胞特異的に MELK を欠損したマウスを作製し、B 細胞の分化と免疫応答について検討した。

(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

hCD2 ノックインマウスに hCD2 イムノトキシンを投与ところ、脾臓およびリンパ節の T 細胞と B 細胞において hCD2 を発現する老化細胞が消失していた。このことから、イムノトキシンを用いて hCD2 ノックインマウスから老化リンパ球を除去できることが示唆された (図 1)。

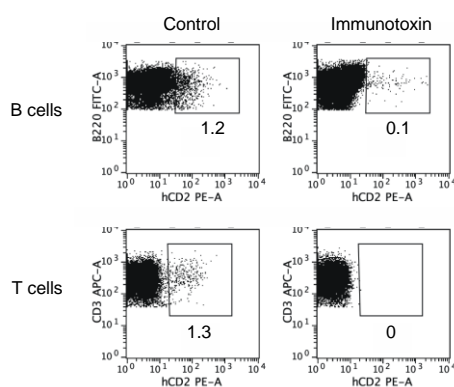


図1 イムノトキシン投与による脾臓 B 細胞と T 細胞における老化細胞の除去。数字は hCD2 を発現した老化細胞の割合 (%) を示す。

老化 T・B 細胞と非老化 T・B 細胞について RNA-seq 解析をおこない、T 細胞と B 細胞の両方で、老化細胞における遺伝子発現量が 2 倍以上増加している細胞表面分子を 7 種類同定した。フローサイトメーターを用い、細胞表面におけるこれら分子のタンパクレベルでの発現を比較したところ、2 種類の分子が加齢に応じて B 細胞、T 細胞で発現が上昇することが示された。

RNA-seq 解析の結果、老化 B 細胞において細胞骨格制御に関与する遺伝子の発現が上昇していることが示された。そこで、ケモカインに対する遊走能について検討したところ、老化 B 細胞 (age associated B cells) において、細胞遊走能が亢進していることが示された。

MELK レポーターマウスを、卵白アルブミンで免疫し、脾臓と骨髄より単離した細胞をフローサイトメーターで解析した。その結果、プレ B 細胞と胚中心 B 細胞で MELK 遺伝子の発現が上昇していることが示された。B 細胞特異的に MELK を欠損するマウスを作製し、B 細胞の分化、卵白アルブミンに対する抗体産生、抗原受容体刺激に応答した増殖とサイトカイン産生について検討したが、MELK を欠損しても B 細胞の分化や機能は正常であることが示された。

D. 考察と結論

hCD2 ノックインマウスを用いた検討から、老化細胞特異的に発現する表面抗原に対するイムノトキシンを用いることにより、個体から老化リンパ球を効率よく除去できることが示された。この実験系が、個体の免疫機能や炎症発症における老化リンパ球の影響を検討する上で有用なマウスモデルになることが期待される。また、RNA-seq とフローサイトメトリーによる解析から、加齢個体の T 細胞および B 細胞で発現が上昇する表面抗原を同定することができた。これらの分子を標的にしたイムノトキシンを作製することにより、野生型マウスにおいて、個体レベルで老化リンパ球を除去できる可能性が示唆された。

老化 B 細胞において、細胞骨格制御関連因子の発現が上昇していること、これらの B 細

胞の遊走能が亢進していることが示された。今後、各種ケモカインに対する遊走性の違いや、リンパ組織における局在を解析することにより、老化 B 細胞の免疫応答や炎症応答における役割が明らかになり、加齢個体における免疫機能のより一層の理解につながる事が期待できる。

刺激応答性に発現が上昇する因子 MELK について、個体レベルでの発現を検討したところ、外来抗原に応答して形成された胚中心の B 細胞で発現が上昇していることが示された。しかしながら、MELK を欠損しても B 細胞の機能や免疫応答は正常であり、B 細胞の免疫記憶形成には関与していないことが示唆された。今、T 細胞など他の免疫細胞に対象を広げて検討する予定である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 錦見 昭彦, 丸山 光生 老化が免疫系におよぼす影響 医学のあゆみ 273:535-540, 2020
- 2) 錦見 昭彦, 丸山 光生 リンパ球の老化と SASP 老年内科 2 : 631-637, 2020

2. 学会発表

- 1) 錦見 昭彦, 丸山 光生 新規老化細胞可視化マウスの作製と老化細胞における糖鎖の発現パターン 第 93 回日本生化学会大会, 2020 年 9 月 17 日, WEB 開催
- 2) 亀井 優香, 川口 耕一郎, 渡辺 憲史, 錦見 昭彦, 松田 一成, 杉本 昌隆, 丸山 光生 老化細胞可視化除去モデルマウスを用いた皮膚老化解析への試み 第 43 回日本基礎老化学会大会, 2020 年 5 月 27 日, 誌上開催

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