

Banyu Foundation Research Grant 2015—生活習慣病領域—

研究成果報告書(追加助成) <概要>

所属	東京医科歯科大学難治疾患研究所
氏名	大石 由美子
研究テーマ	マクロファージの動的恒常性の変容による生活習慣病の分子機構

概要の構成は自由ですが、研究助成報告として広報資料に掲載されます点をご留意ください。研究目的、研究手法、研究成果などを1ページにまとめてください。(図表、写真などの貼付を含む)

食生活の欧米化や運動不足、高齢化に伴い、肥満や動脈硬化症などの生活習慣病が増加している。これら一連の病態は、炎症の収束が妨げられた「慢性炎症」を基盤として発症することが知られており、個体における免疫系と代謝系の密接な連携が想定されている。しかし、肥満や加齢による全身の代謝異常が、免疫系の機能異常から慢性炎症を引き起こすメカニズムは明らかではない。慢性炎症の病態形成に重要なマクロファージは、多彩な機能をもつ。従来より、異なる分化を遂げたマクロファージ (M1/M2) がそれぞれ炎症の促進と収束を司ると考えられてきた。しかし、TLR4 活性化による炎症応答の過程でマクロファージの機能は動的に変化し、転写因子 SREBP1 依存的な脂肪酸の不飽和化を介した転写とエピゲノムによって制御されていることを見いだした(図 1)。さらに、SREBP1 欠損マウスは、敗血症モデルによる炎症応答が遷延したことから、この細胞自律的な機能変化が全身の炎症の適切な収束に必須であることを報告した(Oishi Y et al. *Cell Metabolism* 2017)。

さらに、細胞に備わる体内時計が、炎症応答の時間的制御を担うのではないかと考え、時計遺伝子 *Bmal1* に着目した研究を行った。時計遺伝子 *Bmal1* を欠損するマクロファージは、TLR4 活性化による炎症性サイトカインの発現誘導とその後の抑制が遅れ、炎症応答が遅延・遷延した(図 2)。そのメカニズムは、炎症応答の「時間」を決めるエピジェネティックな制御が障害されていることが示唆された(Oishi Y et al. *Sci Rep* 2017)。

本研究から、マクロファージの細胞機能としての炎症応答は、細胞代謝や細胞時計と連携し、転写とエピゲノムによって制御されていることが明らかとなった(図 3)。マクロファージの「細胞代謝と機能との連携」は、生活習慣病に対する新たな治療標的として有効である可能性が期待される。

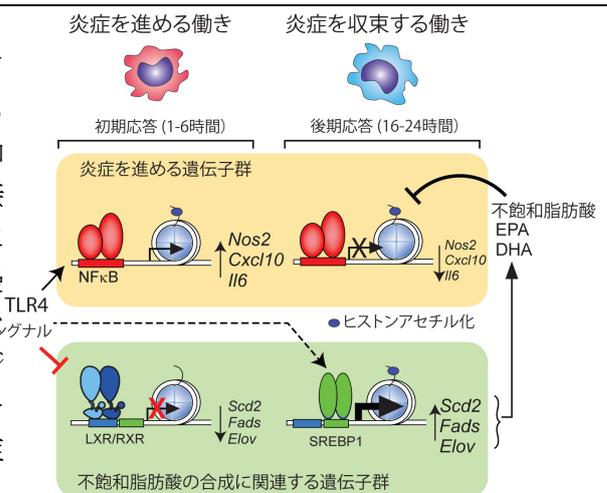


図 1 マクロファージは炎症応答の過程で機能を変える

さらに、SREBP1 欠損マウスは、敗血症モデルによる炎症応答が遷延したことから、この細胞自律的な機能変化が全身の炎症の適切な収束に必須であることを報告した(Oishi Y et al. *Cell Metabolism* 2017)。

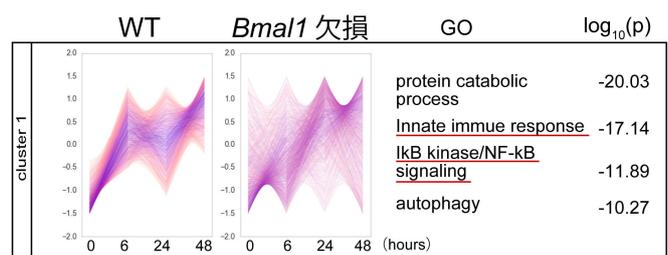


図 2 時計遺伝子 *Bmal1* 欠損マクロファージは炎症応答が遅延・遷延する

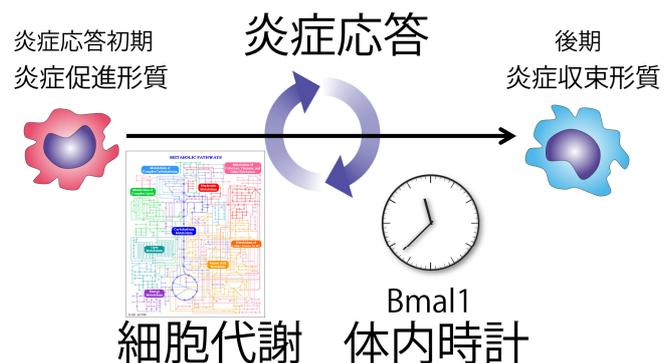


図 3 マクロファージの細胞機能としての炎症応答は細胞代謝や細胞時計と連携する

Banyu Foundation Research Grant 2015—生活習慣病領域—

研究成果報告書(追加助成) <詳細>

所 属	東京医科歯科大学難治疾患研究所
氏 名	大石 由美子
研究テーマ	マクロファージの動的恒常性の変容による生活習慣病の分子機構

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

<研究の背景と目的>

肥満者の増加に伴い、糖尿病や心血管疾患に代表される生活習慣病の有病者が全世界で増加している。わが国でも糖尿病の罹患者数は最近 40 年間で約 3 万人から 820 万人に急増しており、生活習慣病の発症・進展メカニズムを明らかにし、有効な予防・診断・治療法を確立することは喫緊の課題であるとともに、我が国のライフ・イノベーションに貢献する。肥満や動脈硬化症などの生活習慣病の発症や進展に、慢性炎症が重要である。慢性炎症は、内外のストレスによって生じた炎症反応が適切に収束されることなく、くすぶった状態であり、さまざまな組織障害を引き起こす要因となる。慢性炎症の病態の形成には、多彩な機能を持つマクロファージが炎症の惹起と収束の両面で重要な役割を果たすが、その分子機構は明らかにされていない。

生体の恒常性をつかさどる免疫系と代謝系とは個体・組織レベルで密接に連携している(図 1)。たとえば、肥満の病態では脂肪組織や肝臓、骨格筋に浸潤する炎症性マクロファージの数が増加し、インスリンシグナルを抑制してインスリン抵抗性を引き起こす。また、肥満や糖尿病では全身の動脈硬化が進行する。興味深いことに、炎症応答と細胞代謝との連携は、細胞のレベルでも同様に観察されることが最近の研究からわかってきた(図 1)。

マクロファージが炎症を引き起こす刺激を受けて炎症促進型(M1)の形質を獲得すると、速やかに HIF-1a や NF-κB などの転写因子を活性化して解糖系が亢進し、脂質合成は抑制される。これは、炎症が生じ、酸素レベルが低下した組織でも活動し、殺菌作用を示すためと考えられている。一方、組織修復やリモデリングをつかさどる、炎症収束型(M2)マクロファージは、エネルギー産生(ATP産生)系としてむしろ酸化的リン酸化や脂質代謝がメインとなる。

また、マクロファージは種々の脂質を合成することが明らかとなっている。炎症刺激を受けた活性化されたマクロファージは、一過性にエイコサノイド合成が増加するが、炎症応答の後期にはスフィンゴ脂質やステロール合成が増加する。また、エイコサペンタエン酸(EPA、20:5, n-3)、ドコサヘキサエン酸(DHA、22:6, n-3)などの不飽和脂肪酸とその代謝産物はマクロファージにおいて抗炎症活性を示すことが知られている。M1型からM2

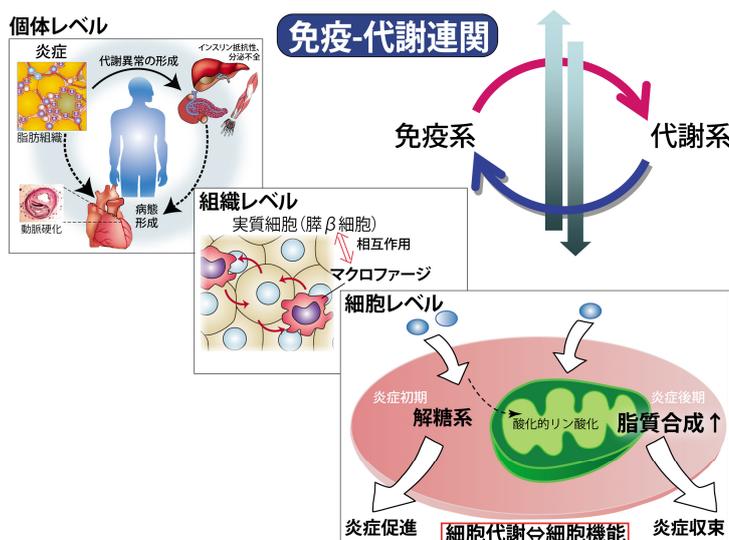


図 1 免疫と代謝は個体・組織・細胞の各階層において密に連携している

型への機能変化が、マクロファージにおける脂肪酸合成の変化と連携して制御されているのではないかと考えて検討を進め、マクロファージの機能は炎症応答の過程で M1 型から M2 型へと動的に変化することを見いだした。さらに重要なことに、M2 型（炎症収束）形質への変化には、SREBP1 依存的な脂肪酸不飽和化の促進が必須であることが明らかとなった (Oishi et al. *Cell Metab* 2017, 図 2)。

そこで、本追加助成期間における研究では、不飽和脂肪酸などの脂質代謝産物が、マクロファージ機能を時間的に制御する分子機構の解明を進めた。

<研究方法と結果>

細胞内脂質代謝の時間的制御を司る因子として、細胞レベルで体内時計（サーカディアンリズム）を司る転写因子 Bmal1 に着目した。臨床検体および疾患動物モデルを用いた検討の結果、Bmal1 の機能異常が肥満や糖尿病の発症と相関することが報告されている。また、Bmal1 は多くの代謝関連遺伝子の発現を制御している。ChIP-seq 法による検討の結果、炎症応答の後期に Bmal1 は NF-κB や SREBP1 と標的遺伝子上で共局在することが明らかである (図 3)。従って Bmal1 が、刺激から一定時間が経過した後に SREBP 依存的な脂質合成が上昇に転ずる分子実態として機能している可能性が高いと考えた。そこで、マクロファージの炎症応答における Bmal1 の重要性を明らかにするため、*Bmal1* ノックアウトマウス (日大薬学部 榎葉教授より御供与) 由来マクロファージを用いた解析を行った。

時計遺伝子 *Bmal1* を欠損するマクロファージは、TLR4 活性化による炎症性サイトカインの発現誘導とその後の抑制が遅れ、炎症応答が遅延・遷延した。RNA-seq による網羅的なトランスクリプトーム解析の結果、野生型細胞では刺激後 6 時間目にピークとなる、自然免疫応答や NF-κB シグナルに関わる遺伝子群の発現が、*Bmal1* を欠損するマクロファージでは 24 時間目にピークを迎えており、炎症応答が遅延していることが示された (図 4)。また、ChIP-seq を用いたエピゲノムの解析の結果、*Bmal1* 欠損マクロファージでは炎症応答性のエンハンサー活性化を示すヒストンアセチル化 (H3K27Ac) の誘導が遅延・遷延することから、炎症応答の「時間」を決めるエピジェネティックな制御が障害されていることが

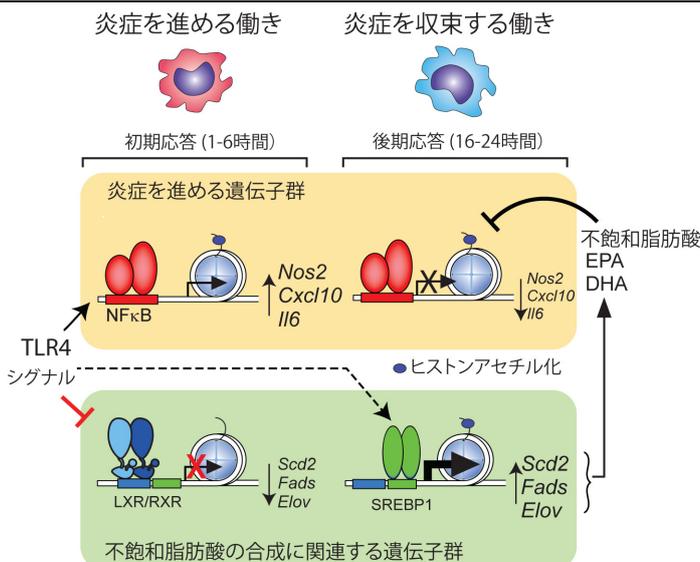


図 2 マクロファージは炎症応答の過程で機能を変える

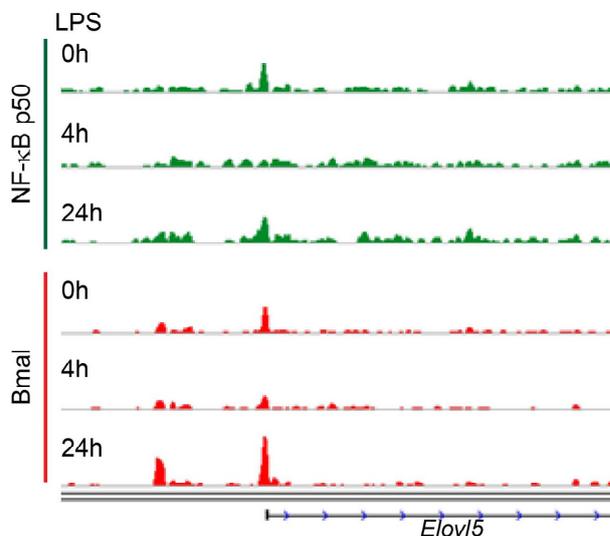


図 3 NF-κB p50 と Bmal は脂肪酸伸長酵素 *Elov15* プロモーターに同時に結合する

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

示唆された。さらに、*Bmal1*欠損マクロファージでは、別の時計遺伝子 *RevErb* の発現が著明に低下し、*RevErb* 依存的なエンハンサーRNA 発現が障害されるために、細胞時計に変調を来すことを明らかにした。

*RevErb* は代謝制御にも重要である。今回見いだした機序は、マクロファージにおける細胞代謝の経時的变化も規定している可能性があり、慢性炎症に対する新たな治療標的としてさらに検討を進めている (Oishi et al. *Sci Rep* 2017)。

<考察>

一連の研究から、マクロファージの細胞機能としての炎症応答は、細胞代謝や細胞時計と連携し、転写とエピゲノムによって制御されていることが明らかとなった(図5)。このことから、マクロファージの「細胞代謝と機能との連携」は、生活習慣病に対する新たな治療標的として有効である可能性が高いと期待される。

<今後の課題>

さらに、最近の予備的検討の結果、私は、糖尿病など、全身の代謝異常があると、筋損傷後の再生が著しく障害され、筋損傷によって組織に生じた炎症も遅延することを見いだしている。このことから、代謝は免疫だけでなく、再生とも深く連携していることが示唆される。そこで、今後は、「免疫-代謝」の連携に、再生の観点を加えた、「免疫-代謝-再生」の3者の連携の観点から、生活習慣病をはじめとした加齢関連疾患の病態の解明し、新しい治療・予防法の開発につながるような基盤的な研究を続けていきたい(図6)。

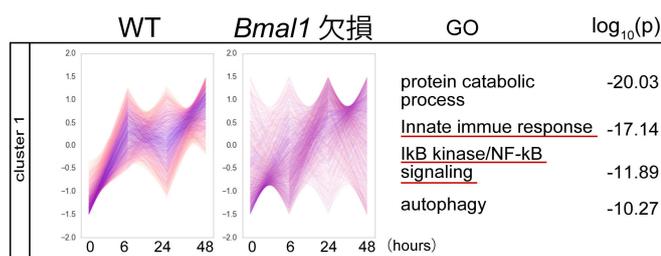


図4 *Bmal1* を欠損するマクロファージは NFκB 依存的な炎症応答の誘導とその後の抑制が遅れる (RNA-seq)

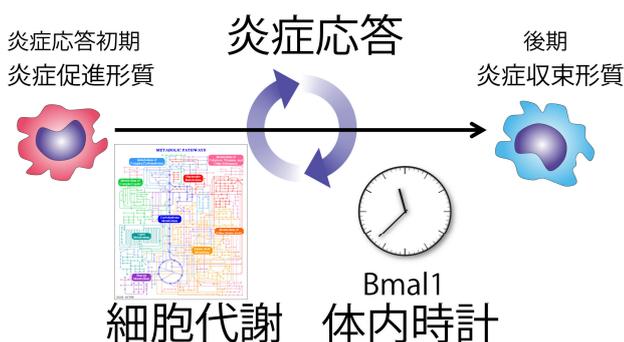


図5 炎症刺激による細胞機能の経時的な変化に細胞代謝の変化と、*Bmal1* による時間的制御が重要

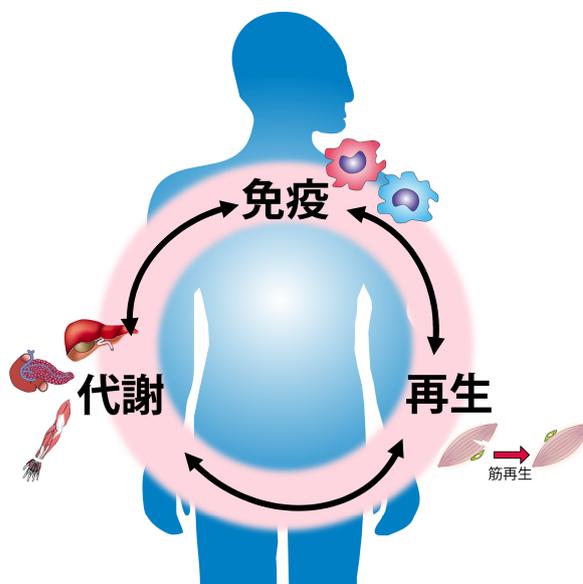


図6 「免疫-代謝-再生」3者の連携の観点から、生活習慣病の病態を解明したい

**Banyu Foundation Research Grant 2015—生活習慣病領域—**  
**研究成果報告書(追加助成) <発表実績/予定一覧>**

所	属	東京医科歯科大学難治疾患研究所
氏	名	大石 由美子

1. 論文発表実績	
<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 掲載年次順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。</li> <li>・ 論文 PDF 添付ありとなしに分けてリストを作成のこと。</li> <li>・ 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。</li> <li>・ 国内外雑誌を問わない。</li> <li>・ 印刷中は in press と記入、学会のアブストラクトおよび投稿中の論文は含めない。</li> <li>・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。</li> </ul>	
① <論文 PDF 添付あり>	
1	Hayakawa S, Oishi Y, Tanabe H, Isemura M, Suzuki Y. Tea, Coffee and Health Benefits <i>Bioactive Molecules in Food</i> , Reference Series in phytochemistry p.1-58
2	<u>Oishi Y</u> , Hayashi S, Isagawa T, Oshima M, Iwama A, Shimba S, Okamura H and <u>Manabe I</u> . Bmal1 regulates inflammatory responses in macrophages by modulating enhancer RNA transcription. <i>Sci Rep</i> 7:7086, 2017.
3	Oishi Y, Spann, NJ, Link VM, Muse ED, Strid T, Edillor C, Kolar MJ, Matsuzaka T, Hayakawa S, Tao J, Kaikkonen M, Carlin A, Lam MT, Manabe I, Shimano H, Saghatelian A and Glass CK. SREBP1 contributes to resolution of pro-inflammatory TLR4 signaling by reprogramming fatty acid metabolism. <i>Cell Metab</i> , 25:412-427, 2017
4	Hayashi S, Manabe I, Suzuki Y, and Oishi Y. Klf5 regulates muscle differentiation by directly targeting muscle specific genes in cooperation with MyoD in mice. <i>eLife</i> ,5:e17462, 2016.
5	Oishi Y and Manabe I. Macrophages in age-related chronic inflammatory diseases. <i>Aging and Mechanisms of Disease</i> , 2016: doi:10.1038/npjamd.2016.18
6	Oishi Y and Manabe I. Integrated regulation of cellular metabolism and function of immune cells in adipose tissue inflammation Clin Exp Pharmacol Physiol 43:294-303, 2016
7	<u>Oishi Y</u> and Manabe I. Immunometabolic control of homeostasis and inflammation. <i>Inflammation and Regeneration</i> 35(4)185-192, 2015
② <論文 PDF 添付なし>	
1	大石由美子、脂肪酸代謝制御による炎症反応の収束 生化学 89(6)907-910, 2017
2	大石由美子 脂肪酸代謝リプログラミングによる炎症の収束 感染・炎症・免疫 47:48-49, 2017
3	大石由美子 炎症応答の収束にはマクロファージ脂肪酸代謝のリプログラミングが重要である 臨床免疫・アレルギー科 68(4) 430-433, 2017

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 発表年順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。</li> <li>・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。</li> <li>・ アブストラクト、プログラム等の PDF を添付すること。</li> <li>・ 国内外を問わない。</li> <li>・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。</li> </ul>		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2017 年 12 月	生命科学系学会合同年次集会 (ConBio2017) 大石 由美子 マクロファージにおける細胞代謝-昨日連携のメカニズム
2	2017 年 12 月	心血管代謝週間 (CMVW) 2017 大石 由美子 加齢関連疾患に対する新たな治療標的としての「免疫-代謝」関連のメカニズム
3		
4		
3. 投稿、発表予定 (投稿中の論文も含める)		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1		
2		
3		
4		