

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02929

研究課題名(和文) 新規免疫制御因子Gas6/Axlによる免疫老化の制御に関する研究

研究課題名(英文) Regulation of immune response by aging-induced Gas6/Axl axis.

研究代表者

柴田 岳彦 (Shibata, Takehiko)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00739196

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：高齢者では感染症が重症化しやすい。本研究では、加齢に伴いレベルが上昇する growth arrest-specific protein (Gas6) に着目し、重症化機構を解明することを目的とした。若齢マウスと老齢マウスを比較した結果、老齢マウスではGas6レベルが高く、インフルエンザウイルス感染による生存率が低下した。Axl阻害剤BGB324の投与により、老齢マウスの初期インターフェロン産生が回復し、生存率が向上した。このことから、Gas6が初期免疫応答を抑制し、過剰な炎症を引き起こすことが示唆された。また、Gas6は細胞老化に伴い誘導されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、加齢に伴い誘導されるGas6/Axlシグナルによる感染症重症化機構を解明した。これにより、老化と免疫応答の関連性に関する新たな知見を提供し、老化現象の理解を深める。また、Gas6やその受容体Axlを標的とした感染症の治療法の開発が期待される。特に高齢者の感染症予防や治療に応用することで、感染症による重症化を防ぎ、健康寿命の延伸に貢献する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Elderly individuals are more susceptible to severe infections. This study focused on growth arrest-specific protein (Gas6), which increases with aging, to elucidate the mechanisms of disease severity. Aged mice had higher Gas6 levels and a lower survival rate after influenza virus infection compared to young mice. Administration of the Axl inhibitor BGB324 restored early interferon production and improved survival rates in aged mice. These results suggest that Gas6 suppresses the early immune response and triggers excessive inflammation. Additionally, it is suggested that Gas6 is induced in association with cellular senescence.

研究分野：感染免疫学

キーワード：感染症 重症化 加齢 Gas6 Axl 細胞老化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

高齢者はウイルスや細菌などの病原体感染に伴う重症化リスクが高い。また、加齢に伴いワクチンの有効性の低下や、気管支喘息などアレルギー発症リスクの上昇がみられる。これら原因のひとつは、個体の老化とされる。個体老化とは「加齢に伴い死亡率が増加する原因となる様々な生体の機能低下」と定義される生命現象である。そして、そのひとつが「免疫系の機能低下」である。具体的には、炎症反応を制御する機構や、自然免疫や獲得免疫による非自己を排除する機構の低下である。前者の誘導機構に関してはいくつかの報告があるが、後者に関する報告はほとんどなく、どのようにこうした免疫老化をもたらすのか、そのメカニズムは解明されていなかった。

## 2. 研究の目的

以前の我々の研究において、若齢マウスにおいて呼吸器ウイルス感染やその抗原接種、あるいは気管支喘息で産生される growth-arrest specific 6 (Gas6) がその受容体 Ax1 を介して感染症の重症化、防御抗体産生の抑制、アレルギー性気道炎症の誘発をもたらすことを見出した。一方、その後の予備的実験により、このような感染やアレルギーに罹患していなくても、ヒトとマウスにおいて加齢に伴い血中 Gas6 濃度が上昇するという結果を得た。すなわち、加齢に伴う免疫機能の低下の一つは、Gas6 によってもたらされることが予想された。そこで本研究では、加齢に伴う Gas6 レベルの上昇が「免疫老化」の原因となるか明らかにすることを目的とし、以下を検討した。

### (1) 老齢マウスの免疫応答 (若齢マウスと比較)

- ① ウイルスに対する応答 (生存率や炎症応答)
- ② ワクチン接種後のウイルスに対する応答 (ウイルスタイターや防御抗体産生)
- ③ アレルギーの増悪 (気管支喘息の増悪)

### (2) Gas6/Ax1シグナルによる老齢マウスの免疫応答の制御

- ① 老齢マウスにおける Gas6/Ax1シグナルによる病態悪化の機構
- ② 老齢マウスにおける Gas6産生機構

## 3. 研究の方法

### (1) 老齢マウスの病原体感染に対する応答

#### ① インフルエンザウイルス感染に対する老齢マウスと若齢マウスの応答の比較

老齢マウスと若齢マウスにインフルエンザウイルス (H1N1) を経鼻的に感染させた。まず、体重と生存率の経時的変化を比較した。次に、肺炎球菌感染 2 日後と 8 日後の老齢マウスの免疫応答を調べた。具体的には、免疫細胞数、サイトカイン産生、病理学的観察をそれぞれフローサイトメトリー、RT-PCR、ELISA、HE 染色により検討した。

#### ② 老齢マウスの Gas6/Ax1シグナルを阻害したときの応答

若齢、老齢マウスに Ax1 阻害剤 (BGB324) を腹腔投与し、インフルエンザウイルスを感染させたときの生存率の変化や、免疫応答を調べた。

#### ③ 老化細胞による Gas6産生

MLE-12 細胞 (肺上皮細胞) 細胞に doxorubicin (DOX) を添加することにより老化細胞を誘導した。老化細胞マーカーである p16 と Gas6 レベルを RT-PCR と ELISA により調べた。

**【1 研究目的、研究方法など (つづき)】****(2) 老齢マウスに対するワクチンの効果**

老齢マウスと若齢マウスに RS ウイルスの F タンパクを接種し、血中の抗 F タンパク抗体価を比較した。またそれら抗体の中和活性について HEp-2 細胞を用いた *in vitro* の系で調べた。

**(3) 老齢マウスのアレルギーに対する応答**

House dust mite (HDM) 誘導アレルギー性気道炎症モデルを用いて、老齢マウスと若齢マウスの免疫応答を比較した。具体的には、気道抵抗値 (AHR)、Th2 サイトカイン産生、好酸球浸潤、粘液産生を調べた。

**4. 研究成果**

まず、ウイルスに対する応答、ワクチン接種後のウイルスに対する応答、アレルギーの発症について、それぞれのモデルを若齢マウスと老齢マウスを用い作製した。そして、免疫応答を若齢マウスと比較して検討した。

**(1) 老齢マウスの病原体感染に対する応答****① 老齢マウスにおける感染初期の免疫応答の抑制とそれに続く重症化**

若齢者より高齢者において感染症が重症化することを模倣するために、若齢と老齢マウスにインフルエンザウイルス (IAV) を経鼻経投与してインフルエンザモデルマウスを作製した。結果、若齢群と比較して老齢群において生存率が低下した。次に、肺の HE 染色像を観察すると、感染 4 日目では若齢群の方が老齢群よりも炎症が強くみられた。そして、感染 14 日目の後期にかけて炎症が終息した。一方、老齢群は感染 4 日目では炎症応答がほとんど誘導されず、感染 14 日目まで生き残ったマウスでは強い炎症がみられた。これらの結果と一致し、感染初期の 4 日目では、若齢群の方が炎症生サイトカインである TNF- $\alpha$  および interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) が高発現した。一方、感染 14 日目では、若齢群より老齢群において発現量が増加した。さらに、老齢群の感染 4 日目において、抗ウイルス性サイトカインである IFN- $\beta$  の発現量が若齢群と比較して低下した。また、感染 4 日目と感染 8 日目でウイルス価を調べると、ともに若齢群より老齢群においてウイルス量が多く、老齢群ではウイルスのクリアランスが遅延した。

**② 加齢に伴う Gas6 発現の上昇**

これまでの結果より、老齢群において IAV 感染初期に何らかの因子による炎症応答を含めた免疫応答の抑制が予想された。これに関して、これまでに我々の研究グループは、致死量のウイルス感染に伴い産生される Gas6 がその受容体 Ax1 を介して IFN- $\beta$  や炎症性サイトカイン産生を強く抑制し、結果的に感染症の重症化を引き起こすことを示してきた。また、若齢者と比較して高齢者において Gas6 レベルが高値となることを予備的実験にて明らかにした。すなわち、感染に関係なく加齢に伴い Gas6 レベルが上昇することが予想された。そこで、これについてマウスレベルで検証した。加齢による Gas6 発現量を定量化するために、若齢と老齢のナイーブマウスを用い、ELISA により肺、気管支肺胞洗浄液 (BAL)、血清における Gas6 タンパクレベルを比較検討した。結果、若齢よりも老齢群の BAL と血清において、Gas6 レベルが高値となった (図 1)。次に、Gas6 発現細胞を調べるために肺切片を免疫組織化学染色したところ、Gas6 は老齢マウスの気道上皮細胞において高発現することが確認された (図 2)。以上より、加齢に伴い Gas6 レベ

【1 研究目的、研究方法など (つづき)】

ルが上昇し、これが感染症の重症化を招く可能性が示唆された。

図1. 老齢マウスの血清中 Gas6レベルの上昇

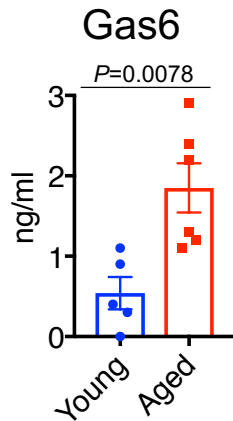
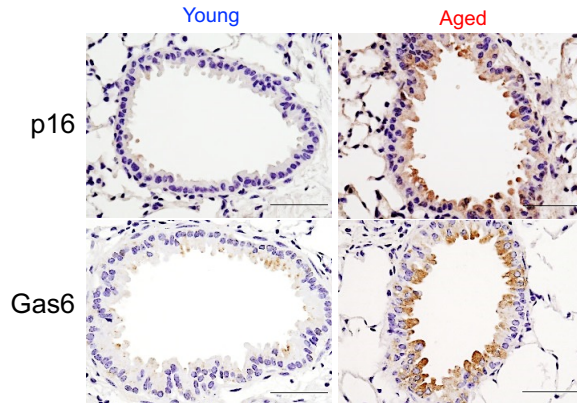


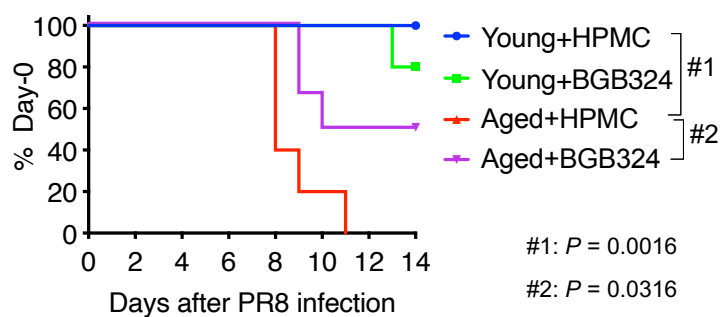
図2. 老化細胞とGas6産生



③ Gas6 レベルの上昇による感染症の重症化

加齢に伴う Gas6 レベルの上昇が感染症の重症化の原因であるか調べるために、Ax1 阻害剤である BGB324 の投与により Gas6/Ax1 シグナルを抑制し、上記同様にインフルエンザマウスモデルを作製した。まず、生存率の変化を検証したところ、インフルエンザを感染させた老齢マウス群は 11 日目で全滅したが、BGB324 を投与した老齢群では、生存率の低下が抑制された (図 3)。老齢群における IAV 感染初期では、BGB324 の投与によりコントロール群と比較して IL-6、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  の発現量が上昇した。また、IFN- $\beta$  の発現も同様に上昇した。以上より、老齢マウスにおいて元々高発現する Gas6 は Ax1 を介して感染初期の炎症応答を含む免疫応答を抑制し、結果として感染症を重症化させることが示唆された。

図3. 老齢マウスにおけるGas6/Ax1による感染症の重症化 Survival



④ 細胞老化による Gas6 発現の上昇

老化個体内では老化細胞が増加する [12]。実際、肺における代表的な老化マーカーの一つである p16 の mRNA 発現量を RT-PCR で解析したところ、若齢よりも老齢群において高値となった。さらに、p16 の発現細胞を同定するために、肺切片を免疫組織化学染色した。結果、特に老齢マウスの気道上皮細胞において p16 が発現することが確認された。老齢マウスの気道上皮細胞においてみられる p16 の発現パターンは Gas6 発現 (図 3) と傾向が一致した。すなわち、老化した気道上皮細胞が Gas6 を発現する可能性が示唆された。

**【1 研究目的、研究方法など (つづき)】**

加齢とともに気道上皮細胞で多くの Gas6 が発現するメカニズムを解明するために、細胞老化に注目し、Gas6 産生機構の解明を試みた。*in vitro*の実験として、肺上皮細胞である MLE-12 細胞を doxorubicin (DOX) で処理し、細胞老化を誘導した際の Gas6 の発現を検討した。MLE-12 細胞を異なる濃度の DOX により処理し、48 時間後に解析を行った。p16、p53、Gas6 発現量について RT-PCR で解析すると、まず 50nM の DOX で p53 の発現量が上がり、次いで 500nM の DOX で老化細胞の維持に欠かせない p16 の発現量が上がった。この際の Gas6 の発現量は、50nM の DOX でも上昇したが、500nM の DOX 処理により顕著に上昇した。さらに、DOX 処理とは異なる方法を用いた細胞老化に伴う Gas6 発現について検討した。MLE-12 細胞の培地に含まれる FCS 濃度を通常よりも低濃度にし、培養した。結果、p16 と p53 の発現量は、FCS 含有度 0% の条件において最も発現量が上昇した。同様に、Gas6 発現は、FCS 含有度 2% および 0% の条件下において発現が上昇した。以上の結果より、老化細胞が誘導されると、Gas6 が誘導される可能性が示唆された。そこで、細胞老化と Gas6 発現の関連性を検討するために、p53 の阻害剤である pifithrin- $\alpha$  (PFT $\alpha$ ) を用いた実験を実施した。DOX 処理した MLE-12 に PFT $\alpha$  を添加し、その後の Gas6 の発現量を調べた。PFT $\alpha$  を添加したのち DOX で処理すると、p53 や p16 の発現が低下したが、同時に Gas6 発現も有意に低下した。以上の結果より p53 や p16 が関連した細胞老化により Gas6 産生が誘導されることが示唆された。

以上の結果により、加齢に伴う感染症の重症化機構として Gas6/Axl が見出され、Gas6 の誘導機構として細胞老化が候補となった。今後、細胞老化における Gas6 誘導機構を解明すること、加齢以外の感染症重症化リスクが高い疾患と Gas6 の関連性を検討することが重要となる。この成功は、Gas6/Axl に限らず細胞老化をターゲットにしたより広範な感染症の重症化予防や治療法の開発につながることを期待される。

**(2) 老齢マウスに対するワクチンの効果**

ワクチン接種後のウイルスに対する応答を調べるために、老齢マウスと若齢マウスに RS ウイルスの F タンパクを接種し、血中の抗 F タンパク抗体価を比較した。結果、抗体価に差はみられなかった。また、それら抗体の中和活性について HEp-2 細胞を用いた *in vitro* の系で調べたところ、中和活性に差はなかった。

**(3) 老齢マウスのアレルギーに対する応答**

アレルギーの発症について検討するために、老齢マウスと若齢マウスを用いて、HDM 誘導アレルギー性気道炎症モデルを作製し、免疫応答を比較した。結果、AHR、Th2 サイトカイン産生、好酸球浸潤、粘液産生について、老齢マウスと若齢マウス間での差はなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柴田岳彦
2. 発表標題 R Sウイルス感染症と免疫応答
3. 学会等名 第34回日本薬学会微生物シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yukie Kure, Takehiko Shibata
2. 発表標題 High levels of Gas6 induced by cellular senescence in aged mice cause severe infections
3. 学会等名 第52回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2024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
---------	---------