

表 題 低分子化合物を用いたアレルギー性気道炎症の新規制御法の開発

論文の区分 博士課程

著 者 名 八木 悠一郎

担当指導教員氏名 臨床薬理学部門 教授 今井 靖

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
専攻 地域医療学系
専攻分野 内分泌代謝疾患・病態解析学分野
専攻科 臨床薬物治療学

2021年1月8日申請の学位論文

目次	頁
略語リスト	3
1. 緒論	4
2. 実験方法	8
2-1. 化学化合物	8
2-2. マウス	8
2-3. <i>In vitro</i> における CD4 T 細胞分化	8
2-4. フローサイトメトリー	9
2-5. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	10
2-6. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)	10
2-7. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay	11
2-8. Immunoblot analysis	11
2-9. 統計学的処理	12
3. 結果	13
3-1. AZD7545 が T 細胞サブセット分化に与える影響	13
3-2. AZD7545 が Th2 分化に必要な転写因子に与える影響	18

3-3. AZD7545 が IL-33 によって誘導される Th2 サイトカイン産生に与える影響	21
3-4. AZD7545 による細胞内代謝変化	23
3-5. メバロン酸経路の阻害と Th2 細胞分化	27
4. 考察	31
5. 結論	34
6. 謝辞	35
7. 参考文献	36

略語リスト

本論文では以下の略語を用いた。

ATP	adenosine triphosphate
ChIP	chromatin immunoprecipitation
CoA	coenzyme A
ECAR	Extracellular acidification rate
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FPP	Farnesyl pyrophosphate
FoxP	forkhead box P
Gfi1	growth factor independent 1
GGPP	Geranylgeranyl diphosphate
HIF	hypoxia induced factor
HMG-CoA	hydroxymethylglutaryl-CoA
IFN γ	interferon γ
IL	Interleukin
IPP	isopentenyl diphosphate
MVA	Mevalonate
OCR	Oxygen consumption rate
PDHC	pyruvate dehydrogenase complex
PDHK	pyruvate dehydrogenase kinase
TCA	tricarboxylic acid
TNF α	tumor necrosis factor α
Th	T helper
Th1	T helper type1
Th17	T helper type17
Th2	T helper type2
Treg	regulatory T
OXYPHOS	oxidative phosphorylation
Ppar γ	peroxisome proliferator-activated receptor γ
qRT-PCR	Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction

1. 緒論

気管支喘息は「気道の慢性炎症を本態とし、変動性をもった気道狭窄(喘鳴、呼吸困難)や咳などの臨床症状で特徴付けられる疾患」と定義され、日本での喘息総患者数は117万7000人と推定される[1]。吸入ステロイドの喘息に対する有効性が明らかとなり[2]、それらを用いた長期管理法が示されるようになったことで、日本における喘息死亡数は減少しているが、今なお標準的な治療で十分なコントロールが得られない難治性喘息患者も存在する。

このような難治性喘息患者への治療戦略を考える中で、喘息の根底にある病態に関しても分子生物学的、免疫学的側面から研究がすすんでいる。ナイーブCD4 T細胞は、外来抗原を認識すると速やかに活性化し、様々なヘルパーT (Th) 細胞サブセットへ分化、増殖する。ヘルパーT細胞サブセットであるTh1、Th2、Th17細胞は、異なるサイトカインを産生し、各々が異なったエフェクター機能を有しているが[3][4]、ヘルパーT細胞の過剰な活性化や、誤った方向への誘導は、アレルギー疾患や自己免疫疾患といった炎症性疾患を惹起することが知られている[5]。それらの中でも、アレルギー疾患の根底にあるメカニズムは、Th2細胞異常などによりもたらされる2型炎症であることが示されている。Th2細胞は、IL-4、IL-5、IL-13といった2型サイトカインを産生し、Th2細胞型アレルギー炎症を引き起こす。Th2細胞型アレルギー炎症の病態は、IL-5によって誘導される好酸球増多、IL-4とIL-13によるIgE産生、IL-13によって媒介される杯細胞の過形成などであるが[6][7]、肺Th2細胞の中にIL-33受容体を強発現し、IL-33に反応して抗原非依存的にIL-5、IL-13を産生する細胞群が存在すること報告されている。これらの細胞群は病原性Th2細胞と呼ばれ、通常のTh2細胞と比較してより高いIL-5産生能を持っており、アレルギー性気道炎症の病態形成に関与していることが明らかとなってきた[8][9]。いずれの機序にせよ、その病態の中心にはTh2細胞があり、このTh2細胞への分化と機能を調整することが、新しいアレルギー疾患の治療戦略となりうると考えられる。

過去20年間で、Th2サイトカインを標的とした新しい生物学的製剤が重症喘息患者に対して承認されてきた。抗IL-5抗体であるメボリズマブは特定の喘息患者に有用である[10]。メボリズマブに加えて、同じく抗IL-5抗体であるレスリズマブ、抗IL-5受容体抗体であるベンラリズマブも実用化された[11][12][13][14]。他のTh2サイトカインであるIL-4、IL-13もアレルギー疾患治療の標的となっており、IL-4、13いずれの機能も阻害する抗IL-4 α 受容体抗体であるデュピルマブも使用されている[15]。Th2サイトカインを標的とした治療薬が、特定の喘息患者に有用であることは明白であるが、生物学的製剤は従来の喘息治療薬と比較して高価であること、投与経路が限られているといった問題がある。その為、安価で安定的に大量生産でき、経口投与も可能である低分子化合物の開発が望まれている。

近年、T細胞の分化、機能は細胞内代謝状態と密接に関連していることが明らかとなっており、多くの研究においてナイーブCD4 T細胞が活性化する際には酸素存在化においても解糖系が亢進している(好気性解糖)ことが示されている。解糖は、酸化的リン酸化と比較してATP産生効率は劣るが、迅速にATPを産生できることに加えて、細胞増殖に必要な生合成中間体を産生して細胞増殖をサポートすると考えられている[16]。この解糖系優位の細胞内代謝変化において、ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ(PDHK; Pyruvate dehydrogenase kinase)は、低酸素誘導因子(HIF: Hypoxia inducible factor)によって上方制御されており[17]、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体(PDHC: Pyruvate dehydrogenase complex)サブユニットをリン酸化することで、PDHCを不活化している[18]。PDHCはピルビン酸をアセチルCoAに変換する際に必要な酵素であるため、PDHKの活性化はピルビン酸からアセチルCoAへの変換を阻害する。このように、PDHKを介したPDHCの調整が、解糖系の最終代謝産物であるピルビン酸のフラックスを決定する重要な因子の一つである。

一方、合成されたアセチルCoAはさらにクエン酸に変換され、ミトコンドリア内でTCA

サイクルの一部として使用される他に、細胞質に輸送された後にアセチルCoAに再変換され、脂質やメバロン酸経路に利用される[19]。メバロン酸経路の中間体にはファルネシルピロリン酸(FPP : Farnesyl pyrophosphate)とゲラニルゲラニルニリン酸(GGPP : Geranylgeranyl pyrophosphate)があり、タンパク質のプレニル化に利用されている(図1)。タンパク質のプレニル化は翻訳後調節であり、プレニル化タンパクは癌、骨疾患、感染症を含む多くの疾患の病態に関与することが知られている[20]。

本研究の目的は、PDHKを薬力学的に競合的に阻害することで、メバロン酸合成やそれに続くタンパクプレニル化を阻害し、IL-5、13産生Th2細胞への分化、増殖が抑制できることを示すことである。これらの代謝経路の阻害剤は、Th2依存的な免疫疾患の新規治療標的となる可能性があると考えられる。

なお、今回使用したAZD7545は、ハイスループットスクリーニングによって同定されたPDHK阻害薬であり、PDHC活性化に伴う骨格筋へのグルコース取り込み増加と血糖降下作用を期待して糖尿病の治療薬として開発された化合物である。

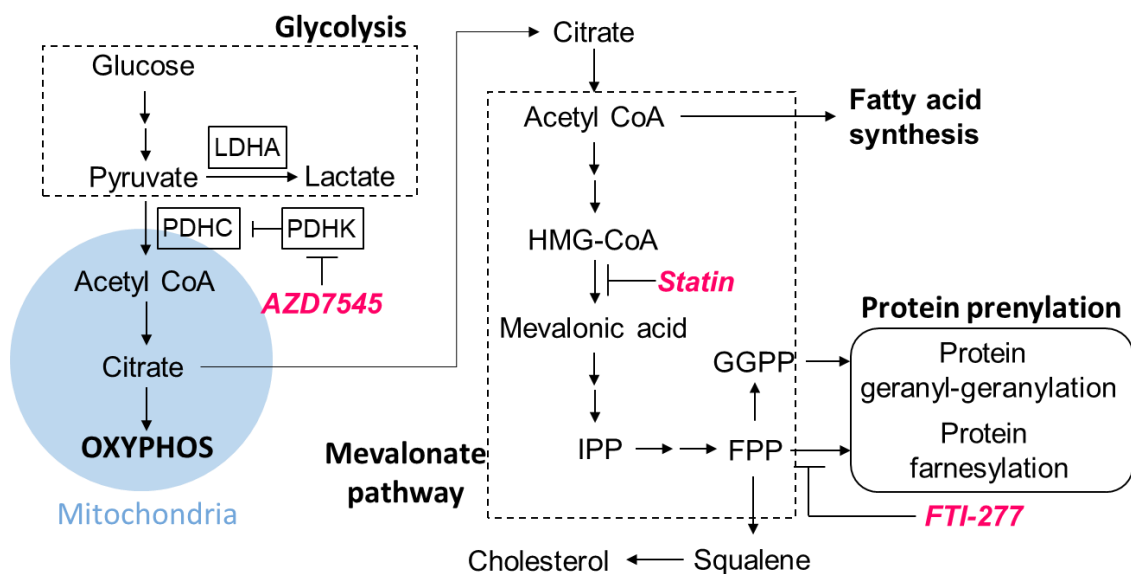


図1：代謝経路の概要と阻害薬の作用部位

PDHK を介した PDHC による解糖系調節経路と、それに続く OXPHOS、脂肪酸合成、ピルビン酸経路の概略を示す。解糖系の代謝酸物であるピルビン酸は PDHC によってアセチル CoA、LDHA によって乳酸に代謝される。好氣的解糖においては、PDHK によって PDHC 活性が上昇し、ピルビン酸から乳酸への変換が上方制御されている。AZD7545 は PDHK の選択的阻害薬である。

ピルビン酸から生成されたアセチル CoA はミトコンドリア内でクエン酸に変換され、エネルギー産生や脂肪酸合成などに使用される一方で、細胞質に輸送されてアセチル CoA に再合成される。このアセチル CoA は脂肪酸合成、メバロン酸経路に利用される。

スタチンはメバロン経路において HMG-CoA からメバロン酸への変換を阻害する。また、FTI-277 は FPP によるタンパク質のファルネシル化を阻害する。

(LDHA : Lactate dehydrogenase A、PDHC : Pyruvate dehydrogenase complex、PDHK : Pyruvate dehydrogenase kinase、HMG-CoA : hydroxymethylglutaryl-CoA、IPP : Isopentenyl diphosphate、FPP : Farnesyl pyrophosphate、GGPP : Geranylgeranyl diphosphate)

方法

2-1 化学化合物

本研究で使用した AZD7545 と Lovastatin は Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) から購入した。また、FTI-277 は Tocris Bioscience (Bristol, UK) から購入した。

2-2 マウス

本研究で用いた C57BL/6 マウスは日本クレア (Tokyo, Japan) から購入した。すべてのマウスは、SPF (specific pathogen free) 動物飼育区域で飼育した。動物を用いたすべての実験は、愛媛大学の動物実験委員会の承認を得ており、動物管理は愛媛大学のガイドラインに従って行った。

2-3 In vitro における CD4 T 細胞分化

実験で用いたナイーブ CD4 T 細胞(CD44^{low}CD62L^{high})は、マウスの脾臓から Mojo sort Mouse CD4 T Cell Isolation Kit (Cat # 480033; BioLegend, San Diego, USA) を用いて精製した。1.5 × 10⁶個のナイーブ CD4 T 細胞を、固相化した抗 TCR-βモノクローナル抗体(10 μg/ml, H57-597; BioLegend)と抗 CD28 抗体で活性化し、各阻害剤の存在・非存在下で指定されたサイトカイン条件の下で2日間培養を行った。次に、細胞を新しいプレートに移し、阻害剤の存在・非存在下条件でさらに培養を行った。特に言及がない限り、AZD7545 は 3 μM の濃度で使用した。各々のサブセット分化で使用したサイトカイン条件は以下の通りである。

Th1 分化条件: IL-2 (10 ng/ml)、IL-12 (1 ng/ml)、抗 IL-4 モノクローナル抗体 (2.5 μg/ml)

Th2 分化条件: IL-2 (10 ng/ml)、IL-4 (3 ng/ml)、抗 IFN-γ モノクローナル抗体 (2.5 μg/ml, R4-6A2; BioLegend)

Th17 分化条件: IL-1β (10 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml), TGF-β (1 ng/ml), 抗 IFN-γ モノクローナル抗体 (2.5 μg/ml)、抗 IL-4 モノクローナル抗体 (2.5 μg/ml)

細胞は、10%牛胎児血清、4 mM L-グルタミン (cat#16948-04; Nacalai Tesque, Kyoto,

Japan), 1 mM ビルビン酸 (cat#11360-070; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 1% MEM 非必須アミノ酸 (cat#06344-56; Nacalai Tesque), 10 mM HEPES (cat#17557-94; Nacalai Tesque), 55 μ M 2-メルカプトエタノール (cat#21985-023; Thermo Fisher Scientific)、1% ペニシリンストレプトマイシン (cat#15140-122; Thermo Fisher Scientific) となるように調整された RPMI1640 (cat#183-02165; FUJIFILM Wako Chemicals, Osaka, Japan) 溶液中で培養を行った。

2-4 フローサイトメトリー

In vitro で分化した細胞を、モネンシン (2 μ M, Cat#M5273; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) 存在下で、固相化した抗 TCR- β モノクローナル抗体 (10 μ g/ml, H57-597; BioLegend) を用いて 6 時間再刺激した。それらの細胞を、4%パラホルムアルデヒド (Cat#163-20145, 和光ケミカル) で固定し、細胞透過処理用バッファー (50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.02% NaN₃, 0.5% TritonX-100) で膜透過処理を行った。次に、以下の蛍光抗体を用いて細胞内染色を行った。

anti-IL-4-PE (11B11; BioLegend)、anti-IL-5-APC (TRFK5; BioLegend)、anti-IL-13-PE (eBio13A; eBioscience)、anti-IFN- γ -APC (XMG1.2; BD Biosciences)、anti-IL-2-APC (JES6-5H4; BD Biosciences)、anti-TNF- α -APC (MP6-XT22; BD Biosciences)、anti-IFN- γ -FITC (XMG1.2; BD Biosciences)、anti-IL-17A-PE (TC11-18H10.1; BioLegend)、anti-IL-17F-Alexa 647 (9D3.1C8; BioLegend)

Foxp3 の細胞内染色には、Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Kit (cat#TNB-0607, TONBO Biosciences) を添付文書に沿って使用した。

測定には FACS Caliber instrument (BD Biosciences) を使用して、それらの結果は FlowJo ソフトウェアプログラム (Tree Star, Ashland, OR, USA) を用いて解析した。

2-5 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

In vitro で分化した細胞を、固相化した抗 TCR- β モノクローナル抗体 (10 μ g/ml, H57-597; BioLegend)を用いて 16 時間再刺激し、その上清を回収した。上清中のサイトカイン濃度は、以下に記載する抗体、試薬を用いて ELISA で測定した。

anti-IL-4 mAb (Cat# 554,387; BD Biosciences)、Biotin-anti-IL-4 mAb (Cat# 554,390; BD Biosciences)、anti-IL-5 mAb (Cat# 554,393; BD Biosciences)、Biotin-anti-IL-5 mAb (Cat# 554,397; BD Biosciences)、anti-IFN- γ mAb (Cat# 551,216; BD Biosciences)、Biotin-anti-IFN- γ mAb (Cat# 554,410; BD Biosciences)、anti-IL-2 mAb (Cat# 554,424; BD Biosciences)、Biotin-anti-IL-2 mAb (Cat# 554,426; BD Biosciences)、streptavidin Horseradish Peroxidase (Cat# 434,323; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and TMB Peroxidase EIA Substrate kit (Cat# 1721066; BIO-RAD, CA, USA)

IL-13、IL-17A、IL-17F の濃度は以下のキットの抗体、試薬を用いて測定を行った。Mouse IL-13 DuoSet ELISA (Cat# DY413; R&D Systems, MN, USA)、Mouse IL-17 DuoSet ELISA (Cat# DY421; B&D Systems) and Mouse IL-17F DuoSet ELISA (Cat# DY2057; B&D Systems)

2-6 Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Total RNA の抽出には TRI reagent (Cat# TR118; Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA)を用いた。cDNA は Superscript VILO cDNA synthesis kit (Cat# 11,754; Thermo Fisher Scientific)を用いて合成した。qPCR は Roche Universal Probe Library と Thunderbird Probe qPCR Mix (Cat# QPS-101T; TOYOBO, Osaka, Japan)、あるいは TaqMan Gene Expression Assay を使用して、The Step One Plus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)を用いて行った。使用した各種プライマーと Roche Universal probe を以下に記載する。*cMaf*の測定には TaqMan プローブ Mm02581355_s1 を使用した。

Gene	Forward sequence (5'→3')	Reverse sequence (5'→3')	Probe
<i>Gata3</i>	TTATCAAGCCCAAGCGAAG	TGGTGGTGGTCTGACAGTTC	108
<i>Gfi1</i>	ATGTGCGGCAAGACCTTC	ACAGTCAAAGCTGCGTTCCT	1
<i>Pparγ</i>	GGGCTGAGGAGAAGTCACAC	AGACCCCGTCAGGCTGTT	92
<i>Il1r1l</i>	GGCCAGAACAACACCTGTC	GACCTGTTACCTGGGCAAGAT	31

2-7 Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay

ChIP アッセイには、The Magna ChIP kit(Merck, Daemastadt, Germany)を使用した。細胞を 1%ホルムアルデヒドで処理して、DNA とヒストンの結合を固定した。次にソニケーションで DNA の断片化を行い、anti-histone H3K27ac pAb (Cat#39133; Active Motif)を用いて免疫沈降を行った。濃縮された DNA を用いて qPCR を行い、Th2 サイトカイン遺伝子座における活性化ヒストンの濃縮状況を調べた。qPCR に用いた Th2 サイトカイン遺伝子座の特異的なプライマーおよび Roche Universal probe を以下に記載する。

cytokine	Forward sequence (5'→3')	Reverse sequence (5'→3')	probe
IL-4 IE	CCCAAAGGAGGTGCTTTTATC	AAATCCGAAACTGAGGAGTGC	75
CGRE	CTCTCCTGGTGGCGTGTT	CTTTGCGCACCCCTTGAAC	53
IL-5p	TCACCTTTATCAGGAATTGAGTTTAA CA	GATCGGCTTTTCTTGAGCAC	43

2-8 Immunoblot analyses

細胞質および核の抽出物は NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Regents(Cat# 78,833; Thermo Fisher Scientific)を用いて調製した。ライセートを SDS ポリアクリルアミドゲル上で分離し、メタノールで親水処理をした PVDF メンブレンにタンク式ブロッキング装置でブロッキングした。その後以下の抗体を用いてタンパクの検出を行った。
anti-Gata3 mAb (HG3-31, Santa Cruz, CA, USA)、anti-Gfi1 pAb (M-19; Santa Cruz)、anti-Ppar γ mAb (81B8, CST, MA, USA)、anti-c-Maf pAb (A300-613A, Bethyl Laboratories, TX, USA)、anti- α -Tubulin mAb (11H10, CST)

2-8 統計学的処理

統計解析には GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)を用いた。全ての数値は平均±標準偏差で示した。2 群間の量的比較には Student's t test を用い、 $p<0.05$ を統計学に有意と判断した。

2. 結果

3-1 AZD7545 が T 細胞サブセット分化に与える影響

3-1-1 AZD7545 は Th2 サイトカイン産生細胞の生成を抑制する

PDHK 阻害と、PDHK 阻害による PDHC の活性化が、Th2 分化にどのような影響を与えるか検討するために、マウスの脾臓から抽出したナイーブ CD4 T 細胞を、AZD7545 存在化、非存在下で Th2 条件の元で 5 日間培養を行った。細胞内染色を行ってフローサイトメトリーで Th2 サイトカイン産生細胞割合を確認したところ、AZD7545 の濃度依存的に、IL-5、IL-13 の産生細胞割合が減少していた。一方で IL-4 産生細胞割合には変化がなかった(図 2A)。AZD7545 を投与して培養を行った Th2 細胞では IL-5 と IL-13 産生が低下していることを ELISA で確認した(図 2B)。IL-5、IL-13 に加えて IL-4 の産生も低下していた。一方で、Th2 細胞の増殖能は AZD7545 の影響を受けなかった(図 3)。

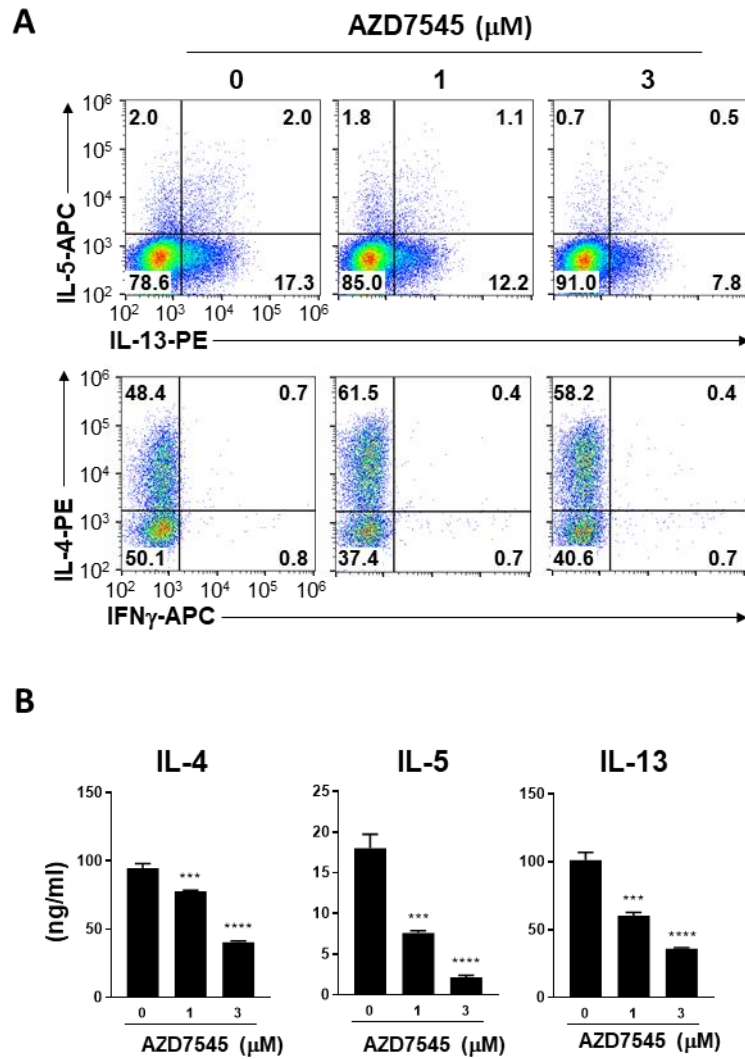


図 2: AZD7545 が Th2 細胞分化に与える影響

(A) ナイーブ CD4 T 細胞を、指定された AZD7545 濃度のもと、Th2 分化条件で 5 日間培養した。培養後の細胞を回収して、TCR β モノクローナル抗体で 6 時間再刺激した後に、細胞内染色を用いて IL-5/IL-13、IL-4/IFN γ 産生細胞割合を調べた。同様の結果が得られた少なくとも 3 回の独立した実験の代表を示す。

(B) (A) で得られた Th2 細胞のサイトカイン産生量を ELISA で調べた。得られた Th2 細胞は TCR β モノクローナル抗体で 16 時間再刺激を行った。(mean \pm S.D., $n=3$)

*** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ vs cells without AZD7545 (Student's t -test)

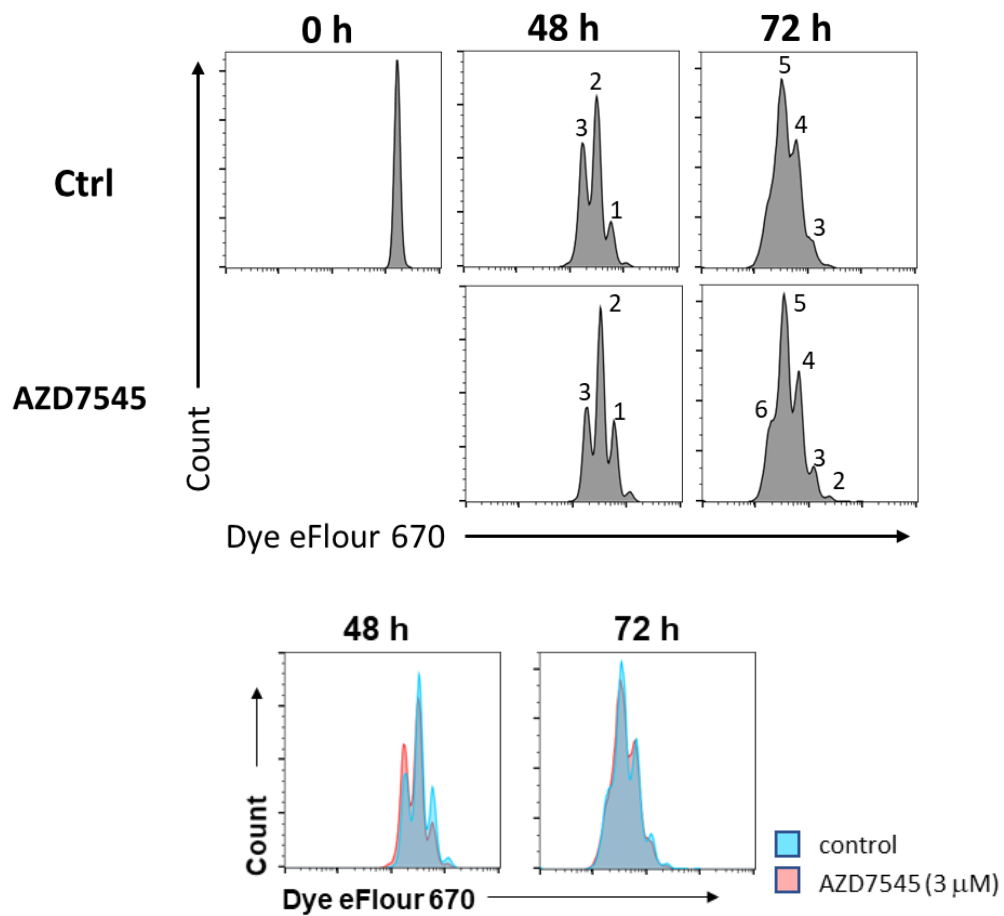


図 3: AZD7545 が Th2 細胞増殖に与える影響

細胞増殖アッセイの結果を示す。刺激前のナイーブ CD4 T 細胞を、Cell Proliferation Dye eFluor™ 670 (cat#65-0840, #00-4222, Thermo Fisher Scientific) で染色し、指定の期間 Th2 分化条件の元で培養を行った。娘細胞に色素が均等に分配され、連続的に蛍光強度が半分になることを利用して細胞分裂の回数を測定している。上段では個々の結果を示し、数字は細胞分裂の回数を意味している。下段は上段の結果を重ねて表示したものである。AZD7545 は Th2 細胞分裂には影響を与えなかった。

3-1-2 AZD7545 が Th2 細胞以外の細胞分化に与える影響は Th2 細胞と比較して小さい

次に、AZD7545 が Th1、Th17、Foxp3 発現 Treg 細胞の分化に与える影響を検討した。IFN γ と TNF α 産生 Th1 細胞割合はわずかに減少する一方で、IL-2 産生 Th1 細胞割合はわずかに増加していた(図 4 A)。IL-17A、IL-17F 産生 Th17 細胞割合もわずかに減少していた(図 4B 上)。IL-17 分化条件下での Foxp3 陽性 Treg 細胞割合は AZD7545 の影響を受けなかった(図 4B 下)。これらの結果より、AZD7545 は他のサブセットと比較して Th2 細胞分化をより顕著に抑制していることが示された。

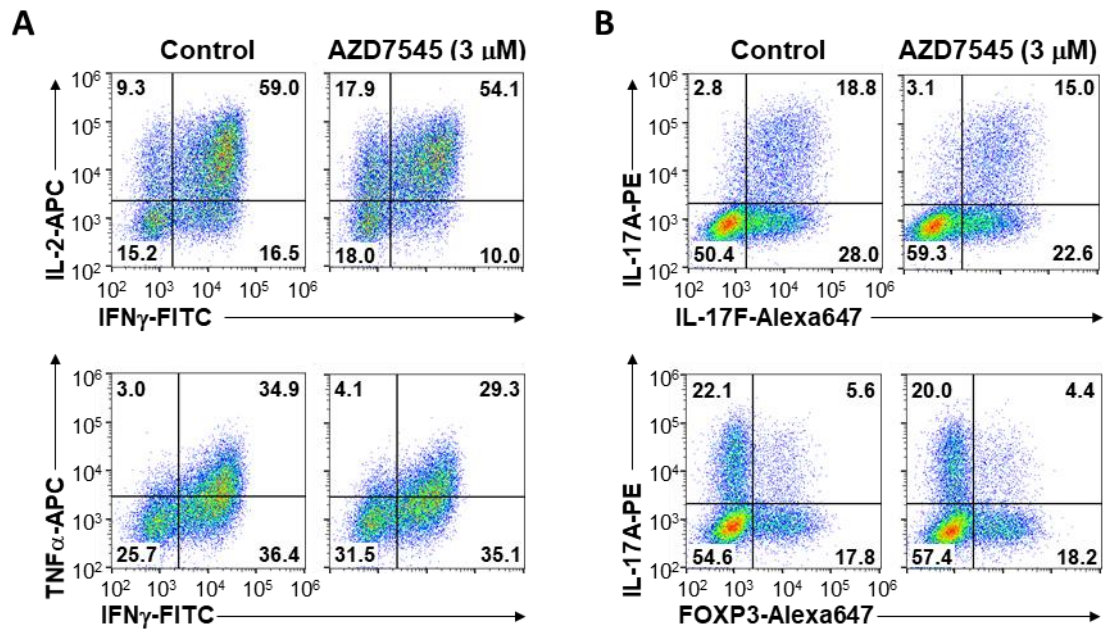


図 4: AZD7545 が Th2 細胞以外 CD4 陽性 T 細胞サブセット分化に与える影響

ナイーブ CD4 T 細胞を AZD7545(3 μ M)の存在化、非存在下で Th1 分化条件 (A)、Th17 分化条件 (B) で培養を行った。細胞を回収して、TCR β モノクローナル抗体で 6 時間再刺激した後に、細胞内染色を行ってフローサイトメトリーでサイトカイン産生細胞割合を調べた。同様の結果が得られた少なくとも 3 回の独立した実験の代表を示す。

3-2 AZD7545 が Th2 分化に必要な転写因子に与える影響

AZD7545 が Th2 分化を抑制する機序を調べる為に、Th2 細胞の分化に関連する mRNA と蛋白発現を評価した(図 5A、5B)。Th2 細胞分化のマスター転写因子である Gata3[21]の mRNA 量と蛋白発現量は、AZD7545 投与による影響はなかった。対照的に、growth factor independent-1(Gfi-1)、c-maf、peroxisome proliferator-activated receptor (Ppar γ)の mRNA 量および蛋白量は、コントロールの Th2 細胞と比較して AZD7545 を投与して分化させて Th2 細胞で低下していた。鈴木らは Gfi1 が Th2 細胞における *Il5* 遺伝子座の活性クロマチン状態の誘導と維持に必要であることを示している[22]。予想通り、*Il5* 遺伝子座のプロモーター領域における活性化ヒストンマークである H3K27ac、H3K4me1 は、AZD7545 の投与で低下していた。抑制性のヒストンマークである H3K27me3 には変化はなかった(図 6)。

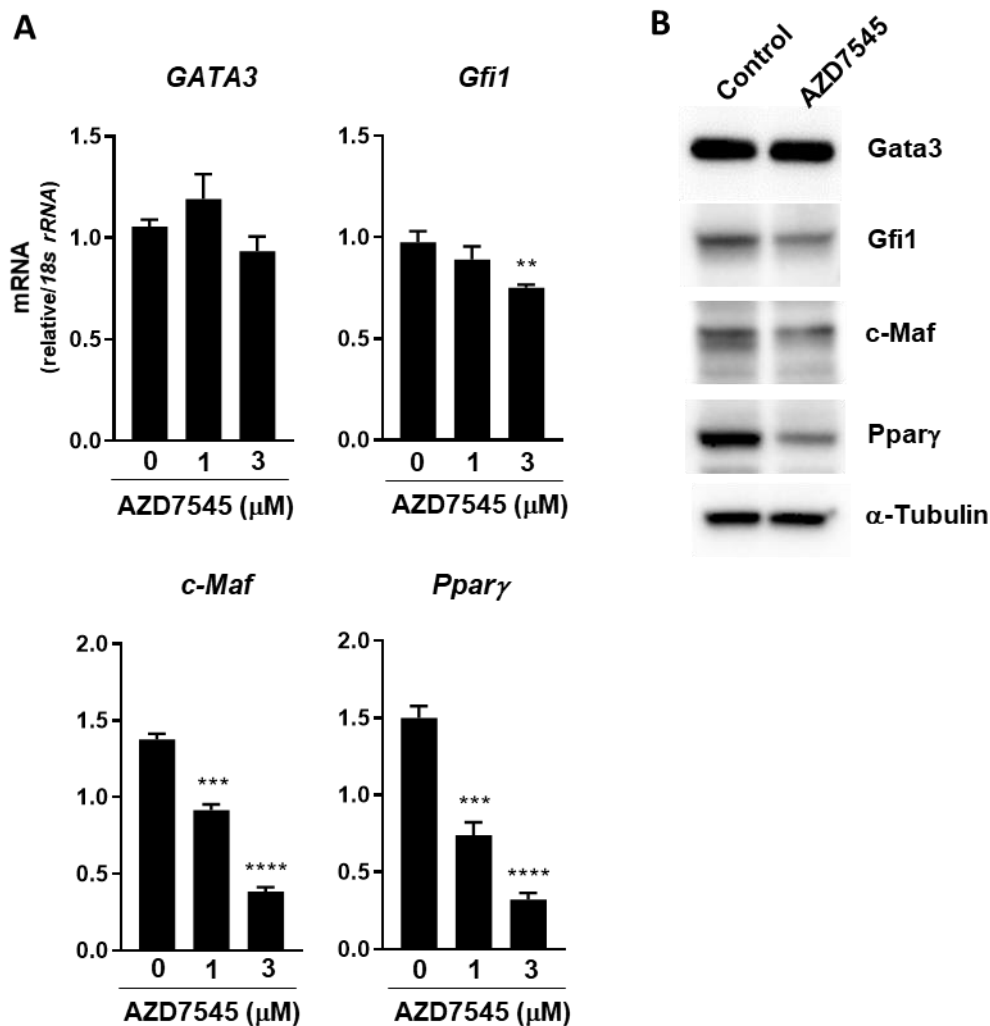


図 5: AZD7545 が転写因子(GATA3、cMaf、Gfi1、Ppary)に与える影響

(A) Th2 分化条件 (AZD7545 0-3 μM) で 5 日間培養を行った細胞の Gata3、Gfi1、c-Maf、Ppary の mRNA 量を、quantitative RT-PCR で測定した。内部標準として 18s rRNA 発現量を測定し、内部標準に対する相対値を示した。(mean ± S.D., n=3, technical replicate) ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs cells without AZD7545 (Student' t-test)

(B) Th2 分化条件 (AZD7545 0, 3 μM) のもと 5 日間培養した細胞の核分画中の、抗 Gata3 抗体、抗 Gfi1 抗体、抗 c-Maf 抗体、抗 Ppary 抗体を用いた免疫ブロット解析の結果を示す。細胞質分画の α-tubulin のタンパク量をローディングコントロールとした。免疫ブロット分析の結果は、同様の結果が得られた少なくとも 3 回の独立した実験の代表を示す。

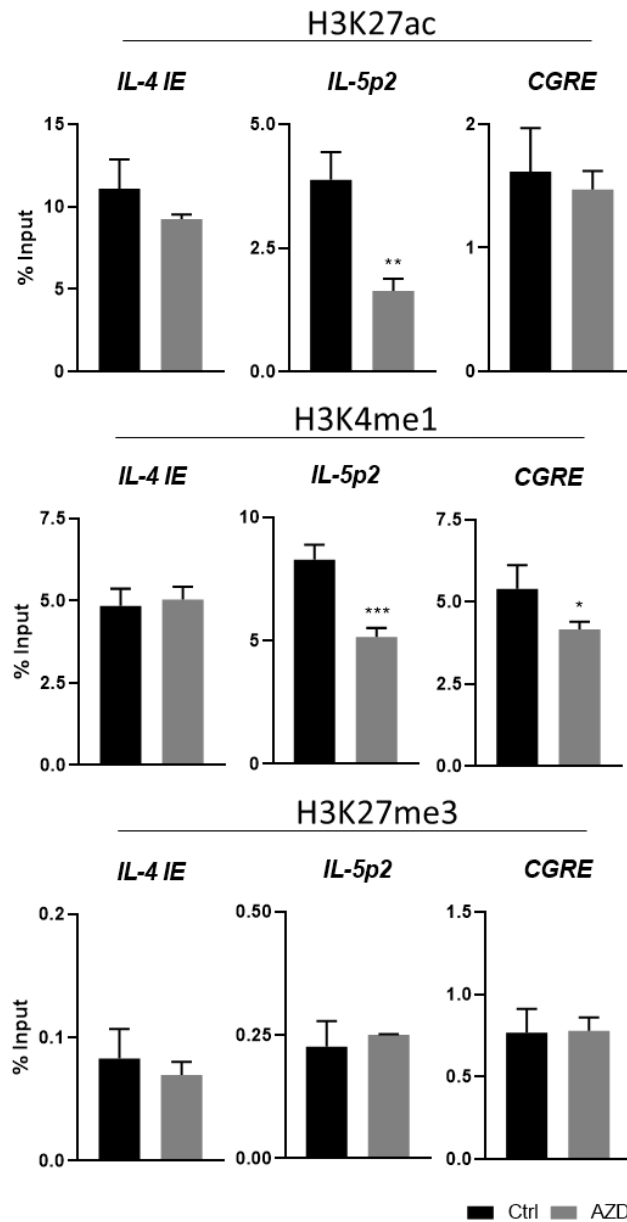


図 6: AZD7545 が Th2 サイトカイン遺伝子座のヒストン修飾に与える影響

AZD7545 の存在、非存在下で Th2 分化条件のもと 5 日間培養したナイーブ CD4 T 細胞における、Th2 サイトカイン遺伝子座のヒストン H3K27 アセチル化、H3K4 モノメチル化、H3K27 トリメチル化レベルを ChIP-qPCR を用いて測定した。結果は、入力 DNA に対する相対値を示す。(mean \pm S.D., $n = 3$) * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs cells without AZD7545 (Student' t -test)

3-3 AZD7545 が IL-33 によって誘導される Th2 サイトカイン産生に与える影響

3-3-1 AZD7545 は IL-33 によって誘導される Th2 サイトカイン産生を抑制する

Th2 細胞において、IL-33 は抗原非依存的な IL-5、IL-13 の産生を通じて慢性気道炎症を引き起こす[8]。図 7A、7B で示すように、IL-33 依存的な IL-5 と IL-13 の誘導は、コントロールの Th2 細胞と比較して AZD7545 を投与した細胞で低下していた。

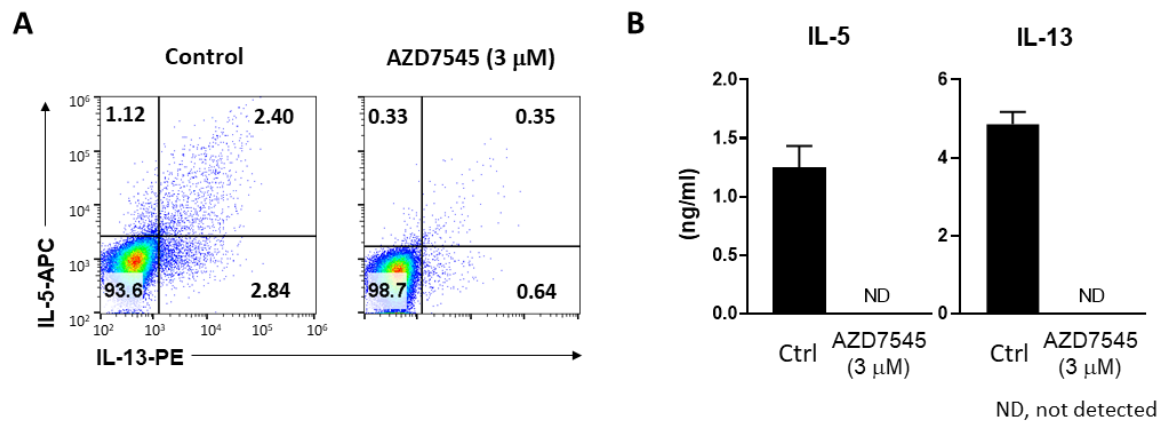


図 7: AZD7545 が IL-33 によって誘導される Th2 サイトカイン産生に与える影響

(A) AZD7545 の存在、非存在下で Th2 分化条件のもとで、ナイーブ CD4 T 細胞を 5 日間培養した。次に、細胞を新しいプレートに移し、IL-7 (10 ng/ml)、IL-33 (10 ng/ml) 存在下でさらに 36 時間培養を行った。細胞内染色を行って IL-5/IL-13 産生細胞割合の変化を調べた。同様の結果が得られた少なくとも 3 回の独立した実験の代表を示す。

(B)(A) で得られた Th2 細胞のサイトカイン産生量を ELISA で調べた。得られた Th2 細胞は TCR β モノクローナル抗体で 16 時間再刺激を行った。(mean \pm S.D., n=3)

3-3-2 AZD7545 は PPAR γ 発現を抑制し、IL-33 レセプター発現を調整する

これまでの実験で、AZD7545 存在下で Th2 分化させた Th2 細胞では PPAR γ の発現が低下していることを示した。Ppar γ は IL-33 受容体(ST2)の誘導によって IL-33 への反応性を調整することが知られている[23]。IL-33 で抗原非依存的に反応させた Th2 細胞における Ppar γ と *Il1rl1*(IL-33 受容体)の mRNA 量を調べところ、いずれも AZD7545 存在下で分化させた Th2 細胞で低下していた(図 8)。

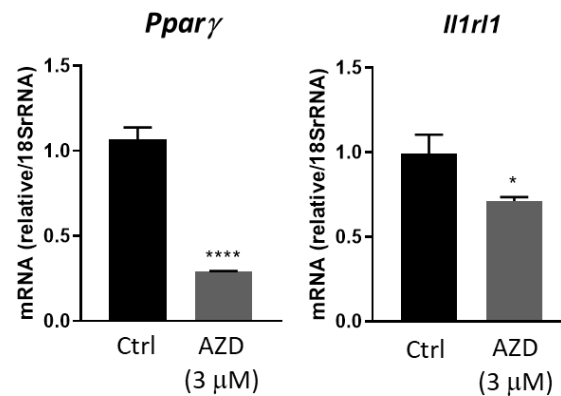


図 8: AZD7545 が IL-33 レセプター (*Il1rl1*)に与える影響

図 7 で使用した細胞の Ppar γ と *Il1rl1* mRNA 量を、quantitative RT-PCR で測定した。内部標準として 18s rRNA 発現量を測定して、内部標準に対する相対値を示した。(mean \pm S.D., $n=3$, technical replicate) * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ vs cells without AZD7545 (Student' t -test)

3-4 AZD7545 による細胞内代謝変化

3-4-1 AZD7545 の投与は Th2 細胞における解糖系、ミトコンドリア呼吸を変化させない

AZD7545 が Th2 細胞の代謝に与える影響を検討するために、ミトコンドリア呼吸を反映する Oxygen consumption rate (OCR) と、解糖の指標となる extracellular acidification rate (ECAR) を Flux analyzer を用いて測定した。Th2 分化条件のもと 36 時間 (図 9A)、5 日間 (図 9B) 培養を行い、それらの細胞を用いて OCR と ECAR を測定したが、驚くべきことに、いずれの培養時間においても、OCR、ECAR 共に、AZD7545 存在下で分化させた Th2 細胞とコントロールの Th2 細胞で同程度であった。

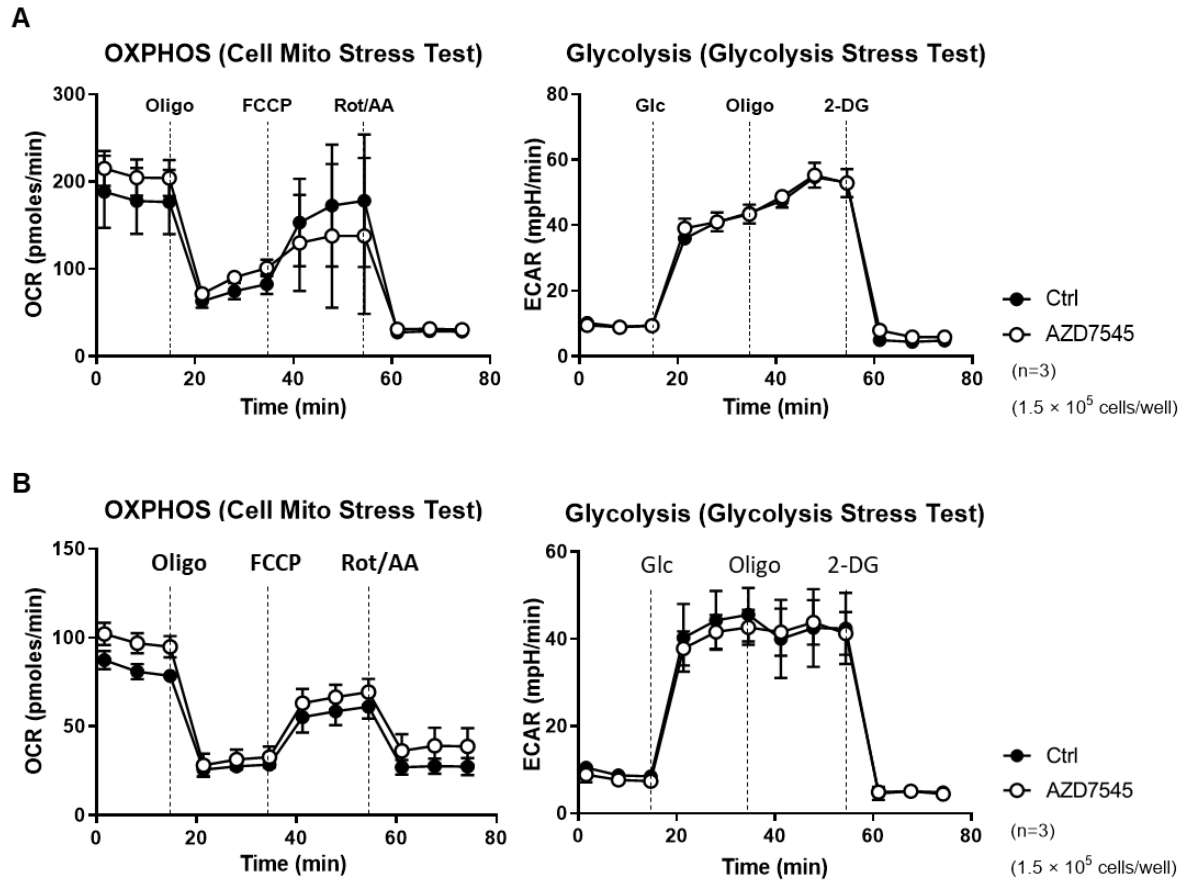


図 9: AZD7545 が Th2 細胞の解糖系、ミトコンドリア呼吸に与える影響

ナイーブ CD4 T 細胞を AZD7545 の存在、非存在下で Th2 条件のもと 36 時間 (A)、5 日間 (B) 培養し、酸素消費率 (OCR) および細胞外酸性化率 (ECAR) を Seahorse Flux Analyzer (Agilent Technologies) で評価した。同様の結果が得られた少なくとも 3 回の独立した実験の代表を示す。

3-4-2 AZD7545 はタンパク質ファルネシル化を抑制する

図 1 に示すように、グルコース由来のクエン酸はメバロン酸経路でステロール合成などに利用されるが、その反応の中間体である Farnesyl diphosphate(FPP)は、タンパク質のファルネシル化にも使用される。そのため、AZD7545 投与がタンパク質のファルネシル化に与える影響を検討した。意外なことに、核内のファルネシル化タンパク量は、AZD7545 で処理した細胞のほうが未処理の細胞より低下していた。AZD7545 によるタンパクファルネシル化の抑制効果は、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害薬である FTI-277 の抑制効果に匹敵するものであった (図 10)。これらの結果より、AZD7545 は Th2 細胞におけるメバロン酸経路を増強するのではなく、むしろ抑制することが明らかとなった。

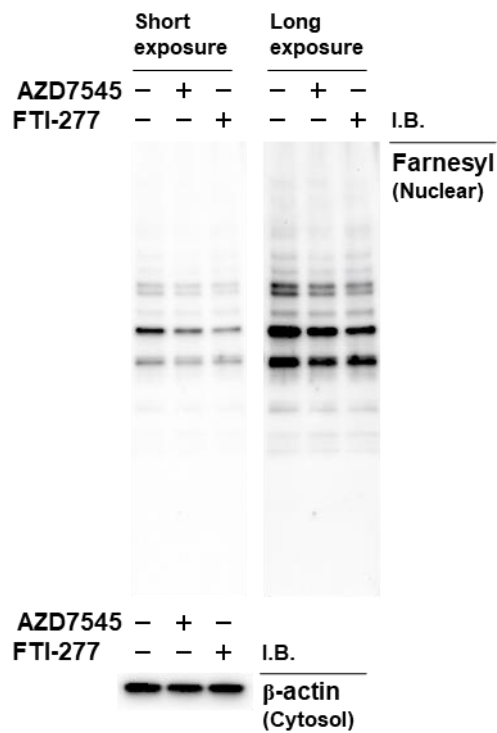


図 10 : AZD7545 が Th2 細胞のタンパク質ファルネシル化に与える影響

ナイーブ CD4 T 細胞を AZD7545 または FTI-277 の存在下、非存在下で Th2 条件のもと 36 時間培養した後、抗ファルネシル化タンパク質抗体を用いた免疫ブロット分析により、核内のファルネシル化タンパク質レベルを測定した。細胞質分画の α -tubulin のタンパク量をローディングコントロールとした。免疫ブロット分析の結果は、同様の結果が得られた少なくとも 3 回の独立した実験の代表を示す。

3-5 メバロン酸経路と Th2 細胞分化

3-5-1 FTI-277 と lovastatin は Th2 細胞分化を抑制する

メバロン酸経路とタンパクフェルネシル化が Th2 細胞分化に影響を与えることが示唆された。Th2 細胞分化において、メバロン酸合成経路とそれに続くタンパク質のファルネシル化がどのような役割をもつかを調べるために、FTI-277 と HMG-CoA 還元酵素阻害薬である lovastatin が Th2 分化に与える影響を評価した。脾臓より抽出したナイーブ CD4 T 細胞を単離し、FTI-277、lovastatin の存在、非存在下で、Th2 細胞分化条件のもと 5 日間培養を行った。次に、Th2 細胞分化に関して細胞内染色を用いてフローサイトメトリーで評価した。図 11A 上で示すように、IL-5、IL-13 産生 Th2 細胞割合は、FTI-277 もしくは lovastatin と共に培養した Th2 細胞で減少していた。IL-4 産生細胞割合の減少は中程度であった(図 11B)。FTI-277 で処理した Th2 細胞においては、IFN γ 産生 Th1 細胞割合が増加していた。加えて、FTI-277 あるいは lovastatin で処理をした細胞では IL-2 産生細胞割合が増加していた(図 11C)。Th2 サイトカイン産生量の低下が ELISA で確認された(図 11D)。

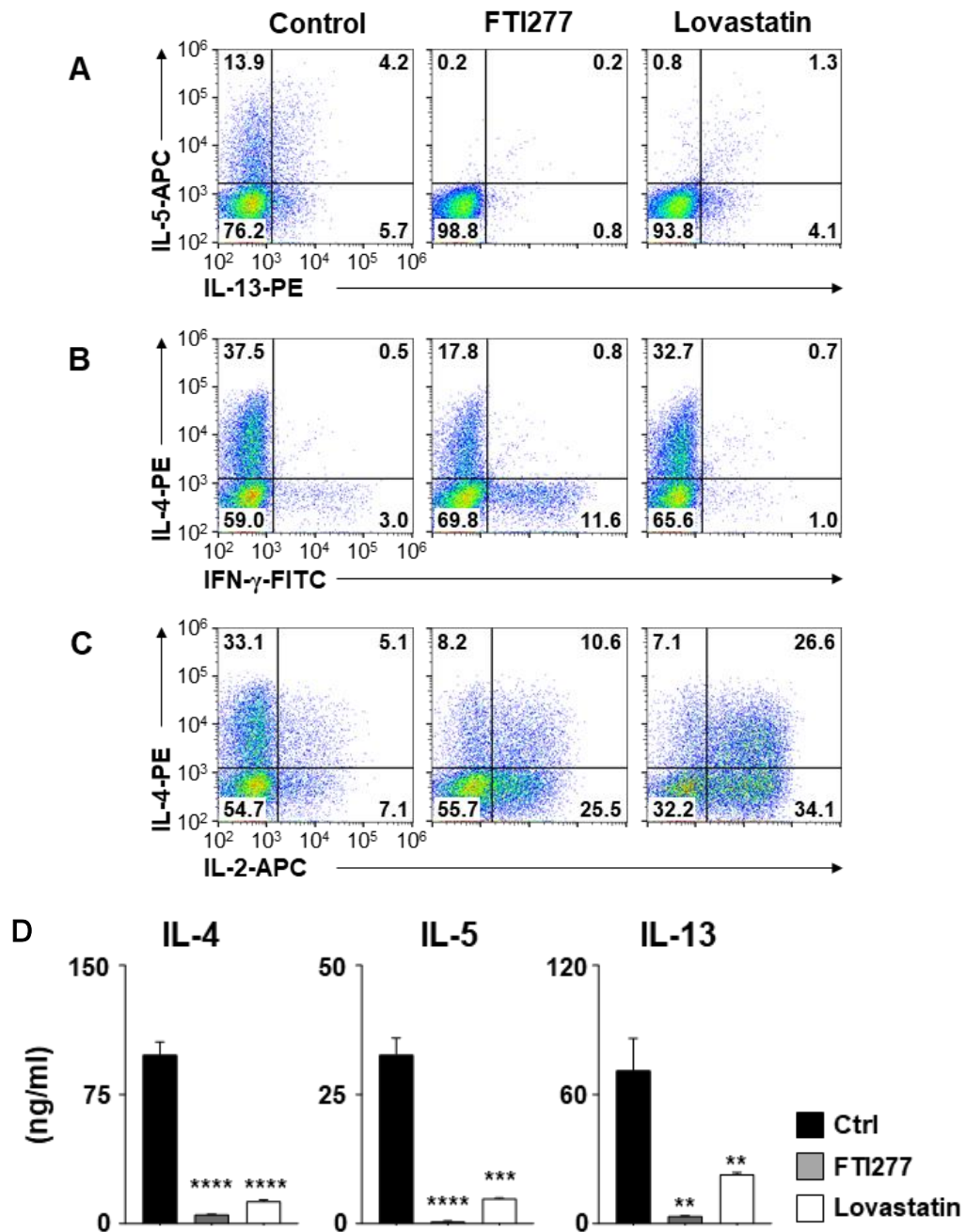


図 11 : FTI-277 と lovastatin が Th2 細胞分化に与える影響

(A)-(C) ナイーブ CD4 T 細胞を、指定された阻害薬存在下で、Th2 分化条件のもと 5 日間培養した。培養後の細胞を回収して、TCRβモノクローナル抗体で 6 時間再刺激した後、細胞内染色を用いて IL-5/IL-13 (A)、IL-4/IFNγ (B)、IL-2/IL-4 (C) 産生細胞割合を調べた。同様の結果が得られた少なくとも 3 回の独立した実験の代表を示す。

(D) (A)-(C) で得られた Th2 細胞のサイトカイン産生量を ELISA で調べた。得られた Th2 細胞は TCRβモノクローナル抗体で 16 時間再刺激を行った。(mean ± S.D., n=3)

*** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs cells without AZD7545 (Student's *t*-test)

3-5-2 FTI-277 と lovastatin は Th2 分化に必要な転写因子を抑制する

FTI-277 および lovastatin によって、Th2 細胞の *Gfi1*、*c-maf*、*Ppary* の mRNA 発現は抑制された(図 12)。

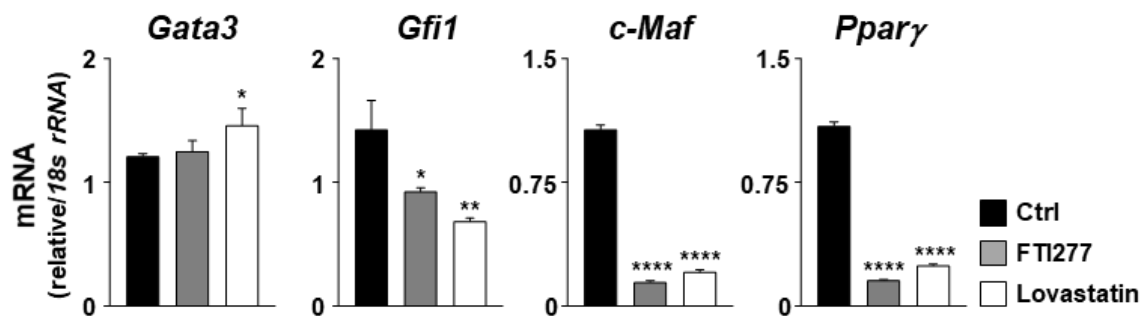


図 12 : FTI-277 と lovastatin が転写因子(*GATA3*、*cMaf*、*Gfi1*、*Ppary*)に与える影響

FTI-277 もしくは lovastatin 存在下で Th2 分化条件のもと、5 日間培養を行った細胞の *Gata3*、*Gfi1*、*c-Maf* ならびに *Pparg* の mRNA 量を、quantitative RT-PCR で測定した。内部標準として 18s rRNA 発現量を測定して、内部標準に対する相対値を示した。

(mean \pm S.D., n=3, technical replicate) * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs cells without AZD7545 (Student' t-test)

3-5-3 FTI-277 と lovastatin は IL-33 によって誘導される Th2 サイトカイン産生を抑制する

FTI-277 と lovastatin によって Th2 細胞における、IL-33 依存的な IL-5、IL-13 産生細胞割合も低下した(図 13)。これらの結果より、メバロン酸合成経路とそれに続くタンパク質プレニル化は Th2 細胞分化において重要な役割を担っていることが示唆された。これらの経路の阻害薬は、喘息を含むアレルギー疾患の治療薬化合物として候補となりうるだろう。

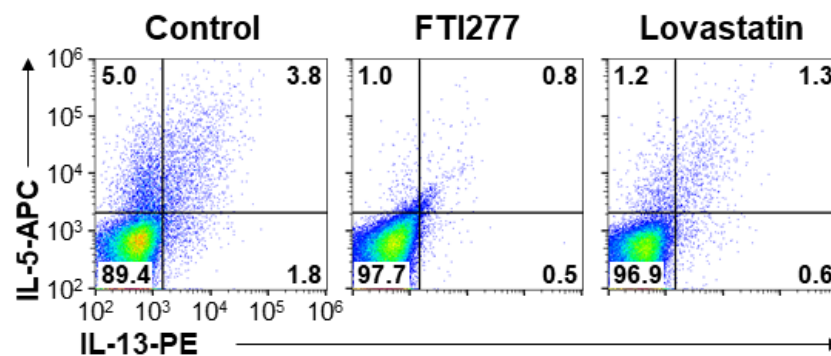


図 13 : AZD7545 が IL-33 によって誘導される Th2 サイトカイン産生に与える影響

指定の阻害薬の存在下、非存在下で Th2 分化条件のもと、ナイーブ CD4 T 細胞を 5 日間培養した。細胞を新しいプレートに移し、IL-7 (10 ng/ml)、IL-33 (10 ng/ml) 存在下でさらに 36 時間培養を行った。細胞内染色を行って IL-5/IL-13 産生細胞割合の変化を調べた。同様の結果が得られた少なくとも 3 回の独立した実験の代表を示す。

3. 考察

この研究で、AZD7545 による PDHK 抑制を介した PDHC の活性化が Th2 細胞分化を抑制することを示した。当初、AZD7545 によって解糖系の最終産物であるピルビン酸の多くがミトコンドリアでアセチル CoA に変換され、酸化的リン酸化が上昇することが期待された。しかし、Flux analyzer で測定を行った OCR、ECAR はいずれも変化が検出できなかった。

グルコース由来のアセチル CoA は、図 1 に示すようにミトコンドリア内での酸化的リン酸化の他に、細胞質にクエン酸の形で輸送されて脂肪酸合成、メバロン酸経路にも利用される[19]。酸化的リン酸化の指標である OCR の変化が検出されなかった為、AZD7545 存在化で培養を行った Th2 細胞では、アセチル CoA が脂肪酸合成やメバロン酸経路に利用されていると予想をした。この仮説の元ではメバロン酸経路の中間体である FPP が上昇し、ファルネシル化タンパク質の増加が期待されたが、予想に反して減少が観察された。

これらの結果は、AZD7545 によってアセチル CoA 消費の経路変わったためであると予想している。ナイーブ CD4 T 細胞は活性化、分化、増殖する際に多くの生合成中間体を必要とし、好氣的解糖がその一翼を担っていることを先に述べた。脂肪酸もリン脂質合成などで細胞増殖に必須であるが、今回 AZD7545 処理で顕著な発現低下を確認した Ppar γ は様々な種類の細胞で脂肪酸の取り込みを促進することはよく知られている[24][25][26]。AZD7545 で処理した Th2 細胞では脂肪酸取り込みが減少しており、その減少を補充するために細胞質内のアセチル CoA による脂肪酸合成が選択的に上方制御され、結果的にメバロン酸合成が代償的に低下したものと考ええる。

今回の実験では AZD7545 によってメバロン酸経路の中間代謝物である FPP によるファルネシル化タンパク質量低下が観察された。同様にメバロン酸経路に阻害的に作用するファルネシルトランスフェラーゼ阻害薬の FTI-277、HMG-CoA 還元酵素阻害薬である lovastatin も、AZD7545 と同様に Th2 細胞産生を抑制することを示した。Lovastatin の経

口投与は、OVA で誘導した喘息モデルマウスにおいて、Th2 タイプの気道炎症を軽減することが報告されている[27]。近年、肺の IL-33 受容体陽性 Th2 細胞が Th2 タイプの慢性気道炎症の病態形成に中心的な役割を果たしているというモデルが提唱されているが[8][9]、今回の実験では、FTI-277 と lovastatin の投与によって、Th2 細胞における IL-33 依存的な IL-5 および IL-13 産生も低下することを示した。さらに、Th2 タイプの気道炎症のマスターレギュレーターである Ppar γ の発現は、FTI-277、lovastatin で処理した細胞で低下していた。

これらの結果より、解糖系やメバロン酸合成経路阻害薬、あるいはタンパク質のファルネシル化の阻害薬は、アレルギー疾患などの Th2 細胞依存の免疫異常疾患を治療するうえで、新規の治療薬候補となる可能性が示された。

2 型炎症は、多くの喘息患者に共通する病態であり、治療薬が実用化されれば多くの患者において治療効果をあげられる可能性があるだろう。特に今回使用した HMG-CoA 還元酵素阻害薬である Lovastatin は、高脂血症治療薬として 1987 年にアメリカで承認されて以降、今日まで使用され続けている薬剤であり、極めて安全性が高いと考えられる(日本においては未承認)[28]。既存の安全性が高い薬剤が、新規治療薬となる可能性を示すことができた点も意義があると考ええる。一方で、上述したように、Lovastatin に関して、喘息マウスモデルを用いた *in vivo* の実験で有効性を報告した既報があるが、スタチンがもつ喘息患者への効果に関しては十分な研究がされておらず、一致した見解が得られていない[29][30]。今後十分にデザインされた臨床試験などの追加実験が望まれる。加えて、今回用いた他の化合物に関しては *in vitro* の実験系で効果を検討するに留まった為、マウスモデルを用いた実験が必要である。

今回使用した「IL-33 による抗原非依存的な IL-5、IL-13 産生」の実験系では、AZD7545 存在下でナイーブ CD4 T 細胞を Th2 細胞に分化をさせた時点で IL-33 レセプター(ST2)が低下している可能性がある。AZD7545 が Th2 細胞のエフェクター機能に与える影響を評

価するためには、分化後の細胞を AZD7545 存在下で再刺激する実験が必要である。IL-33 によるサイトカイン産生抑制に関してはさらなる検討が必要である。

最後に、今回の実験を通じて、Th2 細胞分化には解糖系やそれに続く脂肪酸合成、メバロン酸経路が重要であることが明らかとなり、いくつかの転写因子が関与していることも示唆されたが、代謝経路の変化と転写因子の変化、サイトカイン抑制を結びつける機序の解明までには至らなかった。

現時点で想定される機序はいくつかあるが、1 つ目は代謝に関連する酵素による転写後調節である。Th1 細胞では、解糖系の代謝産物である Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase がインターフェロン γ の mRNA に直接結合して翻訳を阻害することが報告されている[31]。PDHK の阻害は同じくピルビン酸の代謝に関与する LDH の利用割合を変化させる可能性があるが、LDH は mRNA の 3'UTR 領域に存在する AU-rich element (以下 ARE)に結合することで、転写後制御に関与することが知られている[32]。Th2 サイトカインである *Il4*、*Il5*、*Il13*、および転写因子である *Gata3*、*Gfi1*、*c-Maf*、*Ppar γ* は ARE をもっており、AZD7545 によって LDH の利用量が変化して各種サイトカインや転写因子が転写後調整を受けている可能はあるだろう。

2 つ目は代謝産物によるエピジェネティックな制御である。近年代謝とエピジェネティクスの関連が注目されている[33]。今回利用経路の変化が予想されるアセチル CoA はヒストンアセチル化反応の基質となることが知られていることに加えて、多くの代謝産物がクロマチン修飾の基質や補因子として働くことが知られている。

上記の機序と Th2 細胞分化に関してはこれまでも詳細な報告がないため、今後さらなる検討、実験が必要である。

結論

PDHK の選択的阻害薬である AZD7545 は Th2 細胞分化に加えて、IL-33 による抗原非依存的な Th2 サイトカイン産生を抑制した。この機序には、PPAR γ 抑制による脂肪酸取り込み低下を代償するメバロン酸経路抑制が関与している可能性が示唆された。メバロン酸合成経路の阻害薬である lovastatin、タンパク質のファルネシル化阻害薬である FTI-277 でも、Th2 細胞分化ならびに IL-33 による抗原非依存的な Th2 サイトカイン産生が抑制されていた。これらの結果は、解糖系やメバロン酸経路といった代謝経路の阻害薬が、アレルギー疾患などの Th2 細胞依存の免疫異常疾患を治療するうえで、新規の治療薬候補となる可能性を示している。

謝辞

本研究に際し、終始御指導と御鞭撻、御校閲を賜りました

自治医科大学薬理学講座臨床薬理学部門 今井靖教授、愛媛大学医学系研究科免疫学 山下政克教授に謹んで心より感謝致しますと共に、謹んで厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、御協力並びに御助言をいただきました

愛媛大学医学系研究科免疫学 桑原誠講師、鈴木淳平助教に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- [1] 厚生労働省, 平成26年患者調査.
- [2] S. Suissa, P. Ernst, S. Benayoun, M. Baltzan, B. Cai, Low-Dose Inhaled Corticosteroids and the Prevention of Death from Asthma, *N. Engl. J. Med.* 343: 332–336, 2000.
- [3] J. O'Shea, W.E. Paul, Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4 + T cells, *Science*. 327: 1098–1102, 2010.
- [4] J. Zhu, H. Yamane, W.E. Paul, Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations, *Annu. Rev. Immunol.* 28: 445–489, 2010.
- [5] K. Hirahara, T. Nakayama, CD4 + T-cell subsets in inflammatory diseases: beyond the T_H1/T_H2 paradigm, *Int. Immunol.* 28: 163–171, 2016.
- [6] E.M. Dunican, J. V. Fahy, The role of type 2 inflammation in the pathogenesis of asthma exacerbations, *Ann. Am. Thorac. Soc.* 144–149, 2015.
- [7] T. Yanagibashi, M. Satoh, Y. Nagai, M. Koike, K. Takatsu, Allergic diseases: From bench to clinic - Contribution of the discovery of interleukin-5, *Cytokine*. 98: 59–70, 2017.
- [8] Y. Endo, K. Hirahara, T. Iinuma, K. Shinoda, D.J. Tumes, H.K. Asou, N. Matsugae, K. Obata-Ninomiya, H. Yamamoto, S. Motohashi, K. Oboki, S. Nakae, H. Saito, Y. Okamoto, T. Nakayama, The interleukin-33-p38 kinase axis confers memory T helper 2 cell pathogenicity in the airway., *Immunity*. 42: 294–308, 2015.
- [9] A. Gabryelska, P. Kuna, A. Antczak, P. Białasiewicz, M. Panek, IL-33 mediated inflammation in chronic respiratory diseases—understanding the role of the member of IL-1 superfamily, *Front. Immunol.* 10: 692, 2019.
- [10] H.G. Ortega, M.C. Liu, I.D. Pavord, G.G. Brusselle, J.M. FitzGerald, A. Chetta, M. Humbert, L.E. Katz, O.N. Keene, S.W. Yancey, P. Chanez, Mepolizumab Treatment in Patients with Severe Eosinophilic Asthma, *N. Engl. J. Med.* 371: 1198–1207, 2014.
- [11] M. Castro, J. Zangrilli, M.E. Wechsler, E.D. Bateman, G.G. Brusselle, P. Bardin, K. Murphy, J.F. Maspero, C. O'Brien, S. Korn, Reslizumab for inadequately controlled asthma with elevated blood eosinophil counts: results from two multicentre, parallel, double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3

- trials., *Lancet. Respir. Med.* 3: 355–66, 2015.
- [12] C. Pelaia, C. Calabrese, A. Vatrella, M.T. Busceti, E. Garofalo, N. Lombardo, R. Terracciano, G. Pelaia, Benralizumab: From the Basic Mechanism of Action to the Potential Use in the Biological Therapy of Severe Eosinophilic Asthma., *Biomed Res. Int.* 4839230, 2018.
 - [13] J.M. FitzGerald, E.R. Bleeker, P. Nair, S. Korn, K. Ohta, M. Lommatzsch, G.T. Ferguson, W.W. Busse, P. Barker, S. Sproule, G. Gilmartin, V. Werkström, M. Aurivillius, M. Goldman, Benralizumab, an anti-interleukin-5 receptor α monoclonal antibody, as add-on treatment for patients with severe, uncontrolled, eosinophilic asthma (CALIMA): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial, *Lancet.* 388: 2128–2141, 2016.
 - [14] E.R. Bleeker, J.M. FitzGerald, P. Chanaz, A. Papi, S.F. Weinstein, P. Barker, S. Sproule, G. Gilmartin, M. Aurivillius, V. Werkström, M. Goldman, Efficacy and safety of benralizumab for patients with severe asthma uncontrolled with high-dosage inhaled corticosteroids and long-acting β 2-agonists (SIROCCO): a randomised, multicentre, placebo-controlled phase 3 trial, *Lancet.* 388: 2115–2127, 2016.
 - [15] M. Castro, J. Corren, I.D. Pavord, J. Maspero, S. Wenzel, K.F. Rabe, W.W. Busse, L. Ford, L. Sher, J.M. FitzGerald, C. Katelaris, Y. Tohda, B. Zhang, H. Staudinger, G. Pirozzi, N. Amin, M. Ruddy, B. Akinlade, A. Khan, J. Chao, R. Martincova, N.M.H. Graham, J.D. Hamilton, B.N. Swanson, N. Stahl, G.D. Yancopoulos, A. Teper, Dupilumab Efficacy and Safety in Moderate-to-Severe Uncontrolled Asthma, *N. Engl. J. Med.* 378: 2486–2496, 2018.
 - [16] J.P. Pollizzi, Integrating canonical and metabolic signalling programmes in the regulation of T cell responses, *Nat. Rev. Immunol.* 14: 435–446, 2014.
 - [17] J. Kim, I. Tchernyshyov, G.L. Semenza, C. V Dang, HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia, *Cell Metab.* 3: 177–185, 2006.
 - [18] M.C. Sugden, M.J. Holness, Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs, *Am. J. Physiol. Metab.* 284: 855–862, 2003.
 - [19] F. Pietrocola, L. Galluzzi, J.M. Bravo-San Pedro, F. Madeo, G. Kroemer, Acetyl

- coenzyme A: A central metabolite and second messenger, *Cell Metab.* 21: 805–821, 2015.
- [20] A. Jeong, K.F. Suazo, W.G. Wood, M.D. Distefano, L. Li, Isoprenoids and protein prenylation: implications in the pathogenesis and therapeutic intervention of Alzheimer's disease, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 53: 279–310, 2018.
- [21] I.-C. Ho, T.-S. Tai, S.-Y. Pai, GATA3 and the T-cell lineage: essential functions before and after T-helper-2-cell differentiation., *Nat. Rev. Immunol.* 9: 125–135, 2009.
- [22] J. Suzuki, M. Kuwahara, S. Tofukuji, M. Imamura, F. Kato, T. Nakayama, O. Ohara, M. Yamashita, A Novel Small Compound SH-2251 Suppresses Th2 Cell-Dependent Airway Inflammation through Selective Modulation of Chromatin Status at the Il5 Gene Locus, *PLoS One.* 8: e6178, 2013.
- [23] S.P. Nobs, S. Natali, L. Pohlmeier, K. Okreglicka, C. Schneider, M. Kurrer, F. Sallusto, M. Kopf, PPAR γ in dendritic cells and T cells drives pathogenic type-2 effector responses in lung inflammation, *J. Exp. Med.* 214: 3015–3035, 2017.
- [24] M. Angela, Y. Endo, H.K. Asou, T. Yamamoto, D.J. Tumes, H. Tokuyama, K. Yokote, T. Nakayama, Fatty acid metabolic reprogramming via mTOR-mediated inductions of PPAR γ ; directs early activation of T cells, *Nat. Commun.* 7: 1–15, 2016.
- [25] J.M. Stark, C.A. Tibbitt, J.M. Coquet, The metabolic requirements of Th2 cell differentiation, *Front. Immunol.* 10: 2318, 2019.
- [26] A.D. Baker, A. Malur, B.P. Barna, S. Ghosh, M.S. Kavuru, A.G. Malur, M.J. Thomassen, Targeted PPAR γ deficiency in alveolar macrophages disrupts surfactant catabolism, *J. Lipid Res.* 51: 1325–1331, 2010.
- [27] C.J. Liou, P.Y. Cheng, W.C. Huang, C.C. Chan, M.C. Chen, M.L. Kuo, J.J. Shen, Oral lovastatin attenuates airway inflammation and mucus secretion in ovalbumin-induced murine model of asthma, *Allergy, Asthma Immunol. Res.* 6: 548–557, 2014.
- [28] G. SM., HMG-CoA Reductase Inhibitors for Hypercholesterolemia, *N. Engl. J. Med.* 319: 1222–1223, 1988.
- [29] D. Bhattacharjee, B. Chogtu, R. Magazine, Review Article Statins in Asthma:

- Potential Beneficial Effects and Limitations, *Pulm Med.* 2015: 835204, 2015.
- [30] C. Naing, H. Ni, Statins for asthma, *Cochrane Database Syst. Rev.* 7: 2020.
 - [31] C.H. Chang, J.D. Curtis, L.B. Maggi, B. Faubert, A. V. Villarino, D. O'Sullivan, S.C.C. Huang, G.J.W. Van Der Windt, J. Blagih, J. Qiu, J.D. Weber, E.J. Pearce, R.G. Jones, E.L. Pearce, Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis, *Cell.* 153: 1329, 2013.
 - [32] P.A. Pioli, B. Jonell Hamilton, J.E. Connolly, G. Brewer, W.F.C. Rigby, Lactate dehydrogenase is an AU-rich element-binding protein that directly interacts with AUF1, *J. Biol. Chem.* 277: 35738–35745, 2002.
 - [33] J.P. Etchegaray, R. Mostoslavsky, Interplay between Metabolism and Epigenetics: A Nuclear Adaptation to Environmental Changes, *Mol. Cell.* 62: 695–711, 2016.