

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15155

研究課題名(和文) アミノ酸代謝によるヘルパーT細胞運命決定機構の解明

研究課題名(英文) Determination of helper T cell fate by amino acid metabolism

研究代表者

山下 政克 (Yamashita, Masakatsu)

愛媛大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00311605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：CD4 T細胞は抗原を認識して活性化すると、細胞内のエネルギー代謝系路を変化させ増殖することが知られている。しかし、CD4 T細胞の機能分化におけるエネルギー代謝経路変化の役割は不明であった。今回、私たちはグルタミン代謝のヘルパーT細胞(Th)サブセット分化における役割を解析し、グルタミン代謝によって作り出される $\alpha$ -ケトグルタル酸が、サイトカイン遺伝子座のエピゲノム状態を制御することでTh分化を調節していることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：After receiving antigenic stimulation, the reprogram of metabolic pathway is induced in CD4 T cells and supports rapid clonal expansion. However, the role of metabolic reprogramming in the differentiation of helper T cell (Th) subset remains to be elucidated. In this study, we focused on the role of glutamine metabolism in activated CD4 T cells. We found that glutamine metabolism controls chromatin status at the cytokine gene loci and regulates Th differentiation in part via supplementation of  $\alpha$ -ketoglutarate.

研究分野：免疫学

キーワード：グルタミン代謝 ヘルパーT細胞 エピゲノム サイトカイン

### 1. 研究開始当初の背景

抗原を認識したナイーブ CD4 T 細胞は、活性化し、活発に増殖するとともに、抗原排除のための適切な機能を獲得して、機能の異なった Th 細胞サブセットへと分化する。Th 細胞サブセットへの分化には、T 細胞抗原受容体とサイトカイン受容体からのシグナルで誘導される、エピゲノム変化を介した遺伝子発現の協調的かつ網羅的な発現変動(転写リプログラミング)が必要である。一連の過程を適切に行うために、Th 細胞は、活性化後、爆発的にエネルギー消費を増大させるが、そのエネルギーの効率の良い供給のためには、細胞内代謝経路のリプログラミング(代謝リプログラミング)が必須である。つまり、Th 細胞は、ダイナミックに代謝経路を変化させることで、免疫反応をコントロールしているといえるが、代謝リプログラミング調節機構の解析は進んでいない。また、現在行なわれている T 細胞エネルギー代謝研究は、グルコース代謝や脂肪酸代謝の解析が主であり、アミノ酸代謝に関する研究は非常に遅れている。

### 2. 研究の目的

本研究申請では、(1) 活性化 CD4 T 細胞におけるアミノ酸代謝調節機構、(2) Th 細胞サブセット分化に伴う転写リプログラミングにおけるアミノ酸代謝の役割を解明するための研究を行い、“代謝リプログラミングによる Th 細胞の運命制御”の新規概念の提唱を目指す。

### 3. 研究の方法

Bach2 によるアミノ酸代謝調節を介した Th サブセット分化制御を中心に解析を行ない、代謝/転写リプログラミングのクロストークの実態を解明することで、Th 細胞の運命決定機構の新規概念を提唱する。具体的には以下 2 項目について研究を行う。(1) 活性化 CD4 T 細胞におけるアミノ酸代謝調節機構の

解明: アミノ酸代謝のなかでも、Bach2 欠損 CD4 T 細胞で過剰な活性化が誘導される、グルタミン、アラニン、グリシン代謝に着目し、それらの制御に關与する Bach2 経路下流遺伝子を同定した。また、Bach2 結合分子を同定し、発現調節機構についても解析を行なう。(2) Th 細胞サブセット分化に伴う転写リプログラミングにおけるアミノ酸代謝の役割: Th サブセット分化制御における、アミノ酸代謝経路の役割について細胞レベル・個体レベルで解析した。

### 4. 研究成果

*In vitro*において、ナイーブ CD4 T 細胞の活性化に伴い、グルタミン代謝に関連する酵素(Gls2, Got1, Gpt2, Asns)の著しい発現上昇が認められた。発現誘導は、T 細胞抗原受容体(TCR)刺激後、約 4 時間から検出され、24 時間~48 時間で最大となった。また、TCR 刺激により、細胞内グルタミン酸の濃度が著しく上昇し、そのピークは刺激後約 24 時間であった。細胞内グルタミン濃度の上昇は、培養液中のグルタミンを除去することでほぼ完全に抑制されたことから、細胞外のグルタミンが活性化とともに取り込まれ、グルタミン代謝酵素を介してグルタミン酸を作り出していると考えられた。これらの実験結果は、TCR 刺激によって CD4 T 細胞内のグルタミン代謝が亢進することを示唆している。

続いて、*in vitro* Th サブセット分化におけるグルタミン代謝の役割について解析を行なった。グルタミンアナログでグルタミン代謝阻害剤である L-Don の Th 分化に対する作用を *in vitro* で検討したところ、Th2、Th17 細胞の分化は顕著に抑制されたが、Th1 細胞分化はほとんど抑制されず、Th1 細胞からの IL-2 産生は逆に増強された。制御性 T 細胞(Treg)の分化は、L-Don 処理により促進されることが分かった。Th 細胞分化におけるグルタミン代謝の役割をさらに詳細に解析する

ため、低グルタミン条件下における Th 細胞分化について、グルタミン除去培地を用いた Th 分化検討をおこなった。L-Don による薬理的グルタミン代謝の阻害と同様、Th2 と Th17 分化はグルタミン除去により抑制された。一方、IFN $\gamma$  産生 Th1 細胞分化は抑制されず、IL-2 産生 Th1 細胞数は逆に増加した。Treg の分化は、グルタミン除去により促進される傾向であった。

グルタミン代謝では、グルタミンはグルタミン酸へと代謝され、グルタミン酸はアルファケトグルタル酸 ( $\alpha$ -KG) へとさらに代謝される (図 1)。

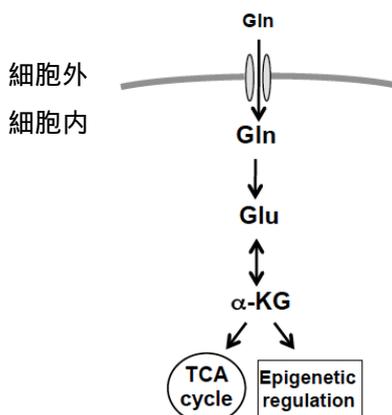


図 1 グルタミン代謝経路

$\alpha$ -KG は、TCA サイクルやマクロ分子合成のための中間代謝産物として利用されるか、酵素の補因子として働く。そこで申請者らは、グルタミン除去の影響が  $\alpha$ -KG の添加によって回復するかについて解析を行なったところ、グルタミン除去による Th2、Th17 細胞分化の低下は、 $\alpha$ -KG の添加により部分的に回復することが分かった。

$\alpha$ -KG は DNA / ヒストン脱メチル化酵素の補因子として働くことが知られている。そこで、Th 分化制御におけるグルタミン代謝- $\alpha$ -KG 経路の役割について Th2 細胞分化をモデルに解析した。低グルタミン Th2 分化条件下の活性化 CD4 T 細胞では、コントロール Th2 分化条件下の細胞に比べ、Th2 サイトカイン遺伝子座のヒストン H3K27 のメチル化状態が上昇すること、その上昇は  $\alpha$ -KG の添加によ

って抑制されることが分かった。興味深いことに、ヒストン H3K4 のメチル化レベルはグルタミン除去や  $\alpha$ -KG の添加によって影響は受けなかった。

以上の結果から、グルタミン代謝経路は  $\alpha$ -KG の供給を介してサイトカイン遺伝子座のヒストン H3K27 の脱メチル化制御し、Th2、Th17 分化を調節している可能性が考えられた (論文投稿準備中)。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3件)

Suzuki J., Maruyama S., Tamauchi H., Kuwahara M., Horiuchi M., Mizuki M., Ochi M., Sawasaki T., Zhu J, Yasukawa M., Yamashita M. Gfi1, a transcriptional repressor, inhibits the induction of the T helper type1 programme in activated CD4 T cells. *Immunology*. 147(4), 476-487, 2016, 査読有り, DOI : 10. 1111/imm. 12580

Kuwahara M., Ise W., Ochi M., Suzuki J., Kometani K., Maruyama S., Izumoto M., Matsumoto A., Takemori N., Takemori A., Shinoda K., Nakayama T., Ohara O., Yasukawa M., Sawasaki T., Kurosaki T., Yamashita M. Bach2-Batf interactions control Th2-type immune response by regulating the IL-4 amplification loop. *Nat. Commun* ncomms12596, 2016, 査読あり, DOI: 10.1038/ncomms12596.

Yamada T., Kanoh M., Nabe S., Yasuoka T., Suzuki J., Matsumoto A., Kuwahara M., Maruyama S., Fujimoto T., Sakisuka R., Yasukawa M., Yamashita M. Menin plays a critical role in the regulation of the antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cell response upon Listeria infection. *J. Immunol.* 197 (10), 4079-4089, 2016, 査読有り, DOI : 10.4049/jimmunol. 1502295.

〔学会発表〕(計 7件)

SUZUKI Junpei, KUWAHARA Makoto, YASUKAWA Masaki, YAMASHITA Masakatsu. A tumor suppressor Menin controls CD8 T cell senescence by regulating glutamine metabolism. 第78回日本血液学会学術集会, 2016年10月14日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

Junpei Suzuki, Makoto Kuwahara, Msaki Yasukawa, Masakatsu Yamashita. A tumor suppressor Menin controls CD8 T cell senescence by regulating energy metabolism. INTERNATIONAL CONGRESS OF IMMUNOLOGY 2016, 2016年8月26日, Melbourne Convention and Exhibition Centre (オーストラリア・メルボルン).

SUZUKI Junpei, KUWAHARA Makoto, Maruyama Saho, YAMADA Takeshi, YASUOKA Toshiaki, YASUKAWA Masaki, YAMASHITA Masakatsu. A tumor suppressor Menin controls CD8 T cell senescence by regulating energy metabolism. 第44回日本免疫学会学術集会, 2015年11月19日, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市).

SUZUKI Junpei, YAMADA Takeshi, YASUOKA Toshiaki, KUWAHARA Makoto, YAMASHITA Masakatsu, YASUKAWA Masaki. 第77回日本血液学会学術集会 A tumor suppressor Menin inhibits CD8 T cell senescence by regulating energy metabolism. 2015年10月16日, 石川県立音楽堂・ANAクラウンプラザホテル金沢・ホテル日航金沢・ホテル金沢・金沢市アートホテル (石川県金沢市)

鈴木淳平、桑原誠、山田武司、安川正貴、山下政克: 腫瘍抑制因子 Menin は代謝調節を介して CD8 T 細胞老化を制御する 第3回がん代謝研究会 2015年7月16日~17日 石川県立音楽堂 (石川県金沢市)

Masakatsu Ymasahita, Makoto Kuwahara:

Bach2 inhibits Th2-type immune responses by regulating glutamine metabolism. 第64回日本アレルギー学会学術大会, 2015年5月26日~28日, グランドプリンスホテル新高輪 (東京都品川区)

塩入幹汰、桑原誠、山下政克: Th2 細胞分化には細胞内グルタミン代謝が必要である 第64回日本アレルギー学会学術大会 2015年5月26日~28日 グランドプリンスホテル新高輪 (東京都品川区)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況 (計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等  
愛媛大学大学院医学研究科免疫学・感染防御学講座  
<http://ehime-u-immunology.com>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 政克 (Yamashita, Masakatsu)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 00311605

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

桑原 誠 (KUWAHARA Makoto)  
研究者番号: 00568214

愛媛大学・大学院医学系研究科・助教

鈴木 淳平 (SUZUKI Junpei)

研究者番号：20734239

愛媛大学・大学院医学系研究科・助教 (特定  
教員)

(4)研究協力者

なし