

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07629

研究課題名（和文）ユビキチン修飾によるメモリーT細胞疲弊・老化制御機構の解明

研究課題名（英文）Regulatory mechanisms of senescence related T cell development by ubiquitination

研究代表者

安藝 大輔（AKI, DAISUKE）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：50420500

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：免疫老化は、加齢特異的に蓄積するメモリーT細胞（加齢関連T細胞）を介した獲得免疫の機能異常が関与している。本研究では、タンパク質ユビキチン修飾系による加齢関連T細胞発生の制御機構の解明を目指した。ユビキチン関連因子の発現ライブラリーを用いたin vivoスクリーニングを実施した結果、PIAS1は加齢関連T細胞の特徴である疲弊化を誘導し、抗腫瘍免疫活性を制御していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

翻訳後修飾のT細胞疲弊化への関与は不明であったが、本研究ではユビキチン修飾系がT細胞を介した免疫老化の誘導に関与していることを明らかにした。老化に伴うT細胞の疲弊化は抗腫瘍免疫の低下を招くことから、疲弊化の予防や解除方法の開発は重要である。本研究より得られた知見は、ガン治療戦略の確立に際してユビキチン化のプロセスが、メモリーT細胞における新規の創薬ターゲットとなりうる可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：Senescence related T cell is a specifically accumulated T cell subset as we age and involved in immunosenescence. To investigate the regulatory mechanisms how senescence related T cells are emerged during aging, we performed in vivo screens to identify ubiquitin related molecules that can regulate senescence related T cell development. We found that a small ubiquitin-related modifier E3 ligase, PIAS1 regulated senescence related T cell induction with promoting T cell exhaustion, which might result in compromised anti-tumor immunity.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫老化 加齢関連T細胞 ユビキチン修飾 疲弊化 抗腫瘍免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

加齢に伴い顕著に現れる組織や臓器レベルでの機能低下は、老化した細胞が蓄積することによって引き起こされると考えられている。免疫系の機能も加齢に伴い、「免疫老化」と呼ばれる免疫応答の変化を示す。免疫老化は抗原特異性や免疫記憶形成といった獲得免疫に関する機能の低下を特徴としているが、加齢に伴い増加するメモリーT細胞 (Senescence-related T cell: Tsen) が深く関わっていることが示唆されている。TsenはT細胞受容体 (TCR) 刺激に対する応答性の低下や抑制性受容体の発現 (疲弊) 細胞傷害活性 (Cytotoxic T lymphocyte: CTL 活性) の上昇や炎症性メディエーターの分泌などのユニークな形質を示すサブセットである。しかしながら、Tsenが加齢とともにどのように誘導され、蓄積されるのかについての分子メカニズムは不明である。

タンパク質ユビキチン修飾システムは76アミノ酸から構成される小分子ユビキチンが標的タンパク質のリジン残基に付加される、翻訳後修飾の一つである。タンパク質ユビキチン化は酵母からヒトにいたるまで幅広く保存されており、タンパク質分解、シグナル伝達、DNA修復や膜タンパク質の細胞内小胞輸送など様々な細胞機能に関与している。獲得免疫においては、TCRやサイトカイン受容体のシグナル伝達経路の制御を通じてCD4 T細胞の分化や活性化を調節し、中枢および末梢性免疫寛容の両方に重要な役割を担っている。しかし、ユビキチン修飾系がTsenを介した免疫老化のプロセスにどのように関わっているか、その詳細は全く明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では「タンパク質のユビキチン修飾系はTsenの発生機序を制御する」という仮説のもと、Tsen誘導に関わるユビキチン連結酵素や脱ユビキチン化酵素を同定し、その分子基盤を解明する。さらに同定分子機構の免疫老化における関与について、個体レベルの解析より明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) Tsenの発生に関与するユビキチン関連分子を同定するために必要とされる *in vivo*スクリーニングや *in vitro*評価系を構築する。
- (2) (1)において確立した実験系に基づき、同定分子の機能解析を実施する。
- (3) (2)で得られた分子について、B16メラノーマ細胞を用いた担ガンマウスモデルにおける抗腫瘍免疫能を解析し、免疫老化における当該分子の関与を検証する。

4. 研究成果

(1) リンパ球欠損マウス (RAG2遺伝子欠損マウス) にナイーブCD4 T細胞を移入し、恒常性増殖を誘導した結果、移入細胞において細胞傷害活性や疲弊関連遺伝子の顕著な発現上昇が観察された。移入細胞の大部分は、ヒトTsenに高発現するPD-1やCD39などの分子を発現していた。さらに、110週齢を超えた老齢マウスに蓄積するメモリーCD4 T細胞における網羅的遺伝子発現解析を行った結果、TCR刺激への低応答性、CTL活性及び向炎症形質が認められた。これらの結果は、リンパ球欠損マウスにおけるT細胞の恒常性増殖は、加齢に伴うメモリーCD4 T細胞の形質変化のプロセスを模倣しており、短期間でTsenを誘導する実験モデルとして有用であることを示唆している。次にユビキチン関連分子についてレトロウイルスcDNAあるいはshRNA発現ライブラリーを作成した。これらに加え、*in vitro*におけるナイーブCD4 T細胞への持続的なTCR刺激が、Tsenの特徴である細胞増殖能の低下、細胞周期阻害因子の発現や炎症性素因の上昇を引き起こすことを見出した。

(2) (1)で作成したユビキチン関連分子をターゲットにした発現ライブラリーをナイーブCD4 T細胞に導入し、これらの細胞をリンパ球欠損マウスに移入した。移入細胞の恒常性増殖を誘導した後、細胞傷害性因子の発現や疲弊を制御する遺伝子の探索を実施した。その結果、Tsen化を促進する可能性を有する分子としてユビキチン様タンパク質 (Small Ubiquitin-related Modifier; SUMO) リガーゼであるPIAS1を同定した。PIAS1が導入された移入細胞はコントロール細胞と比較して、PD-1⁺TIM-3⁺サブセットの顕著な増加を示した。PIAS1導入細胞では移入後の恒常性増殖の抑制が観察された。PIAS1導入細胞の増殖抑制は *in vitro*におけるTCR刺激下でも確認された。CTLのマーカーであるKLRG1について解析したところ、その陽性率はPIAS1導入細胞で増加していた。さらにTsen誘導におけるPIAS1の効果を検討するため、移入細胞における遺伝子発現解析を実施した。その結果、PIAS1導入細胞ではIFN γ の発現はコントロール細胞と同程度であったが、IL-2の発現は低下していた。またメモリーT細胞の形成に重要なTCF7の発現もPIAS1の発現により抑制されていた。以上の結果より、T細胞におけるPIAS1の発現は、細胞傷害性や疲弊などのTsenに特徴的な形質の獲得を促進することが示唆された。

(3) (2)で得られた知見をもとに、PIAS1によるTsen促進化が抗腫瘍免疫に及ぼす影響を検討した。卵白アルブミン (Ova) に特異的なTCRを発現するトランスジェニックマウスより単離したナ

イーブCD8 T細胞にPIAS1を遺伝子導入した。これらの細胞を、Ovaを発現するB16メラノーマ細胞を播種した野生型レシピエントマウスに移入し、腫瘍浸潤リンパ球の解析を行った。その結果、PD-1⁺TIM-3⁺サブセットはPIAS1発現細胞で上昇していた。PIAS1発現細胞の腫瘍への浸潤はコントロールの細胞に比べ増加していた。Granzyme Bの産生はPIAS1発現細胞で低下していた。以上より、T細胞におけるPIAS1の発現は、担ガン状態においては、特に疲弊形質を伴ったTsen化を促進することによって、抗腫瘍免疫を低下させる可能性が推察された。

これまでのところタンパク質SUMO付加がTsenの発生に関与しているという報告はなされていないが、本研究より、PIAS1を介したSUMO化反応がメモリーT細胞の形質に重要な役割を果たしている可能性が示された。SUMOは修飾様式の点でユビキチンと類似性があるものの機能的には、ユビキチンのように基質の分解を促進する効果よりはむしろ、分子間の相互作用の調節を通じて主に核内でのイベントに関与していると考えられている。近年、Tsen発生のメカニズムの一つとしてDNAやヒストンを含むエピジェネティックな変化が関与することが示唆されている。今後は生化学的な解析を通じてPIAS1の基質を同定することでTsen誘導機構におけるSUMO付加の意義について明らかにするとともに、当該経路を標的とした免疫老化の予防や解除方法の開発にも取り組みたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nao Nagai, Yotaro Kudo, Daisuke Aki, Hayato Nakagawa, Koji Taniguchi	4. 巻 22
2. 論文標題 Immunomodulation by Inflammation during Liver and Gastrointestinal Tumorigenesis and Aging	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	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） 10.3390/ijms22052238	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 Zhu Y, Zhao Y, Zou L, Zhang D, Aki D, Liu YC.	4. 巻 216
2. 論文標題 The E3 ligase VHL promotes follicular helper T cell differentiation via glycolytic-epigenetic control	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 1664-1681
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1084/jem.20190337.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 三瀬節子、安藝大輔、池田真理、吉村昭彦	4. 巻 39
2. 論文標題 サイトカインストームとT細胞疲弊 コロナウイルス感染を中心に	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 505-511
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 山本 伸一, 大谷木 正貴, 安藝 大輔, 伊藤 美菜子, 吉村 昭彦	4. 発行年 2022年
2. 出版社 (株)エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 460
3. 書名 生物の寿命延長 老化・長寿命の基盤研究最前線	

〔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
---------	---------