

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K20670

研究課題名（和文）癌を標的とした T 細胞免疫機能に対する細胞代謝における老化因子の役割の解明

研究課題名（英文）Roles for senescence factors of the cellular metabolism in the anti-cancer T-cell immunity

研究代表者

森 真弓（Mori, Mayumi）

京都大学・医学研究科・特定講師

研究者番号：70710060

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,600,000 円

研究成果の概要（和文）：加齢・老化により身体にさまざまな変化が起こり、胸腺の退縮を始めとして T 細胞にも免疫系の機能を減弱させるような「免疫老化」が起こる。しかし T 細胞において、加齢にともなうどのような因子がどう作用して老化に至るのかは明らかになっていない。本研究では細胞レベルで代謝に関わる因子や代謝経路に作用する薬剤・化合物を用いて、癌細胞の除去など T 細胞による免疫応答に対するそれらの直接的作用を解析した。その中で例えば、カルシトリオール（活性型ビタミン D）は活性化 CD8T 細胞の増殖を抑制するが老化マーカー PD1 の発現も低下させ、癌細胞に対する免疫応答が維持されることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢化社会において、加齢・老化にともなう身体機能の低下を防ぎ、健康長寿を目指すことが喫緊の課題である。その中でも T 細胞はその産生臓器である胸腺が年齢とともに不可逆的に退縮し、免疫老化によって癌や感染症に対する抵抗性の低下や、自己免疫疾患を招く大きな要因となる。本研究によって、一つでも T 細胞の免疫老化に対して直接作用する薬剤・化合物が見出されたことは、今後の抗老化医療技術や医薬品開発の一助となる。また、学術的にも免疫老化において細胞レベルの代謝変化から老化・抗老化または癌免疫応答に関与する因子は重要な発見であり、今後も派生的・発展的な研究継続が見込まれる。

研究成果の概要（英文）：Aging will alter the physiological functions all over the body including the immune system. One of such changes in so-called "immune-aging" is that the thymic involution eventually ends up with dysregulation of T cell immunity. However, it is not clear what causes T cell immune-aging and how it happens. This research project analyzed the effects of various reagents that interfere with cellular metabolism on T cell immune responses such as cancer cell eradication. As an instance, calcitriol (active-form vitamin D) was found to suppress the proliferation of activated CD8 T cells but also to reduce the expression of a senescence marker PD1 at the same time, and to maintain the immune responses against cancer cells.

研究分野：免疫学

キーワード：老化 がん免疫 代謝

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

胸腺で分化して産生され、数百万種類を超えるさまざまな抗原認識のレパートリーを一つ一つ持っている T 細胞は、哺乳類の免疫系において癌細胞の認識と除去に中心的な役割を果たす。T 細胞の分化の場でありその抗原認識レパートリーを選択して制御する胸腺という臓器は、加齢と共に自然退縮してしまうが、その後も末梢リンパ組織における一定数の T 細胞が維持される。しかしながら、加齢・老化に伴い身体に様々な変化が起きた結果、T 細胞の数・レパートリーや機能そのものが減弱してしまうことがある。このため、高齢になるほど感染症に対する抵抗力が低下したり、免疫系が癌細胞を除去しきれずに癌が発生する確率が高くなったりすると考えられる。では加齢・老化において何がどのように T 細胞に影響するのか、という点は明らかになっていない。T 細胞は個人個人で全く異なるレパートリーを持つ多様性があるため、多種多様な抗原に反応する免疫系の一つ一つのパラメータを解析して老化という一般的な現象を捉えるのは困難である。そこで、加齢によって変化する代謝という普遍的な因子に着目すれば、老化によって T 細胞の何がどう変化するかという答えに近づくのではないかと考えた。当初は老化因子・抗老化因子の一つとしてまずニコチンアミドジヌクレオチド (NAD) を中心とした代謝経路に着目し、NAD 合成経路に関わる酵素の阻害剤などが T 細胞による免疫反応に直接与える影響を調べることにした。

### 2. 研究の目的

上記の考えから、本研究では癌を標的とした T 細胞における代謝経路の老化因子・抗老化因子を同定し、「T 細胞免疫を中心とした癌除去機能における代謝因子の影響を明らかにする」ことを目的とした。

### 3. 研究の方法

老化因子・抗老化因子として当初は NAD 生合成を中心とした代謝経路に着目したため、NAD 合成酵素の阻害剤である FK866 や、NAD 合成の基質、あるいは NAD を消費する酵素の阻害剤である 3-aminobenzamide や AZD2461 などを中心に薬剤・化合物を準備した。しかしながら、糖代謝や脂質代謝のさまざまな経路が T 細胞機能に関与することが近年わかってきたため、糖・脂質代謝の双方にさまざまな細胞で作用の報告されていたカルシトリオール(活性型ビタミン D)なども用いた。さらに、核酸やアミノ酸の代謝が DNA メチル化状態を変化させて T 細胞の DNA ダメージや他の代謝経路のエピジェネティック制御に影響することを考えて、DNA メチル化阻害薬である 5-azacytidine や RG108、DNA 脱メチル化酵素の阻害剤である Bobcat339 なども用いた。これらの薬剤・化合物を用いて以下の実験 1~3 を行った。

#### ・実験 1: 代謝因子の in vitro における T 細胞の生存・増殖シグナルや活性化への影響

野生型マウス脾臓細胞、またはこれから単離した CD4T 及び CD8T 細胞は、その細胞表面にある抗原受容体である T cell receptor (TCR) を抗体で刺激することで in vitro において活性化できる。ここでは固相化した CD3 抗体及び培地中の CD28 に対する抗体で刺激した。同時に、さまざまな代謝経路に影響する薬剤または化合物で処理し、CD4T 細胞、CD8T 細胞、その他の細胞の増殖や活性・生存率をフローサイトメトリーにより計測した。一方、高齢マウスからも T 細胞単離と活性化を行い、若齢マウスの結果と比較した。複数の薬剤や化合物の中から、T 細胞の挙動が高齢マウス由来の T 細胞の挙動に近くなるものまたは逆の効果を示すものを、それぞれ老化因子・抗老化因子またはその関連因子として探索した。

#### ・実験 2: 抗原特異的な T 細胞活性における代謝経路の影響

実験 1 で用いた野生型マウス由来 T 細胞はさまざまな抗原認識を持つレパートリーを構成し、その抗原受容体である TCR とその活性化シグナルの強度は一つ一つの細胞で異なる。活性化シグナルや T 細胞の増殖などについてシングルセルレベルで解析するために、特定の抗原に特異的な TCR のみを持つ OT-I トランスジェニックマウス及び OT-II トランスジェニックマウスを用いた。脾臓からナイーブ CD8T 細胞または CD4T 細胞を単離し、OT-I や OT-II に対する特異抗原である ovalbumin (OVA) ペプチドと抗原提示細胞、補助的なサイトカインを加えて刺激・活性化した。実験 1 で探索した薬剤または化合物による処理の有無で、増殖・活性化マーカー (CD69, CD44, 蛍光色素 Cell Trace Violet (CTV) の細胞分裂による希釈など) を比較した。また、次の実験 3 で用いる癌細胞に対する免疫応答において in vitro で薬剤・化合物の直接的な作用を調べるため、活性化して薬剤・化合物とともに培養した CD8T 細胞と蛍光標

識した癌細胞を異なる割合で短時間共培養し、死細胞を染色して細胞数あたりの癌細胞除去率を算出した。

・実験 3: 癌抗原特異的な T 細胞免疫に対する代謝経路の in vivo における評価

実験 1 及び 2 で見出した T 細胞の老化・抗老化に関わる代謝因子に影響する薬剤または化合物が、実際に生体内で T 細胞免疫の機能にどう影響するかを以下の実験によって調べた。

(3-1) マウスリンパ球系癌細胞株 EL4 及びこれに OVA 抗原を発現させた細胞株 E.G7 をレシピエントマウスに皮下移植した。レシピエントは C57BL/6 系統のうち Ly5.1 と呼ばれ、CD45.1 アイソフォームを全ての白血球に発現している。癌細胞移植と同時に、OT-I TCR トランスジェニックマウス由来の CD8T 細胞を活性化させ、尾静注により移植した。移植後 2 週間以内に、癌抗原としての OVA 発現細胞に対する除去効果を、実験 2 で用いた薬剤または化合物を投与したマウス、非投与マウスで比較した(図 1)。

(3-2) 移植した癌細胞自身の増殖に薬剤・化合物が直接作用した場合、(3-1) の方法のみではその薬剤・化合物の T 細胞への作用を評価できない。そこで、癌移植マウスにビタミン投与する代わりに、OT-I T 細胞をトランスジェニックマウスから単離して培養中に薬剤・化合物処理したもとのしていないもので比較解析した(図 1)。

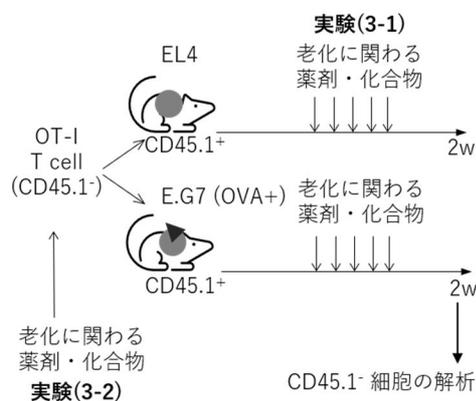


図 1. 生体内における T 細胞癌免疫に対する老化・抗老化因子による作用の評価方法

OT-I TCR トランスジェニックマウスから単離した CD8T 細胞を抗原ペプチドとサイトカインにより活性化させ、癌細胞株 EL4 または E.G7 を皮下移植した CD45.1+ レシピエントマウスに尾静注により同時移植する。実験 (3-1) では移植後のレシピエントマウスに老化・抗老化に関わる薬剤や化合物を投与するが実験 (3-2) では移植する T 細胞に対して活性化と同時に薬剤・化合物を与えて培養する。細胞移植から 2 週間後に腫瘍の大きさや、腫瘍とリンパ器官におけるドナー由来の CD45.1+ CD8T 細胞数などを解析する。

移植された癌細胞の増殖とその抑制を、腫瘍体積または腫瘍重量、及び癌組織浸潤免疫細胞数を基準として評価し、これらの実験グループを比較した。

#### 4. 研究成果

まず実験 1 では、野生型マウスの脾臓細胞または単離 T 細胞の表面受容体を刺激して活性化した。同時に代謝関連薬剤で処理し、T 細胞の増殖や活性・生存率を計測した。また、高齢マウスと若齢マウスの結果を比較した。その結果、高齢マウス由来の T 細胞および代謝阻害した T 細胞で、細胞の活性化や生存・増殖が顕著に低下した。

次に実験 2 では、OT-I または OT-II TCR トランスジェニックマウスの脾臓から T 細胞を単離し、各々の TCR 特異抗原ペプチド等を用いて刺激した。同時に代謝関連薬剤で処理し、老化指標を比較した。老化指標としては、実験 1 において若齢マウスに比べて高齢マウスで変化した T 細胞の活性化抑制や増殖能の低下を調べた。これに加え、T 細胞表面の PD1 や CD153 などの発現を一般的な老化指標とした。この実験では様々な薬剤・化合物により異なる結果が得られたため、各代謝経路による影響はこの実験だけでは結論できないが、まずカルシトリオール(活性型ビタミン D)に着目した。カルシトリオール(活性型ビタミン D)は活性化した T 細胞の増殖を抑制したが生存率を減じることはなく、また PD1 の発現上昇を抑制した(図 2)。また、T 細胞自身の増殖が抑制されているにもかかわらず、in vitro の癌細胞除去能力は維持されていた。さらに、カルシトリオール(活性型ビタミン D)を加えた T 細胞から RNA を抽出し、qPCR によって老化と関わる細胞周期調節因子などの発現を定量的に調べた。

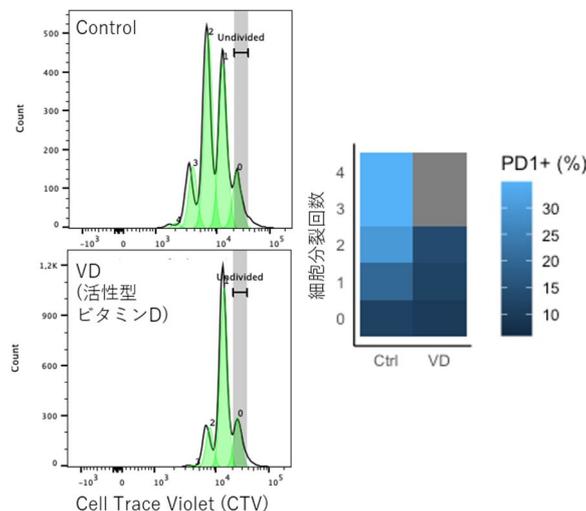


図 2. 活性化 CD8T 細胞に対するカルシトリオール(活性型ビタミン D)の増殖抑制および PD1 発現抑制効果

OT-I TCR トランスジェニックマウスから単離した CD8T 細胞を Cell Trace Violet (CTV) で蛍光標識した後、OVA 抗原ペプチドと IL-2 で活性化後 3 日間培養すると、CTV 蛍光色素が細胞分裂に伴って希釈される。細胞分裂回数がカルシトリオール(活性型ビタミン D)によりやや抑制された(左)。また、このとき細胞表面の PD1 を染色すると、対照実験の細胞では分裂回数が増えるにつれて PD1 発現が上昇するが、活性型ビタミン D によって PD1 発現は抑制された(右)。

これらの結果のうち OT-I TCR を持つ CD8T 細胞に対してカルシトリオール(活性型ビタミン D)が増殖抑制と PD1 発現抑制にはたらく点で老化制御に関与すると考え、さらに実験 3 を行って生体での癌抗原特異的な T 細胞免疫に対する作用を解析した。培養中の E.G7 癌細胞の増殖や生存はカルシトリオール(活性型ビタミン D)により直接影響を受けることがわかったため、癌移植マウスに薬剤投与する代わりに、OT-I T 細胞をトランスジェニックマウスから単離して培養中にカルシトリオール(活性型ビタミン D)処理したものとしていないもので比較解析した。移植癌細胞の増殖とその抑制を、腫瘍体積または重量、癌組織に浸潤した OT-I T 細胞数を基準として評価した。カルシトリオール(活性型ビタミン D)を与えた T 細胞は、in vitro での増殖が抑制されていたにも関わらず、対照実験の T 細胞と同等かそれ以上に癌を縮小させた。統計的な解析の後、この成果を発表する予定である。

本研究から、カルシトリオール(活性型ビタミン D)が CD8T 細胞に対して、増殖を抑制する一方で老化マーカーの一種である PD1 発現を転写・表面発現ともに低下させることがわかったため、これらのメカニズムをさらに追及するため、「ビタミン D による免疫老化におけるエピジェネティック制御機構」(基盤研究(C)、22K11745)において研究を継続中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------