

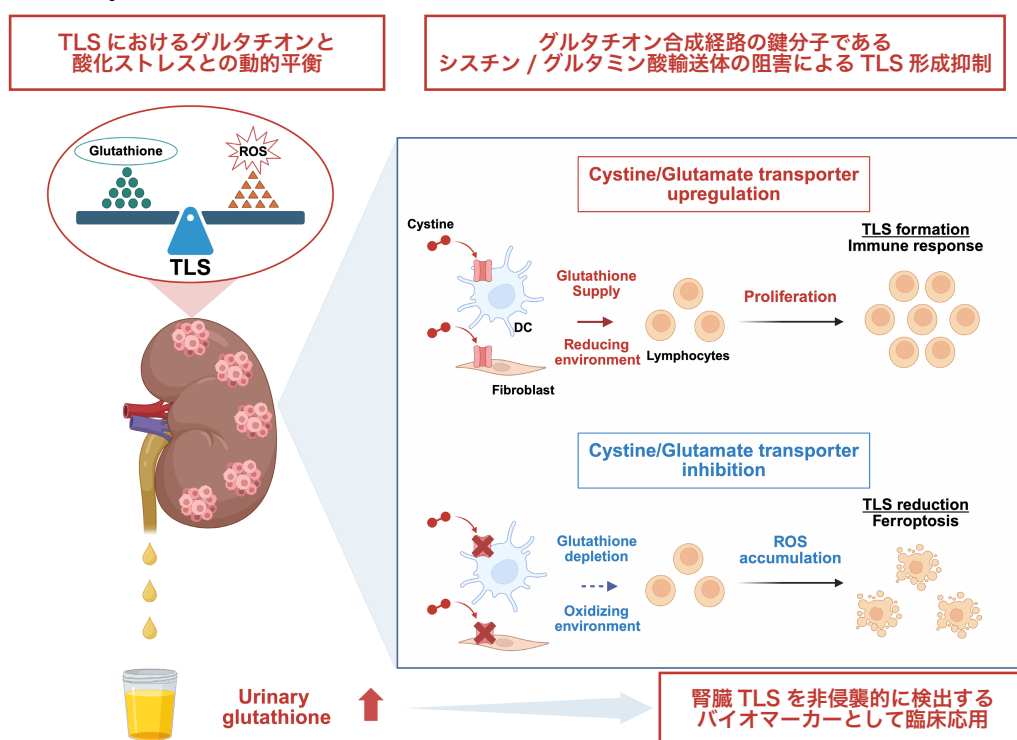
三次リンパ組織における代謝微小環境の解明 —グルタチオンが鍵となる免疫代謝制御機構—

概要

三次リンパ組織（Tertiary lymphoid structure: TLS）は老化や感染など様々な刺激によって非リンパ臓器に誘導される異所性のリンパ組織で、局所における免疫応答の起点として機能します。腎臓における TLS は間質の炎症や尿細管障害を誘導し、IgA 腎症や移植腎など様々な病態において腎予後を悪化させることが知られています。一般に免疫器官はリンパ球の増殖や免疫応答のため様々な代謝資源を必要とすることから、TLS の形成過程では劇的な代謝リモデリングが生じていると予想されていましたが、その詳細はこれまで不明でした。

京都大学医学研究科 腎臓内科学 柳田素子教授（兼・高等研究院ヒト生物学高等研究拠点（WPI-ASHBi）主任研究者/副拠点長）、京都大学大学院医学研究科附属がん免疫総合研究センター マルチオミクスプラットフォーム 杉浦悠毅特定准教授、京都大学医学研究科 腎臓内科学 荒井宏之研究生（研究当時、現：米国・Washington University in St. Louis 腎臓内科 リサーチフェロー）らの研究グループは、イメージング質量分析・メタボローム解析と、多重免疫染色・*in situ* hybridization（RNAscope）・薬理的阻害実験などを組み合わせることにより、腎臓の TLS には抗酸化物質であるグルタチオンと酸化ストレスの双方が高度に集積していることを見出し、グルタチオン合成経路の阻害によって生体内で TLS 形成が抑制されることをはじめて明らかにしました。さらに、腎臓に TLS があるマウスとヒト双方で尿中グルタチオン濃度が有意に上昇しており、IgA 腎症患者において尿中グルタチオンが TLS を非侵襲的に検出する新規バイオマーカーとして機能することを示しました（特許出願中）。将来的に、TLS を標的とした免疫代謝的な介入が腎疾患の新たな治療法となる可能性があります。

本研究成果は、2025 年 8 月 8 日に国際学術誌「*Journal of the American Society of Nephrology*」にオンライン掲載されました。



1. 背景

三次リンパ組織 (Tertiary Lymphoid Structure: TLS) は、炎症や感染、老化などの刺激によって非リンパ臓器に形成される異所性のリンパ組織で、局所における免疫応答の起点として機能します。我々は腎臓に形成される TLS が、IgA 腎症や移植腎など様々な病態において間質の炎症や尿細管障害を誘導し、腎機能の悪化に直接的に寄与することをこれまで明らかにしてきました。

近年、免疫応答と代謝との密接な関連が明らかになりつつあり、活発に研究がなされています (“Immunometabolism”)。一方で、TLS の形成過程における代謝リモデリングの全体像は明らかではありませんでした。特に、免疫応答を支える代謝システムや酸化還元バランスの役割は、これまで *in vitro* の実験系ではその重要性が示唆されていたものの、実際の生体内 (*in vivo*) での関与は未解明でした。こうした背景から、本研究は腎臓の組織解析を得意とする研究グループと生体内代謝物解析を得意とする研究グループとがコラボレーションすることで、TLS の代謝プロファイルを網羅的に解析しその制御機構を明らかにすることを目的として開始しました。

2. 研究手法・成果

本研究では、まずマウス腎臓に形成された TLS を対象に、イメージング質量分析¹ (MALDI-TOF および DESI-MS/MS) と網羅的メタボロミクス解析を組み合わせることで、TLS に局在する代謝物を可視化しました。これにより、TLS には生体内の最も重要な抗酸化物質の一つであるグルタチオン²が高度に集積することと、グルタチオン合成に必須のシステインが著明に減少していることが明らかになりました。また、TLS のある腎臓は、TLS のない腎臓と比較してグルタチオン濃度が有意に高く、グルタチオンの構成要素であるシスチン・システイン濃度が減少していました。すなわち、TLS では局所的にグルタチオンの合成が促進されていることが示唆されました。さらに、TLS には酸化ストレスマーカーである 8-OHdG および 4-HNE が、マウスとヒト双方で強く蓄積することもわかりました。これらの結果から、TLS はグルタチオンと酸化ストレスとが拮抗したバランス(動的平衡)を維持している特殊な代謝微小環境であることが示唆されました。加えて、酸化ストレスプローブ (CellROX) を用いたフローサイトメトリ解析では、TLS 由来の免疫細胞は脾臓や末梢血由来の免疫細胞に比べ、CellROX の蛍光強度が有意に高く、TLS 特有の高酸化ストレス環境が定量的にも裏付けられました。

次に、多重免疫染色と *in situ* hybridization (RNAscope)、シングル核解析の結果から、グルタチオン合成経路の鍵分子であるシスチン/グルタミン酸トランスポーター (xCT, Slc7a11)³が TLS 内の樹状細胞および線維芽細胞に特異的に発現していることがわかりました。これらの細胞はグルタチオンの細胞外排出を担う MRP1 を共発現していることも明らかになりました。さらに、樹状細胞または線維芽細胞と T 細胞を共培養し、*Slc7a11* 特異的 siRNA や阻害薬を用いてシスチン/グルタミン酸トランスポーターを阻害すると、T 細胞内のグルタチオン量が低下しました。この T 細胞のグルタチオン量低下は、特に酸化ストレス環境下で顕著に認められました。これらの結果から、TLS 内では樹状細胞や線維芽細胞が合成したグルタチオンをリンパ球に供給し、リンパ球の増殖・活性化を支えていることが示唆されました。

次に、シスチン/グルタミン酸トランスポーターの阻害薬であるスルファサラジン⁴を用いた薬理的阻害実験を行いました。マウス腎虚血再灌流モデル(Ischemic-reperfusion injury: IRI)において、TLS 形成が始まる時期(IRI 後 14 日)に投与を開始したところ、TLS 形成は著明に抑制され、TLS 関連サイトカインおよびケモカインの発現も有意に低下しました。さらに、TLS がすでに形成された後 (IRI 後 30 日目) から投与した場合も TLS の縮小効果が確認されました。加えて、別の TLS 形成モデルである片側尿管結紮 (Unilateral ureteric

obstruction: UUO) モデルにおいても、スルファサラジン投与により TLS 形成が抑制されることが確認されました。これらの結果は、シスチン/グルタミン酸トランスポーターを介したグルタチオン合成経路が TLS の成立と維持に重要な役割を果たしており、さらに腎疾患モデルに関わらず広く TLS 形成に関与するメカニズムであることを示しています。

さらに、TLS の存在を非侵襲的に推定できる新規バイオマーカーを探索するために、マウスとヒト双方の尿中代謝産物解析を網羅的に行いました。まず、腎臓に TLS のあるマウスの尿中代謝産物を解析したところ、尿中グルタチオン濃度が有意に上昇していることがわかりました。また、TLS 形成を抑制するスルファサラジンの投与により尿中グルタチオン濃度は低下する傾向を示しました。次に、糸球体腎炎の 1 つである IgA 腎症患者の尿中代謝産物を解析したところ、マウスと同様に TLS を有する患者で尿中グルタチオン濃度が有意に上昇していることが確認されました。これらの結果は、TLS におけるグルタチオン合成の亢進が尿中グルタチオン濃度に反映されること、およびこの現象が生物種を問わない現象であることを示唆しています。さらに、尿中グルタチオン濃度を推定糸球体濾過量 (eGFR) と組み合わせることで、IgA 腎症患者において TLS の存在を高精度に検出することができました (AUC=0.92、感度 86%、特異度 83%)。以上の結果から、尿中グルタチオンは腎 TLS を特異的かつ非侵襲的に検出できる有望な新規バイオマーカーとして機能しうることが示されました (特許出願中)。

3. 波及効果、今後の予定

本研究によって、TLS はグルタチオンと酸化ストレスとが拮抗したバランスを保つ特殊な代謝微小環境であり、グルタチオン合成経路が TLS 形成に重要な役割を果たしていることが生体内ではじめて明らかになりました。これまで腎臓病の治療法としてステロイドや免疫抑制剤の投与がありましたが、今回の結果は従来の治療法とは異なる、TLS を標的とした『代謝介入型免疫制御』という新たな治療概念を提示し、腎疾患のみならず自己免疫疾患や腫瘍免疫環境の制御にも波及的な応用が期待されます。さらに、本研究により尿中グルタチオンが TLS 形成を非侵襲的に検出するバイオマーカーとして機能しうることにも示唆されました。これまで腎臓における TLS を検出するには腎生検という侵襲的な方法しかありませんでしたが、尿中グルタチオン濃度を活用することにより TLS の有無や疾患活動性を非侵襲的に把握することが可能となり、早期診断や治療効果判定に応用できる可能性があります。今後は TLS および腎臓における代謝変化をさらに詳細に解析することで新たな治療標的の同定を進める予定です。

4. 研究プロジェクトについて

本研究は以下の資金の援助を受けて行われました (以下、研究開発代表者: 柳田素子)。

- ・国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED)・革新的先端研究開発支援事業 (AMED-LEAP)「三次リンパ組織を標的とした腎臓病治療法および診断法の開発」(AMED-CREST)「腎臓病において組織障害と修復を制御する微小環境の解明と医学応用」、腎疾患実用化研究事業「ヒト腎臓病における三次リンパ組織の役割の解明と治療介入対象としての蓋然性の検討」、健康・医療分野におけるムーンショット型研究開発等事業「炎症誘発細胞除去による 100 歳を目指した健康寿命延伸医療の実現」、橋渡し研究戦略的推進プログラム「アカデミア発先端医療技術の早期実用化に向けた実践と連携」

- ・文部科学省科学研究費助成事業新学術領域研究・学術研究支援基盤形成「腎構成細胞「亜集団」の細胞老化が腎臓の老化と障害応答性に与える影響の解明」

<用語解説>

1. イメージング質量分析: 質量分析装置を用いて、生体組織内の分子（代謝物、脂質など）の分布を画像として可視化する手法です。組織切片上の位置情報を保持したまま、分子の種類と量を同時に取得できます。本研究では MALDI-TOF（マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型）および DESI-MS/MS（脱離エレクトロスプレーイオン化質量分析）を使用し、TLS 領域と非 TLS 領域の代謝物分布を比較することで、TLS に特徴的な代謝パターンを明らかにしました。
2. グルタチオン: グルタミン酸・システイン・グリシンの 3 つのアミノ酸からなるトリペプチドで、細胞内の主要な抗酸化物質です。活性酸素種（ROS）を直接除去し、酸化ストレスから細胞を保護します。免疫細胞の活性化や生存にも必須であり、その合成や消費のバランスは免疫応答に大きく影響します。
3. シスチン/グルタミン酸トランスポーター（xCT, Slc7a11）: 細胞膜上に存在し、細胞外からシスチンを取り込み、代わりに細胞内のグルタミン酸を排出する輸送体です。取り込まれたシスチンは還元されてシステインとなり、グルタチオン合成に利用されます。免疫細胞や腫瘍細胞での生存・増殖に重要な役割を果たします。
4. スルファサラジン: 抗炎症薬の一種で、潰瘍性大腸炎や関節リウマチなどの治療に用いられます。シスチン/グルタミン酸トランスポーターを阻害する作用があり、シスチンの取り込みを抑制することでグルタチオン合成を低下させ、酸化ストレス耐性や細胞増殖能を低下させます。

<研究者のコメント(荒井宏之)>

本研究は、私達の研究グループのメインテーマである三次リンパ組織を、代謝の観点から新たに捉え直そうという発想でスタートしました。免疫代謝(Immunometabolism)の分野は、これまで主に *in vitro* で活発に研究が進められてきましたが、生体内で実際にどのような現象が生じているのかはほとんどわかっていませんでした。代謝解析の技術は、当時慶應義塾大学にいらっしゃった杉浦悠毅先生のもとへ定期的に伺い指導を受け、少しずつ習得しました。後に杉浦先生が京大に着任され、新幹線に乗らなくても近衛通を渡るだけで研究室に伺えるようになり研究がやりやすくなりました。実験系の構築や解析に苦しみ試行錯誤を重ね、研究を断念しようかと思ったこともありました。しかし、苦勞の甲斐あり、最終的にはこれまで知られていなかった『生体内での免疫代謝メカニズム』の一端を明らかにし、腎臓病に対する新たな治療コンセプトと新規バイオマーカーとしての可能性を示せたことを嬉しく思います。腎臓病領域は、他領域と比較して有効な治療薬が限られているのが現状です。今後さらに研究を進めることで、腎臓病の新たな治療法の開発や診断技術の革新につながることを願っています。最後になりましたが、長年ご指導いただきました柳田先生、杉浦先生はじめ皆様にごの場を借りて御礼申し上げます。



プロフィール写真(荒井宏之)

<論文タイトルと著者>

タイトル： Glutathione Synthesis via the Cystine/Glutamate Transporter Promotes the Formation of Tertiary Lymphoid Structures in the Kidney

（シスチン / グルタミン酸輸送体を介したグルタチオン合成は腎臓三次リンパ組織形成を促進する）

著者： Hiroyuki Arai, Yuki Sugiura, Shinya Yamamoto, Takahisa Yoshikawa, Yuta Matsuoka, Rae Maeda, Hiroyuki Neyama, Ryo Kamimatsuse, Shima Goto, Keisuke Taniguchi, Naoya Toriu, Makiko Kondo, Yuki Sato, Shingo Fukuma, Motoko Yanagita

掲載誌： *Journal of the American Society of Nephrology*

DOI : 10.1681/ASN.00000000825