

【トピックス】

加齢に伴って増加するPD-1陽性Tリンパ球の正体は？

猪股光司、嶋田有紀子、林 昌美、岩下淑子
 東京都健康長寿医療センター研究所（東京都老人総合研究所）
 老化制御研究チーム 環境老化

1. はじめに

加齢に伴う免疫機能の低下は易感染性、ガンや自己免疫疾患の発症、ストレスに対する抵抗力の低下等と密接に関連しており、健康長寿を阻む大きな要因である。超高齢化社会が急速に進行しつつある今日、低下した免疫機能を如何に回復させるかが重要な課題となっている。

免疫系は造血系幹細胞から分化した様々な細胞から構成されており、マクロファージや好中球を中心とする自然免疫系と抗原特異的レセプターを有するT細胞やB細胞等のリンパ球を主体とする獲得免疫系に大別される。加齢の影響は自然免疫系よりも獲得免疫系が受け易く、なかでも免疫応答全体をコントロールするT細胞系が特に影響を受け易い[1]。T細胞は表面に発現する共受容体の違いからCD4⁺ T細胞とCD8⁺ T細胞に分けられる。加齢の影響はCD4⁺ T細胞で良く調べられており、増殖能やIL-2産生能が加齢に伴って著しく低下することが知られている [2-4]。CD4⁺ T細胞はB細胞の抗体産生能やCD8⁺ T細胞の細胞傷害能を制御するだけでなく、自然免疫系のマクロファージや好中球の機能制御にも関与することから、この細胞の機能低下は免疫系全体に悪影響を及ぼすことになる。従って、免疫機能の回復を考える場合、CD4⁺ T細胞の機能低下に関わる情報は最も重要なものとなる。

最近、我々はマウスのCD4⁺ T細胞を用いた解析から細胞表面にPD-1と呼ばれる分子を発現する細胞集団が加齢に伴って著しく増加することや、その集団が抗原刺激に対して応答能を失っていることを発見した[5]。また、我々の報告に続いて同様の報告が相次いでなされ[6-7]、加齢に伴う免疫機能の低下とPD-1陽性CD4⁺ T細胞との関係が注目を集めている。本稿ではPD-1陽性 CD4⁺ T細胞の性質や特徴を紹介するとともに、この細胞集団を標的にした免疫機能回復の可能性について考えてみたい。

2. T細胞の免疫応答と補助シグナル受容体

T細胞の機能はT細胞受容体 (TCR) を介した抗原刺激シグナルと補助シグナル受容体を介した第二のシグナルによって厳密に制御されている(図1)。補助シグナル受

容体にはTCRシグナルの伝達を正に制御する活性型と負に制御する抑制型がある [8]。T細胞上の主要な補助シグナル受容体は活性型のCD28であり、恒常的に発現している。一方、抑制型はCD28のスーパーファミリーであるPD-1やCTLA-4等が存在しており、これらの分子はT細胞の活性化に伴って一過性に細胞表面に発現する。CD28を介した補助シグナルは、病原体の排除に必要な抗原特異的T細胞のクローン増殖、CD4⁺ T細胞の分化に必要なサイトカイン(リンフォカイン)の分泌、CD8⁺ T細胞(キラー T細胞)やメモリー T細胞の分化等の免疫応答を促進する。一方、病原体の除去が終了して免疫応答を収束させる場合やTCRが自己抗原と反応するようになった場合には抑制型の補助シグナルが優勢となり、T細胞の増殖抑制、アポトーシス、アナジー等を誘導して免疫応答を抑制する。このように、T細胞の免疫応答は活性型および抑制型補助シグナルの強度のバランスによって制御されている。

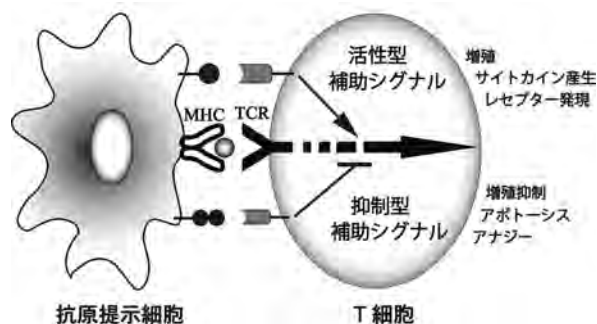


図1 活性型/抑制型補助シグナルによるT細胞機能の制御

T細胞の機能は、主にT細胞受容体 (TCR) を介した抗原刺激シグナルと補助シグナル受容体を介した補助シグナルによって制御されている。補助シグナルにはTCRシグナルの伝達を促進する活性型と「負」に制御する抑制型が存在する (<http://www.rs.noda.tus.ac.jp/~immunol/review.html>より改変)。

3. 加齢に伴って増加するPD-1陽性CD4⁺ T細胞

TCRシグナル伝達経路に及ぼす加齢の影響や活性型補助シグナル受容体CD28の加齢変化に関する報告は数多く存在する [9-11]。しかし、抑制型の補助シグナル受容体に焦点を当てた研究は殆どなされていない。そこで我々は、若齢および老齢マウスの未刺激CD4⁺ T細胞を用い、補助シグナル受容体の発現量を調べてみた。その結果、抑制型の受容体であるPD-1とCTLA-4の発現が老齢では若齢に比べてmRNAおよびタンパク質レベルで亢進していることが明らかになった。それに対し、活性

連絡先：〒173-0015
 東京都板橋区栄町35-2
 TEL: 03-3964-3241 内線3068
 FAX: 03-3579-4776
 E-mail: minomata@tmig.or.jp

型のCD28の発現には有意な差が認められなかった[5]。補助シグナル受容体は細胞表面に発現して初めてその機能を発揮することから、次に細胞表面に於ける発現量を調べた(図2)。その結果、CTLA-4やCD28の発現には有意な差が認められなかったが、PD-1では顕著な違いが見いだされた。つまり、若齢マウスではPD-1を発現するCD4⁺ T細胞が僅かしか存在しないのに対し、老齢ではPD-1陽性細胞が劇的に増加し、約70%にも達することが判明した。また、この細胞集団(PD-1⁺CD4⁺ T細胞)が加齢に伴ってほぼ直線的に増加することも確認されている[図4および引用文献5-7]。PD-1⁺CD4⁺ T細胞が増加する機構については未だ良くわかっていないが、老齢マウスのT細胞ではPD-1の細胞内への取り込み機構に障害があることが示唆されている[5]。

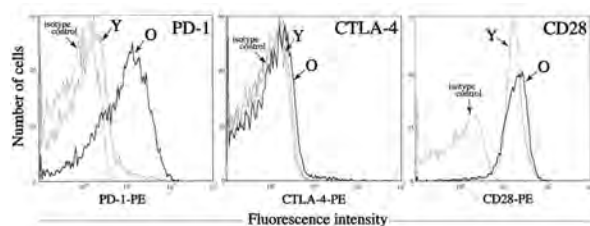


図2 CD4⁺ T細胞に於ける補助シグナル受容体の加齢変化

若齢(Y, 3ヶ月齢)および老齢(O, 23ヶ月齢)マウスから調製した未刺激CD4⁺ T細胞の表面に発現するPD-1、CTLA-4、CD28をフローサイトメーターで解析した。若齢ではPD-1を発現する細胞はごく僅かであるが、老齢では未刺激であるにも拘らず著しく増加している。それに対し、CTLA-4とCD28には有意な差が認められない(引用文献5より改変)。isotype control:染色に用いた抗体の反応が特異的であることを確認するために用いた抗体で、免疫動物、アイソタイプ(抗体クラス)、標識が同じものである。

4. PD-1⁺CD4⁺ T細胞はTCR刺激に不応答性である

PD-1はTCR刺激に伴って一過性に細胞表面に発現すると考えられてきた[12]。しかし上記の結果は、老齢マウスのCD4⁺ T細胞の場合、刺激を加えなくてもPD-1が発現していることを示している。このことから、老齢マウスのCD4⁺ T細胞は調製時に於いて既に活性化状態にあることも考えられる。そこで、活性化マーカーであるCD25やCD69の発現を調べて見たが、PD-1を発現する大半の細胞は不活化状態であった[5]。PD-1はTCRシグナルの伝達を抑制することから、未刺激状態でPD-1を細胞表面に発現するCD4⁺ T細胞は抗原刺激に対して応答性が低下していることが予想される。そこで、老齢マウスのCD4⁺ T細胞をPD-1陽性とPD-1陰性の細胞集団に分別し、各々の集団に於ける細胞分裂能を解析した(図3)。その結果、PD-1陰性の細胞集団ではTCR刺激に応答した細胞分裂が認められるのに対し、PD-1を発現する細胞集団では刺激に対して全く応答しないことが判明した。また、PD-1⁺CD4⁺ T細胞ではIL-2、IFN- γ 、IL-4等のリンフォカイン産生能も著しく低下している[7]。ところが、ごく最近、制御性のCD4⁺ T細胞(Treg)に於いてもPD-1を発現する集団が加齢に伴って増加することが報告された[6]。従って、PD-1を指標にしたソーティングではTregが混入する可能性がある。しか

し、Tregを完全に取り除いてもPD-1⁺CD4⁺ T細胞の増殖能には全く影響しないことから[7]、PD-1⁺CD4⁺ T細胞の応答性の低下はTregによる外的な抑制とは無関係である。これらの結果から、PD-1⁺CD4⁺ T細胞の機能低下にはPD-1を介した補助シグナルの関与が第一に考えられる。ところが、PD-1欠損マウスのCD4⁺ T細胞や白血病細胞株を用いた解析ではPD-1シグナルの関与に否定的な結果が得られている[7]。今後、PD-1のリガンドであるPD-Lの動態やPD-1とPD-Lの相互作用等を詳細に解析し検証する必要がある。

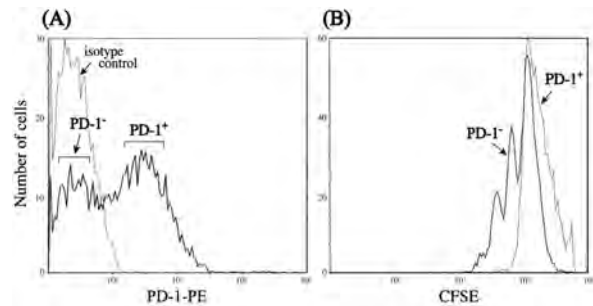


図3 PD-1陽性CD4⁺ T細胞はTCR刺激に不応答性である

(A)老齢マウスから調製した未刺激CD4⁺ T細胞の表面に発現するPD-1をフローサイトメーターで解析した。(B)セルソーターで分取したPD-1陰性およびPD-1陽性の細胞集団(Aを参照)をCFSEで染色した後、抗CD3抗体でコートしたプレート上で抗CD28抗体の共存下で刺激培養した。48時間後に細胞分裂能をフローサイトメーターで解析した。PD-1陰性の細胞集団では細胞分裂が認められる(分裂によるCFSEの希釈)が、PD-1陽性の集団では認められない。(B)の横軸の蛍光ピークは右側から0、1、2の細胞分裂周期を示す(引用文献5より改変)

5. PD-1はメモリータイプのCD4⁺ T細胞に発現する

T細胞には抗原未感作のナイーブフェノタイプ(NP)と抗原感作を受けたメモリーフェノタイプ(MP)が存在する。加齢に伴って前者は減少し、後者は増加することが知られている[13]。そこで、PD-1が何れのサブセットに発現しているかをCD44とCD62-Lをマーカーにして調べた。その結果、PD-1はMP(CD44^{high}CD62-L^{low})のCD4⁺ T細胞に選択的に発現し、NP(CD44^{low}CD62-L^{high})の細胞には発現していないことが明らかになった[図4および引用文献5-7]。前述の如く、加齢はNP CD4⁺ T細胞の減少とMP CD4⁺ T細胞の蓄積をもたらすことから、PD-1陽性細胞の動態は単に若齢と老齢マウスに於けるNP/MP CD4⁺ T細胞の存在比を示しているに過ぎないとも考えられる。しかし、PD-1は全てのMP CD4⁺ T細胞に発現しているわけではなく、PD-1を発現するMP CD4⁺ T細胞の割合が加齢に伴って増加することが確認されている[5-6]。また、MPのT細胞はエフェクター(CD44^{low}CD62-L^{low})、エフェクター/メモリー(CD44^{high}CD62-L^{low})、セントラルメモリー(CD44^{high}CD62-L^{high})に分類されるが、PD-1は何れのサブセットにも発現している[6]。PD-1⁺ MP CD4⁺ T細胞は、Rag2^{-/-}マウス(TCRや抗体分子の遺伝子再構成に必要なRag2遺伝子を欠くためTおよびBリンパ球を持たず、獲得免疫系が機能しない)や γ 線照射C57BL/6マウス(γ 線の照射で造血機能が障害を受けている)へ

の移入実験等の結果から、ホメオスタシス増殖は可能であるものの抗原特異的な免疫応答ができない特異なメモリーフェノタイプの集団と考えられている[7]。

一連の解析から、加齢に伴って抗原刺激に不応答性のPD-1⁺ MP CD4⁺ T細胞が蓄積することが明らかになった。しかし一方では、老齢マウスのCD4⁺ T細胞であってもPD-1陰性MP CD4⁺ T細胞やNP CD4⁺ T細胞には若齢マウスに匹敵する機能が保持されていることも判明している [図3および引用文献7]。これまで加齢に伴う免疫機能の低下は、T細胞全体に起こる不可逆的な機能低下が原因と考えられてきた。しかし上記の事実から、実際は免疫応答を失った特定の細胞集団が蓄積することが主な原因である可能性が強いと考えられる。

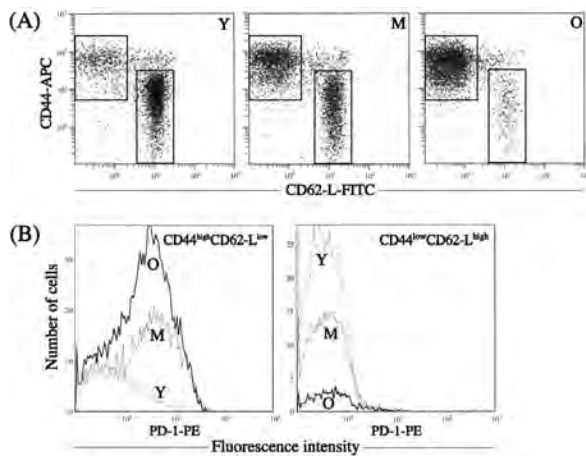


図4 PD-1はメモリータイプのCD4⁺ T細胞に選択的に発現する

(A): 若齢(Y, 3ヶ月齢)、中齢(M, 11ヶ月齢)、老齢(O, 23ヶ月齢) マウスから調製した未刺激CD4⁺ T細胞についてCD44とCD62-Lに対する特異抗体を用いてサブセット解析を行った。加齢に伴ってナイーブタイプ(CD44^{low}CD62-L^{high})の細胞集団が減少し、エフェクター/メモリータイプ(CD44^{high}CD62-L^{low})の集団が著しく増加した。(B): それぞれのサブセットに於けるPD-1の発現を比較した。PD-1はエフェクター/メモリータイプのCD4⁺ T細胞に選択的に発現しており(左)、ナイーブタイプでは殆ど発現が認められない(右)。PD-1を発現するCD4⁺ T細胞は加齢に伴ってほぼ直線的に増加する(左)(引用文献5より改変)。

6. PD-1⁺ MP CD4⁺ T細胞の特異な遺伝子発現

PD-1⁺ MP CD4⁺ T細胞はユニークな遺伝子発現を示すことが明らかになってきた[7]。PD-1⁺ MP CD4⁺ T細胞ではPD-1⁻ MP CD4⁺ T細胞に比べて*Pdcd1*、*Cd121b*、*Spp1*(各々 PD-1、IL-1レセプタータイプ-2、オステオポンチンをコードする)を含む17個の遺伝子で選択的な発現上昇が認められている。その中で最も過剰に発現するのはオステオポンチン遺伝子である。オステオポンチンはマクロファージ、樹状細胞、活性化したTh1細胞等の細胞が産生する非コラーゲン性の細胞外マトリックスである。しかし、近年、強力な炎症性サイトカインとしての性質を併せ持つことが明らかとなり、炎症性疾患との関係が注目されている [14, 15]。また、PD-1⁺ MP CD4⁺ T細胞は転写関連遺伝子の発現に於いても特徴的な変化が認められ、C/EBP α の発現亢進や*c-Myc*、*cyclin D1*の発現抑制等が確認されている[7]。

C/EBP α はマクロファージや好中球等の骨髄球系細胞の分化を司る転写因子であり、通常T細胞には発現しない分子である [16-17]。これらの事実から、PD-1⁺ MP CD4⁺ T細胞はPD-1陰性のMP CD4⁺ T細胞から特異な遺伝子再プログラミングによって派生するものと考えられている(図5)。C/EBP α は*Cdk*インヒビターとの相互作用もしくは*c-Myc*を抑制することによって強力な抗増殖効果を発揮する [18]。実際、若齢マウスのCD4⁺ T細胞にC/EBP α をコードする*Cebpa*を強制発現させると*c-Myc*、*cyclin D1*の発現抑制並びに増殖能の著しい低下が観察されている。また、*Spp1*の顕著な活性化と*IL-2*、*IL-4*の活性化抑制も認められる[7]。これらの結果から、PD-1⁺ MP CD4⁺ T細胞が示す増殖能の低下やオステオポンチン産生などの機能異常にはC/EBP α が重要な役割を担っているものと考えられる。

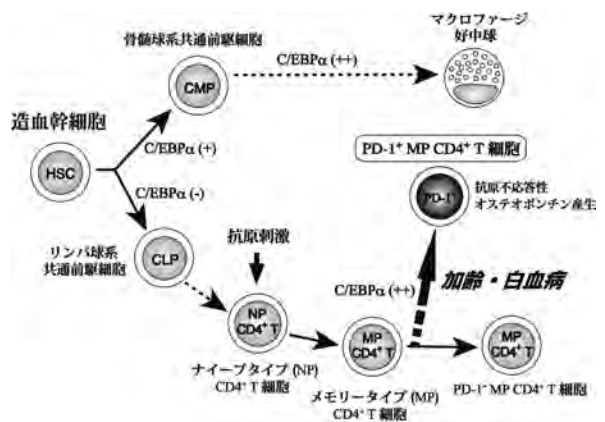


図5 PD-1⁺ MP CD4⁺ T細胞の由来とその性質

加齢に伴って増加するPD-1⁺ MP CD4⁺ T細胞は、遺伝子再プログラミングによるC/EBP α (本来は非リンパ球系細胞の分化や機能の制御に関係する転写因子)等の発現によってPD-1陰性MP CD4⁺ T細胞から派生するものと考えられている。また、この細胞集団と機能的にも遺伝子発現パターンに於いても同様の集団が白血病でも著しく増加する。PD-1⁺ MP CD4⁺ T細胞は抗原刺激に対して不応答性であることや炎症性サイトカインであるオステオポンチンを大量に産生するなど特異な性質を有している (http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news_data/h/h1/news6/2009/090908_1.htmより改変)。

7. 白血病でも増加するPD-1⁺ MP CD4⁺ T細胞

白血病等の悪性腫瘍ではではしばしば深刻なT細胞の免疫抑制が認められ、PD-1⁺ MP CD4⁺ T細胞との関係が注目される。湊らの研究グループは白血病細胞BA-1を移植したC57BL/6マウスの解析並びに白血病を自然発症するSpa-1^{-/-}マウスの解析から、白血病の発症に伴ってPD-1陽性のMP CD4⁺ T細胞が著しく増加することを明らかにした[7]。また、白血病で同定されたPD-1⁺ MP CD4⁺ T細胞に於いて老齢マウスの場合と同様に増殖能の低下、リンフォカイン産生能の低下、オステオポンチンの産生等の機能変化が起こることを観察している。更に、老齢マウスおよび白血病マウス由来PD-1⁺ MP CD4⁺ T細胞の遺伝子発現プロファイリングの結果、両者に高い相関を見いだしている。これらの事実から、白血病に於いても加齢で増加するPD-1⁺ MP CD4⁺ T細胞とほぼ同様の細胞集団が増加するものと考えられて

いる (図5)。

PD-1⁺ MP CD4⁺ T細胞は、抗原刺激に対して不応答性であることから老齢個体や白血病に於ける免疫抑制に関与している可能性が高い。また、PD-1⁺ MP CD4⁺ T細胞が過剰に産生するオステオポンチンにはガン細胞の浸潤や転移を促進する作用が認められており[19]、この細胞集団がガンの進展にも関与する可能性がある。更に、自己反応性T細胞の除去システムに影響を及ぼすことも考えられる。生体は自己反応性T細胞を細胞死によって除去するが、オステオポンチンには活性化CD4⁺ T細胞のアポトーシスを抑制する作用がある [20]。このことから、老齢個体や悪性腫瘍では自己反応性T細胞の除去システムに障害があることも予想される。

8. おわりに

加齢に伴って増加する細胞集団として発見されたPD-1陽性CD4⁺ T細胞の特徴がかなり明らかになってきた。T細胞は病原体に反応すると活性化して増殖するが、役割を終えるとその殆どはアポトーシスを起こして死滅する。しかし、そのごく一部はメモリー T細胞として長期間生き続け二度目の感染に備えている。PD-1陽性CD4⁺ T細胞はこのメモリー T細胞から派生した特異な細胞集団であることが明らかになった。この細胞集団 (PD-1⁺ MP CD4⁺ T細胞) は抗原刺激に対して応答能を失っているだけでなく、オステオポンチンを大量に産生するなど、元の細胞とは機能的にも大きく変化している。また、これと同様の細胞集団が白血病でも増加することが明らかになった。

前述の如く、PD-1⁺ MP CD4⁺ T細胞は老齢個体や悪性腫瘍に於ける免疫抑制と密接に関連すると考えられる。そこで最後に、PD-1⁺ MP CD4⁺ T細胞を標的にした免疫機能の回復の可能性について考えてみたい。慢性のウイルス感染で疲弊状態に陥ったCD8⁺ T細胞は、抗PD-1抗体等によるPD-1-PD-L経路の遮断で機能が回復することが知られている [21]。このことから、加齢や白血病で蓄積するPD-1⁺ MP CD4⁺ T細胞についても機能回復が期待される。しかし、PD-1⁺ MP CD4⁺ T細胞機能低下へのPD-1の関与については否定的な見方があるだけでなく、PD-1⁺ MP CD4⁺ T細胞は機能的に元の細胞とは大きく変化している。これらの事実を考え合わせると、単なるPD-1-PD-L経路の遮断では本来の機能を回復させることは難しいと思われる。次に考えられる手段としては、機能を失ったPD-1⁺ MP CD4⁺ T細胞を抗PD-1抗体やPD-LのPD-1結合部位に相当するペプチド等を用いて選択的に取り除くことである。この手法で残存するPD-1⁻ MP CD4⁺ T細胞やNP CD4⁺ T細胞には十分な機能が保持されており、ホメオスタシス増殖による細胞数の回復が期待できることから有用な手段になると考えられる。今後、PD-1⁺ MP CD4⁺ T細胞を効率良くしかも安全に除去する方法を検討する必要がある。また、今後の解析からPD-1⁺ MP CD4⁺ T細胞が増加するメカニズムが解明されれば、その細胞集団を増加させないような手立ても可能になるかも知れない。

何れにしても、上記の手段はあくまでもマウスの結果に基づいたものである。ヒトで免疫機能の回復を実現するためにはまだまだ解決すべき課題が多いのが実態である。しかし、PD-1⁺ MP CD4⁺ T細胞の発見によって新たな展望が生まれてきたことは間違いない。今後の研究から免疫機能回復法の開発に結びつく成果を期待したい。

引用文献

1. Hirokawa K, Utsuyama M, Kasai M, Kurashima C. Aging and immunity. *Acta Pathol Jpn* 42:537-548, 1992.
2. Chakravarti B, Abraham GN. Aging and T-cell-mediated immunity. *Mech Ageing Dev* 108:183-206, 1999.
3. Linton PJ, Dorshkind K. Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat Immunol* 5:133-139, 2004.
4. Sadighi Akha AA and Miller RA. Signal transduction in the aging immune system. *Curr Opin Immunol* 17:486-491, 2005.
5. Shimada Y, Hayashi M, Nagasaka Y, Ohno-Iwashita Y, Inomata M. Age-associated up-regulation of a negative co-stimulatory receptor PD-1 in mouse CD4⁺ T cells. *Exp Gerontol* 44:517-522, 2009.
6. Channappanavar R, Twardy BS, Krishna P, Suvas S. Advancing age leads to predominance of inhibitory receptor expressing CD4 T cells. *Mech Ageing Dev* 130:709-712, 2009.
7. Shimatani K, Nakashima Y, Hattori M, Hamazaki Y, Minato N. PD-1⁺ memory phenotype CD4⁺ T cells expressing C/EBP α underlie T cell immunodepression in senescence and leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:15807-15812, 2009.
8. Khoury SJ, Sayegh MH. The roles of the new negative T cell costimulatory pathways in regulating autoimmunity. *Immunity* 20:529-538, 2004.
9. Miller RA, Garcia G, Kirk CJ, Witkowski JM. Early activation defects in T lymphocytes from aged mice. *Immunol Rev* 160:79-90, 1997.
10. Inomata M, Shimada Y, Hayashi M, Shimizu J, Ohno-Iwashita Y. Impairment in a negative regulatory system for TCR signaling in CD4⁺ T cells from old mice. *FEBS Lett* 581:3039-3043, 2007.
11. Vallejo AN. CD28 extinction in human T cells: altered functions and the program of T-cell senescence. *Immunol Rev* 205:158-169, 2005.
12. Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y,

- Tsubata T, Yagita H, Honjo T. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol* 8:765-772, 1996.
13. Pawelec G, Hirokawa K, Fülöp T Jr. Altered T cell signalling in ageing. *Mech. Ageing Dev* 122:1613-1637, 2001
 14. Jansson M, Panoutsakopoulou V, Baker J, Klein L, Cantor H. Cutting edge: Attenuated experimental autoimmune encephalomyelitis in eta-1/osteopontin-deficient mice. *J Immunol* 168:2096-2099, 2002.
 15. Wang KX, Denhardt DT. Osteopontin: Role in immune regulation and stress responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 19:333-345, 2008.
 16. Zhang P, Iwasaki-Arai J, Iwasaki H, Fenyus ML, Dayaram T, Owens BM, Shigematsu H, Levantini E, Huettner CS, Lekstrom-Himes JA, Akashi K, Tenen DG. Enhancement of hematopoietic stem cell repopulating capacity and self-renewal in the absence of the transcription factor C/EBP alpha. *Immunity* 21:853-863, 2004.
 17. Johnson PF. Molecular stop signs: Regulation of cell-cycle arrest by C/EBP transcription factors. *J Cell Sci* 118:2545-2555, 2005.
 18. Laiosa CV, Stadtfeld M, Xie H, de Andres-Aguayo L, Graf T. Reprogramming of committed T cell progenitors to macrophages and dendritic cells by C/EBP alpha and PU.1 transcription factors. *Immunity* 25:731-744, 2006.
 19. El-Tanani MK, Campbell FC, Kurisetty V, Jin D, McCann M, Rudland PS. The regulation and role of osteopontin in malignant transformation and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 17:463-474, 2006.
 20. Hur EM, Youssef S, Haws ME, Zhang SY, Sobel RA, Steinman L. Osteopontin-induced relapse and progression of autoimmune brain disease through enhanced survival of activated T cells. *Nat Immunol* 8:74-83, 2007.
 21. Rowland-Jones S, Dong T. HIV: tired T cells turn around. *Nature* 443:282-283, 2006.