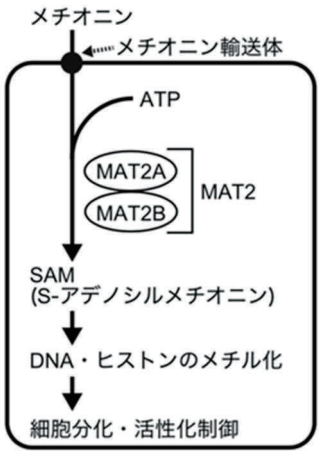
164　B細胞のメチオニン代謝に着目した自己免疫疾患の克服	加藤　浩貴

【目的】自己免疫疾患は自己の組織に対して異常な免疫がおきることで発症する。そこには、異常なB細胞による自己抗体の産生が深く関わる。しかし、なぜ異常B細胞ができるのか、異常B細胞を抑制するにはどうすれば良いのか、いまだに不明な点が多い。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。近年の網羅的ゲノム解析により、遺伝要因の解明が進んだが、遺伝要因の理解だけでは発症の予測も治療も難しいことがわかってきた。環境要因が自己免疫疾患の発症にどう関わるのか、その理解が必要である。環境要因は最終的にはDNAやヒストンのエピゲノム修飾を変化させ、遺伝子発現を攪乱することでB細胞の機能異常を引き起こしている可能性がある。しかし、B細胞の分化や活性化でのエピゲノム修飾の意義、そこへの環境因子の関与には不明な点が多い。研究代表者らは、環境要因のなかでもDNAやヒストンのメチル化修飾に直接関わるメチオニン代謝に注目している。すなわち、メチオニンは酵素MAT2（Methionine Adenosyl Transferase 2、MAT2AとMAT2Bの複合体）によりS-アデノシルメチオニン（SAM）に代謝されるが、SAMはDNAやヒストンのメチル化に必要なメチル基供与体であるため、メチオニン代謝がB細胞の分化・活性化の制御に直接関わっている可能性がある（下図）。しかし、B細胞の分化や活性化にSAMの量的変動がどう関わるか、不明な点が多い。そこで本研究ではB細胞造血におけるメチオニン代謝の意義を明らかにする。

【方法】B細胞の各分化段階でのSAM合成の重要性を解明するために、野生型マウスから各分化段階のB細胞を分取し、SAM合成酵素MAT2Aの発現量を解析した。さらに、野生型マウスのB細胞の造血で、“どの段階で”“なぜ”SAMが必要か、その生体内での役割を解明する為に、B細胞特異的にSAM合成酵素を欠損させたマウスを作製し、その表現型の解析を行った。分化障害の認められる前後の細胞集団を野生型マウスおよびB細胞特異的SAM合成酵素欠損マウスから分取し、網羅的遺伝子発現解析を行った。あわせて、SAMの量的変動がB細胞造血に与える影響を経時的に明らかにすべく、薬剤誘導型の造血細胞特異的SAM合成酵素欠損マウスを作製し、表現型の解析を実施した。

【結果】MAT2Aの発現誘導はB細胞分化の初期に認められ、その後徐々に低下していた。これと一致して、B細胞特異的SAM合成酵素欠損マウスではB細胞の初期分化が障害されることが明らかとなった。同様に、薬剤誘導型の造血細胞特異的SAM合成酵素欠損マウスにおいても、欠損誘導後早期にB細胞の造血障害が起きることが明らかとなった。これらのことから、少なくともB細胞の初期分化においては細胞自律的なSAM合成が必要であり、短期的なSAM合成障害であっても造血障害の原因となりうることが明らかとなった。網羅的遺伝子解析では、大変興味深いことに、B細胞の多様な抗体産生に必要な遺伝子再構成が障害されていることを示唆する所見を得た。B細胞造血におけるメチオニン代謝の意義のさらなる解明が、B細胞異常の関与するさまざまな疾患の理解・克服につながるものと期待される。

メチオニン代謝による細胞分化・活性化制御モデル



164. B 細胞のメチオニン代謝に着目した自己免疫疾患の克服

加藤　浩貴

東北大学病院 血液内科

Key words：B 細胞，自己免疫疾患，メチオニン代謝，MAT2A，SAM

緒　言

自己免疫疾患は自己に対する異常な免疫反応により発症する疾患で、本疾患に伴う各種臓器の障害が生活の質の低下をまねき、ときに命に関わる難治性の疾患である。自己免疫疾患の発症には、異常な B 細胞による自己抗体（自己組織に対する抗体）の産生が深く関わっていると考えられている。しかし、なぜ異常な B 細胞ができるのか、異常な B 細胞を抑制するにはどうすれば良いのか、その詳細には未解明な部分が多く残されている。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。近年の網羅的ゲノム解析により、遺伝要因の解明が進んだが、遺伝要因の理解だけでは発症の予測も治療も難しいことがわかってきた。環境要因が自己免疫疾患の発症にどう関与するか、その機序の解明が必要である。環境要因は最終的には DNA やヒストンのエピゲノム修飾を変化させ、遺伝子発現を攪乱することで B 細胞の機能異常を引き起こしている可能性がある。しかし、B 細胞の（造血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、そこへの環境因子の関与には不明な点が多い。

我々は、環境要因のなかでも DNA やヒストンのメチル化修飾に直接関わるメチオニン代謝に注目している。すなわち、メチオニンは酵素 MAT2（Methionine Adenosyl Transferase 2、MAT2A と MAT2B の複合体で MAT2A が酵素活性をもつ）により S-アデノシルメチオニン（SAM）に代謝されるが、SAM は DNA やヒストンのメチル化に必要なメチル基供与体であるため［1］、メチオニン代謝が B 細胞の分化・活性化の制御に直接関わっている可能性がある（図 1）。

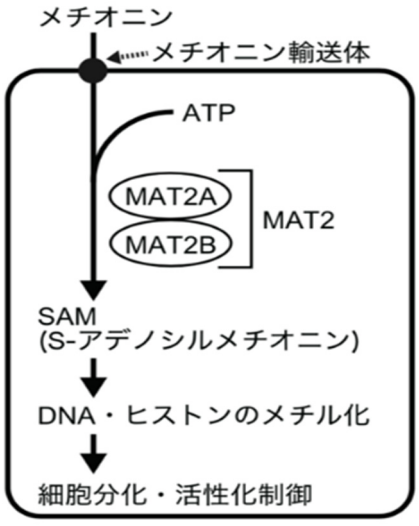


図 1.　メチオニン代謝による細胞分化・活性化制御モデル
メチオニン代謝は SAM によるエピゲノム修飾を調整することで、細胞の分化・活性化制御に関わる可能性がある

しかし、B 細胞の分化や活性化に生体内での SAM の量的変動がどう関わるかについては不明な点が多い。そこで本研究では、生体内 B 細胞造血における SAM 合成の役割を明らかにするために、B 細胞特異的 SAM 合成酵素欠損マウス等を作製し、その表現型を解析した。その結果、これまで明らかにされてこなかった、生体内 B 細胞造血における SAM の役割の一端が明らかとなった。B 細胞造血におけるメチオニン代謝の意義のさらなる解明が、B 細胞異常の関与するさまざまな疾患の理解・克服につながるものと期待される。

方　法

1. B 細胞の各分化段階における MAT2A 遺伝子発現変化解析

B 細胞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 細胞（pre pro-B、early pro-B、late pro-B、pre-B、immature-B、mature-B）を分取し、qPCR で MAT2A 発現量を解析した。

2. SAM 合成酵素欠損マウスの作製とその表現型解析

本研究において、B 細胞特異的 *MAT2A* ヘテロ欠損およびホモ欠損マウスを作製し、野生型マウスと比較することで、B 細胞造血での MAT2A の重要性を評価した。また、薬剤誘導性の造血細胞特異的 *MAT2A* 欠損マウスを作製し、野生型マウスと比較することで、比較的短期間における B 細胞造血での MAT2A の重要性を評価した。あわせて質量分析によるメチオニン関連代謝物の測定を行い、*MAT2A* 欠損によるメチオニン代謝物量の変化を解析した。

3. B 細胞初期分化に関する網羅的遺伝子発現解析

B 細胞特異的 *MAT2A* ホモ欠損マウスにおいて、B 細胞分化障害が認められる前後の細胞分画（pre pro-B および early pro-B）を野生型マウスおよび *MAT2A* 欠損マウスより分取し、網羅的遺伝子発現解析（RNA-sequencing）を実施した。発現解析結果に対して各種クラスタリング解析および GSEA（Gene Set Enrichment Analysis）を実施し、その生物学的意義を検討した。

結　果

1. B 細胞の各分化段階における MAT2A 遺伝子発現変化解析

野生型マウスから各分化段階における B 細胞（pre pro-B、early pro-B、late pro-B、pre-B、immature-B および mature-B）を分取し、qPCR 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 の発現自体は B 細胞の初期分化時（pre pro-B から early pro-B への分化時）に誘導され、その後低下していた（図 2）。すなわち、MAT2A は B 細胞の初期分化時にその発現誘導が起きることがわかった。我々の先行研究から、MAT2A は成熟した B 細胞で重要と予想していたが、予想に反して、MAT2A が B 細胞の初期分化時に必要な可能性が示唆された。

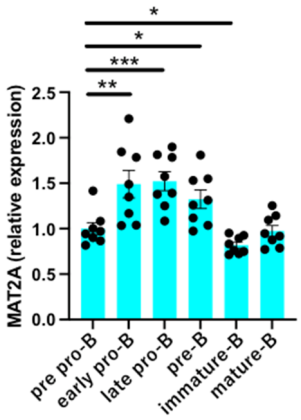


図 2. B 細胞の各分化段階における MAT2A 遺伝子発現

野生型マウスの B 細胞の各分化段階（pre pro-B、early pro-B、late pro-B、pre-B、immature-B および mature-B）での MAT2A の遺伝子発現解析（RT-qPCR）。*p＜0.05、**p＜0.01、***p＜0.001（two-tailed Student's t-test）。

2. SAM 合成酵素欠損マウスの作製とその表現型解析

B 細胞特異的 *MAT2A* ヘテロ欠損およびホモ欠損マウスを作製し、野生型マウスと B 細胞造血を比較した。まず、B 細胞特異的 *MAT2A* ヘテロ欠損マウスでは、野生型マウスと比較して、B 細胞造血に関して明らかな変化は認められなかった。このことから、*MAT2A* の欠損誘導に用いられる Cre リコンビナーゼ自体は、今回の解析系において特に影響を与えないことが確認された。次に、B 細胞特異的 *MAT2A* ホモ欠損マウスと野生型マウスとの比較においては、B 細胞特異的な造血障害が *MAT2A* 欠損で誘導されることが明らかとなった（図 3）。このことから、MAT2A は生体内の正常な B 細胞造血に必要と考えられた。薬剤誘導性の造血細胞特異的 *MAT2A* 欠損マウスにおいても、野生型マウスと比較した際に、ヘテロ欠損マウスでは明らかな B 細胞造血障害を認めなかったが、ホモ欠損マウスでは B 細胞造血障害が認められた。このことから、比較的短期間での SAM 合成障害でも B 細胞造血に影響があることが明らかとなった。なお、実際に MAT2A の活性が低下していることを、質量分析で確認している。さらに、B 細胞造血のどの段階で MAT2A が重要か明らかにするために、野生型マウスおよび B 細胞特異的 *MAT2A* ホモ欠損マウスの各分化段階の B 細胞数（pre pro-B、early pro-B、late pro-B、pre-B、immature-B および mature-B）を確認した。その結果、大変興味深いことに、B 細胞特異的 *MAT2A* ホモ欠損マウスでは、野生型マウスと比較して pre pro-B 細胞数は増加しており、early pro-B 細胞以降の細胞数は顕著に低下していた。このことから、MAT2A は pre pro-B から early pro-B への分化時に重要であると考えられた。

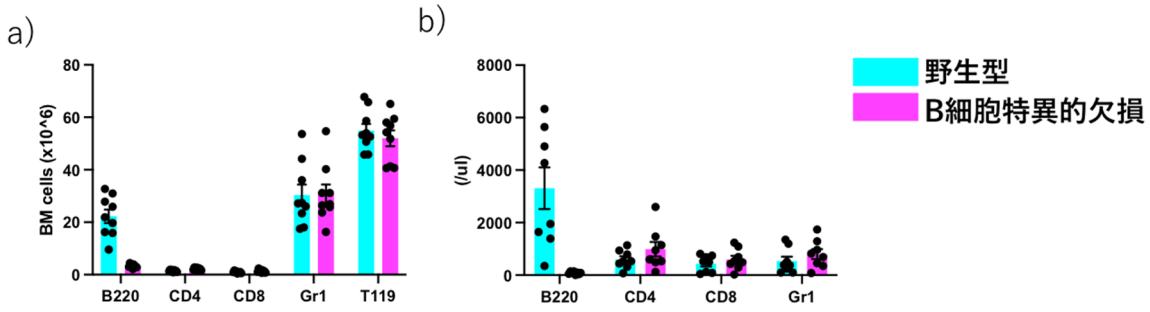


図 3. B 細胞特異的 *MAT2A* 欠損の造血への影響

野生型マウスおよび B 細胞特異的 *MAT2A* ホモ欠損マウスの骨髄（a）および末梢血（b）における各種成熟造血細胞数（B220：B 細胞、CD4：CD4 陽性 T 細胞、CD8：CD8 陽性 T 細胞、Gr1：ミエロイド系細胞、T119：赤血球系細胞）をフローサイトメトリーで解析した。

3. B 細胞初期分化に関する網羅的遺伝子発現解析

上記の解析から、B 細胞造血において、pre pro-B から early pro-B への分化時に MAT2A が重要と考えられたため、野生型マウスおよび B 細胞特異的 *MAT2A* ホモ欠損マウスより pre pro-B および early pro-B を分取して、網羅的遺伝子発現解析（RNA-seq）を実施した。その結果、大変興味深いことに、野生型マウスで pre pro-B から early pro-B への分化時に誘導される遺伝子群の一部に、B 細胞特異的 *MAT2A* ホモ欠損マウスの early pro-B では誘導されない遺伝子群があることがわかった。これらの遺伝子群のなかには、B 細胞の多様な抗体産生に必要な免疫グロブリン遺伝子の再構成に関わる遺伝子が多く含まれており、MAT2A や SAM 合成が B 細胞の遺伝子再構成に関わる可能性が考えられた。さらに、*MAT2A* 欠損に伴う広範な遺伝子発現変化の生物学的意義づけを行うために、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 G2／M 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 *MAT2A* 欠損 early pro-B では低下している所見を得た（図 4）。このことから、*MAT2A* 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。

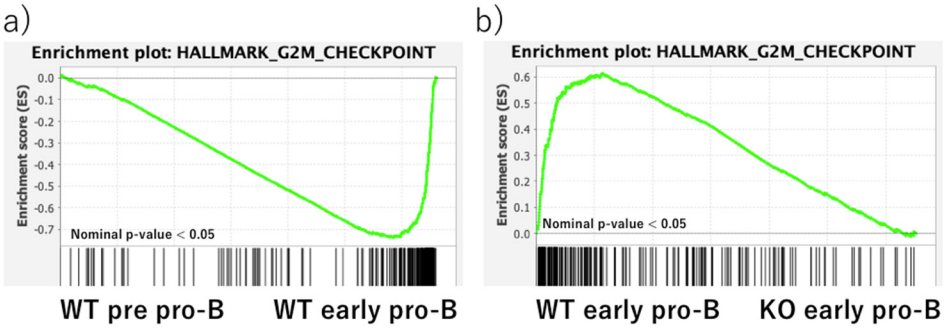


図 4. B 細胞初期分化に関する網羅的遺伝子発現解析

野生型マウスおよび B 細胞特異的 *MAT2A* ホモ欠損マウスより 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、その生物学的意義の検討に GSEA を行った。その結果、特に重要と考えられた G2M Checkpoint に関する遺伝子セットの結果を示す。

a） 野生型マウス（WT）の pre pro-B と early pro-B 間での比較解析結果。

b） early pro-B における、野生型マウス（WT）と B 細胞特異的 *MAT2A* ホモ欠損マウス（KO）間での比較解析結果。

Nominal p-value は null distribution に基づいて計算した（https://www.gsea-msigdb.org/ gsea/index.jsp）。

考　察

今回の研究結果からは、B 細胞の初期分化において、特に pre pro-B から early pro-B にかけての B 細胞分化に MAT2A や SAM が必要であることがわかった。その機序として、SAM が G2／M 期チェックポイント機構や免疫グロブリン遺伝子の再構成に関与している可能性が示唆された。生体内 B 細胞造血における MAT2A や SAM の重要性が今回初めて確認できた意義は大きい。特に、B 細胞特異的 *MAT2A* ホモ欠損が B 細胞造血障害をもたらしたことからは、B 細胞は微小環境の SAM ではなく、細胞自律的な SAM 合成に依存していると考えられ、この知見は生体内 SAM 代謝の解明に向けた大きな前進である。B 細胞の初期分化で MAT2A が必要なことからは、B 細胞初期分化の異常が関わる B 細胞性急性リンパ球性白血病の病態解明や治療標的開発における MAT2A の意義も今後検討していきたい。また、自己免疫疾患の発症には成熟 B 細胞の異常も深く関わると考えられ、今

後は成熟 B 細胞で特異的に *MAT2A* 欠損可能なマウスを作製し、その意義を検証していきたい。メチオニン代謝はがん治療の標的として近年注目を集めており［2］、本研究分野の臨床的意義と発展性は今後ますます広まっていくと期待される。

共同研究者・謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なるご支援、ご指導をいただきました東北大学大学院医学系研究科血液内科学分野の張替秀郎先生、同生物化学分野の五十嵐和彦先生ならびに同研究室のみなさまに、深く御礼申し上げます。また、本研究のご支援を賜りました上原記念生命科学財団に心より御礼申し上げます。

文　献

1） Quinlan, C., Kaiser, S., Bolaños, B. et al. Targeting S-adenosylmethionine biosynthesis with a novel allosteric inhibitor of Mat2A. Nat Chem Biol. 2017:13:785–792. PMID:28553945 DOI:10.1038/nchembio.2384.

2） Sydney M. Sanderson, Xia Gao, Ziwei Dai & Jason W. Locasale. Methionine metabolism in health and cancer: a nexus of diet and precision medicine. Nature Reviews Cancer. 2019:19:625–637. PMID:31515518 DOI:10.1038/s41568-019-0187-8.