

令和元年6月18日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15728

研究課題名(和文)核ラミナによるクロマチン構造変化を介したT細胞老化制御機構の解明

研究課題名(英文)The nuclear lamina regulates T-cell senescence via altering chromatin structure

研究代表者

鈴木 淳平 (Suzuki, Junpei)

愛媛大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20734239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：核ラミナの構成成分であるLamin A/CのT細胞老化・機能における役割を解析した。本研究によって、Lamin A/CはT細胞老化やTh2細胞分化に対して抑制的に働くことを見いだした。また、Lamin Aはファルネシル化修飾されるが、それを阻害することで、T細胞老化の誘導が部分的に回復することを見いだした。これらのことから、Lamin A/Cの発現やタンパク質修飾を調節することで、T細胞老化や機能を制御できる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本申請研究によりLamin A/Cが、mTORC1活性や細胞内エネルギー代謝を介してT細胞老化やTh2細胞分化を制御する可能性を示した。免疫システムの老化(免疫老化)は加齢関連疾患の発症と密接に関わる。本研究では、ファルネシル転移酵素阻害剤が、T細胞老化を部分的に回復させる知見を得た。これらのことから、Lamin A/Cの発現制御や修飾調節を基盤とした、免疫老化に伴う加齢関連疾患の発症予防や新規治療法の開発が行える可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The lamin A is type V intermediate filament protein that is component of nuclear lamina. We analyzed the effect of Lamin A/C on T-cell senescence and functions, and found that Lamin A/C suppressed the induction of T-cell senescence through regulating mTORC1 activity and glycolysis. The induction of senescent T cells was partially inhibited by farnesyltransferase inhibitors (FTI). Furthermore, Th2 differentiation was induced in Lamin A/C deficient CD4 T cells, and the enhancement of Th2 differentiation in Lamin A/C deficient CD4 T cells was inhibited by FTI treatment.

These results suggest that T-cell senescence and function are partially regulated by Lamin A/C expression or modification.

研究分野：免疫学

キーワード：T細胞老化 T細胞機能 Lamin A ファルネシル化

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

免疫システムの老化（免疫老化）は、新規抗原に対する免疫応答の減弱や炎症性サイトカインの産生増加（SASP: Senescence-associated secretory phenotype）を誘導し、高齢者における発がん、感染症や慢性炎症疾患など、老化関連疾患増加の一因となる。T細胞分化の場である胸腺は、成人後に徐々に退縮し、老齢期には新たなT細胞の供給が著しく減少する。そのため、T細胞は免疫担当細胞の中で最も強く細胞老化の影響を受けると考えられている。生体はT細胞供給の減少を補うため、ホメオスタティック増殖（抗原非特異的な増殖）を行うが、それがさらにT細胞老化を加速させる。また、加齢とともに繰り返される同一抗原の侵入により、抗原特異的にT細胞老化が誘導される。前述したようにT細胞の老化は、加齢に伴う発がん、感染症増加や慢性炎症疾患の大きなリスクファクターとなる。そのため、T細胞老化の分子機構を解明し、その制御法を見いだすための研究は、これら老化関連疾患の発症予防や新規治療法の開発に大きく貢献できる。

申請者らは、腫瘍抑制因子 *Menin* を欠損したマウス CD8 T細胞では、抗原刺激後のごく早期に細胞老化が誘導されること、グルタミン代謝や嫌氣的解糖が野生型にくらべ亢進することを見いだした。上記の研究過程で申請者らは、*Menin* 欠損 CD8 T細胞では、核内膜の核質を裏打ちする核ラミナの構成成分である Lamin A/C が著しく増加することを見いだした。*Lamin A/C* の変異とタンパク質の蓄積は早老症をはじめとしたラミノパチーの原因となることや、その発現変動がクロマチン構造変化を誘導することなどが明らかとなっている。そこで本申請研究は、*Lamin A/C* の T細胞老化や機能に与える影響を解析することで、T細胞老化を制御するための新規方法論の提唱を目指す。

2. 研究の目的

本申請研究は、T細胞老化・機能における核ラミナの構成成分 LaminA/C の役割を解析することで、免疫老化に伴う加齢関連疾患の発症予防や新規治療法開発の方法論の提示を目指す。具体的な研究テーマは、(1) T細胞機能・老化における Lamin A/C の役割検討、(2) LaminA/C の発現制御機構の解明、(3) Lamin A/C 制御による免疫調節法の確立である。

3. 研究の方法

T細胞特異的 *Lamin A/C* (*Lmna*)欠損マウスは、*Lamin A/C*^{fllox/fllox} マウスと CD4-Cre トランスジェニックマウスを交配して作成した。*In vitro* 解析は、マウス脾臓由来のナイーブ CD4 T細胞又は CD8 T細胞を固相化抗 TCRβ抗体と抗 CD28 抗体で2日間刺激後、IL-2 で増殖させた細胞を用いて行った。

4. 研究成果

(1) T細胞老化における *Lamin A/C* の役割検討

申請者らはこれまでに、腫瘍抑制因子 *Menin* が T細胞老化に対して抑制的に作用すること報告している。さらに、*Menin* 欠損 T細胞では、個体の老化に重要な役割を担う、核ラミナの構成タンパク質 Lamin A/C の発現が野生型に比べ増加し、Lamin (A/C)/Lamin B 比率が大きく上昇することを見いだしている。そのため、T細胞老化や機能における Lamin A/C の役割について T細胞特異的 *Lamin A/C* 欠損マウスを作製して解析をおこなった。細胞老化の特徴は、細胞の肥大化、細胞周期の停止、SA-βガラクトシダーゼ活性の上昇、SASP 因子の発現増加などがある。さらに T細胞特異的な老化形質として、CD27、CD62L の発現低下、PD-1 を含む抑制性受容体の発現上昇、記憶型 T細胞分化の減少がある。そこで、*Lamin A/C* 欠損 T細胞を用いて T細胞老化における Lamin A/C の役割を検討した結果、*Lamin A/C* 欠損 T (CD4 T, CD8 T)細胞は、老化 T細胞様の形質である CD27、CD62L 分子の発現が低下した(図1)。さらに、SASP 因子であるオステオポンチン産生が有意に増加した。しかしながら、細胞の肥大化、細胞周期の早期停止、SA-βガラクトシダーゼ活性や細胞増殖の早期停止は見られなかった。そのため、*Lamin A/C* の欠損は T細胞老化に対し部分的に影響を与える可能性が考えられた。

申請者らは、T細胞老化形質が早期に誘導される *Menin* 欠損 T細胞では、活性化後の早期に mTORC1 シグナル経路や嫌氣的解糖が野生型に比べ亢進することを報告している。そこで、*Lamin A/C* 欠損 CD4 T細胞の mTORC1 活性を S6 のリン酸化レベルを指標に検討した。その結果、*Lamin A/C* 欠損活性化 CD4 T細胞の S6 リン酸化 (Ser235/236, Ser240/244) レベルは野生型にくらべ上昇した。次に、*Lamin A/C* 欠損 CD4 T細胞で誘導される T細胞老化における mTORC1 活性の役割を解析するため mTOR 阻害剤であるラパマイシンを用いて検討した結果、ラパマイシン処理により細胞老化の形質は部分的に回復した。さらに、解糖系の活性化指標として、Extracellular acidification rate (ECAR) を測定したところ、野生型に比べ *Lamin A/C* 欠損活性化 CD4 T細胞

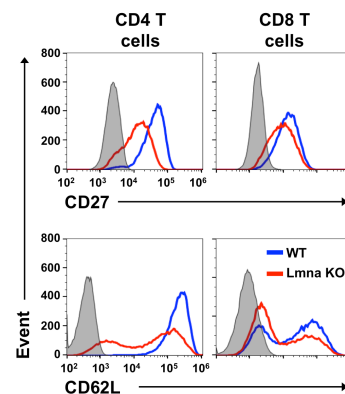


図1 *Lamin A/C*欠損T細胞は活性化後の早期に T細胞老化が誘導される

で ECAR が上昇した。これらの結果から、Lamin A/C は、mTORC1 や解糖系の活性化亢進を介して T 細胞老化や機能を調節する可能性が示された (図 2)。

(2) Lamin A/C 制御による免疫調節法の確立

Lamin A と Lamin C は *Lamin A/C* 遺伝子から選択的スプライシングにより生成される。Lamin A は、翻訳後にファルネシル化され、タンパク切断を経て Lamin A となる。近年、*Lamin A/C* 遺伝子の変異によりファルネシル化されるがタンパク切断が生じない異常な Lamin A の蓄積が早老症の一因となること、ファルネシル化阻害剤で部分的に症状が緩和されることが明らかとなってきた。*Menin* 欠損 CD8 T 細胞は、活性化のごく早期に前述の老化細胞様の形質が誘導されること、Lamin A/C の発現が著しく増加することが分かっている。そこで、*Menin* 欠損 T 細胞を老化モデルとして用い、CD8 T 細胞老化におけるファルネシル化調節の役割についてファルネシル転

移酵素阻害を用いて解析した。*Menin* 欠損 CD8 T 細胞で見られる CD27, CD62L 分子の発現低下や PD-1 の発現増加は、ファルネシル転移酵素阻害剤処理することで部分的に抑制された。さらに、*Menin* 欠損で誘導されるオステオポンチンと IL-6 の産生増加はファルネシル転移酵素阻害剤処理で抑制された。同様の作用は、*Menin* 欠損 CD4 T 細胞でも確認できるため、Lamin A のファルネシル化を調節することで、T 細胞老化を制御できる可能性が示された。申請者らは、これまでに T 細胞特異的 *Menin* 欠損マウスは、野生型に比べ抗腫瘍活性が低下することを報告している。そこで、T 細胞特異的 *Menin* 欠損マウスにマウスリンパ腫細胞 (EG7) を皮下に移植することでマウス腫瘍モデルを作製し、ファルネシル化調節が免疫機能に与える影響について検討を行った。その結果、ファルネシル転移酵素阻害剤の経口投与群はコントロール群にくらべ有意ではないものの、腫瘍サイズが減少傾向であった。以上のことから、Lamin A/C は T 細胞老化に対して抑制的に働き、Lamin A のファルネシル化を調節することで免疫機能を制御できる可能性が示された。

(3) T 細胞機能における Lamin A/C の役割検討

Lamin A/C の T 細胞機能における役割を *Lamin A/C* 欠損 CD4 T 細胞を用いて検討したところ、野生型にくらべ、*Lamin A/C* 欠損 CD4 T 細胞は、Th2 細胞の分化が著しく亢進した。一方で、Th1, Th17, iTreg 細胞分化に大きな差は認められなかった。*Lamin A/C* 欠損 CD4 T 細胞で Th2 細胞分化が亢進したことから、*Lamin A/C* 欠損マウスを用いて OVA 誘導性喘息モデルの病態を解析した結果、野生型マウスに比べ T 細胞特異的 *Lamin A/C* 欠損マウスで気道肺胞洗浄液中の炎症細胞数が増加した。次に、*in vitro* において Th2 細胞分化に対するファルネシル転移酵素阻害剤の作用を検討した結果、ファルネシル転移酵素阻害剤を処理することで Th2 細胞分化が阻害された。

これらの結果から、Lamin A/C は Th2 細胞分化に抑制的に働き、*Lamin A/C* の発現又はファルネシル化を調節することで、Th2 型のアレルギー応答を制御できる可能性が示された。

(4) 成果の国内外における位置づけとインパクト

Lamin A は T 細胞のシナプス形成に関与することが最近報告されているが、T 細胞老化や機能に関して明らかになっていない。申請者らは、Lamin A/C の T 細胞老化や機能における役割について研究を行った。その結果、Lamin A/C は、T 細胞老化や Th2 細胞分化に対して抑制的に作用する可能性を示した。さらに、ファルネシル転移酵素阻害剤は、T 細胞老化を抑制しうることを示した。これらの結果により、Lamin A/C の発現や修飾を調節することで T 細胞老化や機能を制御できる可能性を示すことができた。

(5) 今後の展望

本申請研究では、*Menin* による Lamin A/C の発現制御機構を明らかにしていない。そのため、*Menin* や他の分子を含めた *Lamin A/C* の発現制御機構を明らかにする必要がある。*Lamin A/C* 欠損 CD4 T 細胞では、mTORC1 の活性化と ECAR の亢進が認められた。そのため、Lamin A/C は細胞内エネルギー代謝に影響を与えられられる。このことから、核ラミナの変動が、細胞内エネルギー代謝を変化させることが予想される。今後、Lamin A/C の発現制御機構、核ラミナの変動に伴うクロマチン構造の変化や細胞内エネルギー代謝の変化を統合的に理解することで T 細胞老化や機能を制御できると考えている。

また、本申請研究では、ファルネシル転移酵素阻害剤が T 細胞老化を制御可能であることを示したが、阻害剤は Lamin A 以外のタンパク質のファルネシル化も阻害する。そのため、ファルネシル化されない Lamin A の mutant を用いて Lamin A と T 細胞老化との関係を明らかにする

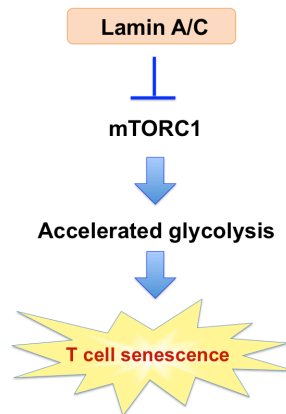


図2 Lamin A/Cは細胞内エネルギー代謝を調節することで T細胞老化を制御する

とともに、阻害剤の標的タンパクを明らかにすることで、T細胞老化に伴う加齢関連疾患の発症予防や新規治療法の開発に貢献したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- ① Yamada T, Nabe S., Toriyama K., Suzuki J., Inoue K., Imai Y., Shiraishi A., Takenaka K., Yasukawa M., Yamashita M., Histone H3K27 demethylase negatively controls the memory formation of antigen-stimulated CD8+ T cells. 202 (4): 1088-1098. 2019. (査読あり)
- ② Suzuki J., Yamada T., Inoue K., Nabe S., Kuwahara M., Takemori N., Takemori A., Matsuda D., Kanoh M, Imai Y., Yasukawa M., Yamashita M., The tumor suppressor menin prevents effector CD8 T cell dysfunction by targeting mTORC1 -dependent metabolic activation. *Nat. Commun.* 9: 3296, 2018. (査読あり)
- ③ Nabe S., Yamada T., Suzuki J., Toriyama K., Yasuoka T., Kuwahara M., Shiraishi A., Takenaka K., Yasukawa M., Yamashita M. Reinforce the antitumor activity of CD8+ T cells via glutamine restriction. *Cancer Sci.* 109(12):3737-3750, 2018. (査読あり)

〔学会発表〕(計 7 件)

- ① SUZUKI Junpei, KUWAHARA Makoto, YAMADA Takeshi, YASUKAWA Masaki, YAMASHITA Masakatsu. The tumor suppressor menin determines activated CD8 T cell fate by targeting mTORC1-dependent metabolic activation. 第47回日本免疫学会学術集会 2018年12月13日 福岡国際会議場 (福岡県)
- ② Junpei Suzuki, Makoto Kuwahara, Masakatu Yamashita. The tumor suppressor menin prevents effector CD8 T cells dysfunction via metabolic restriction by targetin mTOR activation. Cell symposia Aging and metabolism. 2018年9月25日 Siteges (スペイン)
- ③ 鈴木淳平, 桑原誠, 山田武司, 安川正貴, 山下政克 腫瘍抑制因子 Menin はグルタミン代謝調節を介して CD8 T細胞の老化を制御する。第18回日本抗加齢医学会総会, 2018年5月25日、大阪国際会議場 (大阪府)
- ④ SUZUKI Junpei, KUWAHARA Makoto, YAMADA Takeshi, YASUKAWA Masaki, YAMASHITA Masakatsu The tumor suppressor menin epigenetically regulates CD8 T cell senescence via the modulation of glutamine metabolism. 第46回日本免疫学会学術集会, 2017年12月14日, 仙台国際センター (宮城県)
- ⑤ 鈴木淳平, 桑原誠, 山田武司, 安川正貴, 山下政克 Menin はグルタミン代謝とヒストン H3K27 脱メチル化調節を介して CD8 T細胞老化を制御する。第79回日本血液学会学術集会, 2017年10月21日, 東京国際フォーラム (東京都)
- ⑥ 鈴木淳平, 桑原誠, 山田武司, 安川正貴, 山下政克 腫瘍抑制因子 Menin は mTORC1 シグナルを介して T細胞老化と抗腫瘍免疫を制御する。第9回血液疾患免疫療法学会学術集会, 2017年9月30日, 一橋講堂 (東京都)
- ⑦ 鈴木淳平, 桑原誠, 山田武司, 松本哲, 安川正貴, 山下政克 腫瘍抑制因子 Menin は mTORC1 シグナルの調節を介して腫瘍免疫を制御する。第21回日本がん免疫学会総会, 2017年6月30日, 幕張メッセ国際会議場 (千葉県)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

愛媛大学大学院医学研究科免疫学・感染防御学講座

<https://www.m.ehime-u.ac.jp/school/immunology>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：安川 正貴

ローマ字氏名：Yasukawa Masaki

研究協力者氏名：山下 政克

ローマ字氏名：Yamashita, Masakatsu

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。