

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19158

研究課題名(和文) グルタミン代謝による活性化 T 細胞運命決定機構の解明

研究課題名(英文) Investigations of the role of glutamine metabolism in the T cell fate determination

研究代表者

桑原 誠 (Kawahara, Makoto)

愛媛大学・医学部附属病院・助教(病院教員)

研究者番号：00568214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：グルタミン代謝のT細胞運命決定機構における役割を、Th2細胞分化誘導および老化T細胞形質獲得の観点から解析した。グルタミン代謝産物である α -ケトグルタル酸(α -KG)はTh2細胞分化誘導およびT細胞老化形質の獲得に重要であることがわかった。そのメカニズムとして、 α -KGはヒストン脱メチル化酵素 Utx の補酵素として機能し、抑制性ヒストンであるヒストン H3K27トリメチル化の脱メチル化を促進することで、Th2 サイトカイン産生や老化 T 細胞の炎症性サイトカイン産生を制御していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We assessed the role of glutamine metabolism in the fate determination of activated T cells in this study. The deprivation of glutamine from culture medium or the pharmacological inhibition of glutamine metabolism suppressed Th2 differentiation and the induction of T cell senescent phenotype in vitro. The administration of alpha-ketoglutarate (α -KG) in cultures under glutamine-deprived conditions restored Th2 differentiation and induced T cell senescent phenotype indicating that α -KG derived from glutamine is required for Th2 differentiation and induction of T cell senescent phenotype. Furthermore, we found that α -KG-dependent demethylation of the Th2 cytokine gene loci by the H3K27 demethylase Utx is required for the efficient Th2 differentiation. Alpha-KG-dependent histone H3K27 demethylation is also involved in the induction of senescence. These findings reveal the novel role of glutamine metabolism in regulating Th2 differentiation and induction of T cell senescent phenotype.

研究分野：免疫学

キーワード：T細胞運命決定 グルタミン代謝 Th2 Utx

1. 研究開始当初の背景

T 細胞は、外来抗原排除のための正の免疫応答を促進するエフェクター T 細胞 (Teff) と、外来抗原や自己抗原に対する Teff の過剰反応を抑制する負の免疫応答を担う制御性 T 細胞 (Treg) に大別される。また、外来抗原排除後、T 細胞の一部は抗原特異的に獲得した機能を維持しメモリー T 細胞 (Tm) として生体内において保持され、再びの抗原侵入に対して迅速に免疫応答を誘導する。これらの機能分化した T 細胞 (Teff、Treg、Tm) は相互にバランスを保ちながら免疫恒常性を維持している。T 細胞分化には T 細胞抗原認識受容体とサイトカイン受容体からのシグナルで誘導される、クロマチンリモデリングを介した協調的かつ網羅的な遺伝子発現の変動 (転写リプログラミング) が必須である。転写リプログラミングにおいて消費される膨大なエネルギーは、細胞内代謝経路のリプログラミング (代謝リプログラミング) により賄われている。よって、代謝リプログラミングと転写リプログラミングの双方は T 細胞分化に重要である。しかしながら、T 細胞における転写リプログラミングの研究は進んでいるのに対し、代謝リプログラミングの分子機構を解明するための研究はあまり注目されていなかった。そこで本申請研究では、T 細胞運命決定機構におけるグルタミン代謝の役割解析のための研究計画を立案した。

2. 研究の目的

グルタミンおよびその代謝産物は ATP 産生、脂肪酸合成、コレステロール合成などに利用され、T 細胞の活性化や増殖ににおいて必須の役割を担う。しかしながら、抗原刺激を受けた T 細胞の機能変化や運命決定におけるグルタミンとその代謝産物の役割については研究が進んでいない。そこで本研究申請では、グルタミンとその代謝産物のヘルパー T 細胞分化、メモリー T 細胞分化、T 細胞老化における役割を解析し、抗原刺激後のグルタミン代謝亢進による、活性化 T 細胞内エネルギー代謝状態の統合的制御機構を解明する。最終的には、T 細胞運命決定のグルタミンによる制御機構の全体像を明らかにし、その制御方法を提唱することを目的に研究を行う

3. 研究の方法

Th2 細胞における細胞内エネルギー代謝状態を解析するために、IL-4 有り (Th2 細胞)、無し (Thn 細胞) でナイーブ CD4 T 細胞を刺激培養し、48 hr 後にメタボリックプロファイリング (HMT に受託) を行なった。また、主要抑制因子 Menin 欠損活性化 T 細胞 (老化 T 細胞モデル) のメタボリックプロファイリングも実施した。

グルタミン低濃度培地 (グルタミン濃度: 0.05 mM、血清中のグルタミンに由来) を用

いてナイーブ CD4 T 細胞の Th2 細胞分化を行なった。分化誘導 5 日目に、抗原再刺激し細胞内サイトカイン染色法および ELISA 法により Th2 細胞分化におけるグルタミンの役割を解析した。また、グルタミン代謝産物である α -ケトグルタル酸 (α -KG) の細胞膜透過型ジメチル α -KG を用いて、Th2 細胞分化における α -KG の役割を検討した。

Th2 細胞分化誘導におけるグルタミン代謝の関与を明らかにするために、これまでに報告されているグルタミン代謝阻害剤 (L-DON、BPTES、CB-839、AOA) による Th2 細胞分化抑制を検討した。さらに、グルタミンをグルタミン酸に代謝する酵素 Gls を欠失したナイーブ CD4 T 細胞の Th2 細胞分化および Th2 サイトカイン産生を検討し、Gls の関与を評価した。

Alpha-KG はヒストン H3K27 トリメチル化の脱メチル化酵素 Utx の Th2 細胞分化における役割を検討するために、T 細胞特異的 Utx 欠損マウスを作製した。Th2 細胞分化誘導の α -KG-Utx 依存性を検討した。

老化 T 細胞分化におけるグルタミン代謝の役割を解析した。老化 T 細胞の細胞内エネルギー代謝変化を解析するために、Menin 欠損活性化 T 細胞 (老化 T 細胞モデル) のメタボリックプロファイリングを行なった。ついで、グルタミン低濃度培地、ジメチル α -KG、Utx 欠損 T 細胞、Menin-Utx 二重欠損 T 細胞を用いて、老化 T 細胞形質獲得におけるグルタミン代謝の役割を解析した。

4. 研究成果

(1) IL-4 は Gln- α KG 経路を介して Th2 細胞分化を制御する

ナイーブ CD4 T 細胞内グルタミン酸濃度は完全培養培地中のグルタミンに依存して、T 細胞抗原認識受容体 (TCR) 刺激 24 時間後に最大値 (5.7 nmol/10⁶ cells) を示した。また、メタボリックプロファイリングを実施したところ、Th2 細胞分化を誘導する IL-4 によって細胞内グルタミン酸濃度が低下し、 α -KG が増加傾向にあった。また、citrate、cis-aconitate、isocitrate 濃度は変化せず、succinate、fumarate、malat 濃度が上昇していた (Succinate、fumarate、malate は α -KG に続く代謝中間体である)。さらに、 α -KG の代謝副産物である 2-hydroxyglutarate の増加も認めた。また、細胞外フラックスアナライザーを用いた解析から、IL-4 刺激により酸化的リン酸化の活性が上昇することが分かった。これらの結果は、IL-4 依存的にグルタミン代謝が促進することを示唆するものであった。

次に、Th2 細胞分化におけるグルタミン代謝の役割を解析した。培養完全培地のグルタミン濃度を限りなく低下させた培地 (完全培地のグルタミン濃度 4 mM に対してグルタミン濃度 0.05 mM の培地であり、この培地のグルタミンは血清由来である) では Th2 細胞

胞分化が著しく低下した。Th2 細胞が産生する IL-4、IL-5、IL-13 (Th2 サイトカイン) の産生減少も確認できた。さらに、グルタミン低濃度培地に α -KG を加えると、Th2 細胞分化および Th2 サイトカイン産生が増加した。これらの結果から、グルタミン- α -KG 経路が Th2 細胞分化を制御していることが示唆された。

続いて、 α -KG は DNA およびヒストン脱メチル化酵素の補酵素であることから、グルタミン- α -KG 経路による Th2 細胞分化のエピジェネティック制御について検討した。低グルタミン培地で分化誘導した Th2 細胞の Th2 サイトカイン遺伝子座ではヒストン H3K27 トリメチル化 (転写抑制マーク) レベルが高く、 α -KG によりそのレベルが低下することが分かった。よって、グルタミン- α -KG 系により Th2 サイトカイン遺伝子座の H3K27 トリメチル化が脱メチル化され、開いた状態になることが示唆された。H3K27 トリメチル化の脱メチル化酵素の一つとして Utx が知られている。そこで、Utx の関与を検討した。IL-4 依存的に Utx が Th2 サイトカイン遺伝子座に結合していることが分かった。また、Utx 欠損ナイーブ CD4 T 細胞の Th2 細胞分化は抑制され、Th2 サイトカイン遺伝子座の H3K27 トリメチル化レベルが低下していなかった。また、 α -KG 依存的な Th2 サイトカイン産生の上昇は Utx 欠損によって抑制された。これらの結果は、グルタミン- α -KG 経路が Utx の活性化を介して Th2 サイトカイン遺伝子座の H3K27 トリメチル化を脱メチル化し、Th2 細胞分化を制御していることを示唆するものであった。

(2) アミノ基転位反応による Th2 細胞分化制御

グルタミン- α -KG 経路が Th2 細胞分化を制御することが分かった。そこで、グルタミン代謝阻害剤として知られている L-DON (グルタミンアナログ)、BPTES (G1s 阻害剤)、CB-839 (G1s 阻害剤)、AOA (アミノ基転移酵素阻害剤) の Th2 細胞分化抑制効果を検討したところ、L-DON、AOA が Th2 細胞分化を抑制した。BPTES、CB-839 は Th2 細胞分化抑制効果を示さなかった。G1s はグルタミンをグルタミン酸に代謝する酵素であり、この阻害剤が Th2 細胞分化を抑制しなかったことから、G1s 欠損ナイーブ T 細胞の Th2 細胞分化を検討した。G1s 欠損ナイーブ CD4 T 細胞の Th2 細胞分化および Th2 サイトカイン産生は正常であった (桑原、未発表データ)。これらの結果から、G1s を介したグルタミン代謝は Th2 細胞分化に関与していないことが示唆された。

前述したように、グルタミンと α -KG が Th2 細胞分化に重要であることから、グルタミンの役割と α -KG 産生経路について検討を行った。基礎検討の段階であるが、グルタ

ミンは mTOR シグナルを活性化するのに重要であることが分かってきた。また、IL-4 刺激によりセリン合成経路の酵素の発現が上昇することから、この経路のアミノ基転位反応が α -KG の供給源である可能性が考えられた。今後、Th2 細胞分化誘導におけるグルタミン-mTOR シグナルの役割、セリン合成経路のアミノ基転移酵素の役割を明らかにしたいと考えている。

(3) 細胞内代謝変化調節を介した SASP 制御

私たちは Menin KO 活性化 CD8 T 細胞の老化形質獲得にグルタミン代謝が関与していることを明らかにした (現在論文投稿中)。メタボリックプロファイリングの結果から Menin KO 活性化 CD8 T 細胞ではグルタミン代謝経路が活性化していた。T 細胞老化におけるグルタミン代謝の役割を検討するために、グルタミン濃度を低下させた培地を用いたところ、Menin 欠損による T 細胞老化形質が誘導されなかった。また、 α -KG をグルタミン低濃度培地に添加すると、T 細胞老化形質が誘導された。そこで、グルタミン代謝を介したヒストン H3K27 トリメチル化の脱メチル化が T 細胞老化形質の獲得に関与しているかを検討した。グルタミン代謝が活性化している Menin KO 活性化 CD8 T 細胞ではヒストン H3K27 トリメチル化レベルが低下していた。また、Menin 欠損による OPN、IL-6、IL-10 産生亢進 (SASP) は Utx 欠損によって抑制された。これらの結果から、T 細胞老化形質の獲得 (SASP) にグルタミン- α -KG 経路によるヒストン H3K27 トリメチル化の脱メチル化が関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. M. Yamashita, M. Kuwahara. The critical role of Bach2 in regulating type-2 chronic airway inflammation. *Int Immunol*. doi: 10.1093/intimm/dxy020. (2017). (査読有)
2. R. Ebina-Shibya, M. Matsumoto, M. Kuwahara, K.J. Jang, M. Sugai, Y. Ito, R. Funayama, K. Nakayama, Y. Sato, N. Ishii, Y. Okamura, K. Kinoshita, K. Kometani, T. Kurosaki, M. Muto, M. Ichinose, M. Yamashita, K. Igarashi. Inflammatory responses induce an identity crisis of alveolar macrophages leading to pulmonary alveolar proteinosis. *J. Biol. Chem.* jbc.M117.808535. doi:10.1074/jbc.M117.808535 (2017). (査読有)

3. T. Yamada, M. Kanoh, S. Nabe, T. Yasuoka, J. Suzuki, A. Matsumoto, M. Kuwahara, S. Maruyama, T. Fujimoto, R. Sakisuka, M. Yasukawa, M. Yamashita. Menin plays a critical role in the regulation of the antigen-specific CD8+ T cell response upon Listeria infection. *J. Immunol.* 197, 4079-4089 (2016). (査読有)
4. M. Kuwahara, W. Ise, M. Ochi, J. Suzuki, K. Kometani, S. Maruyama, M. Izumoto, A. Matsumoto, N. Takemori, A. Takemori, K. Shinoda, T. Nakayama, O. Ohara, M. Yasukawa, T. Sawasaki, T. Kurosaki, M. Yamashita. Bach2-Batf interactions control Th2-type immune responses by regulating the IL-4 amplification loop. *Nat. Commun.* 7, 12596 (2016). (査読有)
5. T. Yasuoka, M. Kuwahara, T. Yamada, S. Maruyama, J. Suzuki, M. Taniguchi, M. Yasukawa, M. Yamashita. The transcriptional repressor Gfil plays a critical role in the development of NKT1- and NKT2-type iNKT cells. *PLoS One* 11, e0157395 (2016). (査読有)
6. J. Suzuki, S. Maruyama, H. Tamauchi, M. Kuwahara, M. Horiuchi, M. Mizuki, M. Ochi, T. Sawasaki, J. Zhu, M. Yasukawa, M. Yamashita. Gfil, a transcriptional repressor, inhibits the induction of the T helper type 1 program in activated CD4 T cells. *Immunology* 147, 476-487 (2016). (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

1. M. Kuwahara, M. Yamashita. The transcriptional repressor Bach2 regulates differentiation of pathogenic Th2 cells. 第 46 回日本免疫学会総会・学術集会, 仙台 (2017).
2. M. Kuwahara, T. Sawasaki, M. Yamashita. The transcriptional repressor Bach2 controls Th2-type immune response via interaction with Batf. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society, Japan (2017).
3. M. Kuwahara, M. Yamashita. Bach2-Batf interactions control Th2-type airway chronic inflammation. The 19th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience Chronic Inflammation - Initiation, Progression and Regulation-, 大阪 (2017).
4. M. Kuwahara, K. Inoue, Y. Imai, M. Yamashita. TCR-mediated activation of glutamine metabolism plays a critical role in regulating Th2 cell

differentiation. 第 65 回日本アレルギー学会学術大会, 東京 (2016).

5. 桑原 誠, 鈴木淳平, 山田武司, 山下政克. 腫瘍抑制因子 Menin による T 細胞老化制御. 第 16 回日本抗加齢医学会総会, 横浜 (2016).

[図書] (計 1 件)

1. M. Yamashita, M. Kuwahara, J. Suzuki, T. Yamada. Controlling the Mechanism Underlying Chronic Inflammation Through the Epigenetic Modulation of CD4 T Cell Senescence. *Chronic Inflammation Mechanisms and Regulation*. Chapter 32, 417-427. ISBN 978-4-431-56068-5. Springer (2016).

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 出願年月日 :
 国内外の別 :

○取得状況 (計 件)

名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 取得年月日 :
 国内外の別 :

[その他]

愛媛大学大学院医学系研究科免疫学、
<http://ehime-u-immunology.com/index.htm>
 1

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑原 誠 (KUWAHARA, Makoto)
 愛媛大学・大学院医学系研究科免疫学・助教
 研究者番号 : 00568214

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

山下 政克 (YAMASHITA, Masakatsu)