

機関番号：32610

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25560340

研究課題名(和文) 運動と免疫のクロストークに対するマクロファージ時計遺伝子の役割

研究課題名(英文) Role of clock genes in macrophages in the crosstalk between exercise and immunity

研究代表者

大野 秀樹 (OHNO, Hideki)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：00133819

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージに発現する時計遺伝子のRev-erb をマクロファージ細胞株に過剰発現させた結果、Ccl2の発現誘導が抑制され、接着能や遊走能が低下した。さらに、Rev-erb はCcl2プロモーターの結合領域に直接作用し、転写抑制因子として機能していることを見出した。すなわち、マクロファージにおいてRev-erb は炎症性ケモカインの1つである単球走化性因子(Ccl2)の発現調節を介して、炎症性機能を修飾することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Overexpression of Rev-erb in murine macrophage cell line RAW264 cells suppressed the induction of Ccl2 following an LPS endotoxin challenge, resulting in the impaired activity of cell adhesion and migration. In addition, Rev-erb represses Ccl2 expression directly through a Rev-erb binding motif in the Ccl2 promoter region. These findings demonstrate that Rev-erb modulates the inflammatory function of macrophages through the direct regulation of Ccl2 expression.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・スポーツ科学

キーワード：マクロファージ Rev-erb 単球走化性因子 炎症反応

1. 研究開始当初の背景

生体機能の概日リズムは進化の過程で保存されてきた生物時計システムであり、時計遺伝子により精密に制御されている。一方、現代社会が生み出す長期のシフト勤務や不十分な睡眠、時差を伴う移動などの生活習慣、あるいは段階的な恒常性維持機能の低下と定義される老化などの生理的变化は、概日リズムに対して強い影響を与える。最近、時計遺伝子の周期性とその破綻が、炎症反応や免疫、代謝機能異常、運動能力や記憶力の低下に関与することが示唆され、時間免疫学・時間栄養学的研究への関心が急速に高まっている。したがって、不規則な生活習慣がもたらす概日リズムの乱れによる炎症機能異常のメカニズムを明らかにすることは極めて重要になる。

一方、近年老化や肥満は全身性の軽度な炎症病態であるという考え方が浸透しつつある。病原微生物感染に対して免疫系が惹起する生体防御反応の第一線で働くマクロファージは、全身性慢性炎症の制御に密接にかかわっている。例えば、肥満においては白色脂肪組織へ炎症性マクロファージが浸潤し、脂肪細胞とマクロファージの相互作用によって炎症性サイトカインが産生される。その結果、脂肪組織での炎症が始まり、さらに全身性慢性炎症へと進行し、インスリン抵抗性が引き起こされると考えられている。

以上のような知見から、生体内時計機構とマクロファージによる全身性慢性炎症の制御機構がどのようにリンクしているのか明らかにすることで、炎症性疾患に対する時間免疫学的あるいは薬理的な治療や予防法の確立に寄与することが期待される。

2. 研究の目的

本研究では、病原微生物感染に対して免疫系が惹起する生体防御反応の第一線で働くマクロファージに備わる時計遺伝子と概日リズムに焦点を当てて、時計遺伝子によるマクロファージ炎症機能の制御機能の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 老化や肥満によるマクロファージの *Rev-erb* 遺伝子発現の解析

1~1.5 年齢の C57BL/6J マウスを老化マウスとして使用した。また、C57BL/6J マウスを高脂肪食で 6 週間飼育し、食事性肥満マウスとして、*ob/ob*^{-/-} マウスを遺伝的肥満マウスとして使用した。これらマウスから腹腔マクロファージを採取し、*Rev-erb* 遺伝子発現の日内周期を Real-time PCR 法により解析した。

(2) *Rev-erb* 作動薬による単球走化性因子 (*Ccl2*) の遺伝子発現の解析

C57BL/6J マウスから採取した腹腔マクロファージ、及びマウスマクロファージ細胞株

の RAW264 細胞を *Rev-erb* 作動薬で処理したときの、病原微生物成分 (LPS) による *Ccl2* 遺伝子の発現誘導を Real-time PCR 法により検討した。さらに、LPS が誘導するマクロファージ細胞内の *CCL2* の下流のシグナル伝達系への *Rev-erb* 作動薬の影響をウエスタンブロット法により検討した。

(3) *Rev-erb* 強発現細胞株の樹立と遺伝子発現、プロモーター活性の解析

Rev-erb 発現ベクターに組み込み RAW264 細胞にトランスフェクトし強発現株を樹立した。樹立した細胞について *Ccl2* 遺伝子発現、及び分泌タンパク質量を解析した。加えて、*Ccl2* 遺伝子のプロモーター領域の上流 10kb までの配列を調べ *Rev-erb* の応答エレメント (RORE) が存在したことから、*Ccl2* プロモーター組み込んだルシフェラーゼレポーターベクターを構築し *Rev-erb* 強発現細胞株に一過性にトランスフェクトし *Ccl2* のプロモーター活性を検討した。また、Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay により直接的な結合を評価した。

(4) *Rev-erb* 強発現細胞株の細胞内情報伝達系と炎症機能の解析

Rev-erb 強発現細胞株における *CCL2* の下流のシグナル伝達系への影響をウエスタンブロット法により検討した。また、フローサイトメトリ法により *Rev-erb* の強発現細胞表面上のインテグリン分子の発現、及び Real-time PCR 法によりインテグリン分子の遺伝子発現をそれぞれ解析した。さらに、細胞の接着能は Ashida らの方法 (Ashida, N., et al.: J. Biol. Sci. 276: 16555-16560, 2001) を改変し測定した。遊走能は市販の Chemotaxis assay kit を用いて測定し、炎症機能を評価した。

(5) *Rev-erb* ノックアウトマウスの解析

Rev-erb ノックアウトマウスの腹腔マクロファージを採取し、*Ccl2* やインテグリンの遺伝子発現を Real-time PCR 法により解析した。

4. 研究成果

(1) 老化や肥満によるマクロファージの *Rev-erb* 遺伝子発現への影響

マウス腹腔マクロファージにおける *Rev-erb* 遺伝子発現は明期 (zeitgeber time, ZT10) で高く、暗期 (ZT22) で低かった (図 1)。このことから、マクロファージにおける *Rev-erb* の遺伝子発現には日内の周期性があることが確認された。さらに、老化や肥満により明期での *Rev-erb* の遺伝子発現は減少した (図 1)。以上の結果より、老化や肥満による全身性の慢性炎症に *Rev-erb* が関与する可能性が示された。

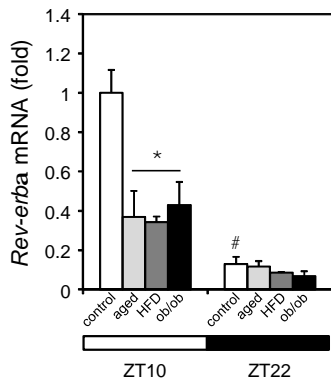
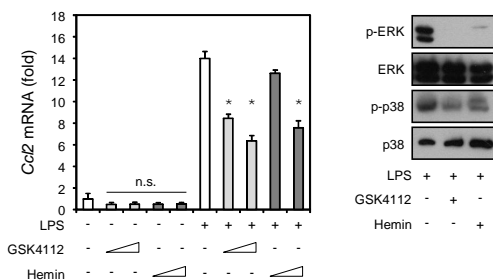


図1. 老化や肥満によるマクロファージの *Rev-erba* 遺伝子発現への影響. *P<0.05 (vs. control mice), #P<0.05 (vs. ZT10)

(2) *Rev-erba* 作動薬による *Ccl2* 遺伝子発現への影響

腹腔マクロファージ、及び RAW264 細胞を LPS で刺激した時の *Ccl2* 発現誘導は *Rev-erba* 作動薬の GSK4112、及び Hemin 処理により低下した (図 2)。CCL2 の下流の細胞内情報伝達系として、extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) と p38 mitogen-activated protein kinase (p38) 経路が知られている。そこで、LPS が誘導するマクロファージ細胞内の ERK と p38 のリン酸化レベルへの *Rev-erba* 作動薬の影響を腹腔マクロファージ、及び RAW264 細胞を用いて検討した。その結果、*Rev-erba* 作動薬の GSK4112、及び Hemin は LPS 刺激による ERK と p38 のリン酸化の亢進を抑制した (図 2)。

腹腔マクロファージ



RAW264細胞

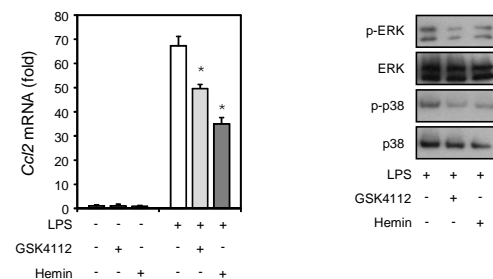


図2. *Rev-erba* 作動薬による *Ccl2* 遺伝子発現、LPS-stimulated cells without GSK4112 and Hemin)

(3) *Rev-erba* による *Ccl2* 遺伝子発現、及び *Ccl2* プロモーター活性への影響

Rev-erba 強発現細胞株では *Ccl2* 遺伝子の発現誘導、及び *Ccl2* タンパク質の分泌が低下した。*Ccl2* 遺伝子のプロモーター領域における推定上の RORE と *Rev-erba* が直接結合することが、ChIP assay により明らかとなった (図 3)。また、reporter assay により、*Rev-erba* が *Ccl2* 遺伝子のプロモーター活性を負に制御していることを明らかにした。

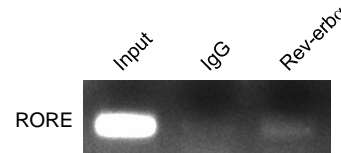


図3. *Rev-erba* による RORE への結合

(4) *Rev-erba* によるマクロファージ細胞内シグナル伝達系、及び炎症性機能への影響

細胞の炎症性機能として、接着能や遊走能が知られており、それぞれは CCL2 の下流のシグナルである ERK と p38 により制御されている。そこで、*Rev-erba* 強発現細胞株における ERK と p38 の活性や細胞の炎症性機能を検討した。*Rev-erba* 強発現細胞株では ERK と p38 のリン酸化が低下した。また、この低下はリコンビナント CCL2 タンパク質の添加により回復したことから、*Rev-erba* による CCL2 の発現抑制が寄与していることが示唆された。さらに、*Rev-erba* 強発現細胞株では接着分子の vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) 特異的に接着能が减弱した。VCAM-1 は細胞表面上のインテグリンβ1 と特異的に結合することが知られているため、次にインテグリンβ1 の発現を検討したところ、*Rev-erba* 強発現細胞株では細胞表面上のタンパク質レベルでの発現 (図 4) 及び遺伝子レベルでの発現が減少していた。*Rev-erba* 強発現細胞株では遊走能も减弱していた。以上の結果より、マクロファージに発現する時計遺伝子の *Rev-erba* は CCL2 の発現調節を介して、炎症性機能を修飾することが示唆された。

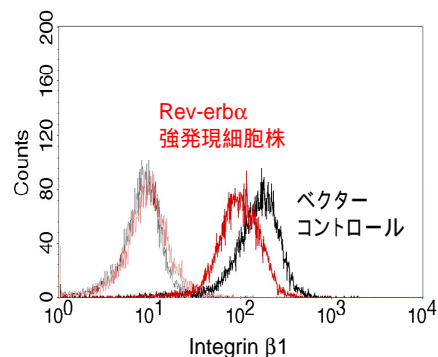


図4. *Rev-erba* によるマクロファージ細胞表面上インテグリンβ1 の発現への影響

(5) *Rev-erb* ノックアウトマウスの解析

腹腔マクロファージにおける *Ccl2* 遺伝子発現は野生型に比べ *Rev-erb* ノックアウトマウスで高く、LPS 刺激による *Ccl2* 遺伝子の発現誘導も亢進していた (図5)。同じ傾向がインテグリンβ1 の遺伝子発現でも見られた。以上の結果より、in vitro と同様に in vivo でも *Rev-erb* は *Ccl2* 発現を負に制御していることが示唆された。

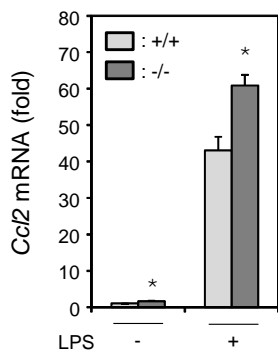


図5. *Rev-erb* ノックアウトマウスの腹腔マクロファージにおける *Ccl2* 遺伝子発現。
* $P < 0.05$ (vs. wild-type mice)

以上の研究成果により、マクロファージに発現する時計遺伝子の *Rev-erb* が炎症性ケモカインの1つである *Ccl2* の発現調節を介して、炎症性機能を修飾することを見出した (図6)。

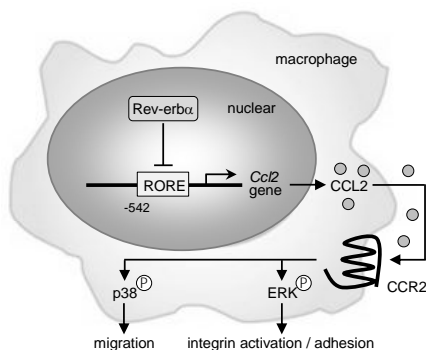


図6. *Rev-erb* による *Ccl2* 発現の調節、及びマクロファージ炎症性機能の調節機構

5. 主な発表論文など

[雑誌論文](計18件)

Ogasawara J, Ito T, Wakame K, Kitadate K, Sakurai T, Sato S, Ishibashi Y, Izawa T, Takahashi K, Ishida H, Takabatake I, Kizaki T & Ohno H : ETAS, an enzyme-treated asparagus extract, attenuates amyloid β -induced cellular disorder in PC12 cells. *Nat Prod Commun* 9 : 561-564, 2014. 査読有
doi:なし

Haga S, Sakurai T, Sato S, Sasahara M, Aita F, Esaki K, Toshinai K, Ueya E, Hashimoto N, Ogasawara J, Kizaki T,

Yoshinaga I, Sakurai T, Oh-ishi S, Ohno H & Takakuwa E : The effects of long-term exercise on cerebral function and the maintenance of concentration in the elderly. *J Exer Sports Orthop* 1: 6-11, 2014. 査読有

doi:なし

Sato S, Sakurai T, Ogasawara J, Takahashi M, Izawa T, Imaizumi K, Taniguchi N, Ohno H & Kizaki T : A circadian clock gene, *Rev-erb*, modulates the inflammatory function of macrophages through the negative regulation of *Ccl2* expression. *J Immunol* 192 : 407-417, 2014. 査読有
doi:10.4049/jimmunol.1301982

Sakurai T, Ito T, Wakame K, Kitadate K, Arai T, Ogasawara J, Kizaki T, Sato S, Ishibashi Y, Fujiwara T, Akagawa K, Ishida H & Ohno H : Enzyme-treated *Asparagus officinalis* extract shows neuroprotective effects and attenuates cognitive impairment in senescence-accelerated mice. *Nat Prod Commun* 9 : 101-106, 2014. 査読有
doi:なし

Yoshida M, Ishikawa M, Karita K, Kokaze A, Harada M, Take S & Ohno H : Association of blood pressure and body mass index with intraocular pressure in middle-aged and older Japanese residents: a cross-sectional and longitudinal study. *Acta Med Okayama* 68 : 27-34, 2014. 査読有
http://www.lib.okayama-u.ac.jp/www/acta/pdf/68_1_27.pdf

Sato S, Shirato K, Mitsuhashi R, Inoue D, Kizaki T, Ohno H, Tachiyashiki K & Imaizumi K : Intracellular

2-adrenergic receptor signaling specificity in mouse skeletal muscle in response to single-dose 2-agonist clenbuterol treatment and acute exercise. *J Physiol Sci* 63 : 211-218, 2013. 査読有

doi:10.1007/s12576-013-0253-z

Radak Z, Zhao Z, Koltai E, Ohno H & Atalay M : Oxygen consumption and usage during physical exercise: the balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. *Antioxid Redox Signal* 18 : 1208-1246, 2013. 査読有

doi:10.1089/ars.2011.4498

Radak Z, Koltai E, Taylor AW, Higuchi M, Kumagai S, Ohno H, Goto S & Boldogh I : Redox-regulating sirtuins in aging, caloric restriction, and exercise. *Free Radic Biol Med* 58 : 87-97, 2013. 査読有

doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.004

Sakurai T, Kitadate K, Nishioka H, Fujii H, Ogasawara J, Kizaki T, Sato S, Fujiwara T, Akagawa K, Izawa T & Ohno H : Oligomerised lychee fruit-derived polyphenol attenuates cognitive impairment in senescence-accelerated mice and endoplasmic reticulum stress in neuronal cells. *Br J Nutr* 110 : 1549-1558, 2013. 査読有

doi:10.1017/S000711451300086X

Takahashi K, Miyokawa-Gorin K, Handa K, Kitahara A, Moriya R, Onuma H, Sumitani Y, Tanaka T, Katsuta H, Nishida S, Yoshimoto K, Ohno H & Ishida H : Endogenous oxidative stress, but not ER stress, induces hypoxia-independent VEGF120 release through PI3K-dependent pathways in 3T3-L1 adipocytes. *Obesity* 21 : 1625-1634, 2013. 査読有

doi:10.1002/oby.20206

Sakurai T, Kashimura O, Kano Y, Ohno H, Ji LL, Izawa T & Best TM : Role of nitric oxide in muscle regeneration following eccentric muscle contractions in rat skeletal muscle. *J Physiol Sci* 63 : 263-270, 2013. 査読有

doi:10.1007/s12576-013-0262-y

Haga S, Kizaki T, Sato S, Takemasa T, Ezaki K, Ueya K, Aita F, Hashimoto N, Ogasawara J, Sakurai T, Hamaoka T, Katsumura T, Sakurai T & Ohno H : Skeletal muscle oxygenation during the nagewaza kakari exercise in Judo. *Sport Sci Res* 10 : 233-241, 2013. 査読有
<http://waseda-sport.jp/paper/1225/1225.pdf>

Sakurai T, Ogasawara J, Kizaki T, Sato S, Ishibashi Y, Takahashi M, Kobayashi O, Oh-Ishi S, Nagasawa J, Takahashi K, Ishida H, Izawa T & Ohno H : The Effects of Exercise Training on Obesity-Induced Dysregulated Expression of Adipokines in White Adipose Tissue. *Int J Endocrinol* 2013 : 801743, 2013. 査読有

doi:org/10.1155/2013/801743

Aita F, Haga S, Sato S, Sakurai T, Esaki K, Hamaoka T, Mizuno M, Toshinai K, Miyazaki H, Takamasa T, Hashimoto N, Ogasawara J, Katsumura T, Kizaki T & Ohno H : Effects of resistance exercise on intramuscular oxygenation and muscle fiber composition. *J Sports Med Doping Stud* 3 : 3-9, 2013. 査読有

doi:10.4172/2161-0673.1000133

Nagasawa J, Kizaki T & Ohno H : Exercise and oxidative stress in hypoxia. *J Phys Fitness Sports Med* 2 : 481-486, 2013.

査読有

doi:10.7600/jpfsm.2.481

Yoshida M, Take S, Ishikawa M, Kokaze A, Karita K, Harada M & Ohno H : Association of smoking with intraocular pressure in middle-aged and older Japanese residents. *Environ Health Prev Med* 19 : 100-107, 2013.

査読有

doi:10.1007/s12199-013-0359-1

Yoshida M, Take S, Ishikawa M, Karita K, Kokaze A, Harada M & Ohno H : Interrelationship among blood pressure, intraocular pressure, and life-style in middle-aged and older Japanese residents. *Health* 5 : 1527-1532, 2013.

査読有

doi:org/10.4236/health.2013.510207

大野秀樹、木崎節子、櫻井拓也、小笠原準悦、佐藤章悟、石橋義永、宮澤伸子、長澤純一、野口いづみ、貫田宗男、荻原理江、村上和子、石田 均、宮崎裕美、斎藤大蔵、小林 靖、鈴木健二、人見嘉哲、中野法彦、大河原知水、大石修司、桜井智野風、井澤鉄也、白土 健、今泉和彦、芳賀脩光 : 高所環境は肥満を改善する . *登山医学* 33 : 167-171, 2013 . 査読有

doi: なし

[学会発表](計11件)

小笠原準悦、櫻井拓也、石橋義永、木崎節子、白土 健、今泉和彦、井澤鉄也、大野秀樹 : 運動と脂肪細胞の働き . 第160回日本体力医学会関東地方会、調布、2014年3月8日 .

Kizaki T, Sato S & Ohno H : A circadian clock gene Rev-erb modulates inflammatory functions of macrophages through negative regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression. 第42回日本免疫学会学術総会、幕張、2013年12月11日 .

小笠原準悦、櫻井拓也、木本紀代子、木崎節子、高橋和人、住谷由計、石田 均、大野秀樹 : 運動は骨格筋前駆細胞から褐色脂肪細胞への分化を誘導するか : 肥満予防・治療への応用 . 第42回杏林医学会総会、三鷹、2013年11月16日 .

長澤純一、野口いづみ、笹尾真美、佐藤章悟、小笠原準悦、櫻井拓也、石橋義永、木崎節子、芳賀脩光、大野秀樹 : 登山時の低酸素ストレス応答. 第68回日本体力医学会大会、東京、2013年9月22日 .

佐藤章悟、木崎節子、櫻井拓也、小笠原準悦、石橋義永、長澤純一、桜井智野風、井澤鉄也、今泉和彦、芳賀脩光、大野秀樹 : 時計遺伝子 Rev-erb は MCP1 遺伝子の発現を抑制しマクロファージ免疫機能を制御する . 第68回日本体力医学会大会、

東京、2013年9月21日。
小笠原準悦、櫻井拓也、木崎節子、佐藤章悟、石橋義永、井澤鉄也、宮崎裕美、斎藤大蔵、十枝内厚次、大石修司、芳賀脩光、大野秀樹：水泳運動は前駆細胞からの褐色脂肪細胞化を促す。第68回日本体力医学会大会、東京、2013年9月21日。
加藤久詞、増田慎也、高倉久志、佐藤章悟、小笠原準悦、櫻井拓也、木崎節子、桜井智野風、大野秀樹、井澤鉄也：脂肪組織および骨格筋組織における時計遺伝子と脂質代謝関連遺伝子の関連性。第68回日本体力医学会大会、東京、2013年9月21日。

Nagasawa J, Noguchi I, Sasao M, Sato S, Sakurai T, Ogasawara J, Ishibashi Y, Kizaki T & Ohno H : Effect of frequent antioxidant supplementation on oxidative stress when climbing Mt Fuji. 21st International Congress on Nutrition and Integrative Medicine, Sapporo, Jul 28, 2013.

Ogasawara J, Ito T, Takanari J, Sakurai T, Kizaki T, Sato S, Ishibashi Y, Nagasawa J, Saito D, Nakano N, Izawa T & Ohno H : Inhibitory effect of ETAS against amyloid beta-induced cellular disorder in PC12 cells. 21st

International Congress on Nutrition and Integrative Medicine, Sapporo, Jul 27, 2013.

櫻井拓也、小笠原準悦、木崎節子、長澤純一、芳賀脩光、大野秀樹：運動は肥満による脂肪組織の線維化関連因子の発現増加を減弱させる。第21回日本運動生理学会大会、川越、2013年7月27日。

小笠原準悦、櫻井拓也、佐藤章悟、石橋義永、長澤純一、大石修司、芳賀脩光、井澤鉄也、木崎節子、大野秀樹：持久性走トレーニングによる白色脂肪細胞の脂肪分解反応の亢進にはATGLの発現変化が関与する。第158回日本体力医学会関東地方会、新座、2013年7月13日。

〔図書〕(計4件)

大野秀樹、木崎節子：身体の活性酸素消去を高める方法。In：活性酸素の本当の姿、鈴木敬一郎編、ナッパ、p.149-169、2014。

斎藤昌之、大野秀樹編：ここまでわかった燃える褐色脂肪組織の不思議、ナッパ、総158ページ、2013。

小笠原準悦、伊藤知洋、高成 準、櫻井拓也、木崎節子、佐藤章悟、石橋義永、長澤純一、斎藤大蔵、中野法彦、井澤鉄也、大野秀樹：酵素処理アスパラガス茎熱水抽出物はアミロイド により誘導される PC12 細胞の細胞障害を抑制する。In：第21回統合医療機能性食品国際会

議事録、AHCC研究会、51-56、2013。
長澤純一、野口いづみ、笹尾真美、佐藤章悟、櫻井拓也、小笠原準悦、石橋義永、木崎節子、大野秀樹：富士登山時の酸化ストレスに対する抗酸化剤頻回摂取の効果。In：第21回統合医療機能性食品国際会議事録、AHCC研究会、83-87、2013。

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 秀樹 (OHNO HIDEKI)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：00133819

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

木崎 節子 (KIZAKI TAKAKO)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：00322446

櫻井 拓也 (SAKURAI TAKUYA)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：20353477

小笠原準悦 (OGASAWARA JUNETSU)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：20415110