

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861735

研究課題名(和文) 老化T細胞の再活性化に注目した新たな高齢者敗血症治療戦略

研究課題名(英文) A novel therapeutic strategy for sepsis with re-activating T cells in the elderly

研究代表者

井上 茂亮 (INOUE, Shigeaki)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：30582209

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)：予後不良の高齢者敗血症の病態として、T細胞の疲弊が近年注目されている。CD8+Tやナチュラルキラー細胞の成長因子であるインターロイキン-15(IL-15)は高齢マウス敗血症モデルの生命予後を改善し、高齢者由来T細胞を活性化し、加齢により低下していたインターフェロンの産生能を改善した。またIL-15は、高齢マウス敗血症モデル由来CD8+T細胞において、suppressor of cytokine signaling 1(SOCS1)の発現量を減少させた。T細胞の分化・成熟に重要な役割を果たすSOCS1の発現制御が新たな高齢者敗血症の治療ターゲットとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Aging induces T cell exhaustion, leading to immunosuppression in sepsis. Interleukin 15 (IL-15) is a pleiotropic anti-apoptotic cytokine that promotes activation and proliferation of CD8+ T and natural killer (NK) cell. We examined whether IL-15 can ameliorate age-related exhaustion of CD8+ T cells and NK cells and improves survival rate in aged septic mice. In Peripheral blood mononuclear cells culture, IL-15 dose-dependently reversed impaired activation, including CD25 expression, Interferon- (IFN-) production, IL-15 also prevented sepsis-induced apoptosis of CD8+ T and NK cells with enhancing IFN- production in aged mice. Finally, IL-15 decreased bacterial load after sepsis, leading to the improvement of survival in aged mice. IL-15 decreases expression of suppressor of cytokine signaling 1(SOCS1) was decreased in CD8+ T cells from the aged septic mice. These result suggest us that SOCS1 might be a new therapeutic target for sepsis in the elderly.

研究分野：救急医学

キーワード：老化 免疫抑制 敗血症 IL-15 SOCS1

1. 研究開始当初の背景

高齢者敗血症は予後不良である 敗血症は感染に伴う全身性炎症反応で、多臓器不全を伴い、その死亡率は極めて高い。米国では年間約 75 万人が敗血症に罹患し、年間死亡者数は約 20 万人で集中治療室における死亡原因の第 2 位である。そのうち 65 歳以上の高齢者は敗血症患者の約 60% であり、その死亡者数の約 80% を占める。申請者は 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く (59% vs. 90%; $p < 0.01$)、高齢者敗血症死亡例の約 80% が入院後 7 - 28 日後の亜急性期であることを報告した (Inoue, et al. Crit Care Med. 2012)。

高齢者由来 T 細胞は活性化されにくく、敗血症ではその数が減少する 敗血症では急性期のサイトカインストームと呼ばれる急性炎症反応の後、亜急性期には免疫抑制状態に陥り、易感染性を呈する。特に高齢者ではその傾向が顕著であり、申請者は高齢者の T 細胞は活性化されにくく、高齢者敗血症患者では約 3 週間にわたりリンパ球減少症が遷延することを発見した (Inoue, et al. Crit Care Med. 2012)。以上より T 細胞の数と機能の低下が高齢者敗血症の亜急性期の免疫抑制状態の原因の一つと考えられ、今後はいかに高齢者由来 T 細胞を再活性化し、予後を改善できるかが高齢者における敗血症治療の課題となる。

IL-15 は高齢者由来 T 細胞を再活性化し、敗血症マウスの予後を改善する 申請者は高齢敗血症患者の有力な治療薬の候補としてインターロイキン-15 (IL-15) に注目している。IL-15 は NK 細胞や CD8+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 (アポトーシス) を抑制する効果を示すことから、悪性腫瘍の治療効果を期待した腫瘍免疫を中心に研究がなされてきた。申請者は、この IL-15 が免疫細胞のアポトーシスを抑制する点に着目し、敗血症マウスモデルでの検討を行った結果、IL-15 投与がリンパ球や NK 細胞のアポトーシスを若年マウス敗血症モデルで抑制し、その生存率を有意に改善することが明らかになった。(Inoue, et al. J Immunol. 2010)。

2. 研究の目的

本研究では 1) IL-15 の高齢者由来 T 細胞活性化の効果やメカニズムなどまだ解明されていない基礎的研究を完成し、2) IL-15 による高齢者由来 T 細胞活性化シグナル伝達系に關与する新規治療標的分子を探索することで、今後先進国で爆発的に増加すると予想される高齢者敗血症の新規治療薬開発につながる基礎的な研究を行う。

3. 研究の方法

本研究では高齢敗血症における IL-15 の治療薬としての可能性と新規標的分子を明らかにするため、本研究計画では以下の研究を行った。

研究 1 高齢者由来 T 細胞に対する IL-15 の活性化および増殖効果判定 (in vitro)

IL-15 の高齢者由来 T 細胞活性化効果やメカニズムなどはまだ解明されていないため、以下の研究を行う。

1. IL-15 添加による活性化およびサイトカイン産生能の評価 インフォームドコンセントを得られた高齢者/成人のボランティアと東海大学高度救命救急センターにおける重症敗血症患者の末梢血より単離した T 細胞を、リンパ球増殖因子 (抗 CD3/28 抗体) 刺激下で 24 時間培養。ヒト組換え蛋白 IL-15 を添加し、T 細胞増殖能や活性化の程度、CD8+T 細胞や NK 細胞から放出される IFN- γ 産生能の変化を検討する。

研究 2 高齢マウス敗血症モデルにおける IL-15 の効果判定

1. IL-15 投与高齢マウス敗血症モデルの免疫機能解析 (in vivo) 高齢 (生後 2 歳) マウスを用い、腹腔内盲腸穿孔 (CLP) による敗血症モデルまたは開閉腹のみ (Sham) を作成。CLP 3 時間後に IL-15 または PBS を皮下注射し、24 時間後に sacrifice し、脾臓・胸腺・リンパ節を回収。フローサイトメトリーおよび免疫組織学的に免疫応答細胞の数およびアポトーシスや活性化マーカーの割合を解析する。

2. IL-15 添加によるサイトカイン産生能の評価 (in vitro) 高齢マウスから脾臓を摘出し、脾細胞に IL-15 を添加し invitro で培養。24 時間後に上清並びに脾臓細胞を回収し、上清中 IFN- γ 濃度及び CD8+T 細胞および NK 細胞内の IFN- γ 陽性率をフローサイトメトリーにて解析し、IL-15 の IFN- γ 産生能への影響を評価する。

研究 3 高齢マウス由来 T 細胞非活性化の原因遺伝子の探索

IL-15 による高齢マウス由来 T 細胞活性化シグナル伝達系の詳細は不明であり、これを探索することで新たな新規治療標的分子の発見につながる可能性がある。研究 1 の 1 と同様に 1) 高齢マウス由来リンパ球、2) 若年者由来リンパ球、3) 高齢マウス由来リンパ球 + IL-15 の 3 群で各 24 時間培養後 CD4+ および CD8+T 細胞を単離し、mRNA を抽出。次世代シーケンサーを用いて、mRNA の発現状況を網羅的に解析する。上記 3 群で比較検討し、高齢マウス由来リンパ球 + IL-15 投与群で高齢マウス由来リンパ球群と比較し有意に上昇し、その発現が若年

者由来リンパ球と同程度である核内転写因子を「ヒト高齢マウス由来T細胞非活性化の原因遺伝子」と同定する。

4. 研究成果

研究1 高齢者由来T細胞に対するIL-15の活性化および増殖効果判定 (in vitro)

成人敗血症患者と比較して、高齢敗血症患者のT細胞は活性化・IFN γ 産生能、増殖が低下しているものの、IL-15の添加によりそれらは有意に改善した(図1)。

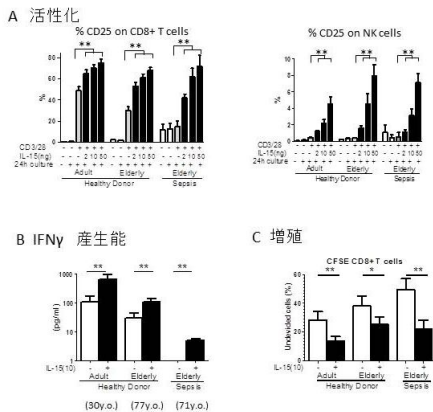


図1 IL-15は高齢により障害されたT細胞・NK細胞の活性化・IFN γ 産生能・増殖を改善する。

研究2 高齢マウス敗血症モデルにおけるIL-15の効果判定

コントロールと比較して、IL-15を投与した高齢マウス敗血症モデルの脾臓および腹腔内のCD8+T細胞・NK細胞は、敗血症により誘導されたCaspase3を低下させ、抗アポトーシスマーカーであるBcl-xLを増加させることが明らかになった(図2)。

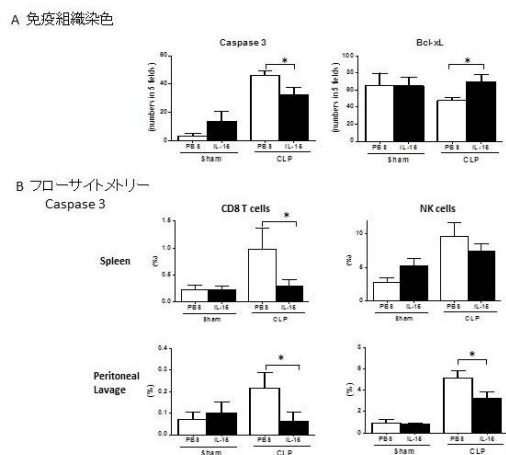


図2 IL-15は高齢マウス敗血症モデルにおいて、敗血症に誘導されたCaspase3の上昇とBcl-xLの低下を改善する。

研究3 高齢マウス由来T細胞非活性化の原因遺伝子の探索

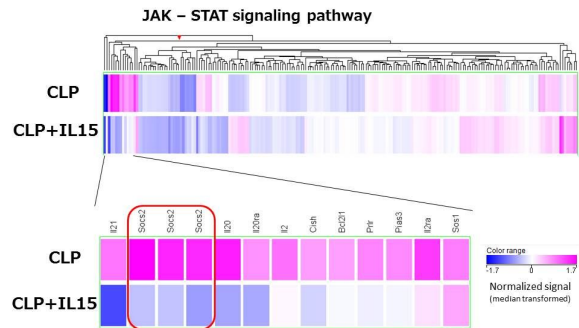


図3 マイクロアレイpathway解析でJAK-STAT系解析。SOCS familyがIL-15投与で有意に低下していた。

マイクロアレイにて得られた遺伝子発現プロファイルを pathway 解析したところ、279個の遺伝子がCLPおよびIL-15投与にて有意な増減変化を認めた(図3)。Real-time PCRではT細胞の分化・成熟に重要な役割を果たすSuppressor of Cytokine Signaling 1(SOCS1)の発現量が、敗血症マウスで増加しIL-15投与にて有意に低下していた(p<0.05)。

【結語】SOCS1はナイーブT細胞からエフェクターメモリーT細胞への分化を抑制する調節因子で、IL-15はSOCS1を制御することでCD8+T細胞の活性化や分化を誘導すると考えられる。本研究より、SOCS1の発現制御が新たな高齢者敗血症の治療ターゲットとなる可能性が示唆された。

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4件)

1. Inoue S, Suzuki K, Komori Y et al: Persistent inflammation and T cell exhaustion in severe sepsis in the elderly. Crit Care, 2014; 18: R130 (査読あり)
2. Inoue S, Suzuki-Utsunomiya K, Okada Y et al: Reduction of immunocompetent T cells followed by prolonged lymphopenia in severe sepsis in the elderly. Crit Care Med, 2013; 41: 810-819 (査読あり)
3. Inoue S, Suzuki-Utsunomiya K, Komori,

et al: Fermentation of non-sterilized fish biomass with a mixed culture of film-forming yeasts and lactobacilli and its effect on innate and adaptive immunity in mice. J Biosci Bioeng, 2013; 116: 682-687 (査読あり)

4. Inoue S, Sato T, Suzuki-Utsunomiya K et al: Sepsis-induced hypercytokinemia and lymphocyte apoptosis in aging-accelerated Klotho knockout mice. Shock, 2013; 39: 311-316 (査読あり)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 井上 茂亮「高齢者敗血症患者ではT細胞の数と機能が低下する」第36回米国ショック学会 サンディエゴ(米国) 2013年6月4日
2. 井上 茂亮「免疫老化が敗血症に与える影響」第1回国際集中治療救急医学会 イスタンブール(トルコ)2013年11月8日
3. 井上 茂亮「輸液とARDS」第29回日本Shock学会総会 松山市コミュニティセンター(愛媛県 松山市)2014年5月18日
4. 井上 茂亮「高齢者敗血症では炎症と免疫抑制が遷延する」第37回米国ショック学会 シャーロット(米国)2014年6月9日
5. 井上 茂亮「新たな免疫強化療法としての抗Programed death-1抗体の可能性～高齢者敗血症の治療法を探る」第56回日本老年医学会学術集会 福岡国際会議場(福岡県 福岡市)にてシンポジウムで発表 2014年6月13日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

井上研究室

<http://shigelabo.med.u-tokai.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 茂亮 (INOUE Shigeaki)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号: 30582209