

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 10 日現在

機関番号：82603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12694

研究課題名（和文）加齢による免疫老化と病的免疫老化の比較解析

研究課題名（英文）Analysis of T cells in immunological aging

研究代表者

立川 愛（TACHIKAWA, AI）

国立感染症研究所・エイズ研究センター・室長

研究者番号：10396880

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：加齢とともに私たちの免疫力は低下し、各種感染症が重症化したり、ワクチン応答性が低下する。高齢者で問題となる疾患の多くは、慢性炎症などの免疫学的制御の破綻と関連があることが明らかとなりつつある。一方で、慢性HIV感染者は免疫学的に老化状態にあることも明らかとなってきた。本研究では、免疫老化状態にあると考えられるHIV感染者のT細胞の性状を解析し、早期分化段階にあるT細胞が容易に活性化されやすい状態にあること、抗原刺激に対してT細胞機能に直結する遺伝子群の発現が過剰に誘導され得ることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Biological aging results in functional decline in immune system, accompanied by increase in severity of infectious diseases. It is revealed that most diseases become problematic in aged people are related to immunological disorder. It also become widely known that immunological character in chronic HIV-infected subjects is consistent with that seen in elderly people, called "immunosenescence". In this study, we characterized T cells in chronic HIV-infected subjects, and the expression of molecular markers related to senescence were significantly higher in early differentiated T cells compared to HIV-uninfected age-matched subjects. We also performed gene expression analysis after antigen stimulation, and genes critical for T cell function were induced excessively compared to HIV-uninfected subjects. These data suggest that T cells, especially in early-differentiated subsets that are normally in quiescent state, are in a state "easy-to-activate" in response to antigen stimulation.

研究分野：感染免疫学

キーワード：免疫老化 慢性ウイルス感染症 T細胞

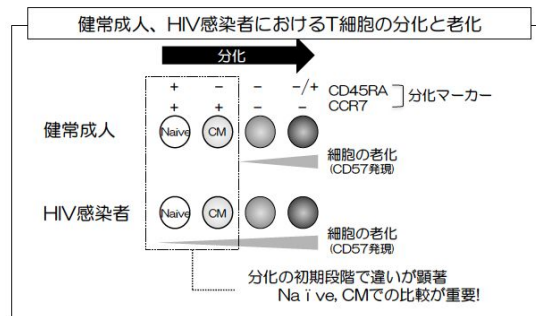
1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎えつつある我が国にとって、健康に歳を取ること、すなわち高齢者で問題となる疾患の予防、症状を最小限に抑えることは、個人の QOL 向上・医療費の削減に大きく貢献する。免疫応答は加齢とともにその正常な機能が失われ、「免疫老化」と呼ばれる状態に至ると考えられている。実際に高齢者では各種感染症は重症化しやすく、ワクチンに対する応答性も低下している。また、高齢者で問題となる疾患の多くは免疫学的異常との関連が指摘されており、動脈硬化、心血管疾患、癌、肝炎、骨塩量の低下などの疾患は慢性炎症などの免疫学的制御の破綻との関連が強く疑われている。しかしながら、免疫老化に関する研究はようやく始まったところであり、その分子メカニズムは未だ解明されていない。

一方、HIV 感染症は抗 HIV 薬による治療を行わなければ後天性免疫不全症候群(AIDS)を発症する致死的疾患である。免疫システムの破綻が病態の本質であること、またその重篤さにより HIV 感染者における免疫機能の解析は、世界中の研究者により勢力的に行われてきた。その結果、HIV 感染者ではその免疫学的特徴が高齢者と多くの点で共通していることが明らかとなってきた。また、抗 HIV 薬治療の進歩に伴い、HIV 感染者の生命予後は格段に改善されたが、一見ウイルス感染症とは関連のない動脈硬化、心血管疾患 (CVD)、骨塩量の低下など高齢者で重篤化しやすい疾患の発症率が、若年で高いことも明らかとなってきた。これらの結果から、HIV 感染者では免疫老化が亢進することで、高齢者と類似した健康状態に陥っていることを示していると考えられている。

私はこれまでに免疫応答で中心的役割を担う T 細胞に焦点を絞り、HIV 感染者における免疫老化の研究を行っており、HIV 感染者では特定の T 細胞機能が低下していること、その機能低下は T 細胞の老化と関連していることを明らかにした (1,2)。T 細胞の一生は、原則的に抗原依存性に制御される。胸腺で教育を受けた Naïve T 細胞が、二次リンパ組織で抗原刺激により分化し、分化が進むと細胞傷害や抗体産生の促進などエフェクター機能を獲得し、病原体を排除する。一部はメモリー細胞として特定抗原に対する

免疫記憶として維持されるが、より未分化なセントラルメモリー (CM) 細胞は長期間感染防御に効果的に働く記憶細胞である。個々の細胞レベルでは、分化が進むと細胞が老化し、最終的には細胞死を起こす。これまで行われている免疫老化の研究では、主に細胞老化が観察される高度に分化した細胞集団での解析に主眼が行われてきた。しかしながら、私はこれまでの研究で CD4 陽性 T 細胞において、HIV 感染者では未分化な CM 細胞でも細胞老化のマーカである CD57 が発現しており、T 細胞の増殖に重要なサイトカインである *IL2* 遺伝子発現も低下していることを明らかにし、分化の初期段階で既に T 細胞が老化状態にあることを見出した (1)。



2. 研究の目的

本研究では、免疫老化状態にある T 細胞の性状を解析し、関連する免疫学的要因について明らかにすることを目的とした。また、未だ明らかとなっていない免疫老化の分子機序について明らかにするため、網羅的解析を行い、関連する遺伝子の探索を行った。

3. 研究の方法

主に T 細胞応答の研究が先行している HIV 感染者由来の末梢血単核球 (PBMC) を用いて、解析を行った。HIV 感染症では血中ウイルス量が病態進行と強く関連しており、血中ウイルス量が高いほど病態進行が早い。また、免疫学的解析により、未治療の HIV 感染者 T 細胞は細胞老化が亢進していることが明らかとなっていることから、未治療の HIV 感染者、血中ウイルス量の高い感染者の T 細胞について、以下の解析を行った。

(1) 早期分化段階の CD8 陽性 T 細胞分画の性状解析

未治療の HIV 感染者、抗 HIV 薬治療により

ウイルス量が検出限界以下に抑制されている HIV 感染者、対照群として非 HIV 感染者の PBMC について、T 細胞の老化との関連が想定される特性を表す表面分子について、T 細胞分化段階を規定する分子とともに多重染色を行い、フローサイトメトリーにて解析を行った。

(2) 未治療 HIV 感染者 T 細胞の抗原刺激誘導性遺伝子発現の解析

免疫老化が亢進していると考えられる血中ウイルス量の高い HIV 感染者、血中ウイルス量の低い HIV 感染者、治療中の HIV 感染者、さらに対照群として非 HIV 感染者の PBMC を用いて、T 細胞刺激後の遺伝子発現について網羅的な解析を行い、群間の比較解析を行った。

本研究の遂行にあたり、研究参加者からは文書による研究参加への同意を得た。また、免疫老化に影響を与える年齢については、群間で同程度になるようにサンプリングを行った。

4. 研究成果

(1) 早期分化段階の CD8 陽性 T 細胞分画の性状解析

まず、これまでの知見により免疫老化との関連が明らかとなっている全 CD8 陽性 T 細胞中の Naïve 細胞の減少について検討を行った。非感染者に比べて未治療群、治療群いずれの HIV 感染者も有意に Naïve 細胞の割合が低く、未治療群、治療群間では差が見られなかった。次に、T 細胞老化との関連が予想される活性化状態を表す CD25、疲弊状態を表す PD-1、抗原刺激応答性に発現される OX40 について、細胞老化のマーカーである CD57 と同時にフローサイトメーターを用いて CD8 陽性 T 細胞での発現解析を行ったところ、非 HIV 感染者では未だ抗原刺激を受けていない Naïve 細胞と CM 細胞においては、CD25、PD-1、OX40 については発現が見られず、CD57 の発現は低頻度であった。一方で、HIV 感染者では、Naïve、CM 細胞において PD-1、CD57 の発現が非 HIV 感染者に比して有意に高く、未治療 HIV 感染者においてより高い発現が見られた。さらに、抗原刺激誘導性に発現する OX40 についても HIV 感染者では両細胞分画で発現が観察された。これまでの知見では、抗原に

感作されていない Naïve 細胞では OX40 の発現は見られないと考えられていたが、HIV 感染者では抗原非依存性に OX40 の発現が亢進していることが示唆された。Naïve 細胞の割合、いずれのマーカー発現においても HIV 感染治療群でも非感染者に比して有意に高かったことから、本研究で観察された Naïve、CM 細胞におけるこれらの現象は不可逆的であることが明らかとなった。さらに、試験管内で抗原刺激を行い48時間後に OX40 の発現を解析したところ、HIV 感染者では非 HIV 感染者に比して非常に高い OX40 発現が見られ、特に CD25、PD-1 陽性の活性化/疲弊状態にある細胞で高い発現が観察された。これらの結果により、免疫老化状態にある HIV 感染者の分化早期段階にある T 細胞は、容易に活性化されやすい状態にあることが示唆された。

(2) 未治療 HIV 感染者 T 細胞の抗原刺激誘導性遺伝子発現の解析

PBMC に抗原刺激を行い、刺激前後での遺伝子発現の変化をマイクロアレイにて解析した。血中ウイルス量の低い群、治療群、非感染群間では、発現量に有意差の見られた遺伝子は少数であったが、血中ウイルス量の高い群では、他の3群いずれとも多数の遺伝子で有意な発現量の違いが見られた。T 細胞に発現する細胞表面受容体や転写因子等 T 細胞機能に直結する遺伝子群において有意差が確認されたが、未治療群において発現が有意に亢進している遺伝子が多くみられた。この結果は、血中ウイルス量が高く、免疫老化状態にある HIV 感染者において、T 細胞機能が一方的に低下するのみでなく、一部の機能については過剰な応答性を有していることが示唆された。この結果は(1)で観察された HIV 感染者において抗原刺激後の OX40 発現が有意に高いことと一致しており、抗原刺激に対して過剰な免疫応答が誘導され得る可能性を示唆している。本検討において群間で有意差の見られた遺伝子群は免疫老化を規定する、あるいは関連する遺伝子であると考えられ、詳細な検討を継続して行う。

HIV 感染者体内では、未治療の状態では常に高いレベルでウイルスが産生されており、免疫システムは常に HIV 抗原に曝されている。また、感染急性期から HIV は腸管リンパ組織

で増殖するため、腸管免疫応答の破綻による腸管内容物の全身への漏出による持続的な高炎症状態にあることが知られており、いずれも免疫システムにとっては負荷となるため、HIV感染者は高い免疫学的負荷を受け続けていると考えられる。一方、私たちは日常的に様々な微生物等の抗原に曝され、免疫システムは常に生体防御機構として働いているため、加齢に伴い免疫学的負荷が累積されてゆく。老化の進行は不可逆的と考えられるが、実際に本研究において解析した各種マーカーについては、抗HIV薬による治療を行いHIV自体による免疫学的負荷を除去しても完全には回復せず、非感染者との間に有意な違いが見られたことから、免疫学的負荷の累積が免疫老化を促進していると考えられる。今後、遺伝子発現解析によって得られた免疫老化に関連する遺伝子群の解析を進めることにより、免疫老化の分子メカニズムを明らかにしたい。

<引用文献>

1. Nakayama-Hosoya K, Kawana-Tachikawa A. et al, Epigenetic repression of interleukin-2 expression in senescent CD4⁺ T cells during chronic human immunodeficiency virus type-1 infection. JID, 211:28-39, 2015
2. Nakayama K, Kawana-Tachikawa A. et al. Imbalanced production of cytokines by T cells associates with the activation/exhaustion status of memory T cells in chronic HIV Type 1 infection. AIDS Res Hum Retroviruses. 28:702-14, 2012

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

1. Ishizaka A, Sato H, Nakamura H, Koga M, Kikuchi T, Hosoya N, Koibuchi T, Nomoto A, Kawana-Tachikawa A, Mizutani T. Short intracellular HIV-1 transcripts as biomarkers of residual immune activation in patients on antiretroviral therapy. J Virol, 90:5665-76. (2016) doi: 10.1128/JVI.03158-15.
2. Katoh J, Kawana-Tachikawa A*, Shimizu A, Zhu D, Han C, Nakamura H, Koga M, Kikuchi T, Adachi E, Koibuchi T, Gao GF, Brumme ZL, Iwamoto A. Rapid HIV-1

Disease Progression in Individuals Infected with a Virus Adapted to Its Host Population. PLoS One. 11:e0150397. (2016) doi: 10.1371/journal.pone.0150397.

[学会発表](計 7 件)

1. 佐藤秀憲、大田泰徳、松原康朗、菊地正、古賀道子、鯉淵智彦、俣野哲朗、立川愛、安達英輔. HIV感染者における胃炎と腸管遊走性 CD4 陽性 T 細胞の検討. 第 30 回日本エイズ学会学術集会. 2016 年 11 月、鹿児島
2. 立川(川名)愛、細谷(中山)香、吉村和久、俣野哲朗: 慢性 HIV-1 感染者の CD4 陽性 T 細胞における *IL2* 遺伝子発現抑制機序の解析. 第 17 回白馬シンポジウム. 2015 年 6 月 19-20 日、米子.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

[その他]

特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

立川 愛 (TACHIKAWA, Ai)

国立感染症研究所・エイズ研究センター・室長

研究者番号: 10396880

(2)研究協力者

佐藤 秀憲 (SATO, Hidenori)

東京大学医科学研究所・大学院生
(平成 27 年度のみ参加)

立川 夏夫 (TACHIKAWA, Natsuo)

横浜市立市民病院・感染症科・科長