

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461455

研究課題名(和文) 健常人および血液疾患患者における免疫老化細胞Tsenの検討

研究課題名(英文) Senescence associated T cells among healthy volunteer and patients with hematological cancer.

研究代表者

鈴木 裕子 (SUZUKI, YUHKO)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：80406941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：京都大学の湊らにより、マウスの加齢や血液がんの発症で大量に出現する老化関連T細胞が報告された。健常人と血液疾患患者で検討を行なった。健常人末梢血では、マウスと同様の表面形質を示す細胞が年齢とともに増加した。この細胞は、T細胞レセプター刺激に対して増殖力が乏しかった。インターフェロンを主に産生しており、転写因子では、Eomesderminを高頻度で発現していた。血液疾患でも、同様の細胞が観察された、マウスの様な劇的な増加はなく、発現頻度は症例によって多様であった。

研究成果の概要(英文)：According to Minato and colleagues at Kyoto University, aging-related T cells that appeared in large amounts due to aging of the mouse and onset of blood cancer were reported. We examined healthy humans and patients with hematological cancers. In peripheral blood of healthy volunteers, senescence associated T-cells showing the same surface traits as mice increased with age. This cell had poor proliferative capacity after T cell receptor stimulation for 72 hours. Interferon was mainly produced, and transcription factors "Eomesdermin" were frequently observed in these senescence associated T cells. Among patients with hematological cancers, similar cells were observed. However, there was no dramatic increase like mice which were reported by Minato, and the frequency of expression varied among cases.

研究分野：血液免疫

キーワード：免疫老化 T細胞 健常人 CML CLL MDS

1. 研究開始当初の背景

加齢に伴い、個体の免疫機能は、外来病原体に対する獲得免疫応答の低下や過剰な炎症反応傾向などの特徴的な変化を示し、“免疫老化”と呼ばれている。免疫老化は、加齢に伴うガンの発生増加への関与も考えられている。免疫老化のメカニズムはよくわかっていない。

京都大学免疫の湊等は、マウスの脾臓での検討で、若齢時には存在しないが、加齢に伴って増加する PD-1, CD4 両者陽性の集団を同定し、PNAS に報告した(1)。この細胞集団は、獲得免疫応答能を完全に消失し、かわりに通常の T 細胞では産生しないオステオポンチン(OPN)を大量に産生するのがわかった。このような機能的変化は、この PD-1, CD4 陽性細胞への、C/EBP 遺伝子の発現が関与している事が想定される。C/EBP は、マクロファージなどの骨髄球系の分化と機能を司るマスター遺伝子であり、通常の T リンパ球では発現されない。

獲得免疫の最も重要な特性は免疫記憶であり、特定の病原体に反応した T リンパ球の一部は、記憶 T 細胞として体内に長期間保持され免疫記憶を維持する。PD-1 陽性 T リンパ球は、この記憶 T 細胞からユニークな遺伝子プログラミングによって派生し、加齢に伴って蓄積する事がわかった。また、マウスでは、急性白血病などの血液ガンで、発症とともにこの PD-1 陽性 T リンパ球が増加し、ガンの発症とも関わっている事が報告されている。さらにこの細胞集団が、自己免疫疾患の発症などに関与していることも明らかとなっており(2)、将来の様々な免疫療法のターゲットとなる可能性もある。

免疫老化は発ガンとも関係があるとされ、今後の、免疫的側面からの発ガン

機序を知る上でも大変に重要な現象である。また、ガン治療のターゲットともなりえるため、ヒトでの基礎データ作りとして、この研究を計画した。

参考文献

1. Shimatani K, Nakashima Y, Hattori M, Hamazaki Y, Minato N. PD-1+ memory phenotype CD4+ T cells expressing C/EBPalpha underlie T cell immunodepression in senescence and leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A 2009;106:15807-15812.
2. Kasagi S, Kawano S, Okazaki T, Honjo T, Morinobu A, Hatachi S, Shimatani K, Tanaka Y, Minato N, Kumagai S. Anti-programmed cell death 1 antibody reduces CD4+PD-1+ T cells and relieves the lupus-like nephritis of NZB/W F1 mice. J Immunol 2011;184:2337-2347.

2. 研究の目的

人(健康人、及び血液疾患患者)での、免疫老化について明らかにする。

3. 研究の方法

A 末梢血の採取

1)ドナーの選定

健康人

以下の 1)-5)の条件をみたす健康人ボランティアを対象とした。1)最近の検診で、治療対象となる異常がない。2)ガンの既往がない。3)自己免疫疾患の既往がない。4)文章での同意が得られる。5)18歳以上6)自由意思で参加

血液疾患

福島医大で、治療開始前の、血液疾患(骨髄異形成症候群、急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、悪性リンパ腫、など)患者で、文書での同意を取得が得られる、18歳以上を対象とした。

2)単核球の分離

リンフォプレップ<sup>®</sup>を用いた、比重遠心法にて、単核球を分離した。

3) フローサイトメトリー(FCM)での細胞分離、表面形質の観察

分離した単核球に、CD4, PD-1, CD44 でマーキングを行い、Aria II<sup>®</sup>( Beckton Dickinson ) で、PD-1 陽性/陰性に分けて、ソーティング、細胞分離を行なった。

免疫老化細胞の表面形質について、蛍光抗体にて染色を行ったのち、FCM で観察を行った。

4) 細胞培養

ウェルに、CD3 抗体, CD28 抗体を固相化し、FCM で分離した細胞を、 $1 \times 10^5$ /well ずつの細胞をまき、72 時間培養を行なった。培養後に、CellTiter-Glo kit<sup>®</sup> (Promega)を用いて、増殖率(ATP)を測定した。

5) サイトカインの測定( Multiplex Cytokine assay: MCA )

細胞培養後の上清の一部を用い、多項目のサイトカイン測定を行なった。

6) 細胞内染色

分離した単核球を用いて、細胞表面を、CD4, PD-1 などで染色。その後、細胞内染色を行い、細胞内サイトカイン( IL-2, IL-10, IFN- $\gamma$ , OPN など)を染色した。

また、同様に、核内染色を行い、核内の転写因子( Bcl-6, Eomesdermin, など)の染色も行い、FCM で観察を行なった。

7) mRNA の測定

ソーティングした細胞を、isogen<sup>®</sup>を用いて、tRNA を作成。Light cycler<sup>®</sup> (Roche)を用いて、qRT-PCR を行った。

4. 研究成果

**健常人**

1) **ヒト老化関連 T 細胞の同定**

健常人ボランティアから採取した末梢血を用いて検討した。CD4 陽性、CD44 陽性細胞について、マウスと同様に、PD-1 陽性・陰性に分けて解析を行った。PD-1 陽性細胞の表面形質は、CD62L 陰性、CD25 陰性、CD69 陰性であり、マウスの免疫老化細胞と同様であった。こ

れらの細胞は、人由来臍帯血、リンパ節にも存在した。

マウスで見られたような、IL-1R や、CD30L の高い発現はなく、マウスとは、表面形質が異なっていた。

年齢増加とともに、末梢血の、CD4 陽性細胞中の、CD44 陽性、PD-1 陽性細胞の比率は、増加した。

2) **ヒト老化関連 T 細胞の増殖力が著しく低い。**

CD4 陽性 CD44 陽性細胞を、セルソーターで、PD-1 陽性・陰性にわけた。その後、T 細胞レセプター刺激下で、培養を行い、これらの細胞の増殖能を検討下。その結果、PD-1 陰性細胞と比較して、陽性細胞の増殖力は著しく低かった。

3) **ヒト老化関連 T 細胞は多種のサイトカインを産生する。そのうち、主となるのが、IFN- $\gamma$  である。**

MCA での検討

2) で培養後、上清の一部で、MCA を行った。多種のサイトカインを産生していたが、そのうち、IFN- $\gamma$  (mean 1865 pg/ml), IL-10 (mean 737 pg/ml), IL-17a (mean 1057 pg/ml)を主に産生していた。

マウスで認められたような、OPN の大量産生は認められなかった。

FCM での検討

CD4 陽性、CD44 陽性細胞を、PD-1 陽性・陰性でサイトカイン産生の検討を行った。PD-1 陽性細胞では、約半数の細胞で、IFN- $\gamma$  (median 51.2%), IL-2 (median 62.2%)を産生していた。IFN- $\gamma$  陽性細胞の比率は、PD-1 陽性細胞では、陰性細胞と比較して、優位に高かった。(  $p < 0.05$  )

4) **ヒト老化関連 T 細胞は、数種の T 細胞の集合であり、その主をなすのは、Th-1 細胞様ケモカインレセプター発現パターンを示す細胞群である。**

**これまでのサイトカインの産生パ**

ターンなどから、ヒト老化関連 T 細胞は、いくつかの事なつた特徴を持つ T 細胞の集合であることが予想された。

Morita らの方法で、ケモカインレセプターの発現パターンから、ヘルパー T (Th) 細胞を分類した。Th2 様細胞 (CXCR3 (-), CCR6 (-)), Th1 様細胞 (CXCR3 (+), CCR6 (-)), Th17 様細胞 (CXCR3 (-), CCR6 (+))、それ以外の Th 細胞 (CXCR3 (+), CCR6 (+)) とに分けた。その結果、どちらの群も、種々の Th の集合であることがわかった。特に、PD-1 陽性細胞群は、Th1 様細胞が主成分であり、PD-1 陰性群は、Th2 様細胞が主成分であった。

年齢別にこれらの成分について検討を行うと、Th1 様細胞のみが加齢に伴って増加することが明らかになった。

#### 5) ヒト老化関連 T 細胞では、転写因子で Eomesdermin を特徴的に発現する。

##### qRT-PCR での検討

2) でソーティングを行った PD-1 陽性・陰性細胞にて、qRT-PCR で各種転写因子などの発現解析を行った。

その結果、PD-1 陽性細胞では、*cebpa*, *spp-1*, *tbx-21*, *eomesdermin* の発現が PD-1 陰性細胞と比較して、高かった。発現が低かったのは、*c-myc*, *satb1* など、細胞増殖に関わるものなどであり、マウスと同様の結果であった。マウスで老化関連細胞の特徴とされた *bcl-6* の発現は、一定の傾向は見られなかった。

##### FCM での検討

qRT-PCR での発現が特徴的だった Eomesdermin に注目して、核内染色を行い、FCM で検討を行った。転写因子として、*bcl-6*, *t-bet*, *gata-3* など、リンパ系細胞の分化に関わるものも観察した。PD-1 陽性細胞群では、陰性細胞群と比較して、Eomesdermin 陽性細胞の発現比率が高かった (median 36.7%)。この様に、タンパクレベルでも、Eomesdermin の高発現が確認された。

#### 血液疾患

福島医大血液内科の協力のもと、血液疾患患者から、説明と同意後、末梢血を採取。健常人と同様の処理で、単核球を作成し、表面形質や、転写因子について検討を行った。

未治療で、重症感染症の合併がない患者を対象とした。

急性骨髄性白血病 3 例、急性リンパ性白血病 2 例、慢性リンパ性白血病 2 例、慢性骨髄性白血病 3 例、悪性リンパ腫 6 例、骨髄異形成症候群 2 例、骨髄増殖性疾患 2 例で、検討を行った。

いずれの疾患でも PD-1 陽性細胞の CD4 陽性細胞に占める割合は健常人と同様であった。

また、Eomesdermin の発現も健常人と同様であった。疾患によっても、特定の傾向はなかった。

結論：ヒトでも、免疫老化関連細胞は、マウスと同様の表面形質をもつ細胞が観察される。これは、マウスと同様に細胞増殖に乏しいが、産生サイトカインも IFN- $\gamma$  が主であったり、マウスとは異なる。転写因子も、*eomesdermin* が主であり、マウスとは異なっている。

高齢化によって、CD4 陽性細胞中の比率は

増加する。このうち、Th-1 様細胞が主成分であった。ヒトでも、加齢によって、免疫老化関連細胞が増加することを、示した。

しかし、マウスでは、血液がんでは、著しい増加が認められたが、ヒトでは、健常人と大きなわりはなかった。ヒトの癌化では、免疫老化細胞はどの様な役割を果たしているか、今後、臨床経過と比較して、検討が必要である。

#### 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 10 件)

1) 鈴木裕子、井上浄. 健常人での老化関連 T 細胞と血液疾患の関わり BIO Clinica 31 (8) 79 - 86 2016

2) Shikama Y, Cao M, Ono T, Feng X, Noji H, Kimura H, Ogawa K, Suzuki Y, Ikeda K, Takeishi Y, Kimura J. Reduction of c-Fos via Overexpression of miR-34a Results in Enhancement of TNF- Production by LPS in Neutrophils from Myelodysplastic Syndrome Patients. PLoS One. 11 (8) e0158527 2016

3) Yuhko SUZUKI, Taku SATO, Jun SAKUMA, Masahiro ICHIKAWA, Yugo KISHIDA, Keiko ODA, Yoichi WATANABE, Takeshi GOTO, Masahiro SATO, Kenneth E. NOLLET, Kiyoshi SAITO, Hitoshi OHTO. Intracranial hemorrhage and platelet transfusion after administration of anti-platelets agents: Fukushima Prefecture. Fukushima J. Med. Sci. 62 (1) in press 2016

4) Takenobu Ohashi, Yuhko SUZUKI, Toshiyuki YAMAMOTO. Use of biologics for pustulotic arthro-osteitis in two patients with palmoplantar pustulosis. The Journal of Dermatology in press 2016

5) Tahir S<sup>1</sup>, Fukushima Y<sup>2</sup>, Sakamoto K<sup>1</sup>, Sato K<sup>1</sup>, Fujita H<sup>1</sup>, Inoue J<sup>1</sup>, Uede T<sup>3</sup>, Hamazaki Y<sup>1</sup>, Hattori M<sup>2</sup>, Minato N<sup>4</sup>. A CD153+CD4+ T follicular cell population

with cell-senescence features plays a crucial role in lupus pathogenesis via osteopontin production. *J Immunol.* 2015 194(12): 5725-35.

6) Doi K<sup>1</sup>, Imai T<sup>1</sup>, Kressler C<sup>1</sup>, Yagita H<sup>2</sup>, Agata Y<sup>1</sup>, Vooijs M<sup>3</sup>, Hamazaki Y<sup>1</sup>, Inoue J<sup>1</sup>, Minato N<sup>1</sup>. Crucial role of the Rap G protein signal in Notch activation and leukemogenicity of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Rep.* 2015 ; 5:7978.

7) Yuhko Suzuki , Ken Okai , Hironori Ohashi , Shigeo Aota , Kaoru Sakurai , Hiroyuki Terawaki , Setsuko Ohtsuka , Minako Wakasugi Kenneth Eric Nollet and Hitoshi Ohto. Autologous blood transfusion for hemodialysis patients: a case report and review of clinical reports and therapeutic features. *Transfusion and Apheresis Science* 52 (2) 204 - 207 2015

8) Yuhko Suzuki, Takao Kitahara, Kazui Soma, Shingo Konno, Kimitoshi Sato, Sachio Suzuki, Hidehiro Oka, Masaru Yamada, Kiyotaka Fujii, Yukio Kitahara, Yuji Yamamoto, Takashi Otsuka, Yoshihiro Sugiura, Yuhsaku Kanoh, Yoshiko Tamai, Hitoshi Ohto. Impact of platelet transfusion on survival of patients with intracerebral hemorrhage after administration of anti-platelet agents at a tertiary emergency center. *PLOS ONE* 9 (5) e97328 2014

9) Ikeda K, Ohto H, Kanno T, Gonda K, Suzuki Y, Ono T, Saito S, Takahashi H, Kimura S, Harada-Shirado K, Yamauchi H, Hoshino Y, Mashimo Y, Nollet KE, Kikuta A, Ogawa K, Takeishi Y. Peripheral blood progenitor cell collection by two programs for autologous and allogeneic transplantation. *Transfusion* 54 (5) 1235 -

1242 2014

10) Suzuki Yuhko; Kume Hikaru; Togano Tomiteru; Kanoh Yuhsaku; Ohto Hitoshi. Epidemiology of Visceral Mycoses in autopsy cases in Japan: the data from 1989 to 2009 in the Annual of Pathological Autopsy Cases in Japan. *Medical Mycology* 51 (5) 522 - 526 2013

〔学会発表〕(計 13 件)

1) Yuhko SUZUKI, Hitosi OHTO, Tomiteru TOGANO, Hikaru KUME. Mucor are increasing: Epidemiology of visceral mycoses in autopsy cases in 2013. 第 78 回日本血液学会総会. Yokohama, 2016

2) Natsuo Yamamoto, Kiwamu Nakamura, Kazuaki Arai, Charles Dela Cruz, Takeshi Machida, Yuhko Suzuki, Yasunori Ogura, Yoshinobu Abe, Hideharu Sekine, Ken Iseki, Philip Askenase, and Keiji Kanemitsu. IL-13-dependent biomarkers with liver inflammatory differentiation after pneumococcal sepsis during rapid inflammatory phase. 16th International Congress of Immunology. Melbourne, Australia 2016

3) 鈴木裕子、井上浄、湊長博. 人免疫老化について. 研究連携セミナーワーキンググループ発表会. 福島 2015

4) Yuhko SUZUKI, Joe INOUE, Nagahiro MINATO. Human senescence associated T cells with high expression of Eomesdermin are increasing in B-cell malignancies. 第 44 回日本免疫学会総会 札幌 2015

5) Yayoi Shikama, Meiwang Cao, Kojun Yamakawa, Xiaomin Feng, Michiko Anzai, Tomoyuki Ono, Hideyoshi Noji, Hideo Kimura, Kazuei Ogawa, Yuko Suzuki, Yasuchika Takeishi, Junko Kimura . Excessive TNFalpha production via reduced expression of c-Fos in myelodysplastic syndromes . 第 77 回日本血液学会総会. 金沢 2015

6) 鈴木裕子、大戸斉、山本夏男、見城明、梅野富輝、久米光。固形臓器移植例での内臓真菌症の検討—日本剖検輯報 2005-2012 より。

第 59 回 日本医真菌学会総会 学術集会.  
札幌 2015

7) Yuhko SUZUKI. Impact of platelet transfusion on survival of patients with intracerebral hemorrhage after administration of anti-platelet agents . The 29th transfusion medicine conference meeting. 葉山. 2015

8) YAMAMOTO Natsuo, MACHIDA Takashi, SUZUKI Yuhko, SEKINE Hiedeharu, KANEMITSU Keiji . Elevated splenic Blimp-1 and CD14 of blood leukocytes within hours in IL-13 deficient mice sepsis. 第 43 回日本免疫学会総会. 京都 2014

9) SUZUKI Yuhko, INOUE Joe, MINATO Nagahiro. Human senescence associated T cells exhibit high expression of Eomesdermin. 第 43 回日本免疫学会総会. 京都 2014

10) Yayoi Shikama, Meiwang Cao, Kojun Yamakawa, Xiaomin Feng, Miciko Anzai, Tomoyuki Ono, Hideyoshi Noji, Kazuei Ogawa, Yuhko Suzuki, Hideo Kimura, Yasuchika Takeishi, Junko Kimura. Effects of miR-34a/miR-155 mediated c-Fos reduction on TNFalpha production in myelodysplastic syndromes. 第 76 回日本血液学会総会. 大阪 2014

11) Yuhko Suzuki, Joe Inoue, Nagahiro Minato. PD-1+ memory phenotypes CD4 Th-1 like cells underlied T cell immunodepression in senescence. 第 42 回日本免疫学会総会, 幕張 2013

12) 鈴木裕子、梅野富輝、大戸斉、久米光. Epidemiology of visceral mycoses in autopsy cases with leukemia in Japan from 1989 to 2009. 第 75 回 日本血液学会総会. 札幌 2013

13) Yuhko Suzuki, Tomiteru Togano,

Hitoshi Ohto, Hikaru Kume. Epidemiology of Visceral Mycoses in Autopsy cases in Japan: Leukemia cases from 1989 to 2009. 28th International Congress of Chemotherapy and Infection. Yokohama 2013

〔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：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6 . 研究組織  
(1)研究代表者  
鈴木 裕子 (SUZUKI Yuhko)  
福島県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号：80406941

(2)研究分担者  
井上 浄 (INOUE Joe)  
慶應義塾大学政策・メディア研究科・准教授  
研究者番号：00433714

(3)連携研究者  
湊 長博 (MINATO Nagahiro)  
京都大学 医学研究科 教授  
研究者番号：40137716