

令和元年5月31日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09928

研究課題名(和文) IFNのB、T細胞代謝システム調節と分化異常への関与：SLE新規治療戦略の創出

研究課題名(英文) The regulation of metabolic system by IFN and its involvement in B cell and T cell differentiation: new therapeutic strategy for SLE

研究代表者

岩田 慈 (Iwata, Shigeru)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：60389434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：全身性エリテマトーデスは難治性の自己免疫疾患である。現在ステロイドや免疫抑制剤による治療が主体であるが、治療抵抗性、副作用の問題もあり、新たな治療戦略の探求が不可欠である。近年、免疫細胞代謝という概念が注目されている。免疫細胞の活性化や分化には、代謝変容による膨大なATP等のエネルギー産生や生体構成成分の生合成が必要となる。本研究では、ヒトB細胞、T細胞の分化における免疫細胞代謝の重要性とその疾患への関与を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年免疫代謝という概念が注目を集めている。免疫学などの基礎医学分野、特にマウスを用いた研究においてその機構は次第に明らかになりつつあるが、ヒト免疫細胞、リンパ球分化における免疫代謝の役割や機序、自己免疫疾患(特にSLE)病態への関与については依然不詳である。本研究では、基礎医学分野では注目されるが、自己免疫疾患領域では未開拓である免疫代謝の研究を、SLE病態解明に繋げることで、SLEの新規治療戦略を探求することを目的としている。また本研究は、感染症、癌治療、アレルギー疾患など他分野への応用も期待される。

研究成果の概要(英文)：Systemic lupus Erythematosus (SLE) is refractory autoimmune disease. Although corticosteroid and immunosuppressant are mainly used as the therapy, there are some problems such as treatment resistance and adverse effect. Therefore, new therapeutic strategy is further needed. Recently "immunometabolism" attract much attention. Activation and differentiation of immunocompetent cells depends on rapid synthesis of cell structure components and biomolecules, therefore, demanding enormous amounts of energy such as ATP, nucleic acids and lipids. In this study, we have clarified the importance of immunometabolism for B cell and T cell differentiation and its relevance to the pathogenesis of autoimmune diseases such as SLE.

研究分野：膠原病、リウマチ学

キーワード：SLE 免疫細胞代謝 B細胞 T細胞

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患において、B・T細胞、その相互作用は病態形成において極めて重要である。我々は、ヒト末梢血B細胞を用いた *in vitro* 実験、患者末梢血リンパ球のFACS解析により、BCR/CD40/TLR/サイトカイン (濾胞性ヘルパーT細胞 (TFH)より産生される IL-4・IL-21)刺激は、Syk、Btk、JAK 等のチロシンキナーゼを介したシグナル活性化により、分化誘導・クラススイッチに重要な gene network を多様に制御していること、さらに SLE 病態では memory 細胞が病態により深く関与すること、などを明らかにした。しかしながら、既存治療抵抗例も依然多く認められ、さらなる病態解明、新規治療の探求が必須である。近年 SLE 患者の遺伝子解析により、1型 IFN signature が特徴的に認められること、疾患活動性に相関することが明らかとなり、海外・本邦では、抗 IFN- α 抗体 (sifalimumab)、抗 IFNAR1 抗体 (anifrolumab)の治験が進行する。最近では IFN- α の SLE への関与も知られる。しかし IFNs の SLE 病態への関与は不詳である。

IFN は構造的に関連した分子ファミリーから成り、蛋白構造やシグナル伝達のための受容体から3つのタイプに分けられるが、主に1型、2型 IFN に対する研究がなされてきた。2型 IFN (IFN- γ)は、Th1 や NK 細胞から産生され、Th1 への分化を誘導する。反対に、1型 IFN の CD4T 細胞への免疫調整機構は複雑で、免疫反応を増強或は抑制し、時に逆説的である。1型 IFN は、IFN- α 産生を促進し、活性化T細胞のアポトーシスを抑制、メモリー細胞を誘導するなど、免疫反応を増強する一方で、T細胞増殖を抑制、細胞死の増加を誘導する。臨床的側面でも、C型肝炎などの慢性ウイルス感染症、多発性硬化症、癌において免疫抑制による治療効果を認める一方で、SLE で認める IFN signature のように、病的役割は一定しない。一方、1型 IFN は、B細胞に対し形質細胞を誘導することが知られるが、不詳である。

2. 研究の目的

近年癌細胞における有酸素下での解糖系亢進 (Warburg effect)が、活性化T細胞においても認められることが知られている。また CD4⁺T 細胞では、effector 細胞で解糖系が亢進、memory 細胞で低下していることも報告されている。以上より、1型 IFN、IFN- α は、T-bet により細胞内代謝システム (特に解糖系)を切り替え、effector/memory などの分化、機能を調整している可能性が示唆された。SLE 患者では、健常人に比し、CD4T 細胞における解糖系亢進が報告されており、我々のデータも総合すると、IFNs が T-bet を介し、SLE 患者リンパ球の細胞内代謝異常を齎す可能性が示唆された。実際、我々は、すでに SLE 患者での CD4T 細胞、B細胞サブセットによる T-bet 発現異常を確認していた。

上記背景をもとに、本研究では、(1) SLEにおけるIFNsと、リンパ球分化、細胞内代謝システム異常、その病態との関連性、(2) IFNsが細胞内代謝システム変化を介してリンパ球分化へ与える影響と分子生物学的メカニズムの解明、(3) さらに細胞内代謝異常がリンパ球分化偏向を齎すエピゲノム制御機構、これらをもとにした臨床応用への基盤となる研究を行う。

研究期間内には以下のことを明らかにすることを目標にした。

- (1) 健常人およびSLE患者末梢血を採取し、CD4⁺T細胞、B細胞のフェノタイプとその細胞内代謝関連因子を8color FACSで測定、この結果と、SLEの患者背景、疾患活動性、治療反応性など臨床病態との関連を検討。
- (2) 健常人およびSLE患者からCD4⁺T細胞、B細胞を抽出、試験管内でIFNsを含む刺激条件下で分化培養させ、IFNsが細胞内代謝システム変化を介してリンパ球分化へ与える影響を確認。
- (3) (2)のメカニズム解明のため、分化に重要な転写因子、主要な細胞内代謝関連因子のプロモーター/エンハンサー領域におけるヒストン修飾を評価し、エピゲノム制御機構の解明。

近年 RA や SLE に対する分子標的薬の開発は目覚ましい発展を遂げているが、特に SLE については、十分な治療薬の開発、承認に至っていない。本研究は、本邦では依然未開拓なヒトリンパ球における細胞内代謝システム研究を、エピゲノム解析を通じて、SLE 病態の解明に繋げる点で、学術的特色・獨創性を有する。SLE 患者における IFNs と細胞内代謝異常、そのメカニズムを明らかにし、患者背景、疾患活動性、治療効果との間に関連性を見出すことで、より正確な分子生物学的評価方法の確立をめざした。さらに、IFNs のヒトリンパ球への影響の詳細が明らかになれば、慢性ウイルス感染症 (C型肝炎) 多発性硬化症、癌治療など他分野への応用も期待される。

3. 研究の方法

- (1) SLE 患者における 8 color FACS による各リンパ球サブセットでの細胞内代謝システム

異常の検出、その病態（患者背景、疾患活動性、治療反応性）との関連を確認。

(2) In vitro 解析により、健康人、SLE 患者より抽出した CD4⁺T、B 細胞を、IFNs を含む各種因子で刺激し、IFNs が細胞内代謝システム変化を介してリンパ球分化へ与える影響、メカニズムの解明。

(3) IFNs がリンパ球分化異常を齎すエピゲノム制御機構を解明するため、分化に重要な転写因子の遺伝子発現領域における、ヒストン修飾をクロマチン免疫沈降アッセイで評価。

4. 研究成果

上記の方法により以下の3つの点を明らかにした。

自己免疫疾患における B 細胞代謝リプログラミングと病態への関与

我々は、健康人末梢血より B 細胞サブセット (IgD⁺CD27⁻, IgD⁺CD27⁺, IgD⁻CD27⁺) を分離し、TLR9 および IFN- γ シグナルによる分化や機能への影響、さらに細胞内代謝変容との関連を検討した。IgD⁺CD27⁺ B 細胞において、TLR9 シグナルにより大量のサイトカインや抗体の産生、plasmablast 分化が誘導された。これらの免疫応答の際、mTORC1 リン酸化 (p-mTORC1) や乳酸産生の増加、つまり解糖系亢進が確認され、IFN- γ は同細胞内機構および分化や機能を増幅した。また AMPK シグナル増強は、TLR9 シグナルにより誘導された p-mTORC1 や乳酸産生、plasmablast 分化を抑制し、一方で IgD⁻CD27⁻ B 細胞への分化に寄与した。次に、SLE 患者 B 細胞における p-mTORC1 を測定したところ、健康人に比し有意に亢進しており、plasmablast の割合や疾患活動性と有意に相関していた。以上より、IgD⁺CD27⁺ B 細胞における細胞内代謝変容は、迅速かつ強力な機能を発揮するエフェクター細胞、或いは memory への分化偏向決定に重要であり、SLE などの自己免疫疾患の病態形成において重要である可能性が示唆された。

SLE 患者の Th1 細胞における免疫細胞代謝異常と病態への関与

近年免疫細胞代謝が注目される。SLE 患者 Th1 細胞における免疫細胞代謝の役割を検討。SLE 患者 Th1 細胞分化を FACS で解析、その代謝機構を健康人末梢血 CD4⁺T 細胞を用い in vitro で検討。SLE 患者末梢血では、IFN- γ 産生能を有する CD4⁺T-bet^{hi} 細胞が増加。同細胞で免疫細胞代謝亢進に重要な mTORC1 が活性化し、治療抵抗性に関与した。一方、T-bet⁺IFN- γ ⁻FoxP3^{int} (non-Treg) 細胞が増加、T-bet⁺IFN- γ ⁻FoxP3^{hi} (Th1-Treg) 細胞が低下、Th1 細胞分化異常を認めた。次に Th1 細胞分化における免疫細胞代謝を in vitro で検討。健康人末梢血 CD4⁺CD45RA⁻ 細胞を採取。TCR 刺激 3 日後、T-bet 発現、IFN- γ 産生亢進、mTORC1 活性化、解糖系亢進が誘導された。同細胞に mTORC1 阻害剤 Rapamycin (Rapa)、解糖系阻害剤 2DG を加えたところ、2DG のみ IFN- γ 産生を抑制、IL-2 産生を誘導。両者とも Treg を誘導したが、Rapa では T-bet⁺IFN- γ ⁻FoxP3^{int} (nonTreg) 細胞を誘導、一方 2DG は T-bet⁺IFN- γ ⁻FoxP3^{hi} (Th1-Treg) 細胞を誘導、2DG でのみ FoxP3⁺T-bet⁺IFN- γ ⁻ (effector Th1) 細胞を抑制した。SLE では Th1 細胞分化異常が治療抵抗性に深く関与し、免疫細胞代謝バランスが深く関与した。免疫細胞代謝は新たな SLE の病態解明に有用であると考えられた。

SLE 患者 B 細胞における必須アミノ酸の重要性とその病態への関与

アミノ酸は様々な代謝プロセスにおいて重要な成分となる。しかしながら、ヒト B 細胞機能発現におけるアミノ酸代謝の重要性は依然不詳である。我々は、必須アミノ酸であるメチオニンが形質芽細胞分化に重要であることを見出した。また、形質芽細胞分化の最終過程において、アミノ酸輸送体である LAT1 は発現低下、一方 CD98 は発現増強し、シーソーのようなバランスで切り替わることが明らかとなった。BCR と mTORC1 の両シグナルがメチオニンに感受性があるのに対し、mTORC1 シグナルはロイシンにのみ感受性を認めた。さらにメチオニン存在下においてメチルトランスフェラーゼ EZH2 は、Syk と mTORC1 の活性化により相乗的に誘導され、BACH2 の遺伝子発現領域の H3K27me3 誘導を介して BACH2 発現を抑制し、その結果、BLIMP1、XBP1 の発現や形質芽細胞の分化をもたらした。また、SLE 患者 CD19⁺ 細胞においては EZH2 の過剰発現がみられ、疾患活動性や自己抗体産生との相関がみられた。以上の結果より、メチオニンは B 細胞内の免疫代謝調節によりシグナル伝達を活性化するとともに、EZH2 発現によるエピゲノム修飾を介して、B 細胞から形質芽細胞への分化にコミットするとともに、斯様なメカニズムを介して、SLE における B 細胞の活性化病態に深く関与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

{ 雑誌論文 } (計 10 件)

1. Ishikawa Y, Iwata S, Hanami K, Nawata A, Zhang M, Yamagata K, Hirata S, Sakata

- K, Todoroki Y, Nakano K, Nakayamada S, Satoh M, Tanaka Y. Relevance of interferon-gamma in pathogenesis of life-threatening rapidly progressive interstitial lung disease in patients with dermatomyositis. *Arthritis Res Ther*. 2018 Oct 26;20(1):240. doi: 10.1186/s13075-018-1737-2.
2. Miyata M, Kakeda S, Kudo K, **Iwata S**, Tanaka Y, Wang Y, Korogi Y. Evaluation of oxygen extraction fraction in systemic lupus erythematosus patients using quantitative susceptibility mapping. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2018 Mar 16:271678X18764829.
 3. Ide S, Kakeda S, Miyata M, **Iwata S**, Ohkubo N, Nakayamada S, Futatsuya K, Watanabe K, Moriya J, Fujino Y, Tanaka Y, Korogi Y. Intracranial vessel wall lesions in patients with systematic lupus erythematosus. *J Magn Reson Imaging*. 2018 Nov;48(5):1237-1246.
 4. **Iwata S**, Saito K, Hirata S, Ohkubo N, Nakayamada S, Nakano K, Hanami K, Kubo S, Miyagawa I, Yoshikawa M, Miyazaki Y, Yoshinari H, Tanaka Y. Efficacy and safety of anti-CD20 antibody rituximab for patients with refractory systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2018 Jan 1:961203317749047. doi: 10.1177/0961203317749047. [Epub ahead of print]
 5. Miyata M, Kakeda S, **Iwata S**, Nakayamada S, Ide S, Watanabe K, Moriya J, Tanaka Y, Korogi Y. Enlarged perivascular spaces are associated with the disease activity in systemic lupus erythematosus. *Sci Rep*. 2017 Oct 3;7(1):12566. doi: 10.1038/s41598-017-12966-4.
 6. Villarino AV, Sciumè G, Davis FP, **Iwata S**, Zitti B, Robinson GW, Hennighausen L, Kanno Y, O'Shea JJ. Subset- and tissue-defined STAT5 thresholds control homeostasis and function of innate lymphoid cells. *J Exp Med*. 2017 Oct 2;214(10):2999-3014. doi: 10.1084/jem.20150907. Epub 2017 Sep 15.
 7. Torigoe M, **Iwata S**, Nakayamada S, Sakata K, Zhang M, Hajime M, Miyazaki Y, Narisawa M, Ishii K, Shibata H, Tanaka Y. Metabolic Reprogramming Commits Differentiation of Human CD27+IgD+ B Cells to Plasmablasts or CD27-IgD- Cells. *J Immunol*. 2017 Jul 15;199(2):425-434. doi: 10.4049/jimmunol.1601908. Epub 2017 Jun 16.
 8. **Iwata S**, Mikami Y, Sun HW, Brooks SR, Jankovic D, Hirahara K, Onodera A, Shih HY, Kawabe T, Jiang K, Nakayama T, Sher A, O'Shea JJ, Davis FP, Kanno Y. The Transcription Factor T-bet Limits Amplification of Type I IFN Transcriptome and Circuitry in T Helper 1 Cells. *Immunity*. 2017 Jun 20;46(6):983-991.e4. doi: 10.1016/j.immuni.2017.05.005. Epub 2017 Jun 13.
 9. **Iwata S**, Tanaka Y. Progress in understanding the safety and efficacy of Janus kinase inhibitors for treatment of rheumatoid arthritis. *Expert Rev Clin Immunol*. 2016 Oct;12(10):1047-57. doi: 10.1080/1744666X.2016.1189826.
 10. **Iwata S**, Tanaka Y. B-cell subsets, signaling and their roles in secretion of autoantibodies. *Lupus*. 2016 Jul;25(8):850-6. doi: 10.1177/0961203316643172.

〔学会発表〕(計 12 件)

1. mTORC1 phosphorylation in CXCR3⁺ memory B cells and its relevance to the pathogenesis of rheumatoid arthritis
Shigeru Iwata, Mingzeng Zhang, Maiko Hajime, Jie Fan, Kei Sakata, Naoaki Ohkubo, Kazuhisa Nakano, Shingo Nakayamada, Yoshiya Tanaka
第 46 回 日本免疫学会, 福岡, 2018
2. IFN- γ -T-bet を介した CD4⁺T 細胞代謝変容と SLE 病態への関与
岩田 慈, 張明增, 元舞子, 阪田 圭, 山形 薫, 中山田 真吾, 田中 良哉

第 46 回 日本臨床免疫学会, 軽井沢, 2018

3. B 細胞分化における免疫細胞代謝と自己免疫病態への関与
岩田慈, 田中良哉
第 46 回 日本臨床免疫学会, 軽井沢, 2018 (ベーシックシンポジウム)
4. IFN- γ -T-bet を介した CD4 陽性 T 細胞代謝変容と SLE 病態への関与
岩田慈, 張明増, 元舞子, 阪田圭, 山形薫, 中山田真吾, 田中良哉
第 4 回 日本骨免疫学会, 名護, 2018
5. IFN- γ -T-bet mediated metabolic reprogramming in T helper 1 cells and its relevance to pathogenesis of SLE
Shigeru Iwata, Yuka Kanno, Kei Sakata, Mingzeng Zhang, Maiko Hajime, Naoaki Ohkubo, Shingo Nakayamada, John J O'Shea and Yoshiya Tanaka
第 45 回 日本免疫学会, 仙台, 2017
6. 2017 Oct 19th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress, Dubai, UAE
mTORC1 phosphorylation in CXCR3⁺ memory B cells and its relevance to pathogenesis of rheumatoid arthritis
Shigeru Iwata, Mingzeng Zhang, Maiko Hajime, Kei Sakata, Masataka Torigoe, Yusuke Miyazaki, Naoaki Ohkubo, Kazuhisa Nakano, Shingo Nakayamada, Yoshiya Tanaka
7. IFN- γ -T-bet を介した Th1 細胞代謝変容と SLE 病態への関与
岩田慈, 菅野由香, 阪田圭, 元舞子, 張明増, 中山田真吾, John J. O'Shea, 田中良哉
第 45 回 日本臨床免疫学会, 新宿, 2017
8. 2017 APR 12th International congress on SLE & 7th Asian congress on autoimmunity
Shigeru Iwata, Kei Sakata, Maiko Hajime, Masataka Torigoe, Naoaki Ohkubo, Shingo Nakayamada, Yoshiya Tanaka
Metabolic reprogramming in CD4⁺CD28⁻CXCR3^{int}T-bet^{hi} cells and its relevance to pathogenesis in patients with SLE
9. Metabolic reprogramming in CD4⁺CD28⁻CXCR3^{int}T-bet^{hi} cells and its relevance to pathogenesis of SLE
Shigeru Iwata, Masataka Torigoe, Naoaki Ohkubo, Maiko Hajime, Shingo Nakayamada and Yoshiya Tanaka
第 44 回 日本免疫学会, 沖縄, 2016
10. 2016 Nov The Annual American College of Rheumatology (ACR) Meeting, Washington, DC, USA,
Metabolic reprogramming in CD4⁺CD28⁻CXCR3^{int}T-bet^{hi} cells and its relevance to pathogenesis in patients with SLE
Shigeru Iwata, Yuka Kanno, Kei Sakata, Maiko Hajime, Masataka Torigoe, Naoaki Okubo, Shingo Nakayamada, John J O'Shea and Yoshiya Tanaka
11. IFNs の T-bet を介した T 細胞代謝プログラミングと自己免疫疾患への関与
岩田慈, 菅野由香, 阪田圭, 中山田真吾, John J. O'Shea, 田中良哉
第 44 回 日本臨床免疫学会, 新宿区, 2016. (Rising star symposium)
12. 自己免疫疾患における B 細胞代謝プログラミングと病態への関与
岩田慈, 鳥越雅隆, 阪田圭, 元舞子, 中山田真吾, 田中良哉
第 44 回 日本臨床免疫学会, 新宿区, 2016. (B 細胞専門スタディフォーラム (symposium))

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。