



HOKKAIDO UNIVERSITY

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 [全文の要約]
Author(s)	麻生, 邦之
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号 : 2672 他
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/2115/86127
Type	doctoral thesis
File Information	ASO_Kuniyuki_summary.pdf



学 位 論 文 (要 約)

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)

2022 年 3 月

北 海 道 大 学

麻 生 邦 之

学 位 論 文 (要 約)

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)

2022 年 3 月

北 海 道 大 学

麻 生 邦 之

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いるが、この imbalance を補正する治療法は確立されていない。本研究では第一部でTh17, Tregに注目した新規治療薬の開発を、第二部ではSLE患者の重要な臓器病変であるループス腸炎に着目して研究を行った。

<第一部：抗炎症性代謝産物によるTh17/Treg imbalanceの是正>

【背景と目的】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いる。ナイーブT細胞は抗原刺激に伴い活性化され、各種サイトカイン含む特定の環境下で特異的な機能をもった各エフェクターT細胞サブセットへと分化することが知られているが、近年、これらに加え細胞内代謝がT細胞の分化に大きな影響を与えていることが明らかとなってきた。各T細胞サブセットへの分化過程において適した代謝経路を阻害することは、その細胞の機能獲得や分化を抑制することに繋がる。その中でもTh17においては複数の主要な代謝経路の阻害により、その分化を抑制できることが既に示されており、我々はそれらに共通して変動する代謝産物が分化において重要な役割を担っていると仮説を立てた。Xという細胞内で産生される代謝産物はマクロファージにおいて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ている。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 を行なったところ、*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。

<第二部：全身性エリテマトーデスにおける抗 gAChR α 3 抗体の臨床的意義の検討>

【背景と目的】SLE は B 細胞の過剰な活性化と多彩な自己抗体の産生を特徴とする自己免疫性疾患である。SLE における Th17/Treg imbalance は抗原提示細胞と B 細胞の間を仲介することで、自己抗体産生に寄与していることが推定される。自律神経節に存在するニコチン性アセチルコリン受容体 α 3 subunit (ganglionic nicotinic acetylcholine receptor α 3 subunit: gAChRa3)に対する自己抗体は複数の疾患において、自律神経症状との関連が報告されている。これまで SLE 患者でも gAChRa3 抗体が検出されることが報告されているが、その臨床的意義は不明であった。従って、我々は SLE における抗 gAChRa3 抗体の臨床的意義を探索することとした。

【対象と方法】2006 年 1 月から 2019 年 12 月までに北海道大学病院を受診した SLE の成人患者を対象に、後ろ向き観察研究を行った。血清中の抗 gAChRa3 抗体を luciferase immunoprecipitation system (LIPS) assay を用いて測定し、抗 gAChRa3 抗体陽性群と陰性群の臨床的特徴(臓器病変の有無など)を比較した。横断的解析により特定した臨床的特徴に関して、抗 gAChRa3 抗体がその特徴を予測し、発症や再発率に影響を与えるかどうかを評価した。

【結果】144 名の患者のうち、抗 gAChRa3 抗体陽性は 29 名であった。ループス腸炎 (lupus enteritis: LE)を有する患者の抗 gAChRa3 抗体価は、他の症状の患者よりも有意に高かった。さらに抗 gAChRa3 抗体価は治療により LE の寛解とともに低下していた。ロジスティック回帰分析では抗 gAChRa3 抗体が LE の独立したリスク因子として抽出された。さらに Kaplan–Meier 解析により、抗 gAChRa3 抗体を有する患者は、その後の LE 発症/再燃が有意に多いことが明らかになった。

【結論】抗 gAChRa3 抗体は SLE 患者の 20%に認められ、LE の活動性と強く関連していた。また、抗 gAChRa3 抗体は LE 発症/再燃の予測因子であった。抗 gAChRa3 抗体は LE の診断・予後予測の一助となり得る。

本研究では、第一部では代謝産物 X が Th17/Treg imbalance が病態に関わる自己免疫性疾患の治療薬となりうることを明らかにした。X はそれ自体が抗菌作用、抗ウイルス作用を持つことが明らかとなっており、免疫抑制に伴う易感染性を低減した新たな自己免疫性疾患の治療薬となりうる。第二部では SLE の Th17/Treg imbalance の結果として産生される自己抗体の一つである抗 gAChRa3 抗体が、感染症などとの鑑別が難しい LE の診断や予後予測に有用であることを明らかとした。いずれも今後さらなる研究を行うことで臨床応用が期待でき、自己免疫疾患患者の利益になりうると思う。