

令和元年6月7日現在

機関番号：21301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08075

研究課題名(和文) 加齢によって変化する2型免疫応答の機序解明と機能回復への挑戦

研究課題名(英文) Mechanisms of age-related changes in type 2 immune responses against nematode parasites in murine small intestine

研究代表者

森本 素子 (MORIMOTO, Motoko)

宮城大学・食産業学群(部)・教授

研究者番号：30250301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：免疫応答を減退させる一因として、リンパ球を不活性な状態へ導くPD-1や、長寿遺伝子として知られるSIRT1の関与が明らかになった。SIRT1の増加にはNAD+が必須であり、NAD+を増加させる-Nicotinamide mononucleotide (NMN) の投与により、加齢期の2型免疫応答の低下に改善がみられた。また、老齢マウスでは非感染時にも関わらずリンパ球の活性化シグナルを表すCD25+が高発現しており、慢性的にリンパ球が活性化状態にあると考えられた。また、老齢群では構成細菌の変化は認められるものの、極端な腸内細菌の多様性の喪失は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトや動物の健康を考えると、「ライフステージ」の視点は重要である。加齢期のさまざまな疾患に、免疫系の老化が関与する。寄生虫感染に対する宿主の防御応答も、加齢による影響を受けると考えられるが、詳細は明らかになっていない。ヒトの場合、寄生虫感染症は世界中で10億人以上が感染し、年間250万人が死亡する。家畜・愛玩動物においてもヒト以上に身近な感染症であり、オーナーにとっては経済的負担・損失も大きい。本研究の成果により、消化管の免疫老化の機序について得られた知見は、寄生虫感染症だけでなく、サイトカインのアンバランスがもたらす様々な疾患の予防治療にも有用な知見となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated primary responses of aged mice against *Heligmosomoides polygyrus*, a gastrointestinal nematode parasite. Gene expression of Th2 cytokines in the small intestine remained at uninfected levels in aged mice but significantly increased in young mice. Alterations in Th2 immune responses in aged mice might be due to inappropriate or insufficient activation of CD4+ T cells in the submucosa. We focused on one of the inhibitory molecules, programmed death 1 (PD-1). FACS analysis revealed that the ratio of PD-1+CD25+ cells was significantly higher in aged mice. Next, we examined gene expression of sirtuin, a well-known molecule against aging, in relation to Th2 cytokines. There was a significant correlation with regard to IL-4 and IL-13; a higher sirtuin expression was associated with a higher Th2 cytokine expression. In conclusion, the expression of PD-1 and sirtuin are important for appropriate activation of CD4+ T cells against nematode infection in aged mice.

研究分野：動物免疫学

キーワード：免疫老化 線虫感染 Th2応答

1. 研究開始当初の背景

加齢に伴い、免疫機能が変化することによって、様々な疾患が増加してくることが知られている。しかし、その変化は「免疫細胞の一律的な機能低下」によってもたらされるのではない。ナイーブ T 細胞の割合が減少し、新規の感染に対する反応が低下する一方、再感染の際に働くメモリー細胞の割合は増加する (Zanni F, et al Exp Gerontol 2003)。また、加齢期にはサイトカインのアンバランスや NF- κ B の活性化により炎症性反応は亢進する (Spencer NFL, et al Int Immunol 1997, 他)。我々は、寄生虫感染防御応答にも老化による変化が認められることを見出し、18 か月齢マウスでは3 か月齢に比較して Th2 サイトカイン遺伝子の発現が大きく減少する (図 1) が、CD4 陽性 T 細胞の数や小腸感染局所への集積に、有意な低下は見られないことを報告した (Morimoto M, et al Parasite Immunology 2015)。すなわち、感染に対し免疫担当細胞は誘導されているが、感染局所で適切な活性化が起こらないために、応答の低下が生じていると考えられた。本研究では、この「免疫細胞の適切な活性化を妨げるものは何か」という疑問を解明したいと考えた。

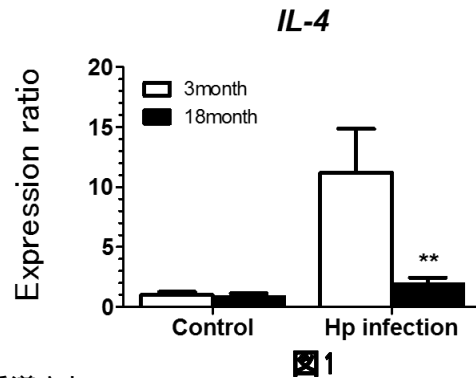


図 1

免疫系の老化についてはこれまでにさまざまな研究があり、未だ結論を得ていないが、最近、いくつかの重要な報告が出ている。PD-1 (programmed cell death 1) は免疫抑制受容体として、一過性に発現してリンパ球の活性化を調整する分子であるが、加齢に伴ってメモリー T 細胞に発現増加してくることがわかっている (Shimatani K, et al PNAS 2009)。また、ウシ白血球ウイルスに感染するとリンパ球が疲弊化し、膜表面に PD-1 が増加してリンパ球の反応低下が起こることや (Ikebuchi R, et al Vet Res 2011)、PD-1 が免疫系を抑制するために腫瘍発生に関与すること (Iwai Y, et al 2002) などが明らかにされており、加齢期の免疫機能低下にも極めて重要な分子と考えられる。しかし Th2 応答の低下への PD-1 の関与や、加齢に伴って PD-1 が発現増加してくるメカニズムについてはよくわかっていない。

一方、代謝や炎症応答をコントロールし個体の老化に関与する因子として大きな注目を集めているサーチュイン (Haigis MC & Sinclair DA Annu Rev Pathol 2010) が、樹状細胞 (DC) の活性化を通して Th2 応答に関与することが、最近明らかにされた。しかし、正負のいずれの方向に誘導するのかという点でまったく正反対の報告があり結論は出ていない (Legutko A, et al J Immunol 2011 他)。サーチュインはニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD⁺) 依存的に活性化されるタンパクで、NAD⁺が濃度依存的に CD4⁺T 細胞の分化を制御することが報告されている (Tullius SG, et al Nat Commun 2014)。したがって、感染局所 (小腸) における NAD⁺の蓄積量が加齢期の 2 型免疫応答の変化や PD-1 の発現に関与する可能性も強く示唆されるが、これまでに検証されていない。さらに、小腸は免疫細胞と小腸組織細胞が密接なネットワークを形成して虫を排除するしくみを持つため、小腸上皮細胞や平滑筋細胞の機能変化についても解析し、複合的に加齢期の腸内環境を理解することが重要であると考えられる。

2. 研究の目的

前述のとおり、免疫機能は加齢とともに変化する。研究代表者は、老齢マウスでは線虫に感染した際に、必要十分な 2 型免疫応答が誘導されず、虫が排除されないことを見出した。しかし、免疫系の老化は免疫応答が一律に低下することによって生じるのではなく、その機序を胸腺の退化やリンパ球数の減少によって単純に説明することはできない。そこで、本研究では、線虫感染マウスモデルを用いて、加齢によって変化する 2 型免疫応答の機序について解明し、高齢者および高齢動物の寄生虫感染防御、および加齢期のサイトカインのアンバランスが関与する種々の疾患の予防・治療に資することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) リンパ球フェノタイプの変化

げっ歯類の消化管内寄生線虫である *Heligmosomoides polygyrus* (Hp) は小腸粘膜下にシストを形成し、感染局所における免疫応答を調べるのに非常にすぐれたモデルである。18 か月まで飼育した Balb/c マウスに Hp を感染させ、サイトカイン産生がピークになる 8 日目に腸間膜リンパ節を採取し、FACS 法を用いて PD-1 を含むリンパ球の膜表面抗原の解析を行い、3 か月齢マウスと比較した。また、小腸のフローズンブロックを作成し、免疫染色法を用いて、シスト周辺に集積する免疫細胞のフェノタイプの変化について解析した。

(2) 老化に関与する分子の変化

老齢マウスでは、炎症性サイトカインの産生が亢進し、免疫系が常に活性化している状態が

長期間維持されたため、リンパ球の疲弊化が起こるのではないかと考えられた。その機序に關与する可能性が示唆されるサーチユインの発現について、リアルタイム PCR 法を用いて解析した。サーチユインを活性化する上で必須の補酵素として注目を集めている NAD⁺については、小腸組織を採取して凍結し、過塩素酸で分解した後 HPLC にロードして、その量を測定した。

(3) 加齢による機能低下を回復させる試み

NAD⁺の中間代謝物である Nicotinamide mononucleotide (NMN) が NAD⁺を増加させる物質として注目されている。サーチユインは NAD⁺依存的に作用するため、NAD⁺を増加させればサーチユインの機能が亢進する。Imai らは、NMN の投与により、加齢によって 2 型糖尿病を発症したマウスに糖耐性の改善がみられ、NMN の投与が糖尿病の治療に有効であることを示した (Cell Metab, 2011)。小腸組織細胞が 2 型サイトカイン依存的に機能低下しているとすれば、サーチユインの活性化によりリンパ球の機能回復が起こり、サイトカイン産生が正常化し、その結果小腸機能が回復する可能性がある。そこで、マウスに NMN を投与した後に線虫を感染させ、同様の解析を行って仮説を検証した。Moro および Koyasu らの研究 (Nature, 2010) や、研究代表者のこれまでの研究から、線虫感染に対する宿主の 2 型免疫応答は小腸上皮の IL-33 産生から始まることがわかっている。また、小腸上皮はシストで成長した虫が再び管腔に戻ってきた際に大量の粘液を産生し、虫を体外に排出する機能を持つため、虫の排除に対して非常に重要な働きを担う。つまり、免疫細胞と小腸上皮細胞は密接なネットワークを形成して生体防御に当たっている。そこで Laser Capture Microdissection (LCM) 法を用いて上皮細胞を分取し、IL-33 の遺伝子発現定量解析を行って加齢による変化について調べた。さらに、腸管粘膜免疫応答の制御に対しても、代謝系が関与することが最近明らかにされ、腸内細菌が産生する代謝物の重要性が指摘されている。そこで、NMN の投与により、加齢期の 2 型免疫応答が改善した場合、その機序に腸内細菌叢の関与があるかどうかについても検証した。

4. 研究成果

(1) リンパ球フェノタイプの変化

腸間膜リンパ節の細胞について FACS 法を用いて解析したところ、18 か月齢マウスで CD4⁺/CD25⁺/PD-1⁺細胞の割合が増加しており (図 2)、リンパ球の疲弊化が示唆された。老齢マウスでは非感染時にも関わらずリンパ球の活性化シグナルを表す CD25⁺が高発現しており、慢性的にリンパ球が活性化状態にあると考えられた。

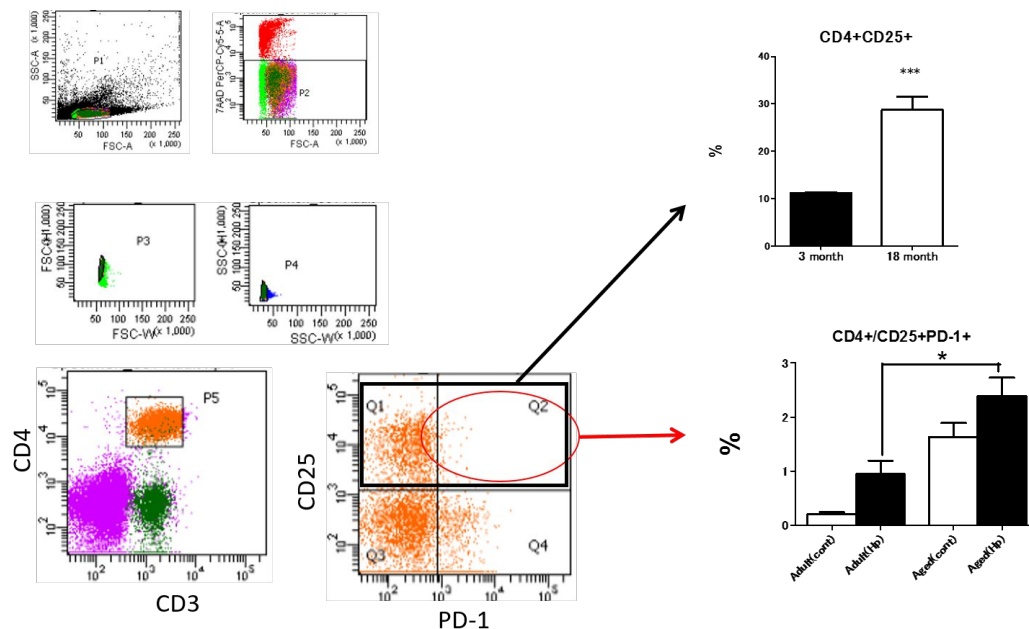


図 2

(2) 老化に關与する分子の変化

加齢マウスでは 2 型サイトカインである IL-4・IL-13 および ARG-1 の発現は有意に低下し、小腸粘膜下に形成される虫のシスト様構造周辺に集積する非炎症性マクロファージの数も減少することが確認された。

老化因子であるサーチユイン (SIRT) 1 の遺伝子発現は、IL-4 および IL-13 の発現と正の相関があった (図 3)。老齢個体のサイトカイン産生は個体差が大きい、感染後の IL-4 産生が低い個体は、SIRT1 の発現も低かった。この現象は 1 型サイトカインでは認められなかった。

一方、NAD⁺の測定については個体差が大きく一定の結論を得ることはできなかった。寄生虫感染における NAD⁺の關与についてはさらに検討が必要である。

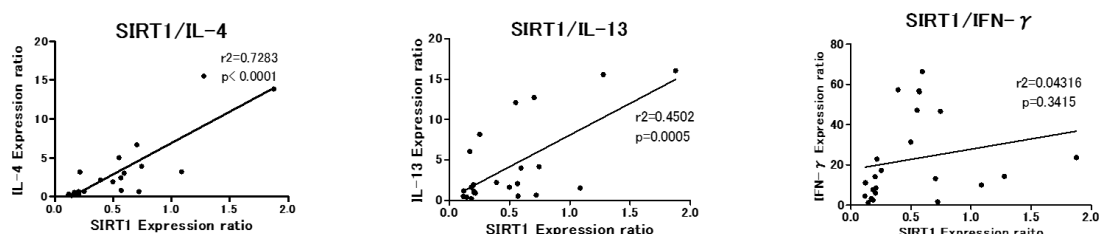


図 3

(3) 加齢による機能低下を回復させる試み

老齢マウスに NMN を投与した結果、Hp 感染後に 2 型サイトカイン (IL-4、IL-13、IL-10) の有意な増加が見られた (図 4)。また、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション (LCM) 法を用いて小腸上皮細胞を分取し、IL-33 の遺伝子発現定量解析を行ったところ、IL-33 の産生も増加した。蛍光免疫染色の結果、シスト周辺に集積する CD4+ 細胞やマクロファージの数に有意な差はなく、NMN の投与によるサイトカイン産生の増加が、感染局所における免疫担当細胞の数の増加によるものではないことが示唆された。

腸内細菌叢については、老齢群では構成細菌の変化は認められるものの、極端な腸内細菌の多様性の喪失は認められず、NMN 投与による大きな変化も見られなかった。したがって、NMN 投与後の Th2 サイトカイン産生の改善には、腸内細菌の関与は小さいものと考えられた。

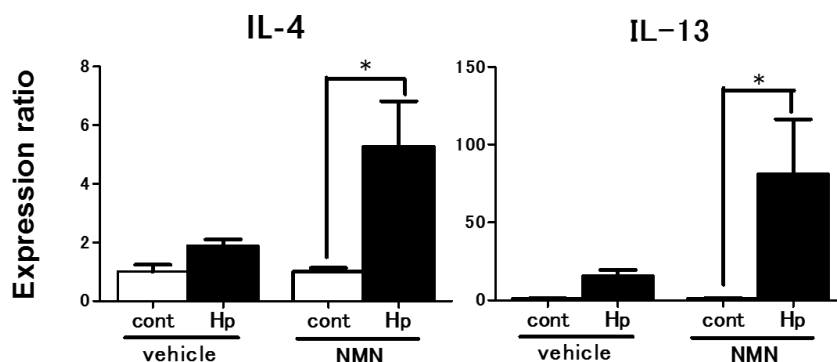


図 4

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 4 件)

Alteration of type 2 immune responses against nematode parasites in the gut of aged mice.

森本素子

第 47 回日本免疫学会 2018 年 12 月 10 日

線虫感染が誘導する 2 型免疫応答の加齢による変化

森本素子, 漆澤桃香

日本獣医学会学術集会講演要旨集 2018 年 9 月 12 日

The mechanisms of age-related changes in type 2 immune responses against nematode in murine small intestine

森本素子

Mucosal Immunology MICS2018 2018 年 7 月 19 日

消化管内線虫と免疫応答～腸管生理機能との連携

森本素子

牛臨床寄生虫研究会 2017 年 7 月 15 日

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：高井俊行

ローマ字氏名：Takai Toshiyuki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。