

令和 4 年 5 月 21 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09012

研究課題名(和文)腸管Tリンパ球における体内時計と増殖代謝

研究課題名(英文)Circadian clock and proliferative metabolism in the intestinal T lymphocytes

研究代表者

木内 謙一郎(Kinouchi, Kenichiro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：50528578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：概日リズムと代謝恒常性の関連は深く、リズムの障害は癌、メタボリックシンドローム、睡眠障害など幅広い疾患の病態生理への関与が示唆されている。本研究はT細胞が活性化する際の増殖代謝と

概日時計の関与を検討した。野生型、Bmal1欠損マウス脾臓のCD4陽性Tリンパ球のサブセットの割合に差は見られなかった。一方で、ナイーブT(Tn)細胞を単離、培養し、CD3/28抗体で刺激したところ、Bmal1欠損Tnで細胞分裂が亢進し、細胞数の増加が観察された。また、Tn細胞の遺伝子発現を検討したところ、解糖系、グルタミン酸化酵素の遺伝子発現の亢進を認めただけで、MYC蛋白発現がBmal1欠損Tnで亢進していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の知見より、T細胞活性化の際の増殖代謝と体内時計が関与することが示唆されている。概日リズム異常は、慢性炎症や自己免疫を増悪する可能性が示唆されているが、大腸癌や炎症性腸疾患、肥満や糖尿病などにおいても、概日時計変容が関与することから、T細胞の概日時計が免疫機能を通じて消化器疾患や内分泌代謝疾患に関与する可能性が考えられる。引き続き、今後詳細な機序を検討することによって、腸管免疫を介した炎症性腸疾患や大腸癌、代謝疾患の創薬ターゲットを探索も目指していく方針である。

研究成果の概要(英文)：Circadian rhythms are heavily involved in metabolic homeostasis. Circadian misalignment is implicated in a wide array of pathophysiology such as cancer, metabolic syndrome, and sleep disruption. This study dissected whether the circadian clock controls proliferative metabolism in activated T lymphocytes. The proportion of splenic T lymphocyte subset population was comparable between the wild-type and Bmal1 knock out mice. On the other hand, when naive T cells (Tn) were isolated, cultured, and stimulated by CD3/28 antibody, Tn from Bmal1 knockout mice exhibited higher proliferative capacity and numbers of cells. Additionally, expression of genes encoding components of glycolysis and glutamine oxidation along with that of MYC protein was upregulated.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：概日リズム 概日時計 代謝 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

概日リズムは生体が昼夜の変化する環境に予測することで適応する代謝恒常性に重要な機構である。その中心的な役割を生体時計が担っており、地球の自転に伴う光の明暗による調節を受けながら、約 24 時間の行動、代謝、生理反応のリズムを生み出している(1)。哺乳類の体内時計のシステムは階層構造をとっており、視床下部の視交叉上核(SCN)に存在する体内時計が中心となり、液性因子や神経因子を介して末梢の体内時計を同期し支配している。体内時計は時計遺伝子による転写翻訳フィードバックループにより機能しており、明期に **CLOCK/BMAL1** が自らの抑制因子である **Period(Per)**や **Cryptochrome(Cry)**を含む標的遺伝子の転写を促進し、暗期に **PER, CRY** タンパク質の増加を介して転写が抑制される。この他にも核内受容体である **ROR** や **REV-ERB** が **Bmal1** の遺伝子発現をそれぞれ促進、抑制するフィードバック系も存在する。この体内時計と代謝は深く関与していることが分かっている。明期のみ食餌摂取させると、末梢時計の位相が中枢時計の位相と逆転することが報告されており、末梢時計の機能に栄養素が深く関わっていることを示唆している(2)。一方で、時計遺伝子変異マウスや慢性的な時差ぼけマウスは肥満、インスリン抵抗性などの代謝障害を呈し、時計遺伝子が組織特異的に代謝遺伝子を制御することが分かっている(3, 4)。研究代表者は 24 時間空腹への肝臓と骨格筋における時間依存的な反応に体内時計が関わっており、その遺伝子応答に組織特異性が存在することを見出している(5)。更に、体内時計は酸化代謝における栄養利用にも関わっており、時計遺伝子は **NAD⁺**産生を介してミトコンドリアにおける脂質酸化を促進する一方、時計の欠損は好氣的解糖系、グルタミン酸化を促進し、乳酸産生量の増加や **ATP** 産生量の低下を招く(6)。この時計の欠損の結果見られる代謝の特徴は癌、多能性幹細胞、活性化リンパ球などの増殖細胞に見られる代謝を想起させ、体内時計と増殖代謝の関連を疑わせる。増殖細胞では急速な細胞増殖に伴うバイオマス産生のため、**NAD⁺**の消費増大と好氣的解糖系、グルタミン酸化に依存した代謝を行なっているが、興味深いことに、**ES** 細胞では体内時計の振動は得られないことが報告されている(7)。これらの知見は体内時計と増殖代謝が関与するという仮説を支持する知見である。本研究では、①概日時計が T 細胞の活性化の際にリプログラムされるのか。②T 細胞活性化の際の細胞増殖代謝と転写制御に体内時計がどのように関与するのか。③腸炎や肥満モデルにおいて体内時計が腸管 T 細胞の機能や活性化にどの程度関与するのか。本研究ではこれらを学術的「問い」とする。

2. 研究の目的

腸管免疫細胞は癌免疫、肥満、炎症性腸疾患など多くの病態生理に関与することから、免疫細胞の代謝障害は免疫機能に影響を及ぼすと考えられる。しかし、腸管の免疫細胞における代謝がどの程度免疫や生体の恒常性へ関与するかは未だ十分には解明されていない。ナイーブ T 細胞やメモリー T 細胞では酸化的リン酸化が活発なのに対し、サイトカイン産生エフェクター T 細胞では好氣的解糖系やグルタミン酸化を行うことで細胞増殖に必要なエネルギーを確保していると考えられている(8)。例えば、**MYC** は T 細胞の増殖の際の同化反応へ代謝をシフトするのに関与することが報告されている(9)。興味深いことに **CLOCK/BMAL1** は **MYC** と同じ **E-box** 配列に結合するが、癌細胞で好発する **MYC** が体内時計を抑制し、代謝を好氣的解糖系、グルタミン酸化へシフトすることが報告されている(9)。本研究の目的は T リンパ球の活性化における体内時計を介した代謝および遺伝子調節の変化を検討し、腸炎や肥満などの代謝障害における免疫機能への関与を明らかにすることである。

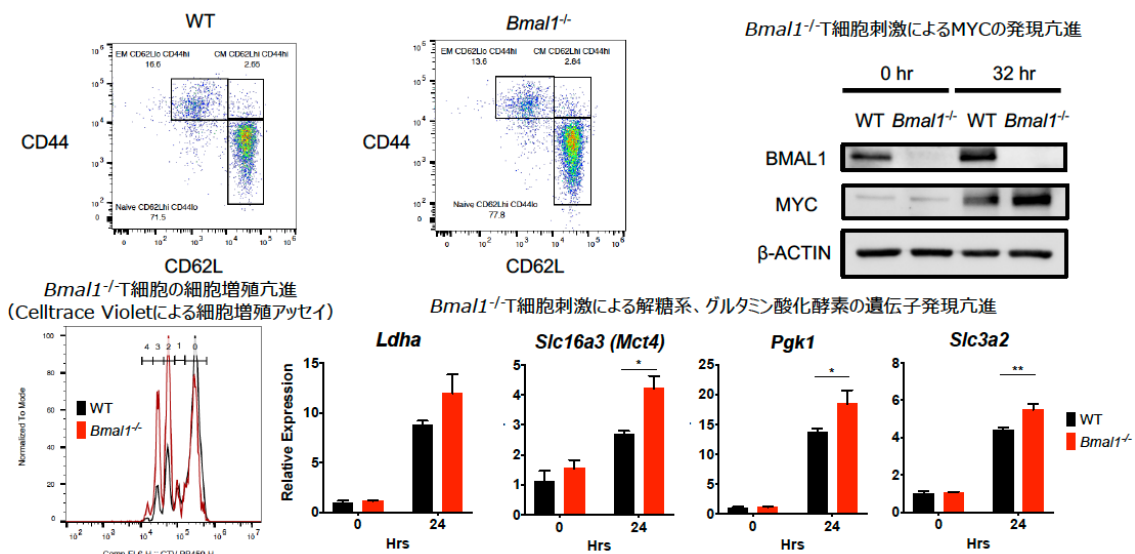
3. 研究の方法

初めに T 細胞活性化と体内時計発現の関与を検討するため、8~12 週齢の *Bmal1* 欠損マウスおよびコントロールマウスの脾臓より FACS を用いて CD44 と CD62L の発現に基づいて、それぞれナイーブ T 細胞 (Tn: CD44^{lo} CD62L^{hi})、エフェクター T 細胞 (Te: CD44^{hi} CD62L^{lo})、メモリー T 細胞 (Tm: CD44^{hi} CD62L^{hi}) を単離し、それぞれの比率を検討する。また、Tn を抗 CD3/28 抗体で刺激する前の細胞 (resting Tn) と抗 CD3/28 抗体で 24 時間刺激した細胞 (activated Tn) に対し、体内時計の発現を RT-qPCR、Western blot 法で検討する。更に、resting Tn、activated Tn、Te、Tm に対し RNA-seq (n=3) および **BMAL1** の ChIP-seq (n=2) を行い、T 細胞の活性化状態に起因する転写調節と **BMAL1** のクロマチンにおける genome wide occupancy を検討する。これらの細胞で酸素消費量 (OCR)、細胞外液酸性度 (ECAR)、**NAD⁺/NADH** 比を測定し、体内時計の欠損が各々の T 細胞に与える代謝変化を検討する。更に代謝フラックスを検討するため、[3-³H]-glucose で解糖系を、[9, 10-³H]-palmitic acid で脂質酸化を、[U-¹⁴C]-glutamine でグルタミン酸化を、[2-¹⁴C]-pyruvate でピルビン酸の酸化を評価する。また Forskolin による synchronization を行い、6 時間ごと 48 時間に渡り時計遺伝子の振動を RT-qPCR、Western blot 法で検討する。これらの結果から、T 細胞が活性化する際の増殖代謝において体内時計のリプログラミングがクロマチンレベルでどのように関与するのかについて明らかとなる。

4. 研究成果

T細胞が活性化する際の増殖代謝と概日時計の関与を検討するため、最初に脾臓におけるCD4陽性Tリンパ球のサブセットの割合において、概日時計が関与するかどうか検討を行った。8~12週齢のBmal1欠損マウスおよびコントロールマウスの脾臓よりセルソーターを用いてCD4陽性CD25陰性の細胞分画を単離し、更にCD44とCD62Lの発現に基づいて、ナイーブT細胞(Tn: CD44lo CD62Lhi)、セントラルメモリーT細胞(Tc: CD44hi CD62Lhi)、エフェクターメモリーT細胞(Tem: CD44hi CD62Llo)の割合を検討した。野生型、Bmal1欠損マウス共に、ナイーブT細胞の分画は約70%、エフェクターメモリーT細胞の分画は約15%であり、CD4陽性Tリンパ球のサブセットの割合に差は見られなかった(図1)。一方で、Tn細胞を単離、培養し、CD3/28抗体で刺激したところ、Bmal1欠損Tnで細胞分裂が亢進し、細胞数の増加が観察された(図1)。また、Tn細胞の遺伝子発現を検討したところ、解糖系、グルタミン酸化酵素の遺伝子発現の亢進を認めただけでなく、MYC蛋白発現がBmal1欠損Tnで亢進していた(図1)。今後、他の概日時計の欠損マウス脾臓のTn細胞についても検討するほか、トランスクリプトームやChIP-seqによる網羅的解析も行う予定である。

図1 T細胞代謝における概日時計の役割



〈引用文献〉

1. U. Schibler, P. Sassone-Corsi, A web of circadian pacemakers. *Cell* **111**, 919-922 (2002).
2. F. Damiola *et al.*, Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes & development* **14**, 2950-2961 (2000).
3. Y. Nakahata, S. Sahar, G. Astarita, M. Kaluzova, P. Sassone-Corsi, Circadian control of the NAD⁺ salvage pathway by CLOCK-SIRT1. *Science (New York, N.Y.)* **324**, 654-657 (2009).
4. K. M. Ramsey *et al.*, Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD⁺ biosynthesis. *Science (New York, N.Y.)* **324**, 651-654 (2009).
5. K. Kinouchi *et al.*, Fasting Imparts a Switch to Alternative Daily Pathways in Liver and Muscle. *Cell reports* **25**, 3299-3314 e3296 (2018).
6. C. B. Peek *et al.*, Circadian clock NAD⁺ cycle drives mitochondrial oxidative metabolism in mice. *Science (New York, N.Y.)* **342**, 1243-1247 (2013).
7. K. Yagita *et al.*, Development of the circadian oscillator during differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 3846-3851 (2010).

8. G. J. van der Windt *et al.*, Mitochondrial respiratory capacity is a critical regulator of CD8+ T cell memory development. *Immunity* **36**, 68-78 (2012).
9. R. Wang *et al.*, The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation. *Immunity* **35**, 871-882 (2011).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kinouchi Kenichiro、Mikami Yohei、Kanai Takanori、Itoh Hiroshi	4. 巻 80
2. 論文標題 Circadian rhythms in the tissue-specificity from metabolism to immunity: insights from omics studies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Aspects of Medicine	6. 最初と最後の頁 100984 ~ 100984
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mam.2021.100984	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 鳥光拓人、木内謙一郎、栗原勲、伊藤裕	4. 巻 50
2. 論文標題 副腎皮質ホルモンの概日リズムと内分泌代謝恒常性	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床化学	6. 最初と最後の頁 337-344
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 木内謙一郎、宮下和季、伊藤裕	4. 巻 47
2. 論文標題 エネルギー代謝・運動の日内ホメオスタシス制御の根幹を成す生体時	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 403-407
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 木内謙一郎
2. 発表標題 臓器連関における概日リズムの意義と栄養シグナル
3. 学会等名 第42回 日本肥満学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木内謙一郎
2. 発表標題 内分泌代謝とエピジェネティクスが収斂する概日リズム
3. 学会等名 第 39 回日本内分泌学会 内分泌代謝学サマーセミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kenichiro Kinouchi, Kazutoshi Miyashita, Hiroshi Itoh
2. 発表標題 Temporal Tissue Coordination by the Circadian Clock and Metabolic Cycles
3. 学会等名 The 9th Seoul International Congress of Endocrinology and Metabolism (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	土居 雅夫 (Doi Masao) (20432578)	京都大学・薬学研究科・教授 (14301)	
研究分担者	宮下 和季 (Miyashita Kazutoshi) (50378759)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任准教授 (32612)	
研究分担者	三上 洋平 (Mikami Yohei) (80528662)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師 (32612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------