

平成 29 年 5 月 27 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19133

研究課題名(和文) Meninによるエネルギー代謝調節を介した免疫老化制御機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of the role of Menin in immunosenescence and cellular energy metabolism

研究代表者

鈴木 淳平 (Suzuki, Junpei)

愛媛大学・医学系研究科・助教(特定教員)

研究者番号：20734239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題の目的は、末梢CD8 T細胞老化と細胞内エネルギー代謝における腫瘍抑制因子Meninの役割を明らかにすることである。Meninの欠損によりAkt/mTORC1シグナル経路が活性化することで、細胞内エネルギー代謝(グルタミン代謝や嫌氣的解糖)が過剰に亢進することがわかった。さらに、過剰なグルタミン代謝の亢進がMenin欠損CD8 T細胞で認められる早期のT細胞老化形質の誘導に関わることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The deficiency in Menin, a tumor suppressor protein, induces CD8 T-cell senescence. We found that Akt/mTORC1 signaling pathway was enhanced in Menin-deficient activated CD8 T cells. We performed a metabolic profiling of 116 metabolites and found that Menin-deficient activated CD8 T cells had higher rate of glutaminolysis and anaerobic glycolysis than that in the WT activated CD8 T cells. Furthermore, premature CD8 T cell senescence in Menin-deficient CD8 T cells was partially inhibited by the treatment with rapamycin or inhibitors for glutamine metabolism. These results suggest that Menin controls CD8 T-cell senescence in part by regulating the energy metabolism.

研究分野：免疫学

キーワード：T細胞老化 細胞内エネルギー代謝 mTORC1

1. 研究開始当初の背景

加齢に伴った免疫系の老化(免疫老化)は、外来抗原に対する応答の減弱や炎症性サイトカイン産生の増加を誘導し、高齢者における易感染性、慢性炎症性疾患や発がん増加の一因となっている。T細胞分化の場である胸腺は、成人後に徐々に退縮して50代でほぼ消失し、老齢期においては新たなT細胞の供給は著しく減少する。そのため、免疫担当細胞の中でもT細胞は、最も強く細胞老化の影響を受けると考えられている。また、長期に渡って繰り返される抗原の侵入はT細胞の過剰な増殖を招き、それによってT細胞老化が促進されることも報告されている。前述したようにT細胞の老化は、加齢に伴う慢性炎症性疾患や発がん、感染症増加の最も大きなリスクファクターとなるため、T細胞老化の分子機構を明らかにし、その制御法を見いだすための研究はこれら老化関連疾患の発症予防に大きく貢献できる可能性が高い。しかしながら、T細胞老化の分子機構に関する研究は免疫学の中では非常に遅れた分野となっている。我々は、腫瘍抑制因子Meninを欠損したT細胞では、抗原刺激後の早期にT細胞老化が誘導されることを見出し、そのMenin欠損マウスをT細胞老化のモデルとして解析を行い、Menin欠損活性化CD8 T細胞ではグルタミン代謝や解糖系が亢進していることを新たに見出した。そこで、本申請研究は、MeninによるT細胞エネルギー代謝とT細胞老化制御機構を解明することで、エネルギー代謝の調節によりT細胞老化を制御し、老化関連疾患を防止するための新規方法論の提示を目指す。

2. 研究の目的

本申請研究は、腫瘍抑制因子MeninによるCD8 T細胞エネルギー代謝調節機構の解明研究をおこなうことで、T細胞老化の制御を代謝リプログラミングの観点から明らかにし、免疫老化に伴って誘導される発がんや炎症性疾患の増加、易感染性を防止するための新規方法論を提示することを目的としている。具体的な研究テーマは、(1) Meninによる細胞内エネルギー代謝調節機構の解明、(2) 細胞内エネルギー代謝調節によるT細胞老化制御を解明するとともに、(3) T細胞エネルギー代謝調節による免疫機能制御法の確立である。

3. 研究の方法

T細胞特異的Menin欠損マウスは、Menin^{flox/flox}マウスをCD4-Creトランスジェニックマウスと交配し作製した。*In vitro*解析は、マウス脾臓由来ナープCD8 T細胞を固層化抗TCRβ抗体/抗CD28抗体で2日間刺激後、IL-2で増殖させたエフェクター細胞を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) Meninによる細胞内エネルギー代謝調節機構の解明

申請者らはこれまでに、メタボロミックプロファイリング解析をおこない、Menin欠損活性化CD8 T細胞でグルタミン代謝と解糖系がともに亢進している可能性を見出している。そこで、グルタミン代謝と解糖系関連酵素のmRNA発現をRNA-シーケンスにより網羅的に解析した。この結果、Menin欠損活性化CD8 T細胞では、解糖系関連酵素のLdhaの発現が有意に増加した。これに加え、グルタミン代謝関連酵素であるグルタミナーゼ(Gls)やアスパラギン合成酵素(Asns)の発現がMenin欠損活性化CD8 T細胞で有意に増加した。これらの結果から、Meninは代謝関連酵素の発現制御を介し、細胞内エネルギー代謝を調節する可能性が示唆された。

次にMeninによる細胞内エネルギー代謝制御機構を検討した。これまでに、Meninはセリン/スレオニンキナーゼのAktと結合することで、Aktの活性化を抑制することが報告されている。そこで、Menin欠損活性化CD8 T細胞のAkt活性化状態についてAktのリン酸化レベルを指標に検討した。この結果、Menin欠損CD8 TではAktのリン酸化(Ser473、Thr308)レベルが野生型に比べ上昇した。さらに、活性化Aktの標的分子であるmTOR(Ser2481, Ser2448)、mTORC1の標的分子リボソームタンパク質S6(Ser235/236, Ser240/244)のリン酸化レベルもMenin欠損活性化CD8 T細胞で増加した(図1)。これらの結果から、Menin欠損活性化CD8 T細胞はAkt/mTORC1シグナル経路が過剰に亢進していることが明らかとなった。

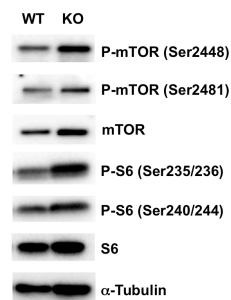


図1 Menin欠損活性化CD8 T細胞はmTORC1経路が活性化する

近年、mTORC1シグナル経路は細胞内エネルギー代謝酵素の活性や発現を制御することが知られている。そこで、代謝関連酵素の発現におけるmTORC1シグナル経路の役割についてmTOR阻害剤ラパマイシンを用いて検討した。この結果、ラパマイシン処理したMenin欠損CD8 T細胞では、Meninの欠損によって増加するGlsやAsnsのmRNA発現が減少した。

以上の結果から、Menin欠損活性化CD8 T細胞では、Akt/mTORC1シグナル経路の過剰な活性化による代謝関連酵素の発現増加が細

胞内エネルギー代謝亢進の一因であると考えられる。

(2) 細胞内エネルギー代謝調節による T 細胞老化制御

我々はこれまでに、Menin が末梢 T 細胞老化に対して抑制的に働くことを見出している。具体的には、Menin 欠損 CD8 T 細胞では、野生型と比較し、抗原刺激後の早期の細胞増殖の低下、CD27/CD62L 分子の発現低下、抑制性受容体 (PD-1, TIM3, KLRG1) の発現上昇、senescence-associated secretory phenotype (SASP) 因子 (オステオポンチン、IL-6) の発現増加、senescence-associated β -galactosidase (SA β -gal) 活性の上昇など老化 T 細胞に特徴的な表現型を示すことを見出している。本研究項目では、Menin 欠損 CD8 T 細胞で認められる T 細胞老化における細胞内エネルギー代謝の役割について検討した。はじめに、Akt/mTORC1 経路の活性化が Menin の欠損によって誘導される T 細胞老化に関与するかについて、ラパマイシンを用いて検討した。この結果、ラパマイシン処理した Menin 欠損 CD8 T 細胞で、CD27/CD62L 分子の発現低下、抑制性受容体の発現上昇、SASP 因子の発現誘導、SA β -gal 活性上昇が部分的に阻害された。これらの結果から、Akt/mTORC1 シグナル経路は Menin 欠損 CD8 T 細胞で誘導される早期の T 細胞老化に関わることが明らかとなった。次に、Menin 欠損 CD8 T 細胞で認められる T 細胞老化におけるグルタミン代謝の役割についてグルタミン代謝阻害剤 6-Diazo-5-oxo-L-norleucine (L-Don) とアミノ基転移阻害剤アミノオキシ酢酸 (AOA) を用いて検討をおこなった。この結果、L-Don や AOA 処理することで、Menin 欠損 CD8 T 細胞で誘導される T 細胞老化の形質が部分的に回復した。これらの結果から、グルタミン代謝経路は活性化 CD8 T 細胞の老化誘導と運命決定に重要な役割を担うことが示された。

(3) T 細胞エネルギー代謝調節による免疫機能制御方の確立

T 細胞代謝調節による免疫機能制御の可能性についてマウス抗腫瘍モデルを用いて検討した。これまでの基礎研究から、T 細胞特異的 Menin 欠損マウスは野生型マウスに比べ、抗腫瘍活性の低下が生じることを確認している。そこで、T 細胞特異的 Menin 欠損マウス腫瘍モデルにラパマイシンのアナログであるエベロニムスを連日経口投与し検討をおこなった。この結果、Menin 欠損マウスで認められる抗腫瘍活性の低下は、エベロニムスの投与により部分的に回復した。

以上の結果から、活性化 CD8 T 細胞において Menin は Akt/mTORC1 シグナル経路を負に制御すること、Menin の欠損による Akt/mTORC1 シグナル経路の過剰な活性化はグルタミン代謝や解糖系を亢進させること、細胞内エネルギー代謝の過剰亢進が CD8 T 細

胞老化誘導の一因となることが明らかとなった (論文投稿中) (図 2)。

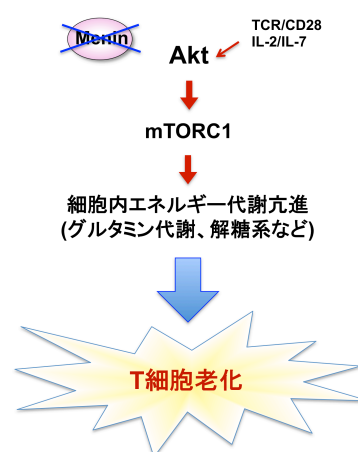


図 2 Menin の欠損は Akt/mTORC1 シグナル経路の活性化を介して T 細胞老化を誘導する

(4) 成果の国内外における位置づけとインパクト

これまでに、T 細胞エネルギー代謝研究は解糖系を中心におこなわれてきた。申請者らは、細胞老化の特徴が早期に誘導される Menin 欠損 CD8 T 細胞では解糖系に加え、グルタミン代謝が亢進していることに着目して研究を行った。この結果、グルタミン代謝を調節することで Menin の欠損によって誘導される T 細胞老化の形質が部分的に回復することが明らかとなった。この研究成果はこれまでに国内外で報告されておらず、グルタミン代謝調節により T 細胞老化が制御可能である新規の知見を得ることができた。

(5) 今後の展望

近年、細胞内エネルギー代謝と T 細胞機能との関係が明らかになりつつある。本研究過程において、細胞内エネルギー代謝調節、特にグルタミン代謝を調節することで、Menin 欠損 CD8 T 細胞で認められる T 細胞老化を制御可能であることを見出した。最近、細胞内エネルギー代謝の中間代謝産物がエピジェネティック関連酵素の基質や補因子として働くことが報告されている。このため、細胞内エネルギー代謝が亢進している Menin 欠損 CD8 T 細胞では、これら中間代謝産物量の変化が生じ、それに伴いエピジェネティック状態も変化していることが予想される。本申請研究では、Menin 欠損 CD8 T 細胞のエピゲノム状態の詳細を明らかにしていない。今後、細胞内エネルギー代謝状態の変化と T 細胞老化のエピゲノム誘導機構を明らかにすることで、T 細胞における代謝・転写両経路の統合的な理解したいと考えている。

また、本申請研究では、グルタミン代謝阻害剤を用いた免疫機能制御の可能性を抗腫瘍マウスモデルで評価していない。今後、マウスに投与可能な阻害剤を入手し、これを用いて検討することで免疫老化に伴って誘導される老化関連疾患防止のための新規方法

論の提唱を目指す。

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)

① Suzuki J., Maruyama S., Tamauchi H., Kuwahara M., Horiuchi M., Mizuki M., Ochi M., Sawasaki T., Zhu J., Yasukawa M., Yamashita M. Gfil, 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

② 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.

③ 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⁺ 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4件)

① 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)

② 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).

③ 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).

④ 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).

[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

鈴木 淳平 (Suzuki, Junpei)

愛媛大学・大学院医学系研究科・助教 (特定教員)

研究者番号 : 20734239

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

安川 正貴 (Yasukawa, Masaki)

山下 政克 (Yamashita, Masakatsu)