

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18390127

研究課題名（和文）

老齢時における CD4T 細胞亜集団の機能低下状態を改善する新規抗体の解析

研究課題名（英文）

Functional analysis of CD4 T cell-subpopulation exhibiting low responsiveness in aged hosts

研究代表者

清水 淳 (SHIMIZU JUN)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：60291134

研究成果の概要：

老齢 B6 マウス（6 ヶ月、12 ヶ月、24 ヶ月齢）をモデルとして用いた解析から、老化に伴いある特定の CD4T 細胞亜集団の割合が増加し、しかもこの亜集団は T 細胞活性化誘導に対し著しい低応答性を呈することを示してきた。今回この亜集団の低応答性を正常な高応答性へと回復させ得る培養条件を検討したが、本亜集団の活性化には持続的活性化刺激が必要であること、また本亜集団の出現には T 細胞が抗原に暴露される必要性はなく、また酸化ストレスの持続的存在も関与していないことを示唆する結果が得られた。

交付額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2006 年度 | 5,300,000 | 1,590,000 | 6,890,000 |
| 2007 年度 | 4,600,000 | 1,380,000 | 5,980,000 |
| 2008 年度 | 4,600,000 | 1,380,000 | 5,980,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,500,000 | 4,350,000 | 18,850,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：細胞・老化

1. 研究開始当初の背景

老齢マウスをモデルとして用い、免疫機構の中心的役割を担う「CD4T 細胞」に着目し、「老化と CD4T 細胞機能」について解析を行ってきた。その過程で、老齢時には CD4T 細胞の機能が著しく低下していること、しかし全ての CD4T 細胞が機能低下状態にあるのではなく、一部 CD4T 細胞は正常な機能を維持していること、また老化に伴い免疫抑制機能を有す CD4T 細胞亜集団が出現してくること

等を明らかにし報告してきた。老齢時の免疫機能低下状態を改善するためには、上記の低応答性 CD4T 細胞亜集団の機能改善、発生原因を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

生体の防御機構としての「免疫機構」は、老化に伴いその防御機能が低下する傾向にある。機能低下した状態では、感染症にかか

り易い、疾患が慢性化し易い、健康状態を取り戻すのに時間がかかる等の様々な問題を伴ってくることとなる。研究代表者は、老齡マウスをモデルとして用い、免疫機構の中心的役割を担う「CD4T 細胞」に着目し、「老化と CD4T 細胞機能」について解析を行ってきた。その過程で、老齡時の CD4T 細胞の機能回復を目指そうとした場合、老齡時 CD4T 細胞の中で最大の亜集団

CD4(+)
CD25(-)
R123(lo)
CD103(-)
T 細胞における低応答性状態の改善が必要不可欠であると痛感している。そこで本研究課題においては、この最大亜集団の低応答性を改善する、あるいはこの亜集団の老化に伴う出現・増加を遅らせる手法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) CD4T 細胞の活性化を誘導するためには、抗原提示細胞が必要である。これまで研究代表者らは CD4T 細胞の応答性を解析する際に、脾細胞を抗原提示細胞として用いていた。脾細胞中には種々の抗原提示能を有す細胞が存在しているのである。しかしながらこの条件では、上記の亜集団

(CD4(+)
CD25(-)
R123(lo)
CD103(-)
T 細胞)は低応答性しか呈さなかった。そこで、脾細胞中にも存在し、かつ最も抗原提示能の強いことが知られている樹状細胞 (DC) を抗原提示細胞として用い、この培養条件下でもこの亜集団が低応答性を呈すか検討する。DC を若齡マウスと老齡マウス各々から調製し、DC の抗原提示能を比較する。また未熟・成熟 DC を調製し、各 DC における抗原提示能を比較検討する。この対比実験から、最も強力な抗原提示 DC を用いて、上記の実験を再度行う。この解析から、老齡マウス由来亜集団 (CD4(+)
CD25(-)
R123(lo)
CD103(-)
T 細胞)の潜在応答能力があるのか否か再検討する。

(2) 老齡 CD4T 細胞中に含まれる免疫抑制性 CD4T 細胞の免疫抑制機能を阻害する単クローン抗体 (59.32 抗体) を樹立した。本抗体は正常 CD4T 細胞の反応性を増強した。そこで 59.32 抗体の亜集団 CD4(+)
CD25(-)
R123(lo)
CD103(-)
T 細胞に対する影響について検討する。

(3) 研究代表者らが樹立・報告してきた前述の新規抗体 (59.32 抗体) は、正常 CD4T 細胞の活性化誘導の際、共添加することにより CD4T 細胞の活性化が著しく増強されることを確認している。また CD4T 細胞亜集団の一つ制御性 T 細胞 (Treg 細胞) は、通常の刺激培養において不応答性を呈すが、この不応答性を改善する抗体 (G3c 抗体) も樹立している。そこでこれら抗体 (59.32 抗体、G3c

抗体) が、Treg 細胞と同様に不応答性を呈す CD4(+)
CD25(-)
R123(lo)
CD103(-)
T 細胞の反応性を改善するか否か、その可能性について検討する。

4. 研究成果

(1) 老齡時 CD4T 細胞の中で、最大の亜集団 (CD4(+)
CD25(-)
R123(lo)
CD103(-)
T 細胞)における低応答性状態の改善の可能性を検討した。CD4T 細胞の活性化を誘導するためには、抗原提示細胞が必要である。最も抗原提示能の強いことが知られている樹状細胞

(DC) を抗原提示細胞として用いた場合でも、この亜集団が低応答性を呈すか検討した。その結果、若齡・老齡マウス何れから調製した DC を用いても、CD4(+)
CD25(-)
R123(lo)
CD103(-)
T 細胞の活性化を誘導することは出来なかった。また DC の成熟段階が異なる DC を用いた場合も、低応答性状態の改善は認められなかった。

(2) 更に、研究代表者らが樹立・報告してきた新規抗体 (59.32 抗体) について検討した。この抗体は、正常 CD4T 細胞の活性化誘導の際、共添加することにより CD4T 細胞の活性化が著しく増強されることを確認している。そこで 59.32 抗体が、CD4(+)
CD25(-)
R123(lo)
CD103(-)
T 細胞の活性化誘導にも何らかの効果を呈さないか検討した。様々な培養条件を試みたが、検討した限りにおいて 59.32 抗体による CD4(+)
CD25(-)
R123(lo)
CD103(-)
T 細胞の活性化増強効果を確認するには至っていない。

(3) CD4T 細胞亜集団の一つ Treg 細胞は、通常の刺激培養において不応答性を呈すが、この不応答性を改善する抗体 (G3c 抗体) も樹立している。そこでこれら抗体 (59.32 抗体、G3c 抗体) が、Treg 細胞と同様に不応答性を呈す CD4(+)
CD25(-)
R123(lo)
CD103(-)
T 細胞の反応性を改善するか否か、その可能性について検討した。T 細胞刺激培養時にこれら抗体を単に添加するばかりでなく、抗原提示細胞として樹状細胞を用いる、更に T 細胞増殖因子 IL-2 をも添加するなどの培養条件を詳細に検討したが、何れの条件においても CD4(+)
CD25(-)
R123(lo)
CD103(-)
T 細胞の活性化は誘導されず、CD4(+)
CD25(-)
R123(hi)
T 細胞の活性化のみが著しく増強されていた。

(4) 抗 CD3 抗体・抗 CD28 抗体をビーズに結合させ、これを上記低応答性 T 細胞亜集団の刺激培養に用いたところ、正常 CD4T 細胞と同等の高応答性が誘導された。T 細胞の刺激培養時に抗原提示細胞を用いた場合、抗原提示細胞は一時的に T 細胞に刺激を伝達す

る。それに対し、抗 CD3 抗体・抗 CD28 抗体ビーズは培養期を通じて T 細胞に持続的に刺激を伝達していると考えられ、上記低応答性亜集団の活性化には通常より長い刺激期間が必要であると考えられる。また上記低応答性は、細胞活性化シグナル伝達効率における障害の存在(伝達効率の低下)をも示唆している。

(5) 更に、このような低応答性細胞亜集団の出現に抗原刺激の存在が必要か否かトランスジェニックマウス (DO11.10 RAG KO マウス) を用い検討したが、抗原に曝露されることがなくとも上記低応答性亜集団の出現が認められた。また酸化ストレスの持続的存在の関与についても検討したが、ストレス存在下において上記 T 細胞亜集団出現の増加・増強は認められなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Nishida E, Nishioka T, Iida R, Yagita H, Morita A, Shimizu J (corresponding author). Antigen-independent generation of a unique CD4 T cell-subset with aging and its persistent unresponsiveness. **Immunol Lett.** 121: 27-32, 2008 査読有
 - ② Nishioka T, Nishida E, Iida R, Morita A, Shimizu J (corresponding author). In vivo expansion of CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells mediated by GITR molecules. **Immunol Lett.** 121: 97-104, 2008 査読有
 - ③ Inomata M, Shimada Y, Hayashi M, Shimizu J, Ohno-Iwashita Y. Impairment in a negative regulatory system for TCR signaling in CD4(+) T cells from old mice. **FEBS Lett.** 581: 3039-3043, 2007 査読有
 - ④ Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, Shimizu J, Takahashi T, Nomura T. Foxp3+CD25+CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. **Immunol Rev** 212: 8-27, 2006 査読有
 - ⑤ Ono M, Shimizu J, Miyachi Y, and Sakaguchi S. Control of autoimmune myocarditis and multi-organ inflammation by GITR^{high}, Foxp3-expressing CD25⁺ and CD25⁻ regulatory T cells. **J. Immunol.** 176: 4748-4756, 2006 査読有
- ⑥ Nishioka T, Shimizu J (corresponding author), Iida R, Yamazaki S, and Sakaguchi S. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells and CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ T cells in aged mice. **J. Immunol.** 176: 6586-6593, 2006 査読有
- [学会発表] (計 13 件)
- ① Nishida E, Nishioka T, Iida R, Morita A, Shimizu J Conversion of CD4⁺Foxp3⁺ T cells into CD4⁺Foxp3⁺ T cells is inhibited by agonistic anti-GITR antibody. 第 38 回日本免疫学会総会 2008.12.01. 京都
 - ② 第 5 回 21 世紀 COE 若手研究フォーラム GITR を介する刺激で制御性 T 細胞は増殖する 西岡朋尚、西田絵美、清水 淳 2007.6.7 名古屋大学医学部
 - ③ 制御性 CD4T 細胞と同様の免疫抑制作用を呈す新規モノクローナル抗体の樹立 西岡朋尚、西田絵美、清水 淳 第 37 回日本免疫学会総会 2007.11.20 東京
 - ④ 新規抗 GITR 抗体による制御性 CD4T 細胞の増殖誘導 西田絵美、西岡朋尚、森田明理、清水 淳 第 37 回日本免疫学会総会 2007.11.20 東京
 - ⑤ Shimizu J, Nishioka T, and Iida R. In vivo expansion of CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells mediated by GITR molecules. Gordon Research Conferences. 2007.03.25. Los Angeles.
 - ⑥ 清水 淳 : In vivo expansion of CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells mediated by GITR molecules. 京都大学再生医科学研究所 セミナー 2007.02.23 京都
 - ⑦ 清水 淳 : 老化と免疫抑制性 T 細胞 協和発酵(株)バイオフロンティア研究所セミナー 2007.01.18 東京
 - ⑧ Shimizu J, Iida R, Nishioka T. CD45 molecules as a functional modulator of regulatory CD4 T cells. Immunology 2006. 2006.5.15 Boston.
 - ⑨ 猪股光司、嶋田有紀子、林 昌美、清水 淳、岩下淑子 老化した CD4T 細胞では脂質ラフトを介した「負」のシグナル制御系に異常がある 第 29 回日本基礎老化学会 2006.6.16 長崎

⑩ Shimada Y, Inomata M, Hayashi M, Shimizu J, Ohno-Iwashita Y. Age-dependent reduction of PAG, a lipid raft-associated transmembrane adaptor protein, in mouse CD4 T cells. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. 2006. 6.18. Kyoto

⑪ Nishioka T, Iida R, and Shimizu J. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells and CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ T cells in aged mice. The 8th International Congress of Neuroimmunology. 2006. 10.15 Nagoya

⑫ 清水 淳: 老化と免疫抑制性 CD4T 細胞. 名古屋市立大学医学部皮膚科セミナー. 2006.09.22 名古屋.

⑬ 清水 淳: 高齢個体の免疫 第 34 回日本臨床免疫学会学術集会 シンポジウム 2006.10.02 東京

〔図書〕 (計 3 件)

① 高齢個体の免疫 西岡朋尚、清水 淳 臨床免疫・アレルギー科、47(5): 585-591, 2007

② CD4 T細胞の加齢変化 西岡朋尚、清水 淳 臨床免疫・アレルギー科、47(4): 477-483, 2007

③ TNF ファミリー分子の分子リウマチ学: GITRL / GITR の CD4 T細胞機能への作用 清水 淳、坂口志文 分子リウマチ、4, 46-51, 2007

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

清水 淳 (SHIMIZU JUN)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号: 60291134

(2)研究分担者

西岡 朋尚 (NISHIOKA TOMOHISA)
国立長寿医療センター(研究所)・老

化機構研究部・流動研究員

研究者番号: 50419149

(3)研究協力者

山崎 小百合 (YAMAZAKI SAYURI)
アメリカ・ロックフェラー大学・博士研究員