

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08799

研究課題名（和文）トランスオミクス解析によるSLE B細胞の代謝制御機構解明とFAM167Aの関与

研究課題名（英文）Investigation of metabolic regulation and role of FAM167A in SLE B cells using trans-omics analysis

研究代表者

岩崎 由希子（Iwasaki, Yukiko）

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・客員研究員

研究者番号：30592935

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、全身性エリテマトーデス(SLE)のGWAS SNPでありB細胞において比較的特異的な発現を認め、かつeQTL効果が判明しているものの、機能未知であるFAM167Aの機能解明を端緒として開始した。本分子の関与が想定される刺激条件下で生じる代謝変容を記述するため、B細胞株を用いて時系列オミクスデータを取得するための基礎データ取得を行った。酸化リン酸化を指標とした検討を経てメタボローム解析により刺激後数時間の段階から代謝変容が生じ、これまで申請者が同定していた抗体産生細胞分化に重要と考えられるアミノ酸の、刺激による変動も確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年immunometabolism、免疫代謝研究は注目されており、免疫担当細胞の代謝環境の制御と機能に密接に関連があることが知られるようになった。こうした研究の潮流に伴い、ヒト血清を用いたメタボローム解析も盛んにおこなわれるようになってきているが、血清中の代謝産物と血球内で生じている代謝変容の関連性を議論するには未だ基礎的研究における知見の蓄積が不十分である。本研究では、既にSLEの血清メタボローム解析と免疫担当細胞のトランスクリプトーム解析の統合解析の結果から得られた知見から、B細胞の抗体産生細胞分化時の代謝変容過程のより詳細な解明を目指し、アミノ酸の重要性を同定したことに学術的意義がある。

研究成果の概要（英文）：This study started to elucidate the function of FAM167A, a GWAS SNP for SLE, which has relatively specific expression and eQTL effects in B cells, but whose function is unknown. To elucidate the metabolic regulation in B cells under such a condition that this molecule is assumed to be involved, basic data acquisition was performed to acquire time-series omics data using B cell lines. Through analysis on metabolic status using oxidative phosphorylation as an index, metabolomics revealed that metabolic regulation occurred and some amino acids, that were identified by the applicants and suggested to be important for differentiation of antibody-producing cells, fluctuated several hours after stimulation.

研究分野：免疫学

キーワード：全身性エリテマトーデス 免疫代謝 B細胞 アミノ酸 I型インターフェロン 自然免疫シグナル トランスオミクス解析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス(Systemic Lupus Erythematosus; SLE)は、代表的な自己免疫疾患の一つで、主に核抗原に対する自己抗体により多臓器に亘り炎症が持続し得る難病である。

SLE のゲノミクスでは、全ゲノムシーケンス (whole genome sequence(WGS))の技術革新により、新しい single nucleotide polymorphisms (SNPs)の報告が続き、genome wide association study (GWAS)から 52 を超える疾患感受性遺伝子が報告されている。これら遺伝子解析から生じるビッグデータが SLE の病態解明にもたらした貢献は多大である。SLE の遺伝的多様性の影響は 15%前後と言われており (*Rheumatology*. 2017;56:i78), Human Leukocyte Antigen (HLA) Class II 遺伝子の関連は強く、*HLA-DRB1*03:01 (HLA-DR3)*, *HLA-DRB1*15:01 (HLA-DR2)*は SLE の疾患感受性遺伝子として知られる。HLA 領域以外の SNPs において、複数の GWAS のメタ解析の結果から、注目すべき genotype の遺伝子群のうち、自然免疫系関連では、12%が NF- κ B signaling, 13%が TLR と type I IFN 関連 signaling, 3%が DNA や RNA の分解, 2%が補体活性化と貪食能(phagocytosis), 2%が好中球と単球 signaling に関連し、適応免疫系関連では、4%が B 細胞 signaling, 11%が T 細胞 signaling, 11%が B 細胞と T 細胞双方の signalingに関連しており、4%が炎症惹起に向かう過程に、1%が抗炎症過程に関与していることが報告されている (*Autoimmunity Reviews*. 2018;17:553)。これらの遺伝学的背景から、SLE の病態形成には自然免疫と適応免疫の双方が関連していると考えられる。一方で、これらの遺伝子の疾患感受性への影響は、odds ratio (OR)が 1.01 程度から、高くても 2.5 程度であることが知られており、環境因子も含めた複雑な制御系の上に疾患発症・維持機構が成立しているものと考えられる。GWAS はあくまでも遺伝型と表現型を統計学的手法により相関関係として示すことを可能にするもので、生化学的相互作用を証明することはできない。

近年、免疫学の分野では免疫代謝(immunometabolism)の領域の研究が進み、主に T 細胞を中心として分化や活性化により細胞の代謝が変容し、それが細胞の機能にとって重要であることが報告されてきている。また、個々の免疫担当細胞において、セントラルドグマを通じて最終的に代謝リプログラミングという表現型に至り特定の機能をもつ細胞集団として特徴づけられる側面以外に、代謝産物が環境因子(例えば細胞外のグルコース量やアミノ酸バランスの変動)として免疫担当細胞機能を調節するという制御も行われており(*Nat Rev Immunol*. 2020;20:55)、遺伝子発現と代謝リプログラミングは一方向性ではなく、連関して動いているシステムである。この複雑な機構の詳細は未だ十分に解明されておらず、その新たな解析手法と共に今後の発展が望まれる分野であり、より生物学的・生化学的な免疫担当細胞の機能制御が明らかになることが期待されている。

2. 研究の目的

(1) SLE の GWAS SNPs の一つであり、B 細胞において比較的特異的発現を認めかつ eQTL (expression Quantitative Trait Locus)効果をもつものの、機能未知である FAM167A に着目。FAM167A 遺伝子欠損マウス(以下 FAM167A KO マウス)を用いて in vitro による機能解析を行うことにより、本分子が B 細胞の機能調節に関わっているメカニズムを解明する。また、その解析手法として、トランスオミクス解析手法を適応することで、因果関係を推定し、病的な B 細胞分化への道筋を解明する。

(2) 既に申請者らの SLE 患者と健常人を対象としたトランスクリプトーム解析の先行研究により、SLE の病態形成にとって B 細胞の抗体産生細胞(Plasmablast; PB)分化におけるミトコンドリア機能調節、すなわち代謝制御の重要性が示された。特に SLE 患者 B 細胞において適応免疫シグナルの代表である I 型インターフェロン(type I IFN)と自然免疫シグナルの代表である Toll-like receptor (TLR)9 (1 本鎖 DNA を認識)のシグナルの重要性が示唆されており、これらのシグナルにより生じる代謝制御機構をトランスオミクス解析の手法を用いて解明する。

3. 研究の方法

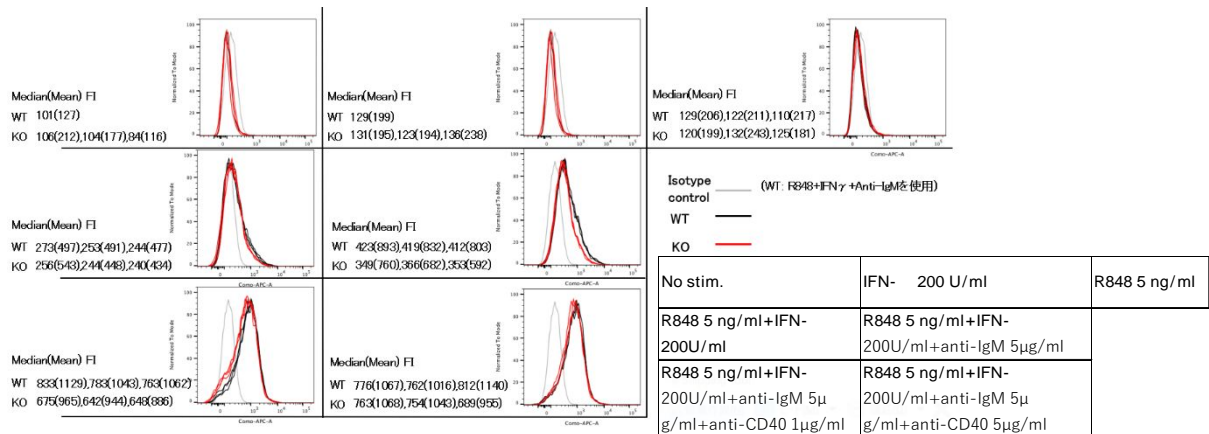
(1) FAM167A KO マウスおよび野生型(wild type: WT)マウス脾臓より B 細胞を精製し、各種抗体産生細胞分化誘導に至る刺激系を検討した。具体的には、特に SLE の病態を考える上で重要な核酸抗原を認識する TLR7 や TLR9 を介した刺激を中心に、B 細胞受容体、IFN- の複数のコンビネーション刺激を行い、着目していた転写因子の発現や抗体産生能に対しての FAM167A の関与を検討した。

(2) ヒト B 細胞株である Ramos B cell line(以下 Ramos B cell)を実験に用いて、TLR9 および IFN- 刺激による代謝変容機構の解明を行う。尚、Ramos B cell は、Epstein-Barr Virus 陰性の白人男児 Burkitt's lymphoma 由来の B 細胞株で、胚中心(Germinal Center: GC)を構成する B 細胞と似ているとされる。オミクス階層を取得するための適切な時系列ポイント選定のため、Flux Analyzer を用いて細胞の代謝状態の変化時点を推定した。

4. 研究成果

(1) 申請者らの SLE 患者の免疫担当細胞トランスクリプトーム解析の結果からは, FAM167A と発現相関のある転写因子として T-bet が挙げられた. T-bet 誘導因子として既知である TLR7 や IFN- の刺激を用いて, FAM167A 遺伝子欠損 B 細胞における T-bet 誘導能を検証した. 野生型 (WT) 及び FAM167A KO マウス脾臓より B 細胞を精製し, 3×10^5 cells/well (96well) で 48 時間刺激を行った. T-bet の発現は, 蛍光標識された特異抗体を用いてフローサイトメーターにて評価した. 図 1 に示すように, TLR7+IFN- +BCR 刺激下で FAM167A 遺伝子欠損により T-bet の発現が低下する傾向がわずかに認められたが, 同条件下における培養上清中の各種免疫グロブリンの産生量にはいずれの刺激条件下でも WT と FAM167A KO 間の有意差を認めなかった. これらの実験検討を複数回行った結果, FAM167A 遺伝子欠損による B 細胞の抗体産生に対する影響は極わずかであり, FAM167A の B 細胞における機能解明をトランスオミクス解析により行うことは難しいと判断した.

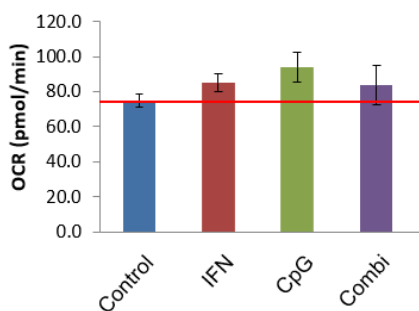
図 1 Splenic B cell 刺激による T-bet 発現の検討



(2) T 細胞非依存性の刺激により抗体産生細胞分化に至る経路の解明

ヒトないしマウス primary B cell を, IFN- と TLR9 のコンビネーション刺激で 48~72 時間培養することで, 細胞表面抗原染色や培養上清中の抗体測定の結果から, 抗体産生細胞分化に至ることがわかっている. トランスオミクス解析を施行するにあたっては, 刺激時間が長くなった場合に, トランスクリプトーム階層, メタボローム階層, リン酸化プロテオーム階層等の時系列の変化の解釈が困難になることから, まずは 24 時間以内に起きる各オミクス階層の変化をとらえることに注目することとした. また, 各階層の解析に必要な細胞数を時系列時点毎に用意するうえで, primary B cell を使用した実験系は現実的でないことから, Ramos B cell を使用することとした. IFN- 1000 U/ml, CpGODN2006(TLR9 刺激) 0.1µM, IFN- +TLR9 刺激を 24 時間与えた Ramos B cell を MitoStress Kit を用いて Flux Analyzer にて代謝状態を検証した. 図 2 に示すように, いずれの刺激においても酸素消費量(Oxygen Consumption Rate: OCR)の

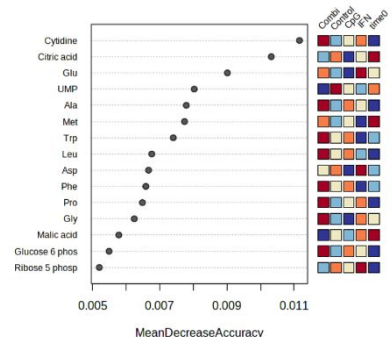
図 2 各刺激下 24 時間における max. OCR



変化がみられ, 24 時間の時間経過の中で代謝状態の変遷が起きていることが示唆された. 更に時系列で OCR の変化を細かく追うことで, 刺激開始後から X 時間後に代謝状態の変化点があることが判明した(data not shown). このことから, まずは X 時間後における細胞内代謝産物の変化につき, トランスオミクス解析を開始する手がかりとして測定した. 図 3 に示すように, 時間経過と刺激の種類により弁別し有用と思われる代謝産物候補が同定された. 現在更に複数の時系列での測定を検討中である.

図 3 X 時間における代謝変化

IFN- と TLR9 のコンビネーション刺激がどのように代謝変容をもたらすのかは今後の検討課題であるが, NAD+/NADH 比の測定系においてコンビネーション刺激特異的に変化を認めることから (data not shown), ミトコンドリアの機能変調を介している可能性を考えている.



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 Yukiko Iwasaki*, Yusuke Takeshima, Masahiro Nakano, Mai Okubo, Mineto Ota, Akari Suzuki, Yuta Kochi, Tomohisa Okamura, Takaho Endo, Ichiro Miki, Kazuhiro Sakurada, Kazuhiko Yamamoto, Keishi Fujio	4. 巻 62
2. 論文標題 Combined plasma metabolomic and transcriptomic analysis identify histidine as a biomarker and potential contributor in SLE pathogenesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 905-913
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/rheumatology/keac338	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
研究協力者	柚木 克之 (Yugi Katsuyuki)	理化学研究所生命医化学研究センター・統合細胞システム研究チーム・チームリーダー	

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