



Title	難治性自己免疫性疾患の病態解明と新規治療薬の開発 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	麻生, 邦之
Description	配架番号 : 2672
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14925号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85727
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	ASO_Kuniyuki_abstract.pdf



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 麻 生 邦 之

学位論文題名

難治性自己免疫性疾患の病態解明と新規治療薬の開発
(A novel therapeutic approach for refractory autoimmune diseases)

【背景と目的】自己免疫性疾患は自己免疫応答の破綻を共通の病態基盤とし、慢性炎症を引き起こす疾患群である。グルココルチコイドは自己免疫性疾患の予後を著明に改善したが、一方で長期投与による副作用や臓器障害が課題となっている。近年はグルココルチコイドに代表される画一的な治療から疾患・病態特異的治療へシフトすることで、患者の長期的な予後・ADLを改善することに重きが置かれている。ヘルパーT細胞は複数の自己免疫疾患の病態を担う重要なリンパ球であり、中でもTh17 (T helper 17)は自己免疫疾患の病勢を悪化させ、Treg (regulatory T)は免疫寛容を維持し炎症を沈静化させるという相反する性質を有している。代表的な自己免疫性疾患である全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus: SLE)や多発性硬化症では、Th17/Treg imbalanceが病態に関与していることが報告されており、それらのエフェクターT細胞の分化には細胞内代謝が関わっている。近年、Xという細胞内で産生される代謝産物が細胞内代謝を制御し、抗炎症作用をもたらすことが報告された。しかしXのT細胞への影響は明らかではない。そこで本研究の目的はXのT細胞分化における役割を明らかにすることとした。

【材料と方法】C57BL/6Jマウスの脾臓組織からナイーブCD4⁺T細胞を採取し、Xの添加による各エフェクターT細胞サブセットへの分化への影響をフローサイトメトリー (flow cytometry: FCM), reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)法を用いて検討した。続いて実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis: EAE)の移入モデルを用いて、Xにより修飾されたT細胞が疾患活動性に与える影響を評価した。さらにXによるT細胞分化制御の機序を解明するため、細胞外フラックスアナライザーによる細胞内代謝の評価ならびに、RNA sequencing (RNA-seq), メタボローム解析による網羅的解析を行った。得られた結果をもとに代謝産物の変動に関わる代謝関連酵素活性を評価した。エピジェネティックな観点から主要な転写因子と遺伝子発現の関連について chromatin immunoprecipitation (ChIP)-qPCRにより評価した。

【結果】XによりTh17への分化は濃度依存性に抑制され、Tregへの分化は促進された。Xの添加により *Il17a* 含むTh17関連遺伝子の発現量は減少していた一方、retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma (ROR γ t)の遺伝子・蛋白発現量は上昇していた。Xによる修飾を受けた抗原特異的Th17を移入した *Rag1* 欠損マウスでは、コントロール群に比して臨床スコアと体重減少は改善し、脊髄への浸潤細胞数も抑制された。RNA-seqではX添加によるTh17, Tregの発現変動遺伝子に対して Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway解析を行なったところ、複数の代謝 pathway が上位に検出された。また、Gene ontology (GO)解析によりTh17, Tregで共通して変動がみられた pathway として解糖系が上位に検出された。そこで細胞内代謝を評価したところ、X添加群では非添加群と比較し解糖系が低下していた。細胞内代謝産物の解析では、細胞内のメチル化の指標である S-アデノシルメチオニン (S-adenosyl-L-methionine: SAM) と S-アデノシルホモシステイン (S-adenosylhomocysteine: SAH) の比 (SAM/SAH) がTh17で減少し、Foxp3発現に対して抑制的に働く 2-ヒドロキシグルタル酸 (2-hydroxyglutarate: 2-HG) がTregで減少していた。Xを投与したTh17, TregではSAM合成に関

わるメチオニンアデノシルトランスフェラーゼ (methionine adenosyltransferase: MAT)の酵素活性が低下しており, 2-HG 合成に関わるイソクエン酸デヒドロゲナーゼ (isocitrate dehydrogenase: IDH)-1 と IDH-2 の酵素活性は Treg で低下していた. Xによる SAM/SAH 低下により epigenetic な変化がおきていることが示唆されたため ChIP-qPCR を行ったところ, *Il17a* promoter 領域における ROR γ t の結合率は非投与群に比して低下していた.

【考察】本研究において X により Th17 分化は著明に抑制されているのにも関わらず, Th17 のマスターレギュレーターである ROR γ t の発現量は亢進していた. そのため *Il17a* promoter 領域におけるメチル化が変化し ROR γ t の結合が抑制されていることが予想された. 事実, X は *Il17a* promoter 領域における ROR γ t の結合率を低下させており, その機序として X は SAM 合成に関わる酵素である MAT の酵素活性を低下させ, SAM/SAH 比を低下させることで *Il17a* promoter 領域の ROR γ t 結合部位のメチル化を変化させていることが示唆された. 一方 Treg においては 2-HG を合成する酵素である IDH-1/2 の酵素活性を低下させることで, Treg 分化を抑制していた.

【結論】X は細胞内代謝の再構成を引き起こし, エピジェネティックな修飾を介して Th17 分化を抑制し, Treg 分化を促進していた. X の修飾を受けた T 細胞は EAE の移入モデルにおいて疾患活動性を減弱させた. Th17/Treg imbalance を背景にもつ自己免疫疾患の治療候補として, X の臨床応用に向けた更なる発展が期待される.