

令和 4 年 8 月 29 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17524

研究課題名（和文）B細胞ミトコンドリアグルタミン代謝制御による1型糖尿病治療への応用

研究課題名（英文）An enhanced mitochondrial function via glutaminolysis in human B cell differentiation: a potential therapeutic target for type 1 diabetes mellitus

研究代表者

元 舞子（Hajime, Maiko）

産業医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：50596682

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）：本研究では、活性化したB細胞におけるグルタミン代謝機序を明らかにし、グルタミン代謝制御による自己免疫疾患の治療への応用を目的とした。グルタミンは、B細胞分化、抗体産生、ミトコンドリア機能において重要であり、メトホルミンはグルタミンの取り込みを抑制することにより形質細胞の分化誘導を濃度依存性に抑制した。さらに、自己免疫疾患であるSLE患者の末梢血ではミトコンドリア機能異常をきたしていることがわかり、グルタミン代謝を介してそれらを是正することが治療となりうることを示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、活性化したB細胞におけるグルタミン代謝機序を明らかにし、グルタミン代謝制御による自己免疫疾患の治療への応用を目的とした。B細胞分化、抗体産生、ミトコンドリア機能においてグルタミンが重要であることが明らかとなり、メトホルミンはグルタミンの取り込みを抑制することにより形質細胞の分化誘導、ミトコンドリアの異常活性化を抑制した。既存の治療薬では難治する症例に対して、代謝を制御することで新たな治療戦略となることが示唆された。

研究成果の概要（英文）： The aim of this study was to clarify the mechanism of glutamine metabolism in activated B cells and to apply the treatment of autoimmune diseases through the regulation of glutamine metabolism. Glutamine is important in B cell differentiation, antibody production, and mitochondrial function, and metformin inhibited the induction of plasma cell differentiation in a concentration-dependent manner by suppressing the incorporation of glutamine. Furthermore, mitochondrial dysfunction was found in the peripheral blood of patients with SLE, an autoimmune disease. Taken together, regulating the mitochondrial function through glutamine metabolism may be therapeutic.

研究分野：免疫

キーワード：B細胞 ミトコンドリア グルタミン代謝

## 1. 研究開始当初の背景

B 細胞は、サイトカイン産生、自己抗体産生、クラススイッチ、他の免疫細胞との相互作用などにより、全身性エリテマトーデス(SLE)、1型糖尿病などの自己免疫疾患の発症や病態形成において極めて重要な役割を果たしている。Genome-Wide Association Studies (GWAS)により、多くの risk alleles が B 細胞の活性化に関与し、細胞間の相互作用に関連して、自己免疫疾患の発症や臓器障害に関与していることが明らかとなっている (1-5)。B 細胞は、主に B 細胞受容体(BCR)の架橋を介して活性化・分化し、その後 CD40/CD40L などの共刺激分子、Toll 様受容体 (TLR)、IFN や IL-21 などの様々なサイトカインの刺激により、様々な下流シグナル伝達経路が活性化される (6-9)。

近年、免疫細胞の活性化や分化における免疫代謝の重要性が注目されている (10)。この過程では、アデノシン三リン酸 (ATP) のような大量のエネルギー産生とともに、アミノ酸、脂質、核酸などの生体構成成分の迅速な合成が必要となる (11,12)。SLE におけるリンパ球細胞代謝異常については、CD4<sup>+</sup> T 細胞において、膜電位の過分極、活性酸素中間体の増加、ATP 欠損などによって特徴付けられるミトコンドリア異常が報告されたことを皮切りに (13)、主にヘルパーT 細胞の分化、機能発現において詳細な報告がなされている (14)。SLE における B 細胞の代謝異常について、SLE 患者 B 細胞においては mTOR が活性化しており、形質芽細胞分化や疾患活動性に関与すること (15)、SLE 患者 B 細胞では必須アミノ酸であるメチオニンがヒストン修飾因子 EZH2 発現亢進を介して形質芽細胞分化、さらには疾患活動性や自己抗体産生に関与することなどはすでにわかっているが (16)、SLE 患者 B 細胞における代謝異常やその病態への関与については全く不詳である。

## 2. 研究の目的

本研究では、SLE 患者における B 細胞代謝異常とその分化や機能発現に与える影響、代謝制御薬の自己免疫疾患への治療応用の可能性を探ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

健康人の末梢血(PBMCs)から B 細胞を分離し、通常培養液、グルコース非含有培養液、グルタミン非含有培養液それぞれにおいてインターフェロン と TLR9 で 3-5 日間刺激し抗体産生 (IgG、IgM) を評価した。細胞回収後、フローサイトメトリーで解析を行った。グルタミン取り込みについては <sup>14</sup>C-L-glutamine を用いて評価した。oxygen consumption rate (OCR)、extracellular acidification rate (ECAR)は XF96 を用いて測定し、細胞形態は電子顕微鏡を用いた。それぞれのグループ間の統計解析は the paired t test を用いた。p value <0.05 で統計学的に有意とした。すべてのデータは平均値 ± SD で示し、統計は the Prism software (Prism Software, Irvine, CA) を用いた。

## 4. 研究成果

**(1) SLE 患者の B 細胞におけるミトコンドリア異常は形質芽細胞分化、疾患活動性に関与する**

SLE 患者 B 細胞における細胞内代謝異常の有無と病態への関与について、SLE 患者(n=41)、また年齢、性別がマッチした健常人 (n=29)を比較対象として検討を行なった。SLE 患者の B 細胞では、健常人に比較しミトコンドリア膜の過分極を示す DiOc6 発現量が、健常人に比較して有意に高かった (Fig.1A)。

次に SLE 患者 B 細胞における DiOc6 発現量と臨床背景との関連性を検討した。SLE 患者において、B 細胞における DiOc6 発現量は、CD19<sup>+</sup>細胞中の形質芽細胞の割合や疾患活動性を示す SLEDAI に有意な正相関を示した (Fig.1B)。すなわち、SLE 患者の B 細胞ではミトコンドリア異常が示唆されるとともに、形質芽細胞分化や疾患活動性との関連性が示された。

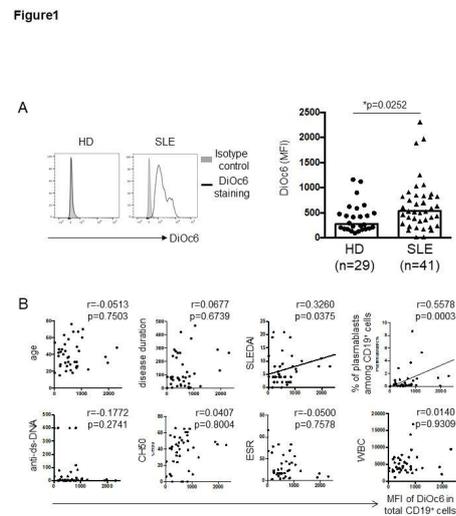


Figure1. Mitochondrial dysfunction of B cells in SLE

## (2) B 細胞において、非必須アミノ酸であるグルタミンはミトコンドリア機能亢進を介して形質芽細胞分化、抗体産生を誘導する

次に B 細胞代謝異常と形質芽細胞分化との関連性について、健常人末梢血 B 細胞を用いて *in vitro* で検討した。健常人末梢血より採取した CD19<sup>+</sup>細胞を CpG、IFN 刺激したところ、ミトコンドリアサイズの拡大とともにクリステが loose となり (Supplemental Fig.1B)、DiOc6 発現亢進、酸素消費率 (OCR) の亢進が誘導され、それに伴

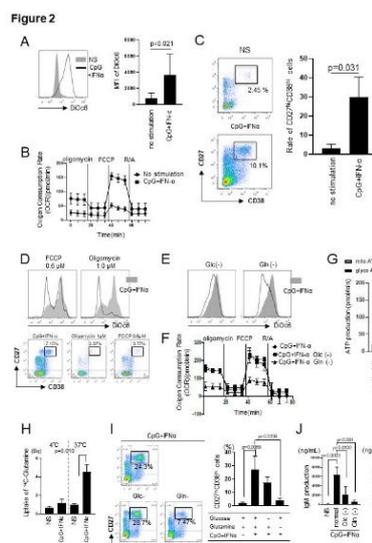
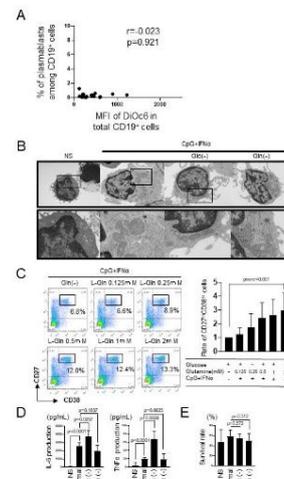


Figure2. Glutamine induces plasmablast differentiation and antibody production

Supplementary Figure1



い形質芽細胞分化が誘導された (Fig.2A, Fig.2B, Fig.2C)。DiOc6 発現と形質芽細胞の割合は負の相関を認めた (Supplemental Fig.1A)。ミトコンドリアの機能において重要な酸化的リン酸化の阻害剤である oligomycin、FCCP を添加したところ、DiOc6 発現量が低下し、形質芽細胞分化が抑制された (Fig.2D)。ミトコンドリア機能発現に必要な栄養素として、グルコースとグルタミンが挙げられる。そこでグルコース、グルタミンのミトコンドリア機能や、形質芽細胞分化への関与について検討した。グルタミン欠損下でミトコンドリアの形態には変化が見られなかったが、DiOc6 発現、酸素消費率 (OCR)、ATP 産生量が有意に抑制され、一方でグルコース欠損下ではそれらに変化がみられなかった (Supplemental Fig.1B, Fig.2E, Fig.2F, Fig.2G)。CpG、IFN 刺激による <sup>14</sup>C-グルタミン取り込みの亢進に伴い (Fig.2H)、形質芽細胞分化、抗体産生亢進が誘導され、それらはグルタミン欠損下で有意に抑制された (Fig.2I, Fig.2J)。グルタミン欠損培養液に L-グルタミンを添加すると、濃度依存的に形質芽細胞分化が回復した (Supplemental Fig.1C)。CD19<sup>+</sup>細胞を CpG、IFN 刺激により 5 日間培養したところ IL-6 および TNF などの炎症性サイトカイン産生が誘導されたが、グルタミン欠損下において変化はみられなかった (Supplementary Fig.1D)。細胞の生存率は、グルタミン欠損下において影響を受けなかった (Supplementary Fig.1E)。

### (3) B 細胞において、グルタミノリシスは酸化的リン酸化や ROS 産生の亢進を介して形質芽細胞分化、抗体産生を誘導する

グルタミンは代謝制御に関わるとともに、蛋白合成に重要な栄養素となるアミノ酸の一つでもある。従って、グルタミン欠損下では栄養素としてのグルタミン不足が代謝や形質芽細胞分化、抗体産生に影響を及ぼした可能性も考慮されたため、グルタミン分解 (グルタミノリシス) に限定し、ミトコンドリア機能や形質芽細胞分化、抗体産生に与える影響を検討した。CpG、IFN 刺激により OCR、細胞外酸性化率 (ECAR) の亢進が誘導された。グルタミン欠損下では OCR、ECAR は共に抑制されたのに対し、グルタミノリシスを阻害するグルタミナーゼ阻害剤 BPTES では、ECAR には変化を与えず、OCR のみが抑制された (Fig. 3A)。ミトコンドリアは生体内の約 95%の酸素を消費し、その 1-3%が ROS に変換される。ROS 産生は、グルタミン欠損下と同様に、BPTES により有意に抑制された (Fig. 3B)。

健常人、SLE 患者末梢血より採取した CD19<sup>+</sup>細胞を CpG、IFN で刺激したところ、形質芽細胞分化、および抗体産生が誘導され、それらはグルタミン欠損下と同様に BPTES によっても有意に抑制された (Fig. 3C, 3D)。

Figure 3

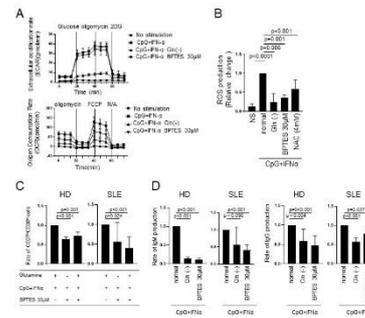


Figure3. Glutaminolysis induces plasmablast differentiation and antibody production

### (4) B細胞において、メトホルミンはグルタミン代謝とミトコンドリア機能を阻害し、形質芽細胞分化、抗体産生を抑制する

ヒト B 細胞の代謝、形質芽細胞分化に対する代謝制御薬の影響を調べた。CpG、IFN で誘導された形質芽細胞分化は、代謝制御薬であるメトホルミンにより濃度依存性に抑制された。一方、その他の代謝制御薬である AMPK 阻害剤 Dorsomorphin や LKB1 阻害剤 Pim1/AKK1-IN-1 では抑制されなかった (Fig. 4A)。CpG、IFN により誘導されたグルタミンの取り込み亢進はメトホルミン添加により濃度依存性に抑制された (Fig. 4B)。

健常人、SLE 患者末梢血より採取した CD19<sup>+</sup>細胞を CpG、IFN で刺激したところ、形質芽細胞分化、および抗体産生が誘導され、それらはメトホルミン添加により有意に抑制された (Fig. 4C, 4D)。

Figure 4

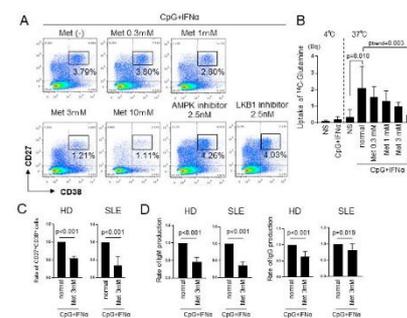


Figure4. Metformin inhibits glutamine metabolism and mitochondrial function

1. Tipton CM, Fucile CF, Darce J, Chida A, Ichikawa T, Gregoret I, et al. Diversity, cellular origin and autoreactivity of antibody-secreting cell population expansions in acute systemic lupus erythematosus. *Nat Immunol* 2015;16(7):755-65
2. Jenks SA, Cashman KS, Zumaquero E, Marigorta UM, Patel AV, Wang X, et al. Distinct effector B cells induced by unregulated Toll-like receptor 7 contribute to pathogenic responses in systemic lupus erythematosus. *Immunity* 2018;49(4):725-39
3. Jacobi AM, Mei H, Hoyer BF, Mumtaz IM, Thiele K, Radbruch A, et al. HLA-DR<sup>high</sup>/CD27<sup>high</sup> plasmablasts indicate active disease in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2010;69(1):305-8
4. Tanaka Y, Kubo S, Iwata S, Yoshikawa M, Nakayamada S. B cell phenotypes, signaling and their roles in secretion of antibodies in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* 2018;

5. Tanaka Y. State-of-the-art treatment of systemic lupus erythematosus. *Int J Rheum Dis* 2020; 23, 465-471
6. Wang S, Wang J, Kumar V, Karnell JL, Naiman B, Gross PS, et al. IL-21 drives expansion and plasma cell differentiation of autoreactive CD11c(hi)T-bet(+) B cells in SLE. *Nat Commun* 2018; 9(1):1758.
7. Igarashi K, Ochiai K, Itoh-Nakadai A, Muto A. Orchestration of plasma cell differentiation by Bach2 and its gene regulatory network. *Immunol Rev* 2014;261:116-25.
8. Iwata S, Yamaoka K, Niuro H, Nakano K, Wang SP, Akashi K, et al. Amplification of Toll-like receptor-mediated signaling through spleen tyrosine kinase in human B-cell activation. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129(6): 1594-601.
9. Tilstra JS, John S, Gordon RA, Leibler C, Kashgarian M, Bastacky S, Nickerson KM, Shlomchik MJ. B cell-intrinsic TLR9 expression is protective in murine lupus. *J Clin Invest* 2020;130(6):3172-87.
10. Choi WS, Yang JI, Kim W, Kim HE, Kim SK, Won Y, et al. Critical role for arginase II in osteoarthritis pathogenesis. *Ann Rheum Dis* 2019;78(3):421-8.
11. Andrejeva G, Rathmell JC. Similarities and distinctions of cancer and immune metabolism in inflammation and tumors. *Cell Metab* 2017;26(1):49-70.
12. O'Neill LA, Kishton RJ, Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol*. 2016;16:553-65.
13. Peter Gergely, J., Grossman, C., Niland, B., Puskas, F., Neupane, H., Allam, F., Banki, K., Phillips, P.E., and Perl, A. Mitochondrial Hyperpolarization and ATP Depletion in Patients With Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis and rheumatism*. 2002; 46:175-190.
14. Amir Sharabi, George C Tsokos. T cell metabolism: new insights in systemic lupus erythematosus pathogenesis and therapy. *Nat Rev Rheumatol*. 2020; 16(2): 100-112.
15. 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<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> B Cells to Plasmablasts or CD27<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup> Cells. *J Immunol*. 2017; 199(2): 425-434.
16. Zhang M, Iwata S, Hajime M, Ohkubo N, Todoroki Y, Miyata H, Ueno M, Hao H, Zhan T, Nakayamada S, Yamagaata K, Tanaka Y. Methionine commits cells to differentiate into plasmablasts through epigenetic regulation of BTB and CNC homolog 2 by the methyltransferase enhancer of zeste homolog 2. *Arthritis Rheum* 2020; 72(7): 1143-53.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Sumikawa Maiko Hajime, Iwata Shigeru, Zhang Mingzeng, Miyata Hiroko, Ueno Masanobu, Todoroki Yasuyuki, Nagayasu Atsushi, Kanda Ryuichiro, Sonomoto Koshiro, Torimoto Keiichi, Lee Seunghyun, Nakayamada Shingo, Yamamoto Kazuo, Okada Yosuke, Tanaka Yoshiya	4. 巻 0
2. 論文標題 An enhanced mitochondrial function through glutamine metabolism in plasmablast differentiation in systemic lupus erythematosus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/rheumatology/keab824	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 元舞子、岡田洋右、岩田慈、田中健一、黒住旭、成澤学、張明増、中山田慎吾、田中良哉
2. 発表標題 1 型糖尿病におけるミトコンドリア代謝異常の解明と新規治療応用
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術総会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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