

老化細胞における新規免疫チェックポイント因子の個体老化における意義解明と治療開発

勝海悟郎

順天堂大学医学部内科学教室 循環器内科学講座

【研究の背景】

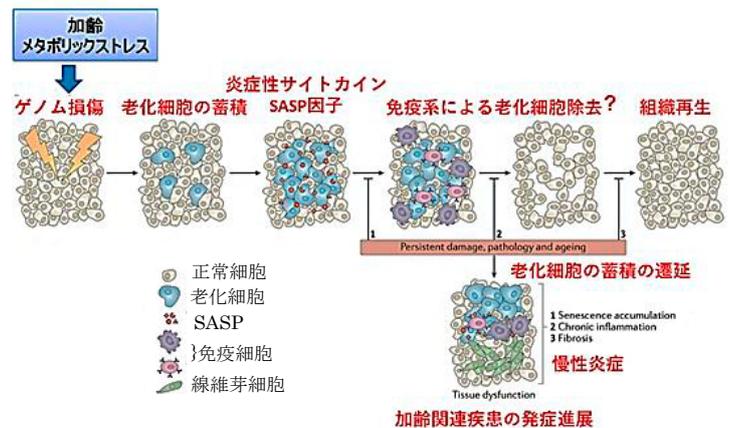
細胞レベルの老化現象である「細胞老化」は個体老化や種々の疾患ストレスによって促進され、諸臓器に「老化細胞」が蓄積することで種々の老化関連疾患の基盤病態となる。また、老化細胞の蓄積の原因の 1 つとして、元来有している内因性の除去機構が個体老化や種々の疾患ストレス下にその機能低下に陥ることが考えられているが、その詳細な機序は不明な点が多い(図 1)。

申請者の所属研究グループでも細胞老化を来したヒト血管内皮細胞の網羅的解析を通じて GPNMB と称する蛋白を同定し、同分子標的とした老化細胞除去ワクチンを開発した<sup>1,2)</sup>。SGLT2 阻害薬の一種であるカナグリフロジンに老化細胞における免疫チェックポイント分子 PD-L1 の発現抑制を通じ内因性の老化細胞除去促進をもたらす効果を有することを報告し<sup>1)</sup>、免疫機能が老化細胞の除去において重要な存在であることを示した。最近申請者は老化血管内皮細胞を用いたシングルセル RNAseq 解析を実施し、細胞老化の程度とよく正相関する「新規老化関連分子」を探索したところ、Interleukin - Inducible factor (ILIF) と称する遺伝子・蛋白を同定した(次項図 3A)。ILIF は免疫チェックポイント因子として機能し、T 細胞等に抑制的に作用してがん細胞のがん免疫機構からの逃避に重要な役割を持つことが知られており、ILIF が老化細胞においても同様に免疫機能による内因性の老化細胞除去からの逃避に寄与することが予想され、同時に老化細胞除去治療の標的になると考えられ、本研究を立案した。

【目 的】

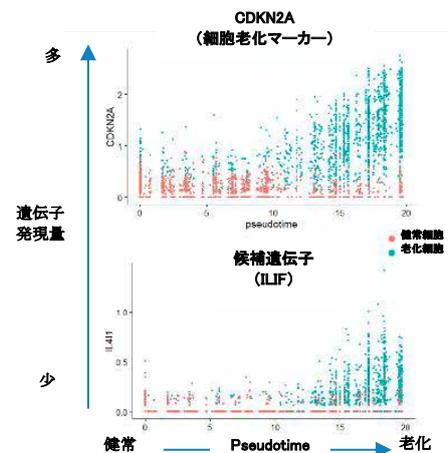
本研究は老化細胞で発現増加する新規免疫チェックポイント因子「Interleukin - InducibleFactor:ILIF」が個体内における老化細胞蓄積にどのように寄与し、老化ならびに加齢関連疾患の病態への影響を与えるかを検証すること、ならびに本分子を標的とした新規老化細胞除去治療の開発を目的とする。

図 1. 細胞老化仮説と老化細胞除去



Nat Rev Mol Cell Biol.2014

図 2.シングルセル RNA-seq 解析における老化血管内皮細胞の老化マーカー (CDKN2A) と ILIF の相関



## 【方 法】

### (1) ILIF の T 細胞の活性化阻害作用の検証

研究代表者は放射線照射または継代により細胞老化を来した血管内皮細胞を使用し、アデノ随伴ウイルスベクターまたは siRNA を用いて ILIF の過剰発現または欠失を施し、その表現型の変化を検証した。また、マウス耳介より採取した線維芽細胞に放射線照射を施し細胞老化を来したのち、ILIF に対する shRNA をコードするアデノ随伴ウイルス(AAV-shILIF)またはコントロール AAV(AAV-shScramble)を予め感染させ、CD3/CD28 抗体で活性化させたマウス脾細胞と共培養を行い、フローサイトメトリー法で T 細胞の表現型を評価した。

### (2) ILIF 欠失による各種疾患モデルマウス老齢マウスにおける影響の検証

研究代表者は、大阪大学大学院医学系研究科健康発達医学寄附講座(教授: 中神啓徳)との共同研究で ILIF 蛋白に対するペプチドワクチンを作製した。ILIF ワクチンまたはコントロールワクチン(KLH) 10ug/50ul をアジュバント(TiterMaxGold または Alum)と 1:1 で混和し、10ug/100ul 皮下接種した。2 種類の配列に対するワクチンを各々マウスに接種し、Titer の増加の良好なものを各種疾患モデルマウスに用いた。

糖尿病モデルマウスは C57BL/6 雄マウスに 4 週齢より高脂肪食(High-Fat-Diet (HFD):HFD32、日本クレア)負荷を施し作製した。12/14 週齢に ILIF ワクチンまたはコントロールワクチンを接種し、18 週齢にグルコース負荷試験ならびにインスリン負荷試験を実施、22 週齢に組織を採取した(図 3A)。

動脈硬化モデルマウスは広く用いられている ApoE ノックアウトマウスの雄に対し 6 週齢より高脂肪食(Western Diet (WD):F2HFD1、オリエンタル酵母)を負荷し、14/16 週齢でワクチンを接種した。22 週齢で大動脈を採取し、解析に供した(図 3B)。

老齢マウスにおける解析は 90-100 週齢の C57BL/6 雄マウスに ILIF ワクチンまたはコントロールワクチンを接種し、個体寿命を解析した(図 3C)。

## 【結 果】

### (1) ILIF の T 細胞の活性化阻害作用の検証

まず、放射線照射により細胞老化を誘導したヒト血管内皮細胞で ILIF を siRNA で knockdown したものを RNA-seq 解析に供し、過去に我々が実施した若年および細胞老化を来したヒト血管内皮細胞を用いた RNA-Seq データ(GSE155680)と突合せ、細胞老化で低下し、ILIF 欠失で増加する遺伝子群を抽出した後 Gene Ontology 解析を行ったところ、ILIF の欠失により T 細胞活性化に係る因子の発現が増加することが分かった。

さらに、マウスより採取した皮膚線維芽細胞および脾細胞を用いた共培養アッセイを行ったところ、ILIF を欠失させた際に T 細胞の活性化が促進されることが分かった(B)。逆に ILIF の添加によりこの活性化が抑制されることも併せて突き止めた。

図 3. 各種マウスモデルにおける実験概要

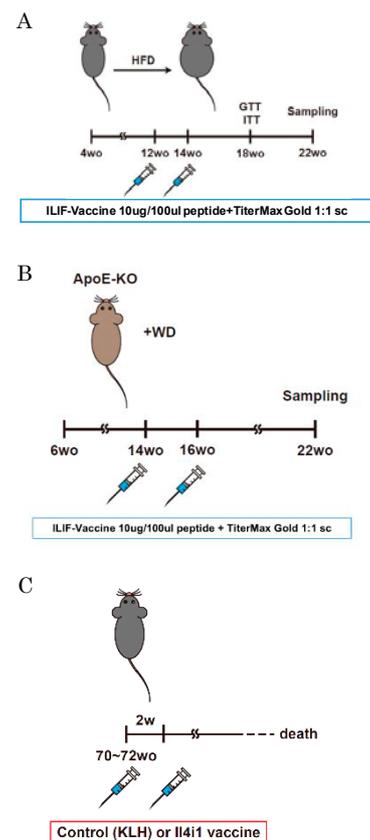
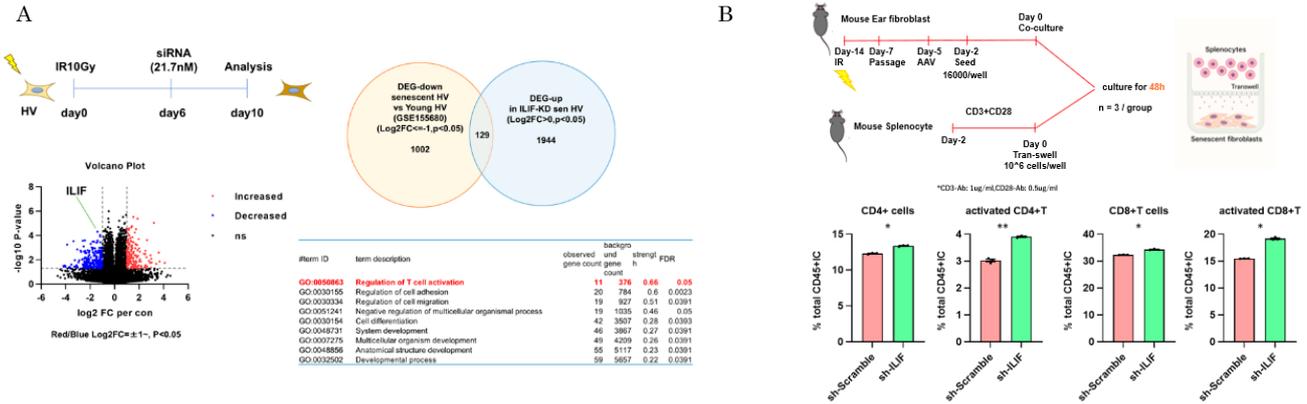


図 4. HUVEC (A) における RNA-seq 解析およびマウス由来線維芽細胞と脾細胞の共培養 (B)

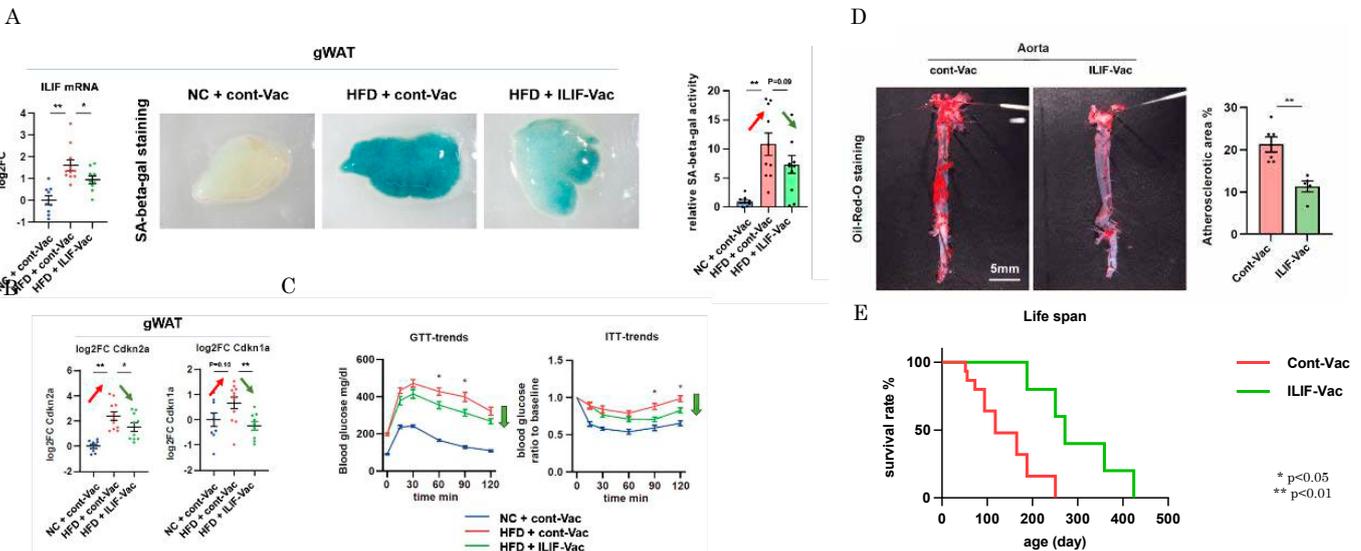


(2) ILIF 欠失による各種疾患モデルマウスおよび老齢マウスにおける影響の検証

高脂肪食負荷により作成した糖尿病モデルマウスは、通常食を与えたマウスと比べ有意に白色脂肪組織(内臓脂肪)において ILIF の発現が増えることを、これまでの予備検討で確認している。このモデルマウスの ILIF ワクチンを接種すると、ILIF の発現量が有意に減少し、さらに内臓脂肪 (gWAT) における老化細胞の蓄積が減少することが老化細胞染色 (SA-β gal 染色) で分かった (図 5A)。また、脂肪組織において細胞老化マーカーである p16 (Cdkn2a)、p21 (Cdkn1a) の発現量もワクチン接種により有意に低下し (図 5B)、グルコース負荷試験およびインスリン負荷試験でも、耐糖能の有意な改善を認めた (図 5C)。

動脈硬化モデルマウスにおいては、ワクチン接種群で大動脈の動脈硬化巣の進展が半分程度に抑制されることが分かった (図 5D)。また、老齢マウスにおいては現時点で解析した個体数が少ないが、ILIF ワクチン群で有意な寿命延長が得られた (図 5E)。

図 5. 各種マウスモデルにおける ILIF ワクチンの治療効果



【考 察】

これまでの検討結果から、マウスにおいて ILIF を標的とした老化細胞除去治療が抗老化効果を示し得ることが分かった。その機序として ILIF が持つ免疫抑制機能の抑制を通じて内因性の老化細胞除去機構の促進を促すことが示唆され、実際に ILIF の欠失により T 細胞の活性化プロファイルの改善効果が認められた。ただ、現状直接的なエビデンスが十分ではないため、本研究の仮説を十分に立証するためには、in vitro 環境のみならず in vivo 環境において ILIF の老化細胞除去機構への影響を評価することが必要である。また、老齢マウスにおける個体寿命測定に供した個体数が少なく、雌雄の比較が

未実施であり、今後遂行していく予定である。いずれにしても ILIF は分泌蛋白の一種であることから、ワクチンを用いて ILIF の機能を抑制するないしは ILIF を高発現する細胞を殺傷する戦略は合理的であり、実際有効性がマウスで見出されつつあるのは今後の研究進展に大いに期待を持てるものと考えられる。

#### 【臨床的意義・臨床への貢献度】

老化細胞除去治療は心血管疾患以外にも腎臓病、肺線維症、サルコペニア、骨粗しょう症、認知症など幅広い加齢関連疾患に対する治療法として有用であることが動物実験によって明らかにされている。すなわち、加齢関連疾患のみならず「老化」そのものを横断的に治療が可能で、疾患を特定せず個体全体に対して有効な治療戦略であり、これが既存の治療法とは一線を画す創造的で有望な点である。わが国をはじめとする先進国では少子高齢化社会を背景に高齢者の疾患発症に伴う健康寿命の棄損が社会に大きな負担をもたらすことが昨今問題となっている。老化細胞除去治療を通じた老化および種々の加齢関連疾患の予防・治療は健康寿命の延伸に寄与し、社会負担を軽減することが大いに期待される。がん治療において細胞を直接障害する化合物のみならず免疫チェックポイント因子に対する抗体製剤も上市されているように、老化細胞除去治療においても多様な治療戦略を提供することは治療の安全性や有効性を高める上で重要で、免疫機能の利用は有望な治療戦略の一つと考えられる。

#### 【参考・引用文献】

1. Suda M, Shimizu I\*, **Katsuumi G\***, Yoshida Y, Hayashi Y, Ikegami R, Matsumoto N, Yoshida Y, Mikawa R, Katayama A, Wada J, Seki M, Suzuki Y, Iwama A, Nakagami H, Nagasawa A, Morishita R, Sugimoto M, Okuda S, Tsuchida M, Ozaki K, Nakanishi-Matsui M, Minamino T. Senolytic vaccination improves normal and pathological age-related phenotypes and increases lifespan in progeroid mice. *Nat Aging* 2021;1: 1117-1126.\* co-first author
2. **Katsuumi G\***, Shimizu I\*, Suda M\*, Yoshida Y, Furihata T, Joki Y, Hsiao CL, Fujiki S, Abe M, Sugimoto M, Soga T, Minamino T. Sodium glucose co-transporter 2 inhibition eliminates senescent cells and alleviates pathological aging. *Nat Aging* 2024.4(7):926-938. \* co-first author