

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02812

研究課題名(和文) 高脂肪食負荷に伴うT細胞老化の分子機序と制御法の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism and regulation of T-cell senescence

研究代表者

佐野 元昭 (SANO, Motoaki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：30265798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：内臓脂肪組織に脂肪が蓄積するとマクロファージを中心とした免疫細胞が浸潤して慢性炎症が生じる。我々は、内臓脂肪組織の慢性炎症には、老化したT細胞から分泌されるオステオポンチンが関与していることを見出した。本研究では、PD-1を標的として老化したT細胞を除去することによって糖代謝が改善することを明らかにした。この方法だと活性化したT細胞も除去することになり好ましくない。オステオポンチンの転写活性の制御こそが治療標的としては重要である。内臓脂肪肥満のみならず心筋梗塞や糖尿病性腎臓病でも観察されるオステオポンチンの転写活性の活性化機序と制御機構を明らかにすることを試みてきた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満にともなうメタボリック症候群は、心筋梗塞、慢性腎臓病、心不全を引き起こし、健康長寿の妨げになる。これらの併存疾患の発症を予防するためには、肥満に伴う全身の炎症状態を軽減する必要がある。我々の研究は、オステオポンチンが心血管内分泌疾患発症を予測する、あるいは、治療効果を予測するバイオマーカーとして有用であることを明らかにしただけでなく、治療標的としても有望であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Accumulation of fat in visceral adipose tissue causes chronic inflammation due to infiltration of immune cells, mainly macrophages. We have found that osteopontin secreted by senescent T cells is involved in chronic inflammation in visceral adipose tissue. In the present study, we found that removal of senescent T cells by targeting PD-1 (Programmed cell death protein 1) improves glucose metabolism. This method would also remove activated T cells, which is not desirable. Regulation of transcriptional activity of osteopontin is important as a therapeutic target. We have been trying to clarify the mechanism of activation and regulation of the transcriptional activity of osteopontin, which is observed not only in visceral obesity but also in myocardial infarction and diabetic kidney disease.

研究分野：循環器、糖尿病内分泌代謝内科、免疫学、生化学、分子生物学

キーワード：炎症制御 線維化制御 心不全 慢性腎臓病 糖尿病 慢性炎症 オステオポンチン 免疫老化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫老化は、高齢者にみられる、感染に対する抵抗力や癌に対する免疫監視機構の低下、自己免疫疾患の発症頻度の増加、過剰な炎症反応の原因となっている。したがって、免疫老化は、個体の老化に深く関与していると考えられてきた。京都大学の湊長博教授は、この免疫老化が、Tリンパ球集団全体の機能劣化ではなく、加齢に伴って抗原特異的な免疫応答が出来ない細胞老化の特徴を兼ね備えた特殊な CD4 Tリンパ球集団(老化関連 Tリンパ球)が増加することが原因であることを明らかにした(Proc Natl Acad Sci U S A. 2009: 106: 15807-12)。老化関連 Tリンパ球は細胞表面に Programmed cell death 1 (PD-1)を高発現する特徴を持ち、CD4 T細胞が通常分泌するサイトカインは分泌せずに、オステオポンチンを大量に、しかも PD-1/PD-L1 チェックポイント・シグナル伝達による抑制を受けずに分泌する。したがって、体内の老化関連 Tリンパ球の数(Tリンパ球集団全体に占める割合)が多い人ほど、血液中のオステオポンチン濃度が高く、老化が早く進むと考えられる。

メタボリック症候群は、見た目のかっこ悪さを警告しているだけでなく、「内臓脂肪」がさまざまな生活習慣病の引き金となり、死を早めてしまうことが問題となっている。それだけではなく、メタボは感染に対する抵抗力が低下する、癌や自己免疫疾患、認知症の発症リスクが高まるなど様々な異常をきたす。メタボに起因するこれらの体調の変化は、高齢者の特徴でもある。したがって、メタボが老化の徴候を加速させる「メタボ・エイジング」の可能性が指摘されてきた。飽和脂肪酸が豊富な高カロリー食が内臓脂肪組織の老化の徴候を加速させている仕組みを研究していたところ、肥満マウスの内臓脂肪組織中に若いマウスが本来もつはずのない、高齢マウスに出現する老化関連 Tリンパ球と極めて良く似た特徴を持つ細胞集団が激増していることを発見した。この細胞は大量のオステオポンチンの分泌を介して内臓脂肪の炎症を慢性化させる「悪の指揮者」としての役割を果たしていることを明らかにした(J Clin Invest, 2016: 126: 4626-4639, PLoS One. 2017)。この発見は、内臓脂肪型肥満が引き起こす症状や病気をくいとするための治療法開発の道が見えてきたことを意味する。その治療法では、「老化した T細胞を作らせない、あるいは、体内から排除すること」がポイントになる。ヒトでも同様の仕組みがあれば、メタボだけでなく高齢者の免疫異常を制御して、健康長寿の実現に貢献できることが期待される。

2. 研究の目的

加齢と内臓肥満は、ともに「免疫老化」、すなわち、獲得免疫機能の異常、炎症性素因の増大を引き起こす。免疫老化は「老化関連 T細胞」という共通した細胞群の蓄積が原因となっている。加齢に伴う老化関連 T細胞の出現には、長い年月にわたる T細胞の恒常性増殖に伴う複製老化が関与していると考えられる。一方で、内臓肥満に伴う老化関連 T細胞は、高脂肪食負荷後わずか 2 週間で観察されることから、その出現にはストレス誘発性早期老化が関与していると考えられる。本研究では、食餌内容を変えることによって変化する腸内細菌叢、腸内代謝産物、腸管の炎症、内臓脂肪組織の代謝産物に焦点を当て、高脂肪食が T細胞を老化させる原因物質の同定を進める。また、老化関連 T細胞に特異的に発現している分子 CD153 に着目して、その機能を明らかにすることによって、その排除法を開発する。

3. 研究の方法

(1) 飽和脂肪酸(ラード)豊富な高脂肪食負荷によって内臓脂肪組織で老化関連 Tリンパ球が出現する分子機序を解明する。

加齢に伴うリンパ節や脾臓における T 細胞老化の機序は、T 細胞の数を一定に保つための恒常性増殖に伴う複製老化によると考えられる。一方で、飽和脂肪酸（ラード）豊富な高脂肪食負荷に伴い内臓脂肪組織に出現する老化関連 T 細胞は、高脂肪食負荷 2 週間後と短期間で出現していることから、ストレス誘発性早期老化である可能性が示唆される。我々は、脂肪、炭水化物、蛋白質の比率は変えずに、脂肪の成分をラード主体としている従来型の高脂肪食（飽和脂肪酸豊富な高脂肪食）と脂肪の成分をオリーブオイル主体とした高脂肪食（単価不飽和脂肪酸豊富な高脂肪食）をマウスに与えた。その結果、同程度の内臓脂肪肥満をおこしたにもかかわらず、老化関連 T リンパ球の出現やオステオポンチンの血液中濃度、全身のインスリン抵抗性、心臓の肥大や線維化、拡張機能に大きな差を認めることを見出した（論文投稿中）。そこで、本研究では、これら脂肪酸の質の異なった 2 種類の高脂肪食によって誘発された肥満マウスを用いて、それらの腸内細菌叢、腸内代謝産物、腸管の炎症、透過性、内臓脂肪組織中の代謝産物の相違点を網羅的に解析し、老化関連 T リンパ球の出現と関連する分子や代謝産物の同定をめざす。

（２）老化関連 T リンパ球を除去することによって、内臓脂肪肥満に伴う内臓脂肪組織の慢性炎症、全身のインスリン抵抗性、高オステオポンチン血症を是正できるか否かを検証する。

（１）の分子機序が明らかになれば、食事内容を変容させる、腸内細菌叢のバランスを改善させることによって老化関連 T リンパ球の出現を制御することが可能となる。（２）では、既に存在する老化関連 T リンパ球を除去する方法の確立をめざす。老化関連 T リンパ球の細胞表面には CD153 が発現している。老化関連 T リンパ球の CD153 の発現量とオステオポンチンの発現量には正の相関を認めることから、CD153 は PD-1 陽性 T リンパ球集団から老化関連 T リンパ球を識別するマーカーだけでなく、老化関連 T リンパ球の機能においても重要な役割を果たしていることになる。

また、CD153 に対するある種の抗体が、老化関連 T リンパ球にアポトーシスを誘発することを京都大学の研究グループが確認している。申請者はすでに CD153 ノックアウトマウスを入手、繁殖している。CD153 ノックアウトマウスと野性型マウスに高脂肪食を負荷し、内臓脂肪の慢性炎症、老化関連 T リンパ球の出現、血液中オステオポンチン濃度の変化、糖代謝異常を比較検討する。

４．研究成果

「炎症」が老化の一因ではないかということが分かってきた。したがって、抗老化薬のターゲットの一つとして炎症を抑制することが考えられているが、加齢に伴い体中に炎症を起こやすくする仕組みが解明されていないために、現在のところ成功していない。オステオポンチンは、細胞外マトリックス蛋白として骨を作るだけでなく、サイトカインとして、免疫系に広く作用して損傷治癒、外部から侵入する細菌の排除にも必要な蛋白質として知られている。しかし、最近の疫学的研究、動物実験からオステオポンチンが過剰に分泌されると、体中に炎症を起こしやすくなり、老化が早く進むことが示されてきた。この OPN を産生して細胞として「老化関連 T リンパ球」に注目した。

まず、最初に、我々は、既に存在する老化関連 T リンパ球を除去する方法の確立をめざした。老化関連 T リンパ球の細胞表面には CD153 が発現している。老化関連 T リンパ球の CD153 の発現量とオステオポンチンの発現量には正の相関を認めることから、CD153 は PD-1 陽性 T リンパ球集団から老化関連 T リンパ球を識別するマーカーだけでなく、老化関連 T リンパ球の機能においても重要な役割を果たしていることになる。また、CD153 に対するある種の抗体が、老化関連 T リンパ球にアポトーシスを誘発することを京都大学の研究グループが確認している。そこ

で、CD153 ノックアウトマウスと野性型マウスに高脂肪食を負荷し、内臓脂肪の慢性炎症、老化関連 T リンパ球の出現、血液中オステオポンチン濃度の変化、糖代謝異常を比較検討した。しかし、残念ながら高脂肪食を負荷すると CD153 ノックアウトマウスでも野性型マウスと同様に老化関連 T リンパ球が出現して、血液中オステオポンチン濃度が上昇するという結果となった。

そこで、次に、免疫系の細胞でオステオポンチンの転写活性が誘導される機序に関して検討を進めることとした。オステオポンチンは、強力な炎症、線維化誘導物質であり、組織のリモデリングを活性化させるため、定常状態では発現レベルが低く抑えられている。組織に障害が加わった場合、局所でオステオポンチンの転写活性が数千倍に高まり、損傷治癒に働く。この場合、損傷治癒過程が完了するとオステオポンチンの転写活性化も終息する。一方、肥満した内臓脂肪組織における慢性炎症の場合のように、組織の障害(炎症)が低レベルであっても慢性的に継続する場合、オステオポンチンの転写活性化も持続して、これが臓器の病的リモデリングを引き起こして臓器を機能不全に導く。我々は、臓器によってオステオポンチンの産生細胞が異なることに注目した。内臓脂肪組織では、CD4 T 細胞のサブセット(CD153+ PD-1hi memory phenotype CD4 T cells)が主要なオステオポンチンの産生源であったが、心筋梗塞巣では骨髄由来の単球から分化した CD206+マクロファージが主要なオステオポンチンの産生源であった。また、腎臓では虚血再灌流障害時、片側尿細管結紮時においては、近位尿細管上皮細胞がオステオポンチンの産生源であった。そこで、我々は、心臓、腎臓の障害時におけるオステオポンチンの転写活性化の機序を解明することを試みた。その結果、心筋梗塞後には、梗塞巣に浸潤して来た単球が、IL-10/macrophage colony stimulating factor の刺激で活性化された STAT3 と ERK が galectin-3 と MerTK の発現を誘導し、これらがすべて、オステオポンチンの転写活性化に寄与していることを証明した(Shirakawa, Sano, et al. Circulation 2018, J Am Heart Assoc. 2020)。また、腎臓では、近位尿細管上皮細胞で解糖経路が異常に活性化されること、特に、解糖経路の側副路である myo-inositol oxygenase 経路の活性化がオステオポンチンの転写活性化に寄与していることを明らかとした(Shirakawa, Sano, Int J Mol Sci. 2020)。

本科学研究費での研究成果は、臓器線維化を進行させる原因物質であり、かつ、臓器機能低下の予測因子であるオステオポンチン遺伝子(Spp1)の転写活性化を指標として、腎臓や肺の間質線維化にかかわるオステオポンチンの主たる産生細胞を同定して、OPN の産生亢進に至る機序の解明を介して、腎、肺機能低下を予防する治療法の開発をめざす研究へと発展を遂げている。オステオポンチンの遺伝子 Spp1 の転写活性を "in situ" でモニタリングできる "Spp-1-GFP-ノックインマウス" を使って、「免疫学的手法」と「生化学的手法」を駆使して、複雑な微小構造を形成する細胞集団の中で、主体的に臓器線維化にかかわる OPN 産生細胞を同定し、Spp-1 の転写活性化にいたる分化機構、細胞内代謝リモデリング機構の解析から線維化制御方法を探索するという点で独自性が高い。

一方で、内臓脂肪組織中の CD4 T リンパ球が内臓脂肪肥満に伴って細胞老化を起こす機序に関しては予想通りに研究が進まなかった。同じ内臓脂肪肥満でも単価不飽和脂肪酸のオレイン酸では CD4 T リンパ球の細胞老化を引き起こさなかった。我々は、脂肪酸の質の違いによって細胞の小胞体に与えるストレスが異なることを報告している (Yamamoto, Sano, et al. PLoS One. 2018, J Mol Cell Cardiol. 2019, Biochem Biophys Res Commun. 2020)。B 細胞を除去する、TLR7 のノックアウトでは CD4 T リンパ球の細胞老化が起こりにくいことを見出しているが核心に迫る研究成果を得られることが出来なかった。この課題に関しては現在もなお引きつづき検討を続けている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Yamamoto Tsunehisa, Endo Jin, Kataoka Masaharu, Matsuhashi Tomohiro, Katsumata Yoshinori, Shirakawa Kohsuke, Isobe Sarasa, Moriyama Hidenori, Goto Shinichi, Shimanaka Yuta, Kono Nozomu, Arai Hiroyuki, Shinmura Ken, Fukuda Keiichi, Sano Motoaki	4. 巻 Volume 526, Issue 1
2. 論文標題 Palmitate induces cardiomyocyte death via inositol requiring enzyme-1 (IRE1)-mediated signaling independent of X-box binding protein 1 (XBP1)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 122-127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.03.027	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 -

1. 著者名 Yoshida Naohiro, Endo Jin, Kinouchi Kenichiro, Kitakata Hiroki, Moriyama Hidenori, Kataoka Masaharu, Yamamoto Tsunehisa, Shirakawa Kohsuke, Morimoto Satoshi, Nishiyama Akira, Hashiguchi Akihiro, Higuchi Itsuro, Fukuda Keiichi, Ichihara Atsuhiko, Sano Motoaki	4. 巻 Volume18, Issue5
2. 論文標題 (Pro)renin receptor accelerates development of sarcopenia via activation of Wnt/YAP signaling axis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Aging Cell	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) 10.1111/accel.12991	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 -

1. 著者名 Isobe Sarasa, Kataoka Masaharu, Endo Jin, Moriyama Hidenori, Okazaki Shogo, Tsuchihashi Kenji, Katsumata Yoshinori, Yamamoto Tsunehisa, Shirakawa Kohsuke, Yoshida Naohiro, Shimoda Masayuki, Chiba Tomohiro, Masuko Takashi, Hakamata Yoji, Kobayashi Eiji, Saya Hideyuki, Fukuda Keiichi, Sano Motoaki	4. 巻 Volume61, Issue3
2. 論文標題 Endothelial-Mesenchymal Transition Drives Expression of CD44 Variant and xCT in Pulmonary Hypertension	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 367-379
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1165/rcmb.2018-02310C	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 -

1. 著者名 Shirakawa Kohsuke, Yano Wataru, Inoue Keisuke, Katsumata Yoshinori, Endo Jin, Sano Motoaki	4. 巻 14
2. 論文標題 Influence of long term administration of tofogliflozin on chronic inflammation of visceral adipose tissue in mice with obesity induced by a high-fat diet	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	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) 10.1371/journal.pone.0211387	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 -

1. 著者名 Yamamoto Tsunehisa, Endo Jin, Kataoka Masaharu, Matsuhashi Tomohiro, Katsumata Yoshinori, Shirakawa Kohsuke, Yoshida Naohiro, Isobe Sarasa, Moriyama Hidenori, Goto Shinichi, Yamashita Kaoru, Nakanishi Hiroki, Shimanaka Yuta, Kono Nozomu, Shinmura Ken, Arai Hiroyuki, Fukuda Keiichi, Sano Motoaki	4. 巻 13
2. 論文標題 Decrease in membrane phospholipids unsaturation correlates with myocardial diastolic dysfunction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	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) 10.1371/journal.pone.0208396	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 -

1. 著者名 Shirakawa Kohsuke, Endo Jin, Kataoka Masaharu, Katsumata Yoshinori, Yoshida Naohiro, Yamamoto Tsunehisa, Isobe Sarasa, Moriyama Hidenori, Goto Shinichi, Kitakata Hiroki, Hiraide Takahiro, Fukuda Keiichi, Sano Motoaki	4. 巻 138
2. 論文標題 IL (Interleukin)-10-STAT3-Galectin-3 Axis Is Essential for Osteopontin-Producing Reparative Macrophage Polarization After Myocardial Infarction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Circulation	6. 最初と最後の頁 2021 ~ 2035
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.035047	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10件 (うち招待講演 9件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Motoaki Sano
2. 発表標題 Obesity-related immune senescence and cardiomyopathy
3. 学会等名 Basic Cardiovascular Sciences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐野元昭
2. 発表標題 急性大動脈解離へ発症後の血管炎症のメカニズム
3. 学会等名 第60回日本脈管学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐野元昭
2. 発表標題 睡眠障害が骨髄のマクロファージの分化・増殖のダイナミズムを修飾して動脈硬化を促進させる機序について
3. 学会等名 第29回日本循環薬理学会・第55回高血圧関連疾患モデル学会合同学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐野元昭
2. 発表標題 非糖尿病専門医がすべき糖尿病診療
3. 学会等名 第67回日本心臓病学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐野元昭
2. 発表標題 骨髄由来の単球がオステオポンチン産生マクロファージへと分化して心筋梗塞による創傷を治癒する機序
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐野元昭
2. 発表標題 栄養エネルギー代謝から考える心不全
3. 学会等名 東京都内科医会 第32回医学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐野元昭
2. 発表標題 肥満と心不全
3. 学会等名 第19回日本抗加齢医学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐野元昭
2. 発表標題 代謝と分子機序を考慮した心血管病治療Cardiac Lipotoxicity
3. 学会等名 第22回 心不全学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐野元昭
2. 発表標題 脂質異常症と心臓病
3. 学会等名 第29回 炎症と循環器疾患研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐野元昭
2. 発表標題 内臓脂肪型肥満による免疫老化の怖さ
3. 学会等名 第4回 Mets associated cancer 研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 新村健, 佐野元昭	4. 発行年 2019年
2. 出版社 メディカルレビュー社	5. 総ページ数 120
3. 書名 アンチ・エイジング医学15巻5号	

1. 著者名 佐野元昭 山本恒久 遠藤仁	4. 発行年 2019年
2. 出版社 南山堂	5. 総ページ数 210
3. 書名 Cutting Edge of Molecular Cardiology 新しい臨床を開拓するための分子循環器病学	

1. 著者名 佐野元昭	4. 発行年 2018年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 302
3. 書名 医学のあゆみ 心不全のすべて 分子生物学から緩和ケアまで:beyondガイドライン	

〔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
---------	---------