

令和元年5月31日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00848

研究課題名(和文)脂質代謝制御を基軸とした炎症慢性化の基盤的研究

研究課題名(英文)Analysis of lipid metabolism regulation through chronic inflammation

研究代表者

早川 清雄 (Hayakawa, Sumio)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：00368292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：近年、生活習慣病とその基盤病態として『慢性炎症』が注目されている。申請者は、活性化されたマクロファージでは脂質代謝と炎症シグナルとが密接に連携して制御されていること、炎症刺激後に増加する脂質合成はカスパーゼ依存的事であることを見いだした。炎症応答に伴うカスパーゼの活性化は従来よく知られた細胞死のシグナルとなるだけでなく、脂質合成の亢進を介して炎症の慢性化を防ぐ生存シグナルとしても機能している可能性が高い。本研究ではカスパーゼを介する脂質代謝制御の観点から炎症慢性化の分子メカニズムを明らかにすることを旨とする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生活スタイルの変化に伴い、わが国では平均寿命が過去最高を更新している。日本人の平均寿命が戦後急速に伸びた理由として、感染症などの急性期疾患の減少があげられる。一方で、近年増加している死因として、がんや心疾患などが関連した「生活習慣病」が大きな問題となっている。実際、生活習慣病が関連する死因は、日本人の死因の約50～60%を占めている。さらなる問題点として生活習慣病は、直接的な死因のみならず、重症化や合併症、生活機能の低下・要介護など生活の質(QOL)の低下の原因ともなる。すなわち、慢性炎症が関わる生活習慣病の予防や治療につながるメカニズムを解明することは、健康寿命を延伸するために急務である。

研究成果の概要(英文)：Inflammatory responses play a central role, as the front line, in the host defense against injury and infection. Under healthy conditions, acute inflammation can be resolved by means of an active termination program. Chronic inflammation is considered a risk factor for the development of pathological conditions, but the precise mechanism of their association is currently unknown. Recent studies have identified a link between inflammatory signaling and lipid signaling. In this study, we hypothesize that TLR-4 signaling activates an SREBP-mediated process through the inflammatory caspase and leads to elevated cholesterol synthesis in macrophages. Our study would provide new insight into the molecular mechanism of crosstalk between chronic inflammation and lipid metabolism signaling and offer new opportunities for the development of drug targets that ameliorate chronic inflammation.

研究分野：生化学

キーワード：脂質代謝 炎症 カスパーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食や生活スタイルの変化に伴い、わが国では平均寿命(女性 86.83 歳, 男性 80.5 歳, 平成 26 年簡易生命表から, 厚生労働省資料)が過去最高を更新している。日本人の平均寿命が戦後急速に伸びた理由として、感染症などの急性期疾患の減少があげられる。一方で、近年増加している死因として、がんや心疾患などが関連した「生活習慣病」が非常に大きな問題となっている。実際、生活習慣病が関連する死因は、日本人の死因の約 50~60% を占めている(平成 25 年人口動態統計月報年計, 厚生労働大臣官房統計情報部資料)。さらなる問題点として生活習慣病は、直接的な死因のみならず、重症化や合併症、生活機能の低下・要介護など生活の質(QOL)の低下の原因ともなっている。すなわち、生活習慣病の予防や治療につながるメカニズムを解明することは、今を生きる日本人にとって健康寿命を延伸するために急務である。

申請者は、この問題に取り組むため生活習慣病の基盤病態として炎症の適切な収束が妨げられた状態である慢性炎症に着目した。炎症応答は本来、内外のストレスに対する生体の防御反応であり、異変がおこると自然免疫応答を活性化させ、サイトカイン・ケモカインとよばれる微量で強力な生理活性物質を放出し、細胞の遊走や周辺の細胞の活性化を誘導することで、生存に必要な環境を維持している。しかしながら、なぜ生存に必須な炎症応答が遷延し、慢性化して病態が形成されるのか? その詳細なメカニズムは未だ明らかにされていない。慢性炎症をコントロールするためには、その分子メカニズムの解明が極めて重要な課題である。近年、Toll-like receptor (TLR) signaling や Inflammasome を介した自然免疫応答の活性化と炎症・脂質代謝が密接に関連していることが注目されている (*Nat. Rev. Immunol.*, 15, 104-16, 2015)。脂質は、エネルギー源としての役割にとどまらず、生体を構成する主要な細胞膜成分となるほか、脂質メディエーターとして機能することが知られ、細胞内脂質量が厳密に調節されている。これまでに多くの研究者によって Sterol-regulatory element binding protein (SREBP) を介する脂質代謝制御関連遺伝子の発現調節等が明らかにされてきた (*Cell*, 1993, *J. Biol. Chem.*, 1994)。

2. 研究の目的

申請者らは、免疫細胞の一つであるマクロファージが炎症刺激を受けると TLR4 を介して炎症シグナルと同時に細胞内脂質合成系を活性化させること、さらに興味深いことに、その脂質代謝の活性化は炎症刺激によって誘導されるカスパーゼ 4/11 依存的な、SREBP の活性化が関与していることを見いだした。このことは、過剰な炎症応答がおきた場合、カスパーゼ 3 の活性化などを介して細胞死が引き起こされるが、軽微な外来性/内因性の刺激に対しては、次なる刺激に備えて細胞膜組成を修復するとともにエンドサイトーシス(貪食)を亢進し、組織恒常性を維持するため、カスパーゼ 4/11 依存的に脂質合成を高め細胞死を回避し、組織の修復を積極的に進める一方、細胞内で過剰に合成・蓄積され変性した脂質(まだ仮説の段階であるが)が、さらなる炎症のトリガーとなる可能性が高いことが考えられた。そこで本研究計画では、脂質合成が炎症シグナルと密接に連携して制御されていることに着目し、組織恒常性を維持/炎症慢性化する機構として、カスパーゼ依存的な脂質代謝制御の分子メカニズムを明らかにする。細胞にとって、危機的状況となりうる炎症応答の際に脂質合成を増加させる生理学的意義を明確にすることで、炎症の遷延に伴う慢性化の一端を明らかにすることができる。さらに、食事性脂質の増加や血清脂質異常に伴う炎症シグナルと脂質合成との高次システム間連携の変調が、マクロファージの機能制御異常を誘発し、動脈硬化に代表される慢性炎症性病態の発症につながるのか、そのメカニズムを分子・組織・個体レベルで解明することを目指す。

3. 研究の方法

マクロファージに対して炎症を惹起する物質を添加すると、脂質代謝関連遺伝子の mRNA 発現誘導が認められた。その経路に炎症誘導性カスパーゼと SREBP が関与していることが明らかになりつつある。そこで(1)分子レベル(qRT-PCR, IF, WB, ルシフェラーゼアッセイ, RNA-Seq等)で、マクロファージにおけるカスパーゼと SREBP の関係を明確にする。(2)カスパーゼノックアウトマウスを用いることで、脂質代謝制御にカスパーゼが関与していることを明らかにする。

4. 研究成果

Raw264.7 細胞または C57BL/6 マウスから Bone-marrow derived macrophage (BMDM) を調整した後、LPS やパルミチン酸などの細胞活性化因子で刺激を行い経時的に細胞を回収し、炎症性カスパーゼやコレステロール生合成に関わる Hmgcr の mRNA 発現について qRT-PCR で解析を行った。その結果、6-8 時間をピークに刺激依存的に Hmgcr mRNA の発現が誘導された。また、タンパク質レベルでもカスパーゼなどの発現を確認することができた。さらに脂質データベースを解析した結果、炎症応答に伴い細胞内脂質の上昇が示されたことから、コレステロールの調節因子の1つである Hmgcr の発現を指標に炎症性カスパーゼの関与について、カスパーゼの阻害剤や特定のカスパーゼをノックダウンする合成 siRNA を用いて、Hmgcr および SREBP ターゲット遺伝子の発現変化について解析を行った。Hmgcr の遺伝子発現誘導は、カスパーゼ阻害剤 (Z-VAD-FMK) やカスパーゼのノックダウンにより抑制された。これらの結果から、カスパーゼが Hmgcr の遺伝子発現制御に関与していることがわかってきた。そこで炎症性カスパーゼが Hmgcr の発現を調節する転写因子 SREBP の核内移行に関与するのかどうかを検討した。BMDM のカスパーゼをノックダウンするため siRNA をトランスフェクションし、炎症刺激後の核内の SREBP の局在量をウェスタンブロット法で解析を行ったところ、ノックダウンにより核内へと移行する SREBP が抑制されることがわかった。また、免疫蛍光染色法 (IF) による共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析から細胞質内で炎症刺激にตอบสนองしてカスパーゼと SREBP が共局在し、293T 細胞に SREBP の発現ベクターを過剰発現させた免疫沈降法 (IP) による解析から両者が会合することがわかった。現在カスパーゼがターゲットとしている分子が直接 SREBP をターゲットとしているのか、または関連因子を介しているのか、さらには、どのドメインを介しているのかなど様々な変異体を作製し会合性を検討している。さらに、リコンビナントタンパク質を作製して直接的な結合性について調べることを計画している。また、カスパーゼの発現をノックダウンした細胞を用いて、細胞内のコレステロールをフィリピン染色 (コレステロール染色) を行うと、カスパーゼノックダウンにより蛍光量が減少したことから、細胞内コレステロールが抑制されることが明らかとなった。さらに、カスパーゼの働きを阻害剤で抑制すると、マクロファージが細胞内に異物をとりこむ貪食作用 (ファゴサイトーシス) 機能が抑制されることがわかった。すなわち、細胞機能において、炎症応答ではなく、脂質代謝制御という観点からカスパーゼの重要性を見出すことができた。以上の結果から、マクロファージにおける炎症性カスパーゼの誘導と脂質代謝が密接に関わっていることが明らかとなってきた。マクロファージは免疫を担当する細胞の1つであり一部の炎症応答を担っていることから、その遷延にこの機構が関わっている可能性が示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

投稿準備中である。

〔学会発表〕(計 5 件)

早川清雄, 成英瀾, 星野由紀子, 大石由美子: マクロファージにおけるコレステロールを介した炎症応答と制御メカニズム, 第91回 日本生化学会大会, 国立京都国際会館【京都】, 日本, 2018年9月24-26日, (ポスター発表)(国内学会)

成英瀾, 早川清雄, 大石由美子: Regulation of lipid metabolism by inflammatory caspase in macrophage, 第91回 日本生化学会大会, 国立京都国際会館【京都】, 日本, 2018年9月24-26日, (ポスター発表)(国内学会)

早川清雄, 星野由紀子, 大石由美子: 慢性炎症と脂質代謝シグナルのクロストーク (3P-333), 第89回 日本生化学会大会, 仙台, 日本, 2016年9月, (ポスター発表)(国内学会)

S. Hayakawa, Y. Oishi: Inflammatory response regulates the transcription factor SREBP activation., The 57th International Conference on the Bioscience of Lipids (ICBL), Chamonix-Mont-Blanc, France September, 2016 (Poster) (国際学会)

S. Hayakawa, Y. Oishi: The crosstalk between chronic inflammation and lipid metabolism., The 24th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophage (MMCB2016), Tokyo, Japan, June, 2016 (Poster) (国際学会)

〔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:
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:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：成英瀾

ローマ字氏名：CHENG YINGLAN

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。