

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：15501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22781

研究課題名(和文)時計遺伝子E4BP4によるマクロファージの炎症制御機構の解明

研究課題名(英文)Regulation of macrophage inflammation by the clock gene E4BP4

研究代表者

山本 薫(Yamamoto, Kaoru)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30885835

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：概日リズムと疾病には密接な関係があり、概日リズムが乱れやすいシフトワーカーは生活習慣病や炎症疾患の発症が増加することから、概日リズム研究は疾患予防や治療に繋がると期待されている。今回、概日リズムを下流へとつなげる出力系時計遺伝子E4BP4をマクロファージ特異的に発現させたマウスを作製した。このマウスにDSSを用いて大腸炎を発症させたところ、このマウスは野生型マウスと比べ、大腸炎の重症度が軽いことが分かった。さらに検討を進めることで、マクロファージでのE4BP4は、マクロファージを抗炎症マクロファージへと分極誘導させ、大腸炎からの回復を早めている可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、マクロファージでのE4BP4は、マクロファージを抗炎症マクロファージへと分極誘導させ、大腸炎の重症度を低下させることが分かった。マクロファージを抗炎症へと導く転写因子はほとんど報告されていない上、疫学的にシフトワーカーなど不規則な生活スタイルと炎症性腸疾患など自己免疫疾患との関連が報告されている。今回の時計遺伝子E4BP4のマクロファージでの抗炎症作用は、こうした病態を解明する上で興味深い知見となった。

研究成果の概要(英文)：Circadian rhythms and disease are closely related, and it is known that shift workers whose circadian rhythms are easily disrupted have an increased incidence of lifestyle-related diseases and inflammatory diseases. Therefore, circadian rhythm research is expected to lead to disease prevention and treatment. In this study, we generated mice with macrophage-specific expression of the output clock gene E4BP4, which connects circadian rhythms downstream. When these mice were subjected to colitis using DSS, these mice were found to have less severe colitis than wild-type mice. Further investigation suggested that E4BP4 in macrophages may induce macrophages to polarize into anti-inflammatory macrophages and accelerate recovery from colitis.

研究分野：免疫学、血液学

キーワード：マクロファージ 大腸炎 E4BP4

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

E4BP4 は M2 への分極を誘導する中心的な分子であるのか？ そうであれば、このメカニズムに基づき炎症疾患が治療できるのか？ 本研究はそれらの学問的問いに答える研究である。

E4BP4 は生体の概日リズムを決定する時計遺伝子群の直下に存在し、時計遺伝子群のシグナルを下流へとつなげる出力系時計遺伝子の一つである。概日リズムと疾病には密接な関係があり、概日リズムが乱れやすいシフトワーカーは代謝異常や生活習慣病等の発症が増加することから、概日リズム研究は疾患予防や治療に繋がると期待されている。研究協力者はこれまで時計遺伝子がインスリン分泌に関わる遺伝子発現を調節することを明らかにし、そのメカニズムを解析してきた (*Science* 2014, *Cell Metabolism*. 2017)。研究代表者は研究協力者と共に出力系時計遺伝子である *E4BP4* に着目し、*E4BP4* が脾細胞においてインスリン分泌を負に制御することを見出した (*EBioMedicine*. 2017)。昨今、*E4BP4* は T 細胞や NK 細胞では、分化・機能発現に必要であることが報告され免疫学の領域で注目を集めている。*E4BP4* 全身ノックアウトマウスは大腸炎を自然発症すること、炎症性腸疾患患者の腸管マクロファージでは *E4BP4* の発現低下がみられることから、*E4BP4* の発現低下によって過剰な炎症が惹起されるのではないかと考えられている (*J Immunol*. 2014)。このような背景から、*E4BP4* がマクロファージを抗炎症に向かわせる M2 マクロファージへの極性誘導に大きく関与しているのではないかと仮説を立て研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、時計遺伝子 *E4BP4* によるマクロファージの分極メカニズムを解明し炎症性腸疾患の治療へと繋げることである。

3. 研究の方法

(1) マクロファージ特異的 *E4BP4* 強発現マウスでの DSS 誘導性腸炎モデルの作製と表現型解析

M-CSF 受容体プロモーター下に *E4BP4* を発現するマクロファージ特異的 *E4BP4* 強発現マウス (M-*E4BP4*) を独自に樹立した。このマウスにデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を 7 日間投与し炎症性腸疾患モデルを作製した。回復期までの腸炎の重症度をコントロールと比較する。また、マクロファージでの *E4BP4* の役割について網羅的に検討する。さらに大腸粘膜中に存在する CD45 陽性細胞を単離しフローサイトメーターで分類することで、マクロファージでの *E4BP4* の発現が、どのような免疫細胞を誘導するのか解析する。

(2) *E4BP4* ノックアウトマクロファージ培養細胞を用いた網羅的解析

CRISPR-CAS9 システムを用いて *E4BP4* ノックアウト RAW264.7 細胞 (*E4BP4* KO RAW) を樹立する。この細胞を M1 または M2 マクロファージへと分極誘導し、RNA シーケンスを行い分極パターンの変化をコントロールと比較する。

(3) *E4BP4* レスキューによる炎症性腸疾患モデルマウスの治療効果の検討

M-*E4BP4* マウスから作出した BMDM (Bone marrow derived macrophage) を野生型の DSS 誘導

性腸炎マウスに輸注して、実際に E4BP4 の導入によって治療効果が得られるのか否かを検証する。

4 . 研究成果

M-E4BP4 マウスでは、DSS 惹起性大腸炎の重症度を軽減させることを確認した。E4BP4 ノックアウト RAW264.7 細胞 (E4BP4 KO RAW) を用いて RNA シーケンスを行ったところ、E4BP4 KO RAW 細胞は、野生型と比べ、抗炎症性マクロファージの発現が低下していることが分かった。さらに野生型マウスに、M-E4BP4 マウスから単離したマクロファージを輸注すると大腸炎の重症度が軽減することも分かった。以上より、マクロファージでの E4BP4 は、マクロファージを抗炎症マクロファージへと分極誘導させ、大腸炎の重症度を低下させる作用を見出した。

メカニズムとしては、抗炎症マクロファージによって大腸炎による過剰な炎症を鎮め、組織修復力を高めている可能性が考えられた。

マクロファージを抗炎症へと導く転写因子はほとんど報告されていない上、疫学的にシフトワーカーなど不規則な生活スタイルと炎症性腸疾患など自己免疫疾患との関連が報告されている。今回の時計遺伝子 E4BP4 のマクロファージでの抗炎症作用は、こうした病態を解明する上で興味深い知見となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kajimura Y, Nakamura Y, Tanaka Y, Tanaka M, Yamamoto K, Matsuguma M, Tokunaga Y, Yujiri T, Tanizawa Y.	4. 巻 53
2. 論文標題 Soluble Interleukin-2 Receptor Index Predicts Outcomes After Cord Blood Transplantation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Transplant Proc .	6. 最初と最後の頁 379-385
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.transproceed.2020.03.027.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsumura T, Ohta Y, Taguchi A, Hiroshige S, Kajimura Y, Fukuda N, Yamamoto K, Nakabayashi H, Fujimoto R, Yanai A, Shinoda K, Watanabe K, Mizukami Y, Kanki K, Shiota G, Tanizawa Y.	4. 巻 534
2. 論文標題 Liver-specific dysregulation of clock-controlled output signal impairs energy metabolism in liver and muscle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 415-421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.11.066.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 梶邑 泰子, 田口 昭彦, 山本 薫, 太田 康晴, 谷澤 幸生
2. 発表標題 時計遺伝子E4BP4によるマクロファージの炎症制御機構の解明
3. 学会等名 日本体質医学会
4. 発表年 2020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
研究協力者	田口 昭彦 (Taguchi Akihiko)		

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
---------	---------