

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18323

研究課題名(和文)高齢者敗血症における長期免疫評価とリンパ球活性化因子を用いた新規治療戦略

研究課題名(英文) Long-term immune evaluation and novel therapeutic strategy using lymphocyte activating factor in elderly with sepsis

研究代表者

齋藤 雅史(Masafumi, Saito)

神戸大学・医学研究科・特命助教

研究者番号：80826321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Interleukin-15(IL-15)がマウス腹膜炎モデルの生存率を有意に改善したことを報告したが、高齢敗血症の免疫機構に対する効果は不明であった。そこで、若齢・高齢マウス反復感染モデルを作成し、長期的な免疫疲弊の機序とIL-15の効果を比較した。反復感染モデルにおいて、50日生存率は若齢群で91%、高齢群で69%、IL-15を投与した若齢・高齢群では100%であった。末梢血中のProgram death-1(PD-1)陽性CD4+・CD8+T細胞と制御性T細胞(Treg)の割合は、若齢群と比較して高齢群において有意に増加したが、IL-15投与群では有意に減少、その効果は50日間持続した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、敗血症患者の多くは高齢者であり、生命予後は極めて悪い。既知の研究から、生命予後の悪化は敗血症に伴う強烈的な免疫抑制と長期化が原因と考えられてきたが、免疫抑制の期間やそのメカニズムは不明であった。本研究において、高齢マウスでは若齢マウスと比較して、免疫応答を抑制するPD-1陽性T細胞やTregの血中での割合が持続的に高値を示すことが明らかとなった。それに対して、IL-15を投与することで、高齢マウスの生命予後を改善し、免疫を賦活化することが示された。この結果から、IL-15が高齢者敗血症の新規の治療ターゲットとなり、二次感染のリスク低減にも寄与する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Although Interleukin-15(IL-15) significantly improved the survival rate in a septic mouse model, its effect on the immune mechanism of aged septic mice was still unknown. Therefore, we established repeated infection models by using cecal slurry injection to induce sepsis in young and old mice and investigated the effects of IL-15 for long-term immune exhaustion. In the repeated infection model, the 50-day survival rate was 91% in the young group, 69% in the old group, and 100% in the young and old groups treated with IL-15. Although the percentage of program death-1(PD-1)-expressed CD4+/CD8+ T cells and regulatory T cells(Treg) in peripheral blood was significantly increased in the aged group compared with the young group. When administered IL-15 with aged septic mice, this phenotype of T cells were significantly decreased in the peripheral blood during 50 days.

研究分野：救急医学

キーワード：敗血症 高齢者 IL-15 免疫抑制

## 1. 研究開始当初の背景

敗血症は、Sepsis-3 において、感染に対する制御不能な宿主応答に起因する生命を脅かす多臓器障害として定義される。近年、ガイドラインの制定や医療技術の革新などに伴い、先進国における敗血症患者の死亡率は大きく改善された。米国においては、敗血症患者の生存率は 80% 程度まで改善されている。しかしながら、その一方で、敗血症ははまだ集中治療分野において死亡率の高い疾患であり、2017 年においては世界で約 4,890 万人が敗血症に罹患し、そのうち 1,100 万人が亡くなったと推定されている。その死亡者の多くが免疫弱者である新生児や高齢者、あるいは医療技術水準の低い地域における患者で占められており、彼らの生存率の改善が大きな課題となっている。

加齢により獲得免疫機能が低下することや、胸腺、脾臓などのリンパ組織の機能低下によるリンパ球 (T 細胞や B 細胞) の数的・質的低下が起こることはよく知られている。そのため、高齢者は感染症に罹患しやすく、重篤化しやすいと考えられている。実際、敗血症においては、65 歳以上の高齢者敗血症の 3 ヶ月後生存率は 18~64 歳の成人敗血症と比較して有意に低い。また、興味深いことに、死亡した高齢敗血症患者の 80% が入院後 7~28 日後の亜急性期であり、その死亡要因は「免疫不全による二次感染」であると報告がなされている。すなわち、高齢者敗血症患者の死亡要因と獲得免疫系の機能低下が深く関連していることを示唆する。よって、敗血症罹患により誘発される強烈的な免疫抑制がいつまで続くのかを明らかにすること、また、低下した獲得免疫機構を賦活化することが、高齢者敗血症患者の生命予後を改善するためには極めて重要である。

Interleukin-15 (IL-15) は Natural Killer (NK) 細胞や CD8<sup>+</sup>T 細胞の増殖に不可欠なサイトカインであり、これらの細胞の細胞死を抑制する効果を示す。既知の敗血症モデルマウスを用いた研究から、IL-15 は、若齢敗血症マウスの生存率を顕著に改善したことが明らかにされていた。しかしながら、IL-15 が高齢敗血症マウスの生存に与える影響や、敗血症により誘導される遷延する免疫抑制に与える効果については、ほとんど研究がなされていない。

## 2. 研究の目的

本研究は、敗血症による免疫抑制の長期化を抑え、高齢患者の長期予後を改善するための基礎的な知見を得ることを目的として、1) 敗血症により誘導される免疫抑制の発症と長期化するメカニズムを明らかにすること、および 2) 遷延する免疫抑制に対する IL-15 の効果について検討する。

## 3. 研究の方法

先述したように、高齢敗血症患者の死因の多くが、敗血症による免疫抑制が原因の二次感染である。そこで、これまでの敗血症マウスモデルをより臨床に近づけるために、反復感染モデルを作製した。マウスの盲腸から摘出した盲腸内容物 (Cecal slurry : CS) を、若齢 (6~8 週齢) および高齢 (18~24 ヶ月齢) マウスに 4 回 (day 0, 3, 7, 10) 腹腔内に投与することでモデルを作製した。以降の研究は、この反復感染モデルを使って行った。

研究 1 : 高齢敗血症マウスを用いて免疫抑制メカニズムの長期化を明らかにするために、敗血症誘導後 50 日間、マウスの末梢血を定期的にサンプリングし、T 細胞の動態を解析した。具体的には CD4<sup>+</sup>T 細胞および CD8<sup>+</sup>T 細胞、免疫抑制に関与する Program death-1 (PD-1) 陽性 T 細胞と制御性 T 細胞 (Treg) の変動についてフローサイトメトリーで解析した。また、短期間ではあるが、高齢敗血症マウスと若齢敗血症マウスの末梢血中のマクロファージや好中球といった自然免疫系の細胞についても解析を行なった。

研究 2 : 高齢敗血症マウスにおける IL-15 投与の効果判定するため、反復感染モデルに対して 1.5  $\mu$ g の mouse recombinant (mr) IL-15 を 3 回 (day 4, 7, 10) 投与した。その後、敗血症誘導から 50 日目まで血中の T 細胞の動態を解析し、さらに、IL-15 の自然免疫系の細胞に対する効果についても検討した。

## 4. 研究成果

4-1) 反復感染モデルにおいて IL-15 投与は、高齢敗血症マウスの生存率を改善する傾向を認めた

CS を反復投与して作製した反復感染モデルにおいて、若齢、高齢マウスのいずれも顕著な減少低下が認められた。若齢敗血症マウスは CS 投与から 10 日目には体重が回復したのに対し、高齢マウスでは回復しなかった。

若齢マウスの 50 日間の生存率は 91.7% であったのに対し、高齢マウスでは 69.2% まで低下した (図 1)。それに対し、1.5  $\mu$ g mrIL-15 を投与したところ、若齢、高齢、いずれの敗血症マウスにおいても死亡個体は認められなかった (図 1)。反復感染モデルにおいて、高齢敗血症マウスでの mrIL-15 投与群と非投与群とでは生存率試験では有意な差が認められなかったものの、一定の効果は示せたと考えられた。

#### 4-2) 反復感染モデルにおいて mrIL-15 投与は、高齢敗血症マウスの CD4<sup>+</sup>T 細胞の減少を抑制した

一般的に、加齢とともに CD4<sup>+</sup>T 細胞は減少することが知られている。本研究において、高齢敗血症マウスは若齢敗血症マウスと比較して、末梢の CD4<sup>+</sup>T 細胞は顕著に低値を示した(図 2A)。

若齢敗血症マウスにおいて、mrIL-15 非投与群では敗血症誘導開始から 2 週間程度まで減少し続けたのに対し、mrIL-15 投与群ではその減少が抑制され、持続的な高値を示した(図 2A)。高齢敗血症マウスにおいても、若齢敗血症マウスと同様、mrIL-15 投与により末梢の CD4<sup>+</sup>T 細胞は持続的な高値を示した(図 2A)。

興味深いことに、mrIL-15 投与により高齢敗血症マウスにおいて Naïve CD4<sup>+</sup>T 細胞の割合が増加することが認められた(図 2B)。また、高齢敗血症マウスにおいて免疫抑制に關与する PD-1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞や Treg の増加が、mrIL-15 投与により持続的に抑制された(図 2C, D)。このような効果は、若齢敗血症マウスでは認められなかった。

#### 4-3) 反復感染モデルにおいて mrIL-15 投与は、高齢敗血症マウスの Naïve CD8<sup>+</sup>T 細胞を増加した

末梢の CD8<sup>+</sup>T 細胞に対する IL-15 の効果を検討した。若齢敗血症マウスにおいて CD8<sup>+</sup>T 細胞は、mrIL-15 投与群では非投与群と比較して持続的な高値を示したが、高齢敗血症マウスにおいては効果が認められなかった(図 3A)。しかしながら、mrIL-15 を投与した高齢敗血症マウスにおいて、Naïve CD8<sup>+</sup>T 細胞の割合は顕著に増加した一方(図 3B)、PD-1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞は持続的に低値を示した(図 3C)。Naïve CD8<sup>+</sup>T 細胞の増加は、mrIL-15 を投与した若齢敗血症マウスにおいても同様の結果が認められた(図 3C)。

#### 4-4) 反復感染モデルにおいて mrIL-15 投与は、高齢敗血症マウス脾臓中の CD4<sup>+</sup>T 細胞および NK 細胞を増加した

敗血症誘導開始から 12 日目において、敗血症マウスの脾臓中の CD4<sup>+</sup>T 細胞、CD8<sup>+</sup>T 細胞および NK 細胞に対する IL-15 の影響について調べた。その結果、脾臓中の CD4<sup>+</sup>T 細胞は、mrIL-15 を投与したマウスにおいて、若齢敗血症マウス、高齢敗血症マウスともに、非投与群と比較して有意に高く、CD8<sup>+</sup>T 細胞は増加傾向が認められた。また、脾臓中の NK 細胞の割合を調べたところ、mrIL-15 を投与したマウスにおいて、若齢敗血症マウス、高齢敗血症マウスともに、非投与群と比較して有意に高かった(図 4A)。

#### 4-5) 反復感染モデルにおいて mrIL-15 投与は、高齢敗血症マウスのマクロファージ貪食活性を上昇した

最後に、反復感染モデルにおいて、mrIL-15 投与が高齢敗血症マウスのマクロファージに及ぼす影響について検討した。若齢敗血症マウスと比較して、高齢敗血症マウスでは末梢血中のマクロファージの割合が顕著に高かった。mrIL-15 の投与により、若齢および高齢敗血症マウスのいずれにおいても、末梢血中のマクロファージの割合は顕著に増加した(図 4B)。また、高齢敗血症マウスにおいて、mrIL-15 の投与によりマクロファージの貪食活性が上昇した(図 4C)。

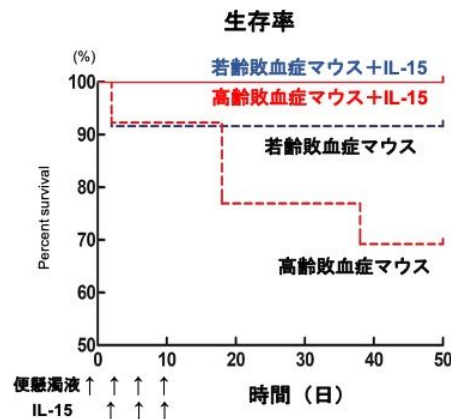


図 1. 反復感染モデルにおける高齢敗血症マウスの生存率と IL-15 投与の効果

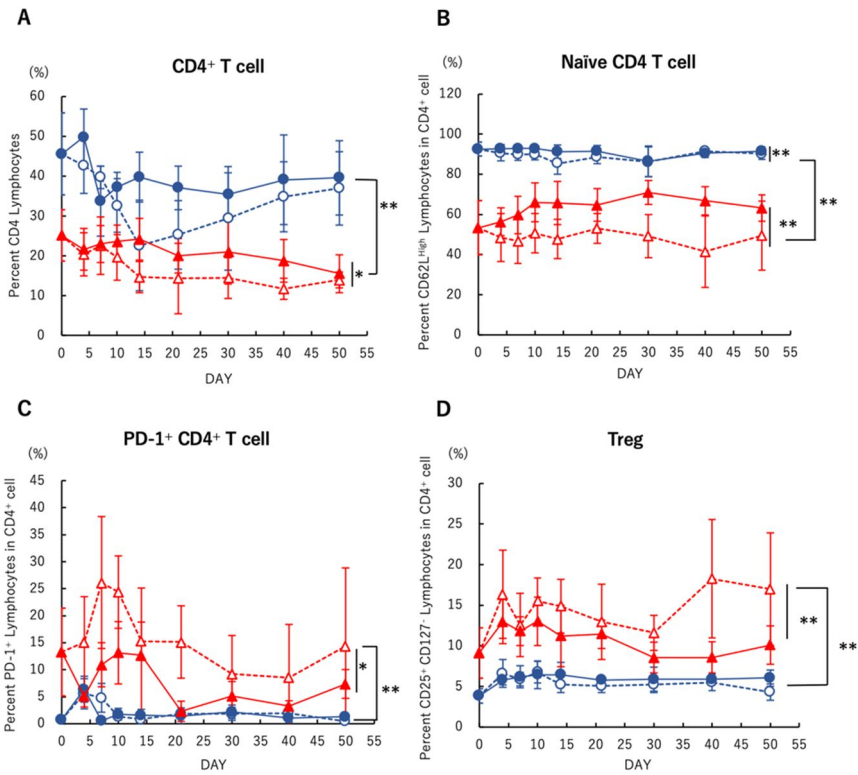


図2. 反復感染モデルにおける高齢敗血症マウスのCD4<sup>+</sup>T細胞の推移とIL-15投与の効果  
 若齢敗血症マウスは○、高齢敗血症マウスは△で示し、mrIL-15を投与した若齢敗血症マウスは△、高齢敗血症マウスは△で示した。\*p<0.05, \*\*p<0.01。

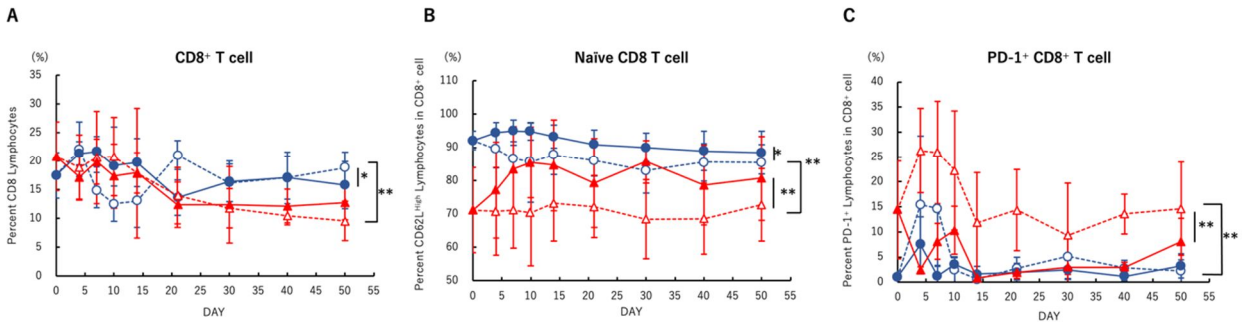


図3. 反復感染モデルにおける高齢敗血症マウスのCD8<sup>+</sup>T細胞の推移とIL-15投与の効果  
 若齢敗血症マウスは○、高齢敗血症マウスは△で示し、mrIL-15を投与した若齢敗血症マウスは△、高齢敗血症マウスは△で示した。\*p<0.05, \*\*p<0.01。

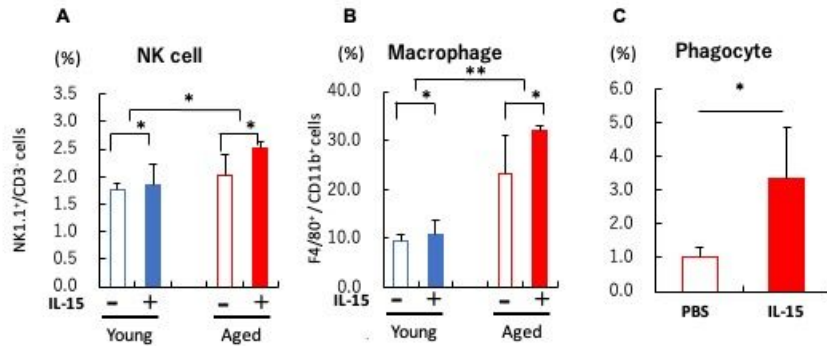


図4. 反復感染モデルにおける高齢敗血症マウスの脾臓NK細胞およびマクロファージの貪食活性に与えるIL-15投与の効果  
 若齢敗血症マウスは○、高齢敗血症マウスは△で示し、mrIL-15を投与した若齢敗血症マウスは△、高齢敗血症マウスは△で示した。\*p<0.05, \*\*p<0.01。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masafumi Saito, Shigeaki Inoue, Kimihiro Yamashita, Yoshihiro Kakeji, Takumi Fukumoto, and Joji Kotani	4. 巻 53
2. 論文標題 IL-15 improves aging-induced persistent T cell exhaustion in mouse models of repeated sepsis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 SHOCK	6. 最初と最後の頁 228-235
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 齋藤雅史、井上茂亮、藤岡一路、小谷穰治
2. 発表標題 高齢マウス反復感染モデルにおける長期的な疲弊の機序解明とIL-15の効果
3. 学会等名 日本Shock学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤雅史、井上茂亮、安藤維洋、山田勇、前田裕二、小谷穰治
2. 発表標題 高齢マウス反復性敗血症モデルにおいて IL-15は遷延するT細胞疲弊を長期間改善する
3. 学会等名 日本集中治療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤雅史、井上茂亮、山田勇、安藤維洋、山下公大、掛地吉弘、福本巧、小谷穰治
2. 発表標題 IL-15は、高齢マウス敗血症のT細胞疲弊と マクロファージ機能を改善し、 長期予後を改善する
3. 学会等名 日本外科代謝栄養学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masafumi Saito, Shigeaki Inoue, Joji Kotani
2. 発表標題 Interleukin-15 improves aging-induced persistent T cell exhaustion in mouse models of repeated sepsis
3. 学会等名 American shock society
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関