

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08492

研究課題名（和文）T細胞早期老化モデルマウスを用いたワクチン有効率改善方法の検討

研究課題名（英文）Investigation of vaccine efficacy using a mouse model of T-cell early senescence

研究代表者

松本 哲（Matsumoto, Akira）

愛媛大学・医学系研究科・講師

研究者番号：90363233

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：Meninを欠損させたT細胞は、早期老化形質を示すことから、免疫老化解析ツールとして適している。T細胞特異的にMeninを欠損させたマウスでは、抗原特異的な抗体産生能の低下が認められた。抗体産生能低下の分子機構を解析するとともに、*in vitro*においてT細胞の早期老化を抑制することができた低分子化合物をマウスに投与することで抗体産生能の改善が認められるか検討したが、有意な改善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

免疫系細胞の中でもT細胞は加齢の影響を特に強く受け、高齢者の体内では老化T細胞が増加することが示されている。老化T細胞は、記憶T細胞への分化能が著しく低下することから、高齢者におけるワクチン有効率の低下は、老化T細胞の増加が原因であると考えられる。そのため、T細胞の老化誘導機構を解明し、その制御法を見出すための研究は、ワクチン有効率を改善することに大きく貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Menin deficient T cells exhibit early senescence, making them suitable as a tool for immunosenescence analysis. Mice deficient in T cell-specific Menin showed decreased antigen-specific antibody production capacity. In addition to analyzing the molecular mechanism of the reduced antibody production capacity, we examined whether antibody production capacity could be improved by administering to mice a small molecule compound that was able to suppress premature senescence of T cells *in vitro*, but no significant improvement was observed.

研究分野：免疫学

キーワード：Menin ワクチン Tfh

1. 研究開始当初の背景

感染症は、世界的にみても死亡要因の高い疾患である。近年、人や物の国際的な移動が活発に行われることにより、世界的な感染症が流行し問題となっている。本邦において、感染症に起因する死者数は、悪性新生物、心疾患について多く、感染症による死亡率は高齢者になるほど高い。抗生剤耐性菌が蔓延する状況下において、感染症の予防は高齢化社会が到来している我が国にとって重要である。ワクチン接種は、ウイルスや細菌といった病原体の感染や発病を防ぐだけでなく、発症時の臨床症状を軽減する。ワクチンの効果を持続するには、病原体に特異的な記憶 T 細胞と記憶 B 細胞によって担われる記憶免疫形成の誘導が必須である。しかしながら、健康人においても加齢に伴い免疫系が老化(免疫老化)することは避けることができず、免疫老化が感染やがんに対する抵抗性を減少するだけでなく、高齢者におけるワクチン有効率の低下を引き起こすことが報告されている。そのため、高齢者のワクチン有効率を高める方策を見出すことは喫緊の課題である。免疫系細胞の中でも T 細胞は加齢の影響を特に強く受け、高齢者の体内では老化 T 細胞が増加することが示されている。老化 T 細胞は、記憶 T 細胞への分化能が著しく低下することから、高齢者におけるワクチン有効率の低下は、老化 T 細胞の増加が原因であると考えられる。そのため、T 細胞の老化誘導機構を解明し、その制御法を見出すための研究は、ワクチン有効率を改善することに大きく貢献できる可能性がある。

細胞老化研究は、免疫学の中でも最も遅れた分野の一つである。その要因として、T 細胞老化解析に適切なモデルがないことが挙げられる。申請者らは、独自に T 細胞早期老化モデルマウスを確立し、その分子機構を報告してきた。さらに、このモデルマウスは、ワクチン効果が顕著に低下することを確認している。

2. 研究の目的

本研究は、T 細胞特異的 Menin 欠損マウスを用いて、抗原接種後の抗原特異的な抗体の産生に対する早期老化 T 細胞の影響を明らかにし、*in vitro* で確認された T 細胞の老化を抑制する低分子化合物 X をマウスに投与することでワクチン効率の改善を目指す。

3. 研究の方法

(1) 抗原特異的な抗体産生の解析

野生型 (WT) マウス、T 細胞特異的 Menin 欠損 (KO) マウスに抗原を腹腔内投与し、経時的に血中の抗体価を ELISA 法により測定するとともに、脾臓やリンパ節の B 細胞の成熟化をフローサイトメトリー法により検出する。

(2) Tfh 細胞の解析

WT マウス、KO マウスに抗原を投与し、脾臓に存在する Tfh 細胞をフローサイトメトリー法により検出するとともに、Tfh 細胞を単離して、Tfh 細胞特異的な遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 法により検討する。

(3) 肺炎球菌感染モデルの確立および解析

肺炎球菌は自己融解酵素を産生することから、寒天培地での保存が困難であり、長時間の培養で自己融解する。そのため感染実験に至適な培養条件を検討し、WT マウス、KO マウスに肺炎球菌を経鼻感染させる実験モデルを確立する。肺炎球菌感染後、経時的に体重を測定することで感染の影響を数値化する。

(4) *in vitro* における低分子化合物 X の抗老化作用の解析

脾臓から単離した CD4 陽性 T 細胞を IL-2 存在下で抗 TCR 抗体と抗 CD28 抗体で刺激し、*in vitro* で培養する際に低分子化合物 X を添加し、細胞表面抗原マーカーの発現を指標に細胞老化に対する影響を検討する。また、細胞老化に伴い産生が亢進する炎症性サイトカインの産生を測定することで、抗老化作用を評価する。

(5) *in vivo* における低分子化合物 X の抗原特異的な抗体産生に及ぼす影響の解析

WT マウス、KO マウスに抗原を接種した後、低分子化合物 X を経口投与し、14 日後に採血する。血清中の抗原特異的な抗体の抗体価を ELISA 法により検出し、その効果を評価する。抗原特異的な抗体産生能の改善が認められた場合は、脾臓細胞を単離し、フローサイトメトリー法により細胞表面抗原マーカーを検出し、T 細胞老化状態を確認する。また、T 細胞を単離し、RNA-seq により遺伝子発現を検討するとともに、エピゲノム変化に対する影響を検討するため、クロマチン免疫沈降法によりヒストンアセチル化量の変化を検出する。

4. 研究成果

(1) T細胞特異的Menin 欠損マウスの抗原特異的な抗体産生低下

DNP-OVA を腹腔内に投与し、14 日後に採血および抗原を再接種し、21 日後に採血した。血清中の DNP 特異的な抗体価を ELISA 法により測定した結果を図 1 に示している。抗原接種前(-1 day)の血清中に認められなかった DNP 特異的な抗体が WT マウス(◇)で上昇していたが、T細胞でMeninを欠失したマウス(KO: ▲)では、抗体産生量がWTマウスに比べ減少していた。フローサイトメトリーの解析から、CD138 陽性 B 細胞の数が KO マウスで減弱傾向にあったことから、T細胞Menin 欠損マウスにおいて、B細胞の分化・成熟のサポートが障害されている可能性が示唆された。

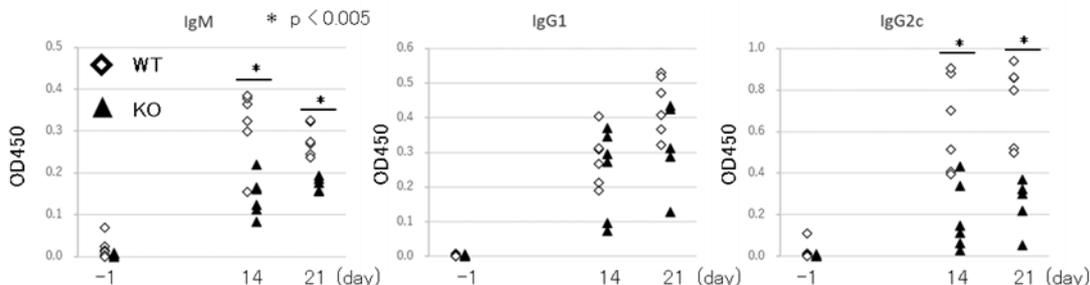


図 1 DNP 特異的抗体の誘導

(2) Tfh細胞への分化およびTfh細胞機能発現に対するMeninの影響

抗原接種後、細胞表面抗原マーカーにより Tfh 細胞 (TCRβ⁺, CD4⁺, CD62L⁻, CD44⁺, CXCR5⁺, PD1⁺) を検出した。KO マウスにおいて抗原特異的な抗体産生の低下がみられたことから、Menin を欠失することで Tfh 細胞への分化が障害されているかと思われたが、KO マウスでは予想に反し Tfh 細胞の割合が WT マウスに比べ増加していた。そのため、Tfh 細胞機能を検証する目的で、Tfh 細胞をセルソーティングにより単離し、遺伝子発現をリアルタイム PCR 法により検討した。Tfh 細胞機能に重要な転写因子やサイトカインの発現量を測定したが、Menin を欠損した Tfh 細胞において発現量は野生型と同程度であった。

(3) 肺炎球菌感染抵抗性の検討

自己融解酵素を産生する肺炎球菌の培養条件を検討し、マウスの感染実験に適した培養条件を確立した。

マウスに対して強毒型の ATCC6303 株を経鼻感染させて、経時的にマウスの体重減少を測定したところ、WT マウス (△) では体重減少がみられない菌数を感染させた KO マウス (●) の体重減少が認められた (図 2)。これまでの研究で、リステリア菌を感染させた Menin 欠損マウスにおいてリステリア菌の排除が遅延しており、病原細菌に対する抵抗性が減弱していることを報告しており、T細胞特異的 Menin 欠損マウスが肺炎球菌感染に対して感受性であることと矛盾しない。

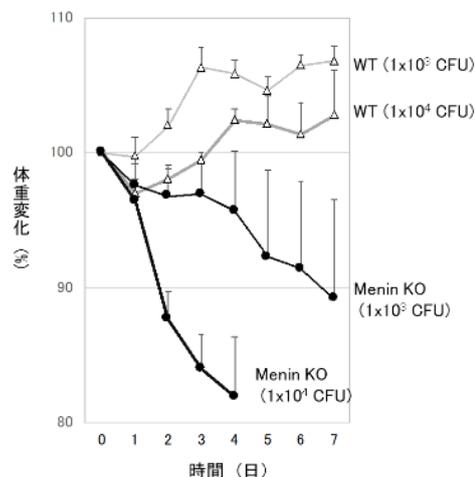


図 2 肺炎球菌感染後の体重変化

(4) *in vitro*における低分子化合物の抗老化作用の解析

脾臓から単離したナイーブ CD4T 細胞を IL-2 存在下で抗 TCR 抗体と抗 CD28 抗体で 2 日間刺激する際に低分子化合物 X を添加しその影響を解析する。2 日間の薬剤処理後 IL-2 存在下で 5 日間培養した細胞の細胞老化状態をフローサイトメトリー法により検討した。

*in vitro*での刺激により、通常の CD4T 細胞は培養 7 日目では CD62L⁺, CD27⁺ (図 3A) の状態となり、さらに培養を進めると CD62L と CD27 の発現が低下し、老化細胞 (CD62L⁻, CD27⁻, 図 3A) となることが報告されている。KO マウスは WT と同じ 7 日間の培養で老化細胞様の細胞表面抗原マーカーの発現パターンを示す (図 3A)。しかしながら、低分子化合物を最初の 2 日間添加することで、細胞表面抗原マーカーの発現は低下せず、正常な状態に回復した。

また、細胞老化マーカーである PD-1 の発現も低分子化合物 X の作用により、正常状態に近い発現量となった (図 3B)。炎症性サイトカインの発現亢進が KO マウスでみられるが、低分子化合物 X を加えることで、正常に近い値に発現量が低下したことから、低分子化合物 X は Menin 欠損 T 細胞の早期老化を抑制することが示唆された。

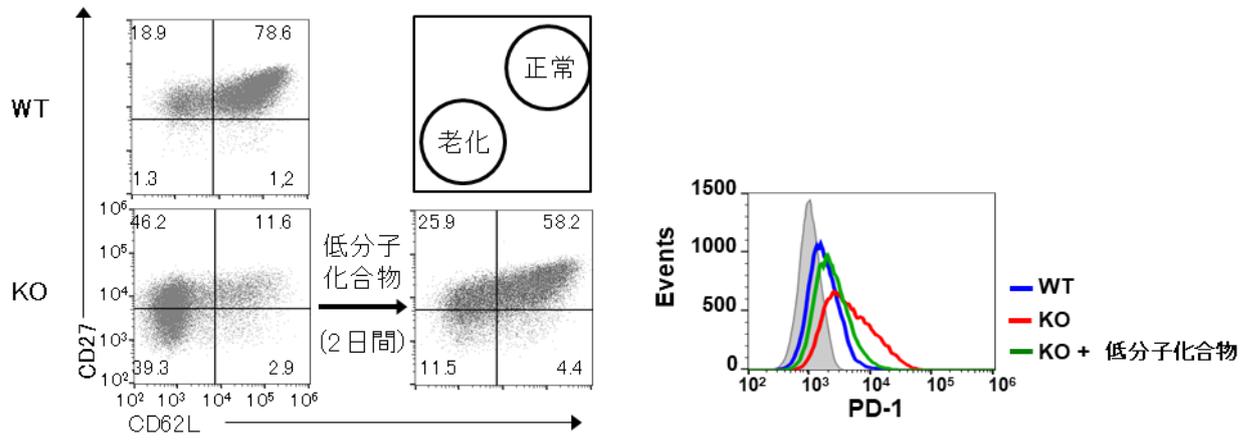


図3 A) 低分子化合物 X による老化形質の改善

B) 低分子化合物 X による PD-1 発現抑制

(5) *in vivo*における低分子化合物の抗原特異的抗体産生に及ぼす影響の解析

KO マウスにおける抗原特異的な抗体産生低下を低分子化合物 X が改善するか、DNP-OVA 接種後、低分子化合物 X を経口投与し、14 日後に採血を行った。ELISA 法により抗原特異的抗体量の検討を行ったが、有意な回復は認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------