

【要約】

Targeting SCD2 – dependent monounsaturated fatty acid  
biosynthesis activates antiviral responses in CD4+ T cells

(CD4T 細胞における SCD2 依存性の一価不飽和脂肪酸合成  
経路の阻害により抗ウイルス応答が活性化される)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：中山 俊憲 教授)

菅野 敏生

Type1 Interferon (IFN)は感染に際して形質樹状細胞や線維芽細胞より急速に産生されるサイトカインである。Type1 IFN には IFN $\alpha$  や  $\beta$  が属するが、これらのサイトカインは自然免疫系、獲得免疫系の細胞に作用して Interferon stimulated genes(ISGs)と呼ばれる抗ウイルス応答に関与する遺伝子群の発現量を上昇させることで感染応答に寄与する。Type1 IFN は ISGs の発現を誘導することに加えて、細胞内の代謝経路のリプログラミングを行うことが知られている。形質樹状細胞では Type1 IFN の応答に細胞内の脂質合成経路が重要であることや、マクロファージでは抗ウイルス応答を呈する 25-HC が、Type1 IFN により分泌が制御されていることが報告されている。細胞内の代謝経路と感染応答についての関連性が明らかにされつつあるが、その多くが自然免疫系の細胞に着目しており、獲得免疫系の細胞である CD4 T 細胞での研究は十分になされていない。そこで我々は CD4 T 細胞における、細胞内代謝経路と感染応答との関連性を明らかにするために本研究を行なった。

初めに Type1 IFN が及ぼす CD4 T 細胞の代謝経路へ及ぼす作用の影響を網羅的 RNA シークエンスによる評価を行った。Gene set enrichment analysis (GSEA)を用いた解析により、IFN  $\beta$  が CD4 T 細胞の脂肪酸合成酵素に関連する遺伝子群の発現を有意に減少させることが明らかになった。その中でも、脂肪酸代謝経路の律速酵素である Acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC1)の発現量の減少が認められた。そこで次に脂肪酸合成経路が感染応答に及ぼす作用を評価するために ACC1 KO マウスを用いた解析を行った。網羅的 RNA シークエンスを行ったところ、ISGs の発現量が ACC1 KO Th1 細胞で顕著に増大していることを発見した。定量 RT-PCR による解析により、ACC1 KO 及び ACC1 阻害剤である TOFA 処置 Th1 細胞での ISGs の発現量が、IFN $\beta$  を処置した Th1 細胞と同程度にまで増大していることが示された。また、Interferon regulatory family 7 (IRF) と呼ばれる Type1 IFN signal により制御される転写因子の発現量が TOFA 処置 Th1 細胞で有意に増大していることが FACS 解析により認められた。特に重要なことは、これらの ISGs の発現の亢進はサイトカインの産生に重要であると言われている TCR の再刺激を行わない、通常培養条件下で見られていること

である。そこで、通常培養条件下での細胞培養上清中の IFN $\alpha$  の含有量を ELISA アッセイにより定量を行った。その結果、ACC1 KO, TOFA 処置 Th1 細胞の培養上清中での IFN $\alpha$  の量が Control Th1 細胞の培養上清よりも有意に多いことがわかった。この結果は、Th1 細胞で脂肪酸合成経路を阻害することにより、自発的に IFN $\alpha$  が産生されることを示している。また、Type1 IFN の受容体の中和抗体により、ISGs の mRNA の発現や IRF7 のタンパク質の発現の上昇は抑制された。さらに TOFA 処置 Th1 細胞培養上清をマウス肺胞上皮細胞 MLE-15 に加えたところ、インフルエンザウイルスに対する抗ウイルス応答が増強した。これらの結果より、Th1 細胞において脂肪酸合成経路を阻害することにより、IFN $\alpha$  が分泌され抗ウイルス応答が誘導されることが示された。

IRF ファミリーは九つのタンパク質からなるが、そのうち IRF3,7 が Type1 IFN の分泌に、IRF9 が ISGs の発現の制御に重要であることが知られている。そこで我々は CRISPR/Cas9 システムにより ACC1 KO Th1 細胞を用いて *Irf3,7,9* の遺伝子編集を行い、ISGs の制御に関わる転写因子の探索を行った。網羅的 RNA シークエンスにより、特に、*Irf3,9* KO を行った ACC1 KO Th1 細胞で ISGs の発現の上昇が抑制されることがわかった。一方で、*Irf7* の KO によっては僅かな変化が見られるのみであった。IRF9 は STAT 1、STAT2 と複合体を形成して ISGs の発現を制御している。クロマチン免疫沈降を行ったところ、脂肪酸の合成阻害をすることにより、IRF9 の ISGs のプロモーター領域への集積が認められた。これらの結果より、ACC1 KO Th1 細胞では IRF3 が Type1 IFN の産生を制御し、IRF9 が ISGs の発現量を制御していることが示唆される。

脂肪酸はその化学構造により、3 種類に分類することができる。二重結合を持たない脂肪酸を飽和脂肪酸、1 つ有する脂肪酸を一価不飽和脂肪酸、2 つ以上有する脂肪酸を多価不飽和脂肪酸と呼ぶ。これらを合成する酵素として、ACC1 が飽和脂肪酸を合成し、それを基に Stearyl-CoA desaturase2 (SCD2) により一価不飽和脂肪酸が合成される。Fatty acid desaturase2 (FADS2) は多価不飽和脂肪酸の合成に重要であることが知られている。Th1 細胞における ISGs の上昇に重要な脂肪酸を探索するために、CRISPR/Cas9 システムにより SCD2, FADS2

の遺伝子編集を行った。その結果、*SCD2* KO Th1 細胞では TOFA 処置 Th1 細胞と同程度にまで ISGs の発現量が増大していることが分かった。一方で *FADS2* KO Th1 細胞では ISGs の発現量が Control Th1 細胞に比べて僅かに上昇したのみであった。また、これらの結果に一貫して *SCD2* KO Th1 細胞の培養上清を加えた MLE-15 細胞でインフルエンザウイルスへの抵抗性が上昇した。

脂肪酸は通常遊離脂肪酸としてよりも、脂質の材料として働くことが多い。そこで Th1 細胞における脂肪酸合成経路の阻害による脂質の合成に対する影響を評価するために、Control, *SCD2* KO, *FADS2* KO, *ACCI* KO Th1 細胞を用いて網羅的リピドミクス解析を行った。*ACCI* KO Th1 細胞では検出された脂質の殆どが Control Th1 細胞と比べて顕著に減少していた。*ACC1* は脂肪酸合成の律速酵素であるため、全ての脂質に影響があるのも合理的であると考えられる。一方で *SCD2* KO Th1 細胞では Diacyl glycerol (DG) や Triacyl glycerol (TG) などの Glycerolipid の脂質の量が減少していた。*FADS2* KO Th1 細胞では脂質の量への影響は軽微であった。リピドミクス解析により、一価不飽和脂肪酸であるオレイン酸が、最も多く脂質の構成に使われていた。また *SCD2* KO Th1 細胞で減少していた Glycerolipid の殆どはオレイン酸を含有するものであった。そこで細胞内のオレイン酸の量が減少することが ISGs の上昇に重要であると仮説を立て、*SCD2* KO Th1 細胞へオレイン酸を外部添加することで ISGs の発現の上昇が抑制されるかどうか評価を行った。*SCD2* KO Th1 細胞へオレイン酸を外部添加することで、ISGs の発現量は Control Th1 細胞と同定にまで抑制された。Th1 細胞においては多価不飽和脂肪酸であるパルミチン酸やステアリン酸がそれぞれ 2 番目、3 番目に豊富な脂肪酸であった。これらの脂肪酸を *SCD2* KO Th1 細胞に加えても ISGs 発現の抑制は見られなかった。これらの結果より脂肪酸の中でも特に一価不飽和脂肪酸であるオレイン酸の発現量が減少することが ISGs の上昇に重要であることが示唆される。また、脂質の合成への影響も見られており特に Glycerolipid の産生量が減少していることが分かった。

最後に脂肪酸合成経路の阻害による Type1 IFN の産生機構について評価を行った。細胞質内の dsDNA や RNA などの核酸を検知する機構として、それぞ

れ STING や MAVS 分子が知られている。これらの分子が細胞質内の核酸を検知したのち、Tank binding kinase1 (TBK1)がリン酸化されることで、IRF ファミリーを介して Type1 IFN の産生に寄与することが知られている。TOFA 処置 Th1 細胞では TBK1 のリン酸化レベルが上昇しており、SCD2 KO Th1 細胞でも同様に TBK1 のリン酸化は亢進していた。一方で、FADS2 KO Th1 細胞では僅かな上昇が見られるのみであった。TBK1 の上流にある分子を探索するために STING, MAVS をそれぞれ SCD2 と共に KO を行った。TBK1 のリン酸化は MAVS/SCD2 DKO Th1 細胞では SCD2 KO Th1 細胞と同様に見られたのに対して、STING/SCD2 DKO Th1 細胞では TBK1 のリン酸化の亢進は生じなかった。また ISGs の発現は MAVS/SCD2 DKO Th1 細胞では SCD2 KO Th1 細胞と同程度にまで上昇したものの、STING やその上流の分子である cGAS と SCD2 をそれぞれ DKO することで ISGs の発現の上昇は抑制された。これらの結果に一貫して、STING/SCD2 DKO Th1 細胞, cGAS/SCD2 DKO Th1 細胞の培養上清はインフルエンザウイルスに対する防御能を呈せなかった。

我々は、Th1 細胞で細胞内のオレイン酸量が減少することにより cGAS-STING 経路が活性化し、その結果分泌された IFN $\alpha$  が ISGs の発現を上昇させるという一連の機構を明らかにした。本研究はオレイン酸や SCD2 をターゲットとした新規抗ウイルス療法の開発に繋がる可能性が考えられる。