

厚生科学研究費補助金
(長寿科学研究事業)
研究報告書

老化に伴う免疫不全の分子機構の解析

主任研究員 広川勝昱 (東京医科歯科大学)

1996~1998

96A1107

老化に伴う免疫不全症の分子機構の解析

広川勝昱（東京医科歯科大学医学部教授）

①老化によるT細胞機能不全の第一の原因は生後早くから始まる胸腺の機能低下であり、それは視床下部一下垂体によりコントロールされている。②T細胞機能不全は数の減少、サブセットの変化、シグナル伝達の異常に起因する。③酸化ストレスによりT細胞受容体の構成因子であるCD3と鎖が消失し、T細胞の機能異常を起こす一因となっている。④高齢者では胸腺由来のT細胞不全を補うようなかたちで、胸腺外分化T細胞と好中球が増加し、免疫機能の維持に重要な役割を果たしている。⑤老化に伴い増加する自己免疫現象の解析に有用なシェーグレン症候群モデルマウスを樹立した。原因となる自己抗原が同定され、その自己抗体の加齢に伴う増加が認められた。

【研究組織】

○広川勝昱（東京医科歯科大学大学院医学研究科感染免疫病理教授）
成内秀雄（東京大学医科学研究所教授）
斉藤 隆（千葉大学医学部教授）
安保 徹（新潟大学医学部免疫学教授）
林 良夫（徳島大学歯学部教授）

その第一の原因となる胸腺機能の制御機構から始めて、T細胞受容体とその下流にあるシグナル伝達、サイトカイン受容体、副刺激などの発現とそれらの機能的変化を明らかにする。又、ヒトにおける解析として百歳老人における免疫機能及びその老化過程を明らかにする。更に、加齢に伴い増加する自己免疫現象の解析に有用な自己免疫疾患自然発症マウスを樹立する。

A. 研究目的

老化に伴う免疫不全症は外来抗原に対する反応性の低下と、それとは逆に自己抗原に対する反応性の異常亢進からなる。前者は老年者における易感染性の増大となり、老年者の直接死因の第一となっている。また、後者は成人から老年に向かって徐々に増加する自己免疫疾患の発症の背景となっている。このような免疫不全が老化と共に起こる理由として、免疫系を構成する細胞の数や構成比が老化と共に変化し、さらに細胞間および細胞内のシグナル伝達に異常が起こることを明らかにしてきた。本研究では従来の成果を更に進めて、老化と共に機能低下するT細胞系について、

B. 研究方法

5つのサブテーマごとに説明する。

- 1) 「T細胞におけるシグナル伝達機構とその加齢変化」：マウス脾臓T細胞を用いてT細胞受容体、サイトカイン受容体、副刺激受容体の発現とそれらの下流にあるシグナル伝達物質の解析、サイトカインの産生などを検索した。また、ラットの視床下部を電気凝固することにより破壊し、その影響を下垂体と胸腺機能について解析した。（広川勝昱）
- 2) 「老化によるT細胞活性化不全の分子機構」：若令及び老令のマウスより複数のTh1型

のT細胞クローンを樹立し、T細胞受容体の下流のチロシンキナーゼを介するシグナル伝達の加齢変化を解析した。(成内秀雄)

3) 「老化に伴うT細胞レセプター複合体の構造及び機能変化」：酸化ストレスによるT細胞レセプター複合体の構造と機能に及ぼす効果を解析した。(齊藤隆)

4) 「老化で増加する胸腺外分化T細胞の生理機能と分子機構の解析」：沖縄在住の百歳以上の高齢者の末梢リンパ球について、胸腺と直接関係しない胸腺外分化T細胞、NK細胞、好中球の動態を解析した。(安保徹)

5) 「老化に伴う自己免疫病変の分子病理学的解析」：シェーグレン症候群疾患モデルマウスNF S/sldを樹立し、老化に伴う唾液腺炎及び腺外性自己免疫病変の発症機構について分子病理学的な解析を行った。(林良夫)

C. 結果と考察

1) 「T細胞におけるシグナル伝達機構とその加齢変化」：免疫系の中で加齢と共に顕著に機能低下するはT細胞系であり、それは「数の減少」、「サブセットの構成の変化」、及び「シグナル伝達の異常」である。シグナル伝達の異常はT細胞受容体、サイトカイン受容体、副刺激受容体などの発現不全、およびそれらの下流にあるシグナル伝達物質の活性化不全として見られる。こうしたT細胞の異常はサイトカインの産生異常につながり、これらが免疫応答反応全体の加齢変化の原因となっている。このようなT細胞機能異常は胸腺の生後早くから起こる機能低下に起因する。胸腺は新生児期の成長ホルモン(GH)分泌の高い時に盛んに活動し、新生児期を過ぎてGH分泌が低下すると共に、急激に機能低下する。GH分泌の低下は視床下部からの抑制シグナルの増強によるもので、その抑制中枢を破

壊すると、老齢動物でもGH分泌が増加し、胸腺が肥大することが分かった。即ち、T細胞免疫系の機能の発達と加齢変化は、視床下部のコントロール下にあることが強く示唆された。これらの結果は、免疫機能の加齢変化がホルモン療法によりコントロール可能であることを示唆している。

2) 「老化によるT細胞活性化不全の分子機構」：複数の老化マウス由来Th1クローンをを用いて、抗原受容体下流のシグナル伝達分子を調べた。その結果、Fynの活性が損なわれ、その下流にあるイノシトールリン酸の代謝などのシグナル伝達系の機能が低下していることが分かった。さらにその原因として、fynが会合するCD3と鎖の発現低下があることがわかった。本研究班の齊藤らによれば鎖の発現低下は酸化ストレスにより起こるので、老化による免疫機能の低下の遠因は酸化ストレスであることが示唆された。

3) 「老化に伴うT細胞レセプター複合体の構造及び機能変化」：T細胞レセプター複合体のCD3と鎖は刺激されたマクロファージ由来の酸化物質により消失することが分かった。そのメカニズムを解析したところ、正常な抗原刺激ではCD3と鎖は活性化されて細胞骨格と会合するのに対し、酸化ストレスではリン酸化されても細胞骨格と会合せず分解されることが示された。酸化ストレスに暴露されたT細胞でも、mRNAレベルで見ると十分な発現があるので、これは蛋白レベルでの傷害であることが分かった。酸化ストレスはDNA、蛋白、細胞膜など、いろいろなレベルでの細胞傷害の原因となっており、T細胞の傷害もその一つと考えられる。そうであれば、免疫機能の加齢変化を制御する目的で、抗酸化物質を投

与することの有用性がこれらの研究で示唆された。

4) 「老化で増加する胸腺外分化T細胞の生理機能と分子機構の解析」：高齢者の末梢血液では、胸腺外分化T細胞と共に好中球が増加していた。胸腺外T細胞ではIFN γ 産生能が亢進していた。好中球機能では、貪食能、IL-1 β 及びTNF α 産生能が亢進していた。従って、高齢者の免疫能は系統的に古いリンパ球や炎症性サイトカインによって維持されていることが分かってきた。これらの細胞は単に代償的に働くだけでなく、加齢により出現する異常自己細胞の処理において、何らかの役割を果たしているものと考えられた。

5) 「老化に伴う自己免疫病変の分子病理学的解析」：シェーグレン症候群疾患モデルとなるNFS/sldマウスを樹立した。生後3日目に胸腺摘出を行うと、8~20週齢に自己免疫性唾液腺炎や涙腺炎が自然発症する。さらに、マウスの月齢が進み、生後12~18カ月になると、肺、肝、脾、腎などの臓器にも、細胞浸潤を伴った自己免疫性病変が高頻度に認められた。これらの自己免疫を起こす自己抗原として、120KDの α フォドリンが同定され、病変のあるマウスの血清中には α フォドリンに対する自己抗体が増加していた。 α フォドリンはマウスだけでなく、ヒトのシェーグレン症候群にも共通する自己抗原であることが分かった。これらのことから、このマウスが老化に伴い増強する自己免疫現象の解析に有用なモデルとなることが分かった。この α フォドリンは細胞膜内の前駆物質が壊れて出現するので、この出現過程の解析により、自己免疫発症の抑制方法の開発が期待できる。

D. 結論

免疫系は多様な細胞から構成され、その免疫機能が正常に働くには、細胞間・細胞内の円滑なシグナル伝達が必須である。老化に伴う免疫機能不全の一因は、これらのシグナル伝達の異常に起因する。これらのシグナル伝達異常の一因はT細胞の亜集団の変化に起因し、その遠因は胸腺の生後早くから始まる機能低下である。この胸腺機能の発達と加齢変化は、神経系や内分泌系と緊密に関連している。即ち、視床下部は胸腺を通して、T細胞系の発達と加齢変化をコントロールしているといえる。生体の細胞は酸素呼吸により生ずる酸化ストレスに晒され、免疫系の細胞もその例外ではない。T細胞では抗原の受容体であるTCRが酸化ストレスにより傷害されることが分かった。老化T細胞では、傷害された後のTCRの再生が素早く起こらない為に、T細胞機能不全が起こりやすい状態になっている。その結果起こるT細胞免疫不全は、感染症の増加及び自己免疫現象の増加につながる。その老化に伴い増加する自己免疫現象の原因となる自己抗原の一つ α フォドリンが同定された。この自己抗原はマウスばかりでなくヒトにおけるシェーグレンなどの自己免疫病の原因であり、加齢と共に増加する自己免疫現象の解析の糸口となるものと期待している。

T細胞におけるシグナル伝達機構と その加齢変化

広川勝昱（東京医科歯科大学医学部教授）

① T細胞系の免疫機能の発達と老化は、下垂体-胸腺を軸に、視床下部のコントロール下にある。② T細胞の加齢変化とはその数の減少、サブセットの変化、抗原刺激時の増殖能の低下として見られる。③ T細胞の増殖能の低下は、T細胞膜上の各種受容体の発現異常、その下流のシグナル伝達異常である。④ サブセットの変化はサイトカイン産生の変化として見られ、IL-2産生の低下とIFN γ の亢進として見られる。⑤ 老化に伴い低下した免疫機能を回復させることは可能であることが示唆された。

キーワード：胸腺、視床下部、サイトカイン、T細胞サブセット、シグナル伝達

A. 研究目的

免疫系の老化に伴う変化はT細胞系、B細胞系、マクロファージ、及びNK細胞など、いろいろな細胞に見られる(1)。しかし、その中で最も変化の著しいのは胸腺萎縮に始まるT細胞系の加齢変化である。胸腺萎縮は形態学的には思春期に始まるが、胸腺のT細胞を作る能力はヒトでも生後1年くらい、マウスでは生後1週位にピークがあり、その後その機能は急激に低下する(2)。そしてこの生後の短い間に作られたT細胞は末梢で抗原刺激を受けてクローンサイズが大きくなり、現場で役に立つ成熟したT細胞となる。成熟したT細胞はときどき抗原刺激され、分裂増殖し、それが加齢と共に度重なると、生体内で細胞老化を起こす事になる(3)。

即ち、T細胞系の老化を理解するには、胸腺の生後早くから始まる機能低下とT細胞の生体内で起こるの細胞老化のプロセスを解析する必要がある。

胸腺機能の早期機能低下については、胸腺内へのT前駆細胞の移住、リンパ球増殖

能力、胸腺から末梢への移住、老化胸腺の作る低能力のT細胞など、その現象論的なところは既に明らかにした(2)。また、昨年、胸腺の大きさが視床下部前部の破壊により肥大する事を発見した(4)。

T細胞の生体内での細胞老化的な側面は老化マウスから樹立したクローン化T細胞や老化マウスの脾臓から調整したバルクのT細胞を使って検索してきた。その結果、老化T細胞では、a) T細胞受容体(TCR)の下流にあるシグナル伝達に異常があり、TCRからの刺激が核まで能率良く伝達しない事、b) 刺激を受けとめるTCRそのもののターンオーバーが悪い事、c) 増殖に関連するサイトカイン受容体の発現の低下、d) 増殖に関連する副刺激受容体の発現の低下などがあることが分かった(5-8)。

本年はこれらの結果を踏まえて、1) 視床下部による胸腺機能の制御機構、2) T細胞サブセットによるサイトカイン産生パターンの加齢変化、3) 老化マウスにおいて低下免疫機能の回復方法、などについて検討を加えた。

B. 研究方法

1) 動物としてはC57BL/6マウスとWistarラットを用い、2~6カ月を若齢、22~26カ月を老齢とした。

2) 細胞としては脾細胞浮遊液、或いはカラム(collect Immunocolumn)を用いT細胞純度を95%前後にしたT細胞浮遊液を用いた。

3) リンパ球の増殖反応。脾細胞浮遊液を、抗CD3単クローン抗体(2C11:5 μ g/ml)、PHA(10 μ g/ml)、ConA(10 μ g/ml)、LPS(20 μ g/ml)で刺激した後、³H-チミジンの取り込みを指標に増殖反応を検討した。また、別の実験では脾細胞浮遊液を抗CD3単クローン抗体(2C11:1 μ g/ml)と抗CD28抗体(37.51, 1 μ g/ml)を同時に使用して刺激した。

4) Immune-complex kinase assay。細胞溶解液にチロシンキナーゼに対する抗体とプロテインGセファローズを用いて、免疫複合体を調整した。この免疫複合体について、 γ 32-ATPの取り込みを指標として、キナーゼ活性をみた。活性は電気泳動後のバンドのラジオオートグラフィーでの黒化度で見た。

5) ウェスタンブロット解析。

T細胞浮遊液を抗CD3単クローン抗体で刺激し20~30分後、直ちにLysis Bufferを用いて細胞を溶解後遠沈し、上清をCell lysateとして用いた。Cell lysateは6%SDS-PAGEで泳動した後、Nitro-cellulose膜に移し、その後、各種抗体を用いて免疫化学的に物質の同定を行った。抗体の認識にはECLのキットを用いた。

6) フローサイトメトリー：

T細胞の表面抗原：マイトージェンで刺激する前と刺激後1~4日目について検索した。

サイトカイン陽性細胞の測定：増殖反応と同じ条件で刺激し、Brefeldin A(10 μ g/ml)を加えた。6時間後に細胞を採取して、始めに抗CD4抗体、或いは抗CD8抗体で染色し、次に細胞内のIL-2、IL-4、IFN γ などを染色し、2カラーで観察した。

7) 視床下部の電気凝固：脳の定位装置を用

い、電極を頭頂部から挿入し、局部に到達した後、高周波電流を流し、脳局所を破壊した。

8) ラット定距離運動給餌装置：ランニングウィールを用いて、一定距離走ると一定量の給餌が行われるように設定し、一日5km走ると、自由給餌の80%のカロリーが摂取できるようにした。

9) 血清中のホルモンの測定：アマシャム社のキットを用いてRIAで成長ホルモン、黄体化ホルモンの測定を行った。

C. 研究結果

1) TCR直下のチロシンキナーゼの加齢変化。

TCRにシグナルが入ると、TCR ζ CD4/8に付随するチロシンキナーゼ(fyn, lck, ZAP-70)、その下流のホスホリパーゼ(PLC) γ 1が連鎖的に活性化し、その結果2つのセカンドメッセンジャーであるイノシトール3リン酸(IP3)とジアシルグリセロール(DG)が産生される。IP3はCa²⁺の流入を促進し、DGはプロテインキナーゼC(PKC)を活性化し、シグナルは更に下流へと伝播し、最終的にはDNA合成や蛋白合成に必要な転写因子が活性化される。T細胞を抗CD3抗体で刺激した後、in vitro Immune complex kinase assay と Western blot法によりZAP-70とfynの活性を測定した。その結果、老齢マウスから調整したT細胞では抗CD3抗体で刺激したあと、これらのチロシンキナーゼが十分に活性化されず、それが増殖能の低下の原因となっていることが分かった。

2) 視床下部による胸腺機能の調節機構

①視床下部前部破壊による胸腺肥大。

ラットを用いて視床下部の前部を破壊すると、胸腺が肥大することは昨年も報告した通りである。その胸腺肥大効果は年齢に関係なく認められ、老齢ラットの萎縮した胸腺でもある程度肥大してくる。更に、若齢で処置をした後の胸腺肥大効果は12か月くらい続く

ことも分かった。

②視床下部前部破壊による胸腺肥大は下垂体摘出で起こらなくなる。

予め下垂体摘出を行ったラットについて、同じように視床下部前部を破壊しても、胸腺肥大は起こらず、この胸腺肥大が下垂体の何らかのホルモンによることが示唆された。視床下部前部を破壊したラットでは、胸腺は肥大するが、副腎や卵巣（精巣）などは萎縮する。しかし、下垂体そのものはやや肥大し、ある特定のホルモンの産生が増加していることが疑われた。

③視床下部前部破壊によるGHの分泌亢進。

そこで視床下部前部破壊実験、下垂体摘出実験を組み合わせを行い、その時の血清中の成長ホルモン(GH)と黄体化ホルモン(LH)を測定した。その結果、視床下部前部破壊されたラットではGHが異常に高くなることが分かった。

④新生仔期に高い血清中のGH濃度。

ラットやマウスでは胸腺が胸腺が大きくなるのは誕生直後から4週齢くらいまでである。その血清中のGHを測定してみると、胎児期では寧ろやや低く、新生時期に著明に高く、その後、4週齢以降になると、急速に低下することが分かった。

これらの結果から、胸腺の成長が血液中のGHのレベルに依存していること、そしてそのGHの分泌をコントロールする中枢が視床下部にあることが明らかになった。

3) 加齢に伴うサイトカイン産生の変化

加齢に伴いT細胞のサブセットの構成に変化が起こることが知られている。それはナイーブT細胞が減少し、メモリーT細胞が増加するとも、またTh1型T細胞が減少し、Th2型T細胞が増加するともいわれている。

①脾臓リンパ球の産生するサイトカイン産生パターンの加齢変化。

若齢と老齢マウスの脾臓リンパ球を抗CD3抗

体と抗CD28抗体で刺激し、比較検討した。先ず増殖能は若齢に較べて、老齢マウスからの脾リンパ球は10倍前後の低いレベルを示した。その培養上清中に産生されるサイトカインをELISAで見ると、IL-2産生は加齢と共に減少するが、IFN γ 産生は逆に加齢と共に増加した。IL-4については加齢と共に増加傾向が見られたが、有意差はなかった。これらの結果は従来の報告をサポートするものであった。

②サイトカイン陽性細胞の比率の加齢変化。

次に上と同じ様に培養した脾細胞をフローサイトメトリーを用いて、サイトカイン陽性細胞の比率を検討した。その結果、IL-2⁺細胞は老齢に較べて若齢脾リンパ球で多く、またIFN γ ⁺細胞は逆に若齢に較べて老齢脾リンパ球の方に多かった。IL-4については若齢と老齢間で差が見られなかった。この結果は培養上清中のサイトカイン濃度の加齢変化と一致する結果であった。

③T細胞サブセットで異なるサイトカイン産生の加齢変化。

次にT細胞をCD4とCD8のマーカーで2つに分け、それらのサイトカイン陽性細胞の比率の加齢変化を見た。

IL-2⁺細胞はCD4⁺とCD8⁺の両方のT細胞に見られたが、CD4⁺T細胞の方が有意に多かった。加齢に伴い、どちらのT細胞のIL-2⁺細胞も減少した。一方、IFN γ ⁺細胞はCD4⁺T細胞に較べて、明らかにCD8⁺T細胞の方に多かった。そして、加齢と共にIFN γ ⁺CD8⁺T細胞が有意に増加した。IL-4⁺細胞もCD4⁺とCD8⁺のどちらのT細胞にも見られた。しかし、IL-4⁺CD4⁺T細胞は加齢と共に明らかに増加を示し、これはTh2型T細胞が加齢と共に増加するという従来の報告をサポートするものであった。

④2種類のサイトカインを産生するT細胞は若齢では少いが、老化と共に増加する。

若齢マウスの脾リンパ球のサイトカイン産生細胞を2カラーを使ってフローサイトメトリーで見ると、1種類のサイトカインを作る

ものが大部分で、2種類のサイトカインを同時に作るものはごく少数であった。Th1型のT細胞はIL-2とIFN γ を作ることで知られているが、IL-2⁺CD4⁺T細胞とIFN γ ⁺CD4⁺T細胞は明らかに別の集団であることがこのフローサイトメトリーの解析で明らかになった。そして加齢と共に前者は減少し、後者が増加することが確認された。CD8⁺T細胞についても若齢では1種類のサイトカインを作るものが大多数であった。老齢マウスの脾細胞では、2種類のサイトカイン(IL-2+IFN γ ⁺、IL-2+IL-4⁺、IFN γ ⁺IL-4⁺)を作るT細胞が有意に増加することが分かった。

4) 老化マウスの免疫機能の回復

①長期運動負荷による免疫機能の回復

実験動物は一般的に狭いケージの中に押し込められ、殆ど運動ができない半拘束状態で長期間飼育されている。そこで、ラットがランニングホイールで一定距離運動すると、一定量の給餌がされるような飼育装置を用い、ラットに運動負荷をした場合の免疫機能への影響をみた。即ち、2ヵ月齢から23ヵ月齢までの18ヵ月間、1日5km走らせ、自由給餌の80%のカロリーを取れるようにした。生存率は運動負荷実験群の方が運動非負荷群に比べてやや良い傾向が認められた。運動非負荷群では21ヵ月の間に体重増加があったが、実験群では変動が殆ど認められなかった。脾臓、胸腺の重量、脾臓のT細胞・B細胞の数には有意な増加などは認められなかった。しかし、ConAやPHAなどのマイトージェンで刺激したときの増殖能をみると、実験群では優位に増加するものが認められた。

②シクロフォスファミドによる免疫能回復

抗ガン剤であるシクロフォスファミド(Cx)を低容量投与すると若齢マウスではその効果は明らかではないが、老化マウスではT細胞系の免疫機能が有意に回復することが分かった。これは低容量のCx投与により胸腺皮質に

おけるアポトーシスが促進され、骨髄からT前駆細胞の胸腺内移住が促進され、T細胞増殖分化が亢進し、その結果新しいT細胞の補充が脾臓で起こる為と考えられた。

D. 考察

従来、思春期から加速する胸腺萎縮は不可逆的な過程と考えられていた。しかし、最近になって、性巣や副腎を摘出すると、胸腺は一過性であるが肥大することがわかり、胸腺の生理的萎縮はある程度可逆的な変化であることが示唆された。本研究では、視床下部の全部を破壊すると、GH分泌が急上昇し、その結果胸腺が肥大し、それは老化ラットの萎縮胸腺でも起こることを明らかにした。マウスやラットの個体発生で見ると、GH分泌は新生児期には著明に高いが、その時期を過ぎると急激に低下し、そのGHレベルの低下と共に胸腺の萎縮が始まることが明らかになった。即ち、T細胞系の免疫機能の発達と老化は下垂体を通して、視床下部のコントロール下にあるといえる。

胸腺機能の加齢に伴う低下により、T細胞の供給が激減するために、末梢ではサブセットの構成の変化が起こる。また、ここのT細胞についても、抗原刺激により繰り返し起こる細胞の分裂増殖は細胞老化の原因となる。その結果T細胞に起こる変化は、抗原刺激時における増殖能の低下とサイトカイン産生の変化である。増殖能の低下はT細胞抗原受容体(TCR)、サイトカイン受容体、副刺激受容体の発現異常、TCRの下流にあるシグナル伝達の異常によることが明らかになった。また、サイトカイン産生については、加齢と共にIL-2産生は低下し、IFN γ は増加することが今回の実験結果でも確認された。新しく分かったことは、(1)IL-2産生は主としてCD4⁺T細胞により、IFN γ 産生はCD8⁺T細胞が主である。(2)加齢と共にIL-2⁺CD4⁺T細胞は減少するが、IFN γ ⁺CD8⁺T細胞は増加する。(3)若齢マウス

では一つのサイトカイン産生をするものが大部分であるが、老齢マウスになると2種類のサイトカインを同時に産生する細胞が増加する。老齢マウス脾細胞のIL-2産生の減少は抗原刺激時における低応答性の背景となっている。また、IFN γ はそれ自体が抗ウイルス作用があり、老齢マウスにおけるその増加は免疫系による抗体産生能の低下を補うものと考えられる。一方、IFN γ にはT細胞機能を抑制する効果があり、その増加が老化マウスの免疫不全の一因となっていることも示唆された。

しかし、この様に变化した免疫機能もある程度ではあるが、回復することが分かったことは朗報である。その一つは運動とカロリー制限という日常的なものである。もう一つはシクロフォスファミドという抗癌剤で免疫細胞のアポトーシスを促進することが有効であった。今後は老化に伴い低下した免疫機能の回復ということが重要な課題となろう。

E. 結論

① T細胞系の免疫機能の発達と老化は、下垂体-胸腺を軸に、視床下部のコントロール下にある。

② T細胞の加齢変化とはその数の減少、サブセットの変化、抗原刺激時の増殖能の低下として見られる。

③ T細胞の増殖能の低下は、T細胞膜上の各種受容体の発現異常、その下流のシグナル伝達異常である。

④ サブセットの変化はサイトカイン産生の変化として見られ、IL-2産生の低下とIFN γ の亢進として見られる。

⑤ 老化に伴い低下した免疫機能を回復させることは可能であることが示唆された。

F. 引用文献

1) Hirokawa K. Immunity and Ageing. In: Principle and Practice of Geriatric Medicine. (Pathy, MSJ ed) pp. 35-47,

John Wiley & Sons Ltd., London 1998

- 2) Hirokawa K, Utsuyama M, Zeng Y-X, Kurashima C and Kasai M. Immunological alteration with aging. Arch. Gerontol. Geriat. 19:171-183, 1994.
 - 3) Hirokawa K, Utsuyama M, Kasai M, Kurashima C, Ishijima S and Zeng Y-X. Understanding the mechanism of the age-change of thymic function to promote T cell differentiation. Immunol. Lett. 40:269-277, 1994.
 - 4) Pawelec G. Immunosenescence. Immunol. Today 18:514-516, 1997.
 - 5) Utsuyama M, Varga Z, Fukami K, Homma Y, Takenawa T and Hirokawa K. Influence of age on the signal transduction of T cells in mice. Int. Immunol. 5:1177-1182, 1993.
 - 6) Zeng Y-X, Takahashi H, Shibata M and Hirokawa K. JAK-3 Janus kinase is involved in IL-7 signal pathway. FEBS Letters 353:289-293, 1994
 - 7) Zeng Y-X and Hirokawa K. Age change in signal transduction of T cells. Aging Immunol. Infec. Dis. 5:147-159, 1994.
 - 8) Weiss A and Littman DR: Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. Cell 76:263, 1994.
- #### G. 研究発表
1. 論文発表
 - 1) Hirokawa K. Age-related change in signal transduction of T cells. Exp. Gerontol. 134:7-18, 1999
 - 2) Wakikawa A, Utsuyama M, Wakabayashi A, Kitagawa M and Hirokawa K. Age-related alteration of cytokine production profile by T cell subsets in mice: A flow cytometric study.

- Exp. Gerontol. in press.
- 3) Wu J, Zen Y-x and Hirokawa K. Signal pathway of mitogen-induced Ca²⁺ activated K⁺ current in young & aged T cell clones of C57BL/6 mice. Cell. Signalling in press.
 - 4) Ishiyama N, Utsuyama M, Kitagawa M & Hirokawa K. Immunological enhancement with a low dose of cyclophosphamide in the aged mice. Mech. Age. Dev. in press
 - 5) Hirokawa K, Utsuyama M & Kobayashi S. Hypothalamic control of development and aging of the thymus. Mech. Age. Dev. 100 : 177-185, 1998
 - 6) Ishiyama N, Kitagawa M, Kina I and Hirokawa K. Expression of truncated VCAM-1 in thymocytes and its role during the process of apoptosis. Pathobiol. 66:274-283-1998
 - 7) Inosita N, Yanagisawa A, Kato Y, Kitagawa T, Hirokawa K. and Kato Y. Pathological characteristics of gastric carcinomas in the very old. Jpn. J. Cancer Res. 89:1087-1092, 1998
 - 8) Iizuka J, Katagiri Y, Tada N, Murakami M, Ikeda T, Sato M, Hirokawa K, Okada S, Hatano M, Tokuhisa T & Uede T: Induction of an osteopontin gene confers the increase in B1 cell population and production of anti-DNA autoantibody. Lab. Invest. 78:1523-1533, 1998
 - 9) Fukui Y, Ishimoto T, Utsuyama M, Gyotoku T, Koga T, Nakao K, Hirokawa K, Katsuki M and Sasazuki T. : Positive and negative CD4⁺ thymocyte selection by a single MHC class II/ peptide ligand affected by its expression level in the thymus. Immunity 6:407-410, 1997
 - 10) Sawanobori M, Suzuki K, Nakagawa Y, Inoue Y, Utsuyama M and Hiroakwa K. Natural Killer cell frequency and serum cytokine levels in monoclonal gammopathies: correlation of bone marrow granular lymphocytes to prognosis. Acta Haemagol. 98:150-154, 1997.
 - 11) Utsuyama M, Kobayashi S and Hirokawa K. Induction of thymic hyperplasia and suppression of splenic T cells by lesioning of anterior hypothalamus in Wistar rats. J. Neuroimmunol. 77:171-180, 1997.
 - 12) Utsuyama M, Wakikawa A, Tamura T, Nariuchi H and Hirokawa K. Impairment of signal transduction of T cells from old mice. Mech. Ageing Development. 93:131-144, 1997.
 - 13) Hirokawa K. : Reversing and restoring immune functions. Mech. Age. Dev. 93:119-124, 1997
 - 14) Kanno J, Wakikawa A, Utsuyama M and Hirokawa K. : Effect of restraint stress on immune system and experimental B16 melanoma metastasis in aged mice. Mech. Age. Dev. 93:107-117, 1997
 - 15) Wakikawa A, Utsuyama M and Hirokawa K. Altered expression of various receptors on T cells in young and old mice. Mech. Age. Dev. 94:113-122, 1997
 - 16) Doria G, Mancini C, Utsuyama M, Frasca D and Hirokawa K. Aging of the recipients but not of the bone marrow donors enhances autoimmunity in syngeneic radiation chimeras. Mech. Age. Dev. 95:131-142, 1997.

- 17) Ohashi K, Nemoto T, Eishi Y, Matsuno A, Nakamura K and Hirokawa K. Proliferative activity and p53 protein accumulation correlate with early invasive trend, and apoptosis correlates with differentiation grade in esophageal squamous cell carcinomas. *Virchow Arch.* 430:107-115, 1997.
- 18) Nemoto T, Ohashi K, Akashi T and Hirokawa K. Overexpression of protein tyrosine kinase in human esophageal cancer. *Pathobiol.* 65:195-203, 1997
- 19) Ohashi K, Nemoto T, Eishi Y, Matsuno A, Nakamura K and Hirokawa K. Expression of the cyclin dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 in esophageal squamous cell carcinomas. *Vir. Arch.* 430:389-395, 1997.
- 20) Kitagawa M, Saito I, Kuwata T, Yoshida S, Yamaguchi S, Takahashi M, Tanizawa T, Kamiyama R and Hirokawa K.: Overexpression of tumor necrosis factor (TNF) α and interferon (IFN) γ by bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 11:2049-2054, 1997
- 21) Tamaoka A, Endoh R, Shoji S, Takahashi H, Hirokawa K, Teplow DB, Selkoe DJ and Mori H. Antibodies to amyloid β protein (A β) crossreact with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). *Neurobiology of Aging.* 17:405-514, 1996.
- 22) Zeng Y-X, Wu J, Yee S-T, Nariuchi H and Hirokawa K.: Abnormality in the early signal transduction pathway is responsible for the impaired proliferative response and low K⁺ current in a T cell clone by stimulation with anti-CD3 antibody. *Cell. Signal* 8:263-267, 1996.
- 23) Kasai M, Hirokawa K, Kajino K, Ogasawara K, Tatsumi M, Hermel E, Monaco JJ and Mizuochi T: Difference in antigen presentation pathways between cortical and medullary thymic epithelial cells. *Eur. J. Immunol.* 26:2101-2107, 1996.
- 24) Utsuyama M, Ichikawa K, Konno-Shirakawa A, Fujita Y and Hirokawa Retardation of the age-associated decline of immune functions in aging rats under dietary restriction and daily physical exercise. *Mech. Age. Dev.* 91:219-228, 1996
- 25) Kitagawa M, Aizawa S, Ikeda H and Hirokawa K: Establishment of a therapeutic model for retroviral infection using the genetic resistance mechanism of the host. *Pathol. Int.* 46:719-725, 1996.
2. 和文総説
- 1) 広川勝昱：免疫の立場から見たエイジング現代医療30:109-116, 1998
- 2) 広川勝昱：ストレスと免疫実験動物と環境 11:38-41, 1998
- 3) 広川勝昱：老化と免疫化学と生物 36:297-305, 1998
- 4) 広川勝昱：老化とストレス、そして免疫系のクロストーク *Progress in Medicine* 18:749-752, 1998
- 5) 広川勝昱：免疫系の加齢変化についての最近の知見 *医学のあゆみ* 187:728-729, 1998
- 6) 広川勝昱：免疫の立場から見たエイジング 現代医療30:109-116, 1998
- 7) 広川勝昱：ストレス、免疫、癌そして老化 *Biotherapy* 11:236-238, 1997

- 8) 広川勝昱：老化と免疫機構の変化に関する分子生物学的研究－T細胞のシグナル伝達の変齢変化－Advances in Aging and Health Research pp.7-25
1997（3月）長寿科学振興財団
- 9) 広川勝昱：免疫から見た老化の基礎
老年消化器病の現況と将来（中澤、福井編集） pp.28-34 医学図書出版1997
- 10) 広川勝昱：老年病診療Q & A。免疫学的検査（1）、免疫学的検査（2）
p 276－279、1997
- 11) 広川勝昱、宇津山正典、湧川温子：老化による免疫現象の変動
リュウマチ科 18:183-193、1997
- 12) 広川勝昱：免疫は老化する。La Vie（ラビエ）10:29-36、1997
- 13) 菅野 純、広川勝昱：ストレス・老化・発癌における神経・内分泌・免疫系の役割。癌治療と宿主 8:19-30、1996
- 14) 広川勝昱：生体の時限装置として働く胸腺 Geriatric Medicine 34:73, 1996
- 15) 広川勝昱：チロシンキナーゼ Keywords
1996-1997炎症免疫系pp.136-137, 1996.
- 16) 広川勝昱：J a k キナーゼファミリー
Keywords1996-1997炎症免疫系
pp.120-121, 1996.
- 17) 広川勝昱：老化と免疫、神経精神薬理
18:285-292, 1996.
- 18) 広川勝昱：老化と免疫、栄養：評価と治療 13:145-154、1996
- 19) 広川勝昱：老化。栄養免疫学（渡辺明治編）医歯薬出版 pp.155-162, 1996
- 20) 広川勝昱：胸腺 生体の科学47:411-414、
1996
- 21) 広川勝昱：T細胞のシグナル伝達の変齢変化 臨床免疫 28:467-478, 1996.
- 22) 広川勝昱：ストレス、老化と免疫そして癌 Progress in Medicine
16:3155-3168, 1996.

老化によるT細胞活性化不全の分子機構

成内秀雄（東京大学医科学研究所

アレルギー学研究部教授）

老化に伴って起こる免疫機能の低下はT細胞の機能低下がその原因であると考えられる。すなわち、老化に伴うT細胞機能不全の原因を明かにすることは免疫機能不全の原因を明かにすることに直接つながる。本研究では、老化マウス脾T細胞とそれに由来する複数のTh1細胞クローンを用いて、T細胞抗原受容体複合体下流の刺激伝達系の機能を検討した。その結果、老化マウス由来T細胞はいずれも抗原受容体の下にあるFynの活性が損なわれ、その下流にあるシグナル伝達系の機能が低下していることがわかった。さらにその原因としてFynが会合するzeta鎖の発現低下があることが分かった。zeta鎖の発現低下は酸化ストレスによって起こる事が報告されている。これらの結果は老化による免疫能低下の遠因は酸化ストレスにあることを示している。

キーワード：老化マウスT細胞、シグナル伝達系、チロシンキナーゼ、ゼータ鎖

A. 研究目的

老化に伴って免疫機能が低下する第一の理由はヘルパーT細胞機能が老化と共に低下することであると考えられている。しかし、T細胞の機能低下の原因は不明のままである。ヘルパーT細胞はIL-2依存性に増殖するので、IL-2産生低下が大きな原因であるとの考え方は多くの研究者に支持されている。しかし、T細胞は多数の亜集団からなり、特に老化動物T細胞は、IL-2産生量についても個々の細胞を見ると若令T細胞と比較してはるかに多様性に富んでいる。従って実験の条件によって異なる集団の反応を見てしまうことがあり、結果の解釈を困難にしている。そこで、我々は老化マウス脾臓T細胞由来のTh1細胞クローンを樹立して、その代表的クローンについて反応を検討し、得られた結果の内、最も典型的な結果について脾臓CD4T細胞を用いて確認する手法をとることにした。我々はT細胞の活性化機構が老化によって損なわれることが免疫機能低下の原因であるとの仮説に立

ち、抗原受容体下流のシグナル伝達の障害が老化T細胞の活性化障害の主な原因であることを検証する目的で本研究を行った。

B. 研究方法

細胞刺激：24-26ヵ月齢C57BL/6マウス脾T細胞由来Th1クローン 0 T1, 0 T12, 0 T17, 同じく 8-12週齢マウス由来35-9D, Y T 2, Y T 5, Y T10クローンを抗CD3Fabで刺激した。脾臓CD4T細胞を刺激する場合には固相化した抗CD3を用いた。

IL-2産生：IL-2依存性T細胞株CTLL-2の増殖またはELISA法に依って測定した。

細胞内刺激伝達経路の測定：抗CD3刺激後、抗Fyn, 抗ZAP70などを用いた immune complex kinase assay 法により、エノレースを基質とするチロシンリン酸化反応の測定を経時的に行った。また、自己リン酸化の測定は抗リン酸化チロシン抗体を用いたウェスタンブロットング法を用いた。フォスホリパーゼCのリン酸化反応は抗リン

酸化チロシンによるウエスタンブロッティングによって検出した。細胞内カルシウムイオン流入はアルガスシステムを用いて、単細胞系で測定した。

細胞内ゼータ鎖の測定：抗ゼータ抗体を用いて、CD4 T細胞内の染色を行い、FACSを用いて蛍光強度を測定し、ゼータ鎖の半定量を行った。

C. 研究結果

まず、T細胞のIL-2産生、増殖について、従来の所見を確認した。すなわち、老化T細胞は若齢T細胞に比較して、IL-2産生、増殖反応共に明らかに減弱していた。特に、老化T細胞はクローンか脾臓由来T細胞かを問わず若齢クローンに比して；1) IL-2産生により多くの抗原刺激を必要とする、2) IL-2受容体発現は良好であるのに、IL-2の添加によるT細胞増殖増強が起こりにくい。この所見はクローンに於いてよりはっきりした結果になった。脾臓由来T細胞のIL-2受容体発現は老化マウスでは若齢マウスに比して良好なものから低いものまで幅が著しく広く、比較しにくい。勿論、傾向としては脾臓由来T細胞の場合でもクローンの場合と明らかに同じである。3) 老化マウス由来T細胞クローンでは若齢T細胞クローンに比して抗CD3刺激によるsrcカインースの反応は弱い。これらの所見は、老化T細胞では抗原受容体刺激のシグナル伝達系に何らかの機能低下があることを示唆している。従って、老若両マウス由来T細胞クローンを用いて、TCRの下にあって、TCR刺激を下流に伝える役割を持つとされるFynに始まるシグナル伝達系を更に解析した。、加えて、細胞外カルシウム流入にも検討を加えた。その結果、老化T細胞クローンはTh1亜集団に属しながら、1)Fynを初めとするシグナル伝達系は機能が低下し、Th2のそれに類似している、2) 抗原受容体刺激によるカルシウム流入は弱いながら存在し、Th1と同様にsrcカインースに依存している事が判った。すなわち、老化T細胞クローンのシグナル伝達系はFynを始めとするTCR下流のチロシンリン酸化経路

の活性が弱い点はTh2細胞に似てはいるが、カルシウム流入を起こさせる系はTh1と同じ系が働いている事を示している。さらに、老化マウス脾臓由来T細胞を用いて、TCR下流のシグナル伝達系を解析し、T細胞クローンを用いた結果が一般性を持つか否かを検討した。その結果、抗CD3刺激によるFyn, ZAP70, PLC γ のチロシンリン酸化は老化クローンの場合と同様に能率が悪い事が判った。次に老化マウス由来T細胞を用いて、もう一つのシグナル伝達系である細胞外カルシウム流入を検討した。抗CD3刺激後の細胞内カルシウムイオンの動きは老化マウス由来T細胞では若齢マウス由来T細胞と比較して細胞内カルシウム濃度オシレーションの振幅が大きく、且つ、一つの細胞における周期が長い。つまり、カルシウムの細胞内流入効率が低下していることが分かった。

これらの所見は老化マウスT細胞における活性化障害の原因の少なくとも一つは、TCR下流の刺激伝達障害にある事を示していると同時に、我々が作製した老化T細胞クローンは老化マウス脾臓T細胞の特徴を持っていることを示している。

次に、Fynの活性化が老化T細胞で障害されることの原因を探る目的で、老化T細胞クローンのTCRzeta鎖の検出を抗zeta鎖を用いたFACS解析によって行った。zeta鎖の染色は極めて低下しており、zeta鎖蛋白自体の量的減少があることが判った。ついで、マウス由来のT細胞についても同様の検索を行った結果、老化マウス由来T細胞では、zeta鎖が量的に多い細胞から少ない細胞まで存在し、特に量的に少ない細胞の割合が若齢マウス由来T細胞に比して多い事が判った。老化に伴って、細胞や各種機能の偏差が大きくなることは良く知られている。zeta鎖の場合にもこれが当てはまることになる。zeta鎖が量的に少ないT細胞が老化マウスに多いこと我々がクローンで得た成績が生体内のT細胞にも当てはまる事を示している。

D. 考察

老化に伴って起こる免疫応答の低下は主としてT細胞の機能低下にその原因があることは一般に認められている。このT細胞の機能低下の原因については胸腺機能の低下によってT細胞の亜集団が変化する可能性を示唆した報告¹⁾、T細胞のシグナル伝達の異常を示唆した報告²⁾などがあるが、詳細は不明である。我々は若齢マウスT細胞クローンの抗原受容体由来活性化シグナル伝達機構を解析した結果、T細胞亜集団Th1、Th2はこのシグナル伝達機構を異にする細胞集団であることを示した³⁾。抗原刺激に応じて産生されるサイトカインの種類が老化マウスではTh2に近いものが多いことを考えると老化マウスT細胞のシグナル伝達機構はTh2に近いと考えることができる。このことは老化マウス脾臓T細胞ではTh1/Th2の分類が必ずしも当てはまらないとする所見⁴⁾とも呼応するものである。今回の実験によって明らかになったことは、1) 老化T細胞では抗原受容体のすぐ下流にあるFyn, ZAP70等のチロシンリン酸化に関与する分子を中心とするシグナル伝達系の働きが悪く、これが原因となってT細胞の機能不全が起こること、2) このシグナル伝達系の機能不全は、TCRzeta鎖の量的減少に起因すると考えられること、3) 我々が樹立した老化マウス由来T細胞クローンは少なくともシグナル伝達経路の解析には老化T細胞のモデルとして用いることである。T細胞の zeta鎖は酸化ストレスによって量的に減少すると報告されている。

今後は老化マウスに見られるzeta鎖の減少が果たして酸化ストレスによって起こるのか？ その他の原因は何か？ どうすればzeta鎖の量的減少を防げるか？ 等について研究を進める予定である。

E. 結論

老化マウス由来の複数のTh1細胞クローン及び老化マウス由来CD4T細胞の抗原受容体を介する活性化シグナル伝達経路を検討し、老化T細胞の活性化シグナル伝達経

路にはFynを始めとするsrcカインースの活性化に異常があり、これが老化T細胞の活性化能率の悪さの原因であることを強く示唆する所見が得られた。また、この直接の原因はTCRzeta鎖の量的減少によって起こることを示唆する結果も得られた。この所見については老化マウス由来T細胞を用いた実験結果と老化マウス由来T細胞クローンを用いた実験結果がほぼ一致している。すなわち、我々が樹立した老化マウスT細胞クローンは老化T細胞のモデルになりうることをも示している。今後は老化マウスT細胞の活性化シグナル伝達経路を更に詳細に明らかにし、応答性回復の方策を検討していきたい。

F. 参考文献

- 1) C. Kurashima, M. Utsuyama, et al: The role of thymus in the aging of Th cell populations and age-associated alteration of cytokine production by these cells. *Int. Immunol.* 7, 97-104, 1995.
- 2) J. Plaust, C. R. Filburn, et al: Age-related defect in signal transduction during lectin activation of murine T lymphocytes. *J. Immunol.* 139, 1472-1478, 1987.
- 3) R. A. Miller, G. Garcia, et al: Early activation defects in T lymphocytes from aged mice. *Immunol. Rev.* 160, 79-90, 1997.
- 4) T. Tamura, T. Yanagida, et al: Difference in signal transduction pathway for IL-2 and IL-4 production in helper 1 and helper 2 cell clones in response to anti-CD3. *J. Immunol.* 151, 6051-6060, 1993.
- 5) T. Tamura, H. Nakano, et al.: Early activation signal transduction pathways of Th1 and Th2 cell clones stimulated with anti-CD3. *J. Immunol.*

155,4692-4701, 1995.

6) M. Otsuji, Y. Kimura, et al.: Oxidative stress by tumor-derived macrophages suppresses the expression of CD3z chain of T-cell receptor complex and antigen-specific T-cell responses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 13119-13124, 1996.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) T. Kato, R. Hakamada, H. Yamane, and H. Nariuchi. Induction of IL-12p40 messenger RNA expression and IL-12 production of macrophages via CD40-CD40 ligand interaction. J. Immunol. 156:3932-3938, 1996.
- 2) A. Hino, and H. Nariuchi. Negative feed back mechanism suppresses interleukin 12 production by antigen presenting cells interacting with T helper 2 cells. Eur. J. Immunol. 26:623-628, 1996.
- 3) O. Igarashi, T. Yanagida, M. Azuma, K. Okumura, and H. Nariuchi. B7-1 synergizes with interleukin-12 in interleukin-2 receptor α expression by mouse T helper 1 clones. Eur. J. Immunol. 26:300-306, 1996.
- 4) T. Yoshimoto, K. Kojima, T. Funakoshi, Y. Endo, T. Fujita, and H. Nariuchi. Molecular cloning and characterization of murine interleukin-12 genes. J. Immunol. 156:1082-1088, 1996.
- 5) Y. Kanamori, K. Ishimaru, M. Nanno, K. Maki, K. Ikuta, H. Nariuchi, and H. Ishikawa. Identification of novel lymphoid tissues in murine intestinal mucosa where clusters of c-kit+IL-7R+Thy1+ lympho-hematopoietic progenitors develop. J. Exp. Med. 184: 1449-1459, 1996.
- 6) H. Nakano, T. Tamura, T. Yoshimoto, H. Yagita, M. Miyasaka, E. C. Butcher, H. Nariuchi, T. Kakiuchi, and A. Matsuzawa. Genetic defect in T lymphocyte-specific homing into peripheral lymph nodes. Eur. J. Immunol. 27:215-221, 1997.
- 7) M. Utsuyama, A. Wakikawa, T. Tamura, H. Nariuchi, and K. Hirokawa. Impairment of signal transduction in T cells from old mice. Mech. Ageing Develop. 93: 131-144, 1997.
- 8) T. Yoshimoto, H. Nagase, T. Ishida, J. Inoue, and H. Nariuchi. Induction of interleukin-12 p40 transcript by CD40 ligation via activation of nuclear factor- κ B. Eur. J. Immunol. 27:3461-3470, 1997.
- 9) H. Nakano, S. Mori, H. Yonekawa, H. Nariuchi, A. Matsuzawa, and T. Kakiuchi. A novel mutant gene involved in T lymphocyte specific homing into peripheral lymphoid organs on murine chromosome 4. Blood 91: 2886-2895, 1998.
- 10) R. H-Taguchi, T. Kato, H. Ushijima, M. Murakami, T. Uede, and H. Nariuchi. Expression and costimulatory function of B7-2 on murine CD4+ T cells. Eur. J. Immunol. 28:865-873, 1998.
- 11) S. Yamanouchi, K. Kuwahara, A. Sakata, T. Ezaki, S. Matsuoka, S. Hirose, T. Tamura, H. Nariuchi, and N. Sakaguchi. T cell activation antigen Ly6C induced on CD4+ Th1 cells mediates an inhibitory signal for secretion of IL-2 and proliferation in peripheral immune response. Eur. J. Immunol. 28: 696-707, 1998.
- 12) O. Igarashi, H. Yamane, S. Imajoh-Ohmi, and H. Nariuchi. IL-12R expression and accumulation of IL-12R β 1 and IL-12R β 2 mRNAs in CD4+ T cells by the costimulation with B7-2 molecules. J. Immunol. 160: 1638-1646, 1998.
- 13) H. Nagase, C-R. Wang, T. Yoshimoto, C. Sugishita, T. Yoneto, A. Matsuzawa, and H. Nariuchi. Novel mutant mice secreting soluble CD4 without expression of membrane-bound CD4. Eur. J. Immunol. 28: 403-412, 1998.
- 14) T. Yoshimoto, T. Yoneto, C-R. Wang, S. Waki, S. Sunaga, Y. Komagata, M. Mitsuyama, J. Miyazaki, and H. Nariuchi. Reduced Th1 responses in interleukin-12 p40 transgenic mice. J. Immunol. 160: 588-594, 1998.
- 15) T. Yoshimoto, H. Nagase, T. Yoneto, J. Inoue and H. Nariuchi. Interleukin-12 expression in B cells by transformation with Epstein-Barr virus. Biochem. Biophys. Res. Commun. 252:556-560, 1998.
- 16) T. Yoshimoto, Y. Takahama, C-R. Wang, T. Yoneto, S. Waki, and H. Nariuchi. A pathogenic role of IL-12 in blood-stage murine malaria lethal strain Plasmodium berghei NK65 infection. J. Immunol. 160:5500-5505, 1998.
- 17) H. Saito, Y. Kanamori, T. Takemori, H. Nariuchi, E. Kubota, H. Takahashi-Iwanaga, T. Iwanaga, and H. Ishikawa. Generation of intestinal T cells from progenitors residing in gut cryptopatches. Science 280: 275-278, 1998.
- 18) T. Yoshimoto, T. Yoneto, S. Waki, and H. Nariuchi. IL-12 dependent mechanisms in the clearance of blood-stage murine malaria Plasmodium berghei XAT, an attenuated variant of Plasmodium berghei NK65. J. Infect. Dis. 177:1674-1681, 1998.

155,4692-4701, 1995.

6) M. Otsuji, Y. Kimura, et al.: Oxidative stress by tumor-derived macrophages suppresses the expression of CD3z chain of T-cell receptor complex and antigen-specific T-cell responses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 13119-13124, 1996.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) T. Kato, R. Hakamada, H. Yamane, and H. Nariuchi. Induction of IL-12p40 messenger RNA expression and IL-12 production of macrophages via CD40-CD40 ligand interaction. J. Immunol. 156:3932-3938, 1996.
- 2) A. Hino, and H. Nariuchi. Negative feed back mechanism suppresses interleukin 12 production by antigen presenting cells interacting with T helper 2 cells. Eur. J. Immunol. 26:623-628, 1996.
- 3) O. Igarashi, T. Yanagida, M. Azuma, K. Okumura, and H. Nariuchi. B7-1 synergizes with interleukin-12 in interleukin-2 receptor α expression by mouse T helper 1 clones. Eur. J. Immunol. 26:300-306, 1996.
- 4) T. Yoshimoto, K. Kojima, T. Funakoshi, Y. Endo, T. Fujita, and H. Nariuchi. Molecular cloning and characterization of murine interleukin-12 genes. J. Immunol. 156:1082-1088, 1996.
- 5) Y. Kanamori, K. Ishimaru, M. Nanno, K. Maki, K. Ikuta, H. Nariuchi, and H. Ishikawa. Identification of novel lymphoid tissues in murine intestinal mucosa where clusters of c-kit+IL-7R+Thy1+ lympho-hematopoietic progenitors develop. J. Exp. Med. 184: 1449-1459, 1996.
- 6) H. Nakano, T. Tamura, T. Yoshimoto, H. Yagita, M. Miyasaka, E. C. Butcher, H. Nariuchi, T. Kakiuchi, and A. Matsuzawa. Genetic defect in T lymphocyte-specific homing into peripheral lymph nodes. Eur. J. Immunol. 27:215-221, 1997.
- 7) M. Utsuyama, A. Wakikawa, T. Tamura, H. Nariuchi, and K. Hirokawa. Impairment of signal transduction in T cells from old mice. Mech. Ageing Develop. 93: 131-144, 1997.
- 8) T. Yoshimoto, H. Nagase, T. Ishida, J. Inoue, and H. Nariuchi. Induction of interleukin-12 p40 transcript by CD40 ligation via activation of nuclear factor- κ B. Eur. J. Immunol. 27:3461-3470, 1997.
- 9) H. Nakano, S. Mori, H. Yonekawa, H. Nariuchi, A. Matsuzawa, and T. Kakiuchi. A novel mutant gene involved in T lymphocyte specific homing into peripheral lymphoid organs on murine chromosome 4. Blood 91: 2886-2895, 1998.
- 10) R. H-Taguchi, T. Kato, H. Ushijima, M. Murakami, T. Uede, and H. Nariuchi. Expression and costimulatory function of B7-2 on murine CD4+ T cells. Eur. J. Immunol. 28:865-873, 1998.
- 11) S. Yamanouchi, K. Kuwahara, A. Sakata, T. Ezaki, S. Matsuoka, S. Hirose, T. Tamura, H. Nariuchi, and N. Sakaguchi. T cell activation antigen Ly6C induced on CD4+ Th1 cells mediates an inhibitory signal for secretion of IL-2 and proliferation in peripheral immune response. Eur. J. Immunol. 28: 696-707, 1998.
- 12) O. Igarashi, H. Yamane, S. Imajoh-Ohmi, and H. Nariuchi. IL-12R expression and accumulation of IL-12R β 1 and IL-12R β 2 mRNAs in CD4+ T cells by the costimulation with B7-2 molecules. J. Immunol. 160: 1638-1646, 1998.
- 13) H. Nagase, C-R. Wang, T. Yoshimoto, C. Sugishita, T. Yoneto, A. Matsuzawa, and H. Nariuchi. Novel mutant mice secreting soluble CD4 without expression of membrane-bound CD4. Eur. J. Immunol. 28: 403-412, 1998.
- 14) T. Yoshimoto, T. Yoneto, C-R. Wang, S. Waki, S. Sunaga, Y. Komagata, M. Mitsuyama, J. Miyazaki, and H. Nariuchi. Reduced Th1 responses in interleukin-12 p40 transgenic mice. J. Immunol. 160: 588-594, 1998.
- 15) T. Yoshimoto, H. Nagase, T. Yoneto, J. Inoue and H. Nariuchi. Interleukin-12 expression in B cells by transformation with Epstein-Barr virus. Biochem. Biophys. Res. Commun. 252:556-560, 1998.
- 16) T. Yoshimoto, Y. Takahama, C-R. Wang, T. Yoneto, S. Waki, and H. Nariuchi. A pathogenic role of IL-12 in blood-stage murine malaria lethal strain Plasmodium berghei NK65 infection. J. Immunol. 160:5500-5505, 1998.
- 17) H. Saito, Y. Kanamori, T. Takemori, H. Nariuchi, E. Kubota, H. Takahashi-Iwanaga, T. Iwanaga, and H. Ishikawa. Generation of intestinal T cells from progenitors residing in gut cryptopatches. Science 280: 275-278, 1998.
- 18) T. Yoshimoto, T. Yoneto, S. Waki, and H. Nariuchi. IL-12 dependent mechanisms in the clearance of blood-stage murine malaria Plasmodium berghei XAT, an attenuated variant of Plasmodium berghei NK65. J. Infect. Dis. 177:1674-1681, 1998.

- 19) H. Yamane, T. Kato, and H. Nariuchi. Effective stimulation for IL-12 p35 mRNA accumulation and bioactive IL-12 production of antigen-presenting cells interacted with T helper cells. *J. Immunol.* in press.
- 20) T. Yoneto, T. Yoshimoto, C-R. Wang, Y. Takahama, M. Tsuji, and H. Nariuchi. Gamma interferon production is critical for protective immunity to infection with blood-stage *Plasmodium berghei* XAT but neither NO production nor NK cell activation is critical. *Infect. Immun.* in press.

老化に伴う T 細胞レセプター複合体の 構造および機能変化

齊藤 隆 (千葉大学大学院医学研究科 教授)

老化における細胞の機能変化の重要な因子として酸化ストレスが挙げられることから、酸化ストレスと免疫制御の関係、とりわけ T 細胞機能に及ぼす影響を解析した。酸化ストレスが CD3 ζ 鎖の消失を誘導することを見だし、そのメカニズムを解析したところ、正常な抗原刺激では CD3 ζ 鎖は活性化されて細胞骨格と会合するのに対し、酸化ストレスではリン酸化されるが細胞骨格と会合せず分解されることが示唆された。

キーワード：酸化ストレス、CD3 ζ 鎖、細胞骨格、免疫機能低下

A. 研究目的

これまで本研究班の解析によって、老化に伴って免疫系の変化、とりわけ T 細胞の機能低下が起こり、それが抗原特異的な認識・活性化を司る T 細胞抗原受容体 (TCR) を介した下流のシグナル伝達系の抑制によって誘導されていることが示唆されてきた。一方、酸化ストレスが老化における種々の細胞変化の原因になっていることが明らかになってきているものの、免疫系—とりわけ T 細胞機能に及ぼす影響はあまり解析されていない。我々はこれまで、担癌モデルマウスにおける T 細胞機能を解析する中で、マクロファージのレドックス状態に基づく酸化ストレスが TCR 複合体のうちの CD3 ζ 鎖の消失を誘導することを見いだした。昨年度は、T 細胞に直接酸化剤を加えることによって CD3 ζ 鎖の消失が誘導されることを見いだすことによって、実際に酸化ストレスが原因して TCR 複合体

の構造変化ならびに T 細胞の機能低下を引き起こしていることを明らかにした。この成果の上に立って今年度は、酸化ストレスによるこうした TCR 複合体への変化がどのようなメカニズムによって起こっているのか、を TCR を介する抗原刺激と比べることによってその違いを見いだすための解析を行った。

B. 研究方式

マウスの脾細胞より磁気ビーズを用いて T 細胞を単離した。抗原特異的な刺激としては、抗 CD3 抗体と二次抗体によって TCR をクロスリンクすることによって行い、酸化ストレスによる刺激としては、過酸化水素 1-10mM を加えて行った。刺激後 2-5 分後に、0.5% Triton-X100 または RIPA buffer (1% NP-40, 1% DOC, 0.1% SDS を含む) によって細胞を可溶化した。また、Detergent insoluble fraction の解析には、0.5% Triton

での可溶化の後、遠心後の核分画を再び RIPA buffer にて可溶化して得た細胞ライセートを抗 CD3 ζ 鎖抗体によって免疫沈降した後、抗リン酸化チロシン抗体、および抗 CD3 ζ 鎖抗体にてイムノブロットした。

C. 研究結果

1. 酸化ストレスによる T 細胞活性化

精製した T 細胞に過酸化水素 1-10mM を加えて刺激した細胞のライセートを抗リン酸化チロシン (PY)抗体で免疫沈降、ブロットして解析した。2-5 分という極めて短時間の刺激によって多くの分子のチロシンリン酸化が亢進することが強いスメアーのようなバンドの検出からわかる。Src キナーゼの Lck などが強くリン酸化されると共に、抗 CD3 ζ 鎖抗体で免疫沈降し、抗 PY 抗体を用いてブロットすると、分子量で 14-21 までの幅広いバンドのリン酸化 CD3 ζ 鎖が検出される。抗 CD3 ζ 鎖抗体でブロットすると時間と共に CD3 ζ 鎖のバンドが消失していくことが判明した。このことから酸化ストレスによって初期の活性化・リン酸化は誘導された後に CD3 ζ 鎖が消失して行くという関係が明らかになった。

2. 正常な TCR 刺激との比較

酸化ストレスによるこうした活性化・リン酸化と CD3 ζ 鎖の消失が、正常な TCR を介する刺激による活性化とどのように異なるのか、を解析した。T 細胞を抗 CD3 抗体でクロスリンクすると、2-5 分で種々のチロシンリン酸化が誘導される。しかし、その強さは過酸化水素添加に比べればずっと弱い。抗 CD3 ζ 鎖抗体で免疫沈降し、抗 PY 抗体でブロットすると、刺激なしに構成的にリン酸化されている 16 kd 付近のリン酸化 ζ 鎖が検出され、抗 CD3 抗体刺激によって、0.5% Triton のライセートからはそのバンドが消失したが、

RIPA buffer でのライセートでは多くは刺激しても同様に検出された。更に、0.5% Triton での可溶化後の不溶性分画を RIPA にて再度可溶化したサンプルを抗 CD3 抗体にて免疫沈降すると、抗 CD3 抗体刺激のものみに CD3 ζ を検出し、過酸化水素刺激のものには全く検出されなかった。

3. CD3 ζ 鎖消失の阻害

既に我々は、担癌マクロファージによる T 細胞からの CD3 ζ 鎖の消失が NAC の添加によって阻害されることを示した。酸化ストレスによってリン酸化されて消失して行く CD3 ζ 鎖が実際に蛋白分解を受けているものを蛋白分解酵素の阻害剤を添加して解析した。基礎的なデータとしては、この CD3 ζ 鎖の消失は、部分的にはプロテオソームの阻害剤であるラクタシステインや MG506 によって阻害されたが、ライソソームの阻害剤では影響がなかった。また、抗 CD3 抗体での刺激による CD3 ζ 鎖の検出にはこれらの阻害剤は大きく影響を与えないと思われた。

D. 考察

T 細胞を活性化できる二種類の刺激として、正常の抗原刺激を反映する抗 CD3 抗体によるクロスリンクによる方法と、酸化ストレスの代表としての過酸化水素による刺激を行って、CD3 ζ 鎖のリン酸化と消失・蛋白分解を解析した。これまで、TCR 刺激によって CD3 ζ 鎖はリン酸化され、detergent に不溶性分画に移行することが示唆されてきたが、実際、抗 CD3 抗体刺激に伴って、CD3 ζ 鎖は活性化初期から 0.5% Triton で可溶性な分画から著しく減少し、不溶性な画分に移動することが確認された。興味深いことに、酸化ストレスでは CD3 ζ 鎖のリン酸化は TCR 刺激よりも強く誘導され、しかも CD3 ζ 鎖の蛋白をウェスタンブロットで調べるとやはり大きく減少し