

62. T 細胞における代謝リプログラミング制御機構の解明

山下 政克

愛媛大学 大学院医学系研究科 免疫学・感染防御学

Key words : T 細胞, グルタミン代謝, 解糖系, Menin, Bach2

緒言

抗原を認識したナイーブ T 細胞は、活性化し、活発に増殖するとともに、抗原排除のための適切な機能を獲得して、エフェクター T 細胞へと分化する。エフェクター T 細胞への分化には、T 細胞抗原受容体とサイトカイン受容体からのシグナルで誘導される、クロマチン構造のリモデリングを介した遺伝子発現の協調的かつ網羅的な発現変動が必要である。これら一連の過程を適切に行うにあたり、T 細胞は、活性化後、爆発的にエネルギー消費を増大させるが、そのエネルギーを効率よく供給するためには、細胞内代謝経路をリプログラミングすること（代謝リプログラミング）が必須である¹⁻³。これまでに、ナイーブ T 細胞は、遊離脂肪酸の β 酸化によって主にエネルギーを生み出しているのに対し、エフェクター T 細胞は、解糖系やグルタミン代謝系をエネルギー供給経路として用いることが報告されている^{4,5}。また、抗原排除後に長期間生存する一部の T 細胞（メモリー T 細胞）は、再び脂肪酸分解経路を主に利用することも分かっている。つまり、T 細胞は、ダイナミックに代謝経路を変化させることで、免疫反応をコントロールしているといえるが、その制御機構の解析は進んでいない。これまでの T 細胞代謝研究は、CD8 T 細胞のグルコース代謝 / β 酸化における AMPK や mTOR, PI3K, Akt などのプロテインキナーゼや転写因子 Hif1, Myc の役割に関する研究が主であり、これら以外の因子に関する研究は国内外ともにほとんど行われていない。さらに、細胞内エネルギー代謝経路と、エフェクター T 細胞機能、メモリー T 細胞分化、T 細胞老化・疲弊との関係も解明が進んでいない。また、iPS 研究やがん研究分野において、代謝リプログラミングと転写リプログラミングの関係が注目されているが、T 細胞における当該分野の研究は非常に遅れており、そこに着目している研究者も国内ではほとんどいない。そこで、本研究では、T 細胞活性化に伴う代謝リプログラミングの誘導機構を解明するとともに、T 細胞機能獲得や運命決定における代謝リプログラミングの役割を明らかにすることを旨とし、研究を進める。

我々は、これまでに腫瘍抑制因子 Menin が CD4 T 細胞のエフェクター機能や老化を制御していることを報告してきた⁶。その分子メカニズムの解析過程で、Menin は Bach2 の発現制御を介してグルタミン代謝を調節していることが分かってきた。これらの結果は、我々がこれまでに報告してきた Menin 欠損 T 細胞で認められる様々な分化・機能異常は、細胞内代謝のリプログラミングの異常に起因する可能性を示唆している。そこで、本研究では、Menin による代謝リプログラミング制御機構の解明を目的に研究を行った。

方法

1. T 細胞特異的 Menin 欠損マウス、T 細胞特異的 Bach2 欠損マウス

Menin^{fllox/fllox} マウスまたは、*Bach2*^{fllox/fllox} マウスを CD4-Cre トランスジェニック (TG) マウスと交配し、T 細胞特異的 *Menin* 欠損マウス (*Menin*^{fllox/fllox} × CD4-Cre TG)、T 細胞特異的 *Bach2* 欠損マウス (*Bach2*^{fllox/fllox} × CD4-Cre TG) を作製した。

2. CD8 T 細胞における代謝リプログラミング解析

ナイーブ CD8 T 細胞は、マウス脾臓からマグネティックセルソーティング法で調製した。T 細胞は、IL-2 存在下で固層化抗 TCR- β 抗体と抗 CD28 抗体で 48 時間刺激して活性化後、IL-2 存在下で増殖させた。細胞内代謝プロファイリングは、ヒューマンメタボロームテクノロジー社に外部委託して解析を行った。

3. Menin 標的分子 Bach2 会合因子の同定

コムギ無細胞タンパク質合成系を用いた網羅的結合解析法（アルファスクリーン法）により⁷⁾、結合因子を同定した。

結果

Menin 欠損活性化 CD8 T 細胞における代謝変化について、細胞内代謝プロファイリングにより解析したところ、*Menin* 欠損 CD8 T 細胞は野生型と比較し活性化後 48 時間までは、嫌氣的解糖やグルタミン代謝が亢進していることが分かった。また、活性化後 48 時間の *Menin* 欠損 CD8 T 細胞において、Lactose dehydrogenase A/Lactose dehydrogenase B 比（嫌氣的解糖の亢進マーカー）の上昇、グルコーストランスポーター、Glutaminase 2 (*Gls2*)、Malic enzyme 1 (*Me1*) の発現上昇が認められた (図 1)。

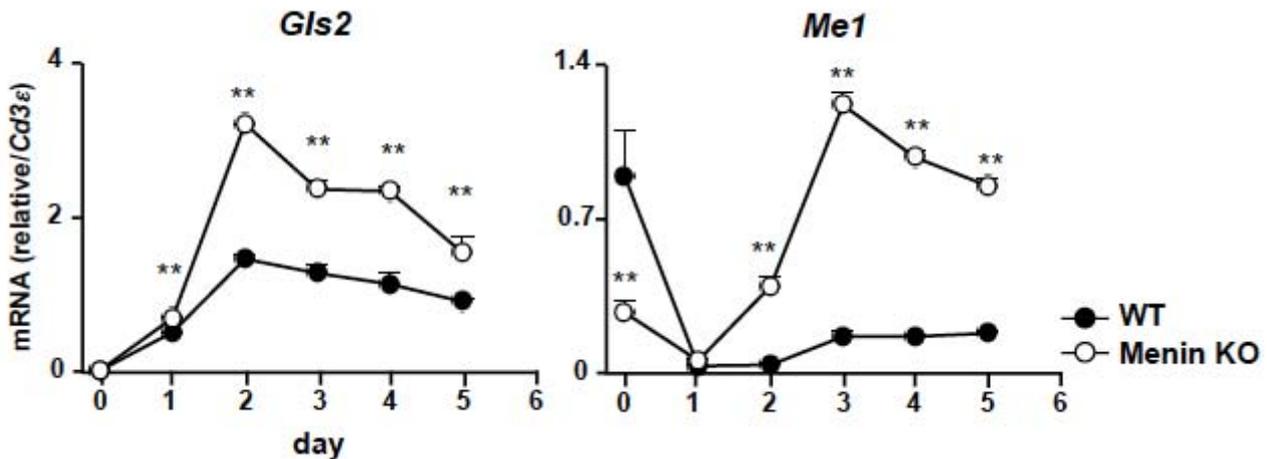


図 1. *Menin* 欠損活性化 CD8 T 細胞における *Gls2* と *Me1* の発現上昇

野生型および *Menin* 欠損ナイーブ CD8 T 細胞を IL-2 存在下で抗 TCR- β 抗体と抗 CD28 抗体で刺激後、経時的に RNA を回収し、グルタミナーゼ 2 (*Gls2*) とリンゴ酸酵素 1 (*Me1*) mRNA の発現量を定量的 RT-PCR にて測定した。**P < 0.01 (Student's t-test) (n = 3)。

さらに、*Menin* 欠損 CD8 T 細胞は、細胞内エネルギー代謝の上昇に呼応する形で、抗原刺激に対する応答性と細胞増殖の亢進が認められた (図 2)。

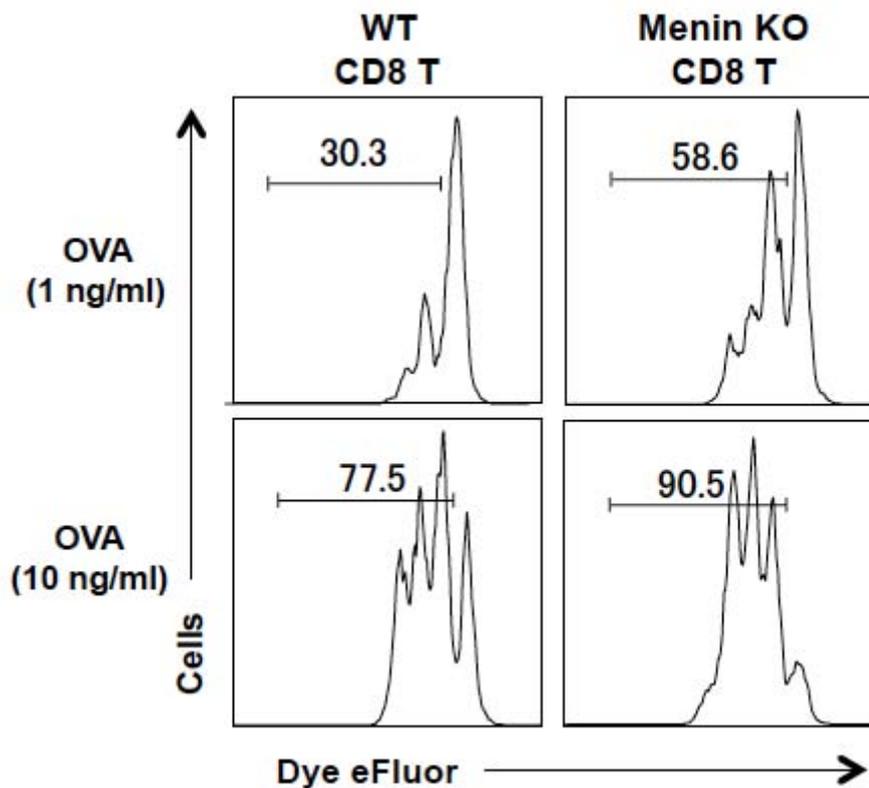


図2. *Menin* 欠損 CD8 T 細胞における抗原反応性の亢進

OVA 特異的 TCR トランスジェニック (OT1-Tg) *Menin* 欠損ナイーブ CD8 T 細胞を OVA ペプチドをパルスした脾臓細胞で 48 時間刺激した。CD8 T 細胞は、分裂回数を測定するために Dye 標識してある。OVA ペプチドの濃度を左側にそれぞれ記載してある。

しかしながら、*Menin* 欠損 CD8 T 細胞では、細胞内グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸濃度が著しく低下するとともに、細胞増速の速度の低下が誘導され、活性化後 7 日目以降においては細胞増殖がほぼ停止した (図 3)。

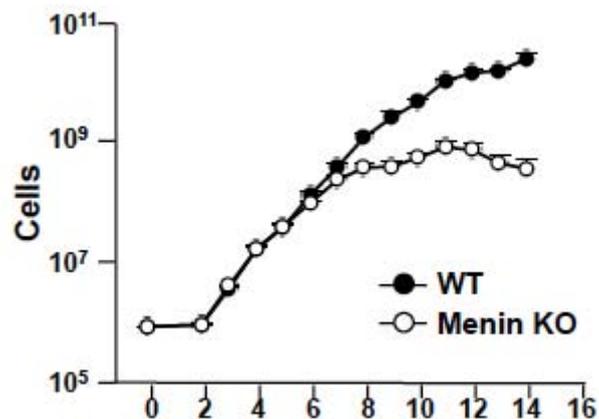


図3. *Menin* 欠損 CD8 T 細胞は、活性化後の早期に増殖が停止する

野生型および *Menin* 欠損ナイーブ CD8 T 細胞を、IL-2 存在下で抗 TCR- β 抗体 + 抗 CD28 抗体で 48 時間刺激した。48 時間以降は IL-2 存在下で細胞を維持し、経時的に細胞数を測定した。

それに加え、活性化7日目以降の *Menin* 欠損 CD8 T 細胞では、抑制性受容体や NK 細胞マーカーの発現上昇と CD62L/CD27 の発現低下、グランザイムやオステオポンチンなどの炎症性因子の高発現、SA- β Gal 活性上昇といった、老化 T 細胞の形質が誘導されていた。これらの結果から、*Menin* は、活性化 T 細胞において、細胞内エネルギー代謝の過剰亢進を抑制することで、T 細胞の恒常性を維持している可能性が考えられた。

CD4 T 細胞を用いた私たちの以前の研究から、*Menin* 欠損によって引き起こされる CD4 T 細胞の形質変化の一部は、転写抑制因子 *Bach2* の発現変化によるものであることが分かっている⁶⁾。そこで、*Menin* 欠損活性化 CD8 T 細胞で認められた代謝酵素の発現変動が、*Bach2* 欠損 CD8 T 細胞でも誘導されるのかを検討したところ、*Gls2* や *Me1* mRNA の発現上昇が確認できた。さらに、*Gls2* 遺伝子の 5' 上流領域に *Bach2* が結合することも明らかとなった。そこで、私たちは、*Menin* 下流に位置する転写抑制因子 *Bach2* の T 細胞恒常性維持における役割を検討する目的で、T 細胞における *Bach2* 結合分子の同定を行った。T 細胞に発現している転写調節因子 64 分子をスクリーニングしたところ、塩基性ロイシンジッパー型転写調節因子、*Batf* と *Batf3* が新規 *Bach2* 会合分子として同定された。

考 察

今回の研究結果から、腫瘍抑制因子 *Menin* が活性化 CD8 T 細胞において代謝の過剰亢進を抑制する役割を持っていることが明らかになった。しかしながら、T 細胞抗原受容体 (TCR) からのシグナルがどのようにして *Menin* の機能を制御しているのかについては未だ明らかになっていない。今後は、TCR シグナルと *Menin* の関係について解析を進め、T 細胞活性化に伴う代謝リモデリング誘導機構の全容を明らかにしたいと考えている。また、*Menin* 下流の標的分子、*Bach2*-*Batf* 複合体の T 細胞代謝リモデリングにおける役割についてさらに解析を進めて行く予定である。

文 献

- 1) Ganeshan K, Chawla A. Metabolic regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:609-34. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120236. PMID: 24655299.
- 2) Pearce EL, Poffenberger MC, Chang CH, Jones RG. Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function. *Science.* 2013 Oct 11;342(6155):1242-454. doi: 10.1126/science.1242454. PMID: 24115444.
- 3) Pollizzi KN, Powell JD. Integrating canonical and metabolic signalling programmes in the regulation of T cell responses. *Nat Rev Immunol.* 2014 Jul;14(7):435-46. doi: 10.1038/nri3701. PMID: 24962260.
- 4) MacIver NJ, Michalek RD, Rathmell JC. Metabolic regulation of T lymphocytes. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:259-83. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095956. Epub 2013 Jan 3. PMID: 23298210.
- 5) Rathmell JC, Vander Heiden MG, Harris MH, Frauwirth KA, Thompson CB. In the absence of extrinsic signals, nutrient utilization by lymphocytes is insufficient to maintain either cell size or viability. *Mol Cell.* 2000 Sep;6(3):683-92. PMID: 11030347.
- 6) Kuwahara M, Suzuki J, Tofukuji S, Yamada T, Kanoh M, Matsumoto A, Maruyama S, Kometani K, Kurosaki T, Ohara O, Nakayama T, Yamashita M. The *Menin*-*Bach2* axis is critical for regulating CD4 T-cell senescence and cytokine homeostasis. *Nat Commun.* 2014 Apr 2;5:3555. doi: 10.1038/ncomms4555. PMID: 24694524.
- 7) Matsuoka K, Komori H, Nose M, Endo Y, Sawasaki T. Simple screening method for autoantigen proteins using the N-terminal biotinylated protein library produced by wheat cell-free synthesis. *J Proteome Res.* 2010 Aug 6;9(8):4264-73. doi: 10.1021/pr9010553. PMID: 20575507.