

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08762

研究課題名(和文) 脂肪酸によるアロ反応性T細胞のヒストン修飾及びエフェクター活性の制御

研究課題名(英文) Lipid-derived acetyl-CoA promotes lipid-specific gene expression in alloreactive T-cells

研究代表者

佐藤 一也 (Sato, Kazuya)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：60382917

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)：-ブチロベタイン水酸化酵素(BBOX-1)ノックアウトマウスを用いた移植片対宿主病モデルを利用して脂質ミトコンドリア輸送の阻害がドナーT細胞のエフェクター活性、エネルギー合成、及びヒストン修飾に与える影響を解析したが、野生型マウスと比較して統計学的に有意な違いはなかった。抗原提示によって活性化T細胞では脂肪酸の取り込み及び脂質ミトコンドリア輸送が亢進するが、脂質欠乏条件下において解糖やグルタミンオリシスといった他の代謝機構が脂肪酸代謝を代償可能であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

移植片対宿主病は造血幹細胞移植後の難治性合併症の一つであり、副腎皮質ステロイド不応例に対する治療は早期に解決すべきアンメット・メディカル・ニーズの一つである。研究の成果により、移植後のドナーT細胞において細胞外脂質の取り込みと脂肪酸代謝が亢進していることが再現性をもって確認され、単一の脂肪酸代謝経路の阻害は他の代謝機構により代償されるものの、デュアル阻害剤の創製による将来的な治療開発の可能性が示された。また、脂質ミトコンドリア輸送の律速経路であるCPT-1の阻害が奏効を示すことが報告されているが、少なくとも一部の知見は阻害剤によるオフターゲット効果を反映していた可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：To evaluate the role of mitochondrial fatty acid transport in donor effector T-cells after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, we generated -butyrobetaine hydroxylase (BBOX-1) knockout mice using CRISPR-Cas9 technique. There were no significant differences in effector function, energy metabolism, and histone modifications in donor T cells between wild-type and BBOX-1knockout mice. This suggests that although antigen presentation enhances extracellular fatty acid uptake and subsequent mitochondrial transport in activated T cells, other metabolic pathways such as glycolysis and glutaminolysis may compensate for fatty acid metabolism under lipid-depleted conditions.

研究分野：血液学

キーワード：造血幹細胞移植 移植片対宿主病 脂肪酸代謝 ヒストン修飾 アセチル化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

移植片対宿主病 (GVHD) は造血幹細胞移植後の難治性合併症の一つであり、副腎皮質ステロイド不応例の予後はきわめて不良である。近年、T細胞は分化、増殖、及び活性化に応じてエネルギー代謝経路を切り替えていることが知られ、代謝リプログラミングを標的とした治療戦略が注目を浴びている。申請者は造血幹細胞移植後のドナーT細胞の代謝動態を解析し、アロ反応性T細胞では細胞外からの脂肪酸の取り込みと脂質ミトコンドリア輸送が亢進しており、脂肪酸を利用した酸化的リン酸化がエネルギー産生の中心的役割を担っていることを見いだした。脂肪酸輸送の阻害によって炎症性サイトカインの産生が低下することから、脂肪酸はエネルギー代謝のみならず、エフェクター活性の誘導に関与していることが示唆された。しかしながら、脂肪酸が炎症性サイトカインの誘導に関わる転写因子の誘導にどのように関わっているかは不明であった。

2. 研究の目的

癌細胞のアセチル化ヒストンの大部分は脂肪酸に由来することが報告されており、脂肪酸代謝が癌の発生及び進展に重要な役割を担うことが報告されている (McDonnell et al, *Cell Rep* 2016)。一方、エフェクターT細胞において脂肪酸がタンパク質の翻訳後修飾に与える影響は良く分かっていない。長期にわたり、脂肪酸は細胞膜の脂質二重層を構成する単なるマトリックスにすぎないと考えられていたため、遺伝子制御に関わる生物学的な役割が報告されるようになったのはごく最近であり、アロ反応性T細胞の脂肪酸代謝とエピジェネティクス制御を対象とした研究の報告はない。以上の背景から、脂肪酸由来のアセチル CoA が、エフェクター遺伝子のアセチル化ヒストンの主要なカーボンソースになっていると仮説を立て、動物モデルでの検証を行いたいと考えた。脂肪酸代謝がエフェクターT細胞のヒストン修飾に与える影響をあきらかにすることで、移植後GVHDを含む免疫疾患に対する病態解明に役立てたいと考えた。

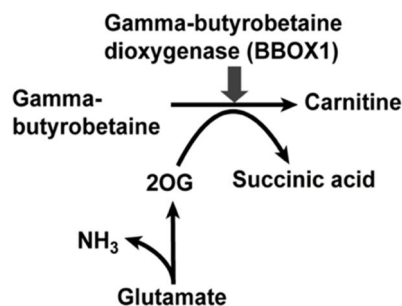
3. 研究の方法

(1) ヒト異種GVHDモデルの作成

非致死量の全身放射線照射を行った高度免疫不全マウス (NOG マウス) にヒトT細胞を輸注し、ヒト異種GVHDモデルを作成した。このモデルでは移植後二週間程度から同種免疫反応が惹起され、脱毛、下痢、歩行障害といった諸症状を示し、三週間以内にほぼ全てが死亡することを確認した。

(2) カルニチン合成酵素 (BBOX1) ノックアウトマウスの作成

長鎖脂肪酸の輸送とそれに引き続く酸化の律速酵素であるカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ-1 (CPT-1) の阻害剤は選択性が低く、オフターゲット効果を示すことが知られている。そこで申請者は、脂質ミトコンドリア輸送に必須であるカルニチンの生合成を触媒する γ -ブチロバタイン水酸化酵素 (BBOX-1) を CRISPR-CAS9 の系で欠損させた高度免疫不全マウスを作成した (図右、以下 BBOX-1 KO マウス)。カルニチン欠乏食で飼育することで、マウスの組織及び血清中のカルニチンはほぼ完全に枯渇し、移植した白血病細胞の長鎖脂肪酸のミトコンドリア輸送を阻害させることができる。実験にあたり、一週間前よりカルニチン欠乏食に切り換えることで、血漿中のカルニチン濃度が著しく低下することを確認した。



(3) 脂肪酸代謝がドナーT細胞のヒストン修飾及びエフェクター活性に与える影響の評価

野生型または BBOX-1 KO マウスをレシピエントとしてヒト異種GVHDモデルを作成し、GVHDの重症度及びマウスの生存を比較した。ヒトT細胞輸注後より1~2週間後にマウスを解剖し、臓器よりヒトT細胞を分取して、分子生物学的手法を用いてエフェクター活性及びヒストンアセチル化を調べた。

4. 研究成果

BBOX-1 KO NOG マウスをレシピエントとして異種移植を行うと、移植後早期からマウスは活動性の低下と進行性の体重減少を示し、野生型マウス (及び BBOX-1 ヘテロマウス) と比較して有意に生存期間が短縮した。抗原提示によって活性化されたT細胞は、in vitroにおいて、細胞外

からの長鎖脂肪酸の取り込み、酸化、及び脂質ミトコンドリア輸送の亢進を示す。カルニチン欠乏条件では脂質利用の低下によって ATP 産生の低下や代謝中間体の欠乏をきたし、T 細胞のエフェクター活性が減弱するため、移植した BBOX-1 KO マウスの生存は延長すると予想していたが、仮説に反する結果であった。一方、脱毛や姿勢の変化といった GVHD に典型的な諸症状には乏しく、解剖した臓器を比較すると、ヒト T 細胞の浸潤の程度は野生型と BBOX-1 KO マウスとで大きな違いがなかった。また、臓器から分取したヒト T 細胞はいずれも同程度の細胞増殖、分化、及び細胞障害活性を示した。そこで、全身放射線照射を行わず、移植前処置を省いた GVHD モデルを作成したところ、BBOX-1 KO マウスの生存は延長し、野生型との生存期間の違いはみられなくなった。L-カルニチンは放射線照射による酸化ストレスに対して抗酸化作用を示すことから、非致死量の少量放射線照射 (250cGy) であっても BBOX-1 KO マウスは高度の臓器障害をきたし、マウスの生存に影響を及ぼした可能性が考えられる。非照射条件では脂肪酸輸送の阻害がマウスの生存に影響しないことから、生体内においては、解糖やグルタミンオリシスといった他の代謝機構が脂肪酸代謝を代償し、エネルギー合成を維持している可能性が示唆された。但し、細胞外フラックス解析を用いて比較したところ、BBOX-1 KO マウスに移植したヒト T 細胞で細胞外酸性化速度及び酸素消費速度が高い傾向を示したものの、統計学的な有意差はなく、仮説は検証できなかった。以上の結果は *in vitro* における既知の報告と大きく乖離しており、これまで報告された活性化 T 細胞における脂肪酸代謝の知見の一部は CPT-1 阻害剤のオフターゲット効果を反映していた可能性が改めて示された。

レシピエントマウスに MHC を欠損した NOG マウスを用いて異種 GVHD モデルを作成すると、ドナー T 細胞における長鎖脂肪酸の取り込みは野生型と比較して有意に低下し、それに相関して細胞分裂速度の低下 (細胞透過性色素の減弱) がみられ、*in vitro* と同じく、脂肪酸がドナー T 細胞の細胞増殖を促進することは動物実験でも示された。エネルギー合成における役割が限定的であるとすると、脂肪酸は細胞骨格の形成のほか、翻訳後修飾に促進的に関与している可能性が示唆された。そこで、移植したマウスから T 細胞を分取し、ヒストン (H3, H4) のアセチル化をウエスタンブロット法で比較したが、野生型と BBOX-1 KO マウスとで差は見られなかった。異種移植モデルでは CD4 陽性 T 細胞が GVHD の中心的役割を担うため (Kawasaki et al, Biol Blood Marrow Transplant. 2018)、CD4 陽性 T 細胞を分取して同様の実験を行ったが、結果は同様だった。一方、カルニチン除去条件として透析血清含有培地で T 細胞に活性化刺激を加えると、少なくとも一週間にわたり、通常血清を含む培地で培養した場合と同程度の増殖を示し、内因性のカルニチンにより CPT の代謝活性が維持される可能性が示唆された。近交系マウスを用いた同種移植モデルと比較して異種移植モデルは早期より重度の GVHD を発症するため、マウスの解剖及びドナー T 細胞の採取は移植後早期に行ったものの、ヒストン修飾のわずかな差異を見いだすには条件が不十分だった可能性がある。移植片のカルニチンを十分に枯渇させ、細胞内の脂質ミトコンドリア輸送をより確実に抑制するべく、移植条件には更なる工夫を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	森田 薫 (Morita Kaoru) (20813223)	自治医科大学・医学部・助教 (32202)	
研究分担者	神田 善伸 (Kanda Yoshinobu) (30334379)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	
研究分担者	遠藤 仁司 (Endo Hitoshi) (50221817)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	

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