

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発事業ユニットタイプ「疾患における代謝産物の解析および代謝制御に基づく革新的医療基盤技術の創出」
(英語) AMED Core Research for Evolutionary medical Science and Technology (AMED-CREST) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) 腸内細菌叢制御による代謝・免疫・脳異常惹起メカニズムの解明と治療応用
(英語) How gut microbiota shifts metabolites leading to neuro-endocrine disorders in mouse and men

研究開発担当者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所 統合生命医科学研究センター
粘膜免疫研究チーム チームリーダー ファガラサン シドニア

所属 役職 氏名： (英語) RIKEN Center for Integrative Medical Sciences
Laboratory for Mucosal Immunity, Team Leader, Sidonia Fagarasan

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 免疫不全マウスにおける腸内細菌叢変化の代謝・行動に与える影響の解析
開発課題名： (英語) How specific immune deficiencies affect body physiology by influencing gut microbiota?

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所 統合生命医科学研究センター
粘膜免疫研究チーム チームリーダー ファガラサン シドニア

所属 役職 氏名： (英語) RIKEN Center for Integrative Medical Sciences
Laboratory for Mucosal Immunity, Team Leader, Sidonia Fagarasan

II. 成果の概要（総括研究報告：These parts will go public.）

- ・ 研究開発代表者による報告の場合

Outline of the CREST research result in FY2016 (for the whole group)

- Please write in English AND in Japanese.
- Within 1 page (per both languages), font size 10-12 point, WITHOUT figures/pictures.
- Please note that this report will be made public through AMED website. Please do NOT contain any confidential / personal information.

The aim for FY 2016 was to find out whether the serum metabolic changes observed in PD-1^{-/-} mice are caused by T cell activation. More precisely the group of Fagarasan, Honjo and Sugiura addressed the question whether T cell activation by any type of antigens would lead to metabolic changes observed in PD-1^{-/-} mice.

We thus evaluated the immune system, metabolites and behavior of PD-1 deficient mice lacking T cells (PD-1^{-/-} CD3^{-/-} DKO mice). We found no serum metabolic changes in PD-1^{-/-} CD3^{-/-} compared with Cd3^{-/-} mice, clearly indicating that T cells are mostly responsible for the metabophenotype in PD-1^{-/-} mice. Next we considered that the reduction of Trp for example, could be due to IFN- γ production, because this inflammatory cytokine is a well-known inducer of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), the rate-limiting enzyme for Trp degradation into the kynurenine pathway. Analyses of PD-1^{-/-} IFN- γ ^{-/-} mice revealed similar Trp levels, indicating that reduction of serum Trp cannot be attributed to the excessive IFN- γ production.

Having established the critical role of T cells in controlling systemic metabolome, we next asked whether food antigen or self antigens would activate T cells and lead to serum consumption of AA. Also activation of the immune system by self-antigens in the absence of microbiota (germ-free conditions) led to reduction of amino acids such as Trp in PD-1^{-/-} mice. We next search whether an acute systemic T cell activation even in the presence of normal PD-1 activity was sufficient to alter the serum metabolome. Intravenous administration of ovalbumin (OVA) to OT-I (CD8⁺Tg T cells) or OT-II (CD4⁺ Tg T cells) transgenic mice reduced the serum Trp levels within few days after stimulation. We also performed behavioral tests in and found that acute activation and expansion of OT-I T cells associated with increased anxiety but did not yet impact fear responses.

We next searched more thoroughly for the causes of the marked serum aminome changes we observed in the absence of PD-1. We hypothesized that the depletion of AA may be caused by either: heightened incorporation by activated T cells required to sustain proliferation and protein synthesis; reduction of their biosynthesis by yet unknown hepatic alterations; or by defects in AA absorption from the intestine. Together with Sugiura group, we set to measure the local metabolites levels in the lymph nodes (LN), spleen, liver, and small and large intestinal segments by non-targeted or targeted-metabolome analyses approaches. Such analyses are ongoing.

We also attempted rescue experiment by diet supplementation of AA. The experiments are ongoing with preliminary expected results.

Since the objective of this research is to demonstrate if a very specific immune deficiency limited to T cells affects not only the blood but also the biochemistry of other organs such brain.

Thus we further extended out analyses on the brain tissue by looking at enzymes involved in the relevant pathways at metabolome and transcriptome levels. We found some changes related with monoamines and their turnover.

The group of Honjo also organized the collection and analyses of plasma metabolome from patients with anxiety and depression or metabolic syndrome and controls.

Furukawa group continues to focus on the brain analyses, particularly the microglial changes in PD-1 deficient mice. Analyses of mitochondria characteristics in the brain are also ongoing.

Recent studies show that PD-1 immune checkpoint is focused on as a target molecule of Alzheimer disease (Saresella M. et al. 2012, Baruch K. et al. 2016). Furukawa, Honjo and Fagarasan groups are currently crossing PD-1 knock-out (KO) mice with APP^{NL-G-F} KI and APP^{NL-F} KI to validate therapeutic effect on Alzheimer disease mouse model.

2016年度の目的はPD1欠損マウスの血清代謝産物変化がT細胞の活性化に由来するかどうかを調べることであった。具体的には、ファガラサン、本庶、杉浦の各グループは、どのような抗原によるT細胞活性化もPD1欠損マウスで認められるような代謝産物変化へとつながるのかを明らかにすることを試みた。

この目的に即してT細胞を欠損するPD1欠損マウス(PD1CD3二重欠損マウス)の免疫システム、代謝産物、行動を評価した。野生型マウスとPD1欠損マウスの中で認められた血清代謝産物の変化は、CD3欠損マウスとPD1CD3二重欠損マウスとの比較では認められなかったことから、PD1KOマウスの代謝産物変化はT細胞に依存するということが示唆された。次に我々はトリプトファン(Trp)に着目し、Trpの減少がIFN γ 産生の増加に由来するのではないかという仮説を立てた。なぜならば炎症性サイトカインはTrp分解の律速酵素であるインドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼの誘導を引き起こすことが知られているからである。しかしIFN γ を欠損するPD1欠損マウス(PD1IFN γ 二重欠損マウス)の解析によりPD1欠損マウスの血清Trpの減少は過剰なIFN γ 産生によるものではないことが明らかになった。全身性のメタボロームを調節するT細胞の重要な役割が明らかになったため、次に我々は食餌抗原や自己抗原がT細胞の活性化や血清アミノ酸消費を誘導するかどうかについて調べた。

PD1欠損マウスは細菌叢を持たない無菌下であっても自己抗原による免疫システムの活性化によるアミノ酸の減少が認められた。

次に通常のPD1活性を持つ野生型マウスであっても急性かつ全身性のT細胞の活性化は血清メタボローム変化を引き起こすのに十分であるかどうかを調べた。オボアルブミン(OVA)のOT-I、OT-IIトランスジェニックマウスの血管内投与は投与後数日以内のTrpレベルの減少を誘導した。このマウスの行動実験も行なったところOT-I T細胞の活性化や増殖に伴い不安様行動が亢進することが明らかになった。次に我々はPD1欠損マウスで認められる特徴的な血清アミノームを引き起こす原因を調べた。まず、アミノ酸減少の原因として3つの仮説を立てた。第一に増殖やタンパク合成を必要とする活性化T細胞による取り込みの上昇、第二に肝臓の機能変化によるアミノ酸合成の減少、最後に腸管でのアミノ酸の吸収の減少である。この仮説を検証するために、脾臓、リンパ節、肝臓、小腸、大腸の局所的な代謝産物レベルを非標的メタボローム並びに標的メタボローム解析により測定した。この解析は現在進行中である。

また一方でアミノ酸添加食によるレスキュー実験を行い、前年度までに見出していたPD1欠損マウスの

脳内神経伝達物質の低下や行動異常がアミノ酸の補給で回復するかどうかについても調べている。

この研究課題の目的は T 細胞に限局された特異的な免疫欠損が血液だけでなく脳のような他の組織にも影響を及ぼすかどうかを検証することである。そこで我々はメタボロームやトランスクリプトームレベルで脳組織の関連酵素を解析した。

本庶グループは、不安様行動やうつを示す患者群、メタボリックシンドロームを示す患者群、健常者のそれぞれの血清のサンプリングや解析を体系化している。

古川グループは引き続き脳の解析を進めており、特に PD1 欠損マウスのマイクログリアの変化に着目している。一方で PD1 欠損マウスの脳内のミトコンドリア異常の可能性についても解析を進めている。

近年、アルツハイマー病の標的分子として免疫チェックポイントを司る PD1 が注目を集めている。古川、ファガラサン、本庶の各グループは、PD1 欠損マウスとアルツハイマー病のマウスモデルである APP^{NL-G-F} KI and APP^{NL-F} KI とを交配しアルツハイマー病のマウスモデルにおける PD1 の治療効果を評価しようと試みている。

研究開発分担者による報告の場合

III. 成果の外部への発表 List of Publication / Oral & Poster presentation during FY2016

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 1 件) List of Paper

1. Chamoto K, Chowdhury PS, Kumar A, Sonomura K, Matsuda F, Fagarasan S, Honjo T, Mitochondrial activation chemicals synergize with surface receptor PD-1 blockade for T cell-dependent antitumor activity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 Jan 31;114(5):E761-E770. doi: 10.1073/pnas.1620433114.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表 List of Oral/Poster presentation

1. Involvement of PD1 in antibody diversification and body homeostasis. 口頭 oral, Sidonia Fagarasan, 2017 NHRI/IBMS Joint International Conference on Inflammation & Disease, Taipei(Taiwan), 2017/02/16, 国外 overseas
2. Involvement of PD1 in antibody diversification and immune homeostasis. 口頭 oral, Sidonia Fagarasan, International Symposium on Immune Diversity and Cancer Therapy Kobe 2017, Kobe, 2017/01/27, 国内 domestic
3. Involvement of T cells in antibody diversification and shaping of the microbial landscape., 口頭 oral, Sidonia Fagarasan, Immune Profiling in Health and Disease 2016 (The Nature Conference), Seattle (USA), 2016/10/04, 国外 overseas
4. Regulation of immune bacterial communities by the adaptive immune system., 口頭 oral, Sidonia Fagarasan, the 5th International Symposium on Regulators of Adaptive Immunity, Erlangen(Germany), 2016/09/10, 国外 overseas

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

(4) 特許出願
該当なし

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発事業ユニットタイプ「疾患における代謝産物の解析および代謝制御に基づく革新的医療基盤技術の創出」
(英語) AMED Core Research for Evolutionary medical Science and Technology (AMED-CREST) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) 腸内細菌叢制御による代謝・免疫・脳異常惹起メカニズムの解明と治療応用
(英語) How gut microbiota shifts metabolites leading to neuro-endocrine disorders in mouse and men

研究開発担当者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所 統合生命医科学研究センター
粘膜免疫研究チーム チームリーダー ファガラサン シドニア

所属 役職 氏名： (英語) RIKEN Center for Integrative Medical Sciences
Laboratory for Mucosal Immunity, Team Leader, Sidonia Fagarasan

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 「免疫-内分泌-精神疾患併存患者の同定・登録・検証による免疫不全マウスで得られた知見のトランスレーション研究」

開発課題名： (英語) Translation of immune deficient mouse studies into the clinic by identifying, registering and analyzing patients with immune-endocrine-psychiatric comorbidities.

研究開発分担者 (日本語) 京都大学大学院医学研究科、特任教授、本庶 佑

所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Medicine Kyoto University, Professor, Tasuku Honjo

II. 成果の概要（総括研究報告）

・ 研究開発代表者による報告の場合

・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者：国立研究開発法人理化学研究所 統合生命医科学研究センター 粘膜免疫研究チーム Fagarasan Sidonia 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表 List of Publication / Oral & Poster presentation during FY2016

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 件、国際誌 件）

1. Chamoto K, Chowdhury PS, Kumar A, Sonomura K, Matsuda F, Fagarasan S, Honjo T. Mitochondrial activation chemicals synergize with surface receptor PD-1 blockade for T cell-dependent antitumor activity. Proc Natl Acad Sci U S A. (2017) 114:E761-E770.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Tasuku Honjo, Cancer Immunotherapy by combination of small molecules with PD-1 blockade 「免疫多様性とがん治療」国際シンポジウム 2016/1/26 国内（神戸）

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 本庶 佐 免疫力でがんを治す 「免疫多様性とがん治療」国際シンポジウム 市民公開講座 2017/1/28 国内（神戸）

(4) 特許出願

該当なし

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発事業ユニットタイプ「疾患における代謝産物の解析および代謝制御に基づく革新的医療基盤技術の創出」
(英語) AMED Core Research for Evolutionary medical Science and Technology (AMED-CREST) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) 腸内細菌叢制御による代謝・免疫・脳異常惹起メカニズムの解明と治療応用
(英語) How gut microbiota shifts metabolites leading to neuro-endocrine disorders in mouse and men

研究開発担当者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所 統合生命医科学研究センター
粘膜免疫研究チーム チームリーダー ファガラサン シドニア

所属 役職 氏名： (英語) RIKEN Center for Integrative Medical Sciences
Laboratory for Mucosal Immunity, Team Leader, Sidonia Fagarasan

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) モデルマウスを用いた代謝異常と精神・神経症状の相関の解析
開発課題名： (英語) Analysis on correlation between metabolic abnormality and brain disorder using model mice

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人大阪大学 蛋白質研究所 分子発生学研究室
教授 古川貴久

所属 役職 氏名： (英語) Laboratory for Molecular and Developmental Biology,
Institute for Protein Research, Osaka University
Professor Takahisa Furukawa

II. 成果の概要（総括研究報告）

・ 研究開発代表者による報告の場合

・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者：国立研究開発法人理化学研究所 統合生命医科学研究センター 粘膜免疫研究チーム Fagarasan Sidonia 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表 List of Publication / Oral & Poster presentation during FY2016

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）

該当なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

該当なし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 新しい生命像～ゲノムの新大陸とは～, 古川貴久, 和歌山県立田辺高等学校ライブカレッジ, 2016/10/21, 国内.

(4) 特許出願

該当なし

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発事業ユニットタイプ「疾患における代謝産物の解析および代謝制御に基づく革新的医療基盤技術の創出」

(英語) AMED Core Research for Evolutionary medical Science and Technology (AMED-CREST) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) 腸内細菌叢制御による代謝・免疫・脳異常惹起メカニズムの解明と治療応用

(英語) How gut microbiota shifts metabolites leading to neuro-endocrine disorders in mouse and men

研究開発担当者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所 統合生命医科学研究センター
粘膜免疫研究チーム チームリーダー ファガラサン シドニア

所属 役職 氏名： (英語) RIKEN Center for Integrative Medical Sciences
Laboratory for Mucosal Immunity, Team Leader, Sidonia Fagarasan

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 免疫不全マウスにおける腸内細菌叢変化の代謝・行動に与える影響の解析

開発課題名： (英語) How specific immune deficiencies affect body physiology by influencing gut microbiota?

研究開発分担者 (日本語) 慶應義塾大学 医学部 医化学教室 専任講師 杉浦悠毅

所属 役職 氏名： (英語) Keio University School of Medicine, Department of Biochemistry,
Yuki Sugiura

II. 成果の概要（総括研究報告）

・ 研究開発代表者による報告の場合

・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者：国立研究開発法人理化学研究所 統合生命医科学研究センター 粘膜免疫研究チーム Fagarasan Sidonia 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表 List of Publication / Oral & Poster presentation during FY2016

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 件、国際誌 件）

1. **Sugiura Y**, Katsumata Y, Sano M, Honda K, Kajimura M, Fukuda K, Suematsu M. *“Visualization of in vivo metabolic flows reveals accelerated utilization of glucose and lactate in penumbra of ischemic heart.”* **Sci Rep.** 2016, 6:32361

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. *Development of an Imaging Mass Spectrometry Technique for Visualizing Localized Cellular Signaling Mediators in Tissues* (オーラル), Yuki Sugiura, the 9th international conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, 2016.5.22 (国際)

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

(4) 特許出願
該当なし