

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08900

研究課題名（和文）ヒトB細胞分化におけるアミノ酸を介した免疫代謝機構の解明～SLE新規治療の創出～

研究課題名（英文）Mechanism of human B cell differentiation via amino-acid metabolism -Development of novel therapy for systemic lupus erythematosus-

研究代表者

岩田 慈 (Iwata, Shigeru)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：60389434

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：RAやSLEにおけるリンパ球の分化機構について、免疫細胞代謝の観点から検討した。SLE患者CD4陽性細胞においては、IFN- γ 過剰産生するeffector Th1細胞が存在し、代謝制御因子mTORの活性化、好気性解糖、脂質合成亢進等の代謝異常が存在し、治療抵抗性など病態に深く関与することを明らかにした。一方B細胞においては、メチオニンなどの必須アミノ酸が代謝因子mTOR活性化、形質芽細胞分化誘導を介してSLE病態に関与することを報告した。またSLE患者B細胞ではミトコンドリア膜電位異常が存在し、グルタミンオリシスがミトコンドリア機能亢進を介して形質芽細胞分化に重要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、SLE患者のリンパ球分化誘導機構を、本邦では依然未開拓な細胞内代謝システムの観点から一部解明することできた。これらの研究結果により、従来SLE患者で示されてきた古典的経路（B細胞受容体、共刺激分子：CD40など、Toll様受容体、サイトカインなどによるシグナル伝達経路）によるリンパ球活性化機序に加え、新たに免疫代謝機構の関与が明らかとなり、さらに疾患活動性や自己抗体産生、治療抵抗性など病態に深く関与することも示された。今後、より正確な分子生物学的評価方法の確立、新規治療へ繋げていくとともに、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。

研究成果の概要（英文）：The mechanism of lymphocytes differentiation in rheumatoid arthritis (RA) and systemic lupus erythematosus (SLE) were assessed in a view of immunometabolism. We found that effector Th1 cells overproducing IFN- γ were involved in refractory to conventional therapy in SLE. These cells showed metabolic abnormalities such as mTOR activation, enhancement of aerobic glycolysis and lipid metabolism. We also found that essential amino-acid methionine was involved in the pathogenesis of SLE via mTOR activation and plasmablast differentiation in B cells. In addition, we found that there were abnormality of mitochondrial membrane potential, and enhancement of mitochondrial function via glutaminolysis was important for plasmablast differentiation in B cells from SLE.

研究分野：リウマチ・膠原病

キーワード：SLE B細胞 自己免疫疾患 免疫代謝

1. 研究開始当初の背景

(1) 関節リウマチ (RA)においては、この20年間に生物学的製剤、JAK 阻害剤などの新規低分子化合物の登場によりパラダイムシフトが齎され、多くの患者の予後が劇的に改善した。一方、全身性エリテマトーデス (SLE)については、海外では既に使用されていたヒドロキシクロロキン、核酸合成阻害剤ミコフェノール酸モフェチル、B 細胞の生存・活性化・分化に関わる BAFF を標的とした抗体ベリムマブなどが近年本邦において次々に承認された。しかしながらその効果は限定的で、依然ステロイド、免疫抑制剤が治療の主体である。

(2) SLE において B 細胞は病態形成に重要な役割を担う。我々は、これまでに特にヒト B 細胞のシグナル伝達機構とその分子標的治療薬の可能性を探求してきた。実際、SLE 病態に重要な 1 型 IFN シグナルを阻害する抗 IFN- α 受容体抗体、Btk 阻害剤、JAK 阻害剤などは現在グローバル臨床試験が進行し、その有効性が期待されている。一方でその効果はやはり限定的であり、また感染防御に重要なシグナルの阻害は感染症のリスクも懸念され、斬新でまったく異なる作用機序の薬剤の探求が必要と考えられる。

2. 研究の目的

(1) 近年”免疫代謝”という概念が注目されている。免疫担当細胞の分化には、代謝変容による膨大な ATP など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ことが知られる。細胞内代謝経路には主に、解糖系、ペントースリン酸回路、酸化的リン酸化、脂肪酸酸化、脂肪酸合成、アミノ酸代謝(グルタミンリシス)の6つの経路が存在するが、これらの動態が様々に変化することで細胞の活性化や分化偏向に密接に関与することが明らかとなりつつある。免疫代謝の分野は近年基礎医学分野では大変な脚光を浴び、多くの報告がなされ、その詳細かつ特徴的な代謝の機序が明らかになりつつある。しかしながら、ヒトの免疫細胞における代謝変容、特に自己免疫疾患病態との関連については全く不詳であり、病態のさらなる解明、分子生物学的評価法の確立、新規治療標的の探求といった観点から大変有用であると考えた。

(2) 免疫学の分野においても、マウスリンパ球活性化に際し、グルタミンやアミノ酸の取り込みにより細胞内代謝が亢進することが報告されているが、ヒト活性化リンパ球におけるアミノ酸(グルタミン)の役割、輸送体発現の有無、RA や SLE 患者におけるその発現についてはまったく不詳である。そこで、細胞内代謝変容の B 細胞分化を介した自己免疫病態への関与について明らかにすべく、今回の研究計画を立案した。

3. 研究の方法

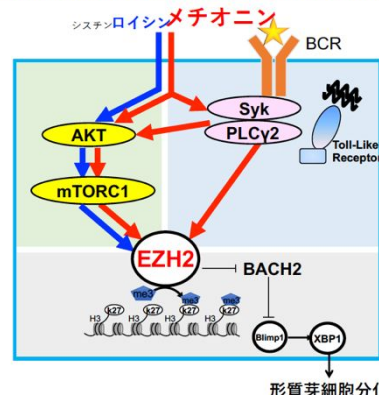
(1) 健康人および SLE 患者末梢血を採取し (1) IFN- γ 、IFN- α 、IFN- β の血清中濃度の測定し、また B 細胞のフェノタイプとその細胞内代謝因子 (p-mTOR (p-S6)、p-AMPK、c-myc、HIF-1 α) を 8color FACS で測定、この結果と、SLE の患者背景、疾患活動性、治療反応性など臨床病態との関連を検討する。

(2) 健康人および SLE 患者から B 細胞を抽出して、試験管内で IFNs を含む刺激条件で分化培養させ、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明らかにする。そのメカニズム解明のため、分化に重要な転写因子、主要な細胞内代謝因子の遺伝子発現領域 (promotor/enhancer) における STATs の結合、ヒストン修飾を評価し、エピゲノム制御機構を解明する。

4. 研究成果

(1) B細胞やB細胞より産生される抗体は、液性免疫や獲得免疫の一部の防御機構として中心的な要素となる。また、B細胞はSLEなどの自己免疫疾患においても中心的な役割を担う。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、アミノ酸のB細胞機能発現における重要性やSLE病態への関与については依然不詳である。今回、ヒトB細胞において、必須アミノ酸であるメチオニン、次点でロイシンが形質芽細胞分化に重要であることを見出した。またアミノ酸輸送体であるCD98やLAT1は形質芽細胞分化過程においてシ

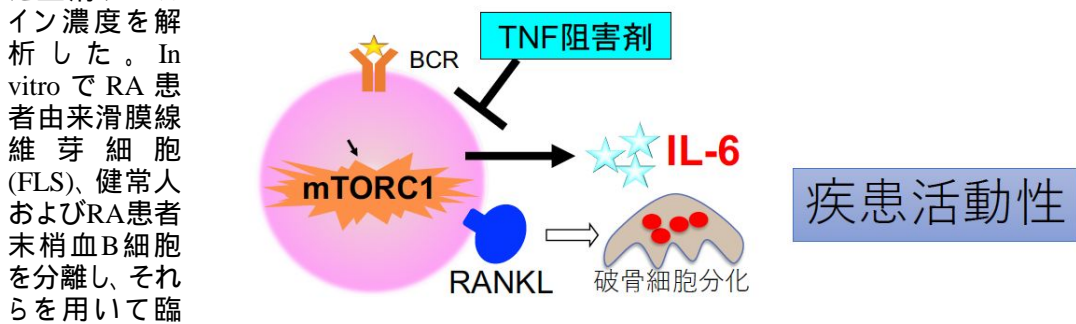
B細胞におけるメチオニンを介したEZH2発現誘導は形質芽細胞分化を誘導しSLE病態に深く関与する



ーソーのようなバランスで切り替わること、つまりCD98が誘導される一方でLAT1の発現が低下することが明らかとなった。BCRとmTORC1の両シグナルは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。メチオニン存在下において、BCRとmTORC1の活性化は相乗的にEZH2を誘導し、BACH2の遺伝子発現領域に結合してH3K27me3を誘導することでBACH2発現を抑制、結果としてBLIMP1、XBP1の発現、形質芽細胞分化を誘導した。SLE患者B細胞におけるアミノ酸関連分子の発現や臨床的背景への関連を検討したところ、SLE患者CD19+細胞においてはCD98とEZH2が過剰に発現し、有意に相関した。特にB細胞におけるEZH2発現レベルは疾患活動性や自己抗体と相関した。以上の結果より、メチオニンはメチルトランスフェラーゼであるEZH2発現を介して形質芽細胞分化において重要な役割を担うとともに、SLE病態に深く関与する可能性が示唆された。

(2) RA患者B細胞における代謝調節因子mTOR活性化の有無やその病態への関与を検討した。健常人31名、RA 86名の末梢血単核球を分離、B細胞におけるmTORのリン酸化、ケモカイン受容体の発現、また血清ケモカイン濃度を解析した。

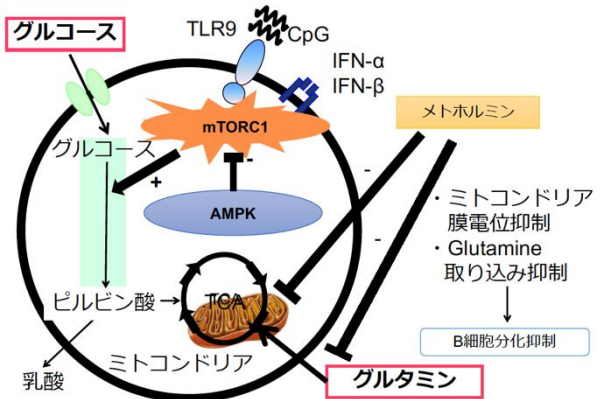
mTOR活性化はB細胞はRANKL発現やIL-6産生を介してRA病態に関与する



In vitro で RA 患者由来滑膜線維芽細胞 (FLS)、健常人およびRA患者末梢血B細胞を分離し、それらを用いて臨床検体で得られた結果の機序を検討した。RA患者末梢血では健常人に比しCXCL10 (CXCR3リガンド)濃度が高く、B細胞中のCXCR3+ memory B細胞の割合が低下していた。CXCL10濃度が高いRA症例では、CXCR3+ memory B細胞の割合が減少し、疾患活動性が高かった。TNF阻害剤加療1年後に、血清CXCL10濃度低下とともに、治療前に減少していたCXCR3+ memory B細胞の割合が増加した。In vitro でRA患者FLSにおけるTNF- α 依存性CXCL10産生はTNF阻害剤で抑制された。RA患者では健常人に比しB細胞のmTORリン酸化が亢進し、特にCXCR3+ memory B細胞で選択的に亢進していた。CXCR3+ memory B細胞におけるmTORリン酸化は疾患活動性と正相関した。In vitro でB細胞のmTORリン酸化はIL-6産生、RANKL発現に関与した。すなわち、RA患者CXCR3+ memory B細胞におけるmTOR 活性化はIL-6産生やRANKL発現を介して疾患活動性に深く関与した。TNF阻害剤はFLSによるCXCL10産生抑制を介しCXCR3+memory B細胞の局所浸潤を制御し、疾患活動性改善に寄与した可能性が示唆された。

(3) SLEの病態においてB細胞は重要な役割を担う。近年免疫細胞代謝が注目されるが、B細胞分化における代謝変容の役割やSLE病態への関与は不詳である。令和2年度はSLE患者と健常人の末梢血B細胞サブセット、代謝関連マーカーの発現を比較検討した。その結果、SLE患者では健常人と比較し、B細胞においてミトコンドリアの過分極を示すDiO_c6の高発現が確認された。令和3年度は、in vitro において健常人末梢血CD19+細胞を分離し、CpG、IFN- α で刺激し、B細胞における代謝変容とその機能に及ぼす影響を検討した。健常人CD19+細胞をCpG、IFN- α で刺激すると、B細胞分化に重要な転写因子PRDM1、XBP1、IRF4発現が誘導され、同時に酸素消費率(OCR)、DiO_c6発現、ROS産生、ATP産生などミトコンドリア機能が亢進し、形質芽細胞分化、IgM、IgG産生が誘導された。グルコース欠損下で変化がみられないが、グルタミン欠損下において、転写因子発現、ミトコンドリア機能がともに抑制され、その結果、形質芽細胞分化、IgM、IgG産生が完全に抑制された。メホルミンの添加により、グルタミン取り込み、ミトコンドリア機

B細胞分化におけるグルタミノリシスの重要性



様式 C-19, F-19-1, 2-19 (共通)

能が選択的に抑制され、その結果、形質芽細胞分化、IgM、IgG産生が完全に抑制された。以上の結果から、ヒトB細胞においてグルタミリシスを介したミトコンドリア機能亢進は、形質芽細胞分化、抗体産生に重要であり、メトホルミンは糖代謝改善効果とともに、グルタミリシスを介するミトコンドリア機能亢進を選択的に制御することでB細胞分化を抑制し、SLE病態改善に有用な可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Iwata Shigeru, Zhang Mingzeng, Hao He, Trimova Gulzhan, Hajime Maiko, Miyazaki Yusuke, Ohkubo Naoaki, Satoh Kanda Yurie, Todoroki Yasuyuki, Miyata Hiroko, Ueno Masanobu, Nagayasu Atsushi, Nakayamada Shingo, Sakata Kei, Tanaka Yoshiya	4. 巻 11
2. 論文標題 Enhanced Fatty Acid Synthesis Leads to Subset Imbalance and IFN- Overproduction in T Helper 1 Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 593103
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2020.593103	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 Iwata S, Zhang M, Hajime M, Ohkubo N, Sonomoto K, Torimoto K, Kitanaga Y, Trimova G, Todoroki Y, Miyata H, Ueno M, Nagayasu A, Kanda R, Nakano K, Nakayamada S, Sakata K, Tanaka Y.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Pathological role of activated mTOR in CXCR3+ memory B cells of rheumatoid arthritis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Rheumatology (Oxford).	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/rheumatology/keab229.	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 岩田 慈, 田中 良哉	4. 巻 in press
2. 論文標題 自己免疫疾患におけるB細胞の役割と新規治療戦略	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 岩田 慈, 田中 良哉	4. 巻 41(2)
2. 論文標題 ヒトB細胞分化におけるアミノ酸を介した免疫代謝機構の解明～SLE新規治療の創出～	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床.	6. 最初と最後の頁 50-54
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Zhang M, Iwata S, Hajime M, Ohkubo N, Todoroki Y, Miyata H, Ueno M, Hao H, Zhang T, Fan J, Nakayamada S, Yamagata K, Tanaka Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Methionine commits cells to differentiate into plasmablasts through epigenetic regulation of BTB and CNC homolog 2 by the methyltransferase enhancer of zeste homolog 2.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Arthritis Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/art.41208.	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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 岩田 慈、田中良哉
2. 発表標題 全身性エリテマトーデス (SLE)におけるリンパ球免疫代謝異常と病態への関与
3. 学会等名 第48回日本臨床免疫学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shigeru Iwata, Mingzeng Zhang, Maiko Hajime, Naoaki Ohkubo, Yukihiro Kitanaga, Gulzhan Torimova, Kazuhisa Nakano, Shingo Nakayamada, Kaoru Yamagata, Kei Sakata and Yoshiya Tanaka
2. 発表標題 The relevance of mTORC1-phosphorylated CXCR3+ memory B cells to the pathogenesis of rheumatoid arthritis
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shigeru Iwata, Mingzeng Zhang, Maiko Hajime, Naoaki Ohkubo, Yasuyuki Todoroki, Hiroko Miyata, Kazuhisa Nakano, Shingo Nakayamada, Kaoru Yamagata, Kei Sakata and Yoshiya Tanaka
2. 発表標題 Role of amino acid cystine in cytotoxic effects of CD8+ cells and the relevance to pathological processes of rheumatoid arthritis
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mingzeng Zhang, Shigeru Iwata, Maiko Hajime, Naoaki Ohkubo, Yasuyuki Todoroki, Hiroko Miyata, Jie Fan, Shingo Nakayamada, Kaoru Yamagata and Yoshiya Tanaka
2. 発表標題 Methionine commits immunometabolism and epigenetic regulation of BACH2 loci in B cells, resulting in biases toward plasmablast differentiation in the pathogenesis of SLE
3. 学会等名 American college of rheumatology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 張明增、岩田慈、元舞子、大久保直紀、轟泰幸、宮田 寛子、中山田真吾、山形薫、田中良哉
2. 発表標題 必須アミノ酸メチオニンによるEZH2発現を介した形質芽細胞分化誘導とSLE病態への関与
3. 学会等名 日本臨床免疫学会 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mingzeng Zhang, Shigeru Iwata, Maiko Hajime, Naoaki Ohkubo, Yasuyuki Todoroki, Hiroko Miyata, Jie Fan, Shingo Nakayamada, Kaoru Yamagata and Yoshiya Tanaka
2. 発表標題 Role of methionine and its transporter CD98 in human B cell differentiation and the relevance to pathological processes of SLE
3. 学会等名 EAGOR 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 張明增、岩田慈、元舞子、大久保直紀、轟泰幸、宮田 寛子、中山田真吾、山形薫、田中良哉
2. 発表標題 Role of methionine in human B cell differentiation and the relevance to pathological processes of SLE
3. 学会等名 日本免疫毒性学会 2019
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究 分担 者	田中 良哉 (Tanaka Yoshiya) (30248562)	産業医科大学・医学部・教授 (37116)	

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
---------	---------