

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16136

研究課題名(和文) 解糖系酵素ピルビン酸キナーゼM2による炎症性疾患の制御

研究課題名(英文) Regulation of inflammatory diseases by pyruvate kinase M2

研究代表者

白井 剛志 (Shirai, Tsuyoshi)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：20646997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞特異的に発現するとされてきたピルビン酸キナーゼM2(PKM2)は、活性化した免疫細胞においても向炎症性を制御する。PKM2の低分子活性化剤を用いてPKM2オリゴマーの免疫細胞における機能を検討するため、PKM2低分子活性化薬による向炎症性への修飾効果を評価した。これらの実験によりPKM2オリゴマーが、M1マクロファージの活性化を制御する事、またT細胞分化にも関与し、モデルマウスではIpr細胞を制御する事、またヒト検体ではT細胞の特定のサブタイプにおける分化に関わっており、膠原病における免疫フェノタイプに関連する可能性があることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞において重要と考えられてきた酵素であるピルビン酸キナーゼM2(PKM2)が、免疫システムの活性化においても重要な役割を果たしていることが明らかになった。これにより、免疫細胞の異常活性化が原因となる膠原病を含む自己免疫疾患において、がん細胞と同様の細胞代謝を標的とする治療方法が有用である可能性が示唆されるとともに、がん細胞周囲の免疫反応においても機能している可能性が考慮される。

研究成果の概要(英文)：Pyruvate kinase M2, which is one of the enzymes involved in glycolysis, has been recognized as the enzyme expressed specifically in cancer cells. We had revealed that PKM2 was also regulating inflammatory activity in activated immune cells. In this study, we evaluated the effects of PKM2 activator to examine the functions of PKM2 in activated immune cells including macrophages and T cells. The results indicated that PKM2 regulated the activation of macrophages to M1 phenotype, and also involved in T cell differentiation. In MRL/lpr mice, PKM2 was considered to regulate lpr cells. Furthermore, PKM2 was involved in the regulation of T cell differentiation, and was possible to be associated with the altered immune responses in autoimmune diseases.

研究分野：リウマチ膠原病内科

キーワード：細胞内代謝 PKM2 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

心血管障害は、罹患率・死亡率の高い疾患であり、特に膠原病患者を含む炎症性疾患患者では、原疾患に伴い心血管障害の発生率が増加することが報告されており、主要な死因となっている。心血管障害の基本病態は動脈硬化であるが、近年、動脈硬化が単にコレステロール沈着だけに起因するものではなく、慢性炎症性疾患であることが明らかになってきた。中でも、動脈硬化の主要な病理的特徴として単球の炎症巣への遊走があげられ、単球は局所でマクロファージへと分化する。マクロファージは、サイトカイン、酵素、成長因子、活性酸素などを分泌し病変形成を促進する。更に、動脈硬化巣が FDG-PET で検出されるように、活性化マクロファージはがん細胞と同じく、Warburg 効果により糖代謝が亢進している。申請者らは、冠動脈疾患患者検体を用いてヒト単球由来マクロファージにおける糖代謝、活性酸素と炎症活動を検討し、ヒトマクロファージがピルビン酸キナーゼ M2 (PKM2) を発現し、PKM2 を介して炎症活動を制御している事を報告した。PKM2 は従来、胎生期またはがん細胞において発現する事が示されているが、正常細胞での機能は未だ詳細には分かっていない。興味深いことに、PKM2 は単に解糖系酵素として働くだけではなく、転写因子の制御もしていることが近年明らかになっている。PKM2 は細胞内では 2 量体または 4 量体のオリゴマーを形成する。4 量体はピルビン酸キナーゼの活性化型であり、解糖系酵素としてピルビン酸と ATP を生成する。一方 2 量体はピルビン酸キナーゼ活性が低いものの、核内へ移行し、解糖系に關与する転写因子を活性化、またはプロテインキナーゼとして直接転写因子をリン酸化する。特に炎症性病態においては、PKM2 の 2 量体が HIF1、STAT3 を介してサイトカイン産生を促進しており、PKM2 オリゴマーは解糖系の調節を受けている。現在、PKM2 の 4 量体形成を促進する低分子(低分子活性化剤)が主にごん細胞を対象として開発されており、申請者はこの低分子を用いてマクロファージのサイトカイン産生が抑制されることを報告した。更に PKM2 は programmed death 1 (PD-L1) の発現を制御し、T 細胞活性化の制御にも關与していることを報告している。現時点でマクロファージを効果的に抑制する治療法はなく、PKM2 低分子活性化剤は、マクロファージの關与する炎症性疾患において、正常細胞に対する影響を最小限に抑えつつ炎症を制御できる可能性が極めて高いと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、以下を目的とした。

- (1) マクロファージの向炎症性における PKM2 の機能の解明
- (2) T 細胞活性化における PKM2 の機能の解明
- (3) 膠原病患者末梢血リンパ球における PKM2 オリゴマーの解析
- (4) 動物モデルを用いた PKM2 を標的とした治療効果の検討

3. 研究の方法

(1) マクロファージ機能に対する PKM2 の作用の解析

ヒト単球由来マクロファージを、インターフェロン (IFN)/リポ多糖体(LPS)を用いて M1 マクロファージあるいは、インターロイキン(IL)-4、13 を用いて M2 マクロファージに分化させた。分化時に PKM2 阻害薬(Stattic)あるいは低分子活性化剤(ML265)を用いて PKM2 の発現を修飾し、各分化マクロファージにおけるエフェクター機能(炎症性サイトカイン、ケモカイン、活性酸素の分泌能、貪食能、アポトーシス)を定量 PCR、フローサイトメトリーを用いて解析し、PKM2 により制御されるエフェクター機能の解析を行った。マクロファージ・T 細胞の共培養を行い、抗原提示能における影響の検討を行った。

(2) T 細胞における PKM2 の作用の解析

T 細胞の活性化、分化に対する PKM2 の機能を解析するため、CD4 あるいは CD8T 細胞を、CD3/CD28 刺激にて活性化し、CD69/CD25 を含む活性化マーカー、CFSE を用いた細胞増殖能解析、Th1, Th2, Th9, Th17, Treg への分化能の各転写因子、細胞内サイトカインによる解析をフローサイトメトリーにて行った。

(3) SLE モデルマウス (MRL/lpr マウス) における PKM2 の解析

MRL/lpr マウスにプラセボあるいは PKM2 低分子活性化剤を経口投与し、疾患活動性の評価を行った(リンパ球サブセット、血清 IgG、血清クレアチニン、尿蛋白、腎組織)。

4 . 研究成果

(1) マクロファージ機能に対する PKM2 の作用の解析

IFN と LPS によりヒト単球由来マクロファージを M1 マクロファージに分化させた。M1 マクロファージは、IL-1 と IL-6 を含む前炎症性サイトカインを産生したが、PKM2 阻害薬の投与によりこれら前炎症性サイトカインの産生は低下した。また、CD62L を含む接着分子や CCR5 を含むケモカイン受容体の発現も低下させることから、M1 マクロファージへの分化を負に制御することが明らかになった。細胞内において、PKM2 は 2 量体あるいは 4 量体のオリゴマーとして存在し、PKM2 活性化剤である ML265 は 2 量体を 4 量体とする作用を有する。ML265 を用いて PKM2 の 2 量体を 4 量体とすると、M1 マクロファージの分化が抑制された。これらの結果から、PKM2 自体のみならず、そのオリゴマーの変化が向炎症性においては重要であることが明らかになった。更に、ヒト単球マクロファージをヒトナイーブ T 細胞と共培養することで、マクロファージにおける T 細胞への抗原提示能を検討した。M1 分化させたマクロファージは共培養により T 細胞の活性化を阻害したが、PKM2 活性化によりこの T 細胞活性化の阻害が抑制された。このことから、PKM2 の活性化は抗原提示細胞による T 細胞活性化を増強するものと考えられた。

一方、IL-4 と IL-13 を用いて分化させた M2 マクロファージにおいては、PKM2 阻害や PKM2 活性化のいずれも M2 マクロファージ機能に影響を与えなかった。

(2) T 細胞における PKM2 の作用の解析

T細胞を CD3/CD28 刺激により活性化し、その活性化と分化能を解析した（右図）。T細胞の活性化を活性化マーカーである CD25 と CD69 により評価すると、ML265 の投与により、特定の T 細胞分画の活性化が抑制されることが明らかになった。更に CFSE を用いて T 細胞活性化を評価すると、T 細胞

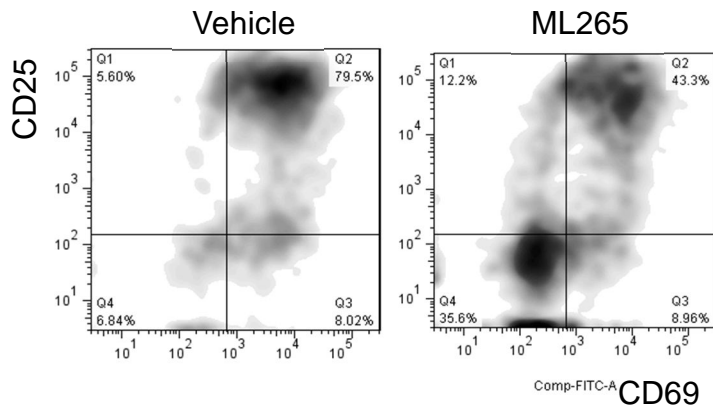


図 1 PKM2 活性化薬による T 細胞活性化抑制

分裂回数の低下が認められた。このことから、PKM2 は T 細胞受容体を介した T 細胞の活性化の調節を行っていることが考慮される。

(3) SLE モデルマウス (MRL/lpr マウス) における PKM2 の解析

上記のように、PKM2 はマクロファージや T 細胞といった免疫細胞の活性化を制御する機能を有している。動物モデルにおける PKM2 の機能を解析するため、MRL/lpr マウスにプラセボあるいは PKM2 低分子活性化剤を経口投与し、その生体内での機能解析をおこなった。結果として

PKM2 活性化薬の投与により、抗 dsDNA 抗体、血清 IgG、血清クレアチニン、尿蛋白、腎組織といった SLE 疾患活動性の有意な変化は認めなかった。一方で、リンパ球サブセットにおいては変化を認めた。MRL/lpr マウスでは lpr T 細胞と呼ばれる病原性 T 細胞の出現が知られているが、ML265 投与により、Thy1-2 と B220 を共発現する細胞の増加を認めた。この結果からは、PKM2 活性化により、in vivo においてもリンパ球の分化に影響があることが示唆される。PKM2 活性化剤の投与期間や投与量、投与時期の最適化を行い、in vivo における PKM2 活性化の効果を検討する事が求められる。

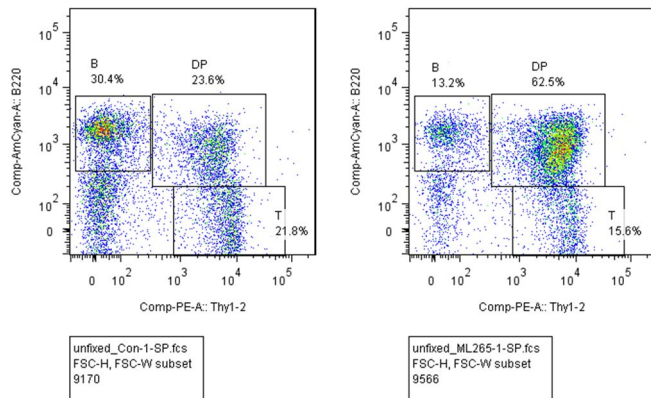


図 2 PKM2 活性化による MRL/lpr マウス T 細胞の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Shirai Tsuyoshi, Kakuta Yoichi, Fujii Hiroshi	4. 巻 NA
2. 論文標題 Distinct autoantibodies against endothelial protein C receptor in ulcerative colitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 Mar
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2021.03.037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shirai T, Sato H, Fujii H, Ishii T, Harigae H	4. 巻 NA
2. 論文標題 The feasible maintenance dose of corticosteroid in Takayasu arteritis in the era of biologic therapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scandinavian Journal of Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/03009742.2021.1881155	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mutoh Tomoyuki, Shirai Tsuyoshi, Ishii Tomonori, Shiota Yuko, Fujishima Fumiyoshi, Takahashi Fumiaki, Kakuta Yoichi, Kanazawa Yoshitake, Masamune Atsushi, Saiki Yoshikatsu, Harigae Hideo, Fujii Hiroshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification of two major autoantigens negatively regulating endothelial activation in Takayasu arteritis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1253
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-15088-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shirai Tsuyoshi, Murakami Koji, Fujii Hiroshi, Ishii Tomonori, Harigae Hideo	4. 巻 5
2. 論文標題 Comment on: Aortarctia: a rare manifestation of relapsing polychondrits	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rheumatology/keaa019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shirai Tsuyoshi、Mori Yu、Izumiya Takuya、Fujii Hiroshi、Ishii Tomonori、Harigae Hideo	4. 巻 NA
2. 論文標題 Rheumatoid Arthritis After Cord Blood Cell Transplantation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JCR: Journal of Clinical Rheumatology	6. 最初と最後の頁 Jun
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/RHU.0000000000001430	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ichikawa Satoshi、Fukuhara Noriko、Shirai Tsuyoshi、Ishii Tomonori、Ichinohasama Ryo、Harigae Hideo	4. 巻 112
2. 論文標題 Extranasal extranodal NK/T-cell lymphoma associated with systemic lupus erythematosus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 592 ~ 596
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-020-02914-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mutoh Tomoyuki、Shirai Tsuyoshi、Fujii Hiroshi、Ishii Tomonori、Harigae Hideo	4. 巻 47
2. 論文標題 Insufficient Use of Corticosteroids without Immunosuppressants Results in Higher Relapse Rates in Takayasu Arteritis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Rheumatology	6. 最初と最後の頁 255 ~ 263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3899/jrheum.181219	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shirai T、Shirota Y、Fujii H、Ishii T、Harigae H	4. 巻 48
2. 論文標題 Four distinct clinical phenotypes of vasculitis affecting medium-sized arteries	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scandinavian Journal of Rheumatology	6. 最初と最後の頁 308 ~ 314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/03009742.2018.1551965	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shirai Tsuyoshi, Komatsu Hiroka, Sato Hiroko, Fujii Hiroshi, Ishii Tomonori, Harigae Hideo	4. 巻 3
2. 論文標題 Migratory Aortitis Associated with Granulocyte-colony-stimulating Factor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 4331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.4331-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishii Yusho, Fujii Hiroshi, Sugimura Koichiro, Shirai Tsuyoshi, Hoshi Yosuke, Fujita Yoko, Shirota Yoko, Ishii Tomonori, Shimokawa Hiroaki, Harigae Hideo	4. 巻 2020
2. 論文標題 Successful Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension in Systemic Sclerosis with Anticentriole Antibody	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Case Reports in Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2020/1926908	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mutoh Tomoyuki, Ishii Tomonori, Shirai Tsuyoshi, Akita Kanae, Kamogawa Yukiko, Fujita Yoko, Sato Hiroko, Shirota Yoko, Fujii Hiroshi, Harigae Hideo	4. 巻 39
2. 論文標題 Refractory Takayasu arteritis successfully treated with rituximab: case-based review	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Rheumatology International	6. 最初と最後の頁 1989~1994
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00296-019-04390-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shirai T, Shirota Y, Fujii H, Ishii T, Harigae H	4. 巻 -
2. 論文標題 Four distinct clinical phenotypes of vasculitis affecting medium-sized arteries	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scandinavian Journal of Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/03009742.2018.1551965	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shirai Tsuyoshi, Hanaoka Riiza, Goto Yusuke, Kojima Ikuho, Ishii Yusho, Hoshi Yousuke, Fujita Yoko, Shirota Yuko, Fujii Hiroshi, Ishii Tomonori, Harigae Hideo	4. 巻 57
2. 論文標題 Takayasu Arteritis Coexisting with Sclerosing Osteomyelitis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 1929 ~ 1934
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.0329-17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishii Tomonori, Tanaka Yoshiya, Kawakami Atsushi, Saito Kazuyoshi, Ichinose Kunihiro, Fujii Hiroshi, Shirota Yuko, Shirai Tsuyoshi, Fujita Yoko, Watanabe Ryu, Chiu Shih-Wei, Yamaguchi Takuhiro, Harigae Hideo	4. 巻 28
2. 論文標題 Multicenter double-blind randomized controlled trial to evaluate the effectiveness and safety of bortezomib as a treatment for refractory systemic lupus erythematosus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 986 ~ 992
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2018.1432331	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishii Yusho, Shirai Tsuyoshi, Hoshi Yousuke, Fujita Yoko, Shirota Yuko, Fujii Hiroshi, Ishii Tomonori, Harigae Hideo	4. 巻 2018
2. 論文標題 Nasal Septal Perforation in Propylthiouracil-Induced Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Case Reports in Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2018/8192021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Tsuyoshi Shirai, Tomoyuki Mutoh, Tomonori Ishii, Hiroshi Fujii, Hideo Harigae
2. 発表標題 Endothelial protein C receptor and scavenger receptor class B type 1 negatively regulate endothelial activation
3. 学会等名 EULAR2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tsuyoshi Shirai, Tomoyuki Mutoh, Tomonori Ishii, Hiroshi Fujii, Hideo Harigae
2. 発表標題 Identification of endothelial protein C receptor and scavenger receptor class B type 1 as major autoantigens in Takayasu arteritis
3. 学会等名 EULAR2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoyuki Mutoh, Tsuyoshi Shirai, Tomonori Ishii, Yuko Shirota, Hideo Harigae, Hiroshi Fujii
2. 発表標題 Endothelial Protein C Receptor and Scavenger Receptor Class B Type 1 Negatively Regulate Vascular Inflammation and Are Major Autoantigens in Takayasu Arteritis
3. 学会等名 American College of Rheumatology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白井剛志, 武藤智之, 藤田洋子, 藤井博司, 石井智徳, 平林泰彦, 張替秀郎
2. 発表標題 生物学的製剤を使用した大型血管炎患者の検討
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会 ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsuyoshi Shirai, Tomoyuki Muto, Yuko Shirota, Hiroshi Fujii, Tomonori Ishii, Hideo Harigae
2. 発表標題 High Prevalence of Vascular Surgery and Autoimmune Comorbidity in Takayasu Arteritis
3. 学会等名 American College of Rheumatology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomoyuki Muto, Tsuyoshi Shirai, Hiroshi Fujii, Tomonori Ishii, Hideo Harigae
2. 発表標題 Insufficient Use of Corticosteroids Results in Higher Relapse in Takayasu Arteritis
3. 学会等名 American College of Rheumatology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuko Shirota, Tomonori Ishii, Tsuyoshi Shirai, Hiroshi Fujii, Hideo Harigae
2. 発表標題 Autoantibodies and Clinical Outcomes in Pulmonary Arterial Hypertension Associated with Connective Tissue Diseases
3. 学会等名 American College of Rheumatology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomonori Ishii, Yasushi Kawaguchi, Osamu Ishikawa, Hiromitsu Takemori, Naruhiko Takasawa, Hitoshi Kobayashi, Yuichi Takahashi, Hidekata Yasuoka, Takao Koderu, Osamu Takai, Izaya Nakaya, Tomomasa Izumiyama, Hiroshi Fujii, Yukiko Kamogawa, Yuko Shirota, Tsuyoshi Shirai et al.
2. 発表標題 Optimized Protocol for Extracorporeal Shock Wave Therapy on Digital Ulcers in Systemic Sclerosis
3. 学会等名 American College of Rheumatology (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計2件

産業財産権の名称 炎症性腸疾患の診断方法、診断プローブ及び診断キット	発明者 白井剛志、藤井博 司、石井智徳、張替 秀郎ら	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、156558	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 高安動脈炎の診断方法、診断マーカー及び診断キット	発明者 白井剛志、藤井博 司、石井智徳、張替 秀郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、110000796	取得年 2018年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------