

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32610

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15296

研究課題名(和文)細胞内エネルギー代謝からみた腸管マクロファージ分化制御の解明

研究課題名(英文)Elucidation of regulation of intestinal macrophage differentiation from intracellular energy metabolism

研究代表者

久松 理一 (HISAMATSU, TADAKAZU)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：60255437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージは炎症性サイトカインを産生するM1型、IL-10を産生し恒常性維持や組織修復に働くM2型に大きく分類される。細胞内エネルギー代謝については従来M1型では好氣的解糖系が主に利用され、M2型では酸化的リン酸化が主として利用されるとされていた。我々はM2型マクロファージのIL-10産生能獲得には分化過程における解糖系が重要であることを明らかにした。さらに分化したM2型マクロファージにおいてLPS刺激下でのサイトカイン産生に関しては従来言われていた酸化的リン酸化経路に加えて解糖系-ERKの経路を使用することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Macrophages are classified into M1 type that produces inflammatory cytokines, and M2 type producing IL-10 that acts on homeostasis and tissue repair. Regarding intracellular energy metabolism, aerobic glycolysis was mainly used in M1 type, and oxidative phosphorylation was mainly used in M2 type.

We clarified that the glycolysis system in the differentiation process is important for obtaining IL-10 productivity of M2-type macrophages. In addition, it was revealed that in the differentiated M2 type macrophages, in addition to the oxidative phosphorylation pathway conventionally mentioned, the glycolytic - ERK pathway was also used for cytokine production under LPS stimulation.

研究分野：炎症性腸疾患 腸管免疫

キーワード：マクロファージ 細胞内エネルギー代謝 サイトカイン産生

1. 研究開始当初の背景

IBDは遺伝学的素因、食事などの環境因子と免疫学的異常が複雑に絡み合った多因子疾患だが、腸内細菌に対する腸管免疫応答システムの恒常性の破綻がその病態の本質だと考えられている。腸管免疫システムは腸内環境に過剰に反応しないよう制御されている。自然免疫担当細胞である腸管Mφは異物の食・処理に続き炎症性サイトカインを産生し免疫を惹起するとされてきた。しかし当研究室を中心とした研究により、『腸管局所Mφは単に異物処理を行なうだけでなく、免疫学的恒常性維持に必須である』ことが明らかになった。我々は正常マウス腸管Mφが腸内細菌刺激に対して抑制性サイトカインIL-10を産生し慢性炎症への進展を防いでいること(Kamada N, Hisamatsu T, et al. J Immunol.2005) Crohn病では腸内細菌に対する腸管Mφ制御異常が病態に関与していること(Kamada N, Hisamatsu T, et al. J Clin Invest.2008)を明らかにしてきた。このように当研究室はIBD病態におけるIL-10産生性腸管Mφの機能異常にいち早く着目していた。近年Mφの機能的分類が進み、炎症性サイトカインを産生するM1型、IL-10を産生するM2型という概念が確立した(Gordon S, Taylor PR. Nat Rev Immunol 2005)。正常腸管MφはM2型に分類され我々の結果が裏付けられた。Mφの機能解析研究ではM1型およびM2型Mφで利用するエネルギー代謝の違いも明らかになってきている(Blagih J, et al, Cell Metabolism. 2012)。一方、各種臓器での局所Mφの機能的分化制御機構、腸管IL-10産生型Mφの分化制御メカニズムも未解明である。我々はこれまでIL-10産生型Mφの分化制御メカニズムを追究してきた(Takada Y, Hisamatsu T, et al. J Immunol. 2010)、(Ichikawa R, Hisamatsu T, et al. Immunology. 2012)。その過程で単球からの分化段階で解糖系を阻害することでMφのIL-10産生性が失われることを発見した。Mφの機能的分化に細胞内エネルギー代謝が関与するという報告はなく、本研究を計画するに至った。

2. 研究の目的

IL-10産生型Mφと解糖系阻害条件下で分化したMφ(IL-10低産生型)の遺伝子発現をDNAアレイで解析し、同時に13C-グルコースを用いた質量分析法による細胞内メタボローム解析の結果を組み合わせIL-10産生型Mφへの分化メカニズムを分子・代謝レベルで明らかにする。

3. 研究の方法

(1)網羅的解析によるKey Regulator候補の同定。DNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析と、13Cラベル体を用いた質量分

析法による網羅的代謝物解析から、IL-10産生性Mφの分化の鍵となる遺伝子・代謝物候補を同定する

(2)生化学・分子生物学的手法によるKey Regulatorの検証。Mφへの人為的遺伝子導入(過剰発現系、発現抑制系)法やMφ分化培地への代謝物添加によるIL-10産生性Mφへの分化への影響を把握する

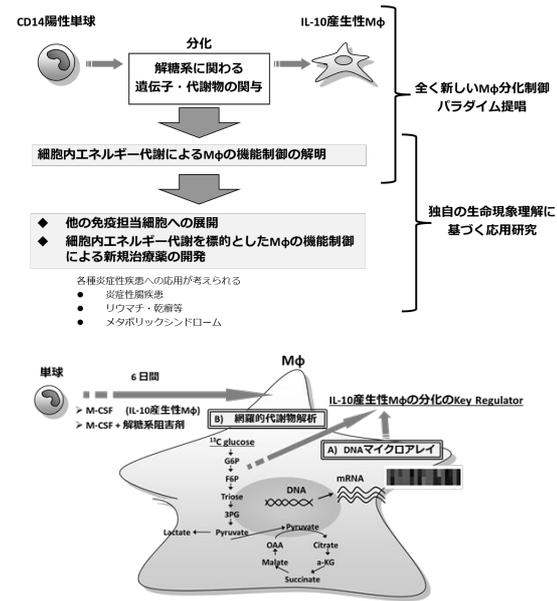


図 研究のイメージ

4. 研究成果

我々は単球からM2型マクロファージにin vitroで分化誘導する際に解糖系を阻害することで誘導されたマクロファージの機能が変化しIL-10の産生が低下しIL-6の産生が亢進するという事実を明らかにした。また遺伝子発現プロファイルも変化していた。

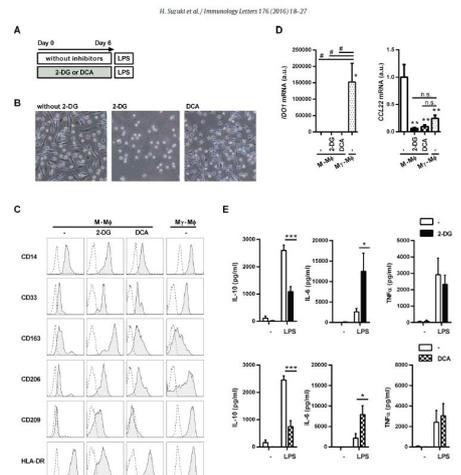
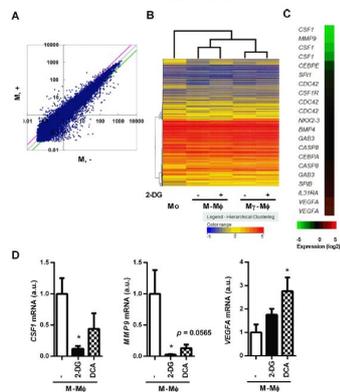
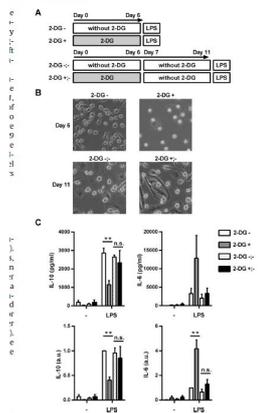


Fig. 2. Inhibition of glycolysis during Mφ differentiation results in the loss of IL-10 producing phenotype and other regulatory macrophage characteristics. (A) Schematic diagram of the experiment. (B) Micrographs showing the phenotype of Mφs differentiated in the presence or absence of 2-DG or DCA. (C) Microarrays were stained with indicated mRNAs and analyzed by flow cytometry. The shaded histogram shows the profiles of the indicated antibody staining and the open histogram shows staining of control cells. Representative data from three independent experiments are shown. (D) Levels of expression of IL-10 and IL-6 mRNA were analyzed by real time quantitative PCR and normalized relative to the amount of 18S rRNA in the same samples. The numbers indicate fold expression compared with M-Mφ (n=3). \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 compared with M-Mφ by Student's t-test multiple comparison test. (E) IL-10, IL-6 and TNF-α were analyzed by ELISA. Mφs were differentiated in the presence or absence of glycolysis inhibitors (3 mM 2-DG, or 20 mM DCA) and stimulated with 100 ng/ml LPS for 20 hrs (n=5-7). Data represent



**Fig. 3.** M-MΦs differentiated in the presence of 2-DG and DCA have distinct gene expression patterns. (A) Scatter plot for gene expression by M-MΦs (M+) versus M-MΦs differentiated in the presence of 2-DG (M-). (B) Heatmap of gene expression patterns. (C) Gene expression levels in 2-DG-treated M-MΦs relative to M-MΦs. (D) Quantitative real-time RT-PCR of IL-6, IL-10, IL-6, and TNFα expression. The level of expression in each sample was normalized relative to the amount of 18S-rRNA in that sample. Data indicate fold expression compared with M-MΦs (n=3). \*p<0.05 compared with M-MΦs by Student's t-test multiple comparison test.

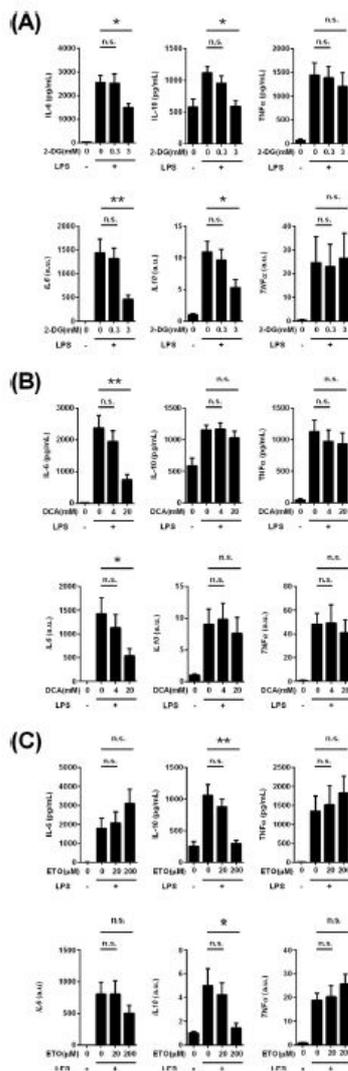
**Table 5**  
Top 5 canonical pathways of genes down regulated in 2-DG-treated M-MΦ compared with M-MΦ.



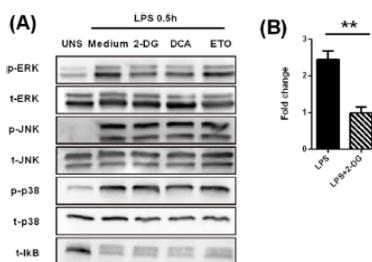
**Fig. 4.** M-MΦs differentiated in the presence of 2-DG retain plasticity. (A) Schematic diagram of the experiments. (B) Micrographs of macrophages cultured in the indicated conditions. (C) Quantification of IL-6, IL-10, IL-6, and TNFα expression. Data represent mean ± SEM. \*p<0.05 compared with control by Student's t-test.

この作用は分化過程での解糖系阻害を解除することでキャンセルされることから M2 型マクロファージの IL-10 産生能獲得には分化過程における解糖系が重要であると考えられた。さらに分化した M2 型マクロファージを LPS 刺激した際の IL-10 と IL-6 産生において、解糖系阻害は IL-6 産生を減少させた。

一方、脂肪酸酸化阻害剤は IL-10 産生を抑制したが、IL-6 産生を抑制しなかった。解糖系阻害剤は ERK リン酸化を抑制したが脂肪酸酸化阻害剤にはこの作用は認めなかった。NF- $\kappa$ B および p38 および JNK はこれらの代謝阻害剤の影響を受けなかった。これらの結果は、M2 型マクロファージにおける LPS 刺激下でのサイトカイン産生において従来言われていた酸化的リン酸化経路に加えて解糖系-ERK の経路を使用することを示している。



**Fig. 5.** Glycolysis inhibitors downregulate IL-6 production by M-MΦ. Cytokine production levels in the culture media and mRNA expression levels in M-MΦ stimulated by LPS and 2-DG (A), DCA (B) or ETO (C) are shown. Culture media were collected after LPS stimulation with or without metabolic inhibitors (2-DG, DCA, ETO) for 6 h (TNFα) or 16 h (IL-6, IL-10). Total RNA was isolated after 2 h of LPS stimulation with or without metabolic inhibitors. mRNA levels were normalized by the levels



**Fig. 6.** Glycolysis regulates the binding of C/EBPβ to the IL-6 promoter via phosphorylation of ERK. (A) The effect of metabolic pathway inhibitors on cellular signaling pathways was evaluated by western blot analysis. M-MΦ were stimulated with LPS (100 ng/ml) in the presence of 2-DG (3 mM), DCA (20 mM) or ETO (200 μM) for 30 min, and cellular protein was collected. Protein and phosphorylation levels of the indicated proteins were evaluated. Results are representative of three independent experiments. (B) M-MΦ were stimulated with LPS in the presence of 2-DG for 2 h. The ChIP assay was performed using anti-C/EBPβ antibody. Quantitative PCR was performed using the IL-6 primers including the C/EBPβ binding site. Data are shown as a fold change relative to the unstimulated sample. Relative expression was determined by normalization to the amplification of input sample DNA. Data represent mean ± SE (n=3). \*\*p<0.01 compared with no 2-DG by Student's t-test.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Chiba S, Hisamatsu T\*, Suzuki H, Mori K, Kitazume MT, Shimamura K, Mizuno S, Nakamoto N, Matsuoka K, Naganuma M, Kanai T. Glycolysis regulates LPS-induced cytokine production in M2 polarized human macrophages Immunology Letters 2017 Mar;183:17-23. \*corresponding author(査読有)

Suzuki H, Hisamatsu T\*, Chiba S, Mori K, Kitazume MT, Shimamura K, Nakamoto N, Matsuoka K, Ebinuma H, Naganuma M, Kanai T. Glycolytic pathway affects differentiation of human monocytes to regulatory macrophages. Immunol Lett. 2016 Aug;176:18-27. \* corresponding author (査読有)

〔学会発表〕(計 3 件)

千葉明子, 鈴木宏明, 久松理一, 中本伸宏, 金井隆典 Glycolytic pathway affects differentiation of human monocytes to regulatory macrophages 第45回日本免疫学会 平成28年12月5-7日 那覇

久松理一, 鈴木宏明, 金井隆典 パネルディスカッション1 Translational medicineへの展開を目指した腸疾患研究血漿アミノ酸プロファイルからのIBDバイオマーカーの確立のアプローチ 第102回日本消化器病学会総会 平成28年4月21-23日 東京 京王プラザホテル

久松理一, 鈴木宏明, 千葉明子, 徳武美奈, 島村克好, 森 清人, 水野慎大, 中本伸宏, 長沼 誠, 金井隆典 解糖系によるIL-10産生型抑制性マクロファージの分化制御 第52回日本消化器免疫学会総会 一般演題 平成27年7月30-31日 東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等:なし

6. 研究組織

(1)研究代表者  
久松 理一 (HISAMATSU, Tadakazu)  
杏林大学・医学部・教授  
研究者番号：60255437

(2)研究分担者 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：

(4)研究協力者 ( )