

免疫系が老化するメカニズムの解明と、それを標的とした予防・治療法の開発
(24-7)

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

加齢とともに免疫機能が低下し、病原体に対する抵抗力が減弱したり、非特異的な炎症応答により慢性的な炎症が引き起こされたりすることが知られている。このような、持続的な低度の炎症応答が、加齢や生活習慣病による疾患を引き起こしたり、症状を悪化させたりすることから、免疫老化は様々な疾患の病態に深く関わっていることが明らかになりつつある。したがって、老化による免疫系の変化を抑制することは、高齢者の健康状態の維持において有効な戦略となり得る。申請者らは、これまでに免疫系の老化に関わる複数の因子を同定し、それらの機能解析や制御法を研究してきた。本研究では、これらのうち、1) 加齢にともなって増加する老化関連 T 細胞 (SA-T 細胞) や老化関連 B 細胞 (ABC) の機能解析とこれらを標的とした創薬、2) 加齢に伴う炎症における分子 X の役割、3) 免疫細胞における DOCK11 の役割とこれを阻害する化合物のスクリーニングという 3 つの研究を通じて、免疫老化のメカニズムを理解し、その成果に基づいて予防、治療法を開発することを目的として研究を行った。

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)

A. 研究目的

1) SA-T 細胞や ABC の機能解析とこれらを標的とした創薬

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。そこで、SA-T 細胞や ABCs 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。本研究では、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することに加え、免疫系の老化に関与している分子の機能を解明することにより効果的に老化による免疫機能低下を制御する方法を確立することを目的としている。

2) 加齢に伴う炎症における分子 X の役割

分子 X ががん細胞でのみ発現し、その増殖や生存に関与しているとされていた。申請者らは、分子 X が正常な T 細胞で抗原刺激依存的に発現すること、欠損マウスが加齢すると組織に T 細胞が浸潤し炎症を起こすことを見出した。このことから、分子 X が加齢による炎症性疾患に関与している可能性が示唆され、そのメカニズムをより詳細に解析することを目的にしている。

3) 免疫細胞における DOCK11 とその関連分子の役割

申請者を含むグループが、DOCK11 が遺伝性疾患の原因遺伝子であることを見出し、T 細胞によるサイトカイン産生の異常が疾患の一因となっていることを明らかにした。今後、そのメカニズムを解明し、疾患を治療する技術を開発することが望まれている。

B. 研究方法

1) SA-T 細胞や ABC の機能解析とこれらを標的とした創薬

SA-T 細胞を標的とした化合物の効果を検証するにあたり、SA-T 細胞を介した病態モデルの構築について検討した。既報にしたがい、12 週齢のマウスに虚血再灌流の措置を実施し、腎臓よりリンパ球を単離しフローサイトメトリーで解析した。

ABC について、これらの細胞で発現が上昇していることを見いだした Fascin1 を RNAi でノックダウンし、コラーゲンゲル内での動態をタイムラプス撮影した。また、ABC で Pak1 の発現が上昇していることの意義を検討するにあたり、ABC を除いた B 細胞に EGFP タグを付加した Pak1 もしくは EGFP の発現ベクターを導入し、コラーゲンゲル内での動態をタイムラプス撮影して比較した。

2) 加齢に伴う炎症における分子 X の役割

分子 X の欠損によりエフェクター（活性化）T 細胞の遊走が亢進していることから、野生型および分子 X 欠損 T 細胞を、抗 CD3 および抗 CD28 抗体で刺激し、細胞表面におけるケモカイン受容体 CXCR3 の発現を、フローサイトメトリーを用いて解析した。また、エフェクター T 細胞におけるシグナル伝達における分子 X の役割を解析するため、活性化させた野生型および分子 X 欠損 T 細胞に IL-2 を添加し、Akt などのシグナル伝達因子のリン酸化をウェスタンブロッティングで解析した。

3) 免疫細胞における DOCK11 とその関連分子の役割

野生型および DOCK11 欠損マクロファージのケモカイン存在下で培養し、タイムラプス撮影することによりその動態を観察した。また、これらのマクロファージを LPS 刺激し、培養上清中に分泌された炎症性サイトカインの濃度について検討した。

DOCK11 の阻害剤を探索するにあたり、リコンビナント DOCK11-DHR2 (GEF) ドメインと Cdc42 を。BODIPY-標識した GTP 存在下で反応させ、GDP-GTP 交換反応に応じて蛍光が増大することで、GEF 活性を測定できる実験系を構築した。この実験系を用いて既存薬より構成される化合物のライブラリをスクリーニングし、DOCK11 を阻害する化合物を同定した。同定した化合物存在下で野生型マクロファージを LPS 刺激し、サイトカイン産生に対する阻害効果を観察した。

(倫理面への配慮)

本研究において、遺伝子組換え遺伝子は、遺伝子組換え安全委員会で承認を受けた実験計画 (遺 5-1) にもとづき、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に準じた実験設備を備えた施設内で実施した。マウスの実験は、動物実験倫理委員会で承認された実験計画 (動 5-6) にもとづき、「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て実施した。

C. 研究結果

1. SA-T 細胞や ABC 細胞の機能解析とこれらを標的とした創薬

昨年度までに、*in vitro* で SA-T 細胞の産生と機能を抑制する化合物を同定した。この化合物の *in vivo* での効果を検証するにあたり、SA-T 細胞を介した病態モデルの構築について検討した。既報にしたがい、12 週齢のマウスに虚血再灌流の措置を実施した結果、腎臓における SA-T 細胞の産生 (図 1) や、炎症因子の遺伝子発現の増加が認められ、化合物の評価に使用可能であることが示された。

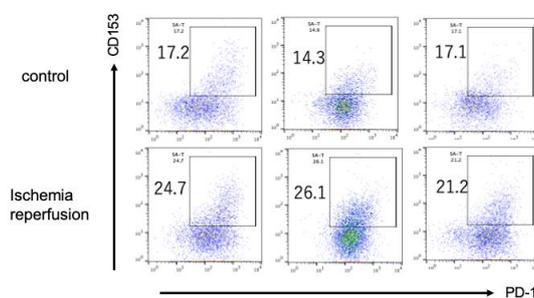


図 1 虚血再灌流による SA-T 細胞 (PD-1+ CD153+) の増加

虚血再灌流なし (上段) あり (下段) の腎臓より T 細胞を採取し解析した。数字は SA-T 細胞の割合を示す

昨年度までに、ABC において Fascin1 と Pak1 が高発現しており、これにより、ABC が他の

B細胞に比べて三次元環境下での遊走能が亢進していることを示した。これらを証明するに当たり、ABCにおいてRNAiでFascin1の発現をノックダウンした際の、三次元環境下での遊走能を検討した。その結果、Fascin1をノックダウンした細胞では、遊走能が有意に低下していることが示された(図2A)。また、Pak1の亢進が遊走能を上昇させていることを示すに当たり、ABCを除いたB細胞にPak1を過剰発現させた際の遊走能について検討した。その結果、Pak1を導入したB細胞で遊走能が上昇することが示された(図2B)。これらのことから、ABCにおいてFascin1とPak1の発現が上昇することで、臓器内など三次元環境での遊走能が亢進することが明らかになった。

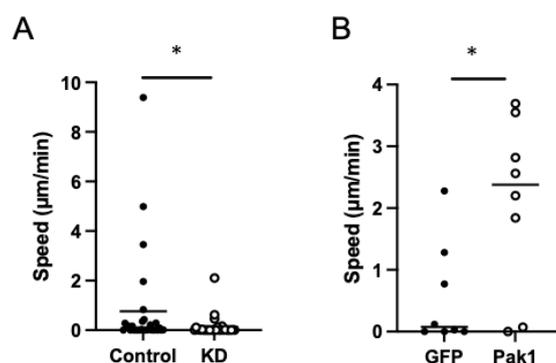


図2 B細胞の遊走におけるPak1とFascin1の影響

- A. Fascin1のノックダウン(KD)におけるABCの遊走能の低下
- B. Pak1を過剰発現させたB細胞における遊走能の亢進

2. 加齢ともなう炎症における分子Xの役割

分子Xはセリン・スレオニンキナーゼで、これまで、主にかん細胞で発現すると考えられてきた。昨年度までに、分子Xが抗原受容体刺激に反応してT細胞で発現が誘導されること、活性化したT細胞(エフェクターT細胞)においてケモカインに反応した遊走が亢進し、T細胞特異的に分子Xを欠損したマウス(分子X-cKOマウス)が加齢すると、T細胞が肺や肝臓に浸潤して炎症を惹起することを明らかにした。本研究課題では、分子Xを欠損することによりエフェクターT細胞の遊走が亢進するメカニズムの解明を目指して研究を継続している。

T細胞の抗原受容体を刺激し、細胞表面に発現するケモカイン受容体CXCR3の発現を比較したところ、CD4+ T細胞、CD8+ T細胞ともに分子X欠損T細胞において、発現する細胞の割合が上昇しており、CD8+ T細胞ではその上昇が顕著であった(図3)。このことから、抗原刺激に反応して発現する分子Xが、CXCR3の発現を負に制御することにより、エフェクターT細胞を誘引するケモカイン(CXCL9, CXCL10)に対して過度に遊走することを防いでいると考えられた

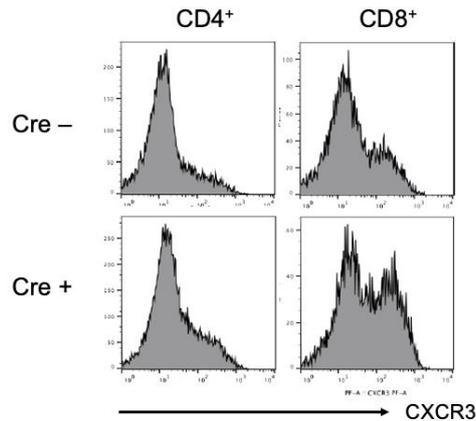


図3 分子 X 欠損による CXCR3 発現の亢進
 CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞いずれにおいても分子 X 欠損
 (Cre⁺) において CXCR3 発現細胞の割合が増加していた。

次に、分子 X により CXCR3 の発現が抑制されるメカニズムについて検討した。CXCR3 の発現は、抗原やサイトカイン (IFN- γ 、IL-2) の刺激により誘導されることから、これらについて検討したところ、分子 X 欠損 T 細胞において IL-2 に応答した Akt のリン酸化が亢進していること、CD8⁺ T 細胞においてこの傾向が顕著であることが示された。このことから、分子 X 欠損により IL-2 に応答した Akt のシグナルが亢進した結果、CXCR3 の発現が上昇することが示唆された。

3. 免疫細胞における DOCK11 の役割とこれを阻害する化合物のスクリーニング

a) DOCK11 欠損によるマクロファージの遊走亢進

DOCK11 は、低分子量 G タンパク質 Cdc42 の活性化を触媒する GDP-GTP 交換因子 (GEF) であり、アクチン細胞骨格の再構成を介して細胞遊走を制御することが知られている。本研究では、炎症の誘導において中心的に機能する免疫細胞であるマクロファージの遊走について検討した。野生型および DOCK11 欠損マクロファージのケモカイン存在下における遊走を検討したところ、DOCK11 欠損によりマクロファージの仮足形成ならびに遊走能が亢進することが明らかになった。このことは、Cdc42 の活性を抑制することによりマクロファージの遊走スピードが上昇するとする既報と一致し、遊走するマクロファージにおいて DOCK11 が Cdc42 活性化のマスターレギュレーターとして機能していることが示唆された。

次に、LPS 刺激したマクロファージにおけるサイトカイン産生について検討した。培養上清に分泌されたサイトカイン濃度を比較したところ、DOCK11 欠損マクロファージにおいて、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、TNF- α の濃度が有意に低下していた。一方で、DOCK11 欠損マクロファージにおいても、これらサイトカインの遺伝子発現は野生型と変わらなかった。これらのことから、DOCK11 がマクロファージにおけるサイトカインの分泌機構に関与していること

が示唆された。

b) DOCK11 阻害剤の探索

DOCK11 は、サイトカインの産生や分泌を制御することが明らかになっており、その阻害により炎症や免疫疾患を制御できる可能性が示唆されている。DOCK11 の GEF 活性を阻害する化合物を探索するために、DOCK11 の活性をモニターする系の作製を試みた。大腸菌で作製したリコンビナント DOCK11-DHR2 (GEF) ドメインと Cdc42 を BODIPY-標識した GTP 存在下で反応させ、GDP-GTP 交換反応に応じて蛍光が増大することで、GEF 活性を測定できる実験系を構築した。

次に、FDA に承認された薬剤により構成されたライブラリーを用いて、DOCK11 を阻害する化合物をスクリーニングした。その結果、5 種類の化合物がヒットし、うち 2 種類 (BTD, BSP) が DOCK11 を IC₅₀=約 1 μ M で阻害した (図 5)。

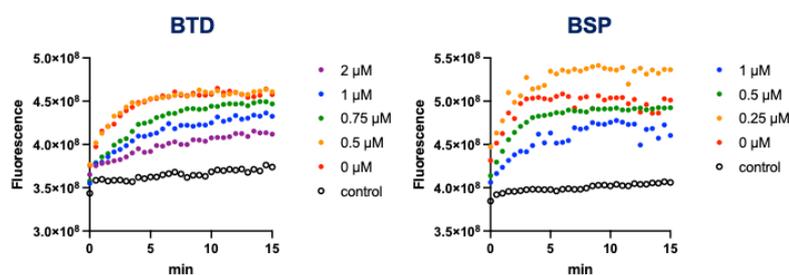


図 5 化合物による DOCK11 GDP-GTP 交換活性の阻害

GDP-GTP 交換にともない蛍光強度が増加する評価系を用いて化合物の阻害活性について検討した。いずれの化合物も、濃度依存的に蛍光強度の増加が抑制された。

ヒット化合物の細胞レベルでの効果を明らかにするために、LPS 刺激したマクロファージにサイトカイン産生に及ぼす影響について検討した。その結果、BTD を添加することにより、IL-1 β の分泌は阻害したが、IL-10 の分泌には影響しなかった。このことは、DOCK11 欠損マクロファージでみられる表現型で、これら化合物が細胞レベルで DOCK11 を阻害していることが示唆された。

D. 考察と結論

1. SA-T 細胞や ABC 細胞の機能解析とこれらを標的とした創薬

SA-T 細胞に関して、その産生や効果を *in vitro* で抑制する化合物を見いだしており、そのマウス個体での効果を検証したいと考えている。本年度の研究により、SA-T が関与する病態をマウス個体で再現でき、次年度につながる成果が得られたと考えている。また、ABC に関して、Fascin1 や Pak1 の発現上昇により、その運動能が亢進することを示唆する結果を得ていた。本年度は、これらの遺伝子をノックダウンしたり過剰発現させたりすることにより B 細胞の運動能に影響を受けることを示し、ABC が他の B 細胞と比較して高い

運動能を有するメカニズムを明らかにすることができた。

2. 加齢にともなう炎症における分子 X の役割

欠損することで全身における炎症疾患を引き起こす DOCK11 について、マクロファージに着目して検討したところ、その運動能に異常が見られることが明らかになった。これまでに、Cdc42 が機能しないマクロファージで同様の傾向が見られること、DOCK11 が Cdc42 の GEF であることを考えると、マクロファージの運動時に Cdc42 を活性化している GEF が DOCK11 であることが示唆された。また、DOCK11 の GEF 活性を *in vitro* でモニターする系を構築してスクリーニングを行った結果、複数の化合物が DOCK11 の活性を細胞レベルで抑制することを確認した。

3. 免疫細胞における DOCK11 の役割とこれを阻害する化合物のスクリーニング

欠損することで全身における炎症疾患を引き起こす DOCK11 について、マクロファージに着目して検討したところ、その運動能に異常が見られることが明らかになった。これまでに、Cdc42 が機能しないマクロファージで同様の傾向が見られること、DOCK11 が Cdc42 の GEF であることを考えると、マクロファージの運動時に Cdc42 を活性化している GEF が DOCK11 であることが示唆された。また、DOCK11 の GEF 活性を *in vitro* でモニターする系を構築してスクリーニングを行った結果、複数の化合物が DOCK11 の活性を細胞レベルで抑制することを確認した。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ogiso N, Yuri S, Munesue Y, Nishikimi A, Watanabe A, Inui M, Takano K, Almunia JA, Niida S. Biological characteristics of age-related changes in C57BL/6 mice substrains in the National Center for Geriatrics and Gerontology Aging Farm. *Exp Anim.* 2024; 74: 229-238.

2. 学会発表

- 1) 近藤遼平, 山内夢叶, 藤原光宏, 山盛(森田)智子, 鎌田 諒, 渡邊 淳, 今村真一, 大橋紹宏, 錦見昭彦. SA-T 細胞を抑制する化合物の探索と加齢性疾患改善への応用 6NC リトリート 2024, 2024 年 4 月, 東京.
- 2) 近藤遼平, 錦見昭彦. DOCK11 regulates migration and cytokine secretion of

macrophages. 第 53 回日本免疫学会学術集会, 2024 年 12 月, 長崎.

- 2) 近藤遼平, 錦見昭彦. DOCK11 regulates migration and cytokine secretion of macrophages. 第 17 回 NAGOYA グローバルリトリート, 2025 年 2 月, 東浦.

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