

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03925

研究課題名(和文) 老化関連T細胞誘導メカニズムの解明と人為的制御

研究課題名(英文) Control of senescence-associated T cell-induction

研究代表者

服部 雅一 (Hattori, Masakazu)

京都大学・医学研究科・特定教授

研究者番号：40211479

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：加齢に伴い炎症性疾患の発症要因となる老化関連T細胞(SA-T細胞)と呼ばれるT細胞集団が増加するが、これまでその増加の分子メカニズムに関しては全く不明であった。本研究ではSA-T細胞上に恒常的に発現するCD153がその増殖を制御していることを明らかにした。CD153はT細胞上においてCD3複合体と結合することによりT細胞抗原レセプターのシグナルを阻害していた。CD153とCD30の相互作用を完全に阻害する抗体を用いることにより、SA-T細胞の増加ならびにそれに伴う自己免疫反応を抑制することが可能であり、新しい自己免疫疾患等治療薬の糸口を見いだすことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化社会において急増しつつある加齢関連疾患の制圧は現代社会の喫緊の課題であり、これに対する適切な医学的対応は社会の強い要請となっている。加齢に伴い増加する老化関連T細胞は様々な加齢関連疾患の発症に関与しており、その制御の方法の一端を明らかにした今回の研究は、加齢関連疾患の予防および治療法の創出に直接的に結びつく成果といえる。

研究成果の概要(英文)： A memory-phenotype CD4+ T cells termed senescence-associated T (SA-T) cells are shown to be involved in the development of SLE and age-associated inflammatory diseases including Type 2 diabetes and chronic kidney diseases. The T cells steadily increase with age, but the mechanism on their increment in vivo remains elusive. In the present study, we found that CD153, which is constitutively expressed on SA-T cells, regulates their growth. CD153 was shown to bind to the CD3 complex on T cells, thereby inducing dissociation of T cell antigen receptor (TCR) alpha-beta with CD3 complex and inhibiting TCR signaling; A monoclonal antibody that completely block the interaction between CD153 and CD30 inhibited the increase in SA-T cells and the autoimmune response with age. The antibody could contribute to reducing SLE and the age-associated disorders such as chronic nephritis and Type 2 diabetes.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫老化 老化関連T細胞 CD153 CD3複合体 リバースシグナル 加齢関連疾患 オステオポンチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫老化は T 細胞の抗原応答性の低下が大きな原因となって起こる現象と考えられてきたが、最近、単に応答性が低下するばかりではなく T 細胞の質的变化を伴う現象であることが分かってきた。つまり、加齢に伴い T 細胞は抗原応答性の低下により免疫系の制御機能を失うとともに、それ自体が炎症性サイトカインを産生することにより加齢に伴う様々な炎症疾患の原因となっている。我々はこれまでにマウスにおいて加齢に伴い増加する老化関連 T 細胞 (SA-T) を同定し、この細胞が主に T_{H1} 型サイトカインである IFN- γ やオステオポンチン (OPN) をはじめとする種々の炎症性サイトカインを産生することにより、全身性エリテマトーデス (SLE) 発症や 2 型糖尿病の発症に関与することが明らかにした。しかし、SA-T 細胞の発生・増加に関わる分子機構については全く不明であった。

2. 研究の目的

本研究課題では SA-T 細胞の発生・増加に関わる分子機構、特に SA-T 細胞の特徴的マーカー分子である CD153 を介するシグナル (CD153 リバースシグナル) の実体とその調節機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Clover-CD153 発現 EL-4 および 3A9 細胞の樹立

CD153 の N 末端側に Clover 蛋白 (GFP 変異体) を付加した分子 (Clov153) を発現するプラスミドをマウス T 細胞株、EL-4 および 3A9 細胞に electroporation 法にて導入、陽性細胞をソーティングにより単離した。

(2) CD153 会合分子の同定

Clov153-EL4 細胞の細胞膜を EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo, #21335) にてビオチン化した後、CHAPS を用いて可溶化する。その可溶化液に GFP Trap ビーズ (Chromotek 社) を添加し 4 1 時間反応させた。ビーズを可溶化バッファーで洗浄した後 SDS-PAGE 電気泳動し、予備実験で強いシグナルの見られた 20 kDa および 10 kDa 付近のバンドを切り出し回収。京都大学医学研究支援センター質量分析室にて解析を行った。

4. 研究成果

I. 加齢に伴う SA-T 細胞の増加には CD153 の発現を必要とする。

1. CD153KO マウスの解析

SA-T 細胞は PD-1⁺CD4⁺CD44^{high}CD62L^{low} のメモリー表現型 (MP) を示すと共に TNF スーパーファミリー分子である CD153 を恒常的に発現する。この CD153 は CD30 のリガンドであるがその機能は不明な点が多い。我々はこの CD153 の機能を明らかにするために、CD153 遺伝子破壊 (CD153KO) マウスにおける SA-T 細胞について解析を行った。図 1A に示すように通常では加齢に伴い PD-1⁺MP T 細胞が増加してくるが、このマウスではほとんどその増加が観察されなかった。SA-T 細胞は IFN- γ や OPN といった炎症性サイトカインを産生するが、CD153KO マウスでは老化マウスにおいてその増加が認められない。これらの結果は CD153KO マウスでは SA-T 細胞の増加が阻害されている可能性を示唆する。この加齢に伴う SA-T 細胞の増加阻害は CD153 のレセプターである CD30 の遺伝子破壊マウスでも同様に認められた (結果に示さず) これらの結果は SA-T 細胞の増加には CD153 と CD30 の相互作用が必要であることを強く示唆している。

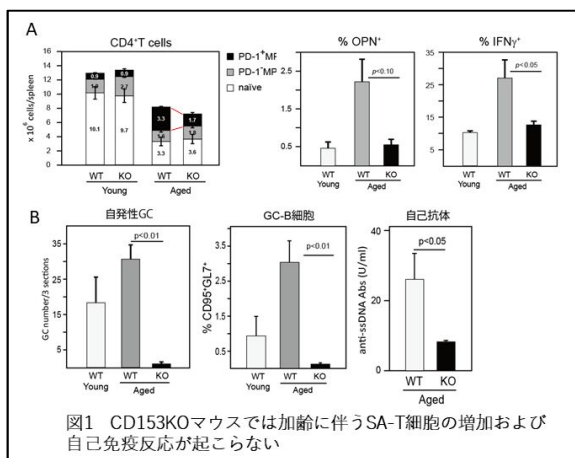


図1 CD153KOマウスでは加齢に伴うSA-T細胞の増加および自己免疫反応が起こらない

免疫老化現象としては T 細胞の抗原応答性の低下の他、自発性胚中心形成の亢進や自己抗体の増加が特徴としてあげられる。興味深いことに正常マウスで観察されるこれらの免疫老化現

象が観察されなかった(図1B)。CD153KOマウスの外来抗原に対する反応性は正常マウスと変化ないことから(結果に示さず), CD153欠損マウスでは自己免疫反応のみが抑制されることが示唆された。

2. CD153-CD30相互作用を阻害するCD153抗体投与によりSA-T細胞が減少する。

加齢に伴うSA-T細胞の増加にCD153-CD30相互作用が必要である可能性が示されたことから, それを検証するためにCD153-CD30相互作用を阻害するCD153抗体を作製し, その影響を検討した。CD153はType II膜蛋白で三量体として機能することが知られている。そこで免疫原として三量体CD153を作製しこれをCD153KOマウスに免疫してモノクローナル抗体を作製した(17D4-7抗体: マウスIgG2c)。17D4-7抗体のCD153-CD30相互作用阻害活性を調べたところ唯一の市販抗体であるRM153に比べ10倍以上強い阻害活性を有していた(結果に示さず)。この抗体を35週齢のB6マウスに投与したところコントロール抗体投与群に比べ有意にPD-1⁺MP T細胞およびSA-T細胞が減少した(図2A)。抗体投与マウスよりCD4T細胞を単離し, そのサイトカイン産生を調べたところOPNが有意に減少するとともにIL-2産生が増強されていることが明らかとなった。

次に抗体の作用機序を明らかにするためにTLR7のリガンドであるR848を投与しSA-T細胞を強制的に増加させ, その増加に対する17D4-7抗体の効果を調べた。図2Bに示すようにR848を投与することによりSA-T細胞が含まれるPD-1⁺MPT細胞分画が増加しKi67陽性となるが, 17D4-7抗体の投与によりその増殖が阻害されることが示された。細胞死に対する効果についても検討を行ったが, PD-1⁺MP T細胞を始めとするT細胞分化には細胞死がほとんど認められなかった(結果に示さず)。これらの結果から17D4-7抗体はSA-T細胞の生体内での増殖を阻害する活性を有すること, さらにSA-T細胞の増殖にはCD153-CD30相互作用が必要であることが示された。

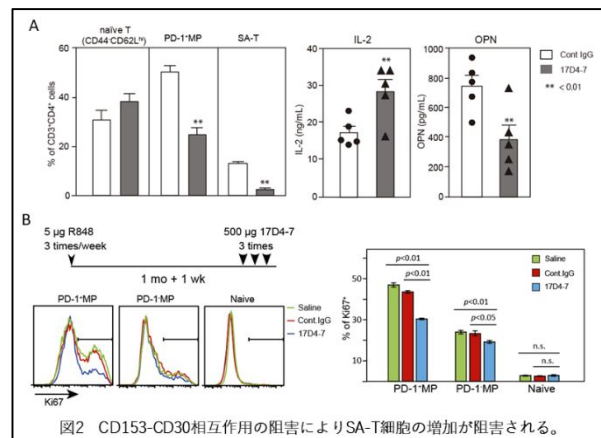


図2 CD153-CD30相互作用の阻害によりSA-T細胞の増加が阻害される。

II. CD153 リバースシグナル (RS) はSA-T細胞の機能を増強する。

CD153はCD30のリガンドであるとともにCD30との相互作用によりCD153を介して細胞内にシグナル伝達を行うことが知られている。このシグナル伝達はCD153RSと呼ばれ, B細胞においてはクラススイッチ誘導に関わることが報告されているが, T細胞における機能についてはその分子機構を含め明らかにはなっていない。SA-T細胞においてCD153は恒常的に発現しているが, CD30の発現はほとんど確認できないことから, SA-T細胞においてはこのCD153RSがその増殖誘導に関与していることが考えられた。そこで次に我々はSA-T細胞にCD153RSを入れた時どのような変化が見られるか検討を行った。CD153RSは市販のCD153抗体(RM153)を固相化させることにより入れた。すでに報告しているようにSA-T細胞はTCR刺激によりほとんど増殖しないが, 図3に示すようにCD153RSをTCR刺激シグナルと同時にSA-T細胞に入れると強い増殖反応を示すことが明らかとなった。また単に増殖のみならず, TCRとCD153RSの組み合わせによりSA-T細胞からのOPNやIFN γ などのサイトカインの産生も増強された(結果に示さず)。

この結果はCD153を介するリバースシグナルはSA-T細胞が生体内で増殖するために必要なシグナルであることを強く示唆している。

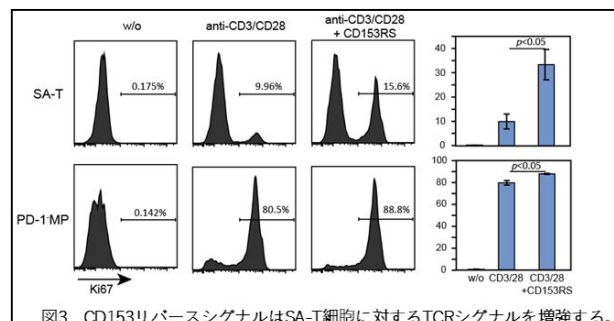


図3 CD153リバースシグナルはSA-T細胞に対するTCRシグナルを増強する。

III. CD153 は CD3 複合体と会合し, TCR シグナルを修飾する。

1. CD153 と CD3 複合体の会合

CD153 は細胞質領域が非常に短く, シグナル伝達に関与すると考えられるドメインを有していないことから, CD153 リバースシグナルには何らかの分子との会合を介している可能性が考えられた。そこでこの可能性を検討するため CD153 強制発現 T 細胞株を作製し, それを用いて会合分子の解析を行った。CD153 の免疫沈降に使用できる抗体が存在しないため, CD153 の N 末端側に Clover 蛋白 (GFP 変異体) を付加した分子をマウス T 細胞株である EL-4 細胞に発現させ (Clov153-EL4 細胞), GFP トラップを用いて免疫沈降し共沈物を TOFF-MASS にて解析した。その結果, CD153 に会合する分子としては Cofilin-1、PAICS (ADE2) および CD3 複合体 (δ, ϵ, ζ) が同定された。図 4 に示すようにウェスタンブロット法での解析により CD153 は CD3 複合体 (δ, ϵ, ζ 鎖) に加え CD3 γ 鎖とも会合していること, 293T 細胞を用いた強発現実験により CD153 は各 CD3 分子と単独で結合することが示された。一方, TCR $\alpha\beta$ 鎖との直接会合は確認できていない。

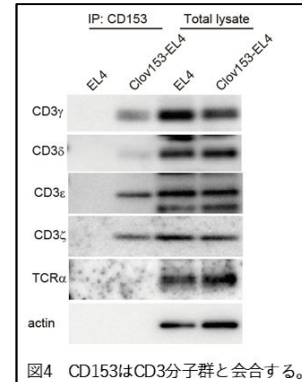


図4 CD153はCD3分子群と会合する。

2. CD153 発現により TCR シグナルが抑制される。

CD153 の発現が TCR シグナルに与える影響について上記の Clov153-EL4 細胞を用いて解析したところ, CD153 の発現により TCR 刺激により産生される IL-2 が大幅に減少することが明らかになった (図 5)。この CD153 による TCR シグナル抑制は Clover を付加していない CD153 でも見られること, さらにこの抑制には各細胞株が発現する CD30 が関与していないことを確認している。この CD153 発現により TCR シグナル抑制については抗原特異的 TCR を発現する 3A9 細胞を用いても確認できた。

次にこの時の TCR 下流のシグナル分子動態をウェスタンブロットにより解析したところ, 通常 TCR 刺激直後に観察できる Zap70 や Erk のチロシンリン酸化が抑制されていた。この CD153 発現による TCR シグナル抑制に関わる分子機構としては, 上記の会合実験結果と合わせて考えると, CD153 が TCR 複合体から CD3 複合体を奪い取るため TCR シグナル抑制が引き起こされるという可能性が示唆される (図 6)。現在, この可能性については全反射顕微鏡 (TIRFM) と抗原提示平面脂質二重膜とを融合した実験系により解析を行っている。また, CD153 を介するリバースシグナルはこの CD153 と CD3 複合体の会合を解離させ, 再び TCR と会合させることにより TCR 下流のシグナル伝達を可能にしていることが考えられる。この点についても現在, 解析を進めている。

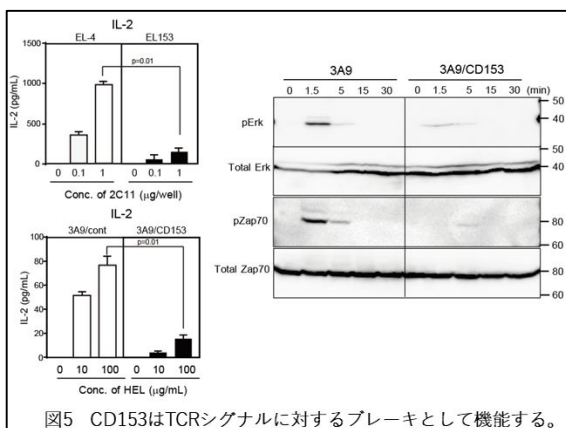


図5 CD153はTCRシグナルに対するブレーキとして機能する。

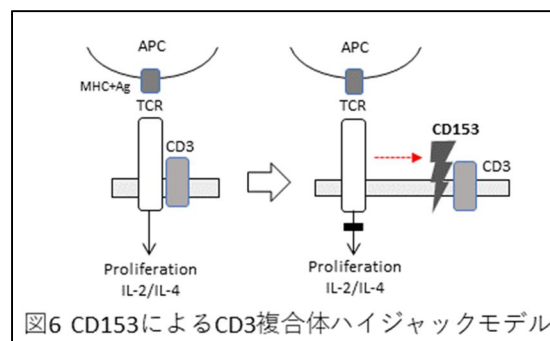


図6 CD153によるCD3複合体ハイジャックモデル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Minato N, Hattori M, Hamazaki Y.	4. 巻 32
2. 論文標題 Physiology and pathology of T-cell aging.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 223-231
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxaa006.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fukushima Y, Minato N, Hattori M	4. 巻 38
2. 論文標題 The impact of senescence-associated T cells on immunosenescence and age-related disorders.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 24-30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41232-018-0082-9. eCollection 2018.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ito K, Nakajima A, Fukushima Y, Suzuki K, Sakamoto K, Hamazaki Y, Ogasawara K, Minato N, Hattori M.	4. 巻 12
2. 論文標題 The potential role of Osteopontin in the maintenance of commensal bacteria homeostasis in the intestine.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0173629
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0173629. eCollection 2017.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 服部雅一
2. 発表標題 老化関連T細胞の誘導メカニズムとその制御
3. 学会等名 第38回日本炎症・再生医学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	保富 康宏 (Yasutomi Yasuhiro) (90281724)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研 究所 霊長類医科学研究センター・センター長 (84420)	
研究 分担者	福島 祐二 (Fukushima Yuji) (90583146)	京都大学・医学研究科・特定助教 (14301)	