

免疫老化が加齢性疾患に及ぼす影響の解明

研究者氏名 □□ 准教授 佐野 元昭

日本所属機関 □□ 慶應義塾大学医学部循環器内科

中国研究者氏名 □□ 教授 陆林

中国所属機関 □□ 上海交通大学医学附属瑞金医院
循環器内科

要 旨

加齢に伴って急速に増加する加齢随伴記憶型T細胞集団はsenescence-associated secretory phenotypeを持ち、慢性炎症を基盤とした加齢関連疾患の発症に普遍的に関与していると考えられる。一方で、肥満、糖尿病は個体の老化を加速させることが知られているが、これらの患者ではより若年のうちから加齢随伴記憶型T細胞が増加する現象を見出した。本研究では、加齢と生活習慣病が心血管病、糖尿病を引き起こす共通の分子基盤として、加齢随伴記憶型T細胞の出現に着目して、その増加が内臓脂肪組織のリモデリング、インスリン抵抗性に及ぼす影響について、加齢マウス、食餌誘導性肥満モデルマウスを駆使して解析する。加齢マウスにおいて、加齢随伴記憶型T細胞が、2次リンパ組織である脾臓だけでなく、内臓脂肪組織中にも出現していること、寿命の延長効果が認められるカロリー制限をしたマウスでは、脾臓、内臓脂肪組織中のこの特殊なT細胞集団の出現が抑制されることを見出した。若いマウスから取り出した正常T細胞集団をラベルした後、加齢マウスに投与すると、短い期間で、加齢マウスにおいて出現する特殊なT細胞集団に変化することから、ある種の環境因子が、T細胞老化を加速する可能性が示唆された。また、抗体を用いてこの特殊なT細胞集団を除去すると加齢マウスの体重や、食欲には影響を与えずに、インスリン抵抗性を改善することを見出した。この結果は、免疫老化を抑制することで加齢に伴う慢性疾患を制御することができるという可能性を示唆する。

Key Words

T細胞, 加齢, 慢性炎症, 肥満、糖尿病

目的や研究背景：

京都大学の湊長博教授らは、CD4+ T細胞の加齢に伴う機能異常は、CD4+ 記憶型T細胞集団の全体的な機能低下ではなくて、CD4+ 記憶型T細胞集団の中にProgrammed cell death-1 (PD-1) を発現する特殊な細胞集団が出現することに起因することを提唱した。この特殊なT細胞集団は、抗原受容体を介する増殖や免疫サイトカイン産生などの獲得免疫機能を示さないが、恒常性維持増殖能をもち、オステオポンチンなどの炎症性サイトカインを産生するなどsenescence-associated secretory phenotype (SASP)の特徴を保有していることから、senescence-associated T cell (加齢随伴記憶型T細胞) と命名された。この老化随伴T細胞の出現は、老化マウスだけでなく、悪性疾患や全身性自己免疫性病の発症にも深く関与していることを報告している (Proc Natl Acad Sci U S A. 2009)。我々は、加齢マウスにおいて、加齢随伴記憶型T細胞が、2次リンパ組織である脾臓だけでなく、内臓脂肪組織中にも出現していること、寿命の延長効果が認められるカロリー制限をしたマウスでは、脾臓、内臓脂肪組織中のこの特殊なT細胞集団の出現が抑制されることを見出した。若いマウスから取り出した正常T細胞集団をラベルした後、加齢マウスに投与すると、短い期間

で、加齢マウスにおいて出現する特殊なT細胞集団に変化することから、ある種の環境因子が、T細胞老化を加速する可能性が示唆された。

研究対象と方法：

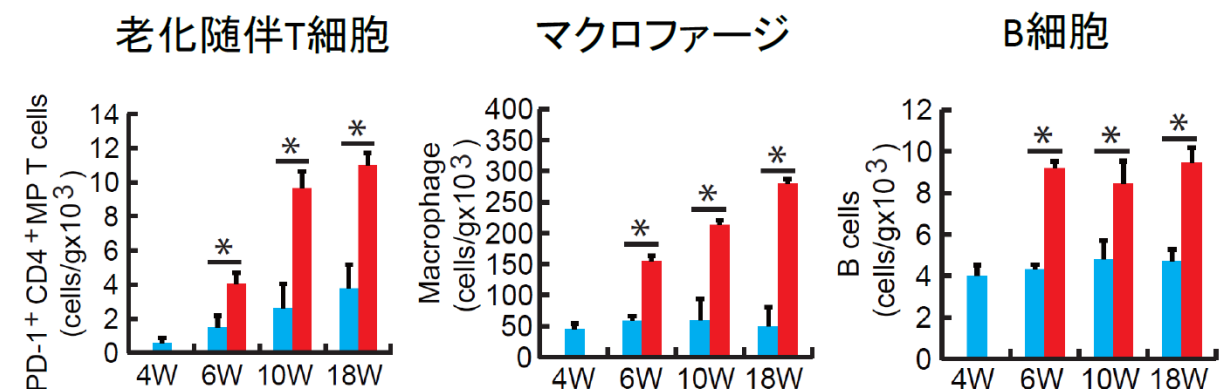
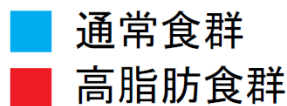
高脂肪食負荷によって食餌誘発性肥満（Diet-Induced Obesity）モデルを作製し、内臓脂肪組織において出現する加齢随伴記憶型 T 細胞の性質を明らかにし、加齢随伴記憶型 T 細胞が誘導される分子機序を解明する。さらに、加齢随伴記憶型 T 細胞を抗体で除去することによって、インスリン抵抗性が改善できるかを検証する。

結 果：

（1）高脂肪食を負荷したマウスの内臓脂肪組織を経時的に解析して、加齢随伴記憶型 T 細胞の局在や、他の免疫細胞との4次元的な連携（時間空間的關係）を解析した。

生後4週間から高脂肪食を投与すると、体重が増加、内臓脂肪が蓄積し、耐糖能異常、インスリン抵抗性が出現する。これと一致して、内臓脂肪組織中に加齢マウスに出現する加齢随伴記憶型 T 細胞 [PD-1+ memory phenotype (MP) CD4+ T cell 細胞集団が出現していた(下図)。

老化随伴T細胞は高脂肪食負荷後2週間で出現する



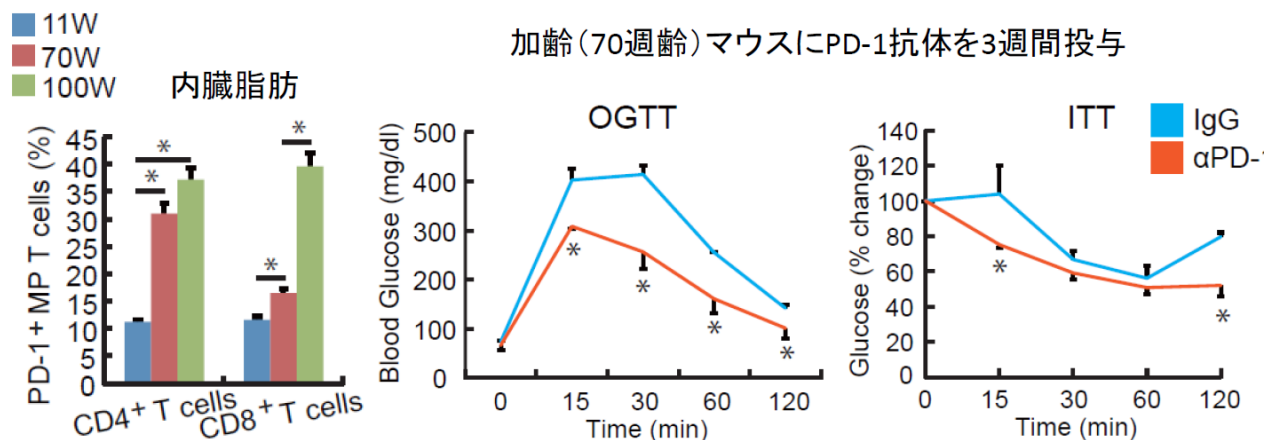
加齢随伴記憶型 T 細胞高脂肪食開始 2 週間後の早期から出現し、内臓脂肪組織の免疫染色を行うと、Crown-like structure の中で細胞死をおこした死亡細胞の周りを取り囲むように出現していた。

（2）食餌性肥満マウスの内臓脂肪から、加齢随伴記憶型 T 細胞を取り出して、抗原受容体刺激に対する増殖能、p21、DNA 障害マーカー γ -H2AX の発現の有無、免疫サイトカインの産生を確認する。加齢随伴記憶型 T 細胞は、抗原受容体刺激に対する増殖能が低下、p21、DNA 障害マーカー γ -H2AX の発現が亢進、高濃度のオステオポンを分泌することが分かった。

（3）抗体を用いて PD-1+加齢随伴記憶型 T 細胞を除去することによって、食餌性肥満マウスの内臓脂肪炎症、Crown-like structure の形成、インスリン抵抗性が改善した。高脂肪食負荷直後から、抗体を投与した場合には、内臓脂肪炎症、インスリン抵抗性の出現を抑制することができた。(下図)

（4）食餌誘発性肥満マウスの内臓脂肪から取り出した PD-1+加齢随伴記憶型 T 細胞を、通常食で飼育した非肥満マウスに adoptive transfer（細胞移入）すると、脂肪組織の炎症、Crown-like structure の形成インスリン抵抗性を惹起できた。

加齢マウスの内臓脂肪で増加している老化随伴T細胞を除去するとインスリン抵抗性が改善する



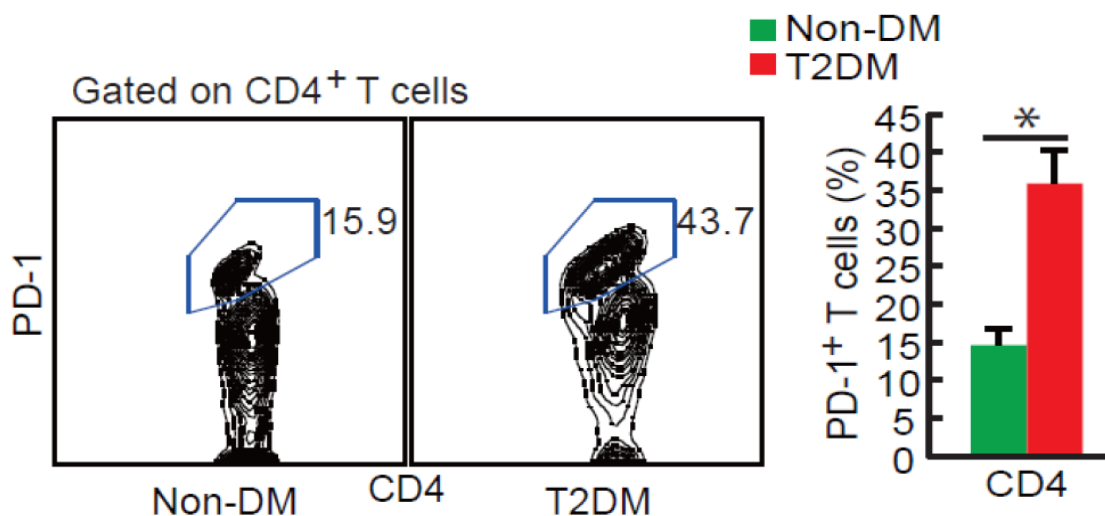
(5) 食餌誘発性肥満マウスの内臓脂肪で、加齢随伴記憶型 T 細胞が出現する機序を調べた。まずは、若い非肥満マウスの脾臓から取り出した T 細胞を低酸素、アンジオテンシン II、活性酸素、パルミチン酸、AGE、各種向炎症性サイトカインなどのストレス下で培養したが、加齢随伴記憶型 T 細胞は、出現しなかった。

次に、加齢随伴記憶型 T 細胞の出現に自己抗原刺激による反復刺激が関与している可能性を考慮して、マクロファージや B 細胞など、抗原提示細胞と正常 T 細胞の共培養を試みたところ、加齢随伴記憶型 T 細胞への分化が *in vitro* で再現された。

clodronate liposomesを用いてマクロファージを除去したマウス、B細胞のいないマウス(μ MTマウス)に高脂肪食負荷を行うと、内臓脂肪における加齢随伴記憶型T細胞の出現が抑制されることが確認された。

(6) 糖尿病患者、非糖尿病患者が胆嚢摘出術を受ける時に、収集した大網中に含まれる老化随伴 T 細胞 (PD-1⁺ T 細胞) をFACSで解析した。その結果、糖尿病患者には、非糖尿病患者に比べて、有意に老化随伴 T 細胞が増加していた。(下図)

糖尿病患者の大網には老化随伴T細胞が非糖尿病患者より有意に多数含まれる



考 察 :

糖尿病性合併症の中で、細小血管合併症（網膜症、腎症、神経障害）は、血糖の厳格なコントロールで

病態の進展抑制、改善治癒が認められる。一方で、大血管合併症（動脈硬化、心筋梗塞、脳梗塞）は、血糖の厳格なコントロールを行っても、病態の改善効果は乏しく、心血管イベント抑制効果は、いかに早期から治療介入できたかに依存している。糖尿病患者における”負の遺産”は、これまで高血糖の記憶として説明されてきたが、血糖値があまり高値でない耐糖能異常の患者でも動脈硬化は進行していく。申請者は「肥満、メタボリックシンドロームという病態において、内臓脂肪組織内の免疫空間ニッチェに錯乱がおこり、その情報が加齢随伴記憶型 T 細胞の蓄積という形で記憶される」ことが”負の遺産”の中心的プレイヤーであると発想するにいたった。加齢随伴記憶型 T細胞の蓄積は、インスリン抵抗性を引き起こし、糖尿病を発症させるだけでなく、動脈硬化の進行にも直接関与する。本研究課題では、過食に伴って内臓脂肪組織で加齢随伴記憶型 T 細胞が誘導されるメカニズム、加齢随伴記憶型 T 細胞のユニークな機能、その増加が内臓脂肪組織のリモデリング、インスリン抵抗性に及ぼす影響について、食餌誘導性肥満モデルマウスを駆使して解析した。加齢随伴記憶型 T 細胞を制御することによって糖尿病を制御する技術基盤として、有望であると考えられた。

参考文献：

1. Anti-programmed cell death 1 antibody reduces CD4+PD-1+ T cells and relieves the lupus-like nephritis of NZB/W F1 mice. Kasagi S, Kawano S, Okazaki T, Honjo T, Morino bu A, Hatachi S, Shimatani K, Tanak Y, Minato N, Kumagai S. J Immunol. 2010 Mar 1;184(5):2337-47.
2. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. Hatanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K, Higuchi T, Yagi H, Takakura K, Minato N, Honjo T, Fujii S. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Feb 27;104(9):3360-5.

作成日：2015年 3月11日

