

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09339

研究課題名(和文) 自然免疫細胞の代謝リプログラミング解析を主軸とした周術期炎症応答の分子機序の探求

研究課題名(英文) Mechanisms and implications of metabolic reprogramming of immune cells in the perioperative inflammatory response

研究代表者

松尾 禎之 (MATSUO, Yoshiyuki)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：50447926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：自然免疫細胞の活性化に伴う代謝変容の分子機構を明らかにするため、マクロファージを用いて遺伝子発現プロファイルの変化および代謝フラックスの観点から解析を行った。感染刺激に応じて、炎症応答を司る一連の遺伝子群の活性化に加え、炎症性マクロファージの分化マーカーの誘導、増殖・生存制御に関わる分子の発現変化が観察された。さらに活性化したマクロファージにおいてはミトコンドリア呼吸が抑制され、ほぼ解糖系に依存したエネルギー代謝にシフトしていた。代謝転換後もミトコンドリア呼吸鎖複合体の機能は正常に保たれており、細胞内レドックス環境の変容がミトコンドリア呼吸抑制と解糖系の活性化に関わることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症応答において免疫細胞のエネルギー代謝様式の転換(リプログラミング)が起こることが報告され、炎症の制御メカニズムとして細胞内代謝調節の重要性に注目が集まっている。炎症の発生・進展・収束と連動した代謝変換をコントロールする機構の詳細を明らかにすることは、複雑な炎症シグナルの総合的理解、さらには代謝制御を標的とした治療・診断法の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the molecular mechanisms of metabolic reprogramming associated with innate immune cell activation, we examined the gene expression profiles and metabolic properties of macrophages in response to inflammatory stimuli. With the induction of inflammatory markers related to macrophage differentiation, cellular oxygen consumption was suppressed in activated macrophages, indicating the metabolic shift from the oxidative phosphorylation to the glycolytic pathway. The activities of mitochondrial respiratory complexes were left intact after induction of metabolic reprogramming associated with inflammation, and the results suggest the involvement of alterations of cellular redox homeostasis.

研究分野：ストレス応答

キーワード：炎症 代謝 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

大規模な外科手術や集中治療の現場において、外傷性あるいは病原体感染による過剰な炎症応答は術後合併症を伴う予後不良、さらには多臓器不全やショックによる生命危機をもたらす。従って周術期を含む critical care の現場では、治療の成否を決定する要因として急性炎症、すなわち好中球や単球・マクロファージによって担われる自然免疫応答を適切にコントロールすることが極めて重要である。近年の研究技術の進展により、感染の感知から炎症の収束に至る各ステップにおいて、免疫担当細胞ごとに特徴的なエネルギー代謝様式の転換(解糖経路と酸化的リン酸化の切替え=代謝リプログラミング)が起こることが報告され、炎症の制御メカニズムとして代謝調節の重要性に注目が集まっている。

申請者らは酸素代謝および酸化ストレス応答の観点から炎症の病態生理の解明に取り組み、炎症時の解糖系を主体とする代謝経路への変換において低酸素誘導性因子(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)の果たす役割や、チオレドキシシン等の酸化還元(レドックス)調節分子による抗炎症作用について報告してきた。炎症制御におけるレドックス関連分子の重要性は明らかであり、周術期における炎症応答と代謝経路をつなぐ因子として重要な知見をもたらす可能性が示唆される。

2. 研究の目的

本研究では炎症応答において代謝の変容(病的変化=代謝不全、生理的応答=代謝リプログラミング)をもたらす細胞内の仕組みは何かという「問い」を設定し、炎症の発生・進展・収束と連動した代謝変動をコントロールする細胞内制御機構の詳細を明らかにすることで、複雑な炎症シグナルの総合的理解に繋がる新たな知見の提示を目指す。

近年の研究により代謝経路はエネルギー供給のみならず炎症応答と深く結びついていることが判明しており、薬剤や病的状況をもたらす細胞内代謝経路の攪乱が生体防御反応に障害を与え病態増悪の要因となり得ることは容易に想像できる。代謝ホメオスタシスの破綻は様々な病態に深く関与することから、疾患の発症・増悪のメカニズム解明や代謝制御を標的とした治療薬や診断法の開発に新たな道を拓く先駆的研究となることが期待される。このような背景に基づき、自然免疫担当細胞を解析モデルとして炎症応答と代謝経路をつなぐ分子基盤を解析する研究の着想に至った。炎症応答における代謝転換とレドックス反応に基づく生体防御の関連が明らかになれば、炎症の消長に関わる新たな制御機構として複雑な炎症の病態生理の理解に果たす役割は大きい。

3. 研究の方法

(1) 炎症誘導性代謝リプログラミングの実験モデル構築

炎症発生時に自然免疫細胞において観察される解糖系と酸化的リン酸化の切替を解析するための細胞モデルを構築する。マクロファージ細胞株を用いて感染を模したりポ多糖(LPS)とインターフェロン γ (IFN- γ)刺激に対する応答を検証する。

(2) 細胞内代謝解析

細胞外フラックス解析の手法により解糖系と酸化的リン酸化の2つのエネルギー代謝経路について活性評価を行う。本手法は「乳酸の産生に起因する培養液のpH変化=解糖活性」と「酸素消費量=ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化の指標」を同時に測定することで、細胞のエネルギー代謝プロファイルを簡便に解析することが可能である。また各代謝指標をリアルタイムでモニタリングできるという特性を生かし、遺伝子発現変化等と連動した、より詳細な代謝転換の時間的制御機構を明らかにする。さらに特異的な基質と阻害剤を反応系に加えることにより、酸素消費量を指標としてミトコンドリア呼吸鎖を構成する複合体のそれぞれの活性を個別に評価する。ミトコンドリアマスの定量には特異的蛍光色素を用いる。

(3) 網羅的遺伝子発現解析

活性化マクロファージおよび対照サンプルよりRNAを調製し、代謝転換に伴う遺伝子発現プロファイルの変化をRNA-Seq解析により明らかにする。特に代謝制御に関する遺伝子に着目し、パスウェイ解析や遺伝子オンロジー解析により代謝転換の背景に存在するシグナル経路を同定する。代謝リプログラミングへの関与が予想される候補遺伝子についてreal-time PCRによる確認と絞り込みを行い、上記細胞モデルを用いて代謝制御における機能を検証する。

4. 研究成果

マウスマクロファージ様細胞株RAW264.7をLPS/IFN- γ の投与により活性化し、細胞外フラックスアナライザーを用いてミトコンドリア呼吸の指標である酸素消費速度、および解糖活性の指標である細胞外酸性化速度を測定した。無刺激の対照細胞と比較して、LPS/IFN- γ 投与により数時間以内にミトコンドリア呼吸の抑制(酸素消費量の低下)と解糖活性の上昇が誘導されることが明らかとなった。活性化後はほぼ解糖系に依存したエネルギー代謝にシフトしていたが、細胞内ATPレベルの大きな変動は認められなかった。

リアルタイムフラックス解析により代謝モードの経時的変化を測定すると、炎症刺激直後に解糖活性の上昇が起こり、その後数時間にわたって維持された。刺激後約3時間が経過した時点から酸素消費量が徐々に低下する現象が確認され、それに伴い解糖系の再活性化が誘導された。

RNA-Seq解析にて炎症応答およびエネルギー代謝様式のシフトに伴う遺伝子プロファイルの変動に関するデータセットを得た。炎症経路の活性化に加え、炎症性マクロファージの分化マーカーの誘導、増殖・生存制御に関わる細胞内経路の変容が観察された。初期応答として炎症性サイトカイン等のマーカー遺伝子の発現上昇や低酸素誘導性因子 HIF-1 の活性化が起こり、その後ミトコンドリア呼吸がほぼ完全に抑制された代謝モードへ移行することが明らかとなった。

代謝転換の誘導には短時間(約30分)のLPS/IFN- γ 処理で十分であり、LPS/IFN- γ 除去後も24時間に渡って代謝リプログラミング状態が維持された。解糖系阻害剤の共存下にてLPS/IFN- γ 刺激を行った細胞では、マクロファージ活性化に伴う酸素消費量の低下が認められず、代謝転換における解糖系の重要性が示唆された。またある種の酸化ストレス誘導剤によっても同様の効果が認められた。

炎症刺激による酸化的リン酸化抑制において標的となる経路を明らかにするため、酸素消費速度を指標としてミトコンドリア呼吸鎖複合体の活性を個別に測定した。各複合体に特異的な阻害剤や電子供与物質を組み合わせることで酸素消費速度への影響を検討したところ、炎症刺激により活性化され酸素消費量の低下したマクロファージにおいても呼吸鎖複合体 II、III、IV の機能は正常に保たれていた。このことからエネルギー基質の供給に関わる経路の遮断により炎症物質除去後も長時間にわたり代謝リプログラミングが維持されると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Matsuo Yoshiyuki	4. 巻 36
2. 論文標題 Introducing Thioredoxin-Related Transmembrane Proteins: Emerging Roles of Human TMX and Clinical Implications	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antioxidants & Redox Signaling	6. 最初と最後の頁 984-1000
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/ars.2021.0187	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 Taniguchi Hisanori, Matsuo Yoshiyuki, Shimo Koyo, Yoshimura Masahiro, Hirota Kiichi, Kinoshita Hidefumi	4. 巻 15
2. 論文標題 Establishment of a novel assessment of the quality of human spermatozoa measuring mitochondrial oxygen metabolism	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Research Notes	6. 最初と最後の頁 123
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13104-022-06012-4	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 Tanimoto Keiji, Hirota Kiichi, Fukazawa Takahiro, Matsuo Yoshiyuki, Nomura Toshihito, Tanuza Nazmul, Hirohashi Nobuyuki, Bono Hidemasa, Sakaguchi Takemasa	4. 巻 11
2. 論文標題 Inhibiting SARS-CoV-2 infection in vitro by suppressing its receptor, angiotensin-converting enzyme 2, via aryl-hydrocarbon receptor signal	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16629
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-96109-w	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 Sakai Takayuki, Matsuo Yoshiyuki, Okuda Kensuke, Hirota Kiichi, Tsuji Mieko, Hirayama Tasuku, Nagasawa Hideko	4. 巻 11
2. 論文標題 Development of antitumor biguanides targeting energy metabolism and stress responses in the tumor microenvironment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4852
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-83708-w	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 Kida Naoko, Matsuo Yoshiyuki, Hashimoto Yoshiko, Nishi Kenichiro, Tsuzuki-Nakao Tomoko, Bono Hidemasa, Maruyama Tetsuo, Hirota Kiichi, Okada Hidetaka	4. 巻 10
2. 論文標題 Cigarette Smoke Extract Activates Hypoxia-Inducible Factors in a Reactive Oxygen Species-Dependent Manner in Stroma Cells from Human Endometrium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 48～48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox10010048	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 Kakita-Kobayashi Maiko, Murata Hiromi, Nishigaki Akemi, Hashimoto Yoshiko, Komiya Shinnosuke, Tsubokura Hiroaki, Kido Takeharu, Kida Naoko, Tsuzuki-Nakao Tomoko, Matsuo Yoshiyuki, Bono Hidemasa, Hirota Kiichi, Okada Hidetaka	4. 巻 161
2. 論文標題 Thyroid Hormone Facilitates in vitro Decidualization of Human Endometrial Stromal Cells via Thyroid Hormone Receptors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 bqaa049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/endocr/bqaa049	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 -

〔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 松尾 禎之 広田 喜一
2. 発表標題 マクロファージ活性化における代謝リプログラミングの分子機序
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019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	広田 喜一 (HIROTA Kiichi) (00283606)	関西医科大学・医学部・教授 (34417)	

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