

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06135

研究課題名(和文) 老化後期におけるCD4キラーT細胞の増加プロセスの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the Expansion Mechanism of Cytotoxic CD4 T Cells During Late-Stage Aging

研究代表者

橋本 浩介 (HASHIMOTO, Kosuke)

大阪大学・蛋白質研究所・准教授

研究者番号：40624599

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、長寿者の末梢血に存在するCD4キラーT細胞を1細胞レベルで解析し、その分子的な特徴を分析した。まず、CD4キラーT細胞が占める割合を調べたところ、100歳以上で高くなる傾向にあるが、それ以下の年齢でも増加しうることが明らかになった。次に、「CD4ヘルパー」と「CD4キラー」の中間的な特徴をもつT細胞群の検出に成功した。これらの細胞は、表面タンパク質と細胞傷害性遺伝子のプロファイルが中間的になっており、遷移過程の細胞と考えられる。また、CD4キラーT細胞では多くのT細胞が同一のTCR配列をもっており、ごく少数のCD4キラーT細胞が大きく増加することも明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢者における感染症の重症化は、免疫機能の低下が主な原因である。特に、獲得免疫の中核を担うT細胞の老化は、免疫防御機能の低下に直結する重大な問題である。本研究は老化後期に特異的に増加するCD4キラーT細胞に注目し、1細胞技術によってT細胞老化の一端を明らかにした。T細胞の老化メカニズムが分子レベルで解明されれば、免疫老化全体に対する理解が進み、健康寿命の延伸に寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed cytotoxic CD4 T cells in the peripheral blood of centenarians at the single-cell level and examined their molecular characteristics. First, we investigated the proportion of CD4 killer T cells and found that while the proportion tends to be higher in individuals aged 100 and above, it can also increase in those below this age. Next, we successfully detected a group of T cells with intermediate characteristics between "CD4 helper" and "cytotoxic CD4". These cells exhibited intermediate profiles of surface proteins and cytotoxic genes, suggesting they are transitional cells. Furthermore, we found that many cytotoxic CD4 T cells shared identical TCR sequences, indicating that a very few T cells undergo significant expansion.

研究分野：バイオインフォマティクス

キーワード：シングルセル トランスクリプトーム スーパーセンテナリアン CD4キラーT細胞 長寿 百寿者 老化

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

老化にともなう免疫機能の低下は健康長寿を達成する上で大きな障害となる。我々はこれまでの研究で、老化 T 細胞の特徴を明確にするために、限界寿命付近である 110 歳以上の血液を 1 細胞トランスクリプトーム技術によって解析し、特殊な T 細胞である CD4 キラー T 細胞が高い割合で存在することを明らかにした。

一般的に、T 細胞は「CD4 ヘルパー」と「CD8 キラー」の 2 種類に分類される。前者は他の免疫細胞を助ける（ヘルパー）機能を持ち、後者はがん細胞などを殺す（キラー）機能を持つ。CD4 キラー T 細胞は、これら両方の特徴を併せ持つ T 細胞であり、110 歳という超高齢者で顕在化した例外的な T 細胞といえる。CD4 キラー T 細胞は、その例外的な特徴のためにアーティファクトと考えられるなど、これまであまり注目されてこなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、老化後期における「CD4 ヘルパー」から「CD4 キラー」への転換と増加のメカニズムを解明することである。ヘルパー T 細胞とキラー T 細胞は異なる遺伝子群を発現しており、それらを制御する転写因子も異なっている。通常、ヘルパー型からキラー型への転換は起こらないが、その転写制御がどのように遷移するのかを、百寿者の血中 T 細胞を 1 細胞レベルで解析することにより明らかにする。さらに、転換した CD4 キラー T 細胞が持つ T 細胞レセプターの特徴を明らかにし、その機能解明を目指す。本研究の準備段階において、110 歳以上の提供者 10 人を含む 28 人の血液から抽出した合計約 5 万の T 細胞について、1 細胞毎のトランスクリプトーム、表面タンパク質、T 細胞レセプターの 3 種類のシーケンスデータが得られていた(図 1)。実際のデータ解析は以下で述べるような方法で行った。

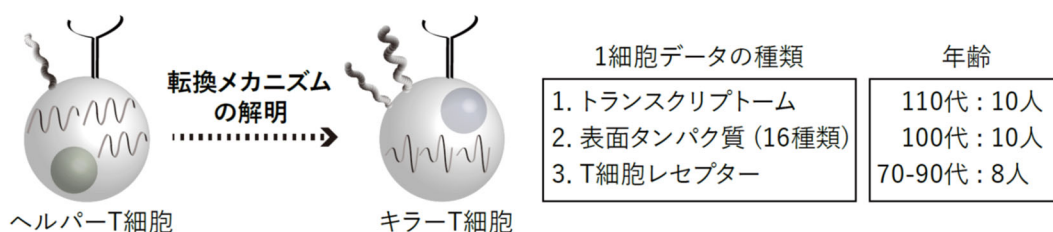


図1. 本研究の概要

3. 研究の方法

まず、得られている 5 万個の T 細胞から CD4 キラー T 細胞を検出する。CD4 キラー T 細胞だけに見られる既知の特徴は、細胞表面に CD4 分子を持ちながら、細胞内部ではグランザイムやパーフォリンなど「キラー」の機能に関わる遺伝子を発現していることである。そのため、表面タンパク質とトランスクリプトームデータを組み合わせることで、CD4 キラー T 細胞を他の T 細胞と区別することができる。実際の解析では、1 細胞解析用の R パッケージである Seurat に実装されている関数を使い、データの正規化、次元圧縮、クラスタリングによって CD4 キラー T 細胞を検出する。検出された CD4 キラー T 細胞を、CD4 ヘルパー T 細胞などの関連する T 細胞と比較することで、CD4 キラー T 細胞の分子的な特徴を明らかにする。

次に、CD4 キラー T 細胞が分化の過程でどのようにして現れてきたのかを明らかにするために、「分化の度合い」という尺度を用いて、CD4 キラー T 細胞を T 細胞全体の中に位置づける。T 細胞は、抗原刺激を受けて活性化・増殖を繰り返すたびに、少しずつ細胞の分化が進み、トランスクリプトームや表面タンパク質の構成が変化する。この変化を理解するために、「CD4 キラー」と「CD4 ヘルパー」の中間的な特徴を持つ細胞を特定し、その分子的な特徴を明らかにする。最後に、過度に増殖した CD4 キラー T 細胞の T 細胞受容体 $\alpha \cdot \beta$ 鎖の配列を解析しその特徴を明らかにする。これまでの研究で、110 歳以上の CD4 キラー T 細胞においてクローン性増殖が観察されている。同様の現象が 100 歳代においても起こっているのかを調べるために、T 細胞レセプターの配列から Simpson index を計算し、年齢層別にレセプターの多様性を評価する。そのうえで、各個体から増殖率が高い T 細胞を抽出し、過度に増殖した T 細胞について、分化マーカーの CD28 や CD27、疲弊マーカーである PD-1 を使い、増殖細胞の細胞表面タンパク質の特徴を明らかにする。

4. 研究成果

(1) CD4 キラーT 細胞は老化後期に増加する

トランスクリプトームと表面タンパク質の両方に基づいて細胞をクラスタリングし、CD4 キラーT 細胞を1つのクラスターとして検出した(図 2A)。このクラスターでは、CD4 遺伝子と同時に、GZMH などの細胞傷害性遺伝子が発現している。CD4 キラーT 細胞が占める割合をそれぞれのドナーで調べたところ、70-90 歳のグループが中央値 4.0%であったのに対して、スーパーセンチナリアンでは 17.6%となっており、有意 (Wilcoxon テスト $P=0.027$) に高い割合を示した

(図 2B)。ただし、100 歳以下でも 40%を超えるケースが見られたことから、CD4 キラーT 細胞は 100 歳以上で高くなる傾向にあるが、それ以下の年齢でも増加しうることが明らかになった。

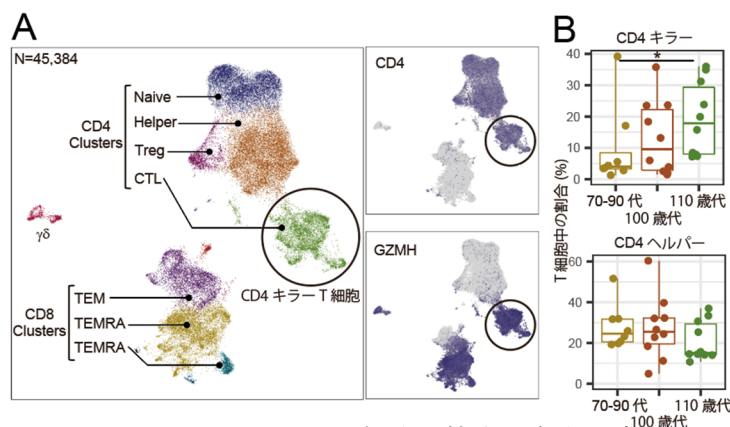


図 2. CD4 キラーT 細胞の検出と存在比率

(2) CD27-CD28+T 細胞は CD4 キラーT 細胞への遷移過程である

CD4 ヘルパーT 細胞と CD4 キラーT 細胞は、遺伝子発現や表面タンパク質の発現パターンが大きく異なり、明確に 2つのクラスターに分かれている。これら 2種類の中間的な特徴を持つT 細胞を検出するために、細胞表面タンパク質の発現レベルに注目した解析を行った。その結果、T 細胞の活性化に重要な共刺激因子である CD27 と CD28 に興味深いパターンが見つかった。

図 3A に示すように、CD4 ヘルパーT 細胞の多くは CD27 を発現しているのに対し、ほぼすべての CD4 キラーT 細胞は CD27 の発現を消失している。しかし、一部の CD4 ヘルパーT 細胞は CD27 を消失していた(図 3A の点線部分)。CD27 の消失は分化が進行していることを示唆しており、これらの CD4 ヘルパーT 細胞は、キラーT 細胞への分化の第一段階の可能性がある。UMAP 上においても CD27-CD28+T 細胞はヘルパーとキラーの間に分布していることが観察された(図 3B)。細胞傷害性遺伝子の発現もヘルパーとキラーの中間程度になっており、これらの細胞は CD4 キラーへの遷移過程にある細胞であることが示唆される。

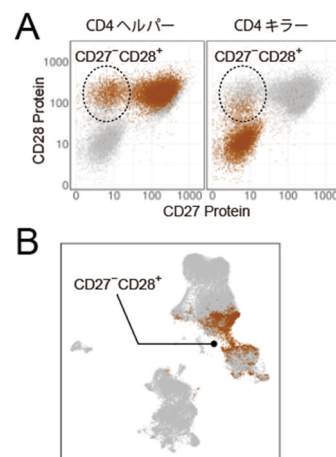


図 3. CD27-CD28+T 細胞

(3) CD4 キラーT 細胞はクローン増殖によって増加する

CD4 キラーへの遷移を別の角度から理解するために、T 細胞レセプターの α 鎖および β 鎖について配列解析を行った。CD4 ヘルパーT 細胞では、レセプター配列が高い多様性を示したのに対し、CD4 キラーT 細胞では、特定のレセプター配列が多数を占めるクローン増殖が見られた(図 4)。クローン増殖は、スーパーセンチナリアンだけでなく他の年齢グループでも見られたことから、CD4 キラーT 細胞への遷移では比較的若い年齢であってもクローン増殖を伴うことが明らかになった。

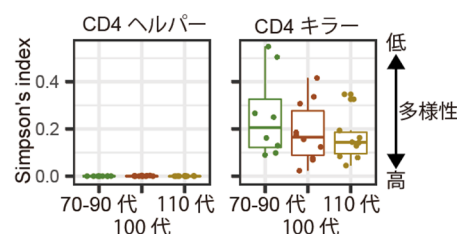


図 4. T 細胞レセプターの多様性

各サンプルで最も増殖したクローンを調べたところ、その占有率は平均して 30%になっており、50%を超えるケースも見られた。このことから、少数の T 細胞が高度にクローン増殖することで CD4 キラーT 細胞の集団が形成されていくことが分かった。

(4) 高度に増殖した CD4 キラーT 細胞の中には α 鎖や β 鎖を 2種類持つものが存在する

一般的に T 細胞は「allelic exclusion」と呼ばれる機構を通じて片方のアレルの α 鎖と β 鎖だけを発現し、他方のアレルは抑制される。この機構は各 T 細胞が 1種類の特異的な受容体を持つための基盤となっている。

本研究では、高度にクローン増殖した T 細胞受容体の特性を調べるために、24 サンプルそれぞれについて、最も増殖した T 細胞受容体を抽出した。興味深いことに、このうち 3 サンプルでは 2 本の α 鎖を、他の 2 サンプルでは 2 本の β 鎖を発現していることが観察された。この結果から、「allelic exclusion」の例外がそれほど稀ではない可能性が示唆される。特に、高度にクローン増殖した T 細胞において存在していることから、2 種類の鎖が共存しても機能的な問題とはならないことが示唆される。ただし、2 種類の鎖が存在することが増殖の促進に寄与しているのか、あるいはどちらか一方の鎖が抗原認識に関与しているのかは、現時点では明らかではない。

CD4 キラー T 細胞は、 α 鎖と β 鎖を発現する $\alpha\beta$ T 細胞の一種である。通常、他のサブセットであるナイーブ、Treg、ヘルパー T 細胞は γ 鎖や δ 鎖をほとんど発現していない。しかし、ここでは CD4 キラー T 細胞が γ 鎖を発現しているという意外な結果が観察された。さらに、これらの細胞に発現している γ 鎖の種類を調べたところ、8 種類以上の異なる V 領域が検出され、CD4 キラー T 細胞が多様な γ 鎖の V 領域を発現していることが示された。これらの発見は、CD4 キラー T 細胞が従来の枠組みを超えて複数の鎖を発現できる多様性を持ち、未知の免疫応答機構を秘めている可能性があることを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hashimoto Kosuke, Jouhilahti Eeva-Mari, Tohonen Virpi, Carninci Piero, Kere Juha, Katayama Shintaro	4. 巻 31
2. 論文標題 Embryonic LTR retrotransposons supply promoter modules to somatic tissues	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genome Research	6. 最初と最後の頁 1983 ~ 1993
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/gr.275354.121	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 該当する

1. 著者名 Koyama Kyohei, Hashimoto Kosuke, Nagao Chioko, Mizuguchi Kenji	4. 巻 3
2. 論文標題 Attention network for predicting T-cell receptor-peptide binding can associate attention with interpretable protein structural properties	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Bioinformatics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fbinf.2023.1274599	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4件（うち招待講演 4件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 橋本浩介
2. 発表標題 Single-cell transcriptome analysis of human immune cells and early embryos
3. 学会等名 The 17th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋本浩介
2. 発表標題 Expansion of cytotoxic CD4 T cells in supercentenarians
3. 学会等名 10x Genomics Global Immunology Virtual Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

1. 発表者名 橋本浩介
2. 発表標題 ヒトの初期胚で活性化するLTR型レトロトランスポゾン
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2021年大会（招待講演）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 橋本浩介
2. 発表標題 ヒトの初期胚で活性化するLTR
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年～2022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	新井 康通 (ARAI Yasumichi) (20255467)	慶應義塾大学・看護医療学部（信濃町）・教授 (32612)	

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
---------	---------