

2023年12月22日

<研究課題> CD45RBの発現亢進を介した加齢に伴うT細胞機能不全メカニズムの解明

代表研究者 神戸医療産業都市推進機構 先端医療研究センター 免疫機構研究部
研究員 和久(仲島) 由佳

【抄録】

加齢に伴うT細胞の機能不全はがんなどの加齢関連疾患の発症や進展に繋がることが知られている。これまでに脱リン酸化酵素 CD45RB は老化に伴い CD8 陽性ナイーブ T 細胞においてその発現が亢進し、T 細胞の機能を抑制することを見出した。この T 細胞老化の分子機構を明らかにするために網羅的な遺伝子発現データの解析を行った結果、CD45RB と発現相関するいくつかの因子を同定した。そのうちの1つである副刺激分子の発現が高い CD8 陽性ナイーブ T 細胞は発現の低い細胞よりも抗原依存的な増殖が抑制されていることを明らかにした。さらに、副刺激分子に対する阻害抗体を担がんマウスモデルに投与することで、高齢マウスで抑制されていたがん免疫治療による抗腫瘍効果が改善された。これらの結果から、CD45RB 発現と共に加齢に従い発現亢進する副刺激分子を阻害することが T 細胞老化による機能不全の回復につながる可能性が示された。

1. 研究の目的

加齢に伴う免疫力の低下は様々な加齢関連疾患の発症に繋がるとは良く知られている。免疫細胞のなかでも、T 細胞は老化による影響が最も大きい。これまでに、CD45RB は加齢に伴い発現増加し T 細胞機能の抑制に関与していることを見出していた。さらに、高齢マウスに強い免疫刺激を加えると CD45RB の発現レベルが低下し、老化 T 細胞の機能が改善されることを明らかにした。しかしながら、この CD45RB を介した T 細胞機能不全の分子機構は明らかになっていない。そこで本研究において、CD45RB の発現を指標にした遺伝子発現解

析を行うことで加齢に伴う T 細胞機能の抑制機構を明らかにすることを目的とする。

2. 研究方法と経過

2-1 ナイーブ T 細胞を用いたマイクロアレイデータ解析による CD45RB 発現と相関する因子の同定

若齢または高齢 C57BL/6 マウス由来のナイーブ細胞又は CD45RB の発現を指標に CD45RB^{high} と CD45RB^{low} に分けたナイーブ細胞から抽出した RNA をマイクロアレイ (Agilent, Mouse 8x60K v2) にかけて得られたデータを用いてパスウェイ解析や発現比較解析を NIH DAVID

Bioinformatics (david.ncifcrf.gov/tools.jsp) と Microsoft Excel を用いて行った。その際、Log 2 fold change 1.5 以上発現が増減した因子を選抜して解析に用いた。免疫刺激は異種の細胞 (Daudi) を尾静脈から投与することで誘導した。

2-2 制御候補因子の CD45RB との発現 関連検討

マイクロアレイデータ解析により得られた候補因子の発現を確認するために、若齢と高齢マウスのリンパ節から細胞を調整し、蛍光標識された抗体を用いて染色した後にフローサイトメーター (BD LSRFortessa) によるタンパク質発現解析を行った。CD45RB の発現や CD8 陽性 T 細胞サブセットの同定には抗 CD45RB 抗体、抗 CD44 抗体と抗 CD62L 抗体を候補因子の抗体とともに用いた。

2-3 副刺激分子の機能解析

副刺激分子の働きを検討するために、はじめに Miltenyi Biotec Naïve CD8⁺ T Cell Isolation Kit を用いて OT-1 マウスの脾臓由来の細胞から CD8 陽性ナイーブ細胞を単離した。単離した細胞における候補因子を蛍光標識された抗体により染色し、その染色性を指標に BD FACSMelody により異なる発現レベルのナイーブ細胞を単離した。単離純度を確認するために、副刺激分子の染色と同時に CD8, CD44, CD62L に対する抗体を用いた細胞染色を行った。単離した細胞を OT-1 マウス由来の CD8 陽性 T 細胞が認識出来る抗原である卵白アルブミン (OVA) を発現するがん細胞 (OVA-MC38) と IL-2 (2 ng/ml) 存在下で共培養し、生細胞数を調べることで増殖の検討を行った。

2-4 副刺激分子の作動薬による T 細胞

老化改善の検討

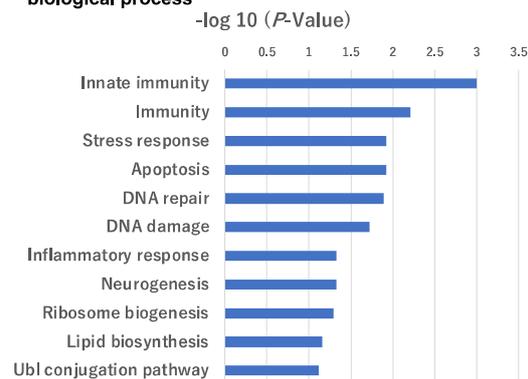
若齢と高齢マウスの皮内に MC38 大腸がん細胞 (5×10^5 細胞) を移植し、腫瘍組織を作らせた。がん細胞移植から 5 日後に副刺激分子に対する抗体 (3 mg/kg) と抗 PD-L1 抗体 (2.5 mg/kg) を腹腔内に投与し、同時に腫瘍サイズをノギスで計測することで腫瘍形成に対する効果を検討した。

3. 研究の成果

3-1 ナイーブ T 細胞を用いた網羅的遺伝子解析による CD45RB 発現と関連する因子の同定

マイクロアレイデータを用いて遺伝子発現解析を行った結果、CD45RB^{low} よりも CD45RB^{high} の細胞において発現が高い遺伝子が 400 存在していた。これらの遺伝子を用いて gene ontology 解析を行った結果、ストレス応答、DNA 損傷、炎症反応などの老化により亢進することが報告されている biological process に関する遺伝子が多く含まれていることが明らかになった (図 1)。

図 1 : CD45RB^{high} CD8陽性ナイーブT細胞で亢進している biological process

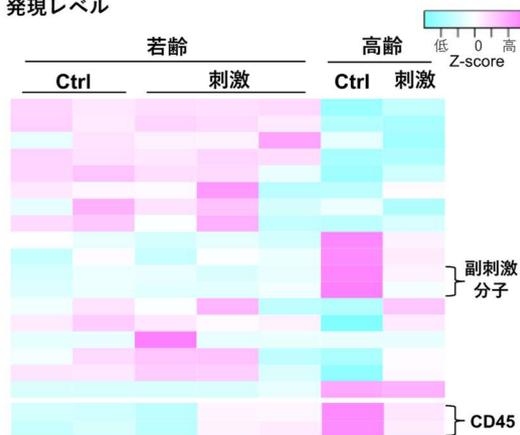


3-2 制御候補因子の CD45RB との発現 関連検討

上記の解析により得られた 400 遺伝子の中から、臨床応用を視野に入れて制御可能

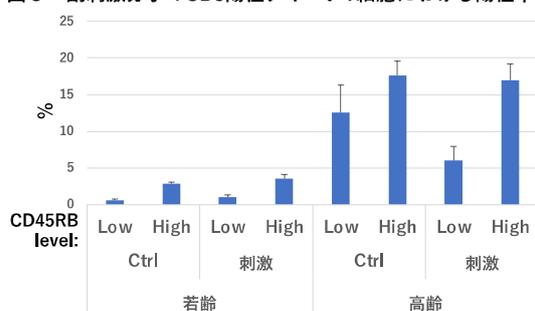
と予想される転写因子や細胞表面分子を抽出し、CD8 陽性ナイーブ細胞におけるそれら遺伝子の発現レベルを若齢と高齢、免疫刺激有り無しとの比較を行ったところ、細胞表面分子の1つである副刺激分子の発現が高齢マウス由来の CD8 陽性ナイーブ細胞において遺伝子発現が増加し、免疫刺激によりその発現が減少する CD45 のパターンと似た遺伝子発現変動を示した (図2)。

図2：CD8陽性ナイーブT細胞における候補因子の発現レベル



この遺伝子発現の結果と一致して、副刺激分子のタンパク質発現の陽性率もまた CD45RB^{low} よりも CD45RB^{high} で高かった (図3)。老化により、CD45RB^{high} ナイーブ細胞における副刺激分子の発現が増加するのに加えて、CD45RB^{low} での発現も増加していた。この CD45RB^{low} での発現は免疫刺激を加えることで減少したことから、T 細胞老化への関与が推測される (図3)。

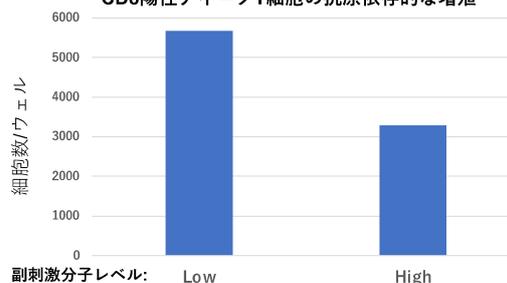
図3：副刺激分子のCD8陽性ナイーブT細胞における陽性率



3-3 副刺激分子の機能解析

CD8 陽性 T 細胞の抗原依存的な活性化における副刺激分子の働きを検討するために OT-1 マウスを用いて副刺激分子の発現レベルの異なるナイーブ細胞を単離し、OVA 発現細胞との共培養実験を行った。培養開始から2日後の細胞数を調べたところ、副刺激分子の発現が低い細胞の方が高い細胞よりもその数が多かった (図4)。この結果から、副刺激分子は抗原特異的なナイーブ細胞の活性化に対して抑制的な働きがあることが示唆された。

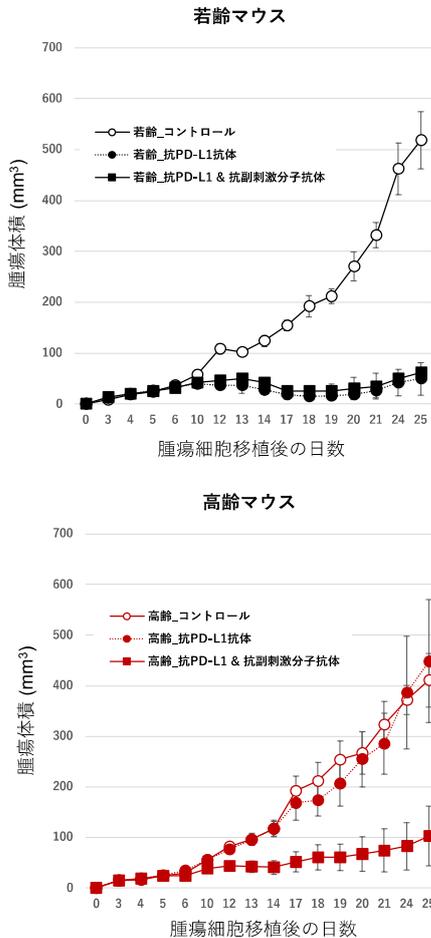
図4：異なる副刺激分子発現レベルを示すCD8陽性ナイーブT細胞の抗原依存的な増殖



3-4 副刺激分子の作動薬による T 細胞老化改善の検討

T 細胞の老化により強く影響を受ける現象の1つにがん免疫治療に対する耐性が挙げられる。そこで、同定した副刺激分子に対する阻害抗体をがん免疫治療マウスモデルに投与し、高齢マウスで見られる免疫治療 (PD-1/PD-L1 経路阻害治療) 耐性が改善し抗腫瘍活性が現れるかどうかを検討した。これまでの報告と同様に、若齢マウスでは強い抗腫瘍効果を表す抗 PD-L1 抗体単独治療が、高齢マウスでは全く抑制せずに耐性を示した (図5)。一方、副刺激分子の阻害抗体との併用治療は、高齢マウスにおける腫瘍形成を強く抑制した (図5)。

図5：副刺激分子阻害の腫瘍形成への影響



以上の結果から、CD45RB との発現相関を示す副刺激分子が老化に伴いナイーブ細胞において増加することで、CD8 陽性 T 細胞の抗原依存的な活性化を抑制する可能性が示された。この分子を阻害すると、高齢マウスにおいて抑制されていた PD-1 阻害治療による抗腫瘍効果が回復したことから、副刺激分子は T 細胞老化の改善のための標的として有望であり、本研究をさらに発展させることで老化治療方法の開発につながる事が期待できると考えられる。

4. 今後の課題

今回、単離細胞数が少なく検出できな

ったサイトカイン産生を含む副刺激分子の T 細胞機能に関するより詳細な役割や、CD45RB との関係性を解析することで、T 細胞老化メカニズムの全貌解明や老化治療方法の開発につなげていきたい。

5. 研究成果の公表方法

本研究の一部は下記のシンポジウムにて発表を行った。さらに、上記の研究結果と、今後の課題で述べた様な追加実験の結果を合わせて、学会発表や研究論文として投稿・公表する予定である。

筑波大学開学 50 周年記念 TARA シンポジウム 「免疫老化の機構と改善への試み」仲島由佳 2023 年 6 月 30 日

6. 謝辞

本研究を推進するにあたり、多大なご支援を賜りました公益財団法人 三井住友海上福祉財団に深く感謝いたします。

The mechanism of T cell aging through enhanced CD45RB expression

Primary Researcher: Yuka Nakajima

Researcher, Department of Immunology, Institute of Biomedical Research and Innovation (IBRI), Foundation for Biomedical Research and Innovation at Kobe (FBRI)

Dysfunctions in T cells during aging are associated with the onset and progression of age-related diseases including cancer. Previously we found that elevated expression of phosphatase CD45RB in naïve CD8⁺ T cells was associated with T cell aging. To elucidate the mechanism of T cell aging through enhanced CD45RB expression, we analyzed microarray data used RNAs from CD45RB^{high} and CD45RB^{low} naïve CD8⁺ T cells and identified some genes whose expression levels were correlated with CD45RB expression. One of those factors was a co-stimulation molecule which inhibited the growth of CD8⁺ T cells. Moreover, the suppression of the co-stimulation molecule by the specific antibody recovered anti-tumor activity in aged mouse models for cancer immunotherapy. These results suggest the possibility that the inhibition of the co-stimulation molecule, which is co-expressed with CD45RB, may be linked with recovery of T cell aging.