

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21512

研究課題名（和文）加齢による慢性炎症に関連する炎症惹起細胞の解析と炎症制御標的候補分子の探索

研究課題名（英文）Analysis of inflammatory cells in age-related chronic inflammation

研究代表者

外丸 詩野（Utano, Tomaru）

北海道大学・医学研究院・准教授

研究者番号：20360901

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：加齢により機能異常を示すT細胞が集積し、慢性炎症が誘導されることが生活習慣病や癌など、様々な疾病に共通する基盤病態として注目されている。本研究では、内的・外的要因により変容し得る自己ペプチドの変化に着目し、老化形質を示す酸化ストレス脆弱化マウスを用い、細胞ストレスによる自己抗原の変容がCD44highCD122highCD49dhigh細胞の増加、慢性炎症を惹起することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢化社会を迎えた我が国にとって、健康寿命の延長につながる萌芽的研究の推進は重要な課題である。T細胞の加齢による変化や免疫老化については、既報研究の研究手法は若齢および老齢マウスの比較検討、リンパ球分化に関わる転写因子の遺伝子改変動物、癌免疫領域の研究が主体であった。本研究により、新規性のある老化形質を示す酸化ストレス脆弱化マウスを用いた研究を推進することで細胞ストレスによる自己抗原の変容が慢性炎症を惹起することが明らかとなった。加齢による慢性炎症のメカニズム解明に向けて新たな知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：Accumulation of age-related abnormal T cells induces chronic inflammation, which is involved in the pathogenesis of various age-related diseases such as lifestyle-related diseases and cancer. In this study, we investigated that the alteration of self-antigens in aging induced chronic inflammation. Using oxidative stress-fragile mice showing age-related phenotypes, we found that altered self-antigens caused by cellular stress induced increased number of CD44highCD122highCD49dhigh CD8+ T cells and chronic inflammation.

研究分野：病理学

キーワード：加齢 自己ペプチド 慢性炎症 老化モデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

加齢により、いわゆる免疫老化という現象が生じるが、免疫老化の進んだ個体では感染症に対する正常な免疫応答が低下する一方、慢性炎症や自己免疫応答が亢進するという、二面性を示すことが特徴である。T細胞は加齢とともにそのサブセット構成が変化し、最も大きな変化の1つが、メモリーT細胞の増加である。近年の研究により、増加するメモリー細胞には既感染によるメモリー細胞に加え、PD-1等の抑制分子を発現する疲弊化細胞、老化細胞等、機能的に異なるサブセットが混在し、これらの過剰な集積、アンバランスが免疫老化に関与している可能性が推定されている。しかしながら、加齢にともなう免疫老化の分子細胞生物学的基盤については不明な点が多く、新しい着想に基づく研究の推進が望まれていた。

2. 研究の目的

加齢により機能異常を示すT細胞が集積し、慢性炎症が誘導されることが生活習慣病や癌など、様々な疾病に共通する基盤病態として注目されている。しかしながら、T細胞の加齢による変化、慢性炎症惹起のメカニズムは十分に解明されていない。本研究では、慢性炎症に関連するT細胞の異常や慢性炎症惹起のメカニズムの解明、炎症制御標的候補分子の探索を行うことを目標として、老化形質を示す酸化ストレス脆弱化マウスを用い、加齢による慢性炎症に関連する炎症惹起細胞の解析を行った。

3. 研究の方法

(1) マウス

コントロールマウスにはC57BL/6野生型(Wild type; WT)マウスを使用した。酸化ストレス脆弱化マウス(Nrf2^{-/-}LMP7^{-/-}マウス)を老化マウスとして用い、Nrf2^{-/-}マウス、LMP7^{-/-}マウスとの比較検討を行った。マウスはSPF条件下で飼育され、すべての動物実験は北海道大学動物実験に関する規定に従い、承認を受けて行った。

(2) CD8⁺ T細胞の細胞形質の解析

24週齢のWT、Nrf2^{-/-}マウス、LMP7^{-/-}、Nrf2^{-/-}LMP7^{-/-}マウスより脾臓を摘出し、細胞浮遊液を作製後、CD3、CD8、CD44、CD122、CD49dの発現をフローサイトメトリーにより解析した。Virtual memory (VM)をCD44^{high}CD122^{high}CD49d^{low}、Non-virtual memory (NVM)をCD44^{high}CD122^{high}CD49d^{high}の細胞群として検出した。

(3) 組織学的検討

24週齢のWT、Nrf2^{-/-}マウス、LMP7^{-/-}マウス、Nrf2^{-/-}LMP7^{-/-}マウスの全身臓器の組織学的検討を行った。

4. 研究成果

(1) 酸化ストレス脆弱化マウスにおけるCD8⁺ T細胞の細胞形質の変化

酸化ストレス脆弱化マウスであるNrf2^{-/-}LMP7^{-/-}マウスでは、WT、Nrf2^{-/-}、LMP7^{-/-}マウスに比較してCD44^{high}CD122^{high}CD49d^{low} VMが減少し、CD44^{high}CD122^{high}CD49d^{high} NVMが増加していた(図1、2)。Nrf2^{-/-}、LMP7^{-/-}マウスには見られない変化であり、酸化ストレス脆弱化による老化形質が進んだ結果と考えられた。

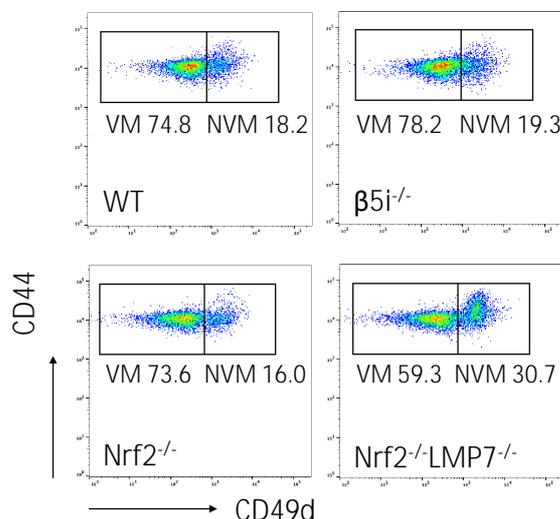


図 1

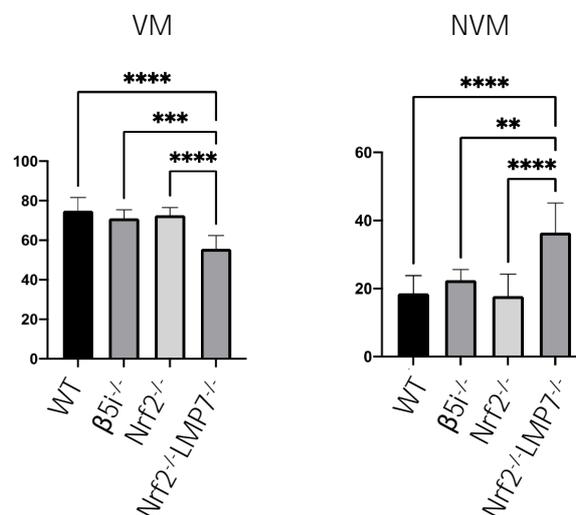


図 2

(図 1、図 2 説明)

図 1 : WT、Nrf2^{-/-}、LMP7^{-/-}、Nrf2^{-/-}LMP7^{-/-}マウスにおける代表的フローサイトメトリープロット
図 2 : Nrf2^{-/-}LMP7^{-/-}マウスでは、WT、Nrf2^{-/-}、LMP7^{-/-}マウスに比較して CD44^{high}CD122^{high}CD49d^{low} VM が減少し、CD44^{high}CD122^{high}CD49d^{high} NVM が増加していた。 n=6、2 way ANOVA を用いて統計解析を行った。 **p<0.01; ***p<0.01; ****p<0.001。

(2) 酸化ストレス脆弱化マウスにおける慢性炎症誘導

Nrf2^{-/-}LMP7^{-/-}マウスでは、WT、Nrf2^{-/-}、LMP7^{-/-}マウスに比較して、肝臓、腎臓等を主体として有意な炎症巣の増加を認めた(図 3)。

(図 3 説明)

WT、Nrf2^{-/-}、LMP7^{-/-}、Nrf2^{-/-}LMP7^{-/-}マウスにおける代表的組織像。Nrf2^{-/-}LMP7^{-/-}マウスでは、WT、Nrf2^{-/-}、LMP7^{-/-}マウスに比較して慢性炎症巣の増加を認めた。

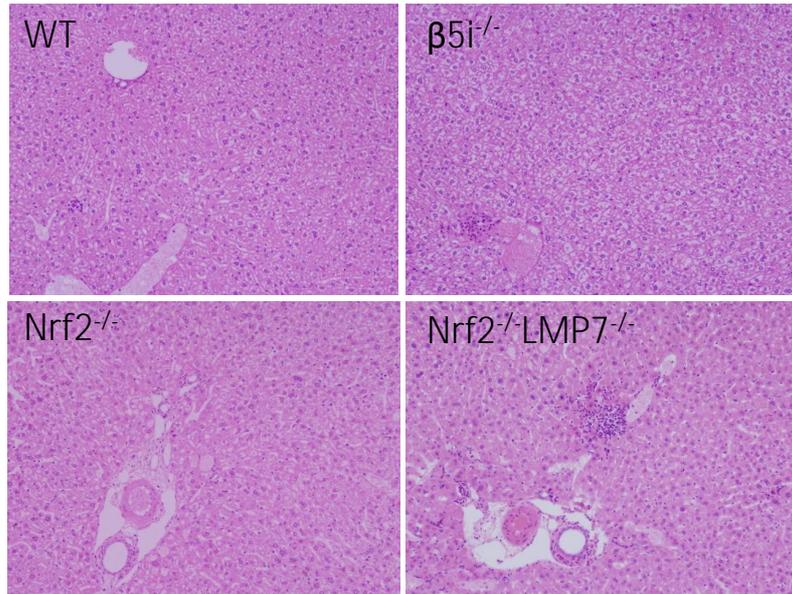


図 3

超高齢化社会を迎えた我が国にとって、健康寿命の延長につながる萌芽的研究の推進は重要な課題である。T細胞の加齢による変化や免疫老化については、既報研究の研究手法は若齢および老齢マウスの比較検討、リンパ球分化に関わる転写因子の遺伝子改変動物、癌免疫領域の研究が主体であった。加齢により様々な酸化ストレス脆弱性が高まることが報告されているが、生体は絶えず内的・外的ストレスを受けており、細胞ストレスの増大は様々な疾患の病態形成に関わっている。酸化ストレスは細胞内タンパク質の変性や細胞機能の異常、細胞死を誘導するが、免疫機能に与える影響は十分に解明されていない。酸化ストレス応答には Nrf2 経路や細胞内タンパク質分解酵素複合体であるプロテアソームが重要な役割を果たしており、本研究では酸化ストレス脆弱性を示す Nrf2、プロテアソームの遺伝子改変動物である Nrf2^{-/-}LMP7^{-/-}マウスを開発し、細胞の表現型変化や自己免疫応答の有無に関して解析を行った。

加齢により末梢の T 細胞サブセットが変化するが、胸腺の退縮によりナイーブ T 細胞が減少する一方で、メモリー T 細胞が増加する現象はもっとも大きな構成の変化の例である。最近の研究により、加齢により末梢の T 細胞は恒常性増殖を示すこと、その結果としてメモリー型の細胞表面マーカーを発現し、エフェクター機能の亢進した T 細胞が分化するが報告されている。これらの細胞に外来抗原の刺激をうけていない VM が含まれると考えられている。本研究により、老化形質を示す酸化ストレス脆弱化マウスにおいて NVM が増加していることが明らかとなった。酸化ストレスによる細胞内タンパク質の変化が自己抗原の変容をきたし、変容自己抗原に反応した細胞が NVM として増加している可能性が推定される。加齢により増加する細胞群には、細胞老化関連分泌形質 (senescence-associated secretory phenotype : SASP) を示す老化細胞が存在することが報告されているが、自己抗原反応性 NVM の炎症惹起性、細胞老化との関連性について検討を進める必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 Ito Shotaro, Asahina Hajime, Yamaguchi Naoko, Tomaru Utano, Hasegawa Tadashi, Hatanaka Yutaka, Hatanaka Kanako C., Taguchi Hiroshi, Harada Taisuke, Ohira Hiroshi, Ikeda Daisuke, Mizugaki Hidenori, Kikuchi Eiki, Kikuchi Junko, Sakakibara-Konishi Jun, Shinagawa Naofumi, Konno Satoshi | 4. 巻 32 |
| 2. 論文標題 A case of radio-insensitive SMARCA4-deficient thoracic undifferentiated carcinoma with severe right heart failure | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Respiratory Medicine Case Reports | 6. 最初と最後の頁 101364 ~ 101364 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.rmcr.2021.101364 | 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 Nishibata Yuka, Koshimoto Shota, Ogaki Kenta, Ishikawa Erika, Wada Kosuke, Yoshinari Miku, Tamura Yuto, Uozumi Ryo, Masuda Sakiko, Tomaru Utano, Ishizu Akihiro | 4. 巻 220 |
| 2. 論文標題 RNase in the saliva can affect the detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 by real-time one-step polymerase chain reaction using saliva samples | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Pathology - Research and Practice | 6. 最初と最後の頁 153381 ~ 153381 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.prp.2021.153381 | 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 Kawakami Tamihiro, Tamura Yuto, Dong Yupeng, Yoshinari Miku, Nishibata Yuka, Masuda Sakiko, Tomaru Utano, Ishizu Akihiro | 4. 巻 48 |
| 2. 論文標題 Anti phosphatidylserine/prothrombin complex antibodies in patients with cutaneous vasculitis: Possible involvement in the pathogenesis | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 The Journal of Dermatology | 6. 最初と最後の頁 703 ~ 706 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.15810 | 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 Tomaru Utano, Ito Tomoki, Ohmura Yu, Higashikawa Kei, Miyajima Syota, Tomatsu Ruka, Higashi Tsunehito, Ishizu Akihiro, Kuge Yuji, Yoshioka Mitsuhiro, Kasahara Masanori | 4. 巻 191 |
| 2. 論文標題 Decreased Proteasomal Function Induces Neuronal Loss and Memory Impairment | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 The American Journal of Pathology | 6. 最初と最後の頁 144 ~ 156 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2020.10.004 | 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 Kiuchi Takayuki, Tomaru Utano, Ishizu Akihiro, Imagawa Makoto, Iwasaki Sari, Suzuki Akira, Otsuka Noriyuki, Ohhara Yoshihito, Kinoshita Ichiro, Matsuno Yoshihiro, Dosaka-Akita Hiroto, Kasahara Masanori | 4. 巻 74 |
| 2. 論文標題 Expression of the immunoproteasome subunit 5i in non-small cell lung carcinomas | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Clinical Pathology | 6. 最初と最後の頁 300 ~ 306 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jclinpath-2020-206618 | 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 Nonokawa Mayu, Shimizu Tomohiro, Yoshinari Miku, Hashimoto Yamato, Nakamura Yusuke, Takahashi Daisuke, Asano Tsuyoshi, Nishibata Yuka, Masuda Sakiko, Nakazawa Daigo, Tanaka Satoshi, Tomaru Utano, Iwasaki Norimasa, Ishizu Akihiro | 4. 巻 190 |
| 2. 論文標題 Association of Neutrophil Extracellular Traps with the Development of Idiopathic Osteonecrosis of the Femoral Head | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 The American Journal of Pathology | 6. 最初と最後の頁 2282 ~ 2289 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2020.07.008 | 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 Yamaguchi Naoko, Tomaru Utano, Kiuchi Takayuki, Ishizu Akihiro, Deguchi Takahiro, Otsuka Noriyuki, Tanaka Satoshi, Marukawa Katsuji, Matsuno Yoshihiro, Kitagawa Masanobu, Kasahara Masanori | 4. 巻 74 |
| 2. 論文標題 Expression of cathepsins B, D and K in thymic epithelial tumours | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Clinical Pathology | 6. 最初と最後の頁 84 ~ 90 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jclinpath-2020-206551 | 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 Tanimura Shun, Nishida Mutsumi, Horie Tatsunori, Kamishima Tamotsu, Matsumoto Hitomi, Morimura Yutaka, Nishibata Yuka, Masuda Sakiko, Nakazawa Daigo, Tomaru Utano, Atsumi Tatsuya, Ishizu Akihiro | 4. 巻 115 |
| 2. 論文標題 Fluvastatin prevents the development of arthritis in env-pX rats via up-regulation of Rho GTPase-activating protein 12 | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Experimental and Molecular Pathology | 6. 最初と最後の頁 104454 ~ 104454 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexmp.2020.104454 | 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 Kawakami Tamihiro, Kikuchi Ayaka, Miyabe Chie, Ikeda Takaharu, Takeuchi Sora, Tamura Yuto, Nishibata Yuka, Masuda Sakiko, Nakazawa Daigo, Tomaru Utano, Ishizu Akihiro | 4. 巻 124 |
| 2. 論文標題 Relationship between lysosomal-associated membrane protein-2 and anti-phosphatidylserine/prothrombin complex antibody in the pathogenesis of cutaneous vasculitis | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Clinical and Experimental Rheumatology | 6. 最初と最後の頁 161 ~ 165 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 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 - |

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 西端 友香、益田 紗季子、中沢 大悟、外丸 詩野、石津 明洋 |
| 2. 発表標題 抗好中球細胞質抗体 (ANCA) に続き抗糸球体基底膜 (GBM) 抗体が産生されるメカニズム |
| 3. 学会等名 日本リウマチ学会総会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 清水 智弘、野々川 茉佑、西端 友香、益田 紗季子、高橋 大介、浅野 毅、田中 敏、外丸 詩野、岩崎 倫政、石津 明洋 |
| 2. 発表標題 特発性大腿骨頭壊死症の発生における好中球細胞外トラップの関与 |
| 3. 学会等名 日本整形外科学会総会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 仲川 心平、外丸 詩野、石津 明洋、笠原 正典 |
| 2. 発表標題 プロテアソーム機能低下が肥満による脂肪組織炎症に与える影響について |
| 3. 学会等名 日本病理学会総会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 石井 保志、外丸 詩野、石津 明洋、笠原 正典 |
| 2. 発表標題 プロテアソーム機能低下が腎虚血再灌流障害に与える影響について |
| 3. 学会等名 日本病理学会総会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 益田 紗季子、石橋 美郷、加藤 くるみ、西端 友香、田中 敏、外丸 詩野、辻野 一三、石津 明洋 |
| 2. 発表標題 肺基礎疾患を有する肺炎患者における分解抵抗性好中球細胞外トラップの形成 |
| 3. 学会等名 日本病理学会総会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 山口 直子、外丸 詩野、木内 隆之、石津 明洋、松野 吉宏、北川 昌伸、笠原 正典 |
| 2. 発表標題 胸腺上皮性腫瘍におけるカテプシンB、D、K発現 |
| 3. 学会等名 日本病理学会総会 |
| 4. 発表年 2020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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|