

長寿医療研究開発費 2022年度 総括研究報告

長寿医療研究のための技術基盤形成に資する基礎技術研究

②免疫細胞の解析と制御法の開発 (21-27-2)

主任研究者 錦見 昭彦 国立長寿医療研究センター バイオセーフティ管理室 (室長)

研究要旨

加齢に伴って病原体に対する特異性が低下し、獲得免疫系の細胞が非特異的に応答することにより炎症性を誘導することが知られている。このような非特異的な炎症応答の一因として、老化関連 T (SA-T) 細胞や加齢関連 B 細胞 (ABC) として同定されている、抗原非特異的な炎症を誘導するリンパ球の集団が加齢とともに増加することがあげられている。本研究は、これら老化に関連した T 細胞や B 細胞の性質を明らかにして、これらを制御することにより、免疫系の老化を研究ためのツールとして使用できる動物実験系を開発することを目的としている。これまでに、SA-T 細胞の産生や活性を抑制する化合物を見出したほか、ABC に特徴的な細胞骨格制御について明らかにした。また、ABC の産生を抑制する化合物をスクリーニングする系を確立した。あわせて、免疫老化に関与する可能性のある因子 (MELK と DOCK11) に着目し、その機能の解析を進めている。

主任研究者

錦見 昭彦 国立長寿医療研究センター研究所バイオセーフティ管理室 (室長)

A. 研究目的

免疫系を司るリンパ球において、SA-T 細胞や ABC など、加齢とともに蓄積する集団の存在が知られている。これらは、抗原に対する増殖応答を失っている一方、非特異的に炎症性の分泌因子を産生する。例えば SA-T 細胞は、抗原特異的な応答能が失われている一方で、オステオポンチンなどの炎症性因子を大量に分泌し、慢性的な炎症や自己反応性の免疫細胞の活性化を誘導している。最近、免疫細胞で選択的に細胞老化を誘導すると、他の組織の細胞老化が促進されて生体機能が低下すること、すなわち、免疫系の老化が個体の老化に大きな影響を与えることが示された。これまでに、ワクチンにより SA-T 細胞を特異的に除去する試みもなされており、糖尿病モデルマウスへのワクチン投与により SA-T 細胞を取り除くことで、糖尿病の症状が改善されることが示された。また、加齢個体の

腎障害において、SA-T細胞やABCによる三次リンパ組織の形成が組織修復を妨げていることが示されている。このように、SA-T細胞やABCの蓄積が、加齢や生活習慣病における慢性炎症や自己免疫疾患の一因となっていることが明らかになりつつある。

これらのことから、SA-T細胞やABCの性質を明らかにし、動物レベルでこれを除去する方法を開発することは、免疫老化の実態を解明に寄与できるだけでなく、ヒトに対して応用可能な技術を提供できると考えられる。しかしながら、低分子化合物等により、老化関連リンパ球を制御する方法は報告されていない。前年度までの研究から申請者は、SA-T細胞で高発現するシグナル伝達因子を特定し、これを阻害することで、SA-T細胞の機能や産生を抑制できることを見出した。本研究では、この新手法を発展させるとともに、様々な阻害剤によるスクリーニングを通じてSA-T細胞やABCの分化や機能発現のメカニズムを解明し、より効果的にこれらの細胞を制御する方法を確立することを目的としている。

また、これまでの研究により、活性化したB細胞において発現が上昇する因子として、DOCK11とMELKを同定した。本研究では、免疫系の老化におけるこれらの因子の役割について、ノックアウトマウス等を用いて解析することも計画している。

## B. 研究方法

### 1. SA-T細胞の産生と機能を抑制する化合物についての検討

昨年度見出した化合物を、2週間にわたって1日1回マウスに経口投与した。投与後のマウスから脾臓を採取し、リンパ球を単離した後、抗CD4抗体、抗PD-1抗体、抗CD153抗体で染色した。染色した細胞をフローサイトメトリーで解析し、CD4+PD-1+CD153+のSA-T細胞の数を計測した。

### 2. ABCの遊走能に関する解析

コラーゲンをコートしたトランスウェルを用いて、脾臓より単離した細胞のCXCL12に対する遊走能を検討した。また、細胞骨格制御に関与する遺伝子群を比較し、ABCで高発現している遺伝子を同定した。これらの遺伝子由来の因子を阻害する化合物存在下で細胞遊走を検討した。

### 3. T細胞におけるDOCK11の機能についての検討

野生型およびDOCK11欠損マウスの脾臓とリンパ節からCD4+T細胞とCD8+T細胞を単離し、プレートにコートした抗CD3抗体と抗CD28抗体で刺激した際のサイトカイン産生、増殖について検討した。また、これらの刺激に応答したシグナル伝達因子のリン酸化やNFAT2の核移行について検討した。

### 4. 免疫系におけるMELKの機能

MELK—flox マウスと Lck-Cre トランスジェニックマウスを交配して、T 細胞特異的に MELK を欠損したマウスを作製した。このマウスのリンパ組織より細胞を単離し、フローサイトメトリーを用いて T 細胞のサブセットを解析した。また、各組織の薄切標本を作製し、炎症の有無について検討した。

(倫理面への配慮)

マウスの飼育や実験は、「動物の愛護及び管理に関する法律」に準じて、苦痛の緩和等の適切な処置を講じた。動物実験ならびに遺伝子組換え実験については、それぞれ、国立長寿医療研究センター動物実験倫理委員会および遺伝子組換え実験安全委員会で、研究実施の妥当性について承認された方法で行った。

## C. 研究結果

### 1. SA-T 細胞の産生と機能を抑制する化合物についての検討

前年度同定した化合物を加齢マウスに経口投与し、脾臓より採取した細胞をフローサイトメトリーにより解析した。その結果、化合物投与により、SA-T 細胞 (PD-1+CD153+の CD4+ T 細胞) の数が減少することが示され、この化合物が個体レベルで有効であることが示された。

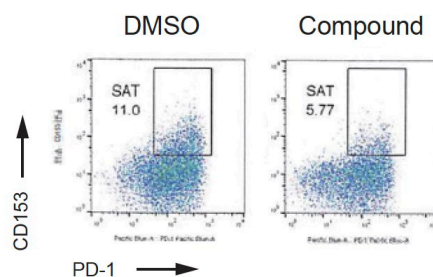


図 1. 化合物を投与したマウスにおける SA-T 細胞の減少

また、p16Ink4a の下流にヒト CD2 (hCD2) 遺伝子をノックインすることにより、老化細胞の表面に hCD2 を発現するマウスを用いて、細胞老化した T 細胞を除去するマウスモデルの作製を試みた。具体的には、サポリン標識した抗 hCD2 抗体をノックインマウスの静脈内に投与し、hCD2 を表面に発現する老化細胞を特異的に傷害する実験系を作出した。その結果、標識抗体の投与により hCD2 を発現する T 細胞を除去することができ、SA-T 細胞の数を減少させる、ナイーブ T 細胞の割合を増加させることにより、T 細胞の老化を抑制することに成功した。

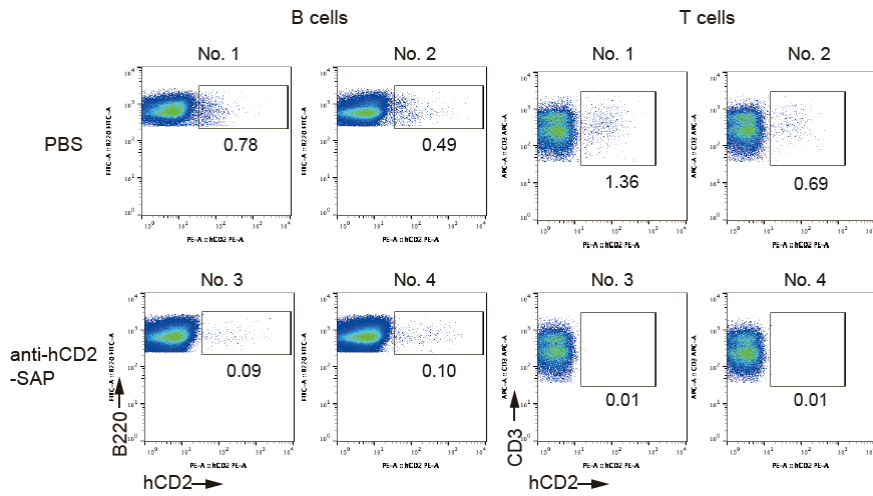


図 2. サポリン標識した抗 hCD2 抗体投与による hCD2 陽性 B 細胞 T 細胞の除去

## 2. ABC の遊走能に関する解析

前年度、ABC において重合型アクチン量が増加しており、ケモカインに対する遊走能が亢進していることを明らかにした。本年度は、コラーゲンゲルをコートしたトランスウェルを用いて、三次元環境下におけるケモタキシスについて検討した。その結果、ABC は、その他の B 細胞に比べて三次元環境下での遊走も亢進していることが明らかになった。次に、アクチン細胞骨格制御に関わる遺伝子の発現を解析したところ、遺伝子 A と遺伝子 B の発現が上昇していることを見出した。A に対する阻害剤を用いると、通常のトランスウェルでの遊走は影響を受けないが、三次元環境下での遊走が障害されることが明らかになった。一方、B に対する阻害剤は、通常のトランスウェル、三次元環境下ともに遊走が障害された。

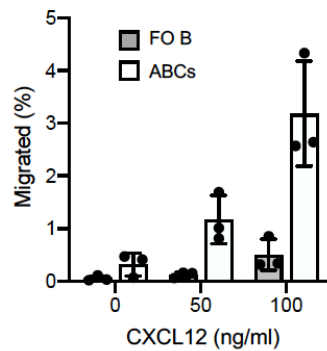


図 3. ABC における三次元環境下でのケモタキシスの亢進

## 3. T 細胞における DOCK11 の機能についての検討

前年度に、DOCK11 を欠損した B 細胞において、LPS 刺激に応答したサイトカイン産生が障害されていることを見出した。今年度は、抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体を用いて抗原受容体を刺激した T 細胞におけるサイトカインの産生について検討した。その結果、

CD4<sup>+</sup> T 細胞については、DOCK2 欠損細胞において、IL-2 の産生が亢進していたのに対して、TNF- $\alpha$  と IL-4 の産生が減少していた。また、CD8<sup>+</sup> T 細胞については IL-2, IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$  の産生が亢進していた。

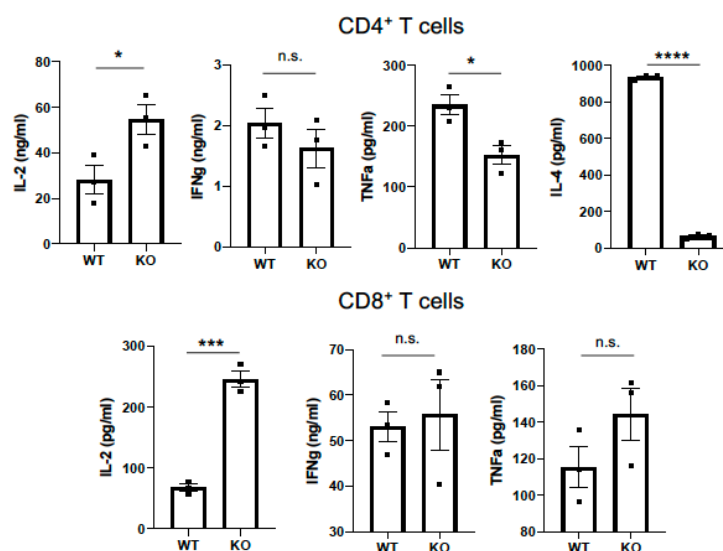


図 4. T 細胞のサイトカイン産生における DOCK11 の機能

#### 4. 免疫系における MELK の機能

T 細胞特異的に MELK を欠損したマウスにおいて、脾臓、リンパ節を構成する T 細胞のうち、活性型の T 細胞数が増加していることが明らかになった。また、12 ヶ月齢を超えるマウスの肺や肝臓において、炎症が生じていることが示された。

#### D. 考察と結論

hCD2 マウスにサポリン標識した抗 hCD2 抗体を投与することにより、細胞老化した T 細胞を除去することができ、ナイーブ T 細胞の割合が上昇すること、SA-T 細胞の割合が減少することが示された。このことから、細胞表面抗原を標的として、T 細胞の老化を抑制できることが示唆された。また、新たに見出した化合物を加齢マウスに投与することにより SA-T 細胞が減少することが明らかになった。今後は、SA-T 細胞が増加することが知られている病態モデルマウスを用い、化合物の投与により病態が改善するかどうかについて検討する予定である。

ABC については、三次元環境下での遊走が亢進していることが示され、ABC が二次リンパ組織や炎症組織内で活発に運動する細胞であることが示唆された。また、アクチン細胞骨格制御因子のうち 2 種類が、ABC において他の B 細胞より発現が亢進していること、うちひとつが特に三次元環境下での遊走に関与していることが明らかになった。

最近、DOCK11 遺伝子の変異に起因して、貧血、炎症性疾患、免疫不全を発症する症例が複数の独立した家系で認められている。本研究により、DOCK11 がサイトカイン産生の

制御に関与しており、DOCK11 欠損マウスの T 細胞において、増殖と活性化に関与する IL-2 の発現が亢進する一方、抗炎症にはたらく IL-4 の発現が低下することが明らかになった。これらのことから、DOCK11 がサイトカイン産生制御に重要な役割を果たしており、この制御が破綻することにより疾患が引き起こされることが示唆された。今後、DOCK11 がサイトカイン産生を制御するメカニズムを解明する予定である。

MELK に関しては、これまでに、がん細胞において高発現することが知られており、がん細胞の増殖に関与していると考えられている。本研究で、抗原刺激を受けたリンパ球においても MELK の発現が見られることが明らかになり、MELK が何らかの生理的な役割を担っていることが考えられる。今回、T 細胞特異的に MELK を欠損することにより、加齢したマウスにおいて炎症が誘導されることが示され、このキナーゼが加齢性の炎症の制御に関与していることが示唆された。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Sugiyama Y, Harada T, Kamei Y, Yasuda T, Mashimo T, Nishikimi A, Maruyama M. senolytic immunotoxin eliminates p16<sup>INK4a</sup>-positive T cells and ameliorates age-associated phenotypes of CD4<sup>+</sup> T cells in a surface marker knock-in mouse. *Exp Gerontol* 174: 112130, 2023.

##### 2. 学会発表

- 1) 杉山悠真、錦見昭彦、丸山光生 p16<sup>INK4a</sup>-associated CC-chemokine gene cluster expression evokes a diversity in cellular senescence. 第 45 回日本基礎老化学会大会 2022.7.27
- 2) 錦見昭彦、藤原光宏 老化関連 B 細胞における細胞骨格再構成の促進 第 95 回日本生化学会大会 2022.11.19
- 3) 杉山悠真、原田 種展、錦見昭彦、丸山光生 細胞老化マーカー p16<sup>INK4a</sup> 発現に付随したクラスター遺伝子制御と個体老化の関連について 第 45 回日本分子生物学会年会 2021.12.1
- 4) 杉山悠真、藤原光宏、坂本明彦、錦見昭彦、丸山光生 Deduced function of DOCK11 in B cells in secondary immune responses with protein antigens. 第 51 回日本免疫学会学術集会 2021.12.7

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし