

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：84420

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K21601

研究課題名（和文）非ヒト霊長類を用いた免疫老化モデルにおける分子基盤解析とその応用展開

研究課題名（英文）Development of the non-human primate model for studying the aging of the Immune System

研究代表者

山本 拓也（Yamamoto, Takuya）

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 免疫老化プロジェクト・プロジェクトリーダー

研究者番号：60752368

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：高齢者での癌や感染症のリスク増大と関連していることが知られているが、免疫老化現象の本態に関しては未解明な点が多い。本研究では、同一環境で飼育されている様々な年齢のカニクイザルを用いて免疫学的解析を行なった。結果としてカニクイザル検体の各免疫担当細胞の質的、量的変化を検証し、高齢カニクイザルでは(1)造血前駆細胞のテロメア長が短縮し、テロメラーゼ活性が減弱すること、(2)その表現型が分化後のNaive T細胞に継承されること、(3)Naive T細胞数が減少すること、(4)Effector memory T細胞のサイトカイン産生が亢進していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢による免疫系への影響は、様々な免疫担当細胞の活性化状態やサイトカイン産生の変化といった質的变化や量的変化など、多岐に渡る可能性が示唆されている。このような複雑な現象を理解するためには、ヒト臨床検体と個体レベルでの解析が必要である。これまで、免疫老化研究を対象とする実験動物モデルは確立されていなかったが、本研究によりカニクイザルの有用性を示すことに成功した。今後さらにカニクイザルを用いた詳細な解析を行うことで、免疫老化をふまえた新規ワクチンの開発や免疫療法の確立が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Immunosenescence is known as the process by which the immune system changes with age, and it is known to be associated with increasing the risks of cancers and infectious diseases in elderly individuals. However, the true nature of immunosenescence remains to be elucidated. In this study, we conducted the use of cynomolgus macaques with a wide range of age groups in the same animal facility and examined the qualitative and quantitative changes of each immune cell in these cynomolgus macaques. We found that (1) telomere lengths and telomerase activities of hematopoietic progenitor cells were declined in aged cynomolgus macaques, (2) this phenotype is inherited by especially naive T cells, (3) the number of naive T cells was decreased like human beings and (4) the production of some inflammatory cytokines by effector memory T cells was enhanced.

研究分野：超高齢社会研究

キーワード：免疫老化 aging T細胞 フローサイトメーター 次世代シーケンス 老化 非ヒト霊長類

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

一般的に高齢者では健康成人と比較して、加齢に伴って免疫システムの個体レベルでの変化が起こりうるということが知られており、この変化を今日では「免疫老化」という言葉で表現している。例えば65歳以上では癌や感染症による死亡率が急激に上昇することが知られているため、これら疾患と免疫老化現象の関連性が長年疑われている。これまで免疫老化現象に関連した事象として、各種免疫担当細胞の活性化状態やサイトカイン産生能の変化、胸腺の萎縮に伴う Naive T 細胞の減少、T 細胞受容体(TCR)レパトアの狭小化など多岐に渡る可能性が示唆されている。過去の報告において、主にヒト血液を用いた解析が行われているが、個人により感染歴や既往歴等が異なることから、純粋な加齢に伴う免疫老化の本態に関しては未解明な点が数多く残されていた。つまり、免疫老化研究を行う上で動物モデルが必須であると考えられるが、研究開始当初において免疫老化研究を対象としたモデルは確立されていなかった。

上記背景を踏まえて本研究では、研究代表者は非ヒト霊長類カニクイザルが免疫老化研究において有用ではないかと考えた。その理由として、細胞老化に関わるテロメアに関して、ヒト体細胞のテロメア長は脊椎動物の中で極めて短いという特徴をもっているが、非ヒト霊長類の体細胞におけるテロメア長は、マウスなどの他の動物と比較して最もヒトに近く短いこと、テロメア長とテロメラーゼ活性の変化が免疫担当細胞の機能に影響を及ぼす可能性が示唆されていることが挙げられた。

2. 研究の目的

本研究では遺伝的にもヒトに極めて近いと考えられる非ヒト霊長類カニクイザルより得られる血液、組織由来検体を用いて、加齢に伴う免疫老化現象を、特に獲得免疫反応の変化に着目して分子レベルで解析し、その実態を個体レベルで解明することで、年齢に応じた高齢者用新規ワクチン開発や免疫療法の確立に繋げる研究基盤を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究の目的を達成するために、同一飼料、同一環境下で飼育されている様々な年齢のカニクイザルを確保した。サル個体から得られる検体を用い各免疫担当細胞のテロメア長、テロメラーゼ活性の測定、ハイパラメーターフローサイトメーターでの各免疫担当細胞の量的・質的变化の解析、Naive T 細胞の全 mRNA 遺伝子発現解析の検討を行なった。

4. 研究成果

1) 各免疫担当細胞のテロメア長、テロメラーゼ活性の変化の解析

まず、加齢に伴うテロメア長、テロメラーゼ活性の変化に関しては、サル免疫担当細胞での解析がヒトでの解析に比べて不十分であったため、実験系の確立を行なった。我々は既に報告していたヒト細胞での qPCR 法によるテロメア測定系をサル細胞に応用した。サル末梢血単核細胞(PBMC)から各免疫担当細胞をセルソーターにより分取し、それぞれのテロメア長ならびにテロメラーゼ活性を測定した。その結果、造血前駆細胞に関して、加齢によりテロメア長が短縮し、テロメラーゼ活性が減少していた。また、その分化後の細胞である Naive T 細胞についても加齢によりテロメラーゼ活性が減少することが明らかとなった(図1)。

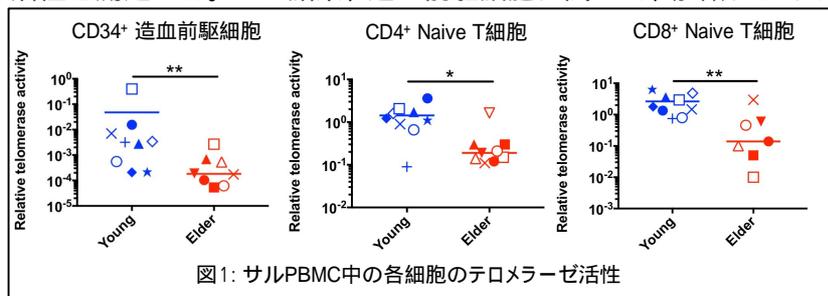


図1: サルPBMC中の各細胞のテロメラーゼ活性

2) ハイパラメーターフローサイトメーターによる各免疫担当細胞の量的・質的变化の解析

我々の研究室では最大31パラメーターまで同時解析可能なハイパラメーターフローサイトメーターを導入しており、これを用いてサルPBMC中の各免疫担当細胞を同時に解析した。まず血中細胞数について解析した結果、造血幹細胞及び Naive T 細胞の血中細胞数が有意に減少していることが明らかとなった(図2)。

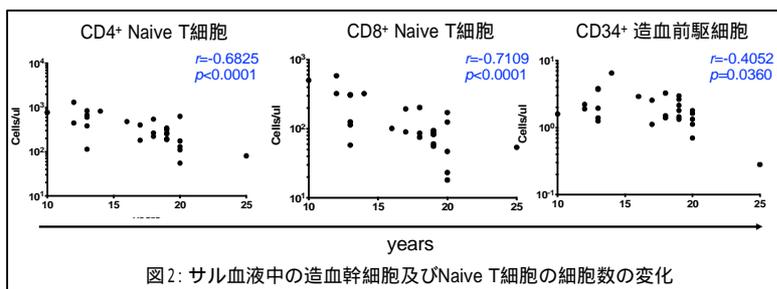


図2: サル血液中の造血幹細胞及びNaive T細胞の細胞数の変化

一方、記憶T細胞に関しては、Effector memory T細胞週が加齢により有意に増大していた(図3)。

さらにPBMCに対して *in vitro* でT細胞受容体依存的な刺激を加えた際には、記憶T細胞からのTNFなどの炎症

性サイトカインが若齢サルと比較して高齢サルで上昇していた (図 4)。

以上の結果より、非ヒト霊長類カニクイザルは免疫老化研究を行う上で有用であると示すことに成功した。

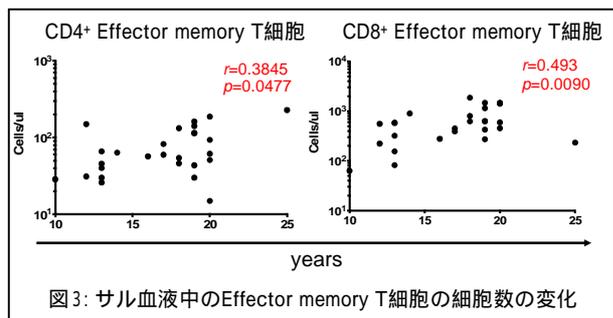


図3: サル血液中のEffector memory T細胞の細胞数の変化

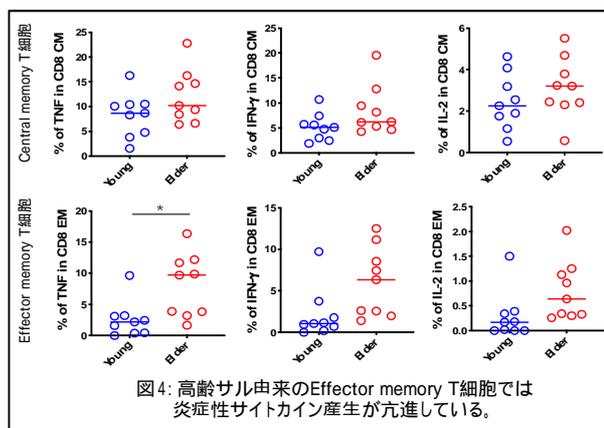


図4: 高齢サル由来のEffector memory T細胞では炎症性サイトカイン産生が亢進している。

3) Naïve T細胞のトランスクリプトーム解析系の確立

T細胞が特に免疫老化現象を呈することが考えられたが、各組織におけるT細胞老化の違いに関しては不明である部分が多い。そこで我々は、カニクイザルの脾臓、リンパ節を用いたトランスクリプトーム解析を行うことを計画した。

しかし、問題点として、高齢カニクイザルから得られるNaïve T細胞が制限されていたため、適正な解析を行うことが困難であった。そこでまず、微量細胞数からのcDNAライブラリー構築及びRNA-seq解析系の構築を行なった。具体的には、サル検体よりセルソーターを用いてCD4⁺、CD8⁺ Naïve T細胞をそれぞれ分取し、細胞数を段階的に減らして検討を行なった。その結果、ごく微量インプット細胞数でのRNA-seq系の構築に成功した(図5)。今後この解析系を用いて更なる詳細はトランスクリプトーム解析を行い、免疫老化現象の理解に繋げる。

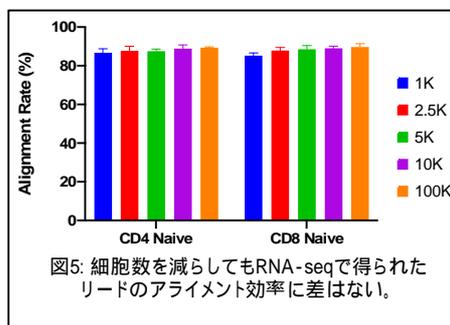


図5: 細胞数を減らしてもRNA-seqで得られたリードのアライメント効率に差はない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Adachi Yu, Tonouchi Keisuke, Nithichanon Arnone, Kuraoka Masayuki, Watanabe Akiko, Shinnakasu Ryo, Asanuma Hideki, Ainai Akira, Ohmi Yusuke, Yamamoto Takuya, Ishii Ken J., Hasegawa Hideki, Takeyama Haruko, Lertmemongkolchai Ganjana, Kurosaki Tomohiro, Ato Manabu, Kelsoe Garnett, Takahashi Yoshimasa	4. 巻 10
2. 論文標題 Exposure of an occluded hemagglutinin epitope drives selection of a class of cross-protective influenza antibodies	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1~13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-11821-6	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 該当する

1. 著者名 Fujimoto Kosuke, Kawaguchi Yunosuke, Shimohigoshi Masaki, Gotoh Yoshiyuki, Nakano Yoshiko, Usui Yuki, Hayashi Tetsuya, Kimura Yasumasa, Uematsu Miho, Yamamoto Takuya, Akeda Yukihiro, Rhee Joon Haeng, Yuki Yoshikazu, Ishii Ken J., Crowe Sheila E., Ernst Peter B., Kiyono Hiroshi, Uematsu Satoshi	4. 巻 157
2. 論文標題 Antigen-Specific Mucosal Immunity Regulates Development of Intestinal Bacteria-Mediated Diseases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1530~1543.e4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1053/j.gastro.2019.08.021	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 該当する

1. 著者名 Leach Sarah, Shinnakasu Ryo, Adachi Yu, Momota Masatoshi, Makino-Okamura Chieko, Yamamoto Takuya, Ishii Ken J, Fukuyama Hidehiro, Takahashi Yoshimasa, Kurosaki Tomohiro	4. 巻 31
2. 論文標題 Requirement for memory B-cell activation in protection from heterologous influenza virus reinfection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 771~779
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxz049	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 該当する

1. 著者名 Takahama Shokichi, Yamamoto Takuya	4. 巻 10
2. 論文標題 Pattern Recognition Receptor Ligands as an Emerging Therapeutic Agent for Latent HIV-1 Infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2020.00216	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Eslamizar L, Petrovas C, Leggat DJ, Furr K, Lifton ML, Levine G, Ma S, Fletez-Brant C, Hoyland W, Prabhakaran M, Narpala S, Boswell K, Yamamoto T, Liao HX, Pickup D, Ramsburg E, Sutherland L, McDermott A, Roederer M, Montefiori D, Koup RA, Haynes BF, Letvin NL, Santra S.	4. 巻 6
2. 論文標題 Recombinant MVA-prime elicits neutralizing antibody responses by inducing antigen-specific B cells in the germinal center.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 NPJ vaccines	6. 最初と最後の頁 15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41541-020-00277-1	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 -

1. 著者名 Lu KT, Yamamoto T, McDonald D, Li W, Tan M, Moi ML, Park EC, Yoshimatsu K, Ricciardone M, Hildesheim A, Totsuka Y, Nanbo A, Puthachoen O, Suwanpimolkul G, Jantarabekkul W, Paitoonpong L, Handley FG, Bernabe KG, Noda M, Sonoda M, Brennan P, Griffin DE, Kurane I.	4. 巻 555
2. 論文標題 U.S.-Japan cooperative medical sciences program: 22nd International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 71-77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virol.2020.12.012	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9件（うち招待講演 3件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yamamoto T.
2. 発表標題 The non-human primate model of immunosenescence.
3. 学会等名 France-Japan Symposium Implication of senescence in age related disorders: Toward health aging. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamamoto T.
2. 発表標題 The challenges of high-dimensional single-cell flowcytometric analysis for the study of immune aging.
3. 学会等名 The 48th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masuta Y, Tanaka M, Takahama S, Sugawara Y, Okamura T, Tanaka S, Yasutomi Y and Yamamoto T.
2. 発表標題 Analysis of immunosenescence in the non-human primates.
3. 学会等名 The 42nd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高濱正吉、神沼智裕、升田雄士、保富康宏、高橋 宜聖、山本拓也
2. 発表標題 非ヒト霊長類におけるFc受容体依存免疫応答評価系の樹立.
3. 学会等名 第23回日本ワクチン学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上弘大、秋田裕史、東口公哉、野木森拓人、高濱正吉、小林省吾、土岐祐一郎、江口英利、山本拓也
2. 発表標題 次世代型フローサイトメーターを用いた膀胱癌微小環境の解析
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 東口公哉、秋田裕史、村上弘大、野木森拓人、高濱正吉、小林省吾、土岐祐一郎、江口英利、山本拓也
2. 発表標題 消化器癌における癌抗原特異性 CD8T 細胞反応の量的・質的評価
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 東口公哉、秋田裕史、高濱正吉、村上弘大、小林省吾、土岐祐一郎、江口英利、山本拓也
2. 発表標題 ケモカイン/ケモカイン受容体を介した膀胱癌細胞と癌関連線維芽細胞間相互作用の解析
3. 学会等名 第24回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高濱正吉、岡村智崇、保富康宏、山本拓也
2. 発表標題 SIV抗原特異的CD4T細胞、及びCD8T細胞の高感度同時分取法の樹立
3. 学会等名 第34回日本エイズ学会 学術集会・総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本拓也
2. 発表標題 SIV慢性感染期抗ウイルス薬治療下カニクイザルを用いた免疫学的マルチオミクス解析
3. 学会等名 第34回日本エイズ学会 学術集会・総会（招待講演）
4. 発表年 2020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
---------	---------