

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670393

研究課題名(和文)心疾患における細胞時計・炎症制御プログラムの連携機序解明

研究課題名(英文) Crosstalk in circadian clock and inflammatory program

研究代表者

眞鍋 一郎 (Manabe, Ichiro)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70359628

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)：慢性炎症は生活習慣病に共通した基盤病態である。生活習慣病の慢性炎症では、炎症がうまく収束できずに遷延し、長期に低レベルで炎症が継続することにより、最終的には組織機能を障害してしまうことが問題となる。この慢性炎症の中で、マクロファージは非常に多彩な機能を持つ。例えば初期には炎症を進め、組織障害を引き起こすが、炎症の慢性期には線維化を進めたり、炎症を抑制するように働く。本研究では長期的な時間の中でのマクロファージの機能変化が、マクロファージに内在するプログラムによって制御されていると考え、検討した。その結果、細胞時計と、炎症を制御する転写因子との間に相互作用があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Chronic inflammation is the common pathological basis of noncommunicable diseases, such as cardiovascular and metabolic disease. In chronic inflammation seen in noncommunicable disease, inflammatory processes are not properly resolved, so that low level inflammatory processes continue, resulting in irreversible remodeling of tissues and tissue dysfunction. In the chronic inflammatory processes macrophages function as a key effector cell and exhibit divergent functions and phenotypes. In this project we hypothesized that an endogenous program controls the time-dependent change in macrophage function and that the cellular core clock is linked with that program. Our data suggest the core clock and the inflammatory program interact with each other in macrophages.

研究分野：循環器内科額

キーワード：マクロファージ 慢性炎症 細胞時計

1. 研究開始当初の背景

慢性炎症は生活習慣病に共通した基盤病態である。我々は、心肥大・心不全(*J Clin Invest* 2010)、動脈硬化(*Circulation* 2010、*Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2013)、メタボリックシンドローム(*Diabetes* 2007、*J Clinical Invest* 2008、*Nat Med* 2009、*Cell Metab* 2013)、慢性腎臓病(*J Clin Invest* 2011)、2型糖尿病(*Cell Metab* 2012)において、慢性炎症プロセスによる病態形成機構を明らかにしてきた。これらを通して、マクロファージが極めて多機能なエフェクター細胞として、時間・空間的にその機能をダイナミックに変化させ、病態形成に中心的な役割を果たすことを見いだした。例えば、腎臓において病態初期に集積する M1 型マクロファージは、炎症や組織破壊を推進する。一方で、時間的に遅れて集積する M2 型マクロファージは、線維化を進めるとともに、炎症を収束させるよ

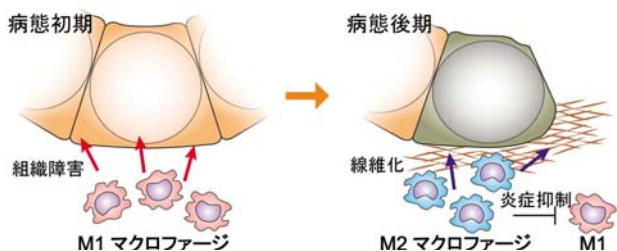


図1 腎障害・線維化におけるマクロファージダイナミクス

うに働く(図1)。また、各組織には恒常的にマクロファージが存在するが、これら組織マクロファージは、炎症時に骨髄から誘導されるマクロファージとは全く異なる機能を示す。我々は、組織に常在するマクロファージが、心臓等の恒常性維持に必須であることを見いだしている。

マクロファージの急性期応答については、詳細な分子機序が明らかにされているが、より長い時間相で生じる変化の制御機構はよく分かっていない。我々は、LPS 刺激 24-48 時間後には、マクロファージが炎症収束の性質を示すことを見いだした。

このような長期的な時間の中での遺伝子発現制御には、細胞時計のメカニズムが関与している可能性が高い。実際、マクロファージでも時計遺伝子の発現が律動することが知られている。

2. 研究の目的

本研究では、長期間の時間相の中でマクロファージの機能を自律的に変えていく内在性のプログラムが、組織における炎症プロセスの制御に重要と考え、その機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

マクロファージに自律的で、長時間相でその機能を制御するプログラムが、細胞時計と

炎症プログラムの連携によって成り立っているという仮説を検証するため、マクロファージにおける細胞時計の役割と、炎症プログラムとのリンクを検証する。

4. 研究成果

各種細胞に細胞時計が備わり、律動することが知られているが、マクロファージにおける細胞時計についてはほとんど調べられていない。そこで、まず、チオグリコレート誘導腹腔マクロファージを無血清培地で培養した後に血清刺激を行った。時計遺伝子群の発現を検討したところ、図2に示すように律動的な発現が誘導された。

NF- κ B はマクロファージにおいて炎症関連遺伝子群の発現を制御するマスター転写因子の一つである。細胞時計と炎症プログラムとの関連を検証するために、NF- κ B と Bmal1 の結合領域を ChIP-seq 法で検討した。マクロファージの細胞系譜を決める PU.1 についても同様に ChIP-seq によって解析した。その結果、多くの Bmal1 結合領域には PU.1 と NF- κ B の結合が認められることが明らかとなった(図3)。つまり、多くの転写調節領域で時計遺伝子である Bmal1 と炎症プログラムを制御する NF- κ B が近傍に結合し、相互作用している可能性を強く示唆する。

次に Bmal1 と炎症プログラムの関連をさらに検証するために NF- κ B 欠損マクロファージでの解析を行ったところ、時計遺伝子群の発現に有意な変化が認められた。

以上の結果から、マクロファージの中で細胞時計のプログラムと炎症を制御するプログラムは相互にリンクしている可能性が高い。このようなリンクがマクロファージの長時間相での機能制御をいかにしているかを明らかにし、心血管疾患等の慢性炎症におけるその役割を検証することが次の課題となる。

生活習慣病に共通して認められる慢性炎症では、炎症が収束されず慢性化し、組織リモデリングや線維化による組織機能の障害

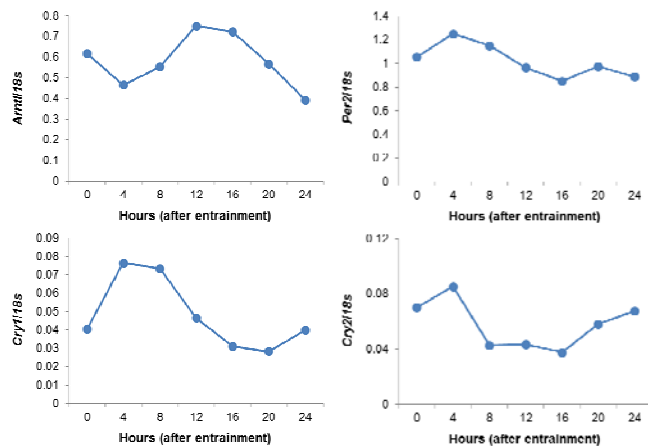


図2 腹腔マクロファージにおける血清刺激後の時計遺伝子の発現変化

をもたらすことが問題である。マクロファージはこのプロセスの中で、その役割を時間的に大きく変動させる(図1)。慢性期にはマクロファージは線維化の促進や、炎症の抑制に働く。マクロファージは多様な微小環境因子の影響によりその機能をダイナミックに変化させることが分かっている。一方で、本研究の結果は、マクロファージ自体の自律的なプログラムもまた、時間を刻みながらマクロファージの機能を制御している可能性を示唆する。今後の研究では、このような自律的なプログラムの意義を明らかにするとともに、細胞時計を中心とした制御機序の解明が求められる。将来的には、自律プログラムを標的として、マクロファージの機能を制御し、炎症の慢性化を抑制したり、傷害後の治癒を促進する治療戦略の開発に発展する可能性がある。

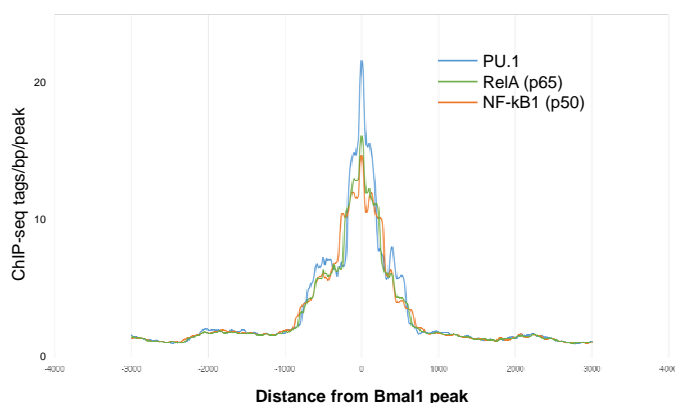


図3 Bmal1、PU.1、NF- κ B 転写因子の結合領域の位置関係

Bmal1 の結合ピークを中心としたときその一からの距離を X 軸に各転写因子の結合を示すシーケンスリード数の分布を示す。

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 2 件)

- ① Eguchi K, Manabe I. Toll-Like Receptor, Lipotoxicity and Chronic inflammation: The Pathological Link Between Obesity and Cardiometabolic Disease. *J Atheroscler Thromb* 21:629-639, 2014.
- ② Wang JH, Eguchi K, Matsumoto S, Fujiu K, Komuro I, Nagai R, Manabe I. The ω -3 Polyunsaturated Fatty Acid, Eicosapentaenoic Acid, Attenuates Abdominal Aortic Aneurysm Development via Suppression of Tissue Remodeling. *PLoS One* 9:e96286, 2014.

[学会発表] (計 7 件)

- ① 真鍋一郎 マクロファージによる恒常性の

維持と生活習慣病発症機序. マクロファージの多彩な機能と疾患. 千里ライフサイエンスセミナー大阪 2014年5月28日.

- ② 真鍋一郎 集合管/間質クロストーク: 慢性腎臓病センサーとしての集合管. シンポジウム3: 話し合う腎臓: ネフロンセグメント間あるいは周辺の細胞とのクロストーク 第55回日本腎臓学会学術総会. 横浜 2014年6月3日
- ③ 真鍋一郎 生活習慣病における免疫・代謝システム連携とその破綻. シンポジウム9: 生体の恒常性維持と破綻 炎症と多臓器連関 第35回日本炎症・再生医学会年次集会. 名護 2014年7月4日
- ④ 真鍋一郎 心不全における免疫代謝連携機構. シンポジウム12 心不全の分子メカニズム. 第18回日本心不全学会学術集会. 大阪 2014年10月11日
- ⑤ 真鍋一郎 代謝異常と自然炎症. シンポジウム 2S02p 自然炎症と代謝のクロストーク 第87回日本生化学会大会. 京都 2014年10月16日
- ⑥ Manabe I. Immunometabolic regulation of cardiometabolic disease. Symposium 8 Immunosenescence and immunometabolism The 43rd Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. 京都 2014年12月11日
- ⑦ Manabe I. Regulation of macrophage function in cardiac adaptive and maladaptive response to stress. Molecular Clock 2015: Epigenetic landscape in biological rhythm. Kyoto 2015年3月27日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://plaza.umin.ac.jp/manabe>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

真鍋 一郎 (MANABE, Ichiro)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 70359628

(2) 研究分担者

(3)連携研究者

藤生 克仁 (FUJIU, Katsuhito)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：30422306

中山 幸輝 (NAKAYAMA, Yukiteru)

東京大学・医学部附属病院・非常勤医員

研究者番号：70721885

柴田 宗彦 (SHIBATA, Munehiko)

東京大学・医学部附属病院・非常勤医員

研究者番号：90646639