

論文の内容の要旨

論文題目

マクロファージのストレス応答におけるエピジェネティクス調節機構の役割

The roles of epigenetic regulation in macrophage activation

氏名 仙波宏章

序文

近年の超高齢化社会の到来に伴い、動脈硬化・心不全などの心血管疾患や肥満症・糖尿病などの代謝性疾患に代表される、いわゆる生活習慣病の診断・治療・予防に対する取り組みの重要性はますます拡大している。世界保健機構は生活習慣病やがん等を総称して非感染性疾患 **non communicable disease (NCD)** と定義し、医学・保健衛生上の重要課題であると位置づけている。

近年、これら **NCD** の基盤病態として慢性的な炎症プロセスの活性化が注目されている。炎症が遷延した病態では、浸潤する細胞はマクロファージやリンパ球が主体となり、長期にわたって組織の破壊と修復が同時に進行し、組織構築の改変による機能障害が引き起こされると考えられている。動脈硬化・心不全・不整脈などの心血管疾患だけでなく、糖尿病・慢性腎臓病などあらゆる **NCD** の病態進展に炎症の遷延が重要な役割を果たしていることが示されてきた。しかしその慢性化のメカニズムは未だ明らかにされておらず、炎症プロセスの遷延・収束について詳細な分子機構解明が望まれている。

一方、心血管疾患の病態形成には低酸素ストレスも重要な役割を果たしている。虚血性心疾患などのような急性の低酸素のみならず、肥大心や動脈硬化病変における慢性的な低酸素が病態形成の一因になることが知られている。さらに、低酸素ストレスは炎症プロセスにも深く関与しており、低酸素と炎症は密接に相互作用しながら協調的に活性化すると考えられている。

hypoxia inducible factor- α (HIF- α)は、その名の如く造血因子エリスロポイエチン、グルコース輸送蛋白や解糖系酵素群、血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor : VEGF)など細胞の低酸素応答に関わる多くの遺伝子発現を制御する転写因子である。HIF- α 蛋白は正常酸素下では酸素依存的に分解されているが、低酸素環境では分解を受けずに安定化し、核内へと移行して遺伝子発現を制御できるようになる。

近年の研究から、マクロファージなどの炎症細胞では低酸素のみならず炎症性刺激によっても HIF- α が誘導されることが明らかとなってきた。しかし、炎症プロセスで誘導される HIF- α の役割は未だ不明である。

そこで本研究は、マクロファージにおける炎症性刺激由来の HIF-1 α に着目することにより、炎症プロセスにおける HIF-1 α シグナルの制御機構とその機能的役割を明らかにすることを目的とし、以下の実験を行なった。

方法

7~9 週齢の wild type C57BL/6J 雌マウスまたは同週齢の Tie2/Cre HIF-1 α KO 雌マウスを用いて、チオグリコレート投与により誘導される腹腔マクロファージを採取し、LPS 添加あるいは低酸素インキュベーターによる培養を施して、経時的に回収した。

それぞれの回収サンプルを用いて、核内分画のウェスタンブロッティングによる HIF-1 α 蛋白発現解析、リアルタイム PCR および RNA シーケンスによる遺伝子発現解析、クロマチン免疫沈降法(ChIP)とシーケンサーによる HIF-1 α 結合領域の網羅的解析、formaldehyde assisted isolation of regulatory elements ; FAIRE 法とシーケンサーによるクロマチン構造変化の網羅的解析、フラックスアナライザーによる代謝解析を行なった。

結果

低酸素刺激・LPS 刺激における HIF-1 α 蛋白の確認

低酸素刺激下では早期(4 時間後)から HIF-1 α 蛋白の発現が見られ、後期(24 時間後)も継続的に確認された。一方 LPS 刺激下では、低酸素刺激よりも遅れて後期(24 時間後)から HIF-1 α 蛋白発現が認められた。このように HIF-1 α 蛋白は、低酸素刺激・LPS 刺激のいずれにおいても核内で発現が認められたが、後述するようにその発現プロファイルは大きく異なっていた。

低酸素刺激・LPS 刺激における HIF-1 α の DNA 結合プロファイル

HIF-1 α ChIP シーケンスにより、低酸素刺激または LPS 刺激により誘導された HIF-1 α の DNA 結合プロファイルを解析し、比較検討した。結果、両者に共通なピーク領域(H/L merged)、すなわち低酸素刺激・LPS 刺激いずれでも HIF-1 α が結合できる領域は 961 ヶ所であった。一方、低酸素刺激特異的な結合領域(H unique)が 1138 ヶ所、LPS 刺激特異的な結合領域(L unique)が 435 ヶ所認められ、それぞれに特異的な HIF-1 α 結合領域も少なからず存在することが分かった。

LPS 刺激特異的な HIF-1 α 結合の制御機構解析

第一に、刺激特異的なクロマチン構造変化によって HIF-1 α の DNA 結合が制御されていると仮説を立て、FAIRE(formaldehyde assisted isolation of regulatory elements) シーケンスにより各刺激下におけるマクロファージのクロマチン構造を解析した。結果、LPS 特異的な HIF-1 α 結合領域(L unique)では、no treat の段階で他の二群よりもクロマチン構造が閉じており、LPS 刺激後は他の二群と同等に開いてくるものの、低酸素刺激ではクロマチンの十分な開放が認められなかった。

第二に、刺激特異的な共役因子が HIF-1 α の DNA 結合を規定していると仮説を立て、HIF-1 α ChIP シーケンスのデータをもとに転写因子結合エレメントの解析を行なった。結果、LPS 特異的な HIF-1 α 結合領域(L unique)には、他の二群にはない固有のエレメント(MTF1 family など)が高頻度に認められた。

LPS 刺激により誘導される HIF-1 α の役割

RNA シーケンスの解析から、LPS 刺激下の HIF-1 α は特に解糖系酵素の遺伝子群を誘導していることが明らかとなった。フラックスアナライザーにより実際の代謝状態を解析したところ、LPS 刺激を受けたマクロファージは刺激後 12 時間～24 時間にかけて好気性代謝から嫌気性代謝にシフトしており、しかもこの代謝リプログラミングは HIF-1 α 依存的であった。さらに、嫌気性代謝へのシフトを抑制する酵素阻害剤を LPS とともにマクロファージへ投与すると、LPS 刺激後の後期(24 時間)に誘導される iNOS などの遺伝子発現が減弱した。すなわち、LPS 刺激後のマクロファージは、HIF-1 α を介して解糖系を亢進させることで代謝を嫌気性にシフトしており、この代謝リプログラミングは転写レベルでマクロファージの機能制御の一部に関与していると考えられた。

考察

HIF-1 α ChIP シーケンスの解析から、低酸素・LPS 刺激に共通する HIF-1 α

結合領域がある一方で、それぞれの刺激に特異的な結合領域も多く認められることが分かった。PHD・pVHL を介したユビキチン・プロテアソーム系による蛋白分解機構は、HIF-1 α 機能制御のセントラルドグマであると考えられてきた。しかし今回得られた ChIP シーケンスの結果は、この蛋白分解・安定化機構とは異なる新たな HIF-1 α 機能制御機構の存在を示唆する興味深い知見であった。

HIF-1 α の刺激特異的な DNA 結合メカニズムに迫るため、FAIRE シーケンスの結果を合わせて解析した。結果、LPS 刺激特異的な HIF-1 α 結合領域群(L unique)は、他の二群(H unique, H/L merge)に比べて no treat の時点からクロマチン構造が閉じており、低酸素刺激ではそのクロマチン構造が開放しない一方で、LPS 刺激ではクロマチン構造が開放していくことが分かった。さらに、転写因子結合領域のエLEMENT解析からも、L unique 群には固有の配列が集積していることが示された。一元的に考察すると、L unique 群では LPS 刺激特異的に誘導される共役因子によって閉じていたクロマチン構造が開放され、LPS 刺激特異的な HIF-1 α 結合が可能となる、という仮説が想起される。

さらに、遺伝子発現解析や代謝解析の結果から、LPS 刺激後のマクロファージは、解糖系を亢進させ嫌気性代謝にシフトする代謝調節機能に特化して HIF-1 α を用いており、さらに酵素阻害剤を用いた検討からこの代謝シフトはマクロファージの細胞機能制御に重要であることが明らかとなった。近年、細胞の機能制御には代謝調整が重要であると考えられており、今回見出した炎症性刺激下における HIF-1 α を介した代謝リプログラミングについても、マクロファージにおけるその役割を追求していきたい。

結論

本研究により得られた知見を、以下三点にまとめる。

- ①HIF-1 α は低酸素刺激・LPS 刺激いずれにおいても誘導されるが、その DNA 結合動態は共通するものだけでなく、それぞれの刺激特異的な結合が存在する。
- ②LPS 刺激特異的な HIF-1 α 結合メカニズムには、LPS 刺激により引き起こされるクロマチン構造変化が深く関与している可能性がある。
- ③LPS 刺激下のマクロファージは、HIF-1 α を介して代謝状態を嫌気性にシフトさせており、この代謝リプログラミングはマクロファージ活性化の一部を制御している。