

令和 5 年 6 月 9 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：2019～2022

課題番号：19K23862

研究課題名（和文）胸腺退縮に伴うT細胞ミトコンドリア障害のメカニズムと機能的意義の解明

研究課題名（英文）Exploring mechanism and functional significance of T-cell mitochondrial dysfunction induced by thymic involution

研究代表者

城 憲秀 (JO, Norihide)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：50849552

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：胸腺摘出マウス(ATx)由来T細胞においてMitoTracker染色性が低下するという予備的結果をもとに本研究を開始した。しかし、電子顕微鏡などの追加解析ではATx由来T細胞のミトコンドリア障害を確認できなかった。原因を探る過程で、ATx由来T細胞でMDR1遺伝子が高発現していることが判明し、MDR1阻害剤でATx由来T細胞を処理するとMitoTracker染色性低下がキャンセルされた。以上の結果より当初の仮説は否定されたが、一方でT細胞老化におけるMDR1の重要性を新たに示唆した。MDR1欠損マウス由来のT細胞は、サイトカイン無添加の培養で生存率が低下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

獲得免疫の中心的役割を担うT細胞の産生臓器「胸腺」は思春期以降退縮する。しかし、未梢性T細胞が緩やかに自己複製・増殖することでT細胞産生低下を代償するために、高齢になっても全身のT細胞プールは維持される。申請者はこのT細胞の生存・維持において重要な役割を果たす分子機構について研究を実施した。研究期間終了までに最終的な結論を示すことはできなかったが、今後も継続して研究を進展させていくことで、T細胞の生存・維持だけでなく、癌や感染症などの加齢関連疾患の原因となる「T細胞老化」に新たな知見を加えると期待する。

研究成果の概要（英文）：This study started based on preliminary results of decreased MitoTracker staining in T cells from adult-thymectomized mice (ATx). However, additional analyzes such as electron microscopy failed to demonstrate mitochondrial dysfunction in ATx-derived T cells. While searching for responsible factors, we found that the MDR1 gene was highly expressed in ATx-derived T cells, and an MDR1 inhibitor canceled the reduced MitoTracker staining of ATx-derived T cells. These results disproved the initial hypothesis, but newly suggested the importance of MDR1 in T-cell senescence. T cells derived from MDR1-deficient mice showed decreased survival in cytokine-free cultures.

研究分野：免疫学

キーワード：T細胞 ミトコンドリア 胸腺退縮 恒常性増殖 代謝 MDR1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

獲得免疫の中心的役割を担う T 細胞の産生臓器「胸腺」は、思春期以降退縮する。そのため、新たな T 細胞産生は一生涯の早期から低下するが、末梢性 T 細胞が感染非依存性に緩やかに自己複製・増殖する（恒常性増殖）ことで T 細胞産生低下を代償するために、高齢になっても T 細胞プールは維持される。しかし、長期間にわたる末梢組織で維持される過程で、末梢 T 細胞は加齢の影響を受けやすく、増殖能低下・炎症性サイトカイン産生能の上昇など様々な機能的変容を来す。重要なことに、この「T 細胞老化」が多くの加齢関連疾患の基礎をなすことが近年明らかになってきた。申請者は、若齢マウスの胸腺を外科的に摘出して、末梢性 T 細胞の恒常性増殖を促進させるモデルを解析し、T 細胞のミトコンドリア量と膜電位が低下する可能性を示唆する予備データを得た。

2. 研究の目的

(1) 恒常性増殖が T 細胞のミトコンドリア障害を誘導することの証明及びそのメカニズム解明
研究開始時には「恒常性増殖が T 細胞のミトコンドリア障害を誘導する」という仮説は MitoTracker というミトコンドリア量と膜電位を定量するプローブを用いて得られた予備データのみに基づいていた。したがって、電子顕微鏡、細胞外フラックスアナライザー、ミトコンドリア膜定量、RNA-seq などの他の解析手法を用いて、胸腺摘出マウスの T 細胞のミトコンドリアが障害されていることを証明する。また、ミトコンドリア障害の性質と分子メカニズムについて明らかにする。

(2) ミトコンドリア機能の変化が T 細胞老化の機能的特徴に果たす役割

ミトコンドリア障害を生じた T 細胞においては、代謝障害やアポトーシス、カルシウム貯蔵などに異常をきたすことが想定される。T 細胞は獲得免疫系の中心的役割を果たす細胞であるために、これらの異常が生じた場合には T 細胞老化の形質を示す可能性がある。末梢プール・レパトア多様性の維持、エフェクター機能（増殖、サイトカイン分泌能）、自己応答性などを解析し、ミトコンドリア障害が T 細胞機能に与える影響について明らかにする。

(3) ミトコンドリア機能回復により T 細胞老化を正常化する介入法の探索

上記(1)(2)の計画が進捗し、ミトコンドリア障害のメカニズムと T 細胞に及ぼす影響の知見が得られた場合には、それらを回復させることで T 細胞老化を正常化する介入法を探索する。

3. 研究の方法

(1) 胸腺退縮モデルとして、8 週齢の野生型 C57BL/6 マウスに胸腺摘出術を施行した（Adult-thymectomized, ATx）。コントロールとしては、開胸のみで胸腺は摘出しないマウス（Sham-operated, STx）を用いた。野生型 T 細胞の平均寿命は 1-2 ヶ月であるために、胸腺摘出後 3-4 ヶ月を開け、末梢組織において長く生存した T 細胞の形質を評価できるようにした。ATx 及び STx 由来の脾臓 T 細胞を単離し、CD4 及び CD8 陽性のナイーブ、メモリー分画ごとに比較・解析を行った。ナイーブ脾臓から摘出した T

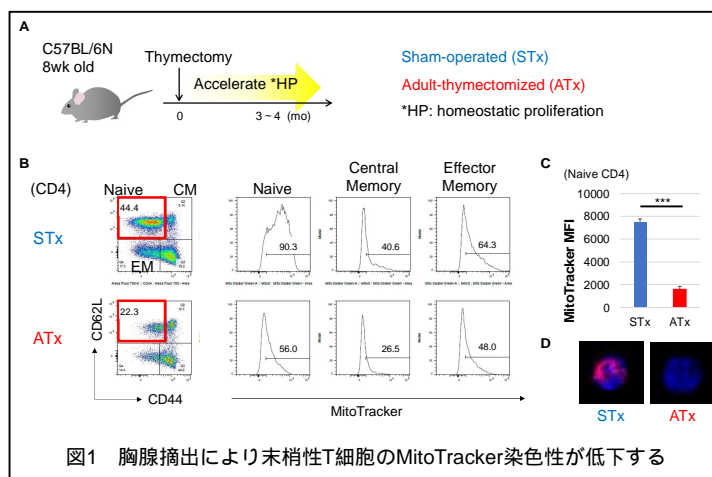


図1 胸腺摘出により末梢性T細胞のMitoTracker染色性が低下する

細胞を MitoTracker® Green FM, MitoTracker® Orange CMTMRos, CellROX®などのプローブを添加した培地で培養し、フローサイトメトリーでシグナルを検出することでミトコンドリア量や膜電位を用いて測定した。電子顕微鏡を用いて、ミトコンドリア形態、面積、周長を測定した。ミトコンドリア外膜及び内膜由来タンパクである TOMM20 及び AIF を蛍光免疫染色法にて定量した。主要なエネルギー代謝経路であるミトコンドリアによる好気呼吸及び解糖の状態をリアルタイムに解析するために、細胞外フラックスアナライザー XF Pro (Seahorse) を用いた。網羅的発現プロファイルをするために、ATx 及び STx 由来の脾臓 T 細胞を単離し、CD4 及び CD8 陽性のナイーブ、メモリー分画の RNA-sequencing を行った。ATx 及び STx 両群マウスの脾臓やリンパ節における T 細胞、CD4/8 比、ナイーブ、メモリー分画の細胞数を定量し、胸腺摘出によるミトコンドリア障害が T 細胞生存に与える影響を評価する。また、BrdU 投与や Ki-67 染色を行い、恒常性増殖の程度を評価する。エフェクター機能評価のために、単離した T 細胞を古典的な抗 CD3 抗体で刺激し、CellTraceViolet 試薬で増殖能を測定したり、細胞内サイトカイン染色を用いてサイトカイン分泌能を解析する。申請者が従事する研究室でこれまでに

同定してきた老化関連 T 細胞 (CD4+, PD-1+, CD153+, Proc Natl Acad Sci USA. 2009;106:15807-12.)を解析する。ミトコンドリア障害はヘルパーT 細胞の分化偏向をきたすという報告もあることから、ナイーブ CD4 T 細胞からヘルパーT 細胞への分化誘導を行い、Th1/2/17/Treg 分化バイアスの有無を確認する。In vivo での免疫応答をみるためには OVA 特異的 TCR トランスジェニックマウス (OT-II)を胸腺摘出後に OVA 抗原を投与し、誘導された活性化 T 細胞の定量、サイトカイン分泌、組織分布の特徴 (腸管や皮膚への指向性など)を評価する。

4. 研究成果

(1) 胸腺摘出マウスの末梢性 CD4 陽性 T 細胞で MitoTracker 染色性が低下する
胸腺退縮が末梢性 T 細胞に与える影響を調べるために、8 週齢の野生型 C57BL/6 マウスに胸腺摘出術を施行し、3-4 ヶ月後の脾臓 T 細胞の様々な形質について解析を実施した (図 1A)。中でも、MitoTracker 染色性が ATx 由来 T 細胞で有意に低下していることがわかった (図 1B-D)。申請者は、この知見を元に「胸腺退縮に伴って末梢性 T 細胞がミトコンドリア障害をきたす」という仮説を立てて本研究を開始した。

(2) 胸腺摘出マウスの末梢性 T 細胞でミトコンドリア障害は生じていない
電子顕微鏡によるミトコンドリア形態観察及び定量、蛍光免疫染色法によるミトコンドリア由来タンパク定量、細胞外フラックスアナライザーによる好気呼吸及び解糖系のリアルタイム測定、網羅的発現プロファイルのための RNA-sequencing を実施したが、いずれのアッセイにおいてもミトコンドリア量及び機能が低下していることを支持するデータは得られなかった (未掲載)。

(3) T 細胞において MitoTracker は Multidrug resistance 1 (MDR1)の基質である
網羅的遺伝子発現解析から候補因子を探索する中で、MDR1 遺伝子が ATx 由来 T 細胞で高発現していることが判明し、ミトコンドリア膜電位プローブを細胞外に排出している可能性が示唆された。他の細胞種では MitoTracker は Multidrug resistance 1 (MDR1)の基質であるという報告を確認した。実際に MDR1 阻害剤で ATx 由来 T 細胞を処理すると、ミトコンドリア膜電位プローブの染色性低下がキャンセルされた (図 2)。さらには MDR1 KO マウス作製に成功し、MDR1 KO マウス由来の T 細胞で MitoTracker 染色性が強いこと確認し、T 細胞においても MitoTracker が MDR1 の基質であることを証明した。以上の結果は、研究開始当初の仮説を否定することとなったが、一方では胸腺退縮後の末梢性 T 細胞の生存・維持における MDR1 の重要性を新たに示唆した。

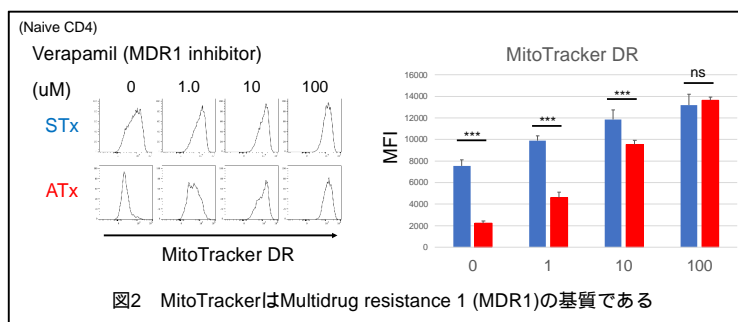


図2 MitoTrackerはMultidrug resistance 1 (MDR1)の基質である

(4) MDR1 KO マウスの T 細胞は、サイトカイン無添加の培養で生存率が低下する
MDR1 の T 細胞生存における機能的意義を検証するために、MDR1 KO マウス由来の T 細胞を *in vitro* 培養し、生存率を比較した。IL-7 や IL-15 などの T 細胞生存に重要であるサイトカインを添加しない培地で培養した場合に、野生型 T 細胞と比較して生存率が有意に低下した。この結果は、MDR1 が機能的に T 細胞の生存延長に寄与していることを支持した。一方で、サイトカインを添加して培養したり、MDR1 KO マウスに胸腺摘出術を施行した場合には、末梢性 T 細胞の生存率低下は認められなかった。

(5) 本研究のまとめ、今後の課題
以上のように、本研究では胸腺退縮 (摘出) に伴う末梢性 T 細胞ミトコンドリア障害という仮説から、途中で MDR1 に標的を切り替えて研究を継続した。研究終了までに加齢に伴う胸腺摘出後の末梢性 T 細胞で MDR1 が高発現する意義は十分に明らかにできなかった。しかし、ミトコンドリア障害という仮説が間違いであることを証明し、当初観察していた現象が MDR1 という分子によることを明らかにしたことは、新たな研究を展開させる機会となった。今後は、サイトカイン無添加の条件で生存率が有意に低下するメカニズム、高脂肪食や抗がん剤等の負荷を与えた場合の T 細胞生存における MDR1 の役割、ヒト T 細胞における MDR1 など、新たに生じた課題点について更に研究を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Jo Norihide, Zhang Rui, Ueno Hideki, Yamamoto Takuya, Weiskopf Daniela, Nagao Miki, Yamanaka Shinya, Hamazaki Yoko	4. 巻 2
2. 論文標題 Aging and CMV Infection Affect Pre-existing SARS-CoV-2-Reactive CD8+ T Cells in Unexposed Individuals	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Aging	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fragi.2021.719342	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2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 城 憲秀、濱崎 洋子
2. 発表標題 ヒトT細胞の加齢変化とその意義 - COVID-19研究から得られた知見と共に
3. 学会等名 第21回日本抗加齢医学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jo Norihide, Hamazaki Yoko
2. 発表標題 Aging and CMV Infection Affect Pre-existing SARS-CoV-2-Reactive CD8+ T Cells in Unexposed Individuals
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 城 憲秀、濱崎 洋子	4. 発行年 2021年
2. 出版社 ライフ・サイエンス	5. 総ページ数 6
3. 書名 Geriatric Medicine（老年医学） 59（7） 677-682, 2021.	

〔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
---------	---------