

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790741

研究課題名(和文)マクロファージ分化・活性化におけるエピゲノム解析

研究課題名(英文)Epigenetic Analysis of macrophage activation

研究代表者

砂河 孝行(Isagawa, Takayuki)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：40418637

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：慢性炎症は癌や生活習慣病などの基盤病態として知られている。そこで、本研究では、炎症応答における主要なエフェクター細胞であるマクロファージの炎症制御機構について炎症応答の中心的な制御遺伝子であるNFκBに注目し炎症に伴う標的遺伝子の遷移について検討を行った。その結果、NFκBファミリー内で炎症応答期から終息期にかけてスイッチングが生じること。さらに、炎症終息期に於いてそのサブファミリーであるp50は、炎症早期において炎症関連遺伝子を制御する一方で終息期には代謝関連遺伝子を標的としていることを明らかとした。また、p50は炎症に伴うミトコンドリアのエネルギー代謝制御に関与していることも見出した。

研究成果の概要(英文)：It is well known that chronic inflammation forms the basis of cancers and the metabolic syndrome. Therefore, in the present study, we performed a comprehensive, genome-wide examination of the targets of NFκBs, the central transcriptional regulator of inflammation, in the context of regulatory mechanisms of inflammation in macrophages. As a result, we revealed that NFκB subunit switching occurs during the transition from the inflammatory response phase to the resolution phase. Furthermore, we found that p50, a NFκB subunit, regulates inflammatory genes during the early inflammatory phase but then shifts to regulating metabolic genes during the resolution phase. We also revealed that p50 is involved in the metabolic reprogramming associated with the inflammatory response.

研究分野：2479074

科研費の分科・細目：循環器内科学

キーワード：macrophage inflammation NFκB metabolism

### 1. 研究開始当初の背景

狭心症や心筋梗塞などの心疾患や脳梗塞などの動脈硬化性疾患は、我が国において悪性腫瘍と並ぶ主要な死亡原因となっている。慢性炎症では低レベルの炎症プロセスが長期にわたり持続することにより、細胞機能の障害、さらには不可逆的な組織構築の改変(リモデリング)が引き起こされ、その結果、臓器の機能不全がもたらされる。慢性炎症プロセスでは、マクロファージが中心的な役割を担う。従来マクロファージは、炎症を促進するものとされてきたが、近年マクロファージにもサブクラスが存在し、一部はむしろ炎症抑制・創傷治癒に機能する可能性が示唆されている。マクロファージは、炎症性サブクラスをM1、抗炎症性をM2として分類される。これら2種類のサブクラスの協調的・競合的な作用は、組織の恒常性維持にとって重要である。しかしながら、組織におけるM1/M2マクロファージのスイッチングの分子機構についてはよくわかっていない。本研究を行うことでマクロファージサブクラスへの活性調節機構をより詳細に解析し明らかにすることは炎症の分子機構を理解するうえで極めて重要であると考えられる。

### 2. 研究の目的

心血管疾患の発症・進展には慢性炎症が必須の役割を果たしている。特にマクロファージは主要なエフェクター細胞として重要であるが、近年、従来考えられていた以上に多様な機能・形質を示すことが明らかとなってきた。我々は、M1マクロファージが細胞障害活性と炎症促進作用を持つのに対して、M2マクロファージが線維化の促進や抗炎症効果を持ち、この両者が協調することによって組織リモデリングが進展することを見いだした。しかし、M1/M2分化や機能制御の分子機構は明らかとなっていない。本研究では、転写制御およびクロマチン状態の観点からマクロファージの分化、活性化における制御機構を明らかにする。また、マクロファージ分化・活性化に介入する新たな治療法の可能性を探る。

### 3. 研究の方法

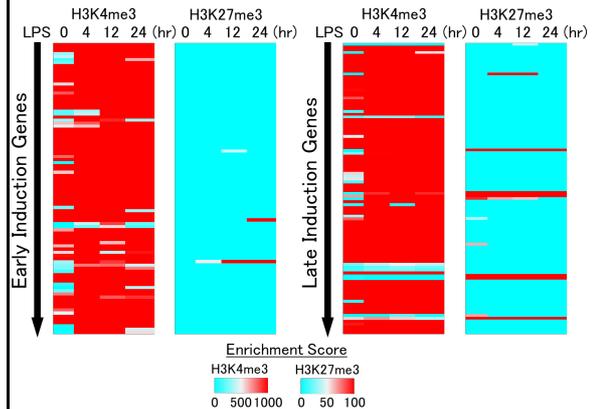
本研究は、マクロファージサブタイプの分化・活性化機構を、転写・エピジェネティクス制御の観点を中心に解明することを目的とする。そのため、まず、培養マクロファージ及びin vivo組織マクロファージを用いて、単球、M1/M2マクロファージにおけるエピゲノム情報を高速シーケンサーを用いてゲノムワイドに取得する。取得したエピゲノム情報と、トランスクリプトゲノムワイド解析(RNA-seq)の情報と組み合わせることによって、マクロファージの分化や活性化に伴う遺伝子発現の活性化や不活性化の制御機構を明らかにする。さらに、病的環境下におけるエピゲノム情報との比較検討を行いその違

いについて検討する。これらの解析からマクロファージの分化および活性化機構・慢性炎症への寄与機構について明らかにする。

### 4. 研究成果

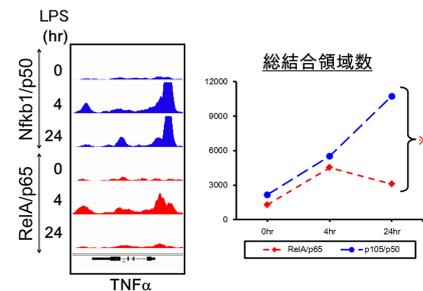
マクロファージでの炎症応答に伴うエピジェネティックな変化を検討するためにLPSによるM1活性化に伴う抑制性ヒストン修飾であるH3K27me3および活性化型

図1. マクロファージにおけるLPS刺激後のヒストン修飾の遷移



のH3K4me3について炎症刺激に伴う遷移をゲノムワイドにデータ取得を行った。その結果、マクロファージ活性化に伴う早期もしくは後期に誘導される遺伝子のこれらヒストン修飾の遷移について検討したと

図2. LPS刺激後のp65, p50標的領域数の遷移

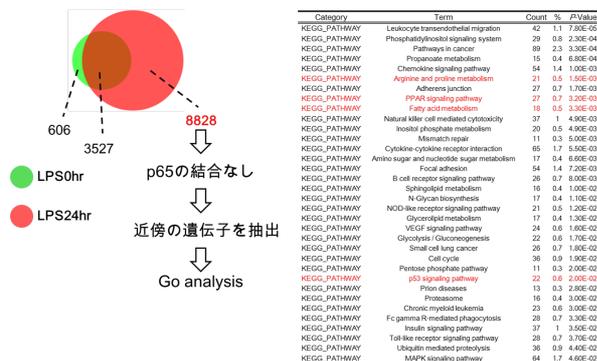


ころ、ほとんど変化がないことが明らかとなった(図1)。

一方、炎症刺激後の炎症惹起と収束の制御が組織恒常性維持に重要であることが知られている。特に炎症収束期に於いてM2様の表現型を取ることが知られており、この表現型のスイッチングが正常な炎症の制御において重要であると考えられる。さらに、炎症応答において中心的な転写因子であるNFκBのサブユニットであるp50の欠失マウスは敗血症モデルにおいて炎症の遷延化と増悪化を呈することが報告された。このような知見からNFκBのp50サブユニットは、炎症収束に於いて重要な機能を持っていることが示唆される。以上から炎症刺激に伴うNFκBの制御機構に着目し、その標的遺伝子を炎症刺激後、継時的

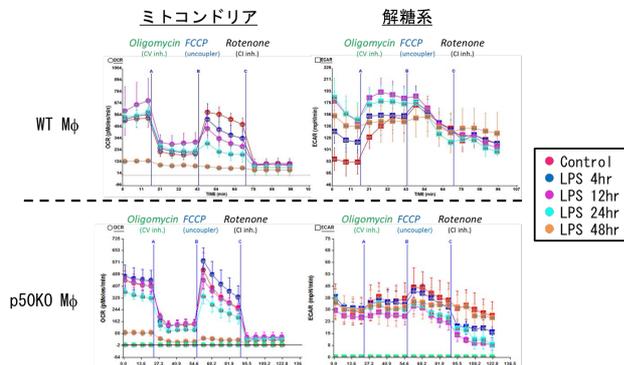
にゲノムワイドに検討した。その結果、NFκBの主要なサブユニットである p65/RelA は炎症応答時に最も結合が検出され、炎症収束期に標的遺伝子数は減少する傾向が見られた(図 2)。一方、p50 サブユニットは炎症収束期に p65 と共通して炎症関連遺伝子を標的としていたが、炎症終息期においては p65 の炎症関連遺伝子への結合は消失し、それらの遺伝子発現も抑制される一方で、p50 は、さらに特異的な標的を持つことが明らかになった(図 2)。このことは、炎症刺激後、時間依存的に NFκB サブユニットのスイッチングが生じていることを示唆している。

図3. 炎症終息期に於けるp50標的遺伝子の Gene Ontology 解析



さらに、p50 の炎症収束期における機能を明らかにする目的で炎症収束期特異的な標的遺伝子について Gene Ontology 解析を行ったところ代謝関連遺伝子が標的遺伝子に含まれていた(図 3)。以上のことから p50 は炎症収束期には p65 と協調して炎症関連遺伝子を制御する一方で、炎症終息期に於いては代謝制御に参与している可能性が示唆された。この結果をもとに野生型および p50 ノックアウトマウス由来のマクロファージを用い、炎症刺激後の細胞内代謝を細胞外フラックスアナライザーにより検討を行った。野生型では、炎症刺激により一過的に解糖およびミトコンドリアによる好気呼吸の上昇後、炎症収束期ではミトコンドリア活性が停止し、解糖系

図4. LPS刺激後の代謝リプログラミングにおけるp50の役割



への代謝シフトが観察された(図 4)。一方、p50 ノックアウトマクロファージにおいては、

ミトコンドリアの活性低下は見られる一方で解糖系の活性上昇は観察されなかった(図 4)。以上より、p50 は、ミトコンドリアにおける好気性呼吸から解糖単独への代謝シフトにおいて解糖の活性化に寄与していると考えられた。すなわち、我々の研究の結果、マクロファージに於いて NFκB の p50 サブユニットは炎症収束期における炎症関連遺伝子の発現制御のみならず、炎症終息期に於いては細胞内代謝を制御するという新しい機能を有する可能性が示唆された。今後、炎症終息期に於ける p50 の代謝制御における意義を明らかにするは炎症終息の分子メカニズムの解明に資するものと考えられる。

### 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 6 件)

1. Yukawa M, Akiyama T, Franke V, Mise N, Isagawa T, et al. Genome-wide analysis of the chromatin composition of histone H2A and H3 variants in mouse embryonic stem cells. PLoS One. 2014 Mar 21;9(3):e92689. doi: 10.1371/journal.pone.0092689. eCollection 2014.
2. Goda S, Isagawa T, et al. Control of Histone H3 Lysine 9 (H3K9) Methylation State via Cooperative Two-step Demethylation by Jumonji Domain Containing 1A (JMJD1A) Homodimer. J Biol Chem. 査読有. 2013 Dec 27;288(52):36948-56. doi: 10.1074/jbc.M113.492595.
3. Fustin JM, Doi M, Yamaguchi Y, Hayashi H, Nishimura S, Yoshida M, Isagawa T, et al. RNA-methylation-dependent RNA processing controls the speed of the circadian clock. Cell, 査読有. 2013 Nov 7;155(4):793-806. doi: 10.1016/j.cell.2013.10.026.
4. Yamamoto S, Tateishi K, Kudo Y, Yamamoto K, Isagawa T, et al. Histone demethylase KDM4C regulates sphere formation by mediating the cross talk between Wnt and Notch pathways in colonic cancer cells. Carcinogenesis. 査読有. 2013 Jun 21. doi: 10.1093/carcin/bgt174.
5. Saito T, Takeda N, Amiya E, Nakao T, Abe H, Semba H, Soma K, Koyama K, Hosoya Y, Imai Y, Isagawa T, Watanabe M, Manabe I, Komuro I, Nagai R,

Maemura K.  
VEGF-A induces its negative regulator,  
soluble form of VEGFR-1, by modulating  
its alternative splicing.  
FEBS Lett. 査読有. 2013 Jul  
11;587(14):2179-85. doi:  
10.1016/j.febslet.2013.05.038.

6. Sato T, Kaneda A, Tsuji S, Isagawa T,  
et al.PRC2 overexpression and  
PRC2-target gene repression relating  
to poorer prognosis in small cell lung  
cancer.  
Sci Rep. 査読有. 2013;3:1911. doi:  
10.1038/srep01911.
7. Tanaka M, Suzuki HI, Shibahara J,  
Kunita A, Isagawa T, et al.  
EVI1 oncogene promotes KRAS pathway  
through suppression of microRNA-96 in  
pancreatic carcinogenesis.  
Oncogene. 査読有. 2013 Jun 10. 1-10.  
doi: 10.1038/onc.2013.204.

〔学会発表〕(計 1件)

砂河孝行、真鍋一郎  
標題：マクロファージ炎症収束期における  
NF-kB1/p50 の網羅的解析  
新学術領域研究「自然炎症」+「脂質マシナ  
リー」合同若手ワークショップ  
発表日時：2013年7月3日(水)  
会場：ルネッサンスリゾート鳴門"

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

砂河 孝行 (Isagawa Takayuki)

東京医科歯科大学難治疾患研究所・助教  
研究者番号：40418637

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：