

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」

平成12年4月

主任研究者 中山 俊憲

千葉大学大学院医学研究科・助教授

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

免疫系の老化は、T細胞の機能異常による易感染性に特徴づけられる。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。若年マウスと老化マウスのリンパ組織を材料にして、このTh1/Th2のバランス制御に関わる分子の解析から、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、Ras/MAPK系が候補として浮上した。がんの発症頻度は加齢にともなって上昇するが、がん免疫に関わるNKT細胞の数・機能は加齢に伴って減少した。まずマウスにおいて、NKT細胞を用いた転移がんをターゲットにした細胞療法を確立し、将来的な臨床応用に役立てる。

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。従って、老化とともにT細胞の機能に異常が生じ、病原微生物に対する効率的な免疫反応が誘導できないといった免疫系の老化現象が見られると考えられている。また、T細胞が効率よく免疫反応を起こすためには、外来抗原の刺激(感染)によって、末梢リンパ組織で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細胞にバランスよく機能分化する必要がある。このバランスがくずれると、感染症に対する防御反応がうまく誘導されない。たとえば、細菌感染にはTh2細胞の分化が必要であり、アレルギー疾患の発症とTh2細胞の過剰分化との密接な関係も明らかになってきた。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第1の目的としている。

一方、ガン細胞は成人で1日に数千個の割合で発生していると考えられている。これを増殖する以前に、殺傷してガンの発生を抑えているのが、NK細胞や最近発見された第4のリンパ球NKT細胞である。最終年度で、わかったことであるが、60歳以上の老人では、NKT細胞数が激減している。我々の研究室で発見されたNKT細胞の特異的活性化物質、 α -

GalCerを用いてヒトのNKT細胞を活性化し、一種の細胞療法が行える可能性が出てきた。がん免疫に関わるNKT細胞の数・機能について加齢の影響を調べるとともに、まずマウスにおいて、転移がんをターゲットにしたNKT細胞療法を確立し、将来的な臨床応用に役立てることを第2の目的とする。

B. 研究方法

次の5つの研究手法を用いて老化マウスでの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事

ができる。約8週のyoung adult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。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、ビオチン化した抗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、その後に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。
- 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。
- 5) 12カ月の老齢マウスの末梢血、脾臓、肝臓でのNKT細胞の数、および60歳以上のヒトでのNKT細胞数をflowcytometryで調べた。B16メラノーマのマウス肝転移モデルを用いてNKT細胞の抗腫瘍活性を調べた。

(倫理面への配慮)

動物実験は千葉大学の動物実験指針に従って行った。ヒトの末梢血のNKT細胞の計測についても、インフォームドコンセントを十分に行って、採血した。

C. 研究結果

- 1)-4)については、昨年度からの実験であるが、今年度はいろいろな条件で次のような結果をconfirmした。(論文投稿準備中) 5)については、今年度新たに得られた実験結果である。
- 1) Th1/Th2細胞の分化については、加齢にともなって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、加齢にともなって上昇が見られた。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。
- 5) マウスの肝転移ガン実験モデルから、NKT細胞が存在しないとガンの転移が抑制できないことが明らかになった。また、NKT細胞を特異的に活性化する糖脂質 α -GalCerが発見された。NKT細胞が存在しないマウスでも、 α -GalCerを樹状細胞にパルスし、生体に戻してやると非常に強い抗腫瘍活性が誘導できることが分かった(J. Immunol. 163: 2387, 1999)。 α -GalCerはヒトのNKT細胞も活性化できることがわかった(Cancer Research. 59: 5102, 1999)。これらのことから、臨床応用の可能性が出てきた。そして、60歳以上のヒトでの解析により、NKT細胞の数は加齢とともに減少し、抗腫瘍効果を示すNKT細胞活性が低いことが分かった(論文投稿準備中)。Ras/MAPKカスケードの活性化に障害の見られる遺伝子操作マウスでは、NKT細胞の数が激減しているので、NKT細胞の分化・機能発現にもRas/MAPKカスケードが重要な役割を果たしていることが明らかになった。

D. 考察

免疫系の老化は、T細胞の機能異常による易感染性に特徴づけられるが、T細胞の細胞内シグナル伝達分子のうちRas/MAPKカスケードの機能低下が、老化マウスでのT細胞のTh2への分化障害を生み、感染症に対する防御機能を低下させることが示唆された。現在、Ras/MAPKカスケードのどの分子が、ペースメーカー的役割をになっているか、検討中である。

一方、「加齢に伴う、第4のリンパ球NKT細胞の機能異常とガン細胞の転移」に関する研究であるが、これは最終年度になって研究が大きく進展した。我々の研究室で見つかった、 α -GalCerはヒトのNKT細胞も活性化でき、臨床応用の可能性が出てきた。細胞療法を行うに当たって、どのような細胞を α -GalCerで刺激して移入すればよいかについて、現在条件検討を行っている。

E. 結論

加齢とともにTh2細胞の分化能は低下するが、これは、Ras/MAPKカスケードの機能低下によるためであることがわかった。Ras/MAPKカスケー

どのどれかの分子が免疫系の老化を制御するペー
 スメーカーの役割を持つ分子であることが強く示
 唆された。抗腫瘍効果を示すNKT細胞の数は加齢
 とともに減少する。ヒトで糖脂質 α -GalCerを用い
 て、NKT細胞療法を行うことができれば、新しい
 ガンの免疫療法が確立できることが示された。

F. 研究発表

1. 発表論文

1. Kawano, T., Tanaka, Y., Shimizu, E., Kaneko, Y., Kamada, N., Sato, H., Osada, H., Sekiya, S., Nakayama, T., and Taniguchi, M.: A nobel recognition motif of human NKT cell receptors for a glycolipid ligand. *Int. Immunol.* 11: 881-887 , 1999.
2. Sato, H., Nakayama, T., Tanaka, Y., Yamashita, M., Shibata, Y., Kondo, E., Saito, Y., and Taniguchi, M.: Induction of differentiation of pre-NKT cells to mature $V\alpha 14$ NKT cells by GM-CSF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:7439-7444 , 1999.
3. Toura, I., Kawano, T., Akutsu, Y., Nakayama, T., Ochiai, T. and Taniguchi, M.: Inhibition of experimental tumor metastasis by dendritic cells pulsed with α -galactosylceramide. *J. Immunol.* 163:2387-2391, 1999.
4. Kubo, M., Yamashita, M., Tada, T., Abe, R., Okumura, K., Ransom, J. T., and Nakayama, T.: CD28 Costimulation Accelerates IL-4 Receptor Sensitivity and IL-4- Mediated Th2 Differentiation. *J. Immunol.* 163:2432-2442 , 1999.
5. Cui, J., Watanabe, N., Kawano, T., Yamashita, Y., Kamata, T., Shimizu, C., Kimura, M., Shimizu, E., Koike, J., Koseki, H., Tanaka, Y., Taniguchi, M., and Nakayama, T.: Inhibition of T Helper Cell Type 2 cell Differentiation and Immunoglobulin E Response by Ligand-activated $V\alpha 14$ Natural Killer T cells. *J. Exp. Med.* 190:783-792 , 1999.
6. Kawano, T., Nakayama, T., Kamada, N., Kaneko, Y., Harada, M., Ogura, N., Akutsu, Y., Motohashi, S., Iizasa, T., Endo, H., Fujisawa, T., Shinkai, H., and Taniguchi, M.: Anti-tumor Cytotoxicity Mediated by Ligand-activated Human $V\alpha 24$ NKT Cells. *Cancer Research*, 59:5102-5105, 1999.
7. Shimamura, M., Huang, Y-Y., Suda, Y., Kusumoto, S., Sato, K., Grusby M. J., Sato, H., Nakayama, T. and Taniguchi, M.: Positive selection of NKT cells by $CD1^+$, $Cd11c^+$ non-lymphoid cells residing in the extrathymic organs. *Eur. J. Immunol.* 29 : 3962-3970(1999)
8. Kaneko, Y., Harada, M., Kawano, T., Yamashita, M., Shibata, Y., Gejyo, F., Nakayama T., and Taniguchi M. Augmentation of $V\alpha 14$ NKT Cell-Mediated Cytotoxicity by IL-4 in an Autocrine Mechanism Resulting in the Development of Concanavalin A-induced Hepatitis. *J. Exp. Med.* 191:105-114, 2000.
9. Adachi, T., Wakabayashi, C., Nakayama, T., Yakura, H. and Tsubata, T. CD72 Negatively Regulates Signaling Through the Antigen Receptor of B Cells. *J. Immunol.* 164:1223-1229, 2000.
10. Ito, K., Karasawa, M., Kawano, T., Akasaka, T., Akutsu, Y., Kondo, E., Tanaka, Y., Nakayama T., Sekiya, S., Sekikawa, K., and Taniguchi, M.: Involvement of decidual $V\alpha 14$ NKT cells in e abortion.. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:740-744, 2000.

2. 学会発表

1. Nakayama, T., Yamashita, M.: Requirement for activation of Ras/MAPK pathway in T helper subset differentiation. Keystone Symposia , Nevada , January 9-15, 1999.
2. Kimura, M., Nakayama, T.: IMPAIRED CALCIUM / CALCINEURIN PATHWAY IN IN VIVO ANERGIZED CD4 T CELLS. Experimental Biology , Washington, DC , April 17-21, 1999.

3. Nakayama, T., Yamashita, M.: TCR-MEDIATED ACTIVATION OF RAS/MAPK PATHWAY CONTROLS IL-4 RECEPTOR FUNCTION AND TYPE-2 HELPER T CELL. *Experimental Biology*, Washington, DC, April 17-21, 1999.
4. 阿久津泰典、外浦功、河野鐵、中山俊憲、落合武徳、谷口克. 活性化NKT細胞による抗腫瘍免疫療法マウスモデル. 第58回日本癌学会, 広島, 9.29-10.1, 1999.
5. 外浦功、阿久津泰典、河野鐵、中山俊憲、落合武徳、谷口克. NKT細胞の特異的リガンドを用いた Dendritic cell therapyの試み. 第58回日本癌学会, 広島, 9.29-10.1, 1999.
6. 山下政克、中山俊憲. カルシニューリン活性化によるIL-4受容体シグナル伝達系へのJak3/STAT5経路のリクルート. *Kyoto T Cell Conference*, 京都, 10.8-9, 1999.
7. 清水千織、山下政克、谷口克、中山俊憲. *lck proximal promoter*の活性調節と細胞周期. *Kyoto T Cell Conference*, 京都, 10.8-9, 1999.
8. 中山俊憲、山下政克、谷口克、多田富雄. Th1/Th2細胞の分化を制御する細胞内シグナル伝達. 第49回日本アレルギー学会, 10.18-20, 1999.
9. 山下政克、渡辺直熙、中山俊憲、谷口克. Th2細胞の分化制御機構: NKT細胞によるTh2細胞の分化抑制とIgE産生の特異的抑制. 第49回日本アレルギー学会, 広島, 10.18-20, 1999.
10. 原田通成、鎌田憲明、金子佳賢、河野鐵、中山俊憲、谷口克. マウスV α 14 NKT細胞でのCD1dを介した細胞障害抑制機構. 第29回日本免疫学会, 京都, 12.1-3, 1999.
11. 清水千織、山下政克、近藤英介、小椋庸隆、横山峰介、谷口克、中山俊憲. *lck proximal*(近位) promoterの発現調節機構. 第29回日本免疫学会, 京都, 12.1-3, 1999.
12. 木村元子、山下政克、赤坂武、谷口克、古関明彦、中山俊憲. T細胞における哺乳類ポリコーム群遺伝子mel-18のサイトカイン遺伝子発現調節. 第29回日本免疫学会, 京都, 12.1-3, 1999.
13. 中山俊憲、山下政克、清水千織、木村元子、鎌田徹、菅谷薫子、谷口克. Ras/MAPKカスケードによるTh1/Th2細胞分化制御. 第29回日本免疫学会, 京都, 12.1-3, 1999.
14. 山下政克、関信男、清水千織、木村元子、鎌田徹、谷口克、中山俊憲. カルシニューリン活性化によるIL-4受容体シグナル系へのJak3/Stat5経路のリクルート. 第29回日本免疫学会, 京都, 12.1-3, 1999.
15. 鎌田徹、山下政克、木村元子、清水千織、谷口克、中山俊憲. Th1/Th2細胞分化における加齢の影響. 第29回日本免疫学会, 京都, 12.1-3, 1999.
16. 柴田陽一、山下政克、渡辺直熙、河野鐵、中山俊憲、谷口克. 活性化NKT細胞によるTh2細胞分化抑制. 第29回日本免疫学会, 京都, 12.1-3, 1999.
17. 河野鐵、田中祐二郎、清水英子、金子佳賢、鎌田憲明、中山俊憲、谷口克. ヒトV α 24NKT細胞抗原受容体のCDR3 β に特徴的なアミノ酸モチーフ. 第29回日本免疫学会, 京都, 12.1-3, 1999.
18. 清野研一郎、村本賢三、谷口克、中山俊憲、八木田秀雄、奥村康、深尾立. 移植免疫におけるNKT細胞の役割. 第29回日本免疫学会, 京都, 12.1-3, 1999.
19. 佐藤宏、小池順造、中山俊憲、谷口克. GM-CSFによるV α 14 NKT細胞の分化の誘導. 第29回日本免疫学会, 京都, 12.1-3, 1999.
20. 金子佳賢、原田通成、河野鐵、柴田陽一、山下政克、中山俊憲、谷口克. Con A誘導性肝炎におけるV α 14NKT細胞の役割. 第29回日本免疫学会, 京都, 12.1-3, 1999.

21唐沢美香、河野鐵、阿久津泰典、中山俊憲、谷口克. 流産とNKT細胞. 第29回日本免疫学会, 京都, 12.1-3, 1999.

22吉川えみ子、山下政克、菅谷薫子、中山俊憲. 胸腺CD4⁺T細胞におけるTh1/Th2分化能解析. 第29回日本免疫学会, 京都, 12.1-3, 1999.

G.知的所有権の取得状況

なし