



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
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
DOI	<a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k14925">https://doi.org/10.14943/doctoral.k14925</a>
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/91943">https://hdl.handle.net/2115/91943</a>
Type	doctoral thesis
File Information	ASO_Kuniyuki.pdf



# 学 位 論 文

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

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

# 目次

発表論文目録および学会発表目録 .....	2
1. 要旨 .....	3
2. 略語表 .....	6
3. 緒言 .....	8
4. 第一部 抗炎症性代謝産物による Th17/Treg imbalance の是正 .....	10
4.1 緒言 .....	11
4.2 目的 .....	13
4.3 イタコン酸の T 細胞分化における影響 .....	14
4.3.1 はじめに .....	14
4.3.2 方法 .....	15
4.3.2.1 エフェクター T 細胞への分化 .....	15
4.3.2.2 FCM によるエフェクター T 細胞サブセットの解析 .....	16
4.3.2.3 RT-qPCR による Th17, Treg 関連遺伝子の評価 .....	17
4.3.3 結果 .....	18
4.3.3.1 エフェクター T 細胞への分化におけるイタコン酸の影響 .....	18
4.3.3.2 Th17, Treg 関連遺伝子の発現変動 .....	20
4.3.4 結論 .....	21
4.4 実験的自己免疫性脳脊髄炎モデルマウスにおけるイタコン酸の疾患活動性への影響 .....	22
4.4.1 方法 .....	22
4.4.1.1 Adoptive transfer EAE の誘導・疾患活動性の評価方法 .....	22
4.4.1.2 マウス脊髄試料の組織染色 .....	24
4.4.1.3 フローサイトメトリーによるマウス脊髄試料の浸潤細胞の評価 .....	24
4.4.2 結果 .....	25
4.4.2.1 Adoptive transfer EAE の臨床スコアと体重変化 .....	25
4.4.2.2 マウス脊髄試料の組織学的評価 .....	26
4.4.2.3 マウス脊髄浸潤細胞の評価 .....	27
4.4.3 結論 .....	28
4.5 イタコン酸による T 細胞分化制御の網羅的遺伝子解析 .....	29
4.5.1 方法 .....	29
4.5.2 結果 .....	30

4.5.2.1 RNA-seq を用いた発現変動遺伝子の解析.....	30
4.5.2.2 Th17, Treg 群でイタコン酸により共通して変動する遺伝子群の解析.....	34
4.5.3 結論.....	37
4.6 イタコン酸による T 細胞内代謝への影響.....	38
4.6.1 方法.....	38
4.6.1.1 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.....	38
4.6.1.2 フローサイトメトリーによる HIF-1 $\alpha$ の発現変動の評価.....	41
4.6.1.3 CE-TOFMS による細胞内代謝産物の評価(メタボローム解析).....	41
4.6.2 結果.....	42
4.6.2.1 解糖系, ミトコンドリア機能への影響.....	42
4.6.2.2 HIF-1 $\alpha$ の発現変動の評価.....	45
4.6.2.3 解糖系, TCA 回路及びメチオニン代謝産物への影響.....	46
4.6.3 結論.....	49
4.7 イタコン酸による代謝関連酵素への影響.....	50
4.7.1 背景.....	50
4.7.2 方法.....	51
4.7.3 結果.....	52
4.7.4 結論.....	53
4.8 イタコン酸による Th17 の <i>Il17a</i> プロモーター領域における ROR $\gamma$ t 結合率への影響	54
4.8.1 背景.....	54
4.8.2 方法.....	55
4.8.3 結果.....	56
4.9 考察.....	57
4.10 結語.....	60
5. 第二部 全身性エリテマトーデスにおける抗 gAChR $\alpha$ 3 抗体の臨床的意義の検討	61
5.1 緒言.....	62
5.2 研究の目的.....	63
5.3 患者と方法.....	64
5.3.1 研究デザインと対象.....	64
5.3.2 評価項目.....	66
5.3.2.1 臓器病変と検査所見.....	66
5.3.2.2 抗 gAChR $\alpha$ 3 抗体の評価.....	67

5.3.3	統計解析 .....	68
5.4	結果.....	69
5.4.1	患者背景 .....	69
5.4.2	抗 gAChR $\alpha$ 3 抗体陽性群と陰性群の臨床像の比較.....	71
5.4.3	ループス腸炎の疾患活動性と抗 gAChR $\alpha$ 3 抗体の相関.....	74
5.4.4	抗 gAChR $\alpha$ 3 抗体の有無による累積ループス腸炎発症/再燃率の比較 .....	76
5.5	考察.....	77
5.6	結語.....	78
6.	結論 .....	79
7.	謝辞 .....	81
8.	利益相反 .....	82
9.	引用文献 .....	83



## 発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は下記の論文に発表した。

1. Kuniyuki Aso, Michihito Kono, Yuki Kudo, Masatoshi Kanda, Keita Ninagawa, Kohei Karino, Yuichiro Fujieda, Masaru Kato, Olga Amengual, Tatsuya Atsumi, Itaconate regulates Th17/Treg cell balance via metabolic and epigenetic reprogramming, *Nature Communications*, submitted
2. Kuniyuki Aso, Michihito Kono, Nobuya Abe, Yuichiro Fujieda, Masaru Kato, Tatsuya Atsumi, Anti-ganglionic nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 3$  subunit antibody as a novel biomarker for lupus enteritis, *The journal of Rheumatology*, submitted

本研究の一部は下記の学会に発表した。

1. Kuniyuki Aso, Michihito Kono, Nobuya Abe, Yuichiro Fujieda, Masaru Kato, Olga Amengual, Tatsuya Atsumi, Anti-gAChR antibody as a novel biomarker for lupus enteritis in systemic lupus erythematosus. 第 65 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2021 年 4 月 26-28 日, WEB 開催
2. Kuniyuki Aso, Michihito Kono, Ninagawa Keita, Nobuya Abe, Yuichiro Fujieda, Masaru Kato, Olga Amengual, Tatsuya Atsumi, Anti-gAChR antibody as a novel biomarker for lupus enteritis in systemic lupus erythematosus. The American College of Rheumatology/The Association of Rheumatology Health Professionals 2021 Annual Meeting, 3-9 November. 2021, online

# 1. 要旨

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>

【背景と目的】SLE や多発性硬化症を含む多くの自己免疫疾患において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、イタコン酸(itaconate: ITA)という細胞内で産生される代謝産物が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た。しかしITA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ITA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<sup>+</sup>T細胞を採取し、ITA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、ITA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ITA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】 ITA 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。ITA 投与により *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 $\gamma$ t)の遺伝子・蛋白発現量は上昇していた。ITA 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 ITA 投与による 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、ITA 投与群では非投与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。ITA 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。ITA 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 $\gamma$ 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 ITA 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 $\gamma$ 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 $\gamma$ t の結合が抑制されていることが予想された。事実、ITA は *Il17a* promoter 領域における ROR $\gamma$ t の結合率を低下させており、その機序として ITA 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 $\gamma$ 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】 ITA 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。ITA 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、ITA の臨床応用に向けた更なる発展が期待される。

## <第二部>

【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の自己抗体産生にはTh17/Treg imbalanceが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  $\alpha 3$  subunit (ganglionic nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 3$  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ITA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。ITA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、免疫抑制という副作用の乏しい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考える。

## 2. 略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである.

ANOVA	analysis of variance
CE-TOF MS	capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry
ChIP	chromatin immunoprecipitation
EAE	experimental autoimmune encephalomyelitis
ECAR	extracellular acidification rate
FBS	fetal bovine serum
FCM	flow cytometry
FPKM	fragments per kilobase of exon per million reads mapped
gAChR $\alpha 3$	ganglionic nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 3$ subunit
GM-CSF	granulocyte macrophage-colony stimulating factor
GO	gene ontology
HIF-1 $\alpha$	hypoxia-inducible factor 1 alpha
H&E	haematoxylin and eosin
IDH	isocitrate dehydrogenase
IFN	interferon
IL	interleukin
ITA	itaconate
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LE	lupus enteritis
LFB	luxol fast blue
LPS	lipopolysaccharide
LIPS	luciferase immunoprecipitation system
MAT	methionine adenosyltransferase
MS	multiple sclerosis
MFI	mean fluorescence intensity
NPSLE	neuropsychiatric systemic lupus erythematosus
OCR	oxygen consumption rate
OR	odds ratio
OXPHOS	oxidative phosphorylation
PBS	phosphate buffered saline

PCA	principal component analysis
PCR	polymerase chain reaction
PFA	paraformaldehyde
PTX	pertussis toxin
RNA-seq	RNA sequencing
ROR $\gamma$ t	retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma
RT-qPCR	reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction
SLE	systemic lupus erythematosus
SLEDAI-2K	systemic lupus erythematosus disease activity index 2000
SAM	S-adenosyl-L-methionine
SAH	S-adenosylhomocysteine
SDH	succinate dehydrogenase
TCA	tricarboxylic acid cycle
TGF- $\beta$	tumor growth factor-beta
Th17	T helper 17 cells
Treg	regulatory T cells
2-DG	2-Deoxy-D-glucose
2-HG	2-hydroxyglutaraate
95%CI	95% confidence interval

### 3. 緒言

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 (Theofilopoulos et al., 2017). その多くは経過中に様々な臓器障害を引き起こし、患者の QOL や生命予後に大きな影響を与えうるが、近年の診断技術の向上や副腎皮質ステロイド・免疫抑制剤による治療の進歩により、自己免疫性疾患の治療成績は飛躍的に向上した (Tsokos, 2020). 一方で、広範で強力な免疫抑制治療には感染症含む種々の副作用が伴い、依然として診療に難渋する病態も存在している。

本研究ではそれらの難治性病態の診断・病態特異的治療法の解明を目的とし、その中でも Th17(T helper 17)/Treg(regulatory T) cell imbalance に対する治療法の確立と全身性エリテマトーデス (Systemic lupus erythematosus: SLE)の重篤な臓器障害の一つである lupus enteritis (LE)に焦点を当てた。

第一部では Th17/Treg cell imbalance に関する研究について述べる。

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 Th1, Th2, Th17, Treg などの特異的な機能をもった T 細胞へ分化する。特に Th17 と Treg はその分化に必要なサイトカインとして TGF- $\beta$  (tumor growth factor- $\beta$ )を共有しているが、Th17は自己免疫疾患の病勢を悪化させ、Treg 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 (Zhou et al., 2008). Th17/Treg cell imbalance は SLE (Sharabi and Tsokos, 2020), 多発性硬化症 (multiple sclerosis: MS) (Dendrou et al., 2015), 関節リウマチ (Samson et al., 2012)などの自己免疫疾患において病態への関与が示唆されているが、その imbalance を特異的に是正する治療法は未だ確立されていない。今回我々は Th17/Treg cell imbalance に対する新規治療法の探索を試みた。

第二部では SLE の病態特異的自己抗体に関する研究について述べる

SLE は多臓器障害をもたらす全身性自己免疫疾患であり、多彩な自己抗体の産生を特徴とする (Kono et al., 2014; Tsokos, 2020). 自己抗体の中には SLE の特定の臨床症状・病態と強く関連するものが存在し、中でも精神神経ループス (neuropsychiatric systemic lupus erythematosus: NPSLE)に関連する自己抗体が多く報告されている (Mader et al., 2018). それらの特異的自己抗体は、疾患の理解を深めるだけでなく、早期診断・治療のバイオマーカーとなり得る。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  $\alpha 3$  subunit (ganglionic nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 3$  subunit: gAChR $\alpha 3$ )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病原性自己抗体である (Imamura et al., 2020). これまで gAChR $\alpha 3$  抗体は SLE

患者で検出されているものの, 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 gAChR $\alpha$ 3 抗体の役割を探索することとした.

#### 4. 第一部

抗炎症性代謝産物による Th17/Treg imbalance の  
是正

## 4.1 緒言

複数の自己免疫性疾患において、Th17/Treg imbalance の病態への関与が確認されている。ナイーブ T 細胞から Th17 や Treg をはじめとした特定のエフェクター T 細胞への分化や機能には様々なサイトカイン刺激や様々な細胞内シグナル伝達が必須である。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 (Geltink et al., 2018)。ナイーブ T 細胞はそのエネルギー源を主にミトコンドリアの電子伝達系における酸化的リン酸化 (oxidative phosphorylation: OXPHOS) に依存しているが、エフェクター T 細胞に分化する際に解糖系へと代謝状態をシフトさせる。また、エフェクター T 細胞のサブセット毎に代謝経路への依存度は異なっており、Th17 が解糖系に依存するのに対し、Treg では脂肪酸酸化に依存している (Geltink et al., 2018)。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。例えば、解糖系の律速酵素の一つである pyruvate kinase muscle isozyme 2 の阻害剤は *in vitro* で解糖系を抑制し、Th1 と Th17 の分化を抑制する (Kono et al., 2019)。Th17 分化についてはグルタミン代謝 (Xu et al., 2017) やメチオニン代謝 (Roy et al., 2020) などの複数の代謝経路との関連も報告されている。また、Th17 と Treg はその分化に必要なマスター転写因子である ROR $\gamma$ t と Foxp3 をそれぞれ発現しており、解糖系の重要な制御因子である低酸素誘導因子 (hypoxia-inducible factor 1 alpha: HIF-1 $\alpha$ ) を CD4<sup>+</sup>T 細胞で欠損させると、解糖系が抑制されることに加え、ROR $\gamma$ t と Foxp3 への作用を介して Th17 の分化を抑制し、一方で Treg の分化を促進する (Dang et al., 2011)。さらに近年の研究では代謝経路を調節した結果生じる代謝産物の変動がエフェクター T 細胞分化に重要であることが明らかにされている。メチオニン代謝を抑制することで、代謝産物かつ細胞内のメチル基供与体である S-アデノシルメチオニン (S-adenosyl-L-methionine: SAM) が減少した結果、*Il17a* 遺伝子のプロモーター領域においてヒストンの脱メチル化が生じ、Th17 の分化が抑制される (Roy et al., 2020)。また、グルタミン代謝を阻害することでクエン酸 (tricarboxylic acid cycle: TCA) 回路の代謝産物である 2-ヒドロキシグルタル酸 (2-hydroxyglutarate: 2-HG) の減少による *Foxp3* 遺伝子座の低メチル化が引き起こされ、Treg の分化が促進することが知られている (Xu et al., 2017)。

イタコン酸 (itaconate: ITA) は TCA 回路の中間代謝産物である。これまでの研究ではリポ多糖 (lipopolysaccharide: LPS) 等で活性化されたマクロファージで ITA の産生が亢進し、interleukin (IL)-1 $\beta$  や IL-6 といった炎症性サイトカインの発現を抑制することで抗炎症作用を示すことが報告されている (Bambouskova et al., 2018; Mills et al., 2018)。さらに、ITA は細菌のイソクエン酸リアーゼを直接阻害して抗菌作用を示し

(McFadden and Purohit, 1977), 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19)においては, ITA の誘導体がウイルスの複製を抑制し, 感染ホスト側の過剰な炎症性応答を抑制するなど抗ウイルス物質としての側面も有している (Olagner et al., 2020). ITA の細胞内代謝への影響については, マクロファージにおいて主要な解糖系酵素を阻害することで解糖系を抑制することが示されている. 一方で, ITA が T 細胞の分化や機能においてどのように影響を与えるかは十分な検討がなされていない.

## 4.2 目的

本研究の目的は抗炎症性代謝産物である ITA による Th17/Treg imbalance への影響を明らかにすることである。

## 4.3 イタコン酸の T 細胞分化における影響

### 4.3.1 はじめに

近年, T 細胞の分化における細胞内代謝の制御の重要性が提唱されている. 我々はマクロファージで解糖系を抑制する ITA が, T 細胞の細胞代謝にも何らかの影響を及ぼし, その分化に影響を与えるという仮説を立てて実験を行った.

動物実験は北海道大学の動物実験倫理委員会の承認のもと(承認番号 19-0147), 北海道大学動物実験に関する規定に従い行った.

## 4.3.2 方法

7~8週齢の雌 C57BL/6J (B6)マウスの脾臓組織からナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞を採取し、各エフェクターT 細胞サブセットに特異的な刺激を与えて分化を誘導した。培地に ITA を加えることで T 細胞分化への影響を flow cytometry (FCM), reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)法を用いて評価した。統計解析は GraphPad Prism (ver. 7.04; GraphPad Software, San Diego, CA, USA)を用いて行った。

### 4.3.2.1 エフェクターT 細胞への分化

マウスは麻酔下に安楽死処理し、脾臓組織を単離した。70  $\mu$ m cell strainer 上で 5 mL シリンジの plunger を用いて機械的に擦潰した後、2 mL の ACK lysing buffer (Gibco)で懸濁し、室温で 2 分間 incubate して赤血球を除去した。4  $^{\circ}$ C, 2000 rpm, 2 分間遠心して上清を除去し、ペレットを CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>T cell isolation kit (Miltenyi Biotec)を用いた Magnetic cell sorting 法によりナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞を分離した。細胞を 10 % 非働化ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS), ペニシリン, ストレプトマイシン, 0.1 % 2-メルカプトエタノール含有 RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich) 1 ml に懸濁し、細胞数をカウントした。48 well プレートに 500 倍希釈した Goat anti-Hamster IgG (MPBio)でコーティングし、1 well あたり  $0.3 \times 10^6$  個の細胞を播種後、抗 CD3 抗体 (0.25  $\mu$ g/mL, clone 145-2C11, Biolegend)と抗 CD28 抗体 (0.5  $\mu$ g/mL, clone 37.51, Biolegend)を用いて刺激した。各エフェクターT 細胞サブセットへの分化のため使用した抗体・サイトカインは、Th1: 抗 IL-4 抗体 (3  $\mu$ g/mL, clone 11B11, Biolegend), IL-12 (20 ng/mL, Biolegend), Th2: 抗 interferon (IFN) $\gamma$  抗体 (3  $\mu$ g/mL, clone AN-18, Biolegend), IL-4 (100 ng/mL, Biolegend), Th17: 抗 IL-4 抗体 (2  $\mu$ g/mL, clone 11B11, Biolegend), 抗 IFN $\gamma$  抗体 (2  $\mu$ g/mL, clone AN-18, Biolegend), IL-6 (30 ng/mL, Biolegend), TGF- $\beta$  (0.3 ng/mL, Miltenyi Biotec), Treg: 抗 IL-4 抗体 (2  $\mu$ g/mL, clone 11B11, Biolegend), 抗 IFN $\gamma$  抗体 (2  $\mu$ g/mL, clone AN-18, Biolegend), IL-2 (20 ng/mL, Biolegend)及び TGF- $\beta$  (1 ng/mL, Miltenyi Biotec)であった。ITA はリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline: PBS)で希釈し、0, 3, 6 mM の濃度で各 well に添加した。

### 4.3.2.2 FCM によるエフェクターT細胞サブセットの解析

3日間の培養の後、細胞を回収した。Th1, Th2, Th17を同定するため、GolgiPlug (BD Biosciences), ホルボール 12-ミリスタート 13-アセタート (PMA: 500 ng/ml, Sigma-Aldrich)とイオノマイシン(1 µg/ml, Sigma-Aldrich)を用いて 37 °C, 4時間の刺激を行った。死細胞除去のため Zombie Aqua (Biolegend)を添加し、室温で 20 分間静置, 洗浄後, 固定/膜浸透化溶液 (BD Biosciences)を用いて固定した。各エフェクターT細胞サブセットの同定のため、細胞内染色に使用した蛍光標識抗体は、抗 IFN-γ 抗体 (clone XMG1.2, Biolegend), 抗 IL-4 抗体 (clone 11B11, Biolegend), 抗 IL-17A 抗体(clone TC11-18H10.1, Biolegend)及び抗 RORγt 抗体 (clone B2D, eBioscience)であった。Treg の同定には、細胞表面染色に抗 CD25 抗体 (clone 3C7, BD Biosciences), 細胞内染色に抗 Foxp3 抗体 (clone FJK-16s, eBioscience)をそれぞれ使用した。各抗体は 1:50 もしくは 1:100 希釈で使用した。4 °C, over night で静置, 洗浄後に BD FACSAria™ II (BD Biosciences)を用いてフローサイトメトリー (flow cytometry: FCM)を施行した (Figure 1)。

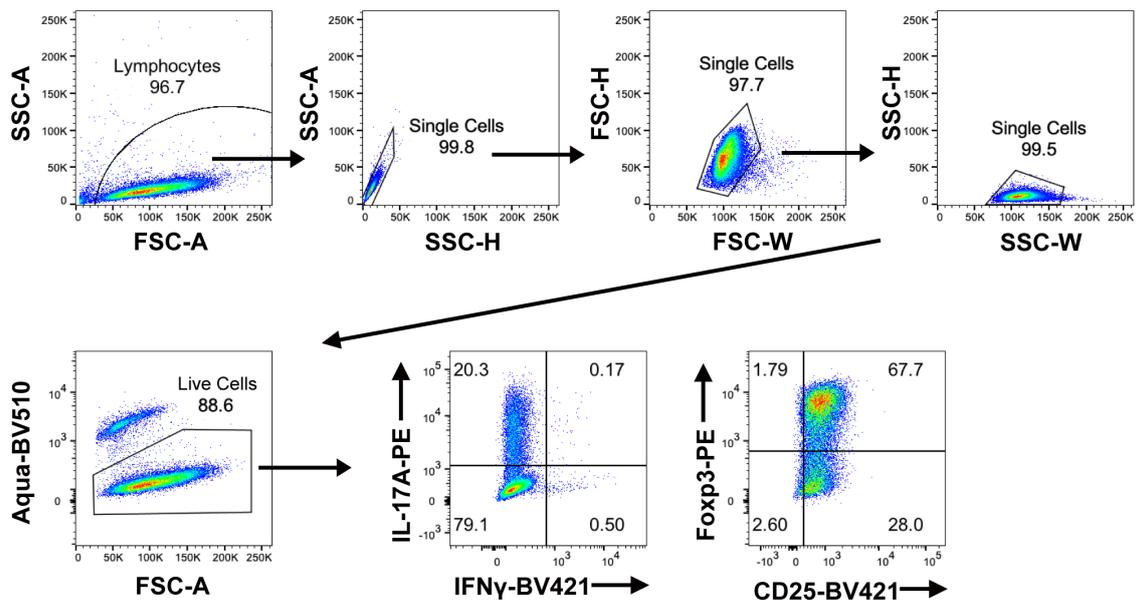


Figure 1. フローサイトメトリーによるエフェクターT細胞の同定

ゲーティングストラテジーを示す。ダブレットを除去した後, Zombie Aqua により死細胞の除去を行い, IL-17A, IL-4, IFN, Foxp3, CD25 でゲーティングを行って各エフェクターT細胞を同定した。前方散乱光シグナル (FSC), 側方散乱光シグナル (SSC), パルスの高さ (Height: H), パルスの幅 (Width: W), パルスの面積 (Area: A)。

#### 4.3.2.3 RT-qPCRによる Th17, Treg 関連遺伝子の評価

培養 2 日目に回収した細胞を RLT buffer で溶解し, RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) を用いて RNA を抽出した. 抽出した RNA は濃度を調整後に SuperScript VILO (Invitrogen) を用いて cDNA とし, TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems) による RT-qPCR 法で Th17, Treg 関連遺伝子の発現を定量した. 使用した primer は TaqMan probe *Foxp3* (Mm00475162\_m1), TaqMan probe *Rorc* (Mm01261022\_m1), TaqMan probe *Il17a* (Mm00446973\_m1), TaqMan probe *Il17f* (Mm00521423\_m1), TaqMan probe *Tbp* (Mm00446973\_m1) 及び TaqMan probe *Gusb* (Mm1197698\_m1) であった. 測定には 7500 Fast Realtime PCR system (Applied Biosystems) を用いた. mRNA 発現量は  $\Delta\Delta CT$  法によって各細胞の各遺伝子とハウスキーパー遺伝子である *Tbp* と *Gusb* の平均の差を計算し, mRNA 量を算出した.

### 4.3.3 結果

#### 4.4.3.1 エフェクターT細胞への分化におけるイタコン酸の影響

フローサイトメトリー解析において Th1, Th2 への分化は ITA の有無により有意な変動はみられなかった。一方, Th17 への分化は ITA の濃度依存的に抑制され, Treg への分化は ITA の濃度依存的に増加した (Figure 2A, B). また, Th17 条件において ITA 投与により ROR $\gamma$ t 発現量は上昇していた (Figure 2C).

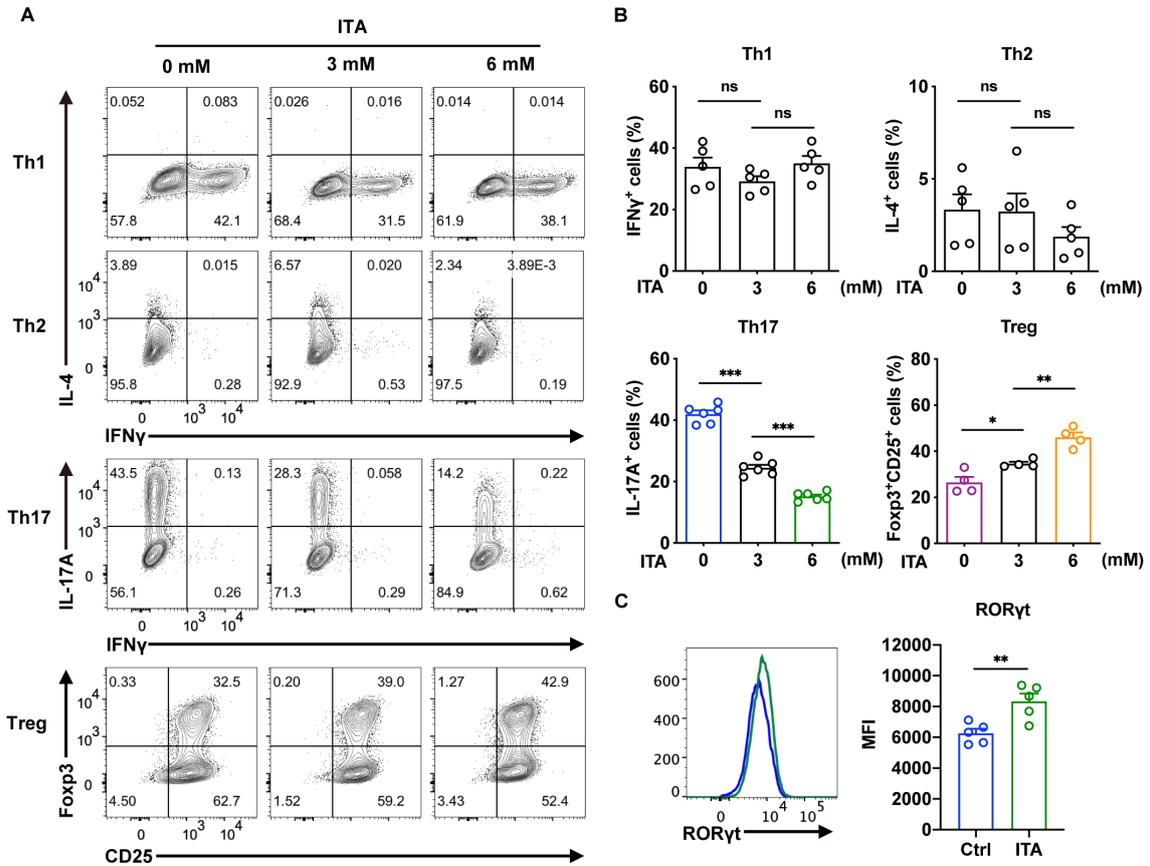


Figure 2. エフェクターT細胞への分化における ITA の影響

イタコン酸 (ITA: 0, 3, 6 mM)存在下で B6 マウス由来のナイーブ CD4<sup>+</sup>T細胞を Th1, Th2, Th17, Treg 条件で分化させ、フローサイトメトリーで解析した. A, B: 各エフェクターT細胞条件の代表的なプロット (A)と累積データ (B)を示す. C: Th17 条件における ROR $\gamma$ t 発現を平均蛍光強度 (mean fluorescence intensity: MFI)で示す.

データは平均値±標準誤差で示した. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , ns: not significant.  $p$ 値は one-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post hoc tests もしくは two-tailed unpaired Student's t test を用いて算出した.

#### 4.4.3.2 Th17, Treg 関連遺伝子の発現変動

次にイタコン酸の有無で Th17, Treg 分化条件で培養したナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞の遺伝子発現量の解析を行った. RT-qPCR 法において, Th17 では ITA により *Il17a*, *Il17f* の発現量は低下していたが, *Rorc* 発現量は増加していた. 一方 Treg では ITA により *Foxp3* 発現量が増加していた (Figure 3).

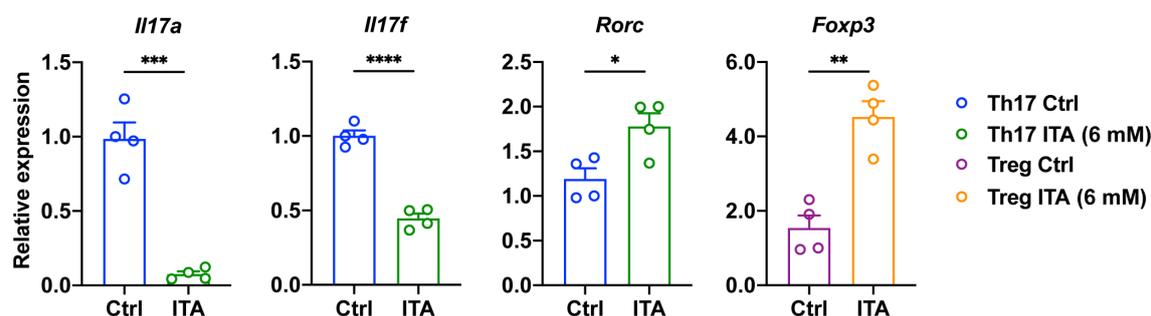


Figure 3. ITA による Th17, Treg 関連遺伝子の発現変動

イタコン酸 (ITA: 0, 6 mM) 存在下で B6 マウス由来のナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞を Th17, Treg 条件で分化させ, RT-qPCR 法を用いて Th17 関連遺伝子 (*Il17a*, *Il17f*, *Rorc*), Treg 関連遺伝子 (*Foxp3*) の発現を解析した.

データは平均値±標準誤差で示した. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ , ns: not significant.  $p$  値は two-tailed unpaired Student's t test を用いて算出した.

#### 4.3.4 結論

ITAにより Th17分化が抑制され, Treg分化が促進されることを mRNA・蛋白レベルで確認した. Th1, Th2分化への影響は認められなかった. Th17においては IL-17Aの発現を制御している ROR $\gamma$ tの上昇を認めた. ROR $\gamma$ tは Th17のマスターレギュレーターと考えられており, ITAにより ROR $\gamma$ tの発現が亢進しているにもかかわらず Th17分化が抑制されている点に関しては 4.8の項で詳細に検討することとした.

## 4.4 実験的自己免疫性脳脊髄炎モデルマウスにおけるイタコン酸の疾患活動性への影響

ITAにより *in vitro* の Th17 分化が抑制されることが明らかになったため、次に ITA により修飾された T 細胞の *in vivo* における機能が変化しているかどうかを検討することとした。使用する動物モデルとして、Th17/Treg imbalance を背景に持つ多発性硬化症モデルである、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis: EAE) を用いることとした (McGinley et al., 2020)。EAE はミエリン特異的な CD4<sup>+</sup>T 細胞、特に Th17 がその発症に重要である (McGinley et al., 2020)。抗原特異的 CD4<sup>+</sup>T 細胞を移入することによって誘導可能であり、ミエリンオリゴデンドロサイト糖蛋白質に対する抗原特異性を有する 2D2 マウス (C57BL/6-Tg (Tcr $\alpha$ 2D2, Tcr $\beta$ 2D2) 1Kuch/J) 由来の Th17 を、成熟した T, B 細胞が存在しない *Rag1* 欠損マウス (B6.129S7-*Rag1*<sup>tm1Mom</sup>/Jmice) に移入し EAE を誘導することで、ドナー由来の T 細胞がレシピエントの EAE の疾患活動性に与える影響を評価することが可能である (adoptive transfer EAE: tEAE) (Stromnes and Goverman, 2006b)。我々はこのモデルを用いて ITA により修飾されたエフェクター T 細胞が *in vivo* において EAE の疾患活動性に与える影響を評価した。統計解析は GraphPad Prism (ver. 7.04; GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いて行った。

### 4.4.1 方法

#### 4.4.1.1 Adoptive transfer EAE の誘導・疾患活動性の評価方法

7~8 週齢の 2D2 マウスより 4.3.2.1. に記載ある方法と同様に脾臓からナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞を分離し、48 well プレート上で刺激した。Pathogenic Th17 への分化のため使用した抗体・サイトカインは、抗 IL-4 抗体 (2  $\mu$ g/mL, clone 11B11, Biolegend), 抗 IFN $\gamma$  抗体 (2  $\mu$ g/mL, clone AN-18, Biolegend), IL-6 (30 ng/mL, Biolegend), TGF- $\beta$  (0.3 ng/mL, Miltenyi Biotec), IL-23 (10 ng/mL, Biolegend) 及び IL-1 $\beta$  (10 ng/mL, Biolegend) を用いた。ITA は PBS で希釈し、0, 3 mM の濃度で各 well に添加した。37  $^{\circ}$ C, 3 日間の培養の後、細胞を回収し、1 匹あたり  $1.0 \times 10^7$  個の細胞を 7~8 週齢の *Rag1* 欠損マウスに静脈注射した。細胞の移入当日と 2 日後に Pertussis toxin (PTX; 400 ng per mouse, List Biological Laboratories) を腹腔内注射し、疾患活動性と体重変化をモニタリングし

た (Figure 4). 疾患活動性は次のような臨床スコアで評価した: 0, 臨床症状なし; 0.5, 尾の部分下垂; 1, 尾の完全下垂; 2, 協調運動ができない, 後肢部分麻痺; 2.5, 片側後肢完全麻痺; 3, 両後肢完全麻痺; 3.5, 前肢部分麻痺を含む両後肢完全麻痺, 4, 四肢完全麻痺; 5, 死亡 (Stromnes and Goverman, 2006a). また, 体重が初日より 20%以上減少した個体については, 動物愛護の観点から麻酔下に安楽死処理した.

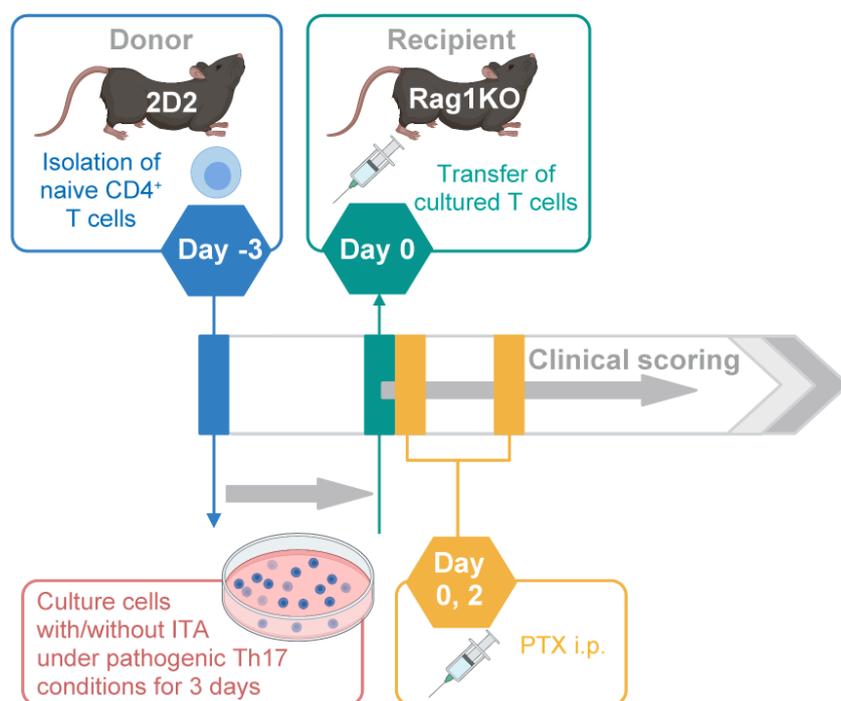


Figure 4. 受動的実験的自己免疫性脳脊髄炎モデルの模式図

Day-3: 2D2 マウスよりナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞を分離し, Pathogenic Th17 条件で培養した. Day0: 回収した細胞を Rag1 欠損マウスに静脈注射した. Pertussis toxin (PTX)は Day0, 2 に腹腔内注射し, 疾患活動性と体重変化をモニタリングした.

#### 4.4.1.2 マウス脊髄試料の組織染色

EAE 誘導から 15 日後に麻酔下にマウスを安楽死処理し, PBS 灌流を行った後に脊髄を採取した. さらに 4 %パラホルムアルデヒド(paraformaldehyde: PFA)で 48 時間固定し, PBS で洗浄後に 70 %エタノールで置換した. パラフィンブロックを作成し, その切片を脱パラフィン処理し, haematoxylin and eosin (H&E)染色と luxol fast blue (LFB)染色を施した. 脊髄への細胞浸潤は次のようにスコアリングした (Inflammation score): 0, no infiltration (< 50 cells); 1, mild infiltration (50-100 cells); 2, moderate infiltration (100-150 cells); 3, severe infiltration (150-200 cells); 4, massive infiltration (> 200 cells) (Yoshida et al., 2016).

#### 4.4.1.3 フローサイトメトリーによるマウス脊髄試料の浸潤細胞の評価

前述のように採取した脊髄を剪刀により細断した. 試料を Collagenase Type IV(worthington)で懸濁し, 37 °C, 20 分間混和した. 続いて 70 µm cell strainer 上で 5 mL シリンジの plunger を用いて機械的に擦潰した後, OptiPrep™ (Sigma-Aldrich)を用いて密度勾配遠心分離した. ペレットを回収し, Th17 を同定するため, GolgiPlug (BD Biosciences), ホルボール 12-ミリスタート 13-アセタート (PMA: 500 ng/ml, Sigma-Aldrich)とイオノマイシン(1 µg/ml, Sigma-Aldrich)を用いて 37 °C, 3.5 時間の刺激を行った. 死細胞除去のため Zombie Aqua (Biolegend)を添加し, 室温で 20 分間静置, 洗浄後, 固定/膜浸透化溶液 (BD Biosciences)を用いて固定した. 細胞表面染色に抗 CD4 抗体 (clone H129.19, Biolegend)及び抗 CD90.2 抗体 (clone 53-2.1, Biolegend), 細胞内染色に, 抗 IFN-γ 抗体 (clone XMG1.2, Biolegend), 抗 IL-17A 抗体 (clone TC11-18H10.1, Biolegend)及び抗 Granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF)抗体 (clone MP1-22E9, eBioscience)をそれぞれ使用した. 4 °C, over night で静置, 洗浄後に BD FACSAria™ II (BD Biosciences)を用いてフローサイトメトリー (FCM)を施行した.

## 4.4.2 結果

### 4.4.2.1 Adoptive transfer EAE の臨床スコアと体重変化

ITA (3 mM)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 (ITA 群)では、コントロール (Ctrl)群に比して臨床スコアと体重減少が有意に抑制された (Figure 5).

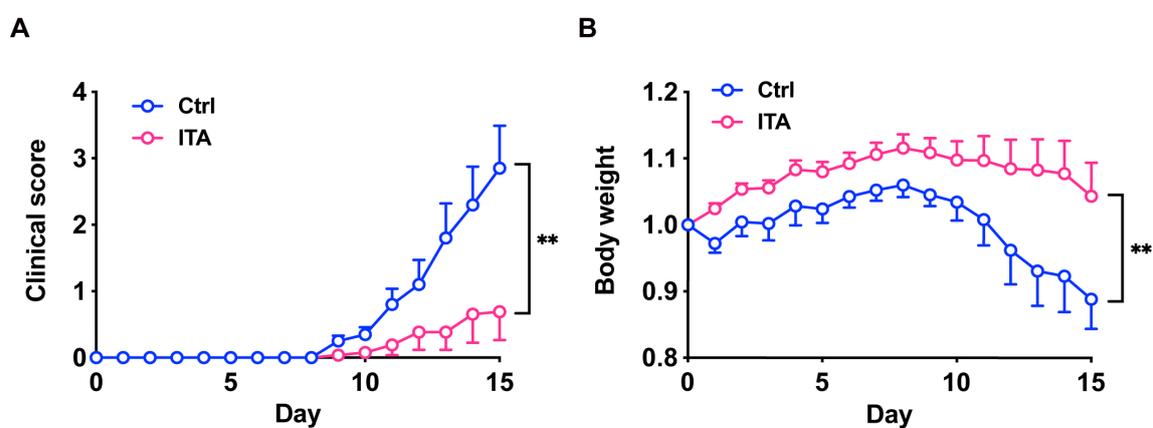


Figure 5. Adoptive transfer EAE の臨床スコアと体重変化

A, B: 抗原特異的 Th17 を移入後から 15 日間, Ctrl 群 (n=8) と ITA 群 (n=10) の臨床スコア (A) と体重変化 (B) をモニタリングした.

データは平均値±標準誤差で示した. \*\* $p < 0.01$ .  $p$  値は two-way ANOVA を用いて算出した.

#### 4.4.2.2 マウス脊髄試料の組織学的評価

脊髄の組織切片において、ITA 群では浸潤細胞数と脱髄が Ctrl 群に比して有意に減少していた (Figure 6A, B). ヒトにおける多発性硬化症の病態と類似して、EAE の疾患活動性は脊髄への浸潤細胞数や脱髄と相関することが報告されており (McGinley et al., 2020), Figure 5 と矛盾しない結果であった.

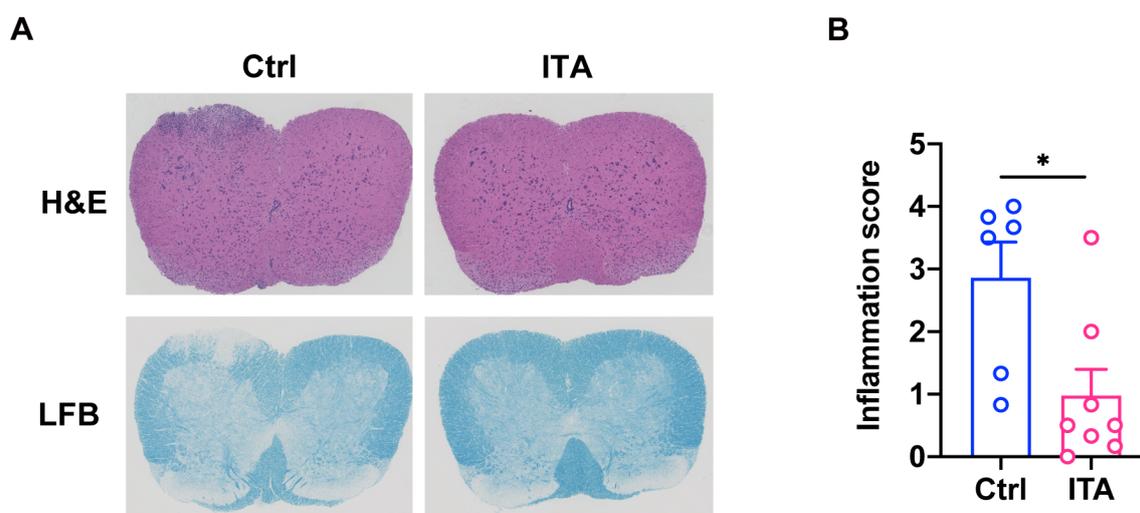


Figure 6. マウス脊髄試料の組織学的評価

A: EAE 誘導して 15 日後に採取した脊髄を haematoxylin and eosin (H&E) と luxol fast blue (LFB) で染色した代表的な組織像. B: 浸潤細胞数から算出した Inflammation score. データは平均値±標準誤差で示した. \* $p < 0.05$ .  $p$  値は two-tailed unpaired Student's  $t$  test を用いて算出した.

#### 4.4.2.3 マウス脊髄浸潤細胞の評価

GM-CSF を産生する Th17 は EAE においてより病原性が高いサブセットとして報告されている (McGinley *et al.*, 2020). 脊髄浸潤細胞の詳細を評価したところ, ITA 群では脊髄における IL-17A<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞と IL-17A<sup>+</sup>GM-CSF<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>T 細胞の絶対数と割合が Ctrl 群に比して有意に減少していた (Figure 7A, B). これは *in vitro* で確認された ITA による Th17 の分化抑制作用 (Figure 2) に矛盾しない結果であった.

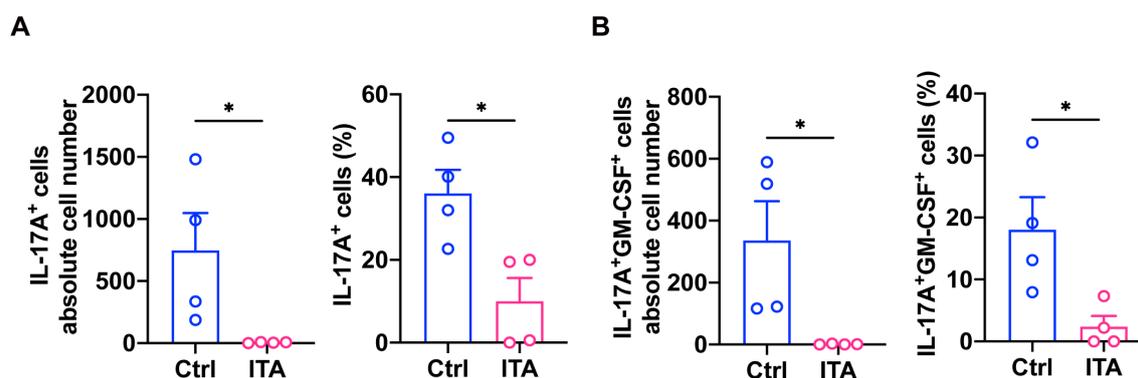


Figure 7. FCM による脊髄浸潤細胞の評価

A, B: EAE 誘導 15 日後の脊髄における IL-17A<sup>+</sup> (A), IL-17A<sup>+</sup>GM-CSF<sup>+</sup> (B) CD4<sup>+</sup>T 細胞の絶対数 (左) と割合 (右) をフローサイトメトリー (FCM) で評価した.

データは平均値±標準誤差で示した. \* $p < 0.05$ .  $p$  値は two-tailed unpaired Student's  $t$  test を用いて算出した.

### 4.4.3 結論

実験 4.4 では ITA 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, Ctrl 群に比して EAE の疾患活動性が抑制された. また, ITA 群では疾患活動性と一致して脊髄に浸潤する IL-17A<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T 細胞, IL-17A<sup>+</sup> GM-CSF<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T 細胞が減少した. *Rag1* 欠損マウスを用いた tEAE モデルは成熟した T 細胞が存在しない環境で, 移入された抗原特異的 Th17 の病原性をより直接的・特異的に評価することができる. 今回, *in vitro* で確認された ITA により Th17 の分化が抑制された T 細胞が, *in vivo* においても機能が抑制されていることが確認された. 一方で, ITA 添加により生じた変化がどのようなメカニズムで起きたのかについては不明であり, 我々はその詳細な機序について探索することとした.

## 4.5 イタコン酸による T 細胞分化制御の網羅的遺伝子解析

ITA が活性化したマクロファージの炎症性サイトカインの発現を抑制する機序については複数の報告がある (O'Neill and Artyomov, 2019). Th17 や Treg の分化の過程においても複数の転写因子や遺伝子の関与が報告されていることから (Kurebayashi et al., 2013), 我々はまず Ctrl と ITA 群で有意に変動する遺伝子群を特定するために網羅的遺伝子解析を行うこととした.

### 4.5.1 方法

ITA が Th17, Treg 分化に関わる pathway を探索することを目的とし, RNA sequencing (RNA-seq)による網羅的遺伝子解析を行った. 8 週齢の雌 B6 マウスから 4.3.2.1.に記載ある方法で ITA (0, 6 mM)の存在下で Th17, Treg に分化させた. 3 匹のマウスから各条件の細胞を作成し (各細胞条件において 3 biological replicates), 培養 2 日目に回収した細胞を RLT buffer で溶解し, RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen)を用いて RNA を抽出した. 抽出した RNA は Genewiz (South Plainfield, NJ)に送付し, ライブラリ作成を委託した. RNA integrity number (RIN) 7 以上の total RNA 500 ng を poly-A mRNA enrichment (NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module) で前処理し, NEB NEXT Ultra RNA Library Prep Kit for Illumine (New England Biolabs, E7530)を用いてライブラリを作成した. ライブラリは NovaSeq 6000 system (Illumina)を用いてシーケンシングし, 150 塩基 paired-end 法で 2500 万以上のリードを取得した. Cutadapt v 2.1 を用いてクオリティが低いリードやアダプター配列を除去した. トリミングされたリードを mm10 (Ensembl 99)にマッピングし, STAR v 2.7.1a を用いて定量化した (Dobin et al., 2013). 発現変動遺伝子 (Differentially expressed genes; DEGs)は DESeq2 を用いて, サンプル間の発現レベル ( $\log_2$  fold-change  $> 0.5$ , 調整  $p$  値  $< 0.01$ )に基づいて同定された (Love et al., 2014). 解析は R software (ver. 4.0.0; R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2020)を用いて施行した. 得られた変動遺伝子のデータの Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway 解析と Gene ontology (GO)解析は Metascape web-based platform を用いて施行した (Zhou et al., 2019).

## 4.5.2 結果

### 4.5.2.1 RNA-seq を用いた発現変動遺伝子の解析

RNA-seq によって得られたデータから fragments per kilobase of exon per million reads mapped (FPKM)を算出し, FPKM が 1 以上である遺伝子を発現変動解析に用いた. 主成分分析(principal component analysis: PCA)では Th17 (ITA 0, 6 mM)と Treg (ITA 0, 6 mM)は PC1 Variance 93%で説明され, それぞれの biological replicates は PC2 Variance 13%で説明された(Figure 8). このことから各細胞群は異なる遺伝子発現プロファイルを有していることが示された. Th17, Treg (ITA 6mM)はコントロール [Th17, Treg (ITA 0 mM)] と比較してそれぞれ 1,072 と 1,554 の遺伝子が有意差をもって変動していた(log<sub>2</sub> fold-change > 0.5, 調整 *p* 値 <0.01) (Figure 9). 次にこれらの発現変動遺伝子に Metascape を用いて KEGG pathway 解析を行った. ITA 投与により変動した pathway として, Th17 群では ‘HIF-1 signaling pathway’, ‘Glycolysis’ 及び ‘Central carbon metabolism in cancer’ であり, Treg 群では ‘Glycolysis’, ‘Fructose and mannose metabolism’, ‘Fatty acid metabolism’ など代謝に関わる pathway が上位に検出された (Figure 10).

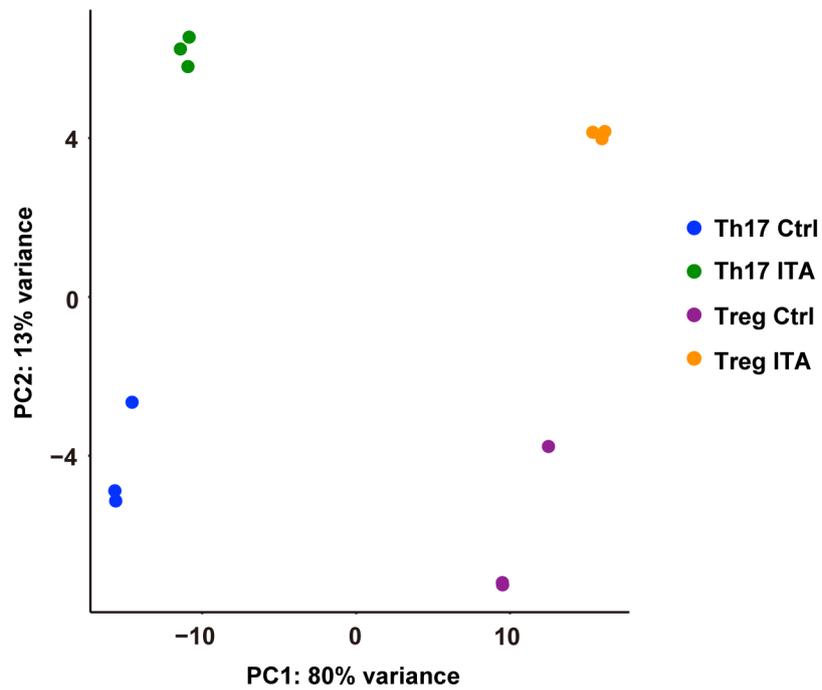


Figure 8. ITA による Th17, Treg 群の発現変動遺伝子の主成分分析

A: 主成分分析 (PCA)の結果. Th17 (イタコン酸: ITA 0, 6 mM)と Treg (ITA 0, 6 mM)は PC1 Variance 93%で説明され, それぞれの biological replicates は PC2 Variance 13%で説明された.

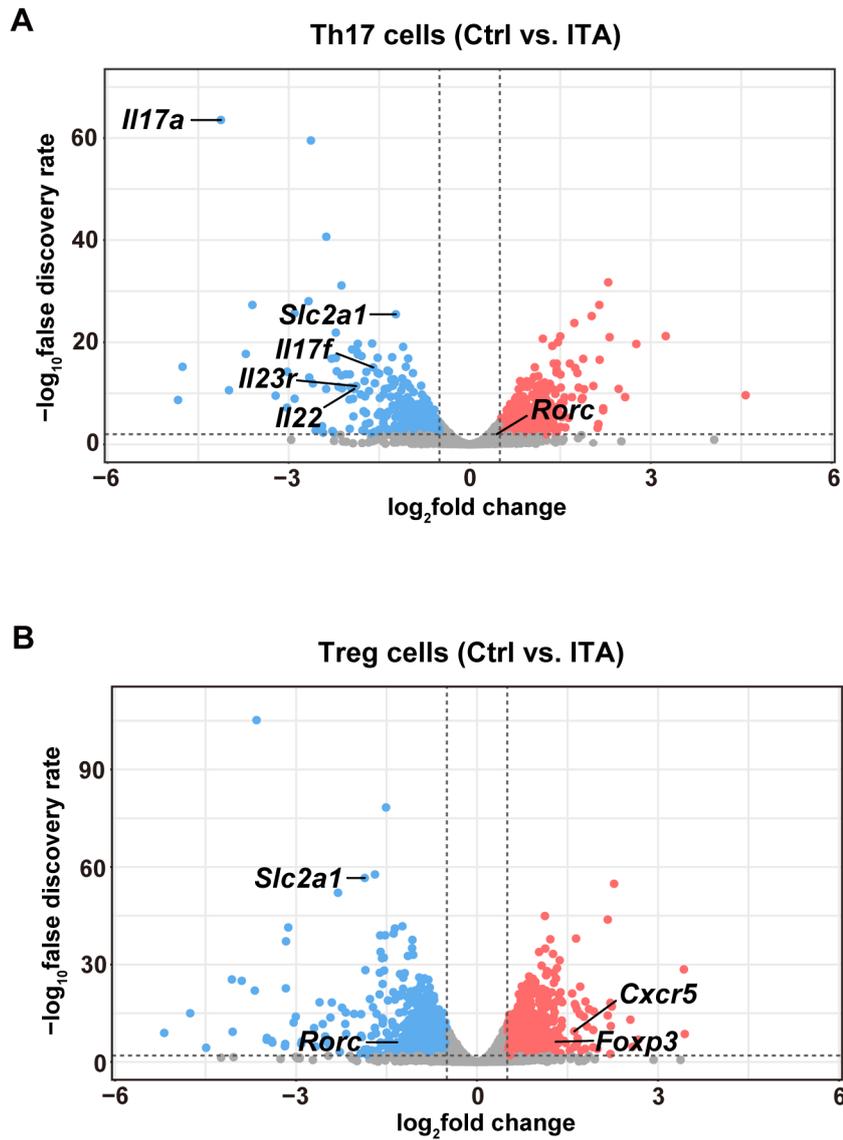


Figure 9. ITA による Th17, Treg 群の発現変動遺伝子

A, B: コントロール (Ctrl) に比してイタコン酸 (ITA) により Th17 群 (A) と Treg 群 (B) で発現が変動している遺伝子の volcano plot. 発現亢進遺伝子を赤, 発現減弱遺伝子を青で示した.

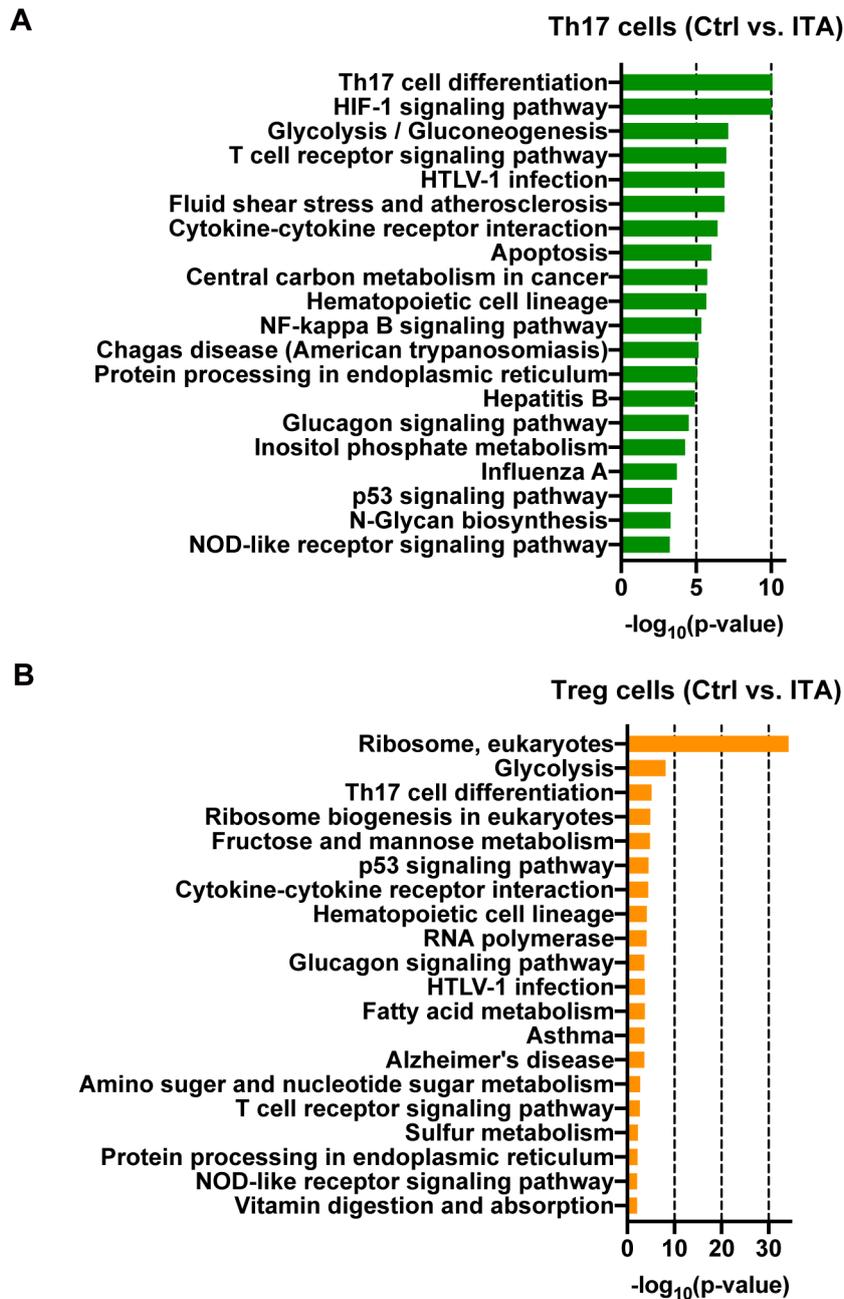


Figure 10. ITA による Th17, Treg 群の発現変動遺伝子に関する pathway  
 イタコン酸 (ITA)により Th17 (A), Treg (B)群において認めた発現変動遺伝子について、  
 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway 解析を施行した。抽出され  
 た上位 20 個の pathway を示す。

#### 4.5.2.2 Th17, Treg 群でイタコン酸により共通して変動する遺伝子群の解析

ITA による Th17, Treg 分化制御に共通する機序を同定するため, Th17, Treg 群において ITA により共通して発現変動する 610 個の遺伝子を同定した ( $\log_2$  fold-change > 0.5, 調整  $p$  値 < 0.01). 共通する発現変動遺伝子に対する Gene ontology (GO) 解析により, 'Glycolysis', 'HIF-1 signaling pathway' を含む pathway が上位に抽出された (Figure 11). それらの pathway の遺伝子セットについてのヒートマップを, fragments per kilobase of exon per million reads mapped (FPKM) を用いて算出した z-score で示した (Figure 12). 両群において解糖系に関わる遺伝子の全体的な発現低下が認められた.

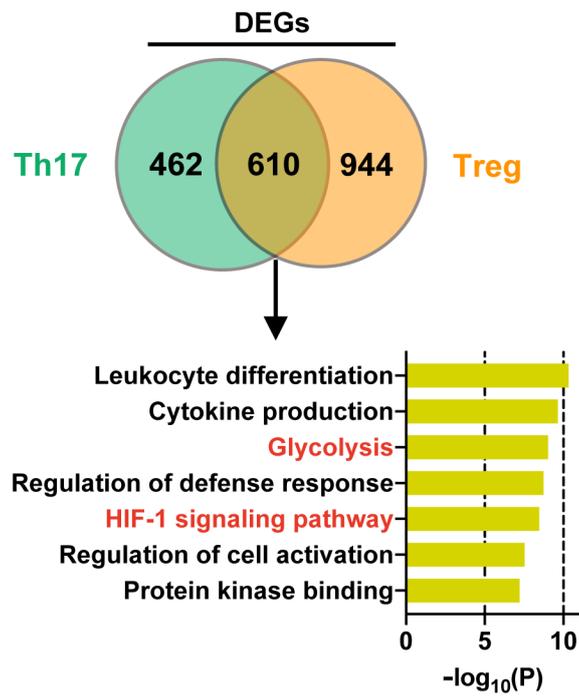


Figure 11. Th17, Treg 群で ITA により共通して変動する遺伝子群の解析  
 Th17 群と Treg 群におけるイタコン酸 (ITA)による発現変動遺伝子 (DEGs)の  
 ベン図. 共通する遺伝子に対して Gene ontology 解析を行った.

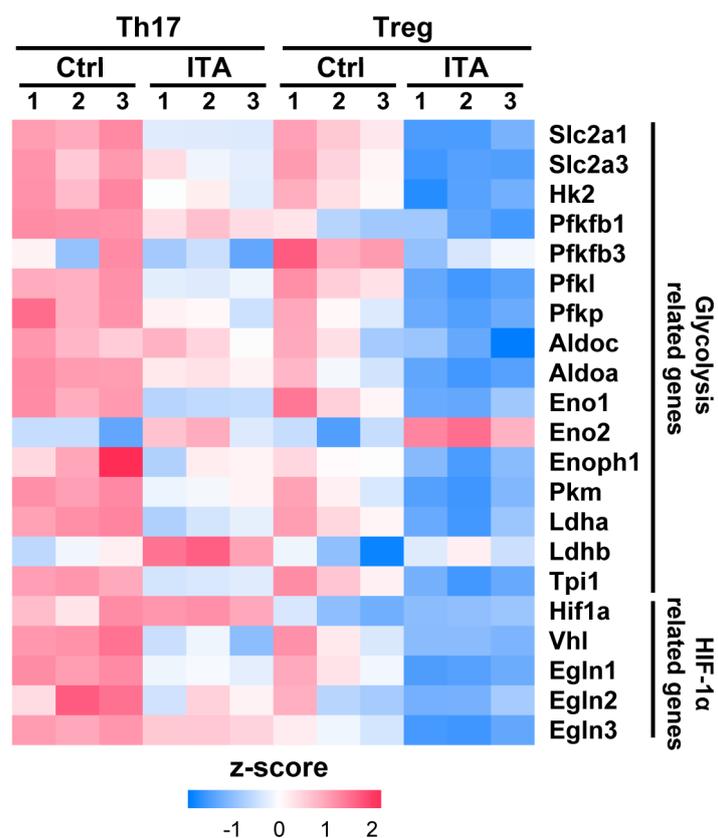


Figure 12. 主要な pathway における遺伝子セットのヒートマップ。  
 Th17 群と Treg 群において、イタコン酸 (ITA) により共通して発現変動がみられる遺伝子に対して Gene ontology 解析を行った結果、上位に抽出された 'Glycolysis', 'HIF-1 signaling pathway' の遺伝子セットについて、遺伝子発現をヒートマップで示した。ヒートマップは FPKM を用いて算出した z-score で示した。

### 4.5.3 結論

RNA-seq を用いることで, ITA によって Th17, Treg とともに複数の代謝経路に関わる遺伝子の変動していることを確認した. 特に両群において解糖系酵素に関わる遺伝子の全体的な発現低下が生じており, これは既報において ITA によってマクロファージにみられた解糖系抑制とも矛盾しない結果であった (Qin et al., 2019).

HIF-1 $\alpha$  は解糖系の制御因子であり, CD4<sup>+</sup>T 細胞で欠損させることで Th17 分化が抑制され, Treg 分化が促進されることが報告されている (Dang et al., 2011). 本研究では両群において *Hif1a* は ITA 投与により有意な変動は認めず, 一方で *Vhl*, *Egln1*, *Egln2* 及び *Egln3* といった HIF-1 $\alpha$  の分解に関わる遺伝子の発現低下を認めた (Figure 12) (McGettrick and O'Neill, 2020). 以上の結果から, Th17, Treg 分化において ITA は HIF-1 $\alpha$  非依存性に解糖系を抑制している可能性が示唆された.

## 4.6 イタコン酸による T 細胞内代謝への影響

RNA-seq の結果より, ITA によって Th17, Treg では解糖系酵素の遺伝子レベルでの発現低下を認めた一方で, 解糖系の制御因子である *Hif1a* の有意な発現変動は認めなかった. 我々はこの代謝制御の機序をさらに詳細に解明するため, 代謝機能や代謝産物の評価を行うこととした. 統計解析は GraphPad Prism (ver. 7.04; GraphPad Software, San Diego, CA, USA)を用いて行った.

### 4.6.1 方法

#### 4.6.1.1 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

8週齢の雌 B6 マウスから 4.3.2.1.に記載ある方法で ITA (0, 6 mM)の存在下で Th17, Treg に分化させた. 培養 2 日目に回収した細胞を用いて, 細胞内代謝をリアルタイムに計測できる細胞外フラックスアナライザー(Agilent Seahorse XFp Analyzer)を用いて glycolytic rate assay: 解糖系測定と mito stress test: ミトコンドリア機能測定を施行した. それぞれの assay による測定原理を Figure 13, 14 に示す.

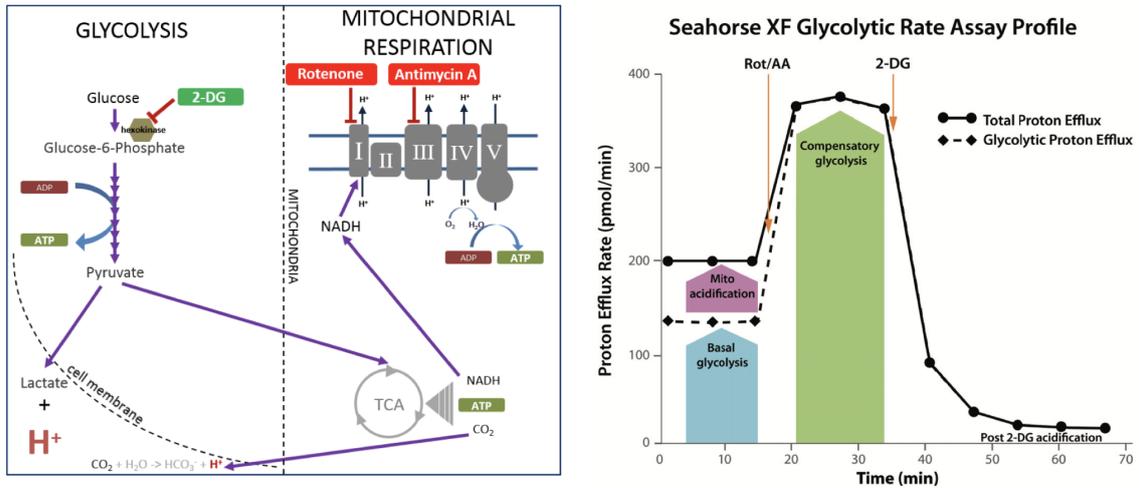


Figure 13. Glycolytic rate assay による解糖系測定の原理

Glycolytic rate assay ではグルコースが乳酸に分解される際に放出されるプロトンを検出して細胞外酸性化速度(extracellular acidification rate: ECAR)もしくは(glycolytic proton efflux rate: glyco PER)を測定することにより解糖系を評価する. 最初にグルコース, L-グルタミン及びピルビン酸を添加した Seahorse XF Glycolytic Rate Assay 培地で incubate した細胞の基礎解糖 (basal glycolysis)を記録する. 次に Rotenone/Antimycin A (Rot/AA: ミトコンドリア複合体 I 及び III の阻害剤)を添加し, ミトコンドリアによるプロトン放出を阻害することで, 代償的解糖 (compensatory glycolysis)を評価する. (<https://www.primetech.co.jp/products/tabid/90/pdid/119/language/ja-JP/Default.aspx> より引用一部改変).

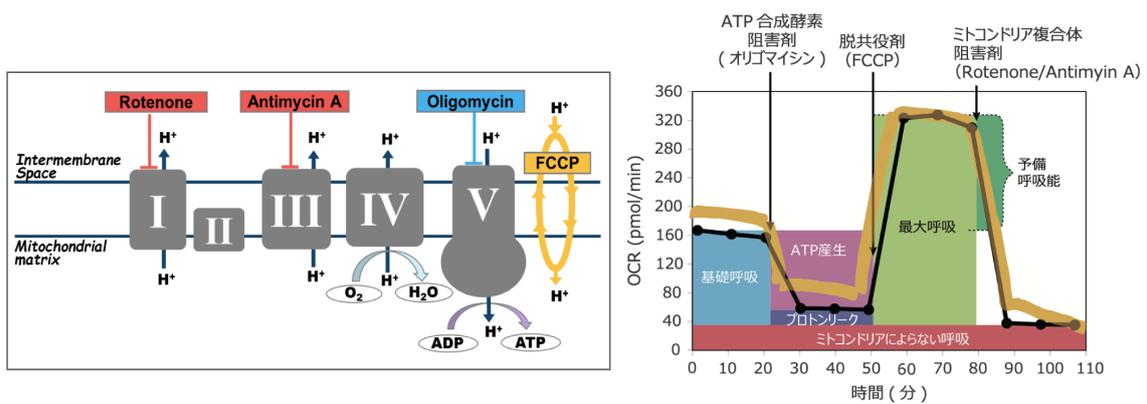


Figure 14. Mito stress test によるミトコンドリア機能

Mito stress test では酸素消費速度 (oxygen consumption rate: OCR)を測定することによりミトコンドリア機能を評価する. 最初に細胞の基礎呼吸 (basal glycolysis)を記録する. 次に oligomycin (ミトコンドリア複合体 V の阻害剤)を添加し, ミトコンドリアによる ATP 合成に関わるプロトンの流れを阻害することで ATP 産生 (ATP-linked respiration)を評価する. 最後にプロトン勾配を崩す Carbonyl cyanide-4 (trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP: 脱共役剤)を投与することにより, ミトコンドリア複合体 IV による酸素消費量を最大にすることで最大呼吸 (maximal respiration)を評価する.

(<https://www.primetech.co.jp/products/tabid/90/pdid/119/language/ja-JP/Default.aspx> より引用一部改変).

#### 4.6.1.2 フローサイトメトリーによる HIF-1 $\alpha$ の発現変動の評価

8週齢の雌 B6 マウスから 4.3.2.1.に記載ある方法で ITA (0, 6 mM)の存在下で Th17, Treg に分化させた. 培養 3 日目に回収した細胞を 4.3.2.2.に記載ある方法で処理・染色した. Th17 の細胞内染色に使用した蛍光標識抗体は, 抗 IFN- $\gamma$  抗体 (clone XMG1.2, Biologend), 抗 IL-17A 抗体(clone TC11-18H10.1, Biologend)及び抗 HIF-1 $\alpha$  抗体 (clone 241812, R&D Systems)であった. Treg 同定には, 細胞表面染色に抗 CD25 抗体 (clone 3C7, BD Biosciences), 細胞内染色に抗 Foxp3 抗体 (clone FJK-16s, eBioscience)及び抗 HIF-1 $\alpha$  抗体 (clone 241812, R&D Systems)をそれぞれ使用した. 4 °C, over night で静置, 洗浄後に BD FACSAria™ II (BD Biosciences)を用いてフローサイトメトリーを施行した.

#### 4.6.1.3 CE-TOF MS による細胞内代謝産物の評価 (メタボローム解析)

3匹の8週齢の雌 B6 マウスから 4.3.2.1.に記載ある方法で ITA (0, 6 mM)の存在下で Th17, Treg に分化させた (各細胞条件において 3 biological replicates). 培養 2 日目に回収した  $14 \times 10^6$  個の細胞を 10 ml の 5%マンニトール溶液で洗浄した後, 800  $\mu$ l のメタノールで処理し, 30 秒間ボルテックスして酵素を失活させた. 次に, 細胞抽出液を内部標準物質 (Human Metabolome Technologies) を含む 550  $\mu$ l の Milli-Q 水で処理し, さらに 30 秒間静置して抽出液を得て, 2,300 G, 4°Cで 5 分間遠心分離した後, 800  $\mu$ l の上清を 5 kDa カットオフフィルター (Milli-pore)で 9,100 G, 4°Cで 120 分間遠心濾過してタンパク質を除去した. 濾液を遠心濃縮し, 50  $\mu$ l の Milli-Q 水に再懸濁して, キャピラリー電気泳動装置を接続した飛行時間型質量分析装置 (capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry: CE-TOF MS)で代謝産物の測定を行った. サンプルは Human Metabolome Technologies 社で測定・解析した.

## 4.6.2 結果

### 4.6.2.1 解糖系, ミトコンドリア機能への影響

ITA を投与した Th17, Treg ではともに Glycolytic rate assay において基礎解糖 (basal glycolysis) と代償的解糖 (compensatory glycolysis) が非投与群と比較して有意に低下していた (Figure 15). また, 両群は Mito stress test においても基礎呼吸 (basal glycolysis), ATP 産生 (ATP-linked respiration) 及び最大呼吸 (maximal respiration) が非投与群と比較して有意に低下していた (Figure 16).

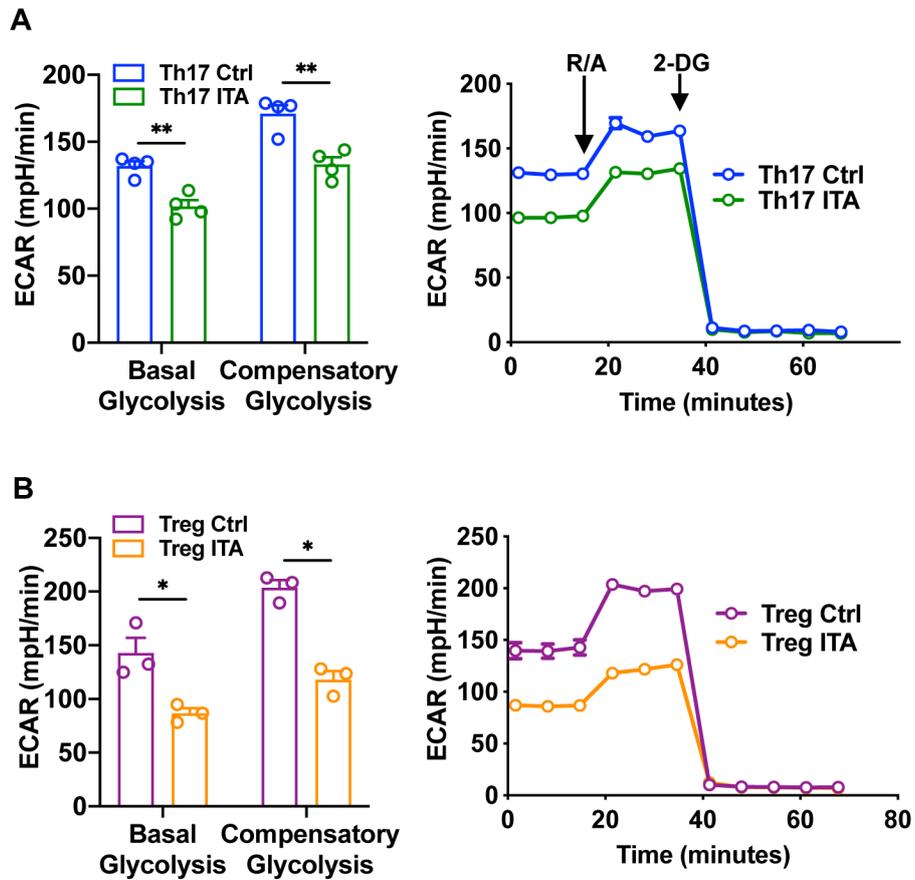


Figure 15. ITA 投与による Th17, Treg の解糖系の変化

A, B: B6 マウスの脾臓より抽出したナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞より分化させた Th17 (A), Treg (B)細胞において, イタコン酸 (ITA)の添加の有無による解糖系の変化を細胞外フラックスアナライザーにより細胞外酸性化速度(extracellular acidification rate: ECAR)を測定して評価した.

データは平均値±標準誤差で示した. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .  $p$ 値は two-tailed unpaired Student's t test を用いて算出した.

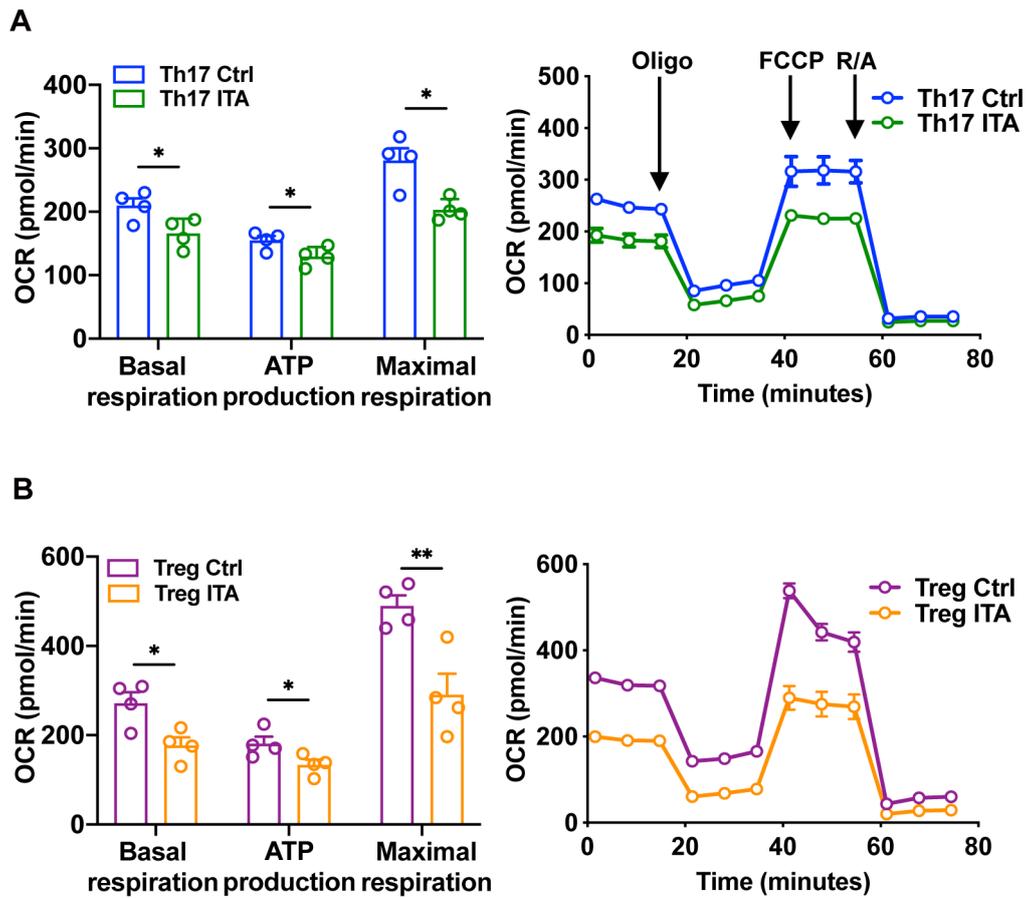


Figure 16. ITA 投与による Th17, Treg のミトコンドリア機能の変化

A, B: B6 マウスの脾臓より抽出したナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞より分化させた Th17 (A), Treg (B)細胞において, イタコン酸 (ITA)の添加の有無によるミトコンドリア機能の変化を細胞外フラックスアナライザーにより酸素消費速度 (oxygen consumption rate: OCR)を測定して評価した.

データは平均値±標準誤差で示した. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .  $p$ 値は two-tailed unpaired Student's t test を用いて算出した.

#### 4.6.2.2 HIF-1α の発現変動の評価

ITA を投与した Th17, Treg ではともに HIF-1α の発現が非投与群と比較して有意に上昇していた (Figure 17). これは RNA-seq における *Hif1a* が遺伝子レベルでの発現亢進と一致しており, 解糖系がその制御因子である HIF-1α 非依存性に抑制されていることを示唆する結果であった.

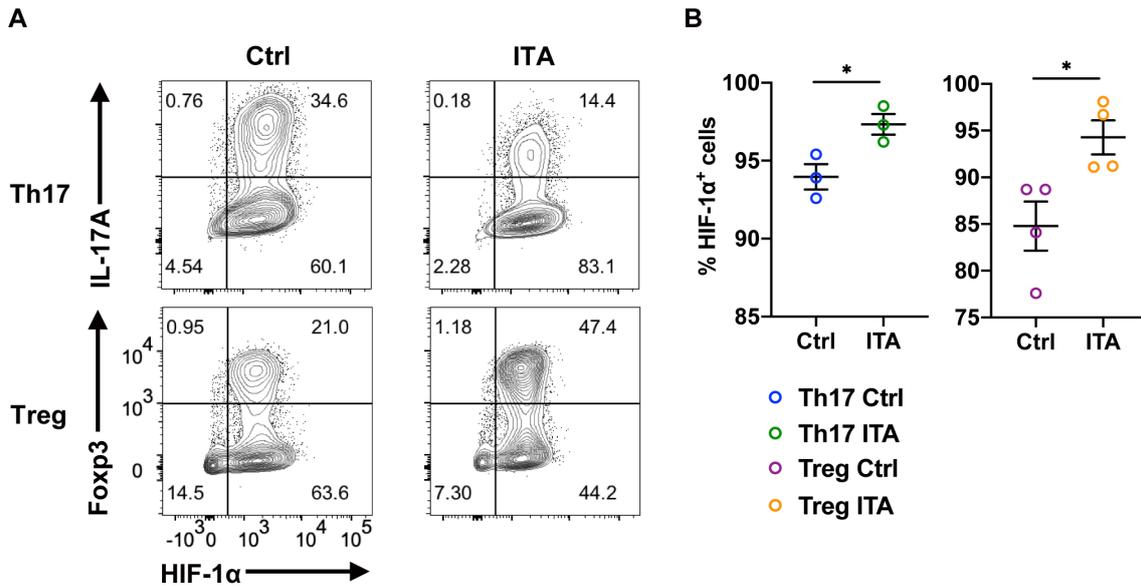


Figure 17. ITA 投与による Th17, Treg の HIF-1α 発現の変化

B6 マウスの脾臓より抽出したナイーブ T 細胞より分化させた Th17, Treg において, イタコン酸 (ITA) の添加の有無による HIF-1α の変化をフローサイトメトリーにより評価した. 代表的なプロット (A) と累積データ (B) を示す.

データは平均値±標準誤差で示した. \* $p < 0.05$ .  $p$  値は two-tailed unpaired Student's t test を用いて算出した. HIF-1α: hypoxia-inducible factor 1 alpha.

#### 4.6.2.3 解糖系, TCA 回路及びメチオニン代謝産物への影響

CE-TOF MS によって得られた細胞内代謝産物データの主成分分析(PCA)では Th17 (ITA 0, 6 mM)と Treg (ITA 0, 6 mM)の上位 2 主成分は PC1 48.1%, PC2 17.8% で説明された(Figure 18). 各サンプルの分布から ITA 投与/非投与群で Th17, Treg はそれぞれ異なる代謝産物プロファイルを有していることが示唆された. これまでの結果同様に解糖系の代謝産物は ITA を投与した Th17, Treg では減少する傾向を示した (Figure 19). また, TCA 回路では ITA 投与後の Th17, Treg で succinate の上昇と fumarate の減少を認め, 2-HG は Treg でのみ減少していた (Figure 20). メチオニン代謝では ITA 投与後の Th17, Treg で SAM が減少し, SAM と SAH の比 (SAM/SAH)は Th17 でのみ減少していた (Figure 20).

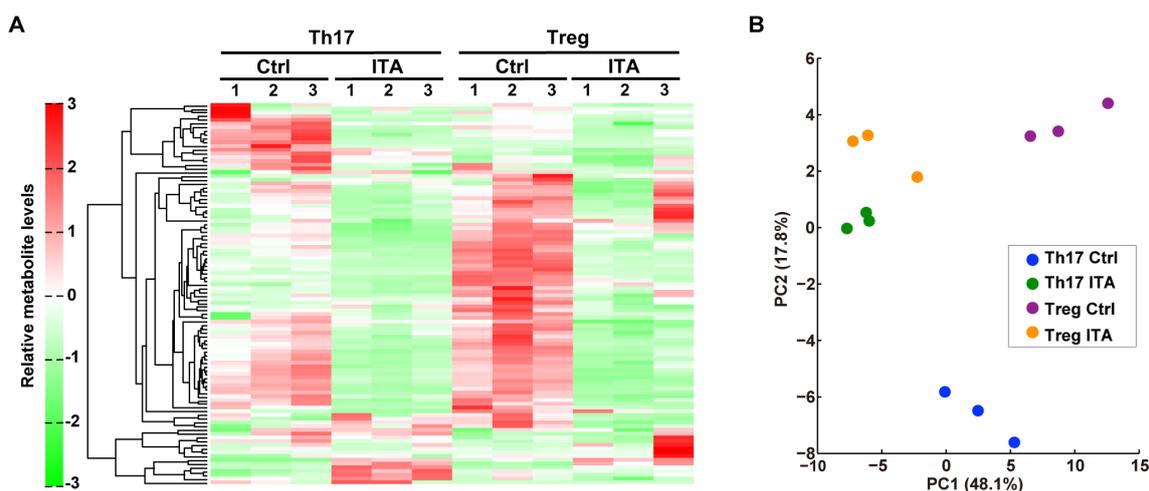


Figure 18. ITA による Th17, Treg 群の細胞内代謝産物のプロファイルの変動  
Th17 (イタコン酸: ITA 0, 6 mM)と Treg (ITA 0, 6 mM)の細胞内代謝産物を CE-TOF MS で解析した (各細胞条件において 3 biological replicates). A: 階層的クラスタ解析の結果をヒートマップで示す. B: 主成分分析 (PCA)の結果を示す. Relative metabolite levels: 検出されたピークの面積値を, 分析機器の感度補正及び細胞数などで補正した相対検出値.

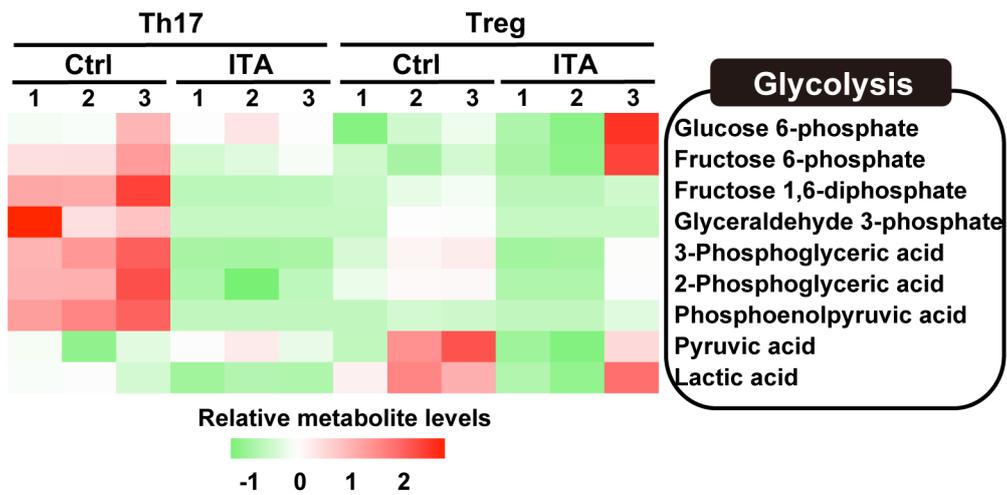


Figure 19. ITA 投与による Th17, Treg の解糖系代謝産物の変化

Th17 (イタコン酸: ITA 0, 6 mM) と Treg (ITA 0, 6 mM) の細胞内代謝産物を CE-TOF MS で解析した (各細胞条件において 3 biological replicates). 解糖系代謝産物の変動を示す. Relative metabolite levels: 検出されたピークの面積値を, 分析機器の感度補正及び細胞数などで補正した相対検出値.

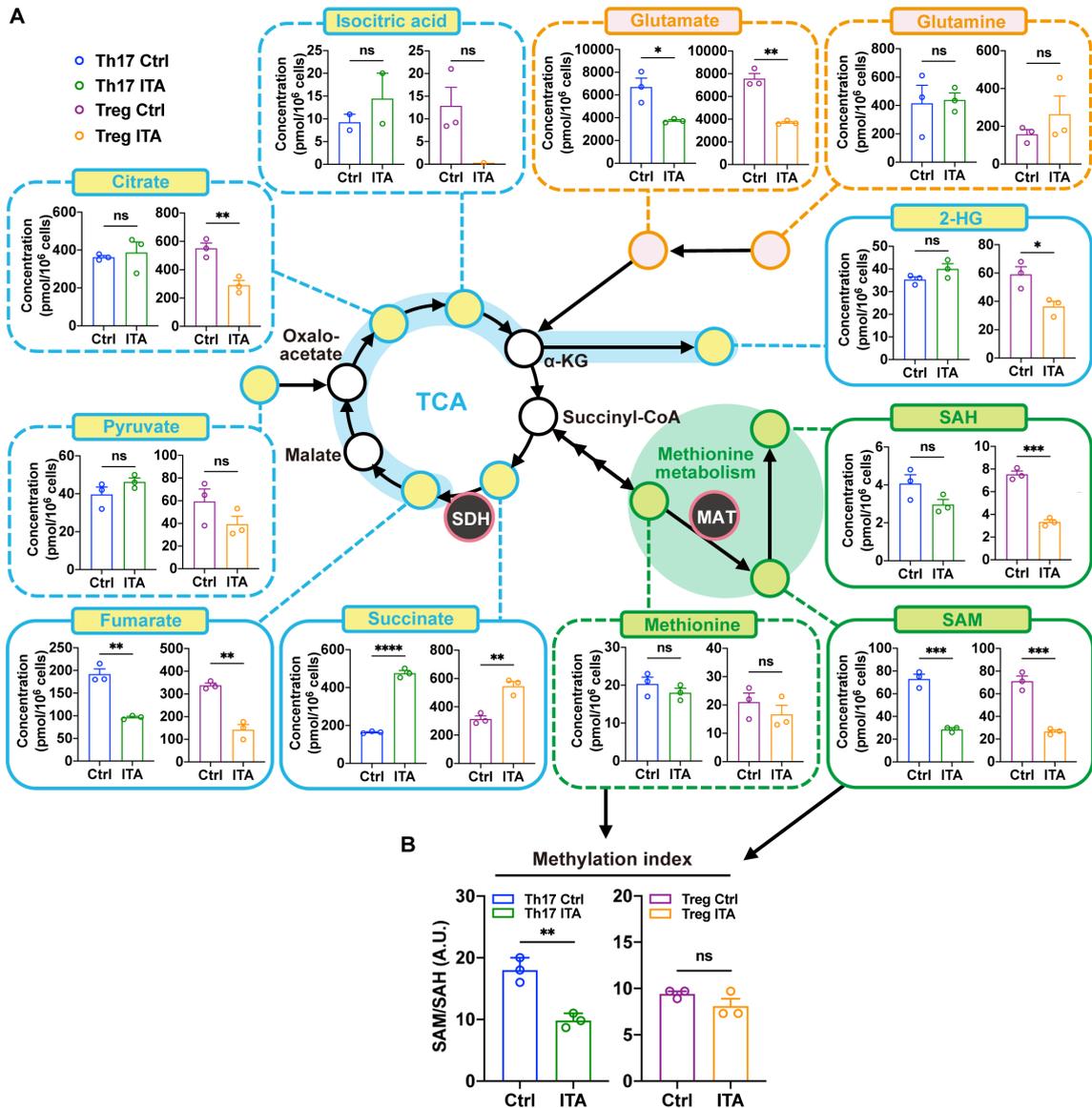


Figure 20. ITA 投与による Th17, Treg の TCA 回路及びメチオン代謝産物の変化  
 Th17(イタコン酸: ITA 0, 6 mM)と Treg (ITA 0, 6 mM)の細胞内代謝産物を CE-TOF MS  
 で解析した(各細胞条件において 3 biological replicates). A: TCA 回路及びメチオン代謝  
 産物の変動を示す. B: S-adenosyl-L-methionine (SAM)と S-adenosylhomocysteine  
 (SAH)の比 (SAM/SAH)を示す.

データは平均値±標準誤差で示した. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , ns: not  
 significant.  $p$ 値は two-tailed unpaired Student's t test を用いて算出した.

### 4.6.3 結論

細胞外フラックスアナライザーと CE-TOF MS を用いることで, ITA によって Th17, Treg とともに解糖系とミトコンドリア機能が低下し, その代謝産物が減少していることを確認した. 解糖系は HIF-1 $\alpha$  により促進されることが報告されている. ITA の添加により解糖系が抑制されているのにも関わらず, RNA-seq の結果と同様に HIF-1 $\alpha$  は蛋白レベルでも上昇しており, ITA による解糖系の抑制は HIF-1 $\alpha$  非依存性であることが示唆された. CE-TOF MS による解析では ITA を投与した両細胞群で succinate (コハク酸)が上昇し, fumarate (フマル酸)が減少していた. マクロファージにおける既報では, ITA は TCA 回路において succinate を fumarate に酸化する酵素である, コハク酸デヒドロゲナーゼ (succinate dehydrogenase: SDH)の酵素活性を阻害することが報告されている (Lampropoulou et al., 2016). SDH はミトコンドリア複合体 II としても知られており, ITA によるミトコンドリア機能抑制はこの酵素活性の阻害に起因していることが示唆された. さらに, ITA を投与した両細胞群でメチオニン代謝における SAM が減少し, SAM と SAH の比 (SAM/SAH)は Th17 で, 2-HG は Treg でのみ減少していた. ITA が SDH 酵素活性を阻害することを考慮し, 次章ではこれらの代謝産物の合成に関わる酵素活性に着目することとした.

## 4.7 イタコン酸による代謝関連酵素への影響

### 4.7.1 背景

一部の細胞内代謝産物はエピジェネティックな修飾を介して細胞の機能を制御する。Th17 分化において、メチオニン供給を制限することで、代謝産物かつ細胞内のメチル基供与体である SAM が減少した結果、*Il17a* 遺伝子のプロモーター領域においてヒストンの脱メチル化が生じ、Th17 の分化が抑制される (Roy et al., 2020)。また、メチオニンから SAM を合成する酵素であるメチオニンアデノシルトランスフェラーゼ (methionine adenosyltransferase: MAT) をノックダウンした細胞でも同様の現象が確認されている。Treg 分化においては、TCA 回路の代謝産物である 2-HG の合成酵素であるイソクエン酸デヒドロゲナーゼ (isocitrate dehydrogenase: IDH)-1 と IDH-2 をノックダウンすることにより、2-HG が減少し、*Foxp3* 遺伝子座の低メチル化が引き起こされ *Foxp3* の発現が上昇し、Treg の分化が促進することが知られている (Xu et al., 2017)。メタボローム解析の結果を踏まえ、ITA が Th17, Treg の分化を制御する機序として、これらの合成酵素の活性を阻害しているという仮説をたて検証を行なった。

## 4.7.2 方法

8週齢の雌 B6 マウスから 4.3.2.1.に記載ある方法で ITA (0, 6 mM)の存在下で Th17, Treg に分化させた. 培養 2 日目に回収した細胞を使用し, Methionine Adenosyltransferase Activity Assay Kit と Isocitrate Dehydrogenase Activity Colorimetric Assay Kit (いずれも Biovision)を用いて, 細胞内の MA T と IDH-1/2 の酵素活性を測定した. 吸光度測定には SpectraMax Paradigm (Molecular Devices)を用いた. 統計解析は GraphPad Prism (ver. 7.04; GraphPad Software, San Diego, CA, USA)を用いて行った.

下記式によりそれぞれの酵素活性を算出した.

$$\text{MAT specific activity} = \frac{B}{\Delta T \times P} \text{ (nmol/min/mg)}$$

*B*: the amount of metabolite produced, calculated from the Standard Curve (in nmol)

$\Delta T$ : the linear phase reaction time  $T_2 - T_1$  (in min)

*P*: the amount of protein added to the sample well (in mg)

$$\text{IDH1/2 activity} = \frac{B}{\Delta T \times V} \times \text{sample dilution factor (nmol/min/ml)}$$

*B*: the NAD(P)H amount, calculated from the Standard Curve (in nmol)

$\Delta T$ : the reaction time (in min)

*P*: the sample volume added to the reaction well (in ml)

### 4.7.3 結果

ITA を投与した Th17, Treg では非投与群と比較して MAT の酵素活性が有意に低下していた (Figure 21). 一方, IDH-1/2 の酵素活性は Treg でのみ低下がみられた (Figure 22).

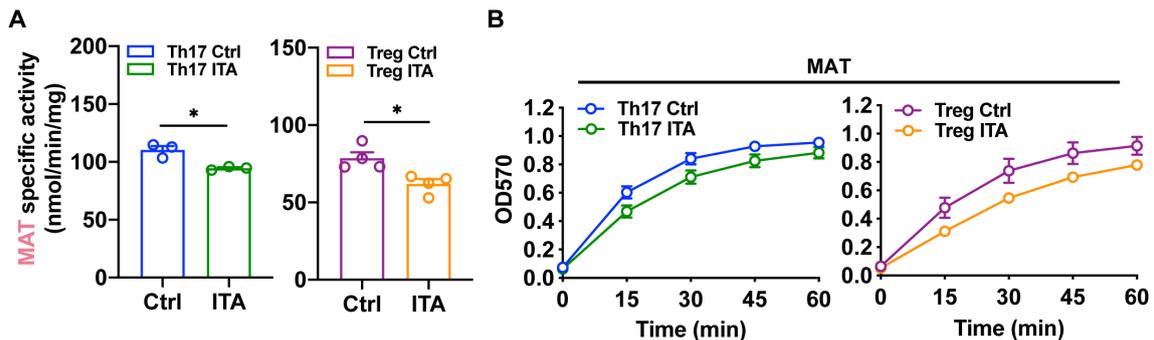


Figure 21. ITA 投与による MAT 酵素活性の変化

A: Th17 (イタコン酸: ITA 0, 6 mM) と Treg (ITA 0, 6 mM) におけるメチオニンアデノシルトランスフェラーゼ (methionine adenosyltransferase: MAT) の酵素活性を測定した. B: 経時的な吸光度測定を示す.

データは平均値±標準誤差で示した. \* $p < 0.05$ .  $p$  値は two-tailed unpaired Student's t test を用いて算出した.

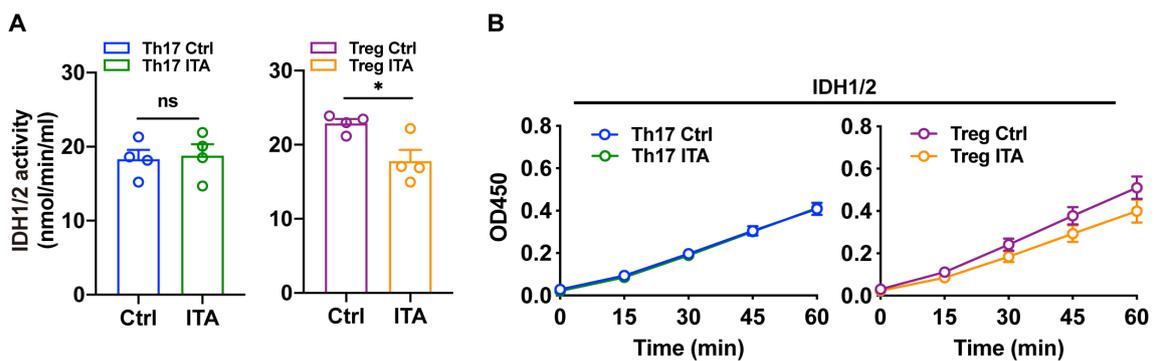


Figure 22. ITA 投与による IDH-1/2 酵素活性の変化

A: Th17 (イタコン酸: ITA 0, 6 mM) と Treg (ITA 0, 6 mM) におけるイソクエン酸デヒドロゲナーゼ (isocitrate dehydrogenase: IDH)-1 と IDH-2 の酵素活性を測定した. B: 経時的な吸光度測定を示す.

データは平均値±標準誤差で示した. \* $p < 0.05$ . ns: not significant.  $p$  値は two-tailed unpaired Student's t test を用いて算出した.

#### 4.7.4 結論

ITA は Th17 分化において, MAT の酵素活性を阻害することで SAM を減少させ, Treg 分化においては IDH-1/2 の酵素活性を阻害することで 2-HG を減少させることが示唆された. 本章の背景で言及したように, これらの代謝産物の変動は Th17, Treg 分化への関与が報告されており, 特に SAM/SAH は細胞のメチル化の状態と関連することから, ITA による SAM/SAH の低下がエピジェネティックな変化を与えていることが示唆された. また, Th17 分化を促進する重要な転写因子である ROR $\gamma$ t は Th17 分化が ITA によって強く抑制されているにもかかわらず mRNA・蛋白レベルで上昇を認めていた (Figure 2, 3). ROR $\gamma$ t は *Il17a* 遺伝子のプロモーター領域に結合して IL-17A 発現を促進することが知られており, 我々は同領域における ROR $\gamma$ t の結合率に着目することとした.

## 4.8 イタコン酸による Th17 の *Il17a* プロモーター領域における ROR $\gamma$ t 結合率への影響

### 4.8.1 背景

SAM は細胞内のメチル基供与体であり、複数のメチル基転移酵素が SAM 依存性にメチル基を転移し、DNA メチル化等を介して遺伝子発現を制御している (Lu and Thompson, 2012). SAM はメチル基転移後に SAH に変換されることから、SAM と SAH の比 (SAM/SAH) は細胞内のメチル化の度合いを示す尺度と考えられている (Mentch et al., 2015). メチオニンを制限することで SAM 合成が減少し、*Il17a* のプロモーター領域において、転写活性化に働く H3K4me3 のメチル化が低下することで IL-17A 発現が低下することが報告されている (Roy et al., 2020). 一方で、同報告では細胞全体でみたときに、H3K27me3 といった転写抑制に働くヒストン修飾も同様に低下することを示している。*Il17a* のプロモーター領域においてメチオニン制限による H3K4me3 以外のヒストン修飾の変化については確認されておらず、厳密に個々のヒストン修飾がどの程度遺伝子発現に関与しているかは明らかにされていない。本研究では ITA を投与した Th17 では非投与群に比して SAM/SAH が減少していた。また、Th17 分化を促進する重要な転写因子である ROR $\gamma$ t の発現が亢進していたことから、SAM 減少により生じたヒストン修飾が転写因子の DNA への結合を制限することにより IL-17A 発現を抑制しているという仮説を立てた。

## 4.8.2 方法

8週齢の雌 B6 マウスから 4.3.2.1.に記載ある方法で ITA (0, 6 mM)の存在下で Th17, Treg に分化させ, 培養 2 日目に細胞を回収した. クロマチン免疫沈降 (Chromatin immunoprecipitation: ChIP)は MAGnifty™ Chromatin Immunoprecipitation System (Thermo Fisher Scientific)を用いて, プロトコール通り施行した. 免疫沈降に用いた抗体は, 抗 ROR $\gamma$ t 抗体 (clone AFKJS-9, eBioscience) と IgG control (clone eBR2a, eBioscience)であった. クロマチン免疫沈降した DNA に対して, SYBR Green を用いた qPCR を行い, %Input を算出した. 測定には 7500 Fast Realtime PCR system (Applied Biosystems)を用いた. ROR $\gamma$ t 結合領域を含む *Il17a* のプロモーター領域のプライマーとして既報 (Endo et al., 2015)で報告されている配列を使用した.

Forward: 5' CAGCTCCCAAGAAGTCATGC 3'

Reverse: 5' GCAACATCTGTCTCGAAGGTAG 3'

%Input は下記の式より算出した.

$$\%Input = 2^{\times} [(Ct\ input - \log_2(\text{希釈倍率})) - Ct\ sample] \times 100$$

### 4.8.3 結果

ITA を投与した Th17 では, *Il17a* promoter 領域における ROR $\gamma$ t の結合率が非投与群に比して有意に低下していた (Figure 23). この結果は, 転写因子の DNA への結合を制限することにより IL-17A 発現を抑制しているという仮説を支持し, ROR $\gamma$ t の発現が亢進していたにも関わらず, IL-17A 発現が低下していた理由を説明しうると考えた.

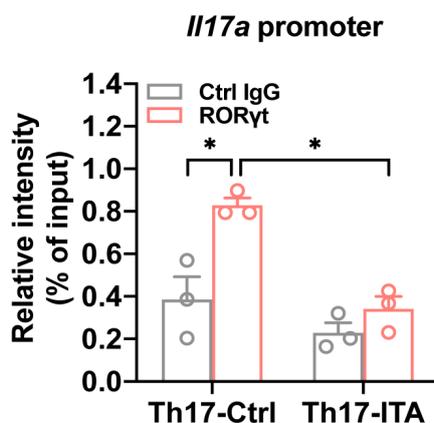


Figure 23. ITA 投与後の *Il17a* プロモーター領域における ROR $\gamma$ t 結合率

イタコン酸 (ITA) を投与した Th17 の *Il17a* promoter 領域における ROR $\gamma$ t の結合率を ChIP-qPCR を用いて評価した.

データは平均値±標準誤差で示した. \* $p < 0.05$ .  $p$  値は one-way ANOVA 検定後に Bonferroni 検定を行って算出した. ROR $\gamma$ t: retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma.

## 4.9 考察

本研究で我々は、T 細胞分化において、ITA が細胞内代謝を再構成し、主要な代謝産物を変動させることによって遺伝子発現を調整して Th17 の分化を抑制し、Treg の分化を促進することを示した。ITA の修飾を受けた Th17 は実験的自己免疫性脳脊髄炎の移入モデルマウスにおいて、その疾患活動性を抑制した。

これまでに解糖系やグルタミン代謝、メチオニン代謝を抑制することで細胞内代謝及びエピジェネティックな再構成が生じ、Th17, Treg 分化が制御されることは複数の既報で報告されていた (Geltink et al., 2018; Kono et al., 2019; Roy et al., 2020; Xu et al., 2017). しかし、これらの複数の代謝経路が互いに独立して制御されているかは不明なままであった。Rapamycin complex 1 (mTORC1)-HIF-1 $\alpha$  経路は解糖系を介して Th17, Treg 分化を制御する最も有力な候補の一つであり、HIF-1 $\alpha$  は Th17 において ROR $\gamma$ t 及び p300 と複合体を形成し、Il17a のプロモーター領域へのリクルートを促進することで Th17 の分化を促進し、一方で Treg においては、HIF-1 $\alpha$  は Foxp3 と結合することにより、プロテアソームによる Foxp3 の分解を促すことで Treg への分化を抑制する (Dang et al., 2011). 今回、我々は ITA が Th17, Treg 分化において解糖系を抑制する一方で HIF-1 $\alpha$  発現が上昇していることを確認したことで、別の代謝メカニズムが分化に影響を与えている可能性を想定した。

細胞内代謝産物が T 細胞の機能に影響を与えるという考えは複数の既報で支持されている。SAM の合成酵素である MAT をノックダウンすることで、メチル基供与体である SAM が減少した結果、Il17a 遺伝子のプロモーター領域においてヒストンの脱メチル化が生じ、Th17 の分化が抑制される (Roy et al., 2020). また、2-HG の合成酵素である IDH-1/2 をノックダウンすることで TCA 回路の代謝産物である 2-HG の減少による Foxp3 遺伝子座の低メチル化が引き起こされ、Treg の分化が促進することが知られている (Xu et al., 2017). 今回の研究では ITA の投与により SAM/SAH は Th17 で減少し、2-HG は Treg で減少することを明らかにした。また、ITA はマクロファージにおいて SDH の酵素活性を阻害することが確認されている (Lampropoulou et al., 2016). 我々はこの作用に着目し、MAT と IDH-1/2 の酵素活性が ITA により阻害されていることを明らかにした。

代謝産物はエピゲノム関連酵素の基質や補因子としての側面も有している。DNA/ヒストンのメチル基転移酵素は SAM を反応基質とし、メチル基を DNA やヒストンに転移させる (Kouzarides, 2007). メチオニンを制限することで SAM 合成が減少し、Il17a のプロモーター領域において、転写活性化に働く H3K4me3 のメチル化が低下するこ

とで IL-17A 発現が低下することが報告されている (Roy *et al.*, 2020). 一方で, 細胞全体でみたときに H3K27me3 といった転写抑制に働くヒストン修飾も同様に低下するため, 厳密に個々のヒストン修飾がどの程度遺伝子発現に関与しているかは明らかにされていない。本研究では ITA を投与した Th17 では SAM/SAH が減少し, Th17 分化を促進する転写因子である ROR $\gamma$ t や HIF-1 $\alpha$  の発現が亢進していたことから, ヒストン修飾自体が転写因子の結合を制限することにより IL-17A 発現を抑制しているという仮説を立て, ITA が *Il17a* promoter 領域における ROR $\gamma$ t の結合率を低下することを明らかにした (Figure 24).

我々の研究にはいくつかの limitation が存在する。本研究では SAM や 2-HG といった一部の代謝産物に着目したが, ITA が T 細胞の分化に影響を与える他の転写因子や遺伝子を制御している可能性も残る。また, ITA による *in vivo* での T 細胞に対する作用を検証するために tEAE モデルを採用したが, 今後は ITA の血中半減期や細胞移行性も考慮した, より生理的なモデルでの有効性の検証が望まれる。

本研究は代謝産物である ITA の投与をすることにより, Th17/Treg imbalance を是正できる可能性を示した。これまでに多く報告された遺伝子操作によるアプローチと比較して生理的で, かつ抗細菌/ウイルス作用を有し, より特異的な免疫異常をターゲットにしているという点から実臨床においても応用が望まれる。今後は ITA を生体内でより正確に細胞へ届けるシステムの構築を目指して本研究を発展させていく所存である。

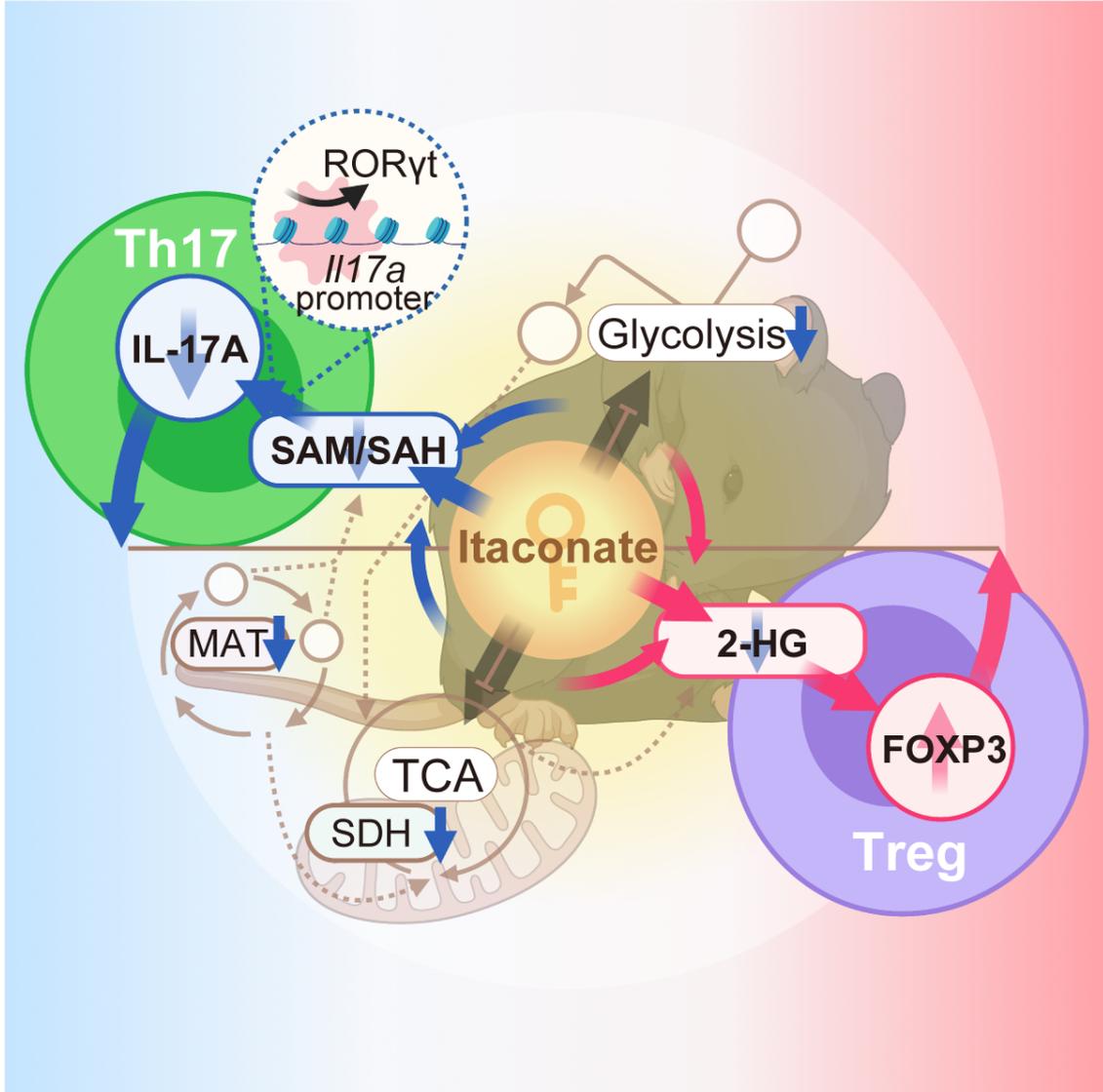


Figure 24. 第一章の図解要旨

## 4.10 結語

ITA 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 分化を促進した。ITA の修飾を受けた Th17 は EAE の移入モデルマウスにおいて、その疾患活動性を抑制した。Th17/Treg imbalance を背景にもつ自己免疫疾患の治療候補として、ITA の臨床応用に向けた更なる発展が期待される。

## 5. 第二部

# 全身性エリテマトーデスにおける抗 gAChR $\alpha$ 3 抗体の臨床的意義の検討

## 5.1 緒言

SLEはTh17/Treg imbalanceとB細胞の過剰な活性化を背景として種々の自己抗体を産生し、多臓器症状を伴う自己免疫性疾患である (Fanouriakis et al., 2021; Kono et al., 2014; Yasuda, 2019). 自己抗体の中にはSLEの特定の臨床症状・病態と強く関連するものが存在する (Mader et al., 2018). それらの特異的自己抗体は、疾患の理解を深めるだけでなく、早期診断・治療のバイオマーカーとなり得る.

ニコチン性アセチルコリン受容体 (AChR)は、9個の $\alpha$  subunit ( $\alpha 1$ – $\alpha 9$ )と4個の $\beta$  subunit ( $\beta 1$ – $\beta 4$ )を含む複数のsubunitから構成されており、これらのsubunitの組み合わせにより、異なる特性が付与されている (Albuquerque et al., 2009; Gharpure et al., 2019). 2個の $\alpha 3$  subunitと3個の $\beta 4$  subunitからなるAChR (gAChR)は、自律神経節に多く存在し、中枢神経系と末梢神経系を繋げる重要な役割を果たしている (Gharpure et al., 2019). 過去にgAChRに対する自己抗体 (抗gAChR抗体)は特発性ニューロパチーの患者血清においてradio-immunoprecipitation assayを用いることにより同定されている (Vernino et al., 2000). この自己抗体は、細胞表面に存在するgAChRの細胞質内への移行を誘導し、シナプス伝達を阻害して自律神経機能障害を引き起こす (Kobayashi et al., 2013; Lennon et al., 2003). また、その抗体価は、自律神経失調症の重症度と相関しており、自律神経症状の改善に伴って抗体価が減少することも確認されている (Vernino et al., 2000). さらに、gAChR  $\alpha 3$  subunit (gAChRa3)を欠損させた動物モデルでは消化管症状を呈することが明らかとなっている (Xu et al., 1999). 近年、gAChRa3に対する特異的自己抗体 (抗gAChRa3抗体)を検出するLIPS assayが開発された (Nakane et al., 2015). この測定系を用いて、全身性強皮症 (systemic sclerosis: SSc), シェーグレン症候群, SLEなど複数の自己免疫性疾患で抗gAChRa3抗体の存在が確認されている (Imamura et al., 2020). 特に同抗体価が高いSSc患者は、低い患者に比して消化器症状を高頻度で呈したと報告されている (Nakane et al., 2020). 一方で、SLEにおける抗gAChRa3抗体の臨床的意義は未だ不明である. 従って、我々はSLEにおける抗gAChRa3抗体の役割を探索することとした.

## 5.2 研究の目的

本研究の目的は, SLE における抗 gAChR $\alpha$ 3 抗体の臨床的意義を検討することである.

## 5.3 患者と方法

### 5.3.1 研究デザインと対象

本研究は後ろ向き観察研究である。通常診療における SLE 患者の診療記録から臨床情報を収集し、過去に血清を保存している患者を対象とした。本研究はヘルシンキ宣言と臨床研究の基本理念に従い、北海道大学病院の倫理委員会の承認のもとに行った(研究番号 019-0389)。

2006 年 1 月から 2019 年 12 月までに北海道大学病院内科 II で診断された成人発症の SLE 患者を対象とした (Aso et al., 2020)。SLE の診断はアメリカリウマチ学会の分類基準に基づき行われた (Hochberg, 1997)。患者血清は過去に SLE の疾患活動性を有する時点において、研究への同意取得とともに採取され、解析まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存された。解析には、血清が保存されていない、もしくは観察期間が 1 年未満の患者を除外した (Figure 25)。

横断的解析により抗 gAChR $\alpha$ 3 抗体とループス腸炎 (lupus enteritis: LE) との強い相関関係が認められたため、続いて観察期間内における LE の発症・再燃に関する情報を収集した。観察期間は初回の血清保存時から死亡もしくは最終受診日と定義した。観察期間中に確認された LE イベントについては、血清保存時に LE を有していなかった患者に生じた場合を‘発症’、血清保存時に LE を有していた患者に生じた場合を‘再燃’と定義した。抗 gAChR $\alpha$ 3 抗体価の経時的評価は、初回血清保存時に LE を有していて、かつ観察期間内に追加血清保存を行った患者に限って施行した (Figure 25)。

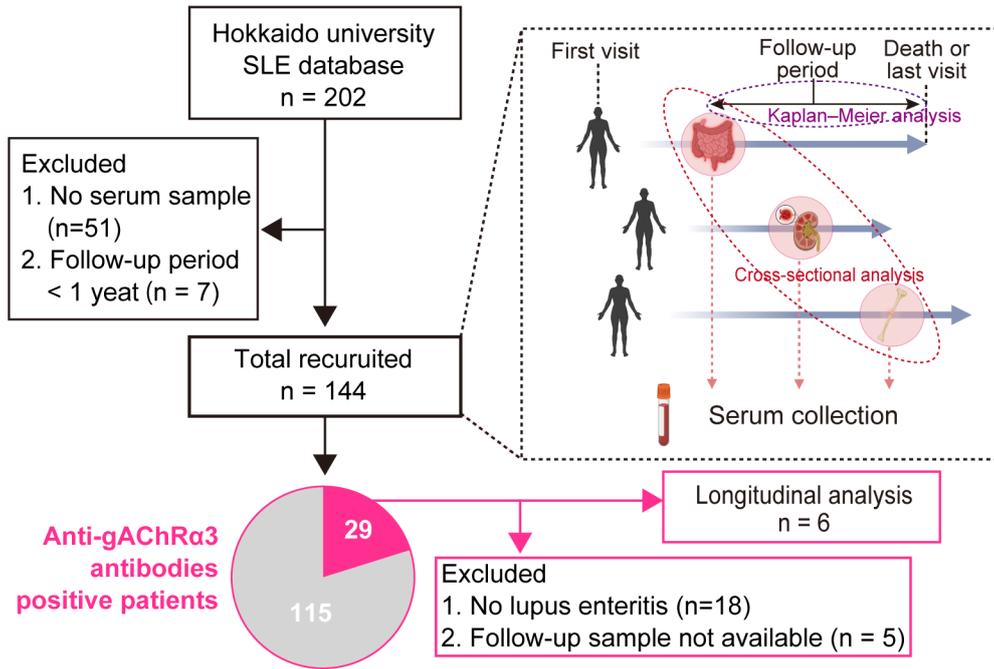


Figure 25. 第二章の研究全体像

## 5.3.2 評価項目

### 5.3.2.1 臓器病変と検査所見

ベースラインの臨床情報は、初回の血清保存時のデータを用いた。臨床検査では抗 double stranded DNA (dsDNA)抗体, 抗 Ro/SSA 抗体, 抗リン脂質抗体 [次のいずれかの抗体をもって陽性と判断した: ループスアンチコアグラント, 抗カルジオリピン体 (IgM, IgG), 抗  $\beta 2$  グリコプロテイン I 抗体 (IgM, IgG)] , 及び補体価 (C3, C4)を評価し, 血清保存時に有していた各臓器病変と併せて SLE の疾患活動性の評価指標の一つである systemic lupus erythematosus disease activity index 2000 (SLEDAI-2K)を計測した。LE は次の 3 つの基準を全て満たすことを選択基準とした: (a) 消化器症状を有する, (b) 治療に免疫抑制療法を有した, (c) 次に示す CT 所見の内, 少なくとも 3 つを有する: dilatation of intestinal segments, bowel wall thickening, target sign, engorgement of mesenteric vessels, and increased attenuation of mesenteric fat (Figure 26).

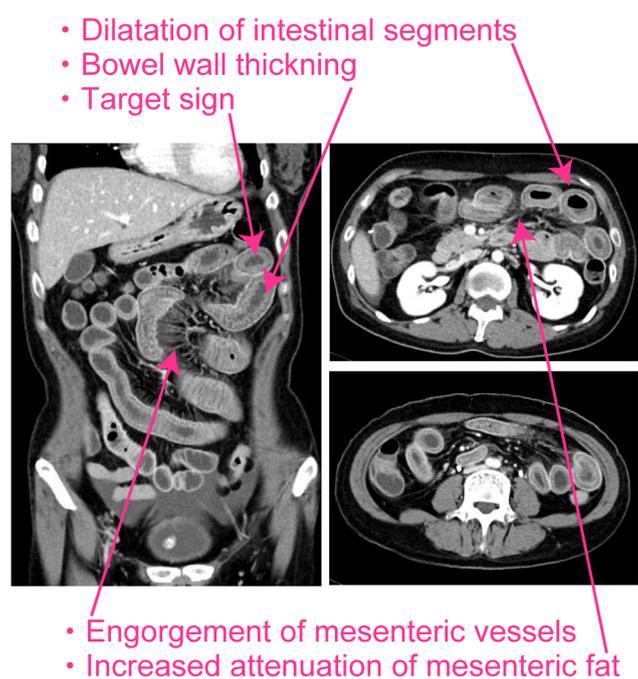


Figure 26. 代表的なループス腸炎の CT 所見

### 5.3.2.2 抗 gAChR $\alpha$ 3 抗体の評価

抗 gAChR $\alpha$ 3 抗体は luciferase immunoprecipitation system (LIPS) assay を用いて, コスミックコーポレーション (Tokyo, Japan)において既報に沿って測定された (Nakane et al., 2015). 抗体の測定は患者の臨床情報を不可視化した上で施行された. 抗体価は activity ratio (A.R.)で表示され, 下記のように算出された.

A.R. = (measured relative luminescence unit [RLU] value for the serum)/ [the RLU of CHRNA3 Ab: 商業ベースの抗 gAChR $\alpha$ 3 抗体 (abcam, ab183097)]

抗体のカットオフは 100 名の健常人の同抗体価データの平均値 + 4 standard deviations (SD)と定義し, 0.585 に決定された.

### 5.3.3 統計解析

初回血清保存時の臨床情報に関して抗 gAChR $\alpha$ 3 抗体陽性群と陰性群間で統計解析を施行した. 連続変数は Mann–Whitney の U 検定, もしくは Wilcoxon の符号順位検定で解析され, 名義変数は Fisher の正確検定を用いて解析された. 多重比較には ANOVA 後に Bonferroni の検定を行った. また, LE の予測因子を同定するため, 単変量および多変量のロジスティック回帰分析を施行した. 多変量解析に用いる変数は単変量解析で有意であったものおよび既報においてリスク因子であると報告されているものを選択した. LE 発症または再燃までの期間に関するデータは Kaplan–Meier 曲線と log–rank 検定を用いて解析された. すべての検定で,  $p$  値が 0.05 未満を統計的有意とした. 統計解析は JMP(ver. 13.0; SAS Institute, Cary, NC, USA) および GraphPad Prism (ver. 7.04; GraphPad Software, San Diego, CA, USA)を用いて行った.

## 5.4 結果

### 5.4.1 患者背景

202 例の SLE 患者のうち, 144 例が研究に組み込まれた. 対象患者の臨床情報, 検査所見を Table 1 に示した. 患者の大半は女性 (89.5%) であり, 血清保存時の年齢中央値は 36 歳 [四分位範囲 (interquartile range: IQR) 30–47 歳] であり, 観察期間の中央値は 6.9 年 (IQR 2–11 年) であった. 血清保存時に活動性を有していた臓器病変の割合は, 腎炎 (45.8%), 精神神経障害 (31.9%), 抗リン脂質抗体症候群 (22.2%), 心膜炎 / 胸膜炎 (18.8%), 腸炎 (14.6%) であった. 抗 gAChR $\alpha$ 3 抗体は 29 例 (20.1%) で陽性であった.

Table 1. 初回血清保存時の患者背景

	全SLE患者 (n=144)
性別 (女性), n(%)	129 (89.5)
年齢, 歳	36 (30.0–47.7)
観察期間, 年	6.9 (2.0–11.0)
SLEDAI-2Kスコア	11.5±8.1
SLEの臓器病変, n(%)	
腎炎	66 (45.8)
精神神経障害	46 (31.9)
腸炎	21 (14.6)
膀胱炎	8 (5.5)
心膜炎/胸膜炎	27 (18.7)
関節炎	76 (52.7)
蝶形紅斑/円盤状皮疹	71 (49.3)
脱毛	18 (12.5)
口腔内/鼻腔内潰瘍	18 (12.5)
抗リン脂質抗体症候群	34 (23.6)
溶血性貧血	9 (6.2)
白血球減少	60 (41.6)
血小板減少	42 (29.1)
検査所見	
抗dsDNA抗体, n(%)	106 (73.6)
抗Ro/SSA抗体, n/total n(%)	78/138 (56.5)
抗リン脂質抗体, n/total n(%)	54/137 (39.4)
抗gAChR $\alpha$ 3抗体, n(%)	29 (20.1)
補体 C3 < 86, mg/dl, n(%)	113 (78.4)
補体 C4 < 17, mg/dl, n(%)	116 (80.5)
過去の治療, n(%)	
GC + IVCY	26 (18.0)
GC + Tac/CyA	11 (7.6)
GC + MMF	5 (3.4)
GC単剤	95 (65.9)

連続変数は中央値(第 1, 第 3 四分位)または平均値 (標準偏差)で示した. 名義変数は n (%)で表記し, 欠損データがある場合は, n/total n(%)と表記した.

GC: glucocorticoid; IVCY: Intravenous cyclophosphamide; Tac: tacrolimus; CyA: cyclosporin; MMF: mycophenolate mofetil. C3 正常値: 86–160 mg/dl, C4 正常値: 17–45 mg/dl.

#### 5.4.2. 抗 gAChRa3 抗体陽性群と陰性群の臨床像の比較

抗 gAChRa3 抗体陽性群と陰性群間で年齢, 観察期間, 過去の治療歴に有意な差はなかった. 一方, 抗 gAChRa3 抗体陽性群では LE (37.9% vs. 8.7%,  $p < 0.001$ )と C3 低下 (93.1% vs 74.6%,  $p = 0.018$ )が抗体陰性群に比して, 高頻度に認められた (Table 2). その他の臓器症状の分布は両群間で有意な差はなかった. 加えて, LE を有する患者の抗 gAChRa3 抗体価の平均値は, 他の臓器症状を有する患者の平均値よりも有意に高値であった (Figure 27).

Table 2. 抗gAChR $\alpha$ 3抗体陽性と陰性群の臨床像の比較

	抗gAChR $\alpha$ 3抗体		p値
	陽性 (n=29)	陰性 (n=115)	
性別 (女性), n(%)	26 (89.7)	103 (89.5)	0.988
年齢, 歳	39 (29.5–47.5)	36 (30.0–49.0)	0.770
観察期間, 年	6.9 (1.4–11.9)	6.9 (2.3–10.2)	0.614
SLEの臓器病変, n(%)			
腎炎	16 (55.2)	50 (43.5)	0.259
精神神経障害	8 (27.6)	38 (33.0)	0.569
腸炎	11 (37.9)	10 (8.7)	<0.001
膀胱炎	3 (10.3)	5 (4.4)	0.242
心膜炎/胸膜炎	6 (20.6)	21 (18.3)	0.766
関節炎	16 (55.2)	60 (52.2)	0.772
蝶形紅斑/円盤状皮疹	17 (58.6)	54 (47.0)	0.260
脱毛	5 (17.2)	13 (11.3)	0.404
口腔内/鼻腔内潰瘍	4 (13.8)	14 (12.2)	0.815
抗リン脂質抗体症候群	6 (20.7)	26 (22.6)	0.823
溶血性貧血	1 (3.5)	8 (7.0)	0.456
血小板減少	10 (34.5)	32 (27.8)	0.486
検査所見			
抗dsDNA抗体, n(%)	22 (75.9)	84 (73.0)	0.756
抗Ro/SSA抗体, n/total n(%)	19/28 (67.9)	59/110 (53.6)	0.170
抗リン脂質抗体, n/total n(%)	11/28 (39.3)	43/109 (39.5)	0.987
補体 C3 < 86, mg/dl, n(%)	27 (93.1)	86 (74.8)	0.018
補体 C4 < 17, mg/dl, n(%)	26 (89.7)	90 (78.3)	0.142
過去の治療, n(%)			
GC + IVCY	6 (20.6)	20 (17.3)	0.683
GC + Tac/CyA	2 (6.9)	9 (7.8)	0.864
GC + MMF	1 (3.4)	4 (3.4)	0.993
GC単剤	19 (65.5)	76 (66.0)	0.953

連続変数は中央値(第1, 第3四分位)または平均値(標準偏差)で示した. 名義変数はn(%)で表記し, 欠損データがある場合は, n/total n(%)と表記した.

GC: glucocorticoid; IVCY: Intravenous cyclophosphamide; Tac: tacrolimus; CyA: cyclosporin; MMF: mycophenolate mofetil. 連続変数はMann-WhitneyのU検定で解析され, 名義変数はFisherの正確検定を用いて解析された. C3正常値: 86–160 mg/dl, C4正常値: 17–45 mg/dl.

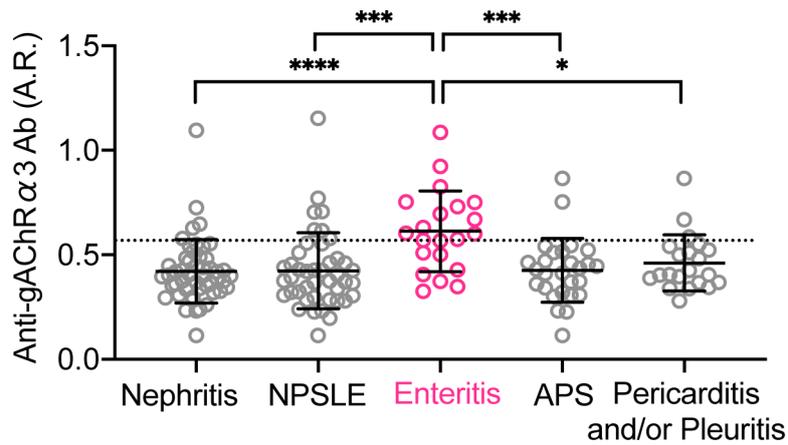


Figure 27. 各臓器症状を有する患者の抗 gAChRα3 抗体価の比較

抗 gAChRα3 抗体価を LIPS assay を用いて測定した. 点線はカットオフ (100 名の健常人データの平均値+4 SD)を示す. エラーバーは平均値 (標準偏差)を示す. 多重比較のため ANOVA 後に Bonferroni の検定を行った. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

### 5.4.3. ループス腸炎の疾患活動性と抗 gAChR $\alpha$ 3 抗体の相関

血清保存時に LE を有し、免疫抑制治療による寛解導入後に追加血清保存を行った 6 例に対し (Figure 25), 追加血清で抗 gAChR $\alpha$ 3 抗体を再測定して、抗体価の変化を比較した. 抗 gAChR $\alpha$ 3 抗体価は免疫抑制治療による寛解導入後に有意に減少した (Figure 28).

次に、ロジスティック回帰分析を用いて、関連する共変量や潜在的交絡因子を調整し、抗 gAChR $\alpha$ 3 抗体と LE の関連を探索した. 単変量ロジスティック回帰分析では、初回血清保存時におけるループス腎炎、ループス膀胱炎、白血球減少、抗 gAChR $\alpha$ 3 抗体が LE の予測因子として検出された (Table 3). 続いてこれらの因子に年齢を調整因子として加えた変量を用いて多変量解析を施行した. 多変量ロジスティック回帰分析では、抗 gAChR $\alpha$ 3 抗体 (調整オッズ比: 6.28, 95%信頼区間: 1.93–20.37,  $p = 0.002$ ) とループス膀胱炎 (調整オッズ比: 26.50, 95%信頼区間: 3.90–179.71,  $p < 0.001$ ) が LE の独立した予測因子として同定された (Table 3).

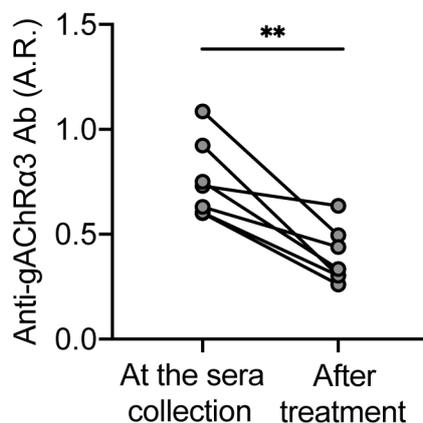


Figure 28. LE 患者における免疫抑制治療前後の抗 gAChR $\alpha$ 3 抗体価の比較

LE 患者の免疫抑制治療前後の抗 gAChR $\alpha$ 3 抗体価を縦断的に比較した. ペアとなるサンプルに対し、Wilcoxon signed rank test を用いて解析した. \*\* $p < 0.01$ .

Table 3. ループス腸炎の予測因子に関する単変量・多変量解析

	単変量		多変量	
	OR (95%CI)	<i>p</i> 値	OR (95%CI)	<i>p</i> 値
性別 (女性), <i>n</i> (%)	0.38 (0.04–3.12)	0.374	—	—
年齢, 歳	0.96 (0.93–1.00)	0.110	0.94 (0.89–1.00)	0.061
SLEDAI-2Kスコア	0.94 (0.87–1.01)	0.078	—	—
SLEの臓器病変				
腎炎	2.73 (1.02–7.24)	0.043	2.40 (0.76–7.56)	0.133
精神神経障害	0.31 (0.08–1.11)	0.072	—	—
膀胱炎	24.20 (4.47–130.86)	<0.001	26.50 (3.90–179.71)	<0.001
心膜炎/胸膜炎	1.02 (0.31–3.32)	0.969	—	—
関節炎	0.98 (0.38–2.47)	0.968	—	—
蝶形紅斑/円盤状皮疹	0.73 (0.29–1.87)	0.523	—	—
脱毛	0.70 (0.14–3.31)	0.523	—	—
抗リン脂質抗体症候群	0.79 (0.24–2.56)	0.705	—	—
白血球減少	3.34 (1.25–8.90)	0.015	2.64 (0.82–8.48)	0.102
血小板減少	0.52 (0.16–1.66)	0.275	—	—
検査所見				
抗dsDNA抗体	2.38 (0.66–8.61)	0.184	—	—
抗Ro/SSA抗体	1.18 (0.44–3.10)	0.734	—	—
抗リン脂質抗体	1.18 (0.46–3.03)	0.726	—	—
抗gAChRα3抗体	6.41 (2.38–17.29)	<0.001	6.28 (1.93–20.37)	0.002
補体 C3 < 86, mg/dl	1.19 (0.37–3.85)	0.765	—	—
補体 C4 < 17, mg/dl	1.53 (0.41–5.60)	0.520	—	—

OR: odd ratio オッズ比; 95%CI: 95% confidence interval 95%信頼区間. 単変量ロジスティック回帰分析による未調整オッズ比と多変量ロジスティック回帰分析による調整オッズ比を示す. 連続変数は単位オッズ比で示す. C3 正常値: 86–160 mg/dl, C4 正常値: 17–45 mg/dl.

#### 5.4.4. 抗 gAChR $\alpha$ 3 抗体の有無による累積ループス腸炎発症/再燃率の比較

抗 gAChR $\alpha$ 3 抗体が LE の発症または再燃に関与するか, Kaplan–Meier 分析を用いて評価した. 観察期間内において, LE の発症は 2 例, 再燃は 6 例であった. LE を発症した 2 例はいずれも初回血清保存時に抗 gAChR $\alpha$ 3 抗体が陽性であった. 抗 gAChR $\alpha$ 3 抗体陽性群と陰性群の初回血清保存日から 10 年間の累積 LE 発症/再燃率は, それぞれ 27.0%と 2.3%であった (Figure 29). 抗 gAChR $\alpha$ 3 抗体陽性群では, 陰性群に比較して累積 LE 発症/再燃率が有意に高かった ( $p < 0.001$ ).

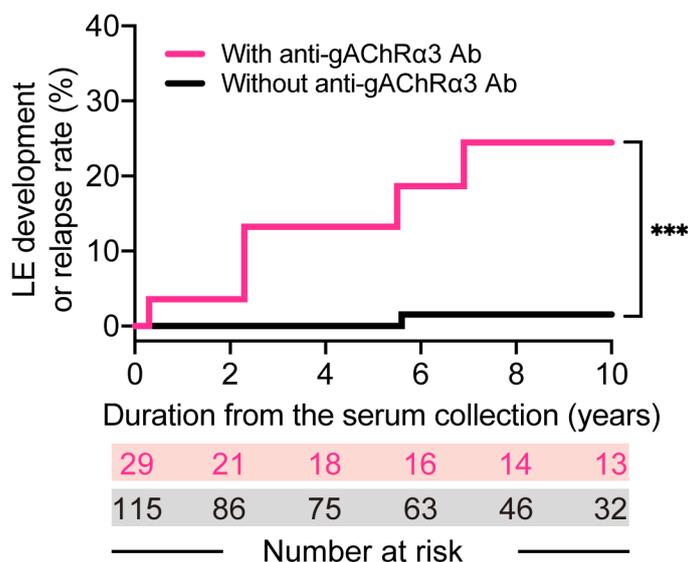


Figure 29. 抗 gAChR $\alpha$ 3 抗体の有無による累積 LE 発症/再燃率の比較  
 累積 LE 発症/再燃率は Kaplan–Meier 曲線と log–rank 検定を用いて解析された. \*\*\* $p < 0.001$ .

## 5.5 考察

本研究で我々は, SLE 患者において LE を有する患者の抗 gAChR $\alpha$ 3 抗体価が, 他の症状の患者よりも高く, 治療後に LE の寛解とともに低下することを確認した. さらに, 抗 gAChR $\alpha$ 3 抗体は LE の発症/再燃の予測因子であることを明らかにした.

SLE 患者において消化管症状 (腹痛, 嘔気・嘔吐, 下痢等) は経験することが多い症状の一つであるが (Sultan et al., 1999), LE はその原因として稀な病態である (Janssens et al., 2013). 診断には LE に共通する CT 所見 (Figure 26) や, 血清学的な疾患活動性等を参考とするが, 内視鏡生検の診断率は低く, その鑑別は時に困難である. 今回, 我々は抗 gAChR $\alpha$ 3 抗体が他の SLE 病態と比較して活動性 LE と強く相関することを明らかにしたことで, 同抗体が LE 診断を補助するバイオマーカーとしての可能性を示した.

これまで LE の病態生理として免疫複合体を介する血管炎 (ループス腸間膜血管炎) の関与が示唆されてきたが, その根拠は少数の症例報告等に基づいており, その発症機序は未だ十分に解明されていない (Ju et al., 2009). 今回の結果は, 次の理由から抗 gAChR $\alpha$ 3 抗体が LE 患者において病原性抗体である可能性を示唆している. 第一に LE の疾患活動と抗 gAChR $\alpha$ 3 抗体の間に有意な関連性があること (Figure 27, Table 3), 第二に治療により LE の改善とともに抗 gAChR $\alpha$ 3 抗体価が減少すること (Figure 28), 最後に AChR $\alpha$ 3 欠損動物モデルが LE と類似の臨床表現型を呈することである. LE の特徴として, 腸管の拡張, 膀胱炎やそれに伴う水腎症の高い併存率が挙げられる (Janssens et al., 2013). これらの特徴に一致して, AChR $\alpha$ 3 欠損マウスでは, 腸管が膨張し, 膀胱に炎症を起こすことが観察されている (Xu et al., 1999). 加えて, 後天的に自律神経節の AChR $\alpha$ 3 に対する自己抗体を産生させたウサギモデルにおいても, 拡張した腸と肥大化した膀胱を呈することが確認されている (Lennon et al., 2003). これらのデータは, 抗 gAChR $\alpha$ 3 抗体が LE の病態・表現型と関連していることを支持している.

本研究にはいくつかの制約がある. 本研究は単施設での後方視研究であり, 分析対象となった SLE 患者は 144 名で抗 gAChR $\alpha$ 3 抗体陽性は 29 例に過ぎなかった. このような小さなサンプルサイズにおいて LE のような稀な病態を対象とする場合, 交絡や選択バイアスを除外しきることは困難である. また, 治療レジメンの違いは LE の発症/再発率に影響を与えた可能性がある. 我々の仮説を証明するには多施設での前向き研究を含めたさらなる検討が必要となる.

## 5.6 結語

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. CT 所見に加え, 抗 gAChRa3 抗体を確認することは LE 患者の診断・予後推定の一助となり得る.

## 6. 結論

本研究から得られた新知見は以下の通りである. 1, 2 の知見はそれぞれ第一部, 第二部で得られた知見に該当する.

1.

- ・ ITA は Th17 分化を抑制し, Treg 分化を促進する.
- ・ ITA の T 細胞分化制御には細胞内代謝の再構成と, それに続く エピジェネティックな修飾が関わっている.
- ・ ITA は Th17/Treg imbalance の是正を介して, 自己免疫疾患の新規治療となり得る.

2.

- ・ SLE の解明不十分な症状である LE の新たなマーカーを見出した.
- ・ 抗 gAChR $\alpha$ 3 抗体は LE の活動性との強い関連があり, LE 発症/再燃の予測因子であった.

第一部では、複数の自己免疫疾患の背景にある、Th17/Treg imbalance を対象とした研究を行なった。T 細胞分化の制御にはこれまで複数の代謝経路・代謝産物を介したアプローチが報告されているが、これらの経路が互いに独立して制御されているかは不明なままであった。本研究ではマクロファージで抗炎症作用が報告されている細胞内代謝産物である ITA に着目し、T 細胞分化における影響を検討した。In vitro における検討では、ITA は Th17 の分化を抑制し、Treg の分化を促進した。tEAE モデルにおいても、ITA の修飾を受けた Th17 はその疾患活動性を減弱させた。RNA-seq によって ITA が Th17, Treg の発現遺伝子に及ぼす影響を網羅的に解析したところ、解糖系を含む複数の代謝経路の関与が示唆された。さらに ITA の影響を代謝産物の網羅的解析で評価したところ、既報で T 細胞分化への関与が報告されている SAM/SAH が Th17 で減少し、2-HG が Treg で減少しており、その変化は ITA によるそれぞれの合成酵素活性の阻害により生じていることを明らかになった。さらに、それらの代謝産物によるエピジェネティックな修飾が *Il17a* promoter 領域における重要な転写因子である ROR $\gamma$ t の結合率を低下させて、IL-17A 発現を制御することを明らかにした。今後は ITA を生体内でより正確に細胞へ届けるシステムの構築を目指して本研究を進展させていく所存である。

第二部では、SLE において解明不十分な自己抗体である抗 gAChR $\alpha$ 3 抗体の臨床的意義を探索する研究を行なった。本研究では、当科データベースに保存されている SLE 患者血清を用いて抗 gAChR $\alpha$ 3 抗体の測定を行い、陽性群と陰性群の臨床像を比較した。抗 gAChR $\alpha$ 3 抗体が LE の疾患活動性と強く関連することを見出し、同抗体が LE の発症/再燃を予測し得ることを明らかにした。LE はこれまでその病態が十分に解明されておらず、治療法も定まっていない SLE の unmet needs である。今後は多施設での前向き研究により、本研究の知見の裏付けを行うとともに、自己抗体に焦点を当てた LE の治療レジメンを確立する予定である。

本研究で得られた結果は、今後さらに研究を重ねていく必要があるが、これらの自己免疫疾患の患者の診療の一助となることを願う。

## 7. 謝辞

本論文は筆者が北海道大学大学院医学院内科学分野 免疫・代謝内科学教室博士課程に在籍中の研究成果をまとめたものです。同教室、渥美達也教授には指導教官として本研究の実施の機会を与えていただき、その遂行にあたって終始、御指導をいただきました。ここに深謝の意を表します。

本教室膠原病グループ河野通仁助教には本研究の遂行にあたり、終始、丁寧かつ熱心に御指導、適切な御助言をいただきました。ここに心より深く感謝の意を表します。

Olga Amengual 講師、加藤将講師、藤枝雄一郎助教にはカンファレンスを通じて常に前向きな励ましとご指導をいただきました。

河野通大先生、大西直樹先生、狩野皓平先生には基礎実験の基本的な手技について懇切丁寧なご指導を賜りました。ここに深く感謝の意を表します。谷村瞬先生、阿部靖矢先生、下山修平先生は研究に行き詰まった時など励ましの言葉を下さりました。工藤友喜大学院生は実験の手技指導や多くの助言をいただきました。蜷川慶太先生、佐藤太貴先生には同じ大学院の仲間として、日頃から有益な御助言をいただき、心より感謝しております。

当科実験助手の藤田悠介さん、寿楽弘子さんの御協力により円滑に実験を行うことができました。心より感謝を申し上げます。この他にもこの論文作成にあたり、ここには記載できないほど多くの御協力、御助言、御支援をいただきました。重ねまして心より感謝を申し上げます。

何より筆者の臨床研究は患者様の御協力なしには成り立たないものです。研究の趣旨に御理解と御協力をいただき、研究の遂行を可能にしてくれた多くの患者様たちに心より感謝申し上げます。

最後にこれまで見守ってくれていた両親、仕事に理解を示し、優しく支え続けてくれた妻に心から感謝致します。

## 8. 利益相反

本研究に際し, 開示すべき利益相反状態はない.

## 9. 引用文献

- Albuquerque, E.X., Pereira, E.F., Alkondon, M., and Rogers, S.W. (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* *89*, 73-120.
- Aso, K., Kono, M., Kono, M., Watanabe, T., Shimizu, Y., Ogata, Y., Fujieda, Y., Kato, M., Oku, K., Amengual, O., et al. (2020). Low C4 as a risk factor for severe neuropsychiatric flare in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* *29*, 1238-1247.
- Bambouskova, M., Gorvel, L., Lampropoulou, V., Sergushichev, A., Loginicheva, E., Johnson, K., Korenfeld, D., Mathyer, M.E., Kim, H., Huang, L.H., et al. (2018). Electrophilic properties of itaconate and derivatives regulate the I $\kappa$ B $\zeta$ -ATF3 inflammatory axis. *Nature* *556*, 501-504.
- Dang, E.V., Barbi, J., Yang, H.Y., Jinasena, D., Yu, H., Zheng, Y., Bordman, Z., Fu, J., Kim, Y., Yen, H.R., et al. (2011). Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell* *146*, 772-784.
- Dendrou, C.A., Fugger, L., and Friese, M.A. (2015). Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* *15*, 545-558.
- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T.R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* *29*, 15-21.
- Endo, Y., Asou, H.K., Matsugae, N., Hirahara, K., Shinoda, K., Tumes, D.J., Tokuyama, H., Yokote, K., and Nakayama, T. (2015). Obesity Drives Th17 Cell Differentiation by Inducing the Lipid Metabolic Kinase, ACC1. *Cell Rep* *12*, 1042-1055.
- Fanouriakis, A., Tziolos, N., Bertias, G., and Boumpas, D.T. (2021). Update on the diagnosis and management of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* *80*, 14-25.
- Geltink, R.I.K., Kyle, R.L., and Pearce, E.L. (2018). Unraveling the Complex Interplay Between T Cell Metabolism and Function. *Annu Rev Immunol* *36*, 461-488.
- Gharpure, A., Teng, J., Zhuang, Y., Noviello, C.M., Walsh, R.M., Jr., Cabuco, R., Howard, R.J., Zaveri, N.T., Lindahl, E., and Hibbs, R.E. (2019). Agonist Selectivity and Ion

Permeation in the  $\alpha 3\beta 4$  Ganglionic Nicotinic Receptor. *Neuron* 104, 501-511.e506.

Hochberg, M.C. (1997). Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 40, 1725.

Imamura, M., Mukaino, A., Takamatsu, K., Tsuboi, H., Higuchi, O., Nakamura, H., Abe, S., Ando, Y., Matsuo, H., Nakamura, T., et al. (2020). Ganglionic Acetylcholine Receptor Antibodies and Autonomic Dysfunction in Autoimmune Rheumatic Diseases. *Int J Mol Sci* 21.

Janssens, P., Arnaud, L., Galicier, L., Mathian, A., Hie, M., Sene, D., Haroche, J., Veysier-Belot, C., Huynh-Charlier, I., Grenier, P.A., et al. (2013). Lupus enteritis: from clinical findings to therapeutic management. *Orphanet J Rare Dis* 8, 67.

Ju, J.H., Min, J.K., Jung, C.K., Oh, S.N., Kwok, S.K., Kang, K.Y., Park, K.S., Ko, H.J., Yoon, C.H., Park, S.H., et al. (2009). Lupus mesenteric vasculitis can cause acute abdominal pain in patients with SLE. *Nat Rev Rheumatol* 5, 273-281.

Kobayashi, S., Yokoyama, S., Maruta, T., Negami, M., Muroyama, A., Mitsumoto, Y., Iwasa, K., Yamada, M., and Yoshikawa, H. (2013). Autoantibody-induced internalization of nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 3$  subunit exogenously expressed in human embryonic kidney cells. *J Neuroimmunol* 257, 102-106.

Kono, M., Maeda, K., Stocton-Gavanescu, I., Pan, W., Umeda, M., Katsuyama, E., Burbano, C., Orite, S.Y.K., Vukelic, M., Tsokos, M.G., et al. (2019). Pyruvate kinase M2 is requisite for Th1 and Th17 differentiation. *JCI Insight* 4.

Kono, M., Yasuda, S., Kato, M., Kanetsuka, Y., Kurita, T., Fujieda, Y., Otomo, K., Horita, T., Oba, K., Kondo, M., et al. (2014). Long-term outcome in Japanese patients with lupus nephritis. *Lupus* 23, 1124-1132.

Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693-705.

Kurebayashi, Y., Nagai, S., Ikejiri, A., and Koyasu, S. (2013). Recent advances in understanding the molecular mechanisms of the development and function of Th17 cells. *Genes Cells* 18, 247-265.

Lampropoulou, V., Sergushichev, A., Bambouskova, M., Nair, S., Vincent, E.E.,

- Lognicheva, E., Cervantes-Barragan, L., Ma, X., Huang, S.C., Griss, T., et al. (2016). Itaconate Links Inhibition of Succinate Dehydrogenase with Macrophage Metabolic Remodeling and Regulation of Inflammation. *Cell Metab* *24*, 158-166.
- Lennon, V.A., Ermilov, L.G., Szurszewski, J.H., and Vernino, S. (2003). Immunization with neuronal nicotinic acetylcholine receptor induces neurological autoimmune disease. *J Clin Invest* *111*, 907-913.
- Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* *15*, 550.
- Lu, C., and Thompson, C.B. (2012). Metabolic regulation of epigenetics. *Cell Metab* *16*, 9-17.
- Mader, S., Jeganathan, V., Arinuma, Y., Fujieda, Y., Dujmovic, I., Drulovic, J., Shimizu, Y., Sakuma, Y., Stern, J.N.H., Aranow, C., et al. (2018). Understanding the Antibody Repertoire in Neuropsychiatric Systemic Lupus Erythematosus and Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder: Do They Share Common Targets? *Arthritis Rheumatol* *70*, 277-286.
- McFadden, B.A., and Purohit, S. (1977). Itaconate, an isocitrate lyase-directed inhibitor in *Pseudomonas indigofera*. *J Bacteriol* *131*, 136-144.
- McGettrick, A.F., and O'Neill, L.A.J. (2020). The Role of HIF in Immunity and Inflammation. *Cell Metab* *32*, 524-536.
- McGinley, A.M., Sutton, C.E., Edwards, S.C., Leane, C.M., DeCoursey, J., Teijeiro, A., Hamilton, J.A., Boon, L., Djouder, N., and Mills, K.H.G. (2020). Interleukin-17A Serves a Priming Role in Autoimmunity by Recruiting IL-18-Producing Myeloid Cells that Promote Pathogenic T Cells. *Immunity* *52*, 342-356.e346.
- Mentch, S.J., Mehrmohamadi, M., Huang, L., Liu, X., Gupta, D., Mattocks, D., Gómez Padilla, P., Ales, G., Bamman, M.M., Thalacker-Mercer, A.E., et al. (2015). Histone Methylation Dynamics and Gene Regulation Occur through the Sensing of One-Carbon Metabolism. *Cell Metab* *22*, 861-873.
- Mills, E.L., Ryan, D.G., Prag, H.A., Dikovskaya, D., Menon, D., Zaslona, Z., Jedrychowski, M.P., Costa, A.S.H., Higgins, M., Hams, E., et al. (2018). Itaconate is an anti-

inflammatory metabolite that activates Nrf2 via alkylation of KEAP1. *Nature* *556*, 113-117.

Nakane, S., Higuchi, O., Koga, M., Kanda, T., Murata, K., Suzuki, T., Kurono, H., Kunimoto, M., Kaida, K., Mukaino, A., et al. (2015). Clinical features of autoimmune autonomic ganglionopathy and the detection of subunit-specific autoantibodies to the ganglionic acetylcholine receptor in Japanese patients. *PLoS One* *10*, e0118312.

Nakane, S., Umeda, M., Kawashiri, S.Y., Mukaino, A., Ichinose, K., Higuchi, O., Maeda, Y., Nakamura, H., Matsuo, H., and Kawakami, A. (2020). Detecting gastrointestinal manifestations in patients with systemic sclerosis using anti-gAChR antibodies. *Arthritis Res Ther* *22*, 32.

O'Neill, L.A.J., and Artyomov, M.N. (2019). Itaconate: the poster child of metabolic reprogramming in macrophage function. *Nat Rev Immunol* *19*, 273-281.

Olagnier, D., Farahani, E., Thyrssted, J., Blay-Cadanet, J., Herengt, A., Idorn, M., Hait, A., Hernaez, B., Knudsen, A., Iversen, M.B., et al. (2020). SARS-CoV2-mediated suppression of NRF2-signaling reveals potent antiviral and anti-inflammatory activity of 4-octyl-itaconate and dimethyl fumarate. *Nat Commun* *11*, 4938.

Qin, W., Qin, K., Zhang, Y., Jia, W., Chen, Y., Cheng, B., Peng, L., Chen, N., Liu, Y., Zhou, W., et al. (2019). S-glycosylation-based cysteine profiling reveals regulation of glycolysis by itaconate. *Nat Chem Biol* *15*, 983-991.

Roy, D.G., Chen, J., Mamane, V., Ma, E.H., Muhire, B.M., Sheldon, R.D., Shorstova, T., Koning, R., Johnson, R.M., Esaulova, E., et al. (2020). Methionine Metabolism Shapes T Helper Cell Responses through Regulation of Epigenetic Reprogramming. *Cell Metab* *31*, 250-266.e259.

Samson, M., Audia, S., Janikashvili, N., Ciudad, M., Trad, M., Fraszczak, J., Ornetti, P., Maillefert, J.F., Miossec, P., and Bonnotte, B. (2012). Brief report: inhibition of interleukin-6 function corrects Th17/Treg cell imbalance in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* *64*, 2499-2503.

Sharabi, A., and Tsokos, G.C. (2020). T cell metabolism: new insights in systemic lupus erythematosus pathogenesis and therapy. *Nat Rev Rheumatol* *16*, 100-112.

- Stromnes, I.M., and Goverman, J.M. (2006a). Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc* 1, 1810-1819.
- Stromnes, I.M., and Goverman, J.M. (2006b). Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc* 1, 1952-1960.
- Sultan, S.M., Ioannou, Y., and Isenberg, D.A. (1999). A review of gastrointestinal manifestations of systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 38, 917-932.
- Theofilopoulos, A.N., Kono, D.H., and Baccala, R. (2017). The multiple pathways to autoimmunity. *Nat Immunol* 18, 716-724.
- Tsokos, G.C. (2020). Autoimmunity and organ damage in systemic lupus erythematosus. *Nat Immunol* 21, 605-614.
- Vernino, S., Low, P.A., Fealey, R.D., Stewart, J.D., Farrugia, G., and Lennon, V.A. (2000). Autoantibodies to ganglionic acetylcholine receptors in autoimmune autonomic neuropathies. *N Engl J Med* 343, 847-855.
- Xu, T., Stewart, K.M., Wang, X., Liu, K., Xie, M., Ryu, J.K., Li, K., Ma, T., Wang, H., Ni, L., et al. (2017). Metabolic control of T(H)17 and induced T(reg) cell balance by an epigenetic mechanism. *Nature* 548, 228-233.
- Xu, W., Gelber, S., Orr-Urtreger, A., Armstrong, D., Lewis, R.A., Ou, C.N., Patrick, J., Role, L., De Biasi, M., and Beaudet, A.L. (1999). Megacystis, mydriasis, and ion channel defect in mice lacking the alpha3 neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5746-5751.
- Yasuda, S. (2019). Emerging targets for the treatment of lupus erythematosus: There is no royal road to treating lupus. *Mod Rheumatol* 29, 60-69.
- Yoshida, N., Comte, D., Mizui, M., Otomo, K., Rosetti, F., Mayadas, T.N., Crispín, J.C., Bradley, S.J., Koga, T., Kono, M., et al. (2016). ICER is requisite for Th17 differentiation. *Nat Commun* 7, 12993.
- Zhou, L., Lopes, J.E., Chong, M.M., Ivanov, II, Min, R., Victora, G.D., Shen, Y., Du, J., Rubtsov, Y.P., Rudensky, A.Y., et al. (2008). TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function. *Nature* 453, 236-240.

Zhou, Y., Zhou, B., Pache, L., Chang, M., Khodabakhshi, A.H., Tanaseichuk, O., Benner, C., and Chanda, S.K. (2019). Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat Commun* 10, 1523.