

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：37116

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20884

研究課題名(和文) SLEにおけるT-bet+CD11c+B細胞の免疫代謝を介した分化誘導機構の解明

研究課題名(英文) Glycolysis controls the differentiation of naive B cells to T-bet+CD11c+ B cells in SLE

研究代表者

轟 泰幸 (Todoroki, Yasuyuki)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：40746814

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：In vitroの検討にてT-bet陽性B細胞はnaive B細胞を由来としBCR+sCD40L+IL21+CpG+IFN- γ 刺激により高率に誘導され高度のIL-6産生を伴った。その分化過程では、解糖系優位の代謝偏向を呈した。対照的に、形質芽細胞への分化はOXPHOS優位の代謝偏向を呈した。同細胞の増殖能およびIL-6産生は解糖系阻害薬により抑制された。一方、OXPHOS阻害薬では限局的であった。SLE患者検体ではT-bet陽性B細胞(%)が活動性腎炎、治療抵抗性と関連し血清IL-6濃度と正相関した。また同細胞では解糖系酵素GLUT1/3, HK2, GAPDH発現が亢進していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はSLEの病態形成において重要な役割を果たすT-bet+CD11c+B細胞の分化機構や機能を細胞内代謝の観点から検討を行った。解糖系阻害が難治性SLEの新たな治療標的となる可能性とともに症例毎にT-bet+CD11c+B細胞の割合を事前に把握することで、多くの合併症を誘発しうる副腎皮質ステロイド剤とは異なる作用機序の効率的かつ有害事象の少ない治療法を提供するというprecision medicineの実践にも応用可能である事が示唆された。その実現により、SLE患者の労働生産性の改善、療養・就労両立支援への貢献が可能となる点で社会的意義が高いと考える。

研究成果の概要(英文)：In vitro, T-bet+ B cells were well-induced when naive B cells cultured under the combination of B cell receptor + CD40 ligand+IL-21 + TLR9 ligand +IFN- γ . And in the culture medium, IL-6 were excessively produced from naive B cell-derived T-bet+ cells. The differentiation process showed a metabolic bias toward glycolytic system. In contrast, differentiation into plasmablasts depend on OXPHOS-dominant metabolic bias. Glycolytic inhibitors suppressed the proliferation and IL-6 production of these cells. On the other hand, OXPHOS inhibitors showed a limited effect.

In SLE patients, T-bet+ B cells (%) were associated with active nephritis and resistance to treatment and positively correlated with serum IL-6 concentration. Glycolytic enzymes GLUT1/3, HK2, and GAPDH were upregulated in these cells.

研究分野：リウマチ膠原病

キーワード：解糖系 IL-6産生 新規病原性B細胞 治療層別化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

SLE の病態形成において B 細胞は重要な役割を担う。当教室でも SLE 患者の末梢血免疫細胞フェノタイプ解析によりヒト B 細胞の形質芽細胞分化機構や分子標的薬の可能性を探索してきた(1-4,8)。実際、B 細胞を標的とした抗 BAFF 抗体ベリムマブは一定の有効性が示されたものの、実臨床ではその効果は限定的であった(3)。その大きな要因として疾患異質性 (heterogeneity) が考えられる。この現状を打破するためには、B 細胞の中でも特に重要な細胞集団を標的とした治療戦略、患者特性を事前に把握しその特性に沿った適切な薬剤選択 (precision medicine)、斬新な作用機序を持つ治療薬の開発が不可欠である。

近年「免疫代謝」という概念が注目されている。免疫細胞の分化・活性化には代謝変容によるエネルギー(ATP)産生や生体構成成分の生合成が必要となる。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、アミノ酸代謝の 6 つが存在する(右図)。これらの代謝変容が細胞の分化偏向・活性化に影響を与える。しかし、ヒト免疫細胞とりわけ B 細胞の分化・活性化と代謝変容との関連は不詳である。

本研究では、single cell RNA-seq 等の網羅的解析手法の進歩により SLE 病態-活動性腎炎や治療抵抗性-と強く相関する 5,6)事が明らかになった新規細胞集団：T-bet+CD11c+B 細胞の分化機構を「免疫代謝」の観点から明らかにするとともにその機能を評価し、代謝偏向を標的とした新規治療薬の開発に向けた基盤研究を行う。

また、SLE 患者検体での末梢血中の T-bet+CD11c+B 細胞を測定し、同細胞が豊富にみられる SLE 患者集団を事前に識別し同細胞をターゲットとした治療を戦略的に選択する、患者特性に沿った適切な薬剤選択 (precision medicine)への応用を目的とした。

2. 研究の目的

本研究では、以下の 2 つを目的とした。

In vitro 研究において、T-bet+CD11c+B 細胞の分化機構を「免疫代謝」の観点から解明しその機能や SLE 病態への関連を評価および代謝偏向を標的とした新規治療薬の開発へ向けた基盤的検討を行う

SLE 患者検体を用いて、T-bet+CD11c+B 細胞が病態に強く関与する SLE 患者集団を事前に識別し患者特性に沿った適切な薬剤選択 (precision medicine)への応用を目指す

3. 研究の方法

In vitro におけるヒト B 細胞を用いた研究 (代表者)

1. T-bet+CD11c+B 細胞の分化および機能の同定

: 健常人末梢血の CD19+B 細胞を用いて、どの B 細胞サブセットからいかなる刺激条件で T-bet+CD11c+B 細胞が最も誘導されるか、またその機能を下記の通り評価する。

(1) 健常人由来の B 細胞を IgD・CD27 を指標として 3 つのサブセット(IgD+CD27- naïve B 細胞, IgD+CD27+ IgM memory B 細胞, IgD-CD27+CS memory B 細胞)に分離する。

(2) SLE と関連する刺激(B 細胞受容体, CD40L, IL-21, TLR 7L(Lox), TLR 9L(CpG-B), IFN- α , IFN- γ) を用いて様々な条件下で、5 日間培養を行い、T-bet/CD11c および B 細胞分化マーカー(CD27, CD38, IRF4), IFN- γ 受容体/IFN- α 受容体の発現を Flow cytometry(FCM)にて評価し T-bet+CD11c+B 細胞を最も誘導する条件を同定する。

(3) 機能評価として、上清の各抗体(IgM, IgG)産生および各種サイトカイン(IL-6, IL-10, TNF- α)産生をそれぞれ ELISA 法・Cytometric Bead Array 法で測定する。

2. 起源となる B 細胞サブセットからの T-bet+CD11c+B 細胞分化における代謝表現型の同定

: 上記(1)で検討した培養条件において下記の代謝関連項目を評価する。

(1) 各種代謝関連マーカー : p-Akt, p-mTOR, p-S6, p-Hif1 α , GLUT1 および Ki-67(FCM)

(2) 解糖系/グルコース代謝 : 細胞外酸性化速度 (ECAR: Extracellular Acidification Rate; Flux analyzer), 解糖系/グルコース代謝酵素 (GLUT1/3, HK1/2, GAPDH, PFKF, PKM1/2, LDH, PDK1/2, PDHA1)発現量(PCR), Lactate 産生

(3) ミトコンドリア機能 (酸化的リン酸化:oxidative phosphorylation ;OXPHOS) : 酸素消費速度(OCR: Oxygen Consumption Rate; Flux analyzer), ミトコンドリアの大きさや内部構造 (クリステ)の変化 (電子顕微鏡), 各栄養素 (グルコース, アミノ酸, 脂肪酸)の利用効率, ATP 産生 (Flux analyzer), ROS 産生

3. 各種代謝標的薬の T-bet+CD11c+B 細胞分化への影響を確認。

:使用する代謝標的薬と作用部位 (右図参照)

(1) Rapamycin:mTORC1 阻害薬

(2) WZB117:GLUT1 阻害薬

(3) 2-Deoxy-D-glucose:Hexokinase 阻害薬

(4) UK5099:Mitochondrial Pyruvate Carrier(MPC) 阻害薬

(5) BPTES:Glutaminase(GLS)1 阻害薬

- (6) Etomoxir: Carnitine palmitoyltransferase I (CPT1) 阻害薬
- (7) Oligomycin: Mitochondrial ATP synthase (complex V) 阻害薬
- (8) Metformin: AMPK activator

患者検体を用いた研究 (代表者)

本学倫理委員会申請の上、同意の得られた SLE 患者および健常人を登録する。患者および健常人の末梢血を採取し単核球を分離の上、FCM 解析にて CD19 + B 細胞における各細胞表面抗原 (IgD, CD27, CD38, CD20) および CD11c/T-bet 発現、各種代謝関連マーカー (p-Akt, p-mTOR, p-S6, p-Hif1 α , GLUT1) を測定し各細胞集団での代謝マーカー発現の差異を検討する。さらに同患者にて血清サイトカイン濃度 (IFN- α , IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-10, IL-21 等) も測定 (電気化学発光法) し表面/代謝マーカーとの関連性を評価する。臨床情報 (年齢・性別・臓器障害・活動性・自己抗体等) を診療録より収集し、上記の細胞集団や代謝マーカーと臨床情報との関連を検討する。

治療開始 4・24 週後の治療反応性、有害事象を確認するとともに、FCM 解析にて B 細胞分化・各細胞集団の割合の変化および代謝マーカー発現の変化を確認する。

SLE における T-bet+CD11c+B 細胞の割合、同細胞と臨床的特徴および各代謝関連マーカー、血清サイトカインとの関連性を主成分分析・Hierarchical clustering・pathway 解析等の統計学的手法により検証する。その結果から T-bet+CD11c+B 細胞が深く関与する患者集団の臨床背景を確認し、患者特性に沿った適切な薬剤選択 (precision medicine) に繋げる。

4. 研究成果

In vitro において

- 1) T-bet+CD11c+B 細胞は、naïve B 細胞を由来とし B 細胞架橋+sCD40L+IL-21+CpG (Toll-like receptor 9 ligand)+IFN- γ 刺激により高率に誘導され、高度の IL-6 産生を伴った。一方、同刺激下で CS memory B 細胞から形質芽細胞 (Plasmablasts) へ分化し、抗体 (IgG) 産生を伴った。
 - 2) T-bet+CD11c+B 細胞の分化過程では、刺激後 1-12 時間に mRNA レベルで、解糖系酵素 (hexokinase2; HK2, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ;GAPDH) の発現亢進し、続いて 3 日後には ECAR (extracellular acidification rate) > OCR (oxidative phosphorylation) の亢進、ミトコンドリアの Cristae が疎で解糖系優位の代謝偏向を呈した。対照的に、形質芽細胞への分化過程では酸化リン酸化 (OXPHOS) 優位の代謝偏向を呈した (図 1)。
 - 3) T-bet+CD11c+B 細胞の増殖能および IL-6 産生は、解糖系阻害剤である HK2 阻害薬 (2-Deoxy-D-glucose), GAPDH 阻害薬 (Heptelidic acid) により顕著に抑制された。一方、OXPHOS 阻害薬 (BPTES, etomoxir, oligomycin, metformin) では限局的であった (図 2)。
- 患者検体において (図 3)
- 4) SLE 患者末梢血では、T-bet+CD11c+B 細胞の割合が疾患活動性および活動性腎炎、さらに血清 IFN- γ 、IL-6 濃度と正相関した。
 - 5) SLE-T-bet+CD11c+B 細胞では解糖系酵素 GLUT1/3, HK2, GAPDH の発現が亢進していた。

図 1. Naïve B から T-bet+CD11c+ B cells への分化において解糖系優位の代謝偏向を呈した

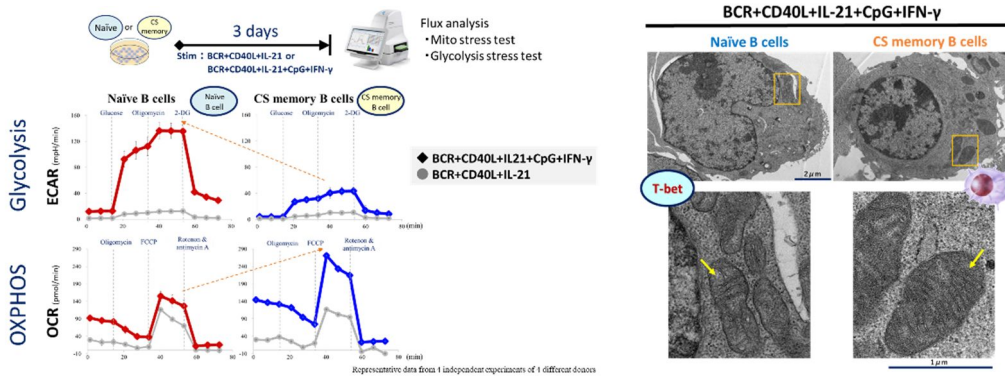


図 2. T-bet+CD11c+B 細胞の分化・IL-6 産生は解糖系阻害薬により抑制された。

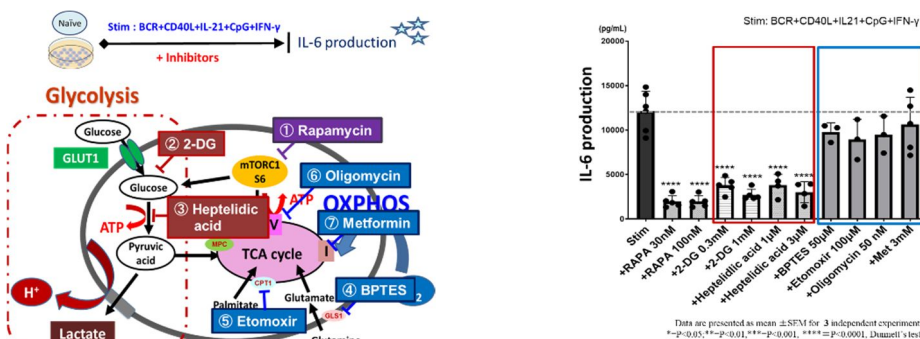
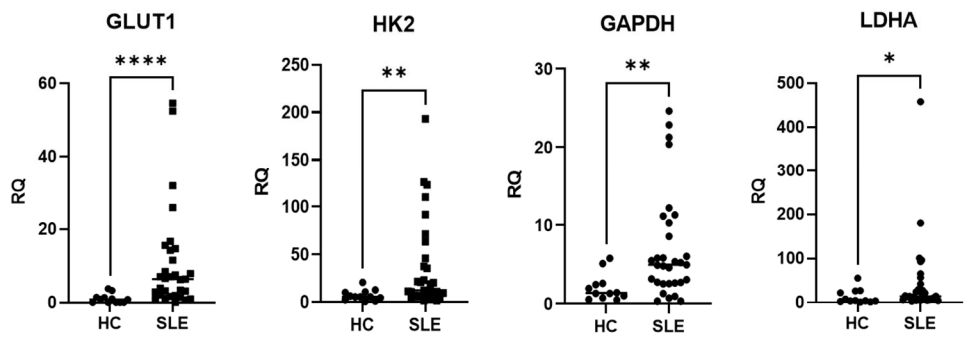
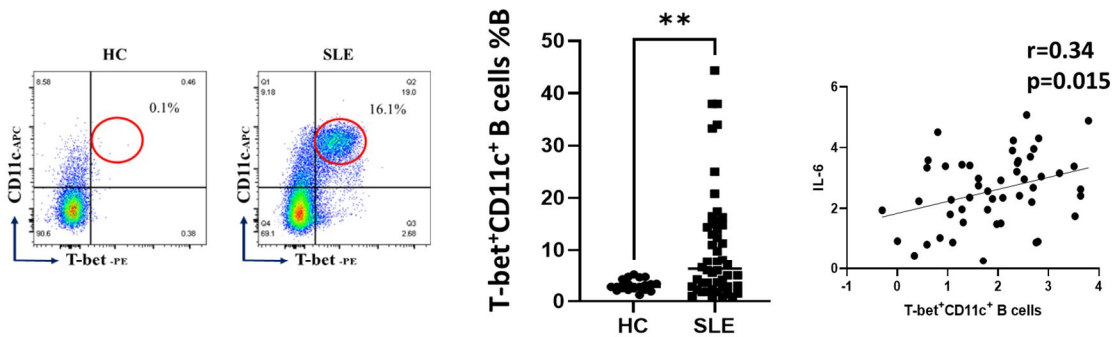


図 3.SLE-T-bet+CD11c+B 細胞の特徴



*=P<0.05; **=P<0.01, ***=P<0.001, ****=P<0.0001, Mann-Whitney test or paired t-test

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 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sumikawa MH, Iwata S, Zhang M, Miyata H, Ueno M, Todoroki Y, Nagayasu A, Kanda R, Sonomoto K, Tomrimoto K, Lee S, Nakayamada S, Yamamoto K, Okada Y and Tanaka Y.	4. 巻 61(7)
2. 論文標題 An enhanced mitochondrial function through glutamine metabolism in plasmablast differentiation in systemic lupus erythematosus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 3049-59
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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Masanobu Ueno, Shigeru Iwata, Kaoru Yamagata, Koshiro Sonomoto, Yasuyuki Todoroki, Junpei Anan, Kentaro Hanami, Yusuke Miyazaki, Akio Kawabe, Hiroko Miyata, Atsushi Nagayasu, Ryuichiro Kanda, Takafumi Aritomi, Shingo Nakayamada, Yoshiya Tanaka
2. 発表標題 Increased IL-21 receptor expression level via glycolysis in B cells and its potential as a trigger for exacerbation of disease activity in SLE
3. 学会等名 第66回 日本リウマチ学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上野匡庸、岩田慈、山形薫、園本格士朗、轟泰幸、阿南純平、宮崎佑介、永安敦、神田龍一郎、有富貴史、中山田真吾、田中良哉
2. 発表標題 SLE患者B細胞における初期解糖系亢進とIL-21シグナルを介した疾患増悪への関与
3. 学会等名 第50回日本臨床免疫学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yasuyuki Todoroki*, Shigeru Iwata, Masanobu Ueno, Atsushi Nagayasu, Ryuichiro Kanda, Naoaki Ohkubo, Mingzeng Zhang, Koshiro Sonomoto, Kazuhisa Nakano, Shingo Nakayamada, Yoshiya Tanaka
2. 発表標題 GLUT1-dependent glycolysis in T-bet+CD11c+ B cells differentiation and the role in Systemic Lupus Erythematosus (SLE)
3. 学会等名 第65回 日本リウマチ学会
4. 発表年 2021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
---------	---------