

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450443

研究課題名(和文) 免疫老化の分子メカニズムの解明とワクチン開発への応用

研究課題名(英文) Study on the mechanism(s) of immunosenescence and its application for vaccine development.

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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：オステオポンチン(OPN)を大量に産生する老化関連T細胞(SA-T)は老化のみならずSLE等の自己免疫疾患においても急速に増加することが明らかとなっており、これら疾患との関連性が示唆されている。本研究ではSA-T細胞から産生されるOPNが死細胞処理にあたっている特殊なマクロファージによる死細胞処理を抑制することにより、自己免疫疾患の原因となる自己抗体産生を亢進していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Immune aging results in diminished adaptive immunity and increased risk for autoimmunity. We previously discovered a unique T cell population that increases with age, termed senescence-associated (SA-) T cells. The SA-T cells secrete abundant osteopontin (OPN) in response to auto B cells. Here, we demonstrate that OPN secreted by SA-T cells, which selectively accumulate in the germinal centers (GCs) of lupus-prone mice, interferes with phagocytosis of apoptotic cells. OPN induced diffuse and prolonged Rac1 activation in phagocytes via integrin alpha v beta 3 and inhibited the dissolution of phagocytic actin cup, causing defective apoptotic cell engulfment. Our results suggest that OPN secreted by follicular SA-T cells in GCs promotes a continuous supply of intracellular autoantigens via apoptotic cells, thus playing a key role in the progression of the autoreactive GC reaction and leading to pathogenic autoantibody production in lupus-prone mice.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫老化 T細胞 PD-1 CD153 オステオポンチン 全身性エリテマトーデス 死細胞処理 貪食

## 1. 研究開始当初の背景

免疫老化は免疫担当細胞の機能低下, 特に 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, 最近の研究から単に機能低下にとどまらず, 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, この細胞群の性状ならびに疾患との関連性について解析を行ってきた (1, 2)。これまでに解析により, (1) SA-T 細胞は, 組織内局在性や細胞マーカー (PD-1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup>) といった点で抗体産生制御に関与する濾胞性 T (T<sub>FH</sub>) 細胞によく似た細胞であるが, T<sub>FH</sub> 細胞と異なり抗原誘導性胚中心 (GC) には存在せず, 老化マウスや全身性エリテマトーデス (SLE) モデルマウスで観察される自発性 GC のみに局在すること, (2) T<sub>FH</sub> 細胞は抗原レセプター刺激により IL-4 や IL-21 といった抗体産生に関わる T<sub>H2</sub> 型サイトカインを産生するが, SA-T 細胞を刺激しても T<sub>H2</sub> 型サイトカインの産生はほとんど見られず, T<sub>H1</sub> 型サイトカインである IFN- $\gamma$  およびオステオポンチン (OPN) をはじめとする種々の炎症性サイトカインが産生されることが明らかとなっている。しかし, SA-T 細胞の機能, 特に SLE の発症との関係についてはほとんど明らかにされていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では SA-T 細胞の生物学的意義を明らかにすることを主目的として, SA-T 細胞が産生する OPN の SLE 等の自己免疫疾患との関連性を明らかにすることを目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 死細胞の貪食アッセイ

死細胞に対する貪食の評価は既報 (3) に従い行った。4~6wks 齢のマウスより胸腺細胞を採取し, 70U/mL Fas リガンドにより 37 2 時間処理し, apoptosis を誘導した。その死細胞を PBS で洗浄後, 0.1  $\mu$ g/mL pHrodo に室温 30 分反応させた。1x10<sup>5</sup> cells/mL に調整した BaF/Rac/ $\alpha$  $\beta$ 細胞と 1x10<sup>6</sup> 個の pHrodo でラベルした apoptosis 細胞を 0.1mg/mL MFG-E8 存在下に 37 2 時間反応させ, 貪食を行った。そ

の細胞を洗浄後, 150mM NaCl および 2%FCS を含む 20mM N-cyclohexyl-2- amino ethanesulfonic acid-NaOH バッファー (pH9) に浮遊させた後, フローサイトメトリー解析を行った。OPN の効果について調べるため, 10 $\mu$ g リコンビナント OPN を 1U thrombin で 22 16 時間反応させ活性化型 OPN (N-half OPN) を作出した後, これを BaF/Rac/ $\alpha$  $\beta$ 細胞と様々な濃度で反応させ, 解析を行った。

### (2) FRET 解析

pPBbsr2-Raichu-Rac1 および pCMV-mPBase を transfection した NIH/integrin 細胞を作出した。この細胞を 35-mm ガラス底ディッシュに播き, apoptosis 細胞を添加した後, CoolLED precisExcite LED illumination system を搭載した IX83 倒立顕微鏡 (UPlanSApo x40 対物レンズ) で観察を行った。

## 4. 研究成果

### (1) OPN 中和抗体による SLE 発症制御

北大医学部の上出らが作製した OPN 中和抗体 (clone 35B7) (4) を代表的な SLE モデルマウスである NZB/W F1 (BWF1) マウスに投与し, その効果を調べた。その結果, 抗 dsDNA 抗体等の自己抗体産生や尿蛋白に対して抑制傾向を示した。しかし, その抑制効果は抗 dsDNA 抗体産生に対しては弱く, 特に投与後半には全く効果が見られなくなった。一方, この抗体投与により BWF1 マウスで形成される自発性 GC 形成が有意に抑制されていた (図 1)。

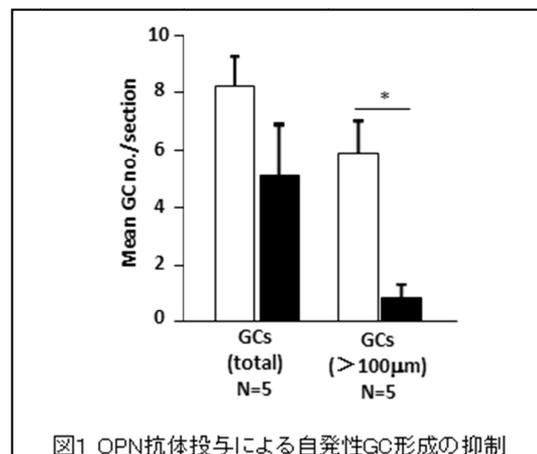
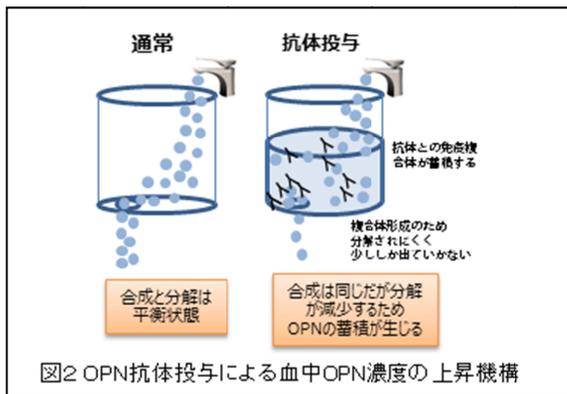


図1 OPN抗体投与による自発性GC形成の抑制

実験に用いた 35B7 抗体は OPN に対する中和活性を持つもののその結合活性が低く, それが投与後期に自己抗体や尿蛋白に対する抑制が見られなくなってくる原因と考え, 35B7

抗体より OPN に対する結合力が 100 倍以上高い新規 OPN 抗体 (clone 4C10) を新たに樹立し,その効果について検討を行った。しかし,4C10 投与ではまったく自己抗体産生抑制に対する抑制効果が見られず,この抗体投与によりむしろ悪化する傾向が見られた。投与マウスの血中 OPN 量を測定したところ,4C10 投与により血中 OPN 量が著しい上昇が見られている。これは OPN に中和抗体が結合することにより OPN の安定化が起こり,血中 OPN 量が上昇したものと考えられた (図 2)。

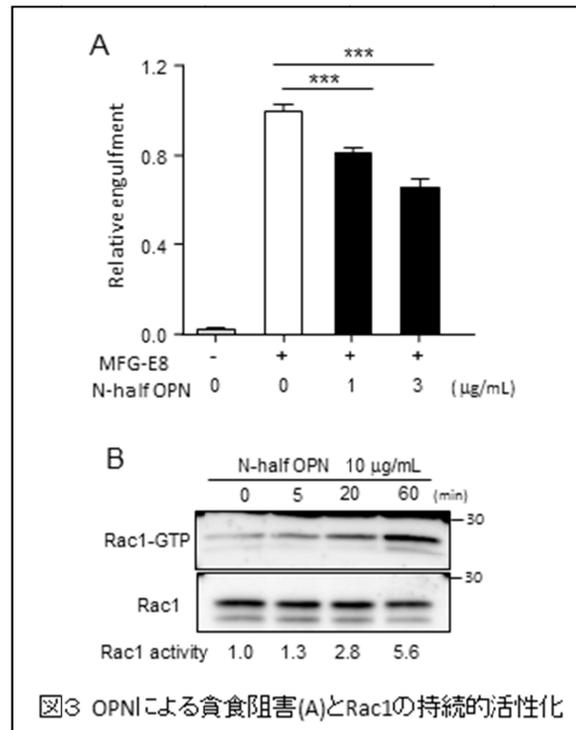


## (2) OPN と自発性 GC 形成

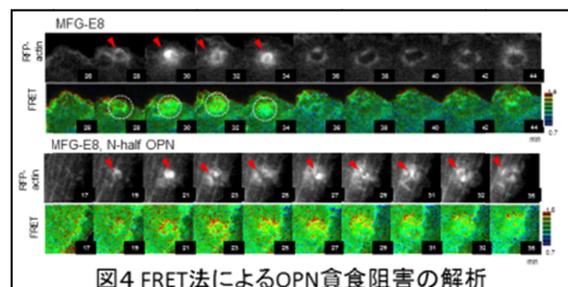
OPN 抗体投与により自発性 GC 形成が抑制されたことは,OPN がこの事象に参与していることを示唆するが,これまで OPN の自発性 GC 形成への関与については報告がない。そこで,次にその分子機構について検討を行った。

OPN はその分子中央部にインテグリン結合ドメインを有し,そのドメインを介してインテグリンと結合することにより様々な生物学的活性を發揮している。2006 年に島根大学の木下らは OPN が同じインテグリンを有する MFG-E8 とインテグリン結合に対し競合拮抗することを報告している (5)。この MFG-E8 はインテグリン結合ドメインの他,C 末側に 2 カ所の Factor VIII 相同ドメインを有し,この部位を介し phosphatidyl-serine に結合する。MFG-E8 は死細胞表面に存在する Phosphatidylserine に結合し,マクロファージなどの貪食細胞により処理される際にアダプター分子となって機能することが知られている。そのため,MFG-E8 遺伝子破壊マウスでは GC での死細胞の貪食が阻害され,GC に局在する tingible body マクロファージ (TB-Mφ) 上に死細胞が蓄積し,最終的に SLE 様の症状を発症する (6)。我々は,OPN が

MFG-E8 のインテグリン結合を拮抗阻害することにより自発性 GC 形成の亢進を引き起こすという仮説を立て,まず死細胞貪食に及ぼす影響について検討を行った。インテグリン  $\alpha v \beta 3$  を強制発現させた Ba/F3 細胞 (BaF/Rac/ $\alpha \beta$ 細胞) を用いる in vitro 貪食系により OPN の効果を調べたところ,活性化 OPN は用量依存的にこの細胞による MFG-E8 依存的死細胞貪食を直接,阻害することが示された (図 3A)。



しかし,その効果は最初予想していた MFG-E8 によるインテグリン結合に対する拮抗阻害ではなく,OPN がインテグリンに結合することによって Rac1 の持続的な活性化が引き起こされるためであることが活性化 Rac1 に対する pull-down assay ならびに FRET 解析より明らかとなった (図 3B, 図 4)。



BWF1 マウスの脾臓で観察される自発性 GC 形成は,脾臓の GC 内の TB-Mφ 上に貪食されずに残っている死細胞数とよく相関す

る (7)。この死細胞蓄積が OPN によるものかどうかを明らかにするために、先の OPN 中和抗体の投与を行ったところ、TB-Mφ上の死細胞数が有意に減少した (図 5)。

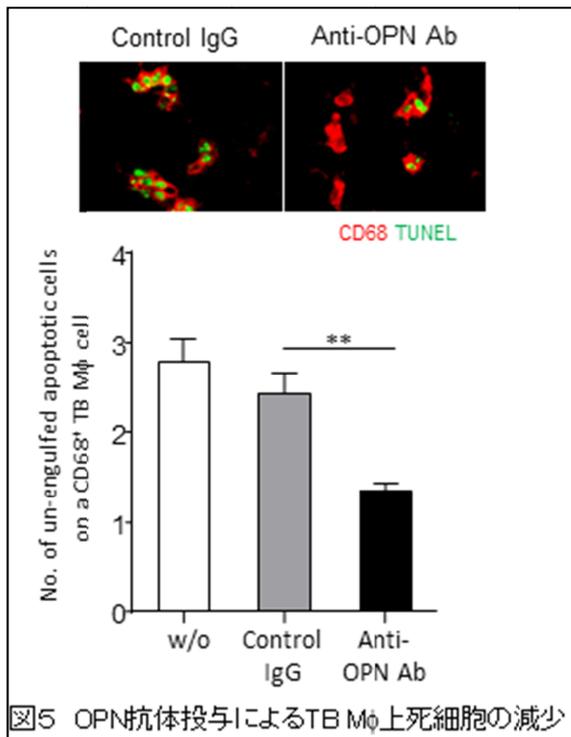


図5 OPN抗体投与によるTB Mφ上死細胞の減少

前述ように BWF1 マウスの自発性 GC 内に局在する SA-T 細胞は多量に OPN を産生する。OPN ノックインマウスを用いて GC 内の OPN 産生を調べたところ、確かに自発性 GC において OPN のシグナルが観察され、そのシグナルは CD3 シグナルと完全に一致した。このことは自発性 GC 内に局在する SA-T 細胞が OPN の主なソースとなっていることを示唆する。SLE を発症した BWF1 マウスから単離した SA-T 細胞を、SLE を発症していない若い BWF1 マウスの脾臓内に移植すると、自発性 GC 形成の促進が見られるとともに TB マクロファージ上の貪食されない死細胞数の有意な増加を認めることも明らかになっている。以上の結果は BWF1 の自発性 GC 形成の促進にそこに局在する SA-T 細胞から産生される OPN が働いていることを強く示唆する。

#### <引用文献>

1. Shimatani K, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106:15807-12, 2009.
2. Tahir S, et al. *J. Immunol.* 194: 5725-35. 2015.

3. Toda S, et al. *Mol. Cell. Biol.* 32: 118-125. 2012.
4. Hamamoto S, et al. *J. Bone. Miner. Res.* 26: 2967-77, 2011.
5. Aziz MMS, et al. *J. Immunol.* 182: 7222-32, 2009.
6. Hanayama R, et al. *Science* 304: 1147-50, 2004.
7. Sakamoto K, et al. *J. Immunol.* 197:2177-86, 2016.

#### 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4件)

Ito K, Nakajima A, Fukushima Y, Suzuki K, Sakamoto K, Hamazaki Y, Ogasarawa K, Minato N, Hattori M. 2017. The potential role of Osteopontin in the maintenance of commensal bacteria homeostasis in the intestine. *PLoS One*, 査読有, 12: e0173629. doi: 10.1371/ journal.pone.0173629. eCollection 2017.

Sakamoto K, Fukushima Y, Ito K, Matsuda M, Nagata S, Minato N, Hattori M. 2016. Osteopontin in spontaneous germinal centers inhibits apoptotic cell engulfment and promotes anti-nuclear antibody production in lupus-prone mice. *J. Immunol.* 査読有, 197:2177-86. doi: 10.4049/jimmunol.1600987. Epub 2016 Aug 17.

Tahir S, Fukushima Y, Sakamoto K, Sato K, Fujita H, Inoue J, Uede T, Hamazaki Y, Hattori M, Minato N. 2015. A CD153<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T follicular cell population with cell-senescence features plays a crucial role in lupus pathogenesis via osteopontin production. *J. Immunol.* 査読有, 194:5725-35. doi: 10.4049/jimmunol.1500319. Epub 2015 May 13.

服部雅一、湊長博. 「T-cell senescence and autoimmune diseases」アレルギー誌, 査読有, 64 (2): 110-118, 2015

[学会発表](計6件)

Tahir S, Fukushima Y, Sakamoto K, Sato K, Inoue J, Hattori M, Hamazaki Y, Minato N.

Senescence associated follicular CD4<sup>+</sup> T cell population underlies systemic lupus erythematosus. 第43回日本免疫学会 京都, 2014

Sakamoto K, Minato N, Hattori M. Osteopontin is involved in the formation of spontaneous germinal centers in NZB/W F1 mice via the inhibition of apoptotic cell-engulfment. Keystone Symposium, Keystone, USA, 2015.

Fukushima Y, Hattori M. Accumulation of naïve TMRM<sup>lo</sup> CD4 T cells promotes generation and functional polarization of effector cells leading to enhanced germinal center reactions in lupus-prone NZB/W F1 mice. 第44回日本免疫学会, 札幌, 2015

Sakamoto K, Nagata S, Minato N, Hattori M. Osteopontin accelerates the formation of spontaneous germinal centers in NZB/W F1 mice via inhibition of apoptosis cell-engulfment by tingibile body macrophages. 第44回日本免疫学会, 札幌, 2015

Sakamoto K, Nagata S, Minato N, Hattori M. Osteopontin produced by CD153<sup>+</sup> follicular T cells suppresses apoptotic cell-engulfment by tingibile body macrophages in germinal centers to accelerate SLE in NZB/W F<sub>1</sub> mice. Keystone Symposium, Monterey, USA, 2016.

Fukushima Y, Yamada H, Yoshikai Y, Minato N, Hattori M. CD153-CD30 interaction is involved in immunosenescence of T cells and spontaneous germinal center reactions. 第46回日本免疫学会, 沖縄, 2016

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：オステオポンチン産生抑制剤  
発明者：服部雅一，福島祐二  
権利者：京都大学，アステラス製薬  
種類：特許  
番号：特許願 2014-215211  
出願年月日：平成 26 年 10 月 22 日  
国内外の別：国内

取得状況(計0件)  
〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

服部 雅一 (HATTORI, Masakazu)  
京都大学・大学院医学研究科・特定教授  
研究者番号：40211479

### (2) 研究分担者

福島 祐二 (FUKUSHIMA, Yuji)  
京都大学・大学院医学研究科・特定研究員  
研究者番号：90583146

### (3) 連携研究者

真下 知士 (MASHIMO, Tomoji)  
大阪大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：80397554