

長寿医療研究開発費 2025年度 総括研究報告

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 MELK 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。本年度は、1) これまでに同定した SA-T 細胞を抑制する化合物の効果について、病態モデルを用いて個体レベルで検討した。また、ABC における細胞骨格制御亢進のメカニズムを明らかにして論文発表した。2) MELK 欠損 T 細胞の組織浸潤に関わるメカニズムの解析を進めた。3) マクロファージのサイトカインシグナルや遊走における DOCK11 の役割を解析した。

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

免疫系を担うリンパ球において、SA-T 細胞や ABC (age-associated B cells) など、加齢に伴って蓄積する細胞集団の存在が知られている。これらの細胞は抗原に対する増殖応答を失う一方で、非特異的に炎症性因子を産生する特徴を有する。したがって、SA-T 細胞や ABC の性質を明らかにし、これらを動物レベルで除去する手法を開発することは、免疫老化の実態解明に寄与するのみならず、ヒトへの応用可能な新たな治療戦略の創出につながると考えられる。しかしながら、低分子化合物などを用いて老化関連リンパ球を制御する方法は、これまで十分に報告されていない。そこで本研究では、各種阻害剤を用いたスクリーニングを通じて、SA-T 細胞および ABC の分化ならびに機能発現機構を解明する。さらに、免疫系の老化に関与する分子の役割を明らかにすることで、加齢に伴う免疫機能低下を効果的に制御する手法の確立を目指す。

2) 加齢に伴う炎症における MELK の役割

MELK は、これまで主にかん細胞に特異的に発現し、その増殖や生存に関与すると考えられてきた。申請者らは、MELK が正常 T 細胞において抗原刺激依存的に発現すること、さらに MELK 欠損マウスでは加齢に伴い組織への T 細胞浸潤および炎症が生じることを見出した。これらの知見から、MELK が加齢に伴う炎症性疾患に関与する可能性が示唆される。本研究では、その分子メカニズムを詳細に解明することを目的とする。

3) 免疫細胞における DOCK11 とその関連分子の役割

申請者を含む研究グループは、DOCK11 が遺伝性疾患の原因遺伝子であることを明らかにし、T 細胞におけるサイトカイン産生異常が本疾患の一因であることを示した。本研究では、これらの分子機構の解明を進めるとともに、疾患に対する新たな治療技術の開発を目指す。さらに近年、加齢個体の造血幹細胞において、DOCK11 が分解されずに蓄積することが、リンパ球への分化抑制の一因となることが報告されている。本研究では、DOCK11 を標的としたアプローチにより、免疫系の老化を制御する手法の確立を目指す。

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

これまでに、SA-T 細胞の産生や機能を *in vitro* で抑制する化合物を見出している。また、昨年度には加齢性腎炎モデルマウスの実験系を確立している。本研究では、このモデルマウスに化合物を 1 日 1 回経口投与し、腎臓における T 細胞中の SA-T 細胞の割合をフローサイトメトリーにより解析するとともに、尿中クレアチニン値および腎臓における炎症性因子の発現を定量的 RT-PCR により評価した。さらに、高脂肪食により誘導した糖尿病モデルマウスに対しても同様に化合物を経口投与し、肝臓および脂肪組織におけるマクロファージの局在を解析した。

昨年度までに、ABC において Fascin1 および PAK1 の発現が亢進しており、その結果と

して遊走能が増強されることを見出している。本年度は、これらの因子が細胞運動に関与することを検証するため、ABC および通常の B 細胞（ABC 除去群）を CXCL12 刺激前後で固定し、Fascin1 および PAK1 の免疫染色を行い、その細胞内動態を観察した。

2) 加齢にともなう炎症における MELK の役割

野生型および T 細胞特異的 MELK 欠損マウスから CD8⁺ T 細胞を単離し、固相化抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体存在下で 2 日間培養した。その後、抗 CD3 抗体で再刺激した細胞を可溶化し、Western blotting により Akt および Stat5 のリン酸化状態を解析した。

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

ケモアトラクタント濃度勾配に対するマクロファージの遊走能を評価するため、Transwell アッセイを用いた。下室に M-CSF を添加し、上室に野生型および DOCK11 欠損マクロファージを播種して培養した。一定時間後、膜表面上の細胞を除去し、裏面へ遊走した細胞をクリスタルバイオレットで染色して評価した。

また、重合型アクチンの細胞内動態を解析するため、野生型および DOCK11 欠損マクロファージをケモカインで刺激し、Phalloidin-Alexa488 で染色後、蛍光顕微鏡下で観察した。DOCK11 阻害剤の探索にあたっては、約 2,000 種からなる化合物ライブラリーを用い、DOCK11 の GDP-GTP 交換活性を阻害する化合物のスクリーニングを行った。GDP-GTP 交換活性は、各化合物存在下において、大腸菌発現のリコンビナント DOCK11-DHR2 ドメイン、Cdc42、および Mant 標識 GTP を反応させ、Mant 蛍光の経時変化を測定することにより評価した。

（倫理面への配慮）

本研究における遺伝子組換え実験は、遺伝子組換え安全委員会の承認を受けた実験計画（遺 5-1）に基づき、「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」に準拠した設備を有する施設内で実施した。また、動物実験は、動物実験倫理委員会の承認を受けた実験計画（動 7-28）に基づき、「動物の愛護及び管理に関する法律」に準拠し、苦痛の軽減等に十分配慮して実施した。

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

これまでに、*in vitro* において SA-T 細胞の産生および機能を抑制する化合物を同定した。本化合物の *in vivo* における効果を検証するため、SA-T 細胞を介した病態モデルの構築を検討した。12 週齢マウスに高アデニン食を投与したところ、腎臓における SA-T 細胞の増加および炎症性因子の遺伝子発現の亢進が認められ、本モデルが化合物の評価に適用可能であることが確認された。このモデルマウスを用いて本化合物を 1 日 1 回経口投与した結

果、SA-T 細胞の産生が抑制されるとともに、腎臓における T 細胞および B 細胞の浸潤、炎症性因子の発現、ならびに血中クレアチニン値の上昇が抑制された。これらの結果から、本化合物が SA-T 細胞を介した炎症反応を抑制することが示された（図 1）。

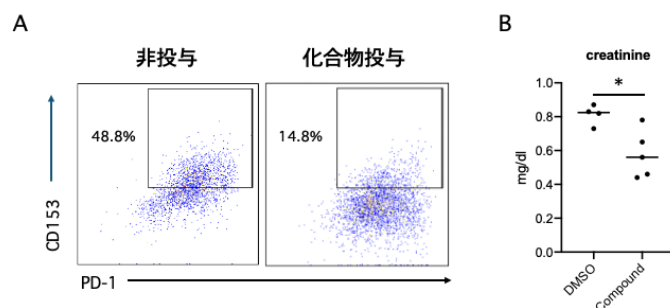


図 1 腎炎モデルマウスにおける化合物の効果

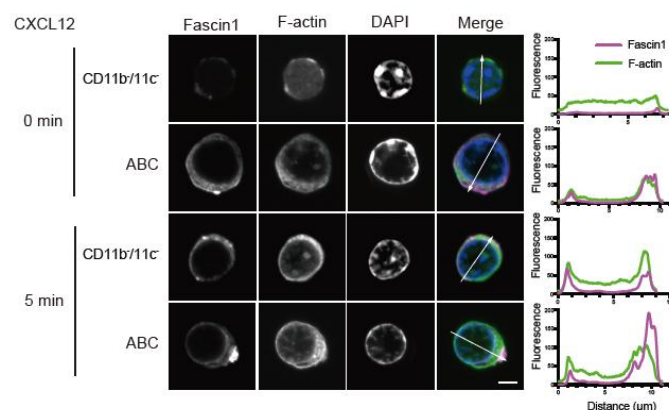
A. SA-T 細胞（PD-1⁺ CD153⁺）の減少

B. 血中クレアチニン値の減少

C.

昨年度までに、ABC において Fascin1 および Pak1 が高発現しており、その結果として ABC は他の B 細胞と比較して三次元環境下における遊走能が亢進していることを明らかにしていた。そこで本研究では、これらの因子が実際に遊走に関与しているかを検証するため、ケモカイン（CXCL12）で刺激した ABC および ABC 以外（CD11b⁻、CD11c⁻）の B 細胞を免疫染色し、Fascin1 および Pak1 の細胞内局在を解析した。その結果、両因子はいずれも CXCL12 刺激に応答して ABC の先端端に集積することが確認され、アクチン細胞骨格の制御を介して細胞運動に関与している可能性が示唆された（図 2）（Cell Biochem Funct, 2025）。

A



B

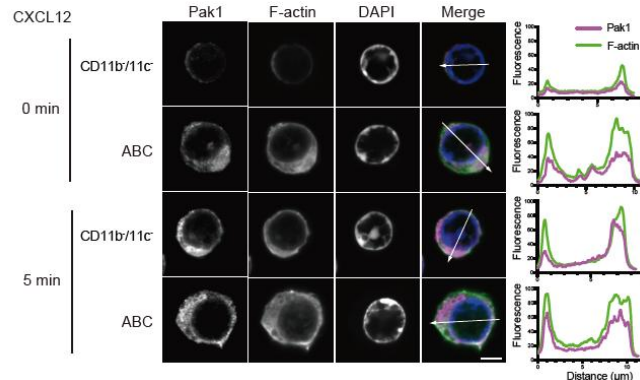


図2 ABCの遊走におけるFascin1 (A) と Pak1 (B) の局在

2. 加齢にともなう炎症における MELK の役割

MELK はセリンスレオニンキナーゼであり、これまで主としてがん細胞において発現すると考えられてきた。私たちは、T 細胞特異的 MELK 欠損マウスにおいて、加齢に伴い肝臓への T 細胞浸潤および炎症の誘導が生じることを見出した。昨年度までの検討により、その一因として、MELK 欠損 T 細胞においてケモカイン受容体 CXCR3 の発現が亢進していることを明らかにした。CXCR3 の発現は抗原刺激やサイトカイン (IFN- γ 、IL-2) によって誘導されることから、これらのシグナルについて解析を行った。その結果、MELK 欠損 T 細胞では IL-2 刺激に応答した Akt のリン酸化が亢進しており、この変化は特に CD8⁺ T 細胞において顕著であることが示された (図 3)。以上の結果から、MELK 欠損により IL-2 依存的な Akt シグナルが増強され、その結果として CXCR3 の発現が上昇する可能性が示唆された。

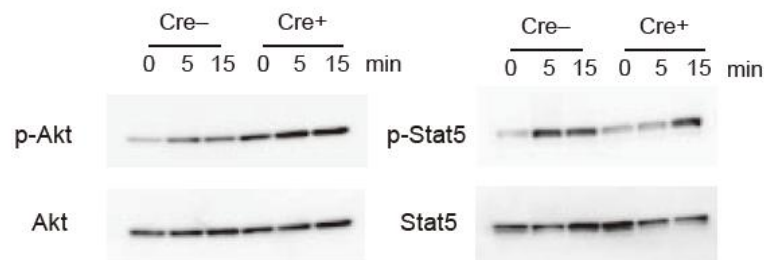


図3 MELK 欠損 CD8⁺ T 細胞における IL-2 に応答した Akt リン酸化の亢進

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異常

DOCK11 は、2005 年に主任研究者の錦見が報告した分子で、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。2023 年には錦見が参加する国際研究チーム

により、DOCK11 が全身性の炎症や貧血を発症する疾患の原因遺伝子であることが明らかにされた (N Engl J Med, 2023)。

昨年度の研究で、DOCK11 を欠損したマクロファージが、ケモカイン存在下での遊走が亢進することを明らかにした。そこで、ケモアトラクタントの濃度勾配にしたがった遊走について検討するため、Transwell を用いた遊走試験を行った。その結果、DOCK11 欠損マクロファージにおいて、ケモアトラクタント (M-CSF) の濃度勾配に応答した方向性を持った遊走が著しく障害されていることを見出した (図 4)。

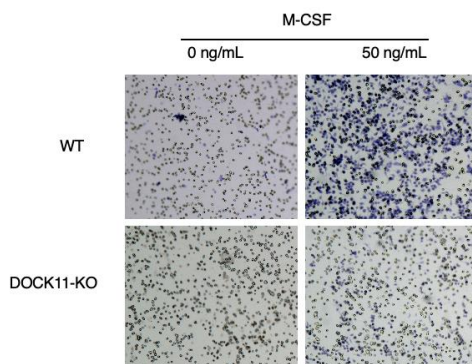


図 4 野生型 (WT) および DOCK11 欠損 (DOCK11-KO) マクロファージの M-CSF 濃度勾配下での遊走。M-CSF の濃度勾配に応答して Transwell の裏面に遊走した細胞を染色した。

この原因を解明するために、遊走するマクロファージにおける重合型アクチンの局在を観察したところ、DOCK11 欠損マクロファージにおいて、進行方向前方に形成されるポドソームという点状の接着斑の形成が障害されていることが示された。既報から、ポドソーム形成に Cdc42-WASP-Arp2/3 を介したアクチン細胞骨格の再編が必要であることが明らかになっており、DOCK11 がこのシグナルの上流で働い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、化合物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)。

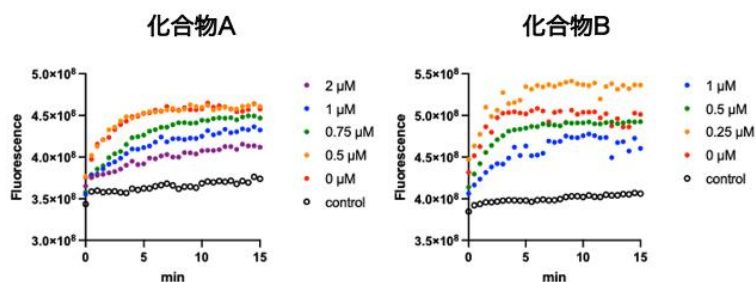


図 5 化合物による DOCK11 GDP-GTP 交換活性の阻害

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およ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-18 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

本研究で見出した SA-T 細胞の産生や機能を抑制する化合物について、昨年度の *in vitro* での結果に引き続き、加齢性腎炎のマウスモデルでも SA-T 細胞の産生抑制や病態の改善が認められた。したがって、この化合物が個体レベルでも効果を示し、SA-T 細胞を標的とした加齢性の慢性炎症の予防や治療に有効であることが示唆された。今後、2 型糖尿病など、他の慢性炎症病態に対しても同様の効果を示すかどうか検証するとともに、この化合物が SA-T 細胞の産生や機能を抑制するメカニズムについて明らかにしていきたいと考えている。

ABC に関しては、ABC で Fascin1 と Pak1 の発現が上昇することで、三次元環境下での遊走が亢進することを見出して論文を発表した。今後、このような ABC に特徴的な性質を標的として、その機能を抑制する方法の開発につなげたいと考えている。

2. 加齢にともなう炎症における MELK の役割

昨年度までに T 細胞特異的に MELK を欠損したマウス由来の CD4+ T 細胞、CD8+ T 細胞において、CXCR3 の発現が更新していることを明らかにしている。本年度、抗原受容体の下流でのシグナル伝達について検討したところ、Akt のリン酸化が亢進しており、MELK が何らかの形でこのシグナルを抑制していることが示唆された。MELK を欠損することにより、T 細胞の遊走や組織への浸潤が亢進して炎症を誘導する一方、がん細胞への浸潤が促進される可能性があり、今後の治療標的として期待される。

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

昨年度までに、DOCK11 欠損マクロファージにおいて、平面上でのランダムな遊走が野生型に比べて亢進することを見出した。一方、ケモアトラクタントの濃度勾配にしたがった方向性を持った遊走が障害されていること、その際に形成されるポドソームが正常に形成されないことを、本年度の研究で明らかにした。組織内でのマクロファージの遊走が病態に関連する例がこれまでに報告されており、例えば高脂肪食を摂取したマウスにおいて、マクロファージが肝臓や脂肪組織内を遊走して脂肪細胞を取り囲んで炎症を誘導することが知られている。DOCK11 を抑制することでこのような病態を負に制御する可能性がある。今後、DOCK11 欠損マウスにおける、組織内でのマクロファージの動態や、慢性炎症の病態について検討したいと考えている。

これと並行して、DOCK11 を阻害する化合物を探索したところ、2つの化合物について DOCK11 の GDP-GTP 交換活性を選択的に抑制することを明らかにした。今後、これらの化合物が細胞レベルで DOCK11 の活性を阻害できるかを確認したうえで、上記の病態モデルに投与することで症状を改善できるか検討していきたい。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kondo R, Kondo K, Nabeshima K, Nishikimi A, Ishida Y, Shigeoka T, Dijkstra JM. PD-1 is conserved from sharks to humans: new insights into PD-1, PD-L1, PD-L2, and SHP-2 evolution. *Front Immunol* 2025; 16: 1573492.
- 2) Fujiwara M, Kondo R, Sugiyama Y, Maruyama M, Nishikimi A. Increased Fascin1 and Pak1 expressions enhance age-associated B-cell actin cytoskeleton remodeling and motility. *Cell Biochem Funct* 2025; 43: e70090.
- 3) Almunia JA, Munesue Y, Ogiso N, Yuri S, Kawasaki H, Morikawa N, Noma S, Takano K, Watanabe A, Niida S, Nishikimi A. Hematologic and biochemical changes associated with age and strain in aged B6 mice breeding in the National Center of Geriatrics and Gerontology. *Exp Anim.* 2025; 10.1538/expanim.25-0071.
- 4) Aihara R, Takahashi M, Morino K, Matsubara K, Kunimura K, Nishikimi A, Izumi Y, Bamba T, Fukui Y, Uruno T. Phospholipase D1 is a critical mediator of neutrophil extracellular trap formation and venous thrombosis. *Front Immunol.*

2025; 16: 1666184.

2. 学会発表

- 1) 近藤遼平, 錦見昭彦. DOCK11 はマクロファージの遊走とサイトカイン分泌を制御する. JH リトリート 2025. 2025 年 6 月 7 日. 東京.
- 2) Kondo R, Fujiwara M, Nishikimi A. Promotion of cytoskeleton rearrangement in age-associated B cells. The 43rd Spring Conference of the Korean Society for Gerontology, シンポジウム. 2025 年 6 月 24 日. Incheon.
- 3) 近藤遼平, 藤原光宏, 錦見昭彦. 老化関連 B 細胞における細胞骨格再構成の亢進. 第 48 回日本基礎老化学会大会. 2025 年 6 月 29 日. 千葉.
- 4) 藤原光宏, 近藤遼平, 錦見昭彦. 老化関連 B 細胞の細胞骨格リモデリングに関与する分子の同定. 第 30 回日本基礎理学療法学会学術大会. 2025 年 10 月 17 日. 別府.
- 5) 近藤 遼平, 近藤 恒平, 鍋島 圭, 錦見 昭彦, 石田 靖雅, 重岡 稔章. Dijkstra Johannes. PD-1 を介した免疫抑制機構はサメからヒトまで高度に保存されている. 第 48 回日本分子生物学会年会. 2025 年 12 月 3 日. 横浜.
- 6) 近藤 遼平, 近藤 恒平, 鍋島 圭, 錦見 昭彦, 石田 靖雅, 重岡 稔章, Dijkstra Johannes. PD-1-mediated immune checkpoint system is conserved from sharks to humans. 第 54 回日本免疫学会学術集会. 2025 年 12 月 10 日. 姫路.

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