

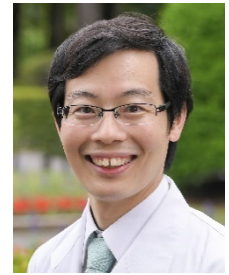
■受領No.1454

## 質量分析イメージングを用いた自己免疫性疾患の病態解明

代表研究者

河野 通仁

北海道大学病院 リウマチ・腎臓内科 助教



### Study of mechanism on autoimmune diseases using mass spectrometry imaging

Principal Researcher

Michihito Kono,

Department of Rheumatology, Endocrinology and Nephrology, Faculty of Medicine, Hokkaido University Assistant Professor

全身性エリテマトーデス(SLE)、多発性硬化症などの自己免疫性疾患ではインターロイキン-17 産生 CD4 陽性細胞(Th17)と制御性 T 細胞(Treg)のバランス異常が病態に関わっている。本研究では生体内で産生される代謝産物 X によりマウス T 細胞の Th17 の分化は抑制され、Treg の分化は促進されることを明らかにした。マルチオミクスによりそのメカニズムも明らかとなった。また質量分析イメージングにより生体内の代謝産物の分布についても明らかとなった。

Dysregulation of T helper 17 (Th17) and regulatory T (Treg) cells contributes to the pathophysiology of many autoimmune diseases. Here, we show that an endogenous metabolite X, inhibited Th17 cell differentiation and promoted Treg cell differentiation by orchestrating the metabolic and epigenetic reprogramming. Mechanistically, X suppressed glycolysis in Th17- and Treg-polarizing T cells. Imaging mass spectrometry is also used to clarify the distribution of metabolites in vivo. These results indicate that cellular metabolism could be a therapeutic target for the autoimmune diseases.

## 1. 研究内容

### 1.1 はじめに

全身性エリテマトーデス(SLE)ならびに多発性硬化症(MS)は神経を侵す代表的自己免疫性疾患である。免疫抑制療法が使用されているが感染症が問題となっており、新規治療薬が望まれる。

細胞内代謝は細胞の生存、分化、増殖に重要である。主要な細胞内代謝には解糖系、グルタミノライシス、脂肪酸代謝などがある。申請者らは T 細胞細胞内代謝に注目して研究を行い、IL-17 産生 CD4 陽性細胞(Th17)は制御性 T 細胞(Treg)と比較し解糖系、グルタミノライシスに依存していること、ピルビン酸キナーゼ、ピルビン酸脱水素

酵素フォスファターゼ、グルタミナーゼ 1 など対応する酵素が自己免疫性疾患の治療ターゲットになりうることを明らかにした(1-4)。このように細胞内代謝は様々な疾患の新規治療ターゲットとなりうることを明らかとなってきている。

近年生体内で産生されるある抗炎症性代謝産物 X が細菌、ウイルスの増殖抑制効果をもつことが明らかになった。X はマクロファージの活性化を抑制することは明らかとなっているが、T 細胞への影響は明らかになっていない。本研究では X の T 細胞分化ならびに T 細胞関連自己免疫性疾患への治療効果を明らかにすることを目的とした。

## 1.2 方法

### 1.2.1 X が T 細胞分化に与える影響の検討

まず B6 マウスの脾臓から naïve CD4 陽性 T 細胞を分離し、X の有無で Th17、Treg 分化条件化に培養を行い、Th17、CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性 T 細胞(Treg)への分化に変化があるかフローサイトメトリー法を用いて検討した。次に同様の条件で RNA シークエンシング(RNA-Seq)、メタボローム解析、ATAC シークエンスを行った。さらに細胞内代謝の変化について細胞外フラックスアナライザーを用いて検討を行った。また、上記により注目した代謝酵素について酵素活性について検討を行った。

### 1.2.2 質量分析イメージングの条件検討

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) イメージングでは質量分析計を用いてタンパク質、ペプチド、代謝物、バイオマーカー、薬物の分布を可視化でき、また網羅的解析も可能である。本研究では Solarix XR を用いて質量分析イメージングを行った。

### 1.2.3 モデルマウスへの治療実験

代表的な T 細胞関連動物モデルである、実験的自己免疫性脳脊髄炎を用いて X の腹腔内投与を行い、治療実験を行った。具体的には 8 週齢の B6 マウスに 100  $\mu$ g の myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) ペプチドと complete Freund's Adjuvant の emulsion を 200ml 背部に皮下注射した。同日ならびに 2 日後に 100  $\mu$ l の PBS に溶解した百日咳毒素 100ng/mouse を day0, 2 に腹腔内注射し、EAE を起こした。マウスは連日体重ならびに clinical score をつけた。day 14 にマウスは安楽死させ、脊髄ならびに浸潤細胞を採取した。X は週 3 回腹腔内投与を行った。

## 1.3 結果と考察

### 1.2.1 X が T 細胞分化に与える影響の検討

B6 マウスの脾臓から naïve CD4 陽性 T 細胞を分離し、X の有無で Th17、Treg 分化条件下に培養を行ったところ、X の添加により Th17 の分化は濃度依存性に抑制され、Treg の分化は促進した (図 1)。

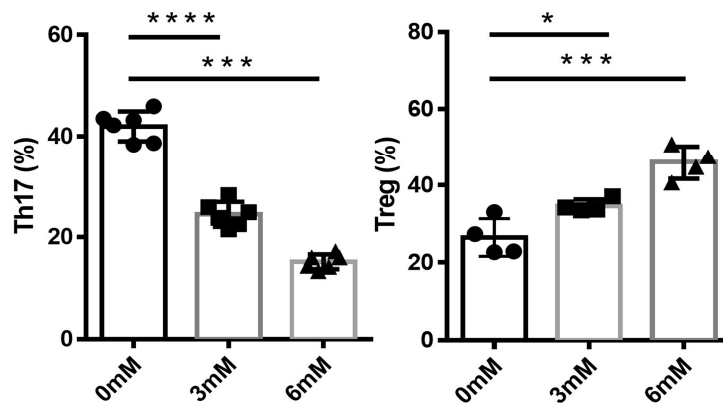


図 1 X は Th17 分化を抑制し、Treg の分化を促進する

Th17 分化条件では X の添加により 567 個の遺伝子が有意差をもって発現亢進し、502 個で発現が低下していることを見いだした。Gene ontology(GO)解析では Glycolysis/Gluconeogenesis や HIF-1 signaling pathway など代謝に関連が強いものが複数挙げられた。一方 Treg では X により

遺伝子の発現は 770 個亢進、806 個減少し、GO 解析では Amide biosynthetic process や HIF-1 signaling pathway など細胞内代謝に関連が強いものが複数挙げられた。X により Th17 と Treg 分化で共通して変動した遺伝子は 582 個あり、GO 解析では Glycolysis、HIF-1 signaling pathway など

に加え、複数の細胞内代謝経路が挙げられた。Th17、Treg で共通して変動した遺伝子のうち、発現の変動が大きい上位には Il2、Ccr6、Il17f など T 細胞の分化として既報があるものに加え、細胞内代謝に関連するこれまでに既報のない新規の遺伝子も多数認められ、T 細胞関連自己免疫性疾患の新たな治療ターゲットの候補になりうると考えられた。現在 naïve CD4 陽性 T 細胞に対し、siRNA を用いてこれらの治療ターゲット候補遺伝子のノックダウンを行い、Th17、Treg 分化への影響を検討している。

上記の結果から細胞外フラックスアナライザーを用いて Glycolytic rate assay による解糖系の測定を行ったところ、Th17、Treg いずれも Basal glycolysis ならびに compensatory glycolysis ともに X の投与により低下していた。メタボロミクスの

評価では、X の添加により解糖系の代謝産物は減少していた。そのほか Th17 分化では代謝産物 Y、Treg では代謝産物 Z が有意差をもって変動しており、それらに関連する酵素活性も X の添加により変化していた。上記の結果が X によるエピジェネティックな変化によるという仮説をたて、ATAC-Seq を行ったところ、Th17 分化においては Il17a、Treg では foxp3 のメチル化が変化していた。

### 1.2.2 質量分析イメージングの条件検討

Solarix XR を用いて質量分析イメージングを行った。脳、腎など複数の臓器で多数の細胞内代謝産物の検出に成功した(図 2)。部位により特異的な代謝産物なども認め、今後さらに治療による変化などについて検討を進めていく予定である。

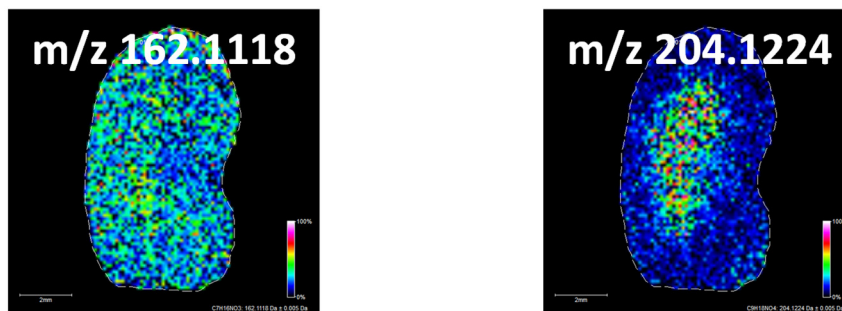


図 2 質量分析イメージングの一例(マウス腎臓)

### 1.2.3 モデルマウスへの治療実験

まず代表的な T 細胞関連動物モデルである、実験的自己免疫性脳脊髄炎を用いて X の腹腔内投与を行い、治療実験を行った。X の腹腔内投与により clinical score、体重減少は改善し、X による治療効果が認められた。

X は生体内で産生される抗炎症性代謝産物のひとつである。近年癌領域や免疫学領域において細胞内代謝の研究が飛躍的に進歩している。それにより細胞の生存、分化、機能に細胞内代謝が重要であること、さらには細胞によりどの細胞内代謝

を好んで使用するか、またその細胞内代謝の抑制が疾患の治療ターゲットとなりうるということが明らかとなってきた。例えば本研究で注目した Treg の分化については解糖系、グルタミノライシスの抑制には影響を受けにくい、脂肪酸代謝の抑制により Treg の分化は抑制される。一方、IL-17 産生 CD4 陽性 T 細胞は解糖系、グルタミノライシスに依存している。これらの細胞による違いをうまく利用することで細胞内代謝をターゲットとした新規治療薬の開発が期待される。

## 2. 発表 (研究成果の発表)

現在論文投稿中。学会での発表は特許の関係もあり、ありません。

## 3. 謝辞

最後になりましたが本研究の遂行にあたり、ご支援をいただいた公益財団法人日立財団ならびに関係者の皆様に心より感謝申し上げます。また、特許取得のため一部のデータを公表できないことに関しまして、ご理解を賜れますと幸いです。公益財団法人日立財団の益々のご発展を祈念いたします。

## 4. 引用文献

1. Kono M, Yoshida N, Maeda K, Tsokos GC. Transcriptional factor ICER promotes glutaminolysis and the generation of Th17 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2018)115:2478-2483. doi:10.1073/pnas.1714717115
2. Kono M, Yoshida N, Maeda K, Skinner NE, Pan W, Kyttaris VC, et al. Pyruvate dehydrogenase phosphatase catalytic subunit 2 limits Th17 differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2018) 115:9288-9293. doi:10.1073/pnas.1805717115
3. Kono M, Yoshida N, Maeda K, Suarez-Fueyo A, Kyttaris VC, Tsokos GC. Glutaminase 1 Inhibition Reduces Glycolysis and Ameliorates Lupus-like Disease in MRL/lpr Mice and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Arthritis Rheumatol.* (2019). doi:10.1002/art.41019
4. Kono M, Maeda K, Stocton-Gavanescu I, Pan W, Umeda M, Katsuyama E, et al. Pyruvate kinase M2 is requisite for Th1 and Th17 differentiation. *JCI Insight.* (2019)4. doi:10.1172/jci.insight.127395