

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08387

研究課題名（和文）代謝をターゲットとした自己免疫疾患の新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel therapeutic strategies targeting cellular metabolism in autoimmune diseases

研究代表者

三枝 淳（Saegusa, Jun）

神戸大学・医学研究科・准教授

研究者番号：20514970

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）： グルタミン代謝阻害薬6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン（DON）およびmTOR阻害薬ラパマイシンはT細胞の増殖を抑制した。また、両者の併用は単剤の場合と比較して有意に強い増殖抑制効果を示した。DONおよびラパマイシンは、Th17細胞分化を抑制した。DONは骨髄細胞の樹状細胞およびマクロファージへの分化を抑制し、骨髄由来抑制細胞（MDSC）への分化を促進した。

さらに、両薬剤のマウス関節炎抑制効果について検討した。その結果、DONとラパマイシンの併用により、相加的にマウス関節炎が抑制されることを証明した。その効果はリンパ球への影響が主体であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節リウマチの病態には細胞内代謝異常が関わっており、グルタミン代謝阻害薬とmTOR阻害薬の併用療法は関節リウマチの新規治療法になり得ると考えられた。

研究成果の概要（英文）： The glutamine metabolism inhibitor 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON) and the mTOR inhibitor rapamycin suppressed T cell proliferation. In addition, the combined use of both showed a significantly stronger growth inhibitory effect than the case of a single agent. DON and rapamycin suppressed Th17 cell differentiation. DON suppressed the differentiation of bone marrow cells into dendritic cells and macrophages and promoted the differentiation into bone marrow-derived inhibitory cells (MDSC).

Furthermore, the effect of both drugs on suppressing mouse arthritis was examined. We demonstrated that combined treatment with rapamycin and DON additively ameliorated the arthritis in SKG mice, possibly by suppressing CD4+ T cell proliferation and Th17 differentiation.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：関節リウマチ グルタミン代謝 オートファジー クロロキン マウス関節炎モデル

1．研究開始当初の背景

関節リウマチ（RA）は、関節滑膜の慢性炎症に特徴づけられる全身性自己免疫疾患である。RA 患者の滑膜細胞は、生体から取り出して *in vitro* で培養しても高い増殖能、遊走能、アポトーシス抵抗性といった“腫瘍様”形質を有しているが、その詳細なメカニズムは明らかではない。申請者は RA 滑膜細胞の腫瘍様形質から着想し、RA 滑膜細胞が“グルタミノリシス（グルタミン分解）の亢進”というがん細胞類似の代謝的特徴を有することを明らかにした¹⁾。また、ヒト RA 患者および RA モデルマウスの免疫担当細胞にも代謝異常が存在すること、そしてその是正によりマウス関節炎が抑えられることを発見した²⁾。その作用機序は Th17 細胞への分化抑制、Treg 細胞への分化促進、および樹状細胞の活性化抑制と考えられたため、RA 以外の全身性自己免疫疾患の治療への応用も可能ではないかと考えた。

生物学的製剤の登場により革命的に変化した RA 治療であるが、治療目標である寛解に達している患者は 5-6 割程度にとどまっているのが現状である。また、RA 以外の膠原病においても難治性病態は数多く存在する。申請者らが行った実験でも、グルタミノリシス阻害薬 Compound 968 および解糖系阻害薬 3-プロモピルビン酸（BrPA）はマウス関節炎を強力に抑制したが、関節炎を完全には抑制できなかった。免疫領域に先駆けて代謝研究が盛んとなったがん研究の領域では、作用機序の異なる薬剤の併用療法が多くの成果をあげている。申請者は、将来作用機序の異なる複数の薬剤を併用するマルチターゲット療法がヒト全身性自己免疫疾患の寛解を目指す上で欠かせない治療となつてゆくと予想している。したがって、本研究では、代謝酵素阻害薬を中心としたマルチターゲット療法が膠原病治療に有効か否かについて検討を行いたいと考えた。

参考文献

- 1) Takahashi S, Saegusa J et al. Arthritis Res Ther. 2017, 19(1):76,
- 2) Okano T, Saegusa J et al. Sci Rep. 2017, 7:42412

2．研究の目的

本研究の目的は、細胞内代謝の鍵となる酵素をターゲットとした全身性自己免疫疾患の新規治療法を開発することである。

3．研究の方法

Balb/c マウスの脾細胞から MACS で CD4⁺T 細胞を単離した。単離した CD4⁺T 細胞を CFSE 標識し、DMSO, rapamycin, 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON), rapamycin + DON の 4 群で投薬を行い、抗 CD3, CD28 抗体刺激下で培養後 FACS により解析を行った。Th17 細胞分化条件として、抗 IFN- γ 抗体、抗 IL-4 抗体、IL-6、TGF- β 添加下で同様の 4 群の投薬を行い、FACS により Th17 細胞、Treg 細胞の解析を行った。また、各投薬条件での mTORC1, mTORC2 の活性化を調べるためにそれぞれの下流にある S6K, Akt のリン酸化を Western blot で評価した。

Balb/c マウスの骨髓細胞を両大腿骨より採取し、DMSO, rapamycin, DON, rapamycin + DON の 4 群で投薬を行い、GM-CSF 存在下で培養後に FACS で解析した。また、投薬下で産生された granulocytic myeloid-derived suppressor cells (G-MDSCs) を MACS で単離し、CFSE 標識した Balb/c マウスの CD4⁺T 細胞との共培養を行い免疫抑制能を評価した。

関節リウマチモデルマウスである SKG マウスに Zymosan A を腹腔内投与して関節炎を発症させ、vehicle, rapamycin, DON, rapamycin + DON を投与する 4 群にランダムに振り分け、週 3 回の投薬を行い、臨床的な関節炎スコア、足関節病理組織における滑膜増生、骨破壊への影響を評価した。そして、マウスから回収した脾細胞について、Th17 細胞、Treg 細胞、樹状細胞、マクロファージ、MDSCs を FACS により解析した。また、足関節病理組織について、T 細胞、骨髓系細胞、滑膜細胞を免疫染色し、細胞種別の効果を評価した。

4．研究成果

- (1) ラパマイシンおよび DON は CD4⁺T 細胞の増殖および Th17 細胞分化を阻害した。

まず、T細胞増殖に対する mTOR 阻害薬ラパマイシンとグルタミン代謝阻害薬 (6-diazo-5-oxo-L-norleucine; DON) の影響を解析した。マウスから単離した CD4⁺T 細胞を、DMSO (コントロール) ラパマイシン、DON、またはラパマイシン + DON を添加して培養したところ、ラパマイシンと DON はそれぞれ CD4⁺T 細胞の増殖を有意に抑制した。さらに、ラパマイシンと DON を併用した治療は、いずれかの薬剤単独よりも CD4⁺T 細胞の増殖を強く抑制することを発見した (図 1 A, B)。

続いて、ラパマイシンと DON の T 細胞分化に対する影響について解析した。Th17 細胞分化促進条件下でこれらの薬剤を添加して調べたところ、ラパマイシンまたは DON による治療は、Ror γ +Th17 細胞の分化を有意に阻害した。また、Foxp3⁺Treg 細胞の割合は、他と比較して、ラパマイシンを含むレジメンで処理された細胞で有意に高かった (図 1 C, D)。これらの結果は、Th17/Treg の分化制御においては、mTOR シグナルがグルタミン代謝に dominant であることを示唆していた。

(2) ラパマイシンと DON は、骨髄細胞の DC とマクロファージへの分化を阻害し、G-MDSC の増殖を促進した。

次に、ラパマイシンと DON が in vitro で骨髄細胞の分化にどのように影響するかを調べた。リンパ球の実験で使用したのと同じ 4 つのレジメンで GM-CSF で刺激した骨髄細胞を処理した。GM-CSF で培養すると、骨髄細胞は樹状細胞 (DC) マクロファージ、および骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) に分化した。DON は、DC の分化を抑制し、MDSC の増殖を促進した。ラパマイシンと DON の併用は、ラパマイシンまたは DON 単独よりもマクロファージの分化をより強く阻害する傾向を認めた (図 2 A, B)。ラパマイシンと DON はどちらも Monocytic MDSC の分化を阻害する一方で、Granulocytic MDSC の増殖を促進した (図 2 C, D)。これらの結果より、DC、マクロファージ、および M-MDSC の分化を抑制して G-MDSC の増殖を促進する上で、DON がラパマイシンよりも強い効果を持っていることが示唆された。

(3) ラパマイシンと DON の組み合わせは、in vivo でそれぞれの単剤療法よりも SKG マウス関節炎を有意に抑制した。

最後に、関節炎モデルマウスに対するラパマイシンと DON の治療効果について解析した。臨床関節炎スコアで評価すると、ラパマイシンと DON の両方が SKG マウスの関節炎を有意に抑制し、ラパマイシンと DON による治療は、ラパマイシンまたは DON 単独よりも強く関節炎を抑制した (図 3 A)。4 つのレジメンのうち、組織学的スコアは、ラパマイシンと DON の組み合わせで治療したグループが最も低かった (図 3 B, C)。

また、関節炎マウスの免疫担当細胞の解析から、ラパマイシンと DON が in vivo で CD4⁺T 細胞の増殖と Th17 の分化を抑制することによって関節炎を相対的に改善したことが示された。

以上の結果より、ラパマイシンと DON の併用療法は RA の新規治療法となり得ると考えられた。

図 1

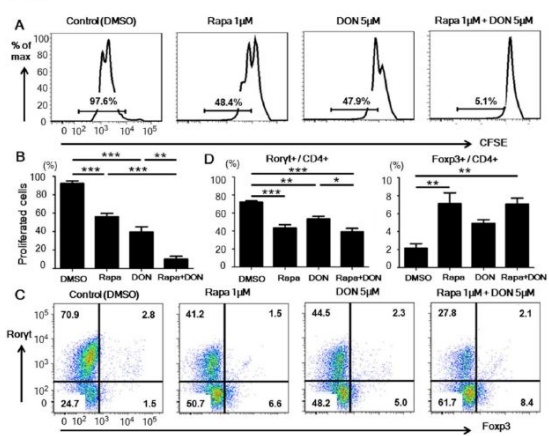


図 2

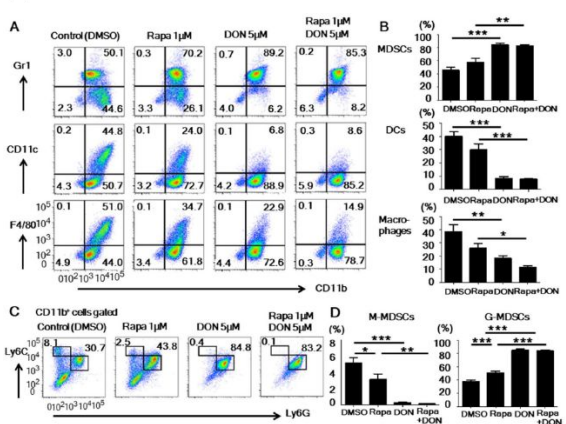
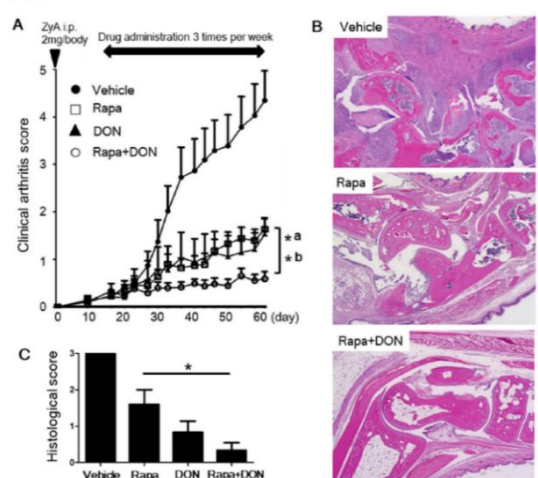


図 3



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Ichise Yoshihide, Saegusa Jun, Tanaka-Natsui Shino, Naka Ikuko, Hayashi Shinya, Kuroda Ryosuke, Morinobu Akio	4. 巻 9
2. 論文標題 Soluble CD14 Induces Pro-inflammatory Cytokines in Rheumatoid Arthritis Fibroblast-Like Synovial Cells via Toll-Like Receptor 4	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1689 ~ 1689
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells9071689	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 Yuzuru Yamamoto, Takaichi Okano, Hirotaka Yamada, Kengo Akashi, Sho Sendo, Yo Ueda, Akio Morinobu, Jun Saegusa	4. 巻 in press
2. 論文標題 Soluble guanylate cyclase stimulator reduced the gastrointestinal fibrosis in bleomycin-induced mouse model of systemic sclerosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arthritis Res Ther	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） 10.1186/s13075-021-02513-y	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 Ueda Yo, Saegusa Jun, Okano Takaichi, Sendo Sho, Yamada Hirotaka, Nishimura Keisuke, Morinobu Akio	4. 巻 9
2. 論文標題 Additive effects of inhibiting both mTOR and glutamine metabolism on the arthritis in SKG mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6374
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-42932-1	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 Takahashi Soshi, Saegusa Jun, Onishi Akira, Morinobu Akio	4. 巻 58
2. 論文標題 Biomarkers identified by serum metabolomic analysis to predict biologic treatment response in rheumatoid arthritis patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 2153 ~ 2161
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/rheumatology/kez199	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 Sendo Sho, Saegusa Jun, Yamada Hirotaka, Nishimura Keisuke, Morinobu Akio	4. 巻 21
2. 論文標題 Tofacitinib facilitates the expansion of myeloid-derived suppressor cells and ameliorates interstitial lung disease in SKG mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Arthritis Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13075-019-1963-2	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 Ueda Yo, Saegusa Jun, Okano Takaichi, Sendo Sho, Yamada Hirotaka, Nishimura Keisuke, Morinobu Akio	4. 巻 9
2. 論文標題 Additive effects of inhibiting both mTOR and glutamine metabolism on the arthritis in SKG mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-42932-1	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 Okano Takaichi, Saegusa Jun, Takahashi Soshi, Ueda Yo, Morinobu Akio	4. 巻 41
2. 論文標題 Immunometabolism in rheumatoid arthritis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Immunological Medicine	6. 最初と最後の頁 89 ~ 97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/25785826.2018.1531186	査読の有無 無
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 Sendo Sho, Saegusa Jun, Morinobu Akio	4. 巻 38
2. 論文標題 Myeloid-derived suppressor cells in non-neoplastic inflamed organs	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	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) 10.1186/s41232-018-0076-7	査読の有無 無
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 Ohnuma Kenichiro, Kasagi Shimpei, Uto Kenichi, Noguchi Yoriko, Nakamachi Yuji, Saegusa Jun, Kawano Seiji	4. 巻 39
2. 論文標題 MicroRNA-124 inhibits TNF- α - and IL-6-induced osteoclastogenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Rheumatology International	6. 最初と最後の頁 689 ~ 695
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00296-018-4218-7	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 Nishida Miwa, Saegusa Jun, Tanaka Shino, Morinobu Akio	4. 巻 13
2. 論文標題 S100A12 facilitates osteoclast differentiation from human monocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0204140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0204140	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 Yamamoto Tetsushi, Awano Hiroyuki, Zhang Zhujun, Sakuma Mio, Kitaaki Shoko, Matsumoto Masaaki, Nagai Masashi, Sato Itsuko, Imanishi Takamitsu, Hayashi Nobuhide, Matsuo Masafumi, Iijima Kazumoto, Saegusa Jun	4. 巻 11
2. 論文標題 Cardiac Dysfunction in Duchenne Muscular Dystrophy Is Less Frequent in Patients With Mutations in the Dystrophin Dp116 Coding Region Than in Other Regions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Circulation: Genomic and Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 e001782
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCGEN.117.001782	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 Yamada Hirotaka, Saegusa Jun, Sendo Sho, Ueda Yo, Okano Takaichi, Shinohara Masakazu, Morinobu Akio	4. 巻 11
2. 論文標題 Effect of resolvin D5 on T cell differentiation and osteoclastogenesis analyzed by lipid mediator profiling in the experimental arthritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17312
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-96530-1	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 Uto Kenichi, Ueda Koji, Okano Takaichi, Akashi Kengo, Takahashi Soshi, Nakamachi Yuji, Imanishi Takamitsu, Awano Hiroyuki, Morinobu Akio, Kawano Seiji, Saegusa Jun	4. 巻 61
2. 論文標題 Identification of plexin D1 on circulating extracellular vesicles as a potential biomarker of polymyositis and dermatomyositis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1669 ~ 1679
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rheumatology/keab588	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9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 9件)

1. 発表者名 Naka I, Saegusa J, Uto K, Yamamoto Y, Ichise Y, Yamada H, Akashi K, Ueda Y, Onishi A, Okano T, Takahashi S, Sendo S, Morinobu A.
2. 発表標題 Combined inhibition of autophagy and glutamine metabolism suppresses cell growth of RA synoviocytes and ameliorates arthritis in SKG mice.
3. 学会等名 The 21st Annual European Congress of Rheumatology - EULAR (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naka I, Saegusa J, Uto K, Yamamoto Y, Ichise Y, Yamada H, Ueda Y, Okano T, Takahashi S, Sendo S, Morinobu A
2. 発表標題 Combined inhibition of autophagy and glutamine metabolism suppresses cell growth of RA synoviocytes and ameliorates arthritis in SKG mice.
3. 学会等名 American College of Rheumatology 84th Annual Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ueda Y, Saegusa J, Okano T, Sendo S, Yamada H, Akashi K, Onishi A, Morinobu A
2. 発表標題 Combined inhibition of mechanistic target of rapamycin and glutamine metabolism inhibits CD4 T cell proliferation and Th17 differentiation, facilitates the expansion of myeloid-derived suppressor cells, and synergistically ameliorates arthritis in SKG mice.
3. 学会等名 American College of Rheumatology 82nd Annual Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1 . 発表者名 Sendo S, Saegusa J, Ichise Y, Yamada H, Naka I, Ueda Y, Okano T, Morinobu A
2 . 発表標題 Tofacitinib facilitates the expansion of myeloid-derived suppressor cells and ameliorates interstitial lung disease in SKG mice.
3 . 学会等名 American College of Rheumatology 82nd Annual Scientific Meeting (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Ueda Y, Saegusa J, Okano T, Sendo S, Yamada H, Ichise Y, Naka I, Takahashi S, Akashi K, Onishi A, Morinobu A
2 . 発表標題 Combination therapy of rapamycin and a glutamine antagonist facilitates the expansion of myeloid-derived suppressor cells and ameliorates arthritis in SKG mice.
3 . 学会等名 The 19th Annual European Congress of Rheumatology - EULAR (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Yamada H, Saegusa J, Sendo S, Ueda Y, Okano T, Fujikawa Y, Yamamoto Y, Nagamoto T, Ichise Y, Naka I, Akashi K, Onishi A, Shinohara M, Morinobu A
2 . 発表標題 Resolvin D5 modulates Th17/Treg cell differentiation and suppresses osteoclastogenesis.
3 . 学会等名 The 21st Annual European Congress of Rheumatology - EULAR 2020 (国際学会)
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 Yamamoto Y, Okano T, Nagamoto T, Fujikawa Y, Ichise Y, Yamada H, Naka I, Ueda Y, Akashi K, Sendo S, Onishi A, Saegusa J, Morinobu A
2 . 発表標題 Soluble guanylate cyclase reduced the gastrointestinal fibrosis in bleomycin-induced mouse model of systemic sclerosis.
3 . 学会等名 American College of Rheumatology 84th Annual Scientific Meeting, 2020 (国際学会)
4 . 発表年 2020年

1. 発表者名 Yamada H, Saegusa J, Sendo S, Ueda Y, Okano T, Fujikawa Y, Yamamoto Y, Nagamoto T, Ichise Y, Naka I, Akashi K, Onishi A, Shinohara M, Morinobu A
2. 発表標題 Resolvin D5 modulates Th17/Treg cell differentiation and suppresses osteoclastogenesis.
3. 学会等名 American College of Rheumatology 84th Annual Scientific Meeting, 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Uto K, Ueda K, Okano T, Akashi K, Takahashi S, Nakamachi Y, Imanishi T, Kawano S, Yano Y, Saegusa J
2. 発表標題 Identification of Plexin D1 on Circulating Extracellular Vesicles as a Potential Biomarker of Polymyositis and Dermatomyositis.
3. 学会等名 American College of Rheumatology 85th Annual Scientific Meeting, 2021 (国際学会)
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
研究 分担者	森信 暁雄 (Morinobu Akio) (10294216)	神戸大学・医学研究科・准教授 (14501)	
研究 分担者	河野 誠司 (Kawano Seiji) (20351512)	神戸大学・医学部附属病院・特命教授 (14501)	

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