

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15234

研究課題名(和文) アミノ酸代謝リモデリングによる新たな炎症制御機構の解明

研究課題名(英文) Role of amino acid metabolism in the regulation of inflammation

研究代表者

菅波 孝祥 (Suganami, Takayoshi)

名古屋大学・環境医学研究所・教授

研究者番号：50343752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：メタボリックシンドロームの病態形成において、過栄養により誘導される慢性炎症の重要性が指摘されている。慢性炎症では、種々のストレスに対する実質細胞と間質細胞の複雑な細胞間コミュニケーションが持続し、最終的には間質の線維化を来して臓器機能不全に至る。一方、これらの起点となる「細胞内炎症」の慢性化機構は未だ不明な点が多い。本研究では、非必須アミノ酸のセリンに着目し、アミノ酸代謝リモデリングによるマクロファージの新たな機能制御メカニズムを検討した。即ち、一部のマクロファージはセリンを細胞外に依存しており、その欠乏により炎症性サイトカイン産生が顕著に増加することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Accumulating evidence has suggested that overnutrition-induced chronic inflammation plays an important role in the pathophysiology of the metabolic syndrome. As a molecular basis of chronic inflammation in the metabolic syndrome, sustained complex interaction between parenchymal and stromal cells results in tissue fibrosis, thereby leading to organ dysfunction. However, little is known about the molecular mechanism underlying metabolic stress-induced chronic inflammatory changes in macrophages. In this study, we tried to elucidate the role of serine metabolism in the regulation of macrophage function. Our data showed that serine metabolism is a novel mechanism of inflammatory cytokine production in macrophages.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：アミノ酸 マクロファージ 炎症

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームの病態形成において、過栄養により誘導される慢性炎症の重要性が指摘されている。慢性炎症では、種々のストレスに対する実質細胞と間質細胞の複雑な細胞間コミュニケーションが持続し、最終的には間質の線維化を来して臓器機能不全に至る。研究代表者はこれまでに、脂肪細胞とマクロファージの細胞間相互作用による脂肪組織炎症の分子機構 (*Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25: 2062-2068, 2005) や脂肪組織を起点とする臓器間ネットワークの破綻の分子機構を明らかにしてきた (*Nat. Commun.* 5: 4982, 2014)。

一方、これらの起点となる「細胞内炎症」の慢性化機構は未だ不明な点が多い。例えば、マクロファージにおいて、Toll-like receptor 4 (TLR4) 経路に代表される炎症シグナル伝達系には様々なフィードバック機構が備わっており、複雑かつ巧妙な調節機構が存在する。研究代表者は、脂肪細胞に由来する飽和脂肪酸が TLR4 を介して炎症を惹起し (*Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27: 84-91, 2007) 同時に誘導される転写因子 activating transcription factor 4 (ATF4) と ATF3 が TLR4 シグナルをそれぞれ正と負に制御する細胞内炎症の制御機構を報告した (*Diabetes* 63: 152-161, 2014; *Circ. Res.* 105: 25-32, 2009) 。さらに、細胞内セリンが欠乏した状態において TLR4 シグナルが活性化することを見出し、アミノ酸代謝による炎症制御機構を考えるに至った。実際、細胞内セリン濃度は、細胞内のセリン生合成経路と細胞外からのセリン流入により規定され、リポポリサッカライド (LPS) 刺激によりマクロファージ細胞内セリン濃度は上昇する。ATF4 は、遊離脂肪酸などの栄養環境や小胞体ストレスに代表される代謝ストレスにより活性化する栄養・代謝センサーであり、セリン生合成を誘導する。最近、セリン生合成経路が乳癌やメラノーマにおいて活性化し、癌細胞の増殖促進や悪性化に働くことが注目を集めているが (*Science* 342:1242454, 2013) 、炎症反応の制御については全く検証されていない。

2. 研究の目的

本研究では、非必須アミノ酸のセリンに着目し、アミノ酸代謝リモデリングによるマクロファージの機能制御とも言うべき新たな分子機序の解明を目指す。本研究により、細胞間、臓器間相互作用により形成されるメタボリックシンドロームにおいて、細胞内炎症の意義を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

(1) 培養マクロファージ:

常法に従って、種々の初代培養マクロファージ、マクロファージ細胞株を培養した。骨髄由来マクロファージ M0 は、interferon- γ お

よび interleukin-4 を用いて、それぞれ M1, M2 マクロファージに分化させた。

(2) Real-time PCR:

種々の培養マクロファージをリポポリサッカライド (LPS) で刺激し、6 時間および 24 時間後にサンプリングした。total RNA を抽出、real-time PCR 法 (StepOnePlus, Thermo Fisher Scientific 社) により mRNA レベルを測定した。

(3) マイクロアレイ解析:

Real-time PCR と同様に、LPS 刺激後 6 時間および 24 時間においてサンプリングし、マイクロアレイ解析を行った。

(4) メタボローム解析:

Real-time PCR やマイクロアレイ解析と同様に、LPS 刺激後 6 時間および 24 時間においてサンプリングし、メタボローム解析を行った。メタボローム解析は、ヒューマンメタボロームテクノロジー社に受託して行った。

4. 研究成果

(1) 種々のマクロファージにおける細胞外セリン依存性の検討:

腹腔内マクロファージ、骨髄由来マクロファージ (M0, M1, M2) 、マクロファージ細胞株 (RAW264, J774) など種々のマクロファージをセリン・グリシン欠乏 (SG) 培地で培養したところ、マクロファージの種類により細胞外セリン・グリシンの依存性が大きく異なることが明らかになった。即ち、腹腔内マクロファージや骨髄由来マクロファージ (M0, M2) 、J774 などでは、SG 培地により細胞内セリン・グリシン濃度は著しく低下し、内因性セリン合成酵素 (Phgdh など) や細胞膜上に存在するアミノ酸トランスポーター (Asct1 など) の遺伝子発現上昇が認められた。これに対して、骨髄マクロファージ (M1) や RAW264 では SG による影響は認められず、細胞種による細胞外セリン依存性の違いが明らかになった。

(2) セリン・グリシンの欠乏によるマクロファージの機能変化:

SG 培地で培養することにより、腹腔内マクロファージや骨髄由来マクロファージ (M0, M2) に生じる機能変化を検討した。その結果、LPS に対する炎症性サイトカインの遺伝子発現が SG 培地において顕著に亢進することが明らかになった。一方、LPS で刺激を行わない場合は、SG の効果を認めず、セリン・グリシンの欠乏により TLR4 シグナルが増強すると考えられた。また、SG 培地では、Arginase 1, IRF4, Ym1 などの M2 マクロファージマーカーの発現が有意に抑制された。これに対して、CD11c, iNOS などの M1 マクロファージマーカーはほとんど影響を受けなかった。

(3) セリン・グリシンの欠乏によるマクロファージの細胞内代謝変化：

SG 培地で骨髄由来マクロファージ (M0) を培養し、メタボローム解析を行った。その結果、解糖系におけるホスホエノールピルビン酸からピルビン酸への代謝が障害されていることが明らかになった。既に、セリンがホスホエノールピルビン酸からピルビン酸への代謝酵素 PKM2 の活性化に必要であることが知られている。そこで、ピルビン酸の添加や PKM2 活性化剤により、SG 培地の炎症性サイトカイン産生増強効果が消失することを確認した。

(4) アミノ酸トランスポーターの阻害によるマクロファージの機能制御：

SG 培地で骨髄由来マクロファージ (M0) を培養すると、Asct1 など一部のアミノ酸トランスポーターの発現が上昇する。Asct1 はセリン・グリシンの細胞内取り込みに働くため、Asct1 ノックダウンを実施した。すると、通常培地においても、アミノ酸トランスポーターをノックダウンすることにより、SG 培地と同様の効果が認められた。即ち、骨髄由来マクロファージ (M0) では、内因性セリン合成系の誘導は、LPS 刺激によるセリン・グリシンの需要増加に十分に対応できず、細胞外セリン・グリシンの取り込みにより対応していると考えられる。

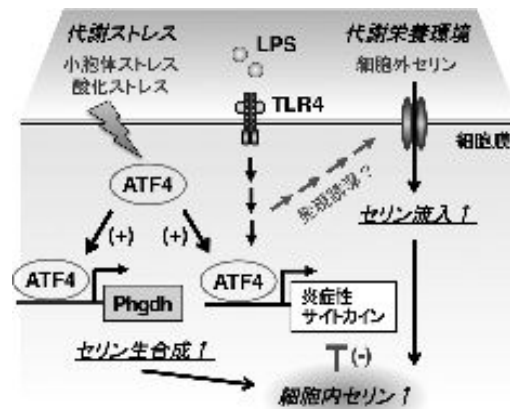
(5) SG が M2 マクロファージマーカーに及ぼす影響：

次に、ピルビン酸の添加やアミノ酸トランスポーターの阻害が M2 マクロファージマーカーに及ぼす影響を検討したが、炎症性サイトカインとは異なり、ほとんど影響を及ぼさなかった。従って、M2 マクロファージマーカーは、炎症性サイトカインとは異なる機序で制御されていることが示唆された。

(5) 考察

従来、マクロファージは一様と考えられていたが、近年、マクロファージの多様性が注目されている。当初は、炎症促進性 M1 と炎症抑制性 M2 に大別されていたが、最近では、各臓器に特異的な組織マクロファージが存在し、特に M2 は多くのサブタイプに分類される可能性がある。さらに、線維化の発症に必須の役割を果たす線維化マクロファージなど、疾患特異的なマクロファージサブタイプも提唱されている。本研究では、セリン・グリシンに対する要求性の観点で、マクロファージが大きく 2 分できることが明らかになった。細胞外のセリン・グリシンに依存するマクロファージは、主に炎症抑制性 M2 マクロファージの形質を有しており、今後、生体内における意義を明らかにする必要がある。

これまで、必須アミノ酸の研究が先行し、



非必須アミノ酸のセリン・グリシンに大きな注目は払われてこなかった。しかしながら、害細胞において Phgdh の過剰発現が認められ、細胞内代謝変化に基づく新たな創薬標的としての意義が注目されている。本研究では、細胞内セリン・グリシン代謝の変容が炎症を制御する可能性が明らかになった (図)。ピルビン酸の変化がどのようにして TLR4 シグナルを制御するのか、今後詳細な分子メカニズムが明らかになることにより、全く新しい抗炎症剤の開発に繋がることが期待される。

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 8 件)

1. T. Goto, M. Itoh, *T. Suganami, S. Kanai, I. Shirakawa, T. Sakai, M. Asakawa, T. Yoneyama, T. Kai, *Y. Ogawa. Obeticholic acid protects against hepatocyte death and liver fibrosis in a murine model of nonalcoholic steatohepatitis. **Sci. Rep.** 2018, *in press.* (査読有)
2. N. Chiyonobu, S. Shimada, Y. Akiyama, K. Mogushi, M. Itoh, K. Akahoshi, S. Matsumura, K. Ogawa, H. Ono, Y. Mitsunori, D. Ban, A. Kudo, S. Arii, T. Suganami, S. Yamaoka, Y. Ogawa, M. Tanabe, S. Tanaka. FABP4 overexpressed in intratumoral hepatic stellate cells within hepatocellular carcinoma with metabolic risk factors. **Am. J. Pathol.** 188: 1213-1224, 2018. (査読有)
3. K. Shiba, K. Tsuchiya, C. Komiya, Y. Miyachi, K. Mori, N. Shimazu, S. Yamaguchi, N. Ogasawara, M. Katoh, M. Itoh, T. Suganami, Y. Ogawa. Canagliflozin, an SGLT2 inhibitor, attenuates the development of hepatocellular carcinoma in a mouse model of human NASH. **Sci. Rep.** 8: 2362, 2018. (査読有)
4. M. Tanaka, M. Itoh, Y. Ogawa, *T. Suganami. Molecular mechanism of obesity-induced “metabolic” tissue remodeling. **J. Diabetes Investig.** 9: 256-261, 2018. (review) (査読有)

5. M. Itoh, *T. Suganami, H. Kato, S. Kanai, I. Shirakawa, T. Sakai, T. Goto, M. Asakawa, I. Hidaka, H. Sakugawa, K. Ohnishi, Y. Komohara, K. Asano, I. Sakaida, M. Tanaka, *Y. Ogawa. CD11c-positive resident macrophages drive hepatocyte death-triggered liver fibrosis in a murine model of non-alcoholic steatohepatitis. **JCI Insight** 2: e92902, 2017. (査読有)
6. C. Komiya, M. Tanaka, K. Tsuchiya, N. Shimazu, K. Mori, S. Furuke, Y. Miyachi, K. Shiba, S. Yamaguchi, K. Ikeda, K. Ochi, K. Nakabayashi, K. Hata, M. Itoh, T. Suganami, Y. Ogawa. Antifibrotic effect of pirfenidone in a mouse model of human nonalcoholic steatohepatitis. **Sci. Rep.** 7: 44754, 2017. (査読有)
7. R. Hachiya, T. Shiihashi, I. Shirakawa, Y. Iwasaki, Y. Matsumura, Y. Oishi, Y. Nakayama, Y. Miyamoto, I. Manabe, K. Ochi, M. Tanaka, N. Goda, J. Sakai, *T. Suganami, *Y. Ogawa. The H3K9 methyltransferase Setdb1 regulates TLR4-mediated inflammatory responses in macrophages. **Sci. Rep.** 6: 28845, 2016. (査読有)
8. RT. Jennings, E. Odkhuu, A. Nakashima, N. Morita, T. Kobayashi, I. Yamai, M. Tanaka, T. Suganami, S. Haga, M. Ozaki, Y. Watanabe, Y. Nagai, K. Takatsu, T. Kikuchi-Ueda, I. Ichimonji, Y. Ogawa, H. Takagi, T. Yamazaki, K. Miyake, S. Akashi-Takamura. Inflammatory responses increase secretion of MD-1 protein. **Int. Immunol.** 28: 503-512, 2016. (査読有)

〔学会発表〕(計6件)

1. Takayoshi Suganami, Michiko Itoh, Yoshihiro Ogawa ・ CD11c+ resident macrophages drive hepatocyte death-triggered liver fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis ・ 2018 Keystone Symposia 2018.3.24-28 Dublin, Ireland
2. Takayoshi Suganami, Miyako Tanaka, Michiko Itoh, Yoshihiro Ogawa ・ Obesity-induced “metabolic” tissue remodeling in adipose tissue and liver ・ 16th Surugadai International Symposium, 2017.10.11, Tokyo
3. 菅波孝祥、田中 都、伊藤美智子、小川佳宏・脂肪組織-肝臓連関の破綻と非アルコール性脂肪肝炎の新たな病態メカニズム・第38回日本肥満学会、2017.10.7-8、大阪
4. 菅波孝祥、田中 都、伊藤美智子、小川佳宏・脂肪組織-肝臓連関の破綻による異所性脂肪蓄積の新たな分子機構・第20回日本心血管内分泌学会学術総会、2016.12.16-17、東京
5. Takayoshi Suganami, Miyako Tanaka,

Michiko Itoh, Yoshihiro Ogawa ・ Role of obesity-induced tissue remodeling in the metabolic syndrome・第38回日本血栓止血学会学術集会、2016.6.16-18、奈良

6. Takayoshi Suganami, Miyako Tanaka, Michiko Itoh, Yoshihiro Ogawa ・ Obesity-induced adipose tissue inflammation and ectopic lipid accumulation ・ The 10th Congress of the Asian-Pacific Society of Atherosclerosis and Vascular Diseases. 2016.7.14-16 Tokyo, Japan
7. 菅波孝祥、田中 都、伊藤美智子、小川佳宏・脂肪組織の慢性炎症・第59回日本糖尿病学会年次学術集会、2016.5.19-21、京都

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.riem.nagoya-u.ac.jp/4/mmm/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

菅波 孝祥 (SUGANAMI, Takayoshi)
名古屋大学・環境医学研究所・教授
研究者番号：50343752

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

青江 誠一郎 (AOE, Seiichiro)
大妻女子大学・家政学部・教授
研究者番号：90365049

