

厚生科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)
(総括)研究報告書

免疫系の老化を制御するペースメーカーの同定に関する研究

主任研究者 中山 俊憲 千葉大学大学院医学研究科・助教授

感染症やアレルギーの病態とTh1とTh2のバランスには密接な相関関係が示唆されている。このTh1/Th2のバランスについても老化とともに変化することが考えられる。本研究計画では、加齢とともに免疫能が特異な変化をしめす、チロシンキナーゼなどのシグナル伝達分子の遺伝子操作マウスに注目し、若年マウスと老化マウスのリンパ組織を材料にして、免疫系の老化を制御するペースメーカー的役割を持つ分子の同定を目的としている。

A. 研究目的

獲得免疫の中心的役割を果たしているT細胞は胸腺で分化・成熟するが、胸腺は10才頃をピークにして萎縮し、65才を越えた老人では組織の殆どが脂肪組織に置き換わっている。加齢とともにT細胞の外来抗原に対する反応性は低下し、自己抗原に対する反応性は上昇することから、老人では胸腺でのT細胞の分化・成熟に支障がおきていることが予想される。さらに、外来抗原の刺激(感染)によって、末梢リンパ組織ではT細胞がそれぞれ異なったリンホカインを産生するTh1またはTh2タイプのメモリーT細胞に分化する。感染症やアレルギーの病態とTh1とTh2のバランスには密接な相関関係が示唆されている。このTh1/Th2のバランスについても老朽とともに変化すること考えられる。本研究計画では、加齢とともに免疫能が特異な変化をしめす、チロシンキナーゼなどのシグナル伝達分子の遺伝子操作マウスに注目し、若年マウスと老化マウスのリンパ組織を材料にして、免疫系の老化を制御するペースメーカー的役割を持つ分子の同定を行うことを目的としている。

B. 研究方法

次の4つの研究手法を用いて老化に伴う反応性の変化を検討した。

1)Th1とTh2細胞の分化誘導：卵白アルブミン特異的なT細胞レセプター(TCR) $\alpha\beta$ トランスジェニックマウス(DO10Tg)の脾臓からナイーブT細胞(CD4⁺CD44⁻)をセルソーターで分離し、この細胞をin vitroで特異的ペプチドと抗原提示細胞を

用いて刺激した。5日後に細胞を回収し、抗TCR抗体で再刺激した後、細胞内に産生されているサイトカイン(IL-4、IFN- γ)を蛍光抗体を用い、フローサイトメトリーで検出する。この検出法はsingle cell analysisなので、これまで頻繁に行われてきたサイトカインの産生量を測る手法と比べ、どのサイトカインを産生する細胞がいくつ存在するか正確に測定することができる長所がある。さらに、IL-4とIFN- γ を二重染色することができ、IFN- γ もIL-4も産生しないナイーブT細胞、IFN- γ を産生しIL-4を産生しないTh1細胞、IL-4を産生しIFN- γ を産生しない細胞を明確に区別することができる。約8週のyoungadultマウスと12カ月の老齢マウスを用いてTh1/Th2細胞の分化における加齢の影響をしらべた。

2)T細胞抗原レセプターを刺激した後におこる細胞内カルシウムイオン濃度の上昇について、約8週のyoungadultマウスと8カ月、12カ月の老齢マウスを用いて加齢の影響をしらべた。T細胞を脾臓から分離・調製し、カルシウム感受性の色素Indo-1を細胞に取り込ませる。その後、ピオチン化した抗TCR抗体とアビジンを用いて37度の状態でTCRを架橋刺激し、その後起こる細胞内カルシウムイオン濃度の上昇について比較検討した。

3)T細胞抗原レセプターを刺激した後におこる細胞内シグナル伝達系のうちRas/MAPKのカスケードの活性化について、約8週のyoungadultマウ

スと8カ月、12カ月の老齢マウスを用いて加齢の影響をしらべた。

- 4)抗原ペプチドによってT細胞抗原レセプターを刺激したあとにみられるT細胞の増殖反応とサイトカイン(IL-2、IL-4、IFN- γ)の産生能、約8週のyoung adult マウスと8カ月、12カ月の老齢マウスを用いて加齢の影響をしらべた。

C. 研究結果

次のような結果が得られた。

- 1)Th1/Th2細胞の分化については、加齢ともなっていてTh2細胞の分化に障害がでた。これは、6ヶ月以上で顕著になった。
- 2)カルシウム反応については、加齢ともなっていて、上昇が見られた。特に、backgroundの上昇が顕著であった。
- 3)Ras/MAPKのカスケードの活性化については、加齢に伴って低下がみられた。
- 4)増殖反応と違って、サイトカイン(IL-2、IL-4、IFN- γ)の産生能については、老化マウスのTリンパ球では、調べた全てのもので、上昇がみられた。

D. 考察

今年度の解析で、老齢マウスのT細胞の反応性の変化について、いくつかの興味深い現象についてその詳細が明らかになった。まず、アレルギーの発症や細胞外の寄生虫感染などにおける生体防御を担っているとされるTh2細胞の分化が老齢マウスのT細胞では非常に低下していた。一方、細胞性免疫を担うと考えられている、Th1細胞の分化については変化が見られなかった。これらの結果は、老化に伴う生体防御機能の変化について、どのような感染に対する機能低下が顕著に現れるかを考える上で、重要である。また、細胞内シグナル伝達については、特にRas/MAPKのカスケードの活性化に低下が見られ、TCRによる抗原認識後におこる細胞増殖に異常が生じている可能性が示唆されたが、抗TCR抗体によるT細胞の刺激に対する増殖反応は正常に起こっていた。今年度の解析でわかった、6ヶ月の時点を超えて老化現象が顕著になる点について今後の検討が必要である。

E. 結論

今年度の研究によって、Th2細胞の分化が加齢にともなって非常に低下していること、TCRの下流のシグナル伝達系に特徴的な変化が生じていることなどが確認された。老化に伴う生体防御機能の変化を理解する上で、これらの新知見は有用である。

F. 研究発表

1. 発表論文

- 1.Hasegawa, A., Ueno, Y., Yamashita, M., Nakayama, T., and Tada, T. : Regulation of T cell autoreactivity to MHC class II by controlling CD80 (B7-1) expression on B cells. Int. Immunol. 10:147-158,1998.
- 2.Yamashita, M., Hashimoto, K., Kimura, M., Kubo, M., Tada, T. and Nakayama T. : Requirement for p56/ck tyrosine kinase activation in T helper subset differentiation. Int. Immunol. 10:577-591, 1998.
- 3.Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Toura, I., Kaneko, Y., Sato, H., Kondo, E., Harada, M., Koseki, H., Nakayama, T., Tanaka, Y., and Taniguchi, M. : Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated Va14 NKT cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95:5690-5693, 1998.
- 4.Shimizu, C., Li, X.-K., Kimura, M., Hashimoto, K., Sugaya, K., Kubo, M., Suzuki, S., and Nakayama, T. : A novel immunosuppressant, FTY720 increases the efficiency of a superantigen-induced peripheral T cell deletion whilst inhibiting negative selection in the thymus. Immunology 94:503-512, 1998.
- 5.Nakayama, T., Yamashita, M., Kubo, M., Kimura, M., Shimizu, and Tada, T. : TCR-mediated signal transduction pathways that control helper T cell differentiation : Requirement for activation of Lck tyrosine kinase and Ras/MAPK pathway in Th2 cell differentiation. 10th International congress of in Immunology. International Proceedings Division Co., Bologna, Italy. pp589-593 , 1998.
- 6.Kubo M., Nakayama, T., and Tada, T. : Involvement of JAK-STAT signaling cascade in T cell subset-specific expression of IL-4 gene. 10th International congress of in Immunology.

- International Proceedings Division Co., Bologna, Italy. pp443-446, 1998)
7. Yamashita, M., Kimura, M., Kubo, M., Shimizu, C., Tada, T., Perlmutter, R. M., and Nakayama T. : TCR-mediated activation of Ras/MAPK pathway controls IL-4 receptor function and Th2 cell differentiation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96:1024-1029, 1999.
 2. 学会発表
 1. Nakayama, T., Yamashita, M., Kubo, M., Hashimoto, K. and Kimura, M. : Requirement for p56^{lck} tyrosine kinase activation in T helper subset differentiation. Keystone Symposia Colorado, January 25-30, 1998.
 2. Yamashita, M., Kubo, M. and Nakayama, T.: REQUIREMENT FOR p56^{lck}(LCK) TYROSINE KINASE ACTIVATION IN T HELPER SUBSET DIFFERENTIATION. FASEB meeting. San Francisco, April 18-22, 1998.
 3. Kubo, M., Tada, T. and Nakayama, T. : INVOLVEMENT OF JAK-STAT SIGNALING CASCADE IN T CELL SUBSET-SPECIFIC EXPRESSION OF IL-4 GENE. FASEB meeting. San Francisco, April 18-22, 1998.
 4. Kubo, M., Nakayama, T. and Tada, T. : INVOLVEMENT OF JAK-STAT SIGNALING CASCADE IN T CELL SUBSET-SPECIFIC EXPRESSION OF IL-4 GENE. 10th International Congress of Immunology. New Delhi, . NOVEMBER 1-6, 1998
 5. Yagi, R., Tada, T., Nakayama, T. and Kubo, M.: T CELL RECEPTOR STIMULATION AND CD28 COSTIMULATION INCREASES IL-4 RECEPTOR SENSITIVITY TO BE REQUIRED FOR TH2 DIFFERENTIATION. 10th International Congress of Immunology. New Delhi, NOVEMBER 1-6, 1998.
 6. Nakayama, T., Yamashita, M., Kubo, M., Hashimoto, K. and Kimura, M. : REQUIREMENT FOR p56^{lck} TYROSINE KINASE ACTIVATION IN T HELPER SUBSET DIFFERENTIATION. 10th International Congress of Immunology. NEW DELHI, NOVEMBER 1-6, 1998.
 7. 清水千織、李小康、木村元子、鈴木盛一、中山俊憲. 免疫抑制剤FTY720がT細胞のアポトーシスに与える効果. 第5回日本臓器保存生物医学会総会. 東京, 5月28-29日, 1998年
 8. 木村元子、中山俊憲. スーパー抗原(SER)によって誘導されたアナジ-T細胞におけるシグナル伝達系の解析. Kyoto T Cell Conference. 京都, 10月8-9日, 1998年
 9. 山下政克、久保允人、中山俊憲. TCRを介したシグナル伝達系によるTh1/Th2細胞の分化決定機構の解析. Kyoto T Cell Conference. 京都, 10月8-9日, 1998年
 10. Taniguchi, M., Kawano, T., Karasawa, M., Tanaka, Y., Nakayama, T., Ito, K. and Sekiya, S. : Function of Va14 NKT cells. 第28回日本免疫学会総会シンポジウム. 神戸, 12月2-4日, 1998年
 11. 八木良二、山下政克、奥村康、多田富雄、中山俊憲、新井孝夫、久保允人. Th2細胞の機能分化におけるCD28補助シグナルの役割. 第28回日本免疫学会総会. 神戸, 12月2-4日, 1998年
 12. 久保允人、中山俊憲、多田富雄. Th1とTh2細胞におけるIL-4レセプターシグナル伝達の質的相違. 第28回日本免疫学会総会. 神戸, 12月2-4日, 1998年
 13. 佐藤宏、田中裕二郎、中山俊憲、谷口克. NKβ細胞はin vitroでVα14NKT細胞に分化する. 第28回日本免疫学会総会. 神戸, 12月2-4日, 1998年
 14. 崔俊青、渡辺直熙、河野鐵、中山俊憲、谷口克. 抗原特異的IgE産生抑制. 第28回日本免疫学会総会. 神戸, 12月2-4日, 1998年
 15. 鎌田憲明、河野鐵、田中裕二郎、石塚稲夫、杉田陸海、矢野郁也、中山俊憲、谷口克. マウスVα14NKT細胞を活性化する糖脂質の構造. 第28回日本免疫学会総会, 神戸, 12月2-4日, 1998年
 16. 河野鐵、田中裕二郎、佐藤宏、天野雅彦、東野和子、伊藤俊広、中山俊憲、長田久夫、関谷宗英、谷口克. ヒトVα24NKT細胞は臍帯血に存在している. 第28回日本免疫学会総会. 神戸, 12月2-4日, 1998年
 17. 山下政克、木村元子、清水千織、久保允人、Roger M. Perlmutter、中山俊憲. TCRを介したシグナル伝達系によるTh1/Th2細胞の分化決定機構. 第28回日本免疫学会総会. 神戸, 12月2-4日, 1998年
 18. 吉川えみ子、山下政克、菅谷薫子、田沢裕光、中山俊憲. マウス胸腺CD4+T細胞における

Th1/Th2分化. 第28回日本免疫学会総会, 神戸,
12月2-4日, 1998年

19.常世田好司、横沢恭一、中山俊憲、新井孝夫、
久保允人. カルシニューリンの活性化と核移行を
制御する分子機構. 第28回日本免疫学会総会.
神戸, 12月2-4日, 1998年

20.清水千織、李小康、木村元子、鈴木盛一、中山
俊憲. 免疫抑制剤FTY720がマウスT細胞のアポ
トーシスに与える効果. 第28回日本免疫学会総会
神戸, 12月2-4日, 1998年

21.木村元子、中山俊憲. スーパー抗原(SEB)によっ
て誘導されたアナジ-T細胞におけるシグナル伝
達系の解析. 第28回日本免疫学会総会. 神戸, 12
月2-4日, 1998年