

長寿医療研究開発費 2023年度 総括研究報告（総合報告）

長寿医療研究のための技術基盤形成に資する基礎技術研究

②免疫細胞の解析と制御法の開発（21-27-2）

主任研究者 錦見 昭彦 国立長寿医療研究センター

バイオセーフティ管理室（室長）

#### 研究要旨

加齢に伴って病原体に対する特異性が低下し、獲得免疫系の細胞が非特異的に応答することにより炎症性を誘導することが知られている。この様な非特異的な炎症応答の一因として、老化関連 T (SA-T) 細胞や加齢関連 B 細胞 (ABC) として同定されている、抗原非特異的な炎症を誘導するリンパ球の集団が加齢とともに増加することがあげられている。本研究は、これら老化に関連した T 細胞や B 細胞の性質を明らかにして、これらを制御することにより、免疫系の老化を研究ためのツールとして使用できる動物実験系を開発することを目的としている。これまでに、SA-T 細胞の産生や活性を抑制する化合物を見出したほか、ABC に特徴的な細胞骨格制御について明らかにした。また、ABC の産生を抑制する化合物をスクリーニングする系を確立した。あわせて、免疫老化に関与する可能性がある因子（分子 Y と DOCK11）に着目し、その機能の解析を進めている。

#### 主任研究者

錦見 昭彦 国立長寿医療研究センター バイオセーフティ管理室（室長）

研究期間 2021年4月1日～2024年3月31日

#### A. 研究目的

免疫系を司るリンパ球において、SA-T 細胞や ABCs など、加齢とともに蓄積する集団の存在が知られている。これらは、抗原に対する増殖応答を失っている一方、非特異的に炎症性の分泌因子を産生する。例えば SA-T 細胞は、抗原特異的な応答能が失われている一方で、オステオポンチンなどの炎症性因子を大量に分泌し、慢性的な炎症や自

己反応性の免疫細胞の活性化を誘導している。最近、免疫細胞で選択的に細胞老化を誘導すると、他の組織の細胞老化が促進されて生体機能が低下すること、すなわち、免疫系の老化が個体の老化に大きな影響を与えることが示された。これまでに、CD153 を抗原とするワクチンにより SA-T 細胞を特異的に除去する試みもなされており、糖尿病モデルマウスへのワクチン投与により SA-T 細胞を取り除くことで、糖尿病の症状が改善されることが示された。また、加齢個体の腎障害において、SA-T 細胞や ABCs による三次リンパ組織の形成が組織修復を妨げていることが示されている。このように、SA-T 細胞や ABC の蓄積が、加齢や生活習慣病における慢性炎症や自己免疫疾患の一因となっていることが明らかになりつつある。これらのことから、SA-T 細胞や ABCs の性質を明らかにし、動物レベルでこれを除去する方法を開発することは、免疫老化の実態を解明に寄与できるだけでなく、ヒトに対して応用可能な技術を提供できると考えられる。しかしながら、低分子化合物等により、老化関連リンパ球を制御する方法は報告されていない。本研究では、様々な阻害剤によるスクリーニングを通じて SA-T 細胞や ABCs の分化や機能発現のメカニズムを解明することに加え、免疫系の老化に関与している分子の機能を解明することにより効果的に老化による免疫機能低下を制御する方法を確立することを目的としている。

## B. 研究方法

### 1. 低分子化合物を用いた SA-T 細胞の制御

マウスより採取した CD4 陽性 T 細胞を、キナーゼ阻害剤ライブラリ由来の化合物存在下で抗原刺激し、培養上清中に分泌されるオステオポンチンを定量した。オステオポンチン産生を阻害する化合物について、*in vitro* における SA-T 細胞産生を抑制するものを選定した。効果が見られた化合物について、加齢性腎疾患モデルマウス投与し、疾患の病態が改善されるかどうか検討した。

### 2. ABC の性質の解明

マウス脾細胞中の濾胞 B 細胞と ABC について、CXCL12 に対するケモタキシスをトランスウェルアッセイで検討した。次に、濾胞 B 細胞と ABC より RNA を抽出し、アクチン細胞骨格制御に関連した遺伝子の発現を比較した。ABC で高発現する分子の阻害剤存在下でトランスウェルアッセイを行い、当該遺伝子の産物が ABC の運動に関与していることを検証した。

### 3. 加齢性炎症疾患における分子 Y の役割

T 細胞を抗 CD3/CD28 で刺激した際の分子 Y の発現をウエスタンブロッティングで検討した。T 細胞特異的に分子 Y を欠損させたマウスを飼育し、肝臓、肺などの組織切片を形態学的に観察した。

### 4. サイトカイン産生における DOCK11 の役割

野生型および DOCK11 欠損マウス由来の B 細胞を抗 IgM と LPS で、CD4 陽性、ならびに、CD8 陽性 T 細胞を抗 CD3/CD28 でそれぞれ刺激し、産生されるサイトカインを比較した。活性化された野生型および DOCK11 欠損マウス由来の T 細胞を抗 CD3/CD28 で刺激し、シグナル伝達因子の応答と転写因子 NFATc1 の細胞内局在を観察した。

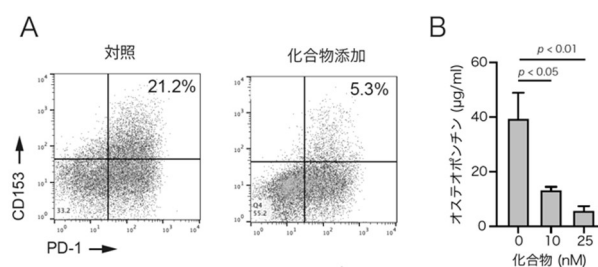
(倫理面への配慮)

遺伝子改変マウスを用いた実験は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に準じて安全責任者の監督、指導の下に実施した。マウスの実験にあたっては、「動物の愛護及び管理に関する法律」に準じて、苦痛の緩和等の適切な処置を講じた。動物実験ならびに遺伝子組換え実験については、それぞれ動物実験倫理委員会および遺伝子組換え実験安全委員会で承認された方法で行った。

## C. 研究結果

### 1. 低分子化合物を用いた SA-T 細胞の制御

SA-T 細胞における発現遺伝子の解析、ならびにキナーゼ阻害剤のライブラリーの探索を行った。その結果、SA-T 細胞で発現が上昇しているキナーゼを見出し、その阻害剤の効果について検討した。In vitro で刺激した CD4+ T 細胞において、このキナーゼの阻害剤存在下で、SA-T 細胞の産生や、オステオポンチンの分泌が抑制された (図 1)。この阻害剤を、加齢マウスに経口投与したところ、SA-T 細胞の数が減少することが確認された。



▼図 1. キナーゼ阻害剤による SA-T 細胞抑制効果

- A: 阻害剤添加による SA-T 細胞 (PD-1+, CD153+) 産生の抑制
- B: 阻害剤添加による SA-T 細胞のオステオポンチン分泌の抑制

12 ヶ月齢以上のマウスにおいて、腎臓傷害に対して、SA-T 細胞と老化関連 B 細胞により三次リンパ組織が形成され、傷害からの回復が遅延することが明らかになっている。そこで、高アデニン食により腎障害を誘導した 12 ヶ月齢のマウスに化合物を投与し、傷害が軽減するかどうか検討した。その結果、化合物投与群で、腎疾患のマーカである

る血清中のクレアチニンの濃度や、腎臓において炎症性の遺伝子の発現が低下した（図2）。

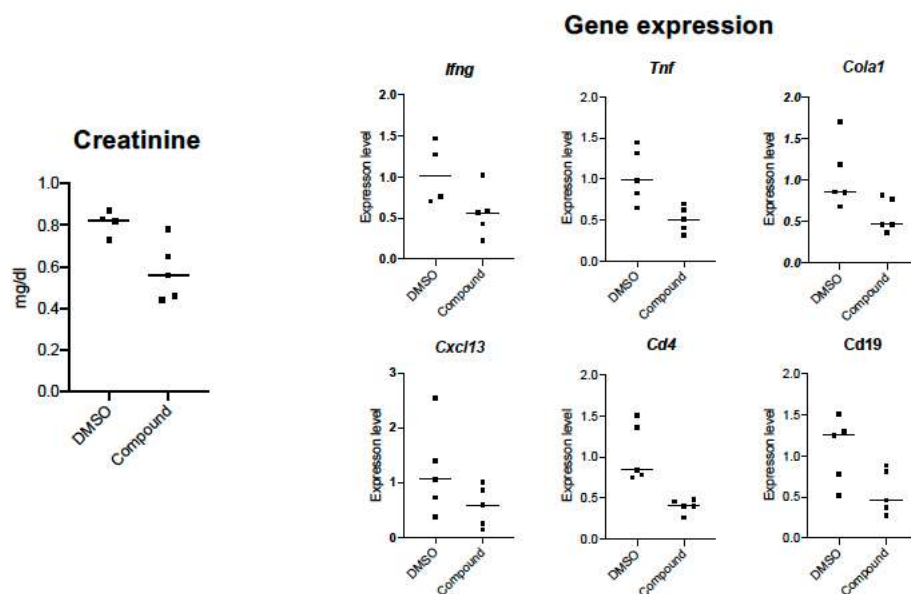


図2. 腎臓疾患モデルにおける化合物投与の効果

- A. 血中クレアチニン濃度、
- B. 腎臓における炎症関連遺伝子の発現

## 2. SA-T 細胞産生メカニズムの解明

前項で示したキナーゼ阻害剤のライブラリーのスクリーニングにおいて、標的分子ごとに阻害効果を検討した。その結果、PI3 キナーゼ、Akt、mTOR、チロシンキナーゼに関連した分子を阻害する化合物群がオステオポンチン産生を抑制することが示された（図3）。

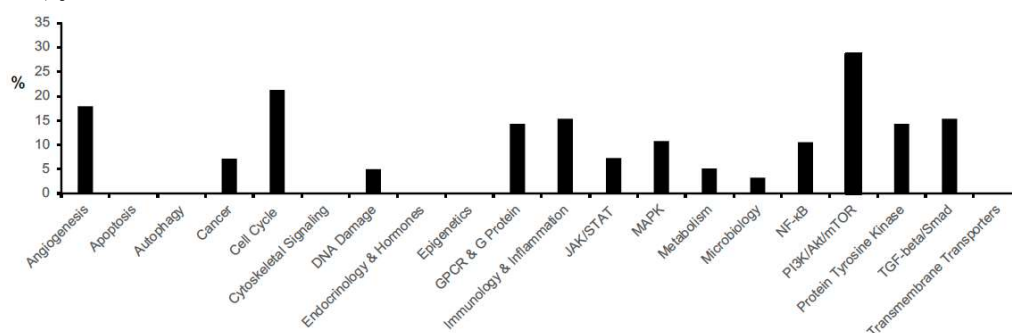


図3. シグナルパスウェイごとのヒット化合物の割合

上記でヒットしたチロシンキナーゼ阻害剤について内訳を解析したところ、レセプターチロシンキナーゼの1つである TAM レセプターに対する阻害剤がオステオポンチンの産生や SA-T 細胞の分化を抑制していることが明らかになった。そこで、SA-T 細胞

における TAM レセプターに属する受容体群の発現を検討したところ、遺伝子 X が発現していることを見出した。T 細胞における発現について月齢を追って解析したところ、月齢が上がるとともに分子 X+ T 細胞の割合が増加すること、CD4+ T 細胞のうち PD-1 陽性の細胞に分子 X が発現することを見出した (図 4)。これらのことから、SA-T 細胞の分化や機能が分子 X を介したシグナルによって制御されていることが示唆された。

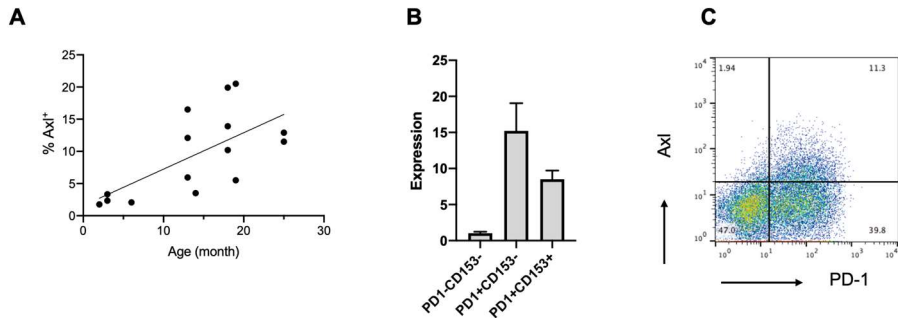


図 4. SA-T 細胞における分子 X の発現

A: マウスの月齢と分子 X 陽性 T 細胞の割合の相関

B: PD-1 陽性 T 細胞における遺伝子 X mRNA の発現増加

C: CD4+ T 細胞における分子 X と PD-1 の発現

### 3. ABC の性質の解明

ABC が濾胞 B 細胞と比較して、ケモカインに応答したアクチン重合が亢進し、遊走能が上昇していることを見出した (図 5)。また、コラーゲンゲルによる三次元環境下における遊走を比較したところ、ケモカイン非存在下においても、ABC が活発に遊走することを見出した。

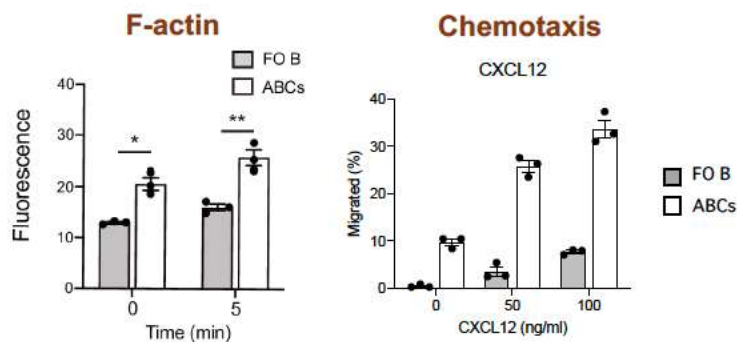


図 5. ケモカインに対する重合型アクチン (F-actin) の生成と B 細胞の遊走

ABC においてアクチン細胞骨格の再構成が亢進しているメカニズムを明らかにする目的で、ABC と濾胞 B 細胞より RNA を抽出し、アクチンの制御に関与する遺

伝子の発現を網羅的に比較した。その結果、Fscn1 と Pak1 が、遺伝子、タンパクレベルで ABC において高発現していることを見出した (図 6)。

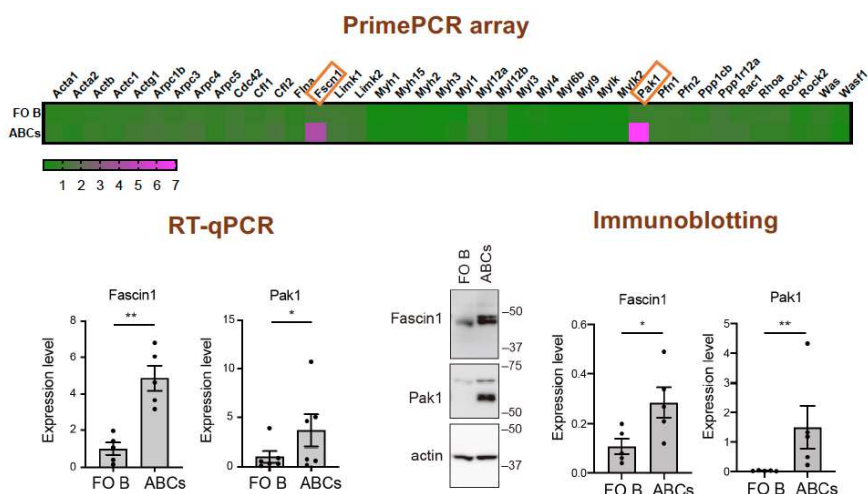


図 6. ABC における Fscn1 と Pak1 の高発現

そこで、Fascin1 (Fscn1 遺伝子の産物) と Pak1 に対する阻害剤の存在下でケモカインに応答した B 細胞の遊走を比較したところ、Fascin1 存在下では三次元環境下での遊走が、Pak1 存在下では全ての遊走が障害されることを示し、これらの因子の発現が上昇することにより、ABC の遊走が亢進することが明らかになった (図 7)。

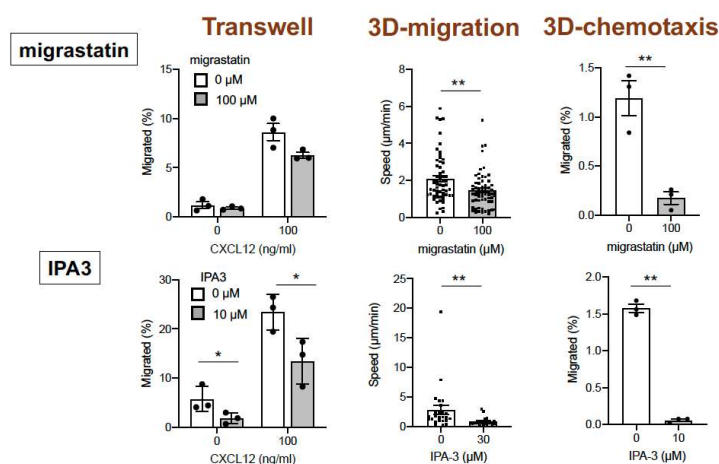


図 7. ABC の遊走における Fascin1 阻害剤 (migrastatin) と Pak1 阻害剤 (IPA3) の影響

#### 4. ABC の産生や機能を抑制する化合物の探索

現在までに、抗 IgM、R848、IL-21 存在下で B 細胞を培養して ABC に分化させる方法を確立した。現在、この培養液に既存薬のライブラリー由来の化合物を添加し、ABC の産生を抑制するものを探索した。その結果、ステロイドホルモンのシグ

ナルを制御する因子が ABC 分化を抑制することを明らかにした。

## 5. 獲得免疫系の老化に関わる分子の機能解析

これまでに、獲得免疫系の老化に関わる因子として分子 Y と DOCK11 を見出している。現在、これらのノックアウトマウスについて解析している。

### 1) 分子 Y 欠損による加齢性の肝炎の誘導

分子 Y は、がん細胞特異的に発現する因子として知られており、正常組織では精巢を除いて発現しないとされていた。しかしながら、主任研究者は、抗原受容体の刺激に応答して T 細胞で分子 Y の発現が誘導されること、T 細胞特異的に分子 Y を欠損したマウスは、加齢とともに T 細胞が肝臓に浸潤し、炎症病態を呈することを明らかにした (図 8)。

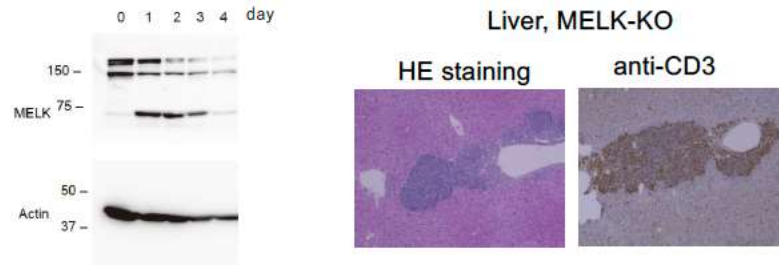


図 8. T 細胞における分子 Y の発現誘導と、分子 Y 欠損 T 細胞の肝臓への浸潤

次に、抗原受容体を刺激して分子 Y の発現を誘導した T 細胞について、ケモカインによる細胞遊走について検討した。活性化した T 細胞を炎症組織に誘導する CXCL9 や CXCL10 に対する細胞誘導をトランスウェルアッセイにより検討したところ、分子 Y 欠損細胞の遊走が野生型細胞に比べて亢進していることが明らかになった (図 9)。また、これらのケモカインに応答した Akt や Erk のリン酸化も分子 Y 欠損 T 細胞で亢進しており、分子 Y が活性化した T 細胞においてケモカインのシグナルを抑制している可能性が示唆された。

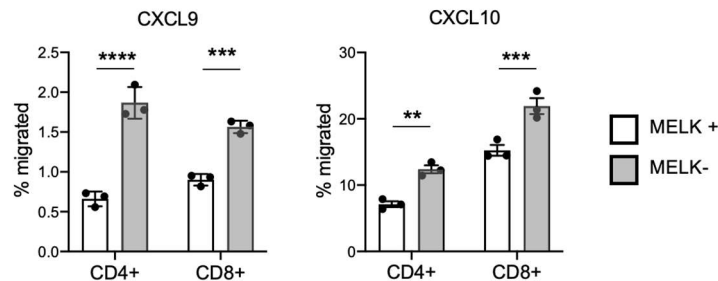


図 9. 分子 Y 欠損 T 細胞のケモカインに対する遊走

## 2) サイトカイン産生における DOCK11 の役割

DOCK11 は、免疫細胞特異的に発現する Cdc42 活性化因子で、研究代表者がクローニングした因子である。本研究の過程で、DOCK11 を欠損した B 細胞で LPS に応答したサイトカイン産生が低下することを明らかにした (図 10)。

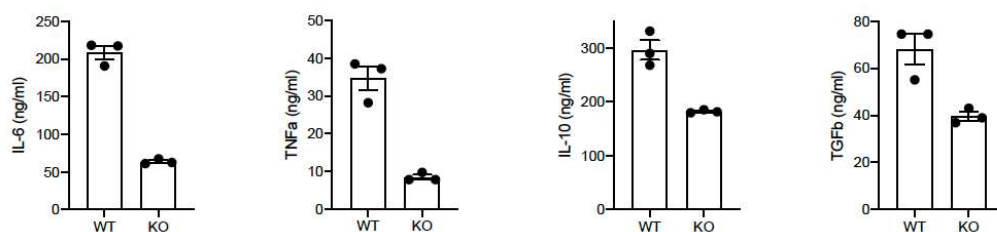


図 10. LPS 刺激に応答した野生型 (WT) および *DOCK11* 欠損 (KO) B 細胞のサイトカイン産生

また、共同研究者である Kaan Boztug 博士のグループにより、これまで原因不明とされてきた炎症性疾患の原因遺伝子が DOCK11 であることが示された。これを受けて、DOCK11 欠損マウスを用いて、T 細胞における DOCK11 の役割を検討した。その結果、抗原受容体の刺激に応答した CD8 陽性 T 細胞のサイトカイン産生や増殖が亢進していることを明らかにした。一方、CD4 陽性 T 細胞については、IL-2 の産生は上昇する一方、TNF- $\alpha$  や炎症抑制に作用する IL-4 の産生が傷害されていることが明らかになり、DOCK2 欠損により炎症応答を促進する I 型免疫が亢進していることが疾患の一因であることが示唆された (図 11)。

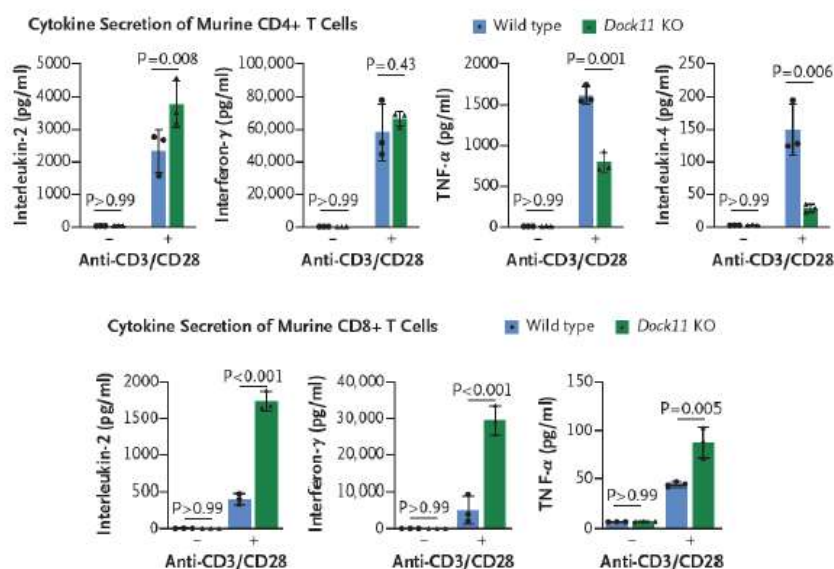


図 11. DOCK11 欠損 T 細胞におけるサイトカイン産生の異常



サイトカイン産生に関わるシグナルについて詳細に検討したところ、DOCK11を欠損したエフェクターT細胞において、抗原受容体刺激に応答したJNKのリン酸化が障害されていることを見出した。その結果、JNKにより抑制されるNFATc1の核移行が亢進し、このことがIL-2などのサイトカイン産生の亢進に寄与していることが示唆された(図12)。

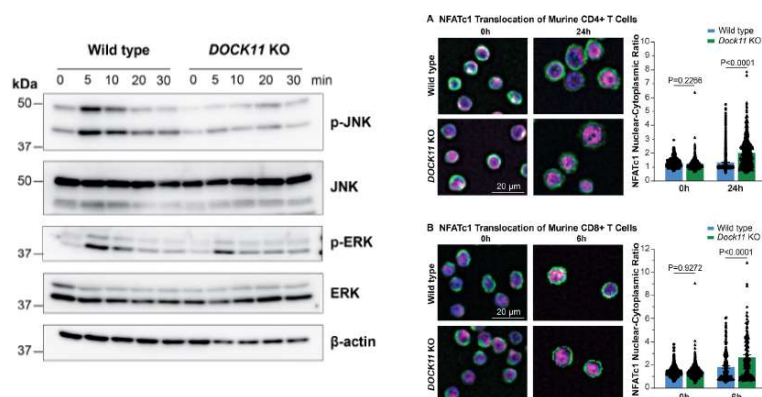


図 12. DOCK11 欠損 T 細胞における JNK リン酸化の障害と NFATc1 核移行の亢進

#### D. 考察と結論

##### SA-T 産生メカニズムとその制御

本研究において、CD4+ T 細胞のうち PD-1 陽性のもので分子 X の発現が上昇していることを見出した。In vitro で分子 X を阻害することにより、CD4+ T 細胞の SA-T への文化やオステオポンチンの分泌が抑制されることから、SA-T の産生や機能に分子 X が関与していることが示された。化合物のスクリーニングから、オステオポンチンの分泌が PI3 キナーゼ、Akt、mTOR の阻害剤で抑制されたことから、分子 X の下流でこれらの因子が関与していることが示唆された。加齢性腎疾患のモデルにおいても、分子 X 阻害剤の投与により病態が改善された。これらのことから、分子 X 阻害剤が SA-T の産生や機能を抑制することが明らかになり、SA-T が関わる加齢性の病態が改善する治療薬となり得ることが示された。

##### ABC における細胞骨格制御の亢進

本研究で、ABC において細胞骨格制御が亢進しており、活発に遊走することが示された。そこで、アクチン細胞骨格の制御に関する遺伝子の発現について検討したところ、ABC において Fscn1 と Pak1 の発現が上昇していることを見出した。Fscn1 の産物である Fascin1 はアクチン繊維の束化に関与しており、ABC における三次元環境下での遊走を促進していた。また、Pak1 はアクチン繊維の伸長に関与しており、ABC を含むリンパ球の遊走に不可欠な役割を担っている。これらのことから、Fascin1 や

Pak1 が増加することにより、ABC が二次リンパ組織などにおいて活発に遊走していると考えられる。

#### 分子 Y 欠損 T 細胞における組織浸潤

本研究において、T 細胞の活性化にともない分子 Y の発現が誘導されることを見出した。T 細胞特異的に分子 Y を欠損したマウスでは、加齢とともに肝臓や肺で T 細胞の浸潤とそれによる炎症応答が認められた。分子 Y 欠損 T 細胞は、CXCL9 や CXCL10 に対する遊走が亢進しており、これにより組織浸潤が促されることが示唆された。

#### DOCK11 を介したサイトカイン制御

本研究において、DOCK11 欠損 B 細胞および T 細胞において、それぞれ、LPS および抗原刺激に応答したサイトカイン産生に異常が認められることを見出した。T 細胞の IL-2 産生のメカニズムについて詳細に解析したところ、DOCK11 欠損により抗原刺激による JNK の活性化が障害されていることが明らかになった。これまでに、JNK が Cdc42 の下流で制御されていること、JNK が NFATc1 の活性化と核移行を負に制御していることが明らかになっている。これらのことから、DOCK11 が Cdc42 を介して JNK を活性化し、NFATc1 の活性化を抑制することで、過剰な IL-2 産生を抑制していることが示唆された。DOCK11 欠損により、IL-2 が過剰に産生されることにより、DOCK11 欠損患者で全身性の炎症が発症すると考えられる。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

##### 2022 年度

- 1) Sugiyama Y, Fujiwara M, Sakamoto A, Tsushima H, Nishikimi A, Maruyama M. The immunosenescence-related factor DOCK11 is involved in secondary immune responses of B cells. *Immun Ageing* (2022) 19: 2.
- 2) Sugiyama Y, Harada T, Kamei Y, Yasuda T, Mashimo T, Nishikimi A\*, Maruyama M\* (\*corresponding authors). A senolytic immunotoxin eliminates p16INK4a-positive T cells and ameliorates age-associated phenotypes of CD4+ T cells in a surface marker knock-in mouse. *Exp Gerontol* (2023) 174:112130.

##### 2023 年度

- 1) Block J, Rashkova C, Castanon I, Zoghi S, Platon J, Ardy RC, Fujiwara M, Chaves B, Schoppmeyer R, van der Made CI, Jimenez Heredia R, Harms FL, Alavi S, Alsina L, Sanchez Moreno P, Ávila Polo R, Cabrera-Pérez R, Kostel Bal S, Pfajfer L, Ransmayr B, Mautner AK, Kondo R, Tinnacher A, Caldera M, Schuster M, Domínguez Conde C, Platzer R, Salzer E, Boyer T, Brunner HG, Nooitgedagt-Frons JE, Iglesias E, Deyà-Martinez A, Camacho-Lovillo M, Menche J, Bock C, Huppa JB, Pickl WF, Distel M, Yoder JA, Traver D, Engelhardt KR, Linden T, Kager L, Hannich JT, Hoischen A, Hambleton S, Illsinger S, Da Costa L, Kutsche K, Chavoshzadeh Z, van Buul JD, Antón J, Calzada-Hernández J, Neth O, Viaud J, Nishikimi A, Dupré L, Boztug K. Systemic inflammation and normocytic anemia in DOCK11 deficiency. *N Engl J Med* (2023) 389: 527-539.

## 2. 学会発表

### 2021 年度

- 1) 錦見昭彦 新型コロナウイルス感染症の特徴とワクチン治療 第 32 回日本老年学会合同シンポジウム 2021.6.13
- 2) 藤原光宏、丸山光生、錦見昭彦 The role of MELK in B cell proliferation and differentiation. 第 50 回日本免疫学会学術集会 2021.12.9
- 3) 杉山悠真、津島博道、錦見昭彦、丸山光生 Diversity of p16INK4a associated chronological senescence in MEF culture. 第 44 回日本基礎老化学会大会 2021.6.12
- 4) 杉山悠真、津島博道、錦見昭彦、丸山光生 細胞老化における p16 INK4a の発現に付随した CC ケモカインクラスター遺伝子の特徴的発現様式 日本分子生物学会第 44 回年会 2021.12.3

### 2022 年度

- 1) 錦見昭彦、藤原光宏 老化関連 B 細胞における細胞骨格再構成の促進 第 95 回日本生化学会大会 2022.11.9
- 2) 杉山悠真、藤原光宏、坂本明彦、錦見昭彦、丸山光生 Deduced function of DOCK11 in B cells in secondary immune responses with protein antigens. 第 51 回日本免疫学会学術集会 2022.12.7
- 3) 杉山 悠真、原田 種展、錦見 昭彦、丸山 光生 細胞老化マーカーp16INK4a 発現に付随したクラスター遺伝子制御と個体老化の関連について 第 45 回日本分子生物学会年会 2022.12.1

### 2023 年度

- 1) Kondo R, Fujiwara M, Nishikimi A. Actin cytoskeleton remodeling is promoted in age-

- associated B cells. IAGG Asia/Oceania Regional Congress 2023. 2023.6.12
- 2) 近藤遼平、藤原光宏、錦見昭彦. 老化関連 B 細胞における細胞骨格再構成の亢進. 第 46 回日本基礎老化学会大会. 2023.6.16
  - 3) 杉山悠真、原田種展、錦見昭彦、丸山光生. セノリティックイムノトキシンによる p16INK4a 陽性 T 細胞の除去と T 細胞集団における加齢に伴う表現型の緩和. 第 46 回日本基礎老化学会大会. 2023.6.16
  - 4) 錦見昭彦. 細胞骨格制御とシグナル伝達における DOCK ファミリー分子の多彩な機能と構造基盤 ~DOCK GEF 発見から 20 年を経て~. 第 96 回日本生化学会大会. 2022.10.31
  - 5) Block J, Rashkova C, Castanon I, Zoghi S, Platon J, Ardy RC, Fujiwara M, Chaves B, Schoppmeyer R, van der Made CI, Harms FL, Ardy RC, Alavi S, Alsina L, Ávila Polo R, Sanchez Moreno P, Jimenez Heredia R, Hannich T, Huppa J, Distel M, Pickl W, Yoder J, Traver D, Engelhardt K, Linden T, Kager L, Hambleton S, Hoischen A, Illsinger S, Chavoshzadeh Z, Kutsche K, Da Costa L, van Buul JD, Calzada-Hernández J, Antón J, Neth O, Viaud J, Nishikimi A, Dupré L, Boztug K. Human DOCK11 deficiency causes defective erythropoiesis and systemic inflammation. 65th ASH Annual Meeting & Exposition. 2023.12.11
  - 6) 近藤遼平、藤原光宏、錦見昭彦. Actin cytoskeleton remodeling is promoted in age-associated B cells. 第 52 回日本免疫学会学術集会. 2024.1.18

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし