

177. 老化 T 細胞の再活性化に基づいた高齢者敗血症治療戦略

井上 茂亮

Key words : 敗血症, 高齢者, 免疫抑制,
インターロイキン 15, 免疫老化

*東海大学 創造科学技術研究機構
医学部門

緒 言

高齢の救急患者は激増している

少子高齢化は日本が抱える大きな社会問題である。2030 年には 65 歳以上人口は約 3,500 万人に達し、総人口の約 30%を占めるといわれている。東海大学病院高度救命救急センターにおいても高齢患者数は爆発的に増加し、平成 21 年度入院患者平均年齢は 62 歳に達した。若年者の都市部への流出や核家族化にともなう独居老人の増加などの社会背景を勘案すると、今後も救命センターに搬送される高齢者は増加すると考えられる。高齢者では軽度の侵襲が致死的な病態に移行することが多く、軽度な外傷や熱傷、脳梗塞、市中肺炎、悪性腫瘍等の侵襲から免疫抑制状態に陥り全身状態が悪化する。とくに高齢者や基礎疾患のある患者では局所の感染が全身性に波及する敗血症に陥りやすい。

敗血症は死亡率の高い重篤な感染症である

日本での年間死亡者数は約 6,000 人であるものの、米国での年間死亡者数は約 20 万人で集中治療室での死亡原因第 2 位である。敗血症の急性期では炎症性サイトカインの増加に伴う全身性の炎症性反応が引き起こされる。しかし亜急性期ではリンパ球のアポトーシスが誘導され、リンパ球の数が減少し免疫活性が低下することが知られている。またリンパ球のアポトーシス誘導の程度は敗血症の予後と関係していることから、リンパ球のアポトーシスを抑制できれば、敗血症の予後が改善すると予想される。このため亜急性期の免疫抑制状態に陥る敗血症では、免疫応答細胞のアポトーシスを抑制することが治療戦略の 1 つである。

高齢敗血症研究は少ない

これまでの報告では高齢マウスが侵襲学の基礎研究では用いられることは少なく、ヒトに例えると 20 歳前後に相当する 4-6 週齢のマウスが研究で用いられることが多い。高齢敗血症マウスモデルは若年モデルと比べて、生命予後が増悪するという報告があるものの、高齢モデルの敗血症研究は少なくその免疫機能は十分に解析されていない。そのため、本研究の第 1 の目的は、ヒトおよびマウスの高齢敗血症における免疫機能と病態メカニズムを免疫応答細胞のアポトーシス解析を中心に明らかにすることである。本研究の第 2 の目的は、その解析結果をもとに高齢敗血症モデルの免疫機能を改善する適切な分子を選択し、その効果を判定することである。

高齢者における免疫機能変化

高齢者における免疫機能はまだ不明な点が多いが、若年者と比較して高齢者の末梢血では CD8+ T 細胞数が低下し、NK 細胞の機能が低下するという報告がある。このため高齢者が敗血症に陥った場合、さらに CD8+ T 細胞および NK 細胞の数や機能が減少すると著者らは予想している。敗血症は死亡率の高い重篤な全身性感染症である。高齢者では敗血症が重篤化しやすいが、その病態はいまだ不明である。

*現所属：東海大学 医学部 外科学系救命救急医学

IL-15 の高齢者敗血症治療薬としての可能性

敗血症が高齢モデルの CD8+ T 細胞および NK 細胞の数や機能を著しく低下させるという仮説のもと、著者は高齢敗血症患者の有力な治療薬の候補として 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、これらの細胞のアポトーシス抑制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。著者らは、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、25% であった若年マウス敗血症生存率を 70% まで改善することを発見した。そこで著者は IL-15 を高齢者敗血症患者に応用し、CD8+ T 細胞と NK 細胞のアポトーシスを抑制することで、免疫機能ならびに生命予後を改善しようと予想している。

本研究の目的は、高齢者敗血症患者と高齢マウス敗血症モデルの免疫機能解析を行うとともに、CD8+ T 細胞・NK 細胞の成長因子である IL-15 の高齢敗血症への効果を明らかにすることである。

方 法

高齢敗血症における免疫機能を解析し、病態メカニズムならびに IL-15 の治療薬としての可能性を明らかにするため、本研究は以下の 2 つの実験系で構成される。

1. 高齢敗血症モデルの免疫機能解析

1-1) 高齢者敗血症の免疫機能を解析する

本学倫理委員会のガイドラインにもとづき、インフォームドコンセントを実施された若年（65 歳未満）および高齢者ボランティア（65 歳以上）から血液を採取後、末梢血単核球を分離する。リンパ球を活性化させるため、抗 CD3/28 抗体を添加し末梢血単核球を刺激し、活性化および非活性化マーカーの発現率をフローサイトメトリーにて解析する。また高齢者敗血症の 3 ヶ月後生存率を成人敗血症と比較検討する。

1-2) 高齢マウス敗血症モデルを作製し、その免疫機能を解析する。

高齢（生後 2 歳）/若年（生後 4-6 週）マウスを用い、腹腔内盲腸穿孔 (CLP) による敗血症モデルを作製、24 時間後に脾臓・胸腺・腸間膜リンパ節を回収して免疫機能解析を行い、比較検討した。

1-3) CLP マウス作製後の生存率を高齢マウスと若年マウスで比較した。

2. 高齢敗血症モデルにおける IL-15 の有効性の検討

2-1) 上記 1-1 の実験系に準じ、高齢敗血症患者の末梢血単核球に IL-15 を添加し培養し、免疫機能改善効果を解析する。

2-2) 上記 1-2 の実験系に準じ、高齢マウス敗血症モデルに IL-15 を添加し、免疫機能改善効果と生存率を解析する。

3. 高齢マウス由来 T 細胞非活性化の原因遺伝子の探索

腸管穿孔 (CLP) による高齢マウス敗血症モデルを作製し、その 3 時間後に IL-15 を投与。24 時間後に脾臓を摘出し、FACS にて CD8+ T 細胞を分離し、mRNA を抽出。マイクロアレイにて網羅的に発現遺伝子プロファイルを解析した後、Real-time PCR にて発現変化を確認した。

結果および考察

1. 高齢敗血症モデルの免疫機能解析

1-1) ヒト高齢者免疫応答細胞の解析

65 歳以上の高齢者では、18 歳から 64 歳の若年者と比較して、CD8+ T 細胞数が有意に減少していた。また高齢者敗血症患者では CD4+ T 細胞数が減少していた。

T 細胞を活性化する受容体である CD28 陽性率が、CD4+ T 細胞および CD8+ T 細胞において有意に減少していた (CD4+ T 細胞 : 10%, CD8+ T 細胞 : 30% 減少, $P < 0.01$). また高齢者の CD4+ および CD8+ T 細胞では、T 細胞を非活性化する受容体である programmed death-1 (PD-1) の陽性率が若年者と比較して増加していた. 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った. 以上より、高齢者敗血症の予後は不良であり、①加齢に伴う CD8+ T 細胞数の減少、②敗血症後の CD4+ T 細胞数の減少および活性化障害などの獲得免疫障害が認められた.

1 - 2) 若年/高齢マウス敗血症モデルの免疫機能および生存率の比較

高齢マウス (生後 2 年) では若年マウス (生後 4 - 6 週間) と比較して 脾臓および腸管リンパ節における CD4+ T 細胞の PD-1 陽性率が有意に上昇していた (脾臓 18 vs 70%) (各 $n=8$). また PD-1 同様、T 細胞を抑制的に制御する受容体である Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) の発現率も若年マウスと比較して、高齢マウスで陽性率が増加していた (脾臓 1 vs 4%) (各 $n=8$). また高齢腹膜炎型敗血症モデルマウス (以下高齢 CLP マウス) ではその陽性率が 6 % に上昇し、敗血症侵襲で T 細胞が活性化されにくい状況に陥っていることが明らかになった.

さらに活性化 T 細胞の一つのサブタイプであり、T 細胞の活性や増殖を抑制する制御性 T 細胞の陽性率は加齢と共に増加し (若年 3 %, 高齢 10%; $p < 0.01$), さらに高齢 CLP マウスでの陽性率は 18% までに上昇していた. 以上より、高齢マウスに敗血症侵襲が加わることで、さらなる制御性 T 細胞の増加に関係していることが明らかになった (各 $n=8$).

細胞死の一つであるアポトーシスを免疫組織化学染色 (カスパーゼ 3 染色) にて評価した. 脾臓におけるアポトーシス陽性細胞数は高齢マウス敗血症モデルで著しく増加していた. 胸腺でも同様の傾向を認めた. このため、脾臓および胸腺におけるリンパ球のアポトーシスは加齢と敗血症侵襲で増加することが明らかになった (各 $n=8$).

1 - 3) サバイバルスタディー

上記高齢/若年マウス敗血症モデルの生存率を比較検討した. 高齢および若年マウス敗血症モデルの 7 日後生存率はそれぞれ 0 % と 63% であり、有意に高齢マウスが生命予後不良であった. 敗血症後 2 日目までは若年マウスと同程度の生存曲線の低下であるものの、2 日目以降は急激に高齢マウスで生存率が低下しており、敗血症後の亜急性期の死亡が高齢マウスの特徴であると推測している.

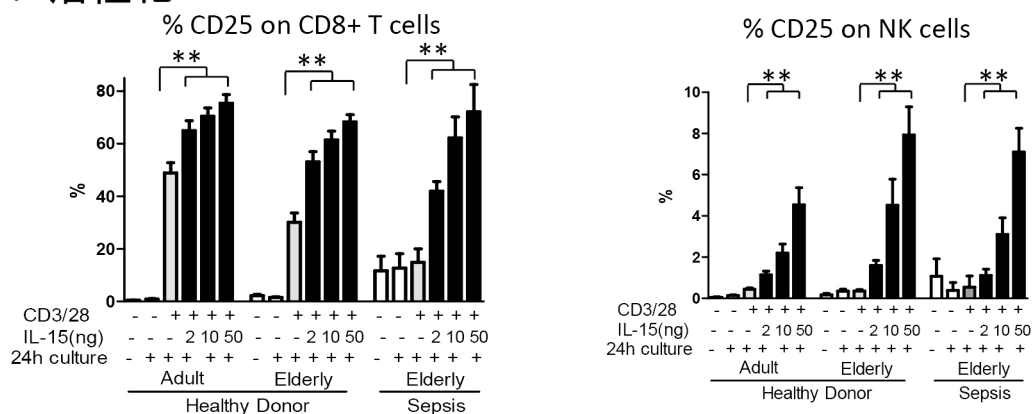
2. 高齢敗血症モデルにおける IL-15 の有効性の検討

2 - 1) 高齢ヒト末梢リンパ球に対する IL-15 の効果 (*in vitro*)

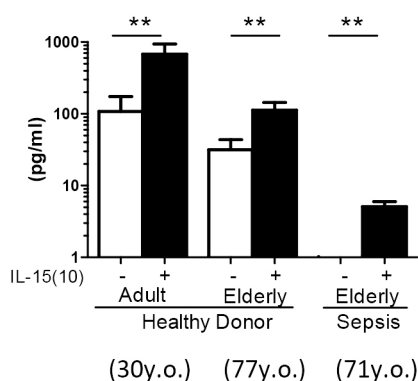
18-65 歳の若年者と 65 歳以上の高齢者から採血し、末梢血単核球 (85% T 細胞) を単離. 末梢血単核球を T 細胞刺激因子 (抗 CD3/28 抗体) とともに 24 時間培養し、T 細胞の活性化の程度をフローサイトメトリーにて判定.

高齢者由来の老化 T 細胞は若年者 T 細胞と比較して 30% 程度しか活性化できないものの、IL-15 を添加することで濃度依存的に T 細胞増殖効果を発揮した. 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).

A 活性化



B IFN γ 産生能



C 増殖

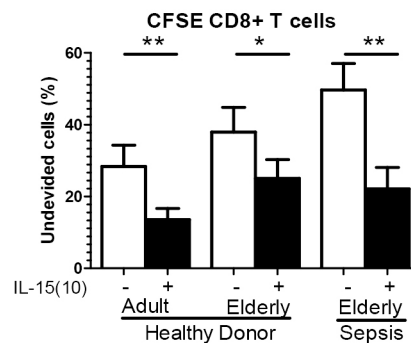


図1. IL-15は加齢により障害されたT細胞・NK細胞の活性化・IFN γ 産生能・増殖を改善する。

A) CD8+ T および NK 細胞における活性化マーカー (CD25) 発現率. B) PBMC 培養上清中 IFN γ 濃度. C) CFSE を用いた CD8+ T 細胞増殖アッセイ. **p < 0.05 (Mann-Whitney analysis).

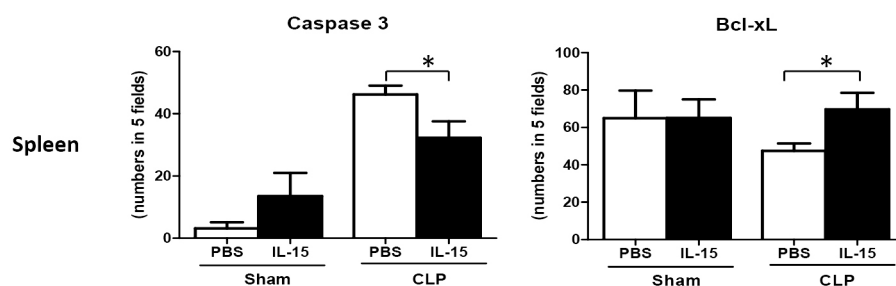
2-2) 高齢マウス敗血症モデルに IL-15 を投与し、免疫機能と生存率に対する効果を解析 (*in vivo*)

(1) サバイバルスタディー：高齢マウスに腹膜炎敗血症モデルを作製3時間後に、IL-15 1.5 μ g を皮下投与した。7日後生存率は IL-15 投与群 67%、コントロール群 17%であり、有意に IL-15 投与は高齢マウス敗血症モデルの生命予後を改善した (p < 0.05)。

(2) 免疫機能解析：高齢マウスに腹膜炎敗血症モデルを作製3時間後に、IL-15 1.5 μ g を皮下投与し24時間後に sacrifice し、その免疫機能を解析。

IL-15 は高齢マウス敗血症モデルの血清及び腹腔内洗浄液の IFN γ を上昇させ、バクテリアクリアランスを増加させた。また IL-15 は高齢マウス敗血症モデルにおいて、脾臓における抗アポトーシス蛋白 Bcl-xL を上昇させ、CD8+ T 細胞および NK 細胞におけるアポトーシスを抑制した (図2)。

A 免疫組織染色



B フローサイトメトリー

Caspase 3

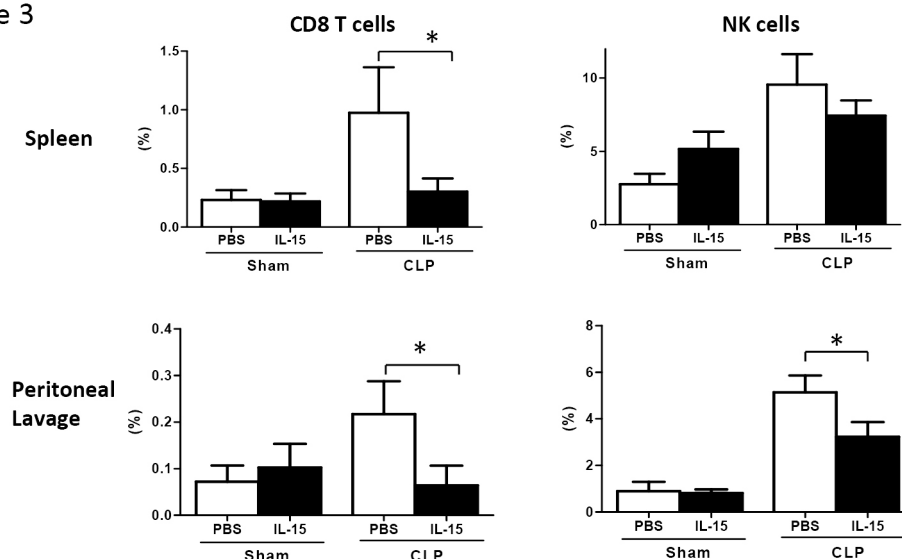


図2. IL-15 は高齢マウス敗血症モデルにおいて、敗血症に誘導された Caspase 3 の上昇と Bcl-xL の低下を改善する。

A) 脾臓における Caspase3 および BCL-xL 陽性細胞数. B) 脾臓/腹腔洗浄液における CD8+ T/NK 細胞の Caspase3 陽性率. * $p < 0.05$ (Mann-Whitney analysis).

3. 高齢マウス由来 T 細胞非活性化の原因遺伝子の探索

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。また 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 ($p < 0.05$)。

考 察

IL-15 は活性化しにくい高齢者ならびに高齢マウスの T 細胞を再活性化させ、高齢マウス敗血症モデルの生命予後を改善した。また 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 SOCS 1 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、SOCS 1 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。

今後は SOCS1 を中心に、IL-15 による老化 T 細胞活性化のシグナル伝達系に介入する新たな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高齢者敗血症の新規治療薬の開発を目指す予定である。

文 献

- 1) Inoue, S., Vasilevskis, E. E., Pandharipande, P. P., Girard, T. D., Graves, A. J., Thompson, J., Shintani, A. & Ely, E. W. : The impact of lymphopenia on delirium in ICU patients. *PLoS One*, **10** : e0126216, 2015.
- 2) Inoue, S., Suzuki, K., Komori, Y., Morishita, Y., Suzuki-Utsunomiya, K., Hozumi, K., Inokuchi, S. & Sato, T. : Persistent inflammation and T cell exhaustion in severe sepsis in the elderly. *Crit Care*, **18** : R130, 2014.
- 3) Inoue, S., Suzuki-Utsunomiya, K., Okada, Y., Iida, Y., Taira, T., Miura, N., Tsuji, T., Yamagiwa, T., Morita, S., Chiba, T., Sato, T. & Inokuchi, S. : Reduction of immunocompetent T cells followed by prolonged lymphopenia in severe sepsis in the elderly. *Crit. Care Med.*, **41** : 810-819, 2013.