

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04825

研究課題名(和文) 加齢とメタボリックシンドロームに伴う心血管障害に共通の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular basis common to cardiovascular disorders associated with aging and metabolic syndrome

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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：肥満が見ただけでなく内臓の老化を加速させるメカニズムを解明した。高脂肪食負荷マウスの内臓脂肪でCD4⁺T細胞の一部(CD44^{hi}CD62L^{lo}CD4⁺T細胞)が、本来加齢マウスで出現する細胞老化の性質を獲得すること、この細胞老化がB細胞依存的に起こること、さらに、Senescence associated secretory phenotype (SASP)としてのオステオポンチンの大量分泌を介して、内臓脂肪組織の慢性炎症と全身のインスリン抵抗性に関与していることを発見した。今後、老化したTリンパ球集団を標的とした生活習慣病の発症予防をめざす治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Chronic inflammation in visceral adipose tissue (VAT) precipitates the development of cardiometabolic disorders. Here, we have determined that a high-fat diet (HFD) caused a preferential increase and accumulation of CD44^{hi}CD62L^{lo}CD4⁺T cells that constitutively express PD-1 and CD153 in VAT. These cells possessed characteristics of cellular senescence and produced large amounts of osteopontin (OPN) in a PD-1-resistant manner. The features of these T cells were highly reminiscent of senescence-associated CD4⁺T cells that normally increase with age. Adoptive transfer of CD153⁺PD-1⁺CD44^{hi}CD4⁺T cells from HFD-fed WT, but not Spp1-deficient, mice into the VAT of lean mice fed a normal diet recapitulated the essential features of VAT inflammation and insulin resistance. Our results demonstrate that a distinct CD153⁺PD-1⁺CD44^{hi}CD4⁺T cell population causes VAT inflammation by producing large amounts of OPN. This finding suggests a link between visceral adiposity and immune aging.

研究分野：内科学、循環器、心臓

キーワード：免疫老化 肥満 T細胞 マクロファージ 高脂肪食 内臓脂肪 B細胞 養子免疫細胞移入

1. 研究開始当初の背景

京都大学の湊長博教授らは、CD4+ T 細胞の加齢に伴う機能異常は、CD4+ 記憶型 T 細胞集団の全体的な機能低下ではなくて、CD4+ 記憶型 T 細胞集団の中に Programmed cell death-1 (PD-1) を発現する特殊な細胞集団が出現することに起因することを提唱した。この特殊な T 細胞集団は、抗原受容体を介する増殖や免疫サイトカイン産生などの獲得免疫機能を示さないが、恒常性維持増殖能をもち、オステオポンチンなどの炎症性サイトカインを産生するなど senescence-associated secretory phenotype (SASP) の特徴を保有していることから、senescence-associated T cell (加齢随伴記憶型 T 細胞) と命名された。この老化随伴 T 細胞の出現は、老化マウスだけでなく、悪性疾患や全身性自己免疫性疾患の発症にも深く関与していることを報告している (Proc Natl Acad Sci U S A. 2009)。

我々は、加齢マウスにおいて、加齢随伴記憶型 T 細胞が、2 次リンパ組織である脾臓だけでなく、内臓脂肪組織中にも出現していること、寿命の延長効果が認められるカロリー制限をしたマウスでは、脾臓、内臓脂肪組織中のこの特殊な T 細胞集団の出現が抑制されることを見出した。若いマウスから取り出した正常 T 細胞集団をラベルした後、加齢マウスに投与すると、短い期間で、加齢マウスにおいて出現する特殊な T 細胞集団に変化することから、ある種の環境因子が、T 細胞老化を加速する可能性を示唆された。また、抗体を用いてこの特殊な T 細胞集団を除去すると加齢マウスの体重や、食欲には影響を与えずに、インスリン抵抗性を改善することを見出した。この結果は、免疫老化を抑制することで加齢に伴う慢性疾患を制御することができるという可能性を示唆する。

心血管代謝疾患の発症は加齢とともに増加することが知られている。また、肥満を基盤とするメタボリックシンドロームの患者は心血管イベントを若くしては発症するリスクが高くなる。これは、加齢や代謝異常に反応して出現するヘテロな細胞集団の集団記憶 (臓器記憶) が、病態形成に深く関与していることを示唆する。申請者は、加齢や代謝異常を記憶する細胞集団として、加齢随伴記憶型 T 細胞に着目した。

2. 研究の目的

加齢に伴って急速に増加する加齢随伴記憶型 T 細胞集団は senescence-associated secretory phenotype を持ち、慢性炎症を基盤とした加齢関連疾患の発症に普遍的に関与していると考えられる。一方で、肥満、糖尿病は個体の老化を加速させることが知られているが、これらの患者ではより若年のうちから加齢随伴記憶型 T 細胞が増加する現象を見出した。本研究では、加齢と生活習慣病

が心血管病、糖尿病を引き起こす共通の分子基盤として、加齢随伴記憶型 T 細胞の出現に着目して、その増加が内臓脂肪組織のリモデリング、インスリン抵抗性に及ぼす影響について、加齢マウス、食餌誘導性肥満モデルマウスを駆使して解析する。最終的には、加齢随伴記憶型 T 細胞を制御することによって、糖尿病、動脈硬化を制御する技術基盤の開発を目標とする。

3. 研究の方法

我々は加齢に伴って出現し 2 次リンパ組織で急速に増加する加齢随伴記憶型 T 細胞が、加齢マウスや食餌誘導性肥満マウスの内臓脂肪組織中にも存在することを見出した。本研究では、加齢と生活習慣病が心血管病、糖尿病を引き起こす共通の分子基盤として、加齢随伴記憶型 T 細胞の出現に着目して、加齢随伴記憶型 T 細胞が誘導される機序やそのユニークな機能を明らかにして、加齢随伴記憶型 T 細胞の増加が内臓脂肪組織のリモデリング、インスリン抵抗性に及ぼす影響について、加齢マウス、食餌誘導性肥満モデルマウスを駆使して解析する。最終的には、加齢随伴記憶型 T 細胞を制御することによって、糖尿病、動脈硬化を制御する技術基盤の開発を目標とする。

(1) 高脂肪食を負荷したマウスの内臓脂肪組織を経時的に解析して、加齢随伴記憶型 T 細胞の局在や、他の免疫細胞との 4 次元的な連携 (時間空間的關係) を解析する。

(2) 食餌性肥満マウスの内臓脂肪から、加齢随伴記憶型 T 細胞を取り出して、抗原受容体刺激に対する増殖能、p21、DNA 障害マーカー γ -H2AX の発現の有無、免疫サイトカイン (T 細胞特異的なサイトカイン vs. オステオポンチンなどの骨髄系のサイトカイン) の産生を確認する。

(3) 抗体を用いて PD-1+加齢随伴記憶型 T 細胞を除去することによって、食餌性肥満マウスの内臓脂肪炎症、Crown-like structure の形成、インスリン抵抗性が改善するか否かを検討する。高脂肪食負荷直後から、抗体を投与した時に、内臓脂肪炎症、インスリン抵抗性の出現を抑制することができるか、検討する。

(4) 食餌誘発性肥満マウスの内臓脂肪から取り出した PD-1+加齢随伴記憶型 T 細胞を、通常食で飼育した非肥満マウスに adoptive transfer (細胞移入) することによって、脂肪組織の炎症、Crown-like structure の形成、インスリン抵抗性を惹起できるか否か、検討する。

(5) 食餌誘発性肥満マウスの内臓脂肪で、加齢随伴記憶型 T 細胞が出現する機序を明らかにする。まずは、若い非肥満マウスの脾臓から取り出した T 細胞を低酸素、アンジオテンシン II、活性酸素、パルミチン酸、AGE、各種向炎症性サイトカインなどのストレス下

で培養して、加齢随伴記憶型 T 細胞が出現する否か、検討する。これら、ストレス刺激で加齢随伴記憶型 T 細胞が出現しない場合は、加齢随伴記憶型 T 細胞の出現に自己抗原刺激による反復刺激が関与している可能性を考慮して、マクロファージや B 細胞など、抗原提示細胞と正常 T 細胞の共培養を試みる。clodronate liposomes を用いてマクロファージを除去したマウス、B 細胞のいないマウス (μ MT マウス) に高脂肪食負荷を行い、内臓脂肪における加齢随伴記憶型 T 細胞の出現の有無を確認する。

(6) これまで、加齢に伴う T 細胞老化の研究は、主として CD4+ T 細胞に関して研究が進められてきた。加齢マウスの脾臓中には、加齢随伴記憶型 T 細胞 [PD-1+ 免疫記憶形質 (memory phenotype: MP) CD4+ T cell] の増加が目立つが、PD-1+ MP CD8+ T cell の増加はわずかである。対照的に、食餌性肥満マウスの内臓脂肪中には、加齢随伴記憶型 T 細胞 PD-1+ MP CD4+ T cell と同程度に、PD-1+ MP CD8+ T cell が増加していることを発見した。食餌性肥満マウスの内臓脂肪から、PD-1+ MP CD8+ T cell を取り出して、抗原受容体を介する増殖能、p21、DNA 障害マーカー γ -H2AX、免疫サイトカインの産生に関して、老化随伴 CD4+ T 細胞 (PD-1+ MP CD4+ T cell) と比較検討する。PD-1+ MP CD4+ T cell と PD-1+ MP CD8+ T cell とマクロファージを共培養して、マクロファージの遊走能や、マクロファージにおける炎症性サイトカインの発現量に対する影響を比較検討する。

(7) 循環器病棟に入院してくる患者と年齢をマッチさせた人間ドック受診患者の血液中の老化随伴 T 細胞の数を比較検討し、加齢随伴記憶型 T 細胞の比率が高齢者の心血管リスク予測因子となりうるか検討する (倫理委員会承認済み: 承認番号 2014062、T リンパ球の免疫老化と加齢性疾患の相関の解析、承認日が 2014 年 7 月 2 日)。

(8) ナイブ CD4+T 細胞、記憶型 T 細胞 PD-1+ MP CD4+ T 細胞、加齢随伴記憶型 T 細胞 PD-1+ CD4+T 細胞を CD3/CD28/IL-12 で T 細胞を活性化した後、メタボローム解析を行い、それぞれの T 細胞サブセットに特異的な代謝経路を明らかにする。同時に、RNA Sequencing により、それぞれの細胞集団の mRNA や miRNA の配列を解読して、発現量の定量比較を行う。特に、代謝酵素遺伝子そのもの、代謝酵素遺伝子を制御する miRNA に注目する。T 細胞の代謝を修飾することによって、加齢随伴記憶型 T 細胞への終末分化を遅延、抑制する、あるいは、加齢随伴記憶型 T 細胞だけに選択的にアポトーシスを誘導する方法がないか、検討する。

4. 研究成果

(1) マウスの内臓脂肪組織中には、高脂肪食を負荷 2 週間後には加齢随伴記憶型 T 細胞が出現しており、時間経過とともに増加してい

った。加齢随伴記憶型 T 細胞は Crown-like structure 内にマクロファージなどの他の免疫細胞とともに局在していた。

(2) 加齢随伴記憶型 T 細胞は、抗原受容体刺激に対する増殖能が弱く、p21、DNA 障害マーカー γ -H2AX を発現、T 細胞特異的なサイトカインの発現は低下、代わりにオステオポンを大量に分泌していた。

(3) 抗体を用いて PD-1+加齢随伴記憶型 T 細胞を除去することによって、食餌性肥満マウスの内臓脂肪炎症、Crown-like structure の形成、インスリン抵抗性が改善した。

(4) 食餌誘発性肥満マウスの内臓脂肪から取り出した PD-1+加齢随伴記憶型 T 細胞を、通常食で飼育した非肥満マウスに adoptive transfer (細胞移入) することによって、脂肪組織の炎症、Crown-like structure の形成インスリン抵抗性を再現できた。

(5) 食餌誘発性肥満マウスの内臓脂肪で、加齢随伴記憶型 T 細胞が出現する機序に関しては、B 細胞がおそらく抗原提示細胞として加齢随伴記憶型 T 細胞が出現に必須であることは確認できたが、抗原そのものの同定にはいたらなかった。

(6) PD-1+ MP CD8+ T cell も食餌誘発性肥満マウスの内臓脂肪で経時的に増加していた。ただし、PD-1+ MP CD4+ T cell 集団の中で、細胞老化した細胞に特異的に発現している CD153 は PD-1+ MP CD8+ T cell には発現しておらず、PD-1+ MP CD8+ T cell 集団の中で細胞老化した細胞に特異的に発現している細胞表現タンパクの同定が今後の課題である。

(7) 新たに倫理委員会で承認をいただいたあと、心臓血管外科手術時に心外膜脂肪をもらい検討した結果、心臓血管外科手術を受ける患者の心外膜脂肪中にも CD153+PD-1+ MP CD4+ T cell が存在していることが分かった。ただし、T リンパ球の免疫老化と加齢性疾患の相関の解析までには至らなかった。心外膜脂肪と隣接する冠動脈疾患、あるいは、心臓リモデリングとの関連は、動物実験、臨床研究共に今後の検討課題としたい。

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 2 件)

(1) Shirakawa K, Endo J, Katsumata Y, Yamamoto T, Kataoka M, Isobe S, Yoshida N, Fukuda K, Sano M. Negative legacy of obesity. *PLoS One*. 2017 Oct 26;12(10):e0186303.doi: 10.1371/journal.pone.0186303. eCollection 2017. 査読あり

(2) Shirakawa K, Yan X, Shinmura K, Endo J, Kataoka M, Katsumata Y, Yamamoto T, Anzai A, Isobe S, Yoshida N, Itoh H, Manabe I, Sekai M, Hamazaki Y, Fukuda

K, Minato N, Sano M. Obesity accelerates T cell senescence in murine visceral adipose tissue. J Clin Invest. 2016 Dec 1;126(12):4626-4639. doi: 10.1172/JCI88606. Epub 2016 Nov 7. 査読あり

〔学会発表〕(計 5 件)

(1)佐野元昭 2017年 第81回日本循環器病学会学術集会 Diabetes and Heart Failure—From Clinical and Basic Research Point of View—AHA-JCS Joint symposium

(2)佐野元昭 2016年 第39回分子生物学会 臓器老化による臓器間ネットワークの破綻を探る—免疫老化と肥満関連疾患—

(3)佐野元昭 2016年 The 2nd IMCR Symposium on Endocrine and Metabolism: International Frontier in Homeostatic Regulation Research. Visceral obesity and T cell senescence

(4)佐野元昭 2016年 第80回日本循環器病学会学術集会 Functional importance of immune cells in the hear-T cell senescence & cardiovascular-metabolic disease

(5)佐野元昭 2016年 第80回日本循環器病学会学術集会 Molecular mechanism of obesity/T2DM-associated cardiomyopathy—AHA-JCS Joint symposium—from the point of view of T cell senescence—AHA-JCS Joint Symposium

〔図書〕(計 4 件)

(1)佐野元昭 臓器の記憶と血管代謝ニッシエ
心臓ストレス記憶形成機構と心不全への分子機序
メディカルレビュー社, 16 (4), 339-344, 2015

(2)白川公亮, 佐野元昭 内臓脂肪の慢性炎症を惹起するヘルパーCD4 T細胞とB細胞の役割
代謝調節における免疫細胞の役割
医師薬出版株式会社, 医学のあゆみ 257(6), 673-679, 2016

(3)佐野元昭 肥満糖尿病におけるCD4 T細胞とB細胞の役割
臓器連関による代謝制御を中心とした恒常性維持と生活習慣病
科学評論社, 内分泌・糖尿病・代謝内科 42(5), 342-345, 2016

(4)佐野元昭 老化制御と循環器疾患
老化制御と疾患
日本臨床社, 74(9), 1508-1512, 2016

○出願状況 (計 1 件)

名称: 加齢又は肥満に伴う慢性炎症の抑制剤、加齢又は肥満に伴う慢性炎症に関連する疾患の治療剤又は予防剤、罹患可能性評価装置及びスクリーニング方法
発明者: 佐野 元昭、新村 健

権利者: 学校法人慶應義塾
種類: 出願審査請求中
番号: 特願 2014-058581
出願年月日: 2014/3/20
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.cpnet.med.keio.ac.jp/research/basic/pathogenesis/>

メディア報道

プレスリリース

<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20161108-2/>

科学技術振興機構 (JST) のサイエンスポータルというサイトの「サイエンスクリップ」

(<http://scienceportal.jst.go.jp/clip/>)

JST News and Topics 2016年度1月号

<https://www.jst.go.jp/pr/jst-news/backnumber1701.html>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究協力者

白川 公亮 (SHIRAKAWA, Kohsuke)

山本 恒久 (YAMAMOTO, Tsunehisa)

研究は、慶應義塾大学医学部循環器内科研究室において研究代表者、佐野元昭が総括して、大学院生、白川公亮、山本恒久が中心に行った。研究分担者や連携研究者は置かなかった。