

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20770

研究課題名(和文) SアデノシルメチオニンのBリンパ球分化・活性化での機能の解明

研究課題名(英文) Roles for S-adenosylmethionine in B cell differentiation and activation

研究代表者

加藤 浩貴 (Kato, Hiroki)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50801677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：Bリンパ球異常は自己免疫疾患などの発症に関わる。その正常造血に必要な遺伝子発現調節にはエピゲノム修飾が関わる。S-アデノシルメチオニン(SAM)は、代表的なエピゲノム修飾の一つメチル化修飾に必要なメチル基の主な供与体であり、Bリンパ球分化に関わりうる。しかし、Bリンパ球造血にSAMがどう関わるか詳細は未解明である。本研究では、独自のマウスモデルを駆使してBリンパ球でのSAMの重要性の解明を行った。その結果SAM合成がBリンパ球初期分化に必要なことが明らかとなった。今後本機序をさらに究明することで、これまで未解明であったSAM代謝によるBリンパ球分化制御機構が解明されることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Bリンパ球の異常は自己免疫疾患や白血病など治療の難しいさまざまな疾患の発症に関わる。これまでこれらの疾患の克服に向けて、遺伝要因の解明が精力的に行われてきたものの、これらの疾患は依然として難治性である。環境要因がBリンパ球造血にもたらす影響の解明が急務である。我々は、環境要因の一つとしての栄養(メチオニン)の代謝がBリンパ球造血に重要である可能性について研究を積み重ねている。今回、メチオニンからのSアデノシルメチオニンの合成が生体内Bリンパ球造血に必要なことをはじめて明らかにできた。本機序のさらなる解明が、上記疾患の克服につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Disorders of B cell differentiations and activations can be related to several diseases including autoimmune disorders. For its proper differentiations and activations, epigenetic modifications should possess significant roles. S-adenosylmethionine (SAM) is inevitable for epigenetic modifications as a principle methyl donor, suggesting its important roles for B cell biology. However, still little is known for the importance of SAM in B cell biology, especially in vivo. In this study, we revealed that SAM synthesis is necessary for proper B cell differentiation in its early stage in vivo by using several mouse models. Further investigation of this mechanism will help us understand the unknown mechanisms in B cell biology controlled by the SAM metabolism.

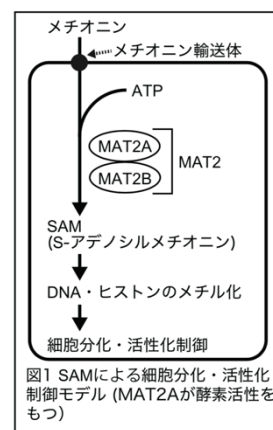
研究分野：メチオニン代謝の造血における役割の解明

キーワード：Bリンパ球造血 エピゲノム メチオニン代謝 Sアデノシルメチオニン

1. 研究開始当初の背景

Bリンパ球は抗体産生を担う細胞であり、獲得免疫の一つである液性免疫に必須の細胞である。その異常は難治性疾患のひとつである自己免疫疾患の発症に直接関わっている。この自己免疫疾患の発症には遺伝要因と環境要因が関与すると考えられている。網羅的ゲノム解析技術の普及で遺伝要因の解明が進んだが、遺伝要因の理解だけでは自己免疫疾患の発症予測も治療もいまだに難しい。環境要因がいかにBリンパ球の異常を引き起こすのか、この理解の重要性が改めて認識されてきている。環境要因は、細胞の代謝を変化させ、これがDNAやヒストンのエピゲノム修飾変化を促し、Bリンパ球の機能異常を誘発する可能性がある。しかし、Bリンパ球の(前駆細胞から成熟細胞への)分化や(抗原やサイトカイン刺激による)活性化でのエピゲノム修飾の意義には不明な点が多い。

我々は環境要因の一つである栄養に着目し、なかでもエピゲノム修飾に直接関与するメチオニンの代謝に注目している。メチオニンは酵素MAT2 (MAT2AとMAT2Bの複合体)でS-アデノシルメチオニン (SAM) に代謝される。SAMはDNAやヒストンのメチル化に必要なメチル基の主な供与体で、細胞のエピゲノム修飾に関わる (図1)。しかし、Bリンパ球の分化や活性化でのSAMの意義はほとんど不明であった。我々のこれまでの知見からは、SAMの量的変動がBリンパ球の活性化を支え、その障害が自己免疫病態を改善しうると考えられるが、Bリンパ球の分化や活性化にSAMの量的変動がどう関わるか、その具体的な動態と機序は不明であった。



2. 研究の目的

本研究では、(1) Bリンパ球の分化や活性化にSAMがどう関わるか、(2) 自己免疫疾患の治療に最適なSAM合成阻害剤は何か、を明らかにすることを本研究の目的とした。本目的達成のための具体的な方法は下記に記述する。

3. 研究の方法

(1) Bリンパ球の分化や活性化にSAMがどう関わるか

我々のこれまでの知見からは、Bリンパ球の分化や活性化にSAMが必要である可能性は高い。しかし、“どの段階で” “なぜ” SAMが必要か不明である。そこで我々は、Bリンパ球特異的にSAM合成酵素を欠損させたマウスを作成した。本マウスにおいて、骨髄や脾臓のBリンパ球数が著減することを発見した。これはBリンパ球の分化や活性化にSAMが必須であることを強く示唆する所見であった。そこで、本研究では、野生型マウスとBリンパ球特異的SAM合成酵素欠損マウスの表現型を比較することで、

SAM 合成障害が B リンパ球の分化や活性化に影響を与える段階を明らかにし、その機序を解明する。さらに、SAM の量的変動が B リンパ球に与える影響を経時的に明らかにすべく、造血細胞特異的な誘導型 SAM 合成酵素欠損マウスも作成し活用する。

(2) 自己免疫疾患の治療に最適な SAM 合成阻害剤は何か

我々がこれまでに生体で効果を確認した SAM 合成阻害剤は有効濃度に限界があり、臨床応用にはより高力価の阻害剤が必要であると考えている。効率的な阻害剤の同定には、細胞内 SAM 濃度の簡便な測定系が有用である。我々は、MAT2A mRNA の非翻訳領域にある SAM 感受性領域 (SAM 濃度が低い時に安定化する領域) を用いた発光解析で SAM 濃度をモニター可能な測定系を構築しており、化合物ライブラリーに対しスクリーニングを行い、阻害剤を同定する。一方、MAT2B はその C 末端で MAT2A に結合しその機能を支持する。そこで、ペプチドミメティクス技術で MAT2B の C 末端の類似構造を有する分子化合物を薬学部と連携して合成し、MAT2A と MAT2B の結合阻害による SAM 合成阻害剤を開発する。自己免疫疾患で異常に活性化した B リンパ球では正常 B リンパ球と比べ SAM の需要が高まっている可能性が高く、SAM 合成の適度な阻害により異常な B リンパ球を選択的に抑制できると期待される。

4. 研究成果

(1) B リンパ球の分化や活性化に SAM がどう関わるか

まず、B リンパ球の各分化段階における MAT2A の発現変化を明らかにするために、野生型マウスから各分化段階の B リンパ球 (pre pro-B, early pro-B, late pro-B, pre-B, immature-B, mature-B) をそれぞれ分取し、RT-PCR で MAT2A の発現量を解析した。その結果、大変興味深いことに、MAT2A の発現量は最も幼若な B リンパ球である pre pro-B から early pro-B への分化時に誘導され、その後徐々に低下傾向を示すことが明らかとなった。すなわち、MAT2A は B リンパ球の初期分化時にその発現誘導が起きることが明らかとなった。研究開始当初、MAT2A は成熟した B リンパ球において特に重要であることを予想していたが、本解析結果からは、B リンパ球の初期分化において、より MAT2A や SAM 合成が重要である可能性が示唆された。

次に、B リンパ球特異的 SAM 合成酵素欠損およびホモ欠損マウス、さらに薬剤誘導的かつ造血細胞特異的に SAM 合成酵素ヘテロ欠損またはホモ欠損可能なマウスの表現型の解析を行った。どちらのマウスにおいても、野生型と比較した場合、SAM 合成酵素のヘテロ欠損では、B リンパ球造血において明らかな変化は認められなかった。このことから、SAM 合成酵素のヘテロ欠損が B リンパ球造血に与える影響は限定的であると考えられると同時に、標的遺伝子欠損を誘導するための Cre リコンビナーゼの存在自体は、少なくとも解析対象において有意な影響は与えていないと考えられた。一方で、どちらのマウスにおいても SAM 合成酵素のホモ欠損では B リンパ球造血が障害される所見を得た。このことから、B リンパ球造血においては、細胞自律的な SAM 合成が必要であり、比較的短期間のあいだでも SAM 合成が障害されると、B リンパ球造血に決定的な

障害が起きると考えられた。なお、これらのマウスにおいて、SAM 合成酵素のホモ欠損により SAM 合成酵素の活性が実際に落ちていることは、質量分析による代謝物測定で確認している。

さらに、B リンパ球分化のどの時点で SAM 合成が重要か明らかにするために、B リンパ球特異的 SAM 合成酵素ホモ欠損マウスを用いた解析を行った。その結果、B リンパ球特異的 SAM 合成酵素ホモ欠損マウスでは、野生型マウスと比較して、pre pro-B 細胞数が増加し、early pro-B 以降の細胞数が顕著に低下していた。前述の SAM 合成酵素発現量変化とあわせて考えると、SAM 合成は pre pro-B が early pro-B に分化する際に必要と考えられた。この機序を明らかにするために、野生型および B リンパ球特異的 SAM 合成酵素ホモ欠損マウスから pre pro-B および early pro-B を分取し、網羅的遺伝子発現解析を実施した。その結果、B リンパ球特異的 SAM 合成酵素ホモ欠損マウスの early pro-B においては、野生型 pre pro-B が early pro-B に分化する際に誘導される遺伝子群のうち、特異的に誘導されない遺伝子群があることがわかった。大変興味深いことに、このような遺伝子群には、多様な抗体産生に必要な B リンパ球のレセプター遺伝子再構成に関わる遺伝子が多数認められた。このことから、B リンパ球のレセプター遺伝子の再構成において適切な SAM 合成が必要であると考えられた。さらに、SAM 合成酵素の欠損に伴う広範な遺伝子発現変化に対して生物学的な意義づけを行うために、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) を実施した。その結果、野生型マウスの B 細胞造血では pre pro-B から early pro-B への分化時に細胞周期チェックポイント機構に関わる遺伝子群の発現が誘導されているのに対し、これらの遺伝子群の発現が SAM 合成酵素の欠損した early pro-B では低下している所見を得た。このことから、SAM 合成酵素欠損により本来 pre pro-B から early pro-B にかけて誘導されるべき細胞周期がうまく誘導されていない可能性が考えられた。

以上の結果から、B リンパ球の初期分化において SAM 合成が必要であり、特に B リンパ球のレセプター遺伝子再構成や細胞周期の調節に重要である可能性が考えられた。

(2) 自己免疫疾患の治療に最適な SAM 合成阻害剤は何か

上記に記載の独自のスクリーニング技術を用いた SAM 合成阻害剤のハイスループットスクリーニングでは、残念ながら、未だに試験管内での細胞への投与実験で明らかな効果のある化合物の同定にはいたっていない。一方で、薬学部との連携により合成した新規化合物においては、複数の化合物において、細胞増殖を抑制する効果のある化合物を同定した。さらにこれらの化合物の効果に関する質量分析などを行うことで、実際に臨床応用可能な SAM 合成阻害剤の開発につなげていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Suzuki Chie, Fujiwara Tohru, Shima Hiroki, Ono Koya, Saito Kei, Kato Hiroki, Onodera Koichi, Ichikawa Satoshi, Fukuhara Noriko, Onishi Yasushi, Yokoyama Hisayuki, Nakamura Yukio, Igarashi Kazuhiko, Harigae Hideo	4. 巻 42
2. 論文標題 Elucidation of the Role of FAM210B in Mitochondrial Metabolism and Erythropoiesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biology	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） 10.1128/mcb.00143-22	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 Ikeda Masatoshi, Kato Hiroki, Shima Hiroki, Matsumoto Mitsuyo, Furukawa Eijiro, Yan Yan, Liao Ruiqi, Xu Jian, Muto Akihiko, Fujiwara Tohru, Harigae Hideo, Bresnick Emery H., Igarashi Kazuhiko	4. 巻 118
2. 論文標題 Heme-dependent induction of mitophagy program during differentiation of murine erythroid cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Experimental Hematology	6. 最初と最後の頁 21 ~ 30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.exphem.2022.11.007	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 Ochi Tetsuro, Fujiwara Tohru, Ono Koya, Suzuki Chie, Nikaido Maika, Inoue Daichi, Kato Hiroki, Onodera Koichi, Ichikawa Satoshi, Fukuhara Noriko, Onishi Yasushi, Yokoyama Hisayuki, Nakamura Yukio, Harigae Hideo	4. 巻 12
2. 論文標題 Exploring the mechanistic link between SF3B1 mutation and ring sideroblast formation in myelodysplastic syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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） 10.1038/s41598-022-18921-2	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 Ono Koya, Fujiwara Tohru, Saito Kei, Nishizawa Hironari, Takahashi Noriyuki, Suzuki Chie, Ochi Tetsuro, Kato Hiroki, Ishii Yusho, Onodera Koichi, Ichikawa Satoshi, Fukuhara Noriko, Onishi Yasushi, Yokoyama Hisayuki, Yamada Rie, Nakamura Yukio, Igarashi Kazuhiko, Harigae Hideo	4. 巻 12
2. 論文標題 Congenital sideroblastic anemia model due to ALAS2 mutation is susceptible to ferroptosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-022-12940-9	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 Sasaki Katsuyuki, Fujiwara Tohru, Ochi Tetsuro, Ono Koya, Kato Hiroki, Onodera Koichi, Ichikawa Satoshi, Fukuhara Noriko, Onishi Yasushi, Yokoyama Hisayuki, Miyata Toshio, Harigae Hideo	4. 巻 257
2. 論文標題 TM5614, an Inhibitor of Plasminogen Activator Inhibitor-1, Exerts an Antitumor Effect on Chronic Myeloid Leukemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Tohoku Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 211 ~ 224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1620/tjem.2022.J036	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2件 (うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 加藤浩貴
2. 発表標題 メチオニン代謝によるエピゲノム調節をかいした赤血球造血制御
3. 学会等名 日本血液学会 (第83回日本血液学会学術集会) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroki Kato, Nguyen Chi Long, Yusho Ishii, Mitsuyo Matsumoto, Catherine Rhee, Daisuke Saigusa, Ryo Funayama, Hiroaki Okae, Tohru Fujiwara, Akihiko Muto, Hideo Harigae, David T. Scadden, Kazuhiko Igarashi
2. 発表標題 Inhibition of S-Adenosylmethionine Synthesis Promotes Erythropoiesis via Epigenetic Modifications
3. 学会等名 American Society of Hematology (63rd ASH Annual Meeting) (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
--	---------------------------	-----------------------	----

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