

加齢性慢性炎症性疾患に対する運動効果： マクロファージ時計遺伝子をプローブとして

木崎 節子¹⁾ 楊 國昌²⁾ 櫻井 拓也¹⁾
小笠原 準悦¹⁾ 白土 健¹⁾

1) 杏林大学医学部衛生学公衆衛生学教室

2) 杏林大学医学部小児科学教室

【背景と目的】

軽度の全身性慢性炎症は主に肥満者や高齢者で認められる症状であり、2型糖尿病などの代謝性疾患の発症メカニズムに深く関わっていると考えられている。肥満により肥大した脂肪組織や脂肪肝では、血中から遊走・集積した単球が炎症性マクロファージに分化して腫瘍壊死因子- α (tumor necrosis factor- α : TNF- α) などの炎症性サイトカインを分泌し、脂肪・肝実質細胞のインスリン感受性を低下させる (De Taeye et al.: *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2007)。このときのマクロファージの炎症性応答には腸内細菌由来のリポ多糖 (lipopolysaccharide: LPS) が重要な役割を果たしていることも示唆されている (Moreno-Indias et al.: *Front. Microbiol.*, 2014)。

インスリン抵抗性の結果として生じる高血糖はマクロファージの炎症性応答を亢進させると考えられている。例えば、LPS投与後のマクロファージのTNF- α 分泌レベルは肥満2型糖尿病発症 *db/db* マウスの方が正常ヘテロマウスよりも高かった (Sherry et al.: *J. Immunol.*, 2007)。加えて、抗炎症性サイトカインとして知られるインターロイキン-10 (interleukin-10: IL-10) の産生能は *db/db* マウスの方がヘテロマウスよりも低かった (Chung et al.: *J. Leukoc. Biol.*, 2015)。

一方、LPSに対するマクロファージの炎症性応答には日内変動が認められ、時計遺伝子による調節を受けていることが明らかにされている (Gibbs et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2012)。ヒトマクロファージの *IL-10* 遺伝子発現は時計遺伝子の一種である核内転写抑制因子 Rev-erb α による抑制を受けている (Chandra et al.: *J. Biol. Chem.*, 2013)。*db/db* マウスの腎臓や大動脈などの特定の組織では Rev-erb α を始めとする各種時計遺伝子の発現レ

ベルの日内変動が小さくその発現量はヘテロマウスよりも低いことが報告されている (Su et al.: *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2012)。しかし、2型糖尿病においてマクロファージの Rev-erb α の発現レベルが如何に影響を受けているかは明らかになっていない。さらに、高血糖によるマクロファージの炎症性応答亢進における Rev-erb α の役割の有無についても不明である。2型糖尿病の発症や進行に関わる分子を同定すると共にそのメカニズムを明らかにすることは予防医学や健康科学の観点からも極めて重要である。そこで本研究では、高グルコース濃度条件下における Rev-erb α の発現レベルとその調節機構の変化およびマクロファージの IL-10 発現抑制機構における Rev-erb α の役割を明らかにすることを目的とした。

【方法】

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 を 5.5 mM または 25 mM のグルコース濃度条件下で培養した後、細胞から核タンパク質および RNA を抽出した。Rev-erb α のタンパク質レベルと mRNA レベルはそれぞれウェスタンブロット法とリアルタイム PCR 法で分析した。プロテアソーム活性は、プロテアーゼ阻害剤非存在下で抽出した全タンパク質を検体として、26S プロテアソームの化学発光基質と反応させることにより測定した。タンパク質の *O*-結合型 *N*-アセチルグルコサミン (*O*-linked N-acetylglucosamine: *O*-GlcNAc) レベルはウェスタンブロット法で分析した。LPS 刺激後に培養液中に分泌された IL-10 の分泌レベルは ELISA 法で定量した。

【結果と考察】

RAW264.7 細胞の核内 Rev-erb α タンパク質レベルは 5.5 mM グルコース濃度条件下で培養したときに比べ 25 mM

グルコース濃度条件下で培養したときの方が明らかに高かったが(図1A), mRNA発現レベルには差がなかった(図1B)。これらの結果から、高グルコース培養による Rev-erb α タンパク質発現レベルの増加はタンパク質翻訳後において調節されていると推定された。

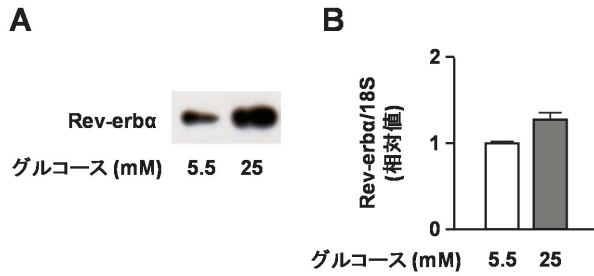


図1 RAW264.7細胞のRev-erb α 発現レベルに及ぼす高グルコース培養の影響。RAW264.7細胞を5.5mMまたは25mMのグルコース濃度条件下で24時間培養した後、Rev-erb α の核内タンパク質発現レベル(A)とmRNA発現レベル(B)を分析した。平均値 \pm 標準誤差 ($n = 3$)。

実際に、26Sプロテアソームの活性は5.5 mMよりも25 mMのグルコース濃度条件下で培養したときの方が有意に低かった(図2A)。さらに、RAW264.7細胞の核内Rev-erb α タンパク質レベルはプロテアソーム阻害剤MG-132により明らかに増加したことから(図2B)、高グルコース培養によるRev-erb α タンパク質レベルの増加は、26Sプロテアソームの活性低下によると推定された。

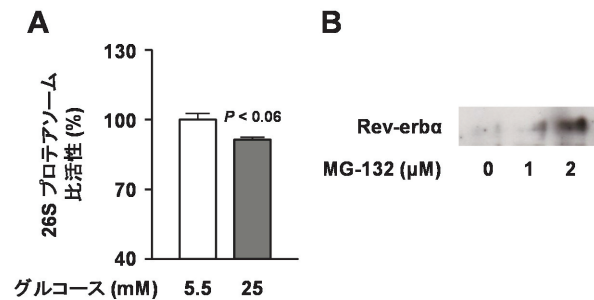


図2 RAW264.7細胞の26Sプロテアソーム活性に及ぼす高グルコース培養の影響。RAW264.7細胞を5.5mMまたは25mMのグルコース濃度条件下で24時間培養した後、26Sプロテアソーム活性を測定した(A)。RAW264.7細胞に各濃度のMG-132を1時間培養させた後、Rev-erb α の核内タンパク質発現レベルを分析した(B)。平均値 \pm 標準誤差 ($n = 3$)。

さらに、高グルコース培養によるヘキサミン経路の代謝量増加によりタンパク質翻訳後修飾である糖鎖修飾の一種O-GlcNAc修飾が亢進することが知られているが、このO-GlcNAc修飾はプロテアソームの細胞内阻害因子として働くことが報告されている(Zhang et al.: *Cell*, 2003)。そ

こで、RAW264.7細胞のO-GlcNAc転移酵素OGTの発現量をRNA干渉法により予め低下させた上で高グルコース培養を行った結果、高グルコース培養による核内Rev-erb α タンパク質レベルの増加は消失した(図3)。

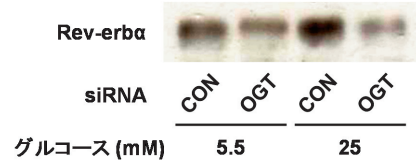


図3 RAW264.7細胞の高グルコース培養によるRev-erb α タンパク質レベル増加に及ぼすOGTノックダウンの影響。RAW264.7細胞にcontrol siRNAまたはOGT siRNAを導入した後、5.5mMまたは25mMのグルコース濃度条件下で24時間培養し、Rev-erb α の核内タンパク質発現レベルを分析した。CON: control。

最後に、高血糖によるIL-10産生能低下のメカニズムにおけるRev-erb α の役割の有無を検討した。まず、RAW264.7細胞を5.5 mMまたは25 mMのグルコース濃度条件下で培養・継代を1週間行うと、LPS刺激に伴うIL-10の産生・分泌が低下することを明らかにした(data not shown)。このタイミングでRev-erb α の発現量をRNA干渉法で低下させた後にLPSで刺激した結果、高グルコース培養によるIL-10分泌量低下が一部回復した(図4)。

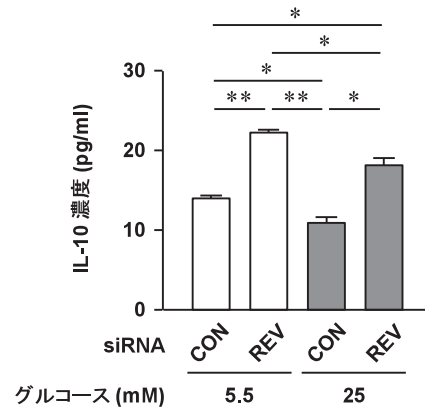


図4 RAW264.7細胞の高グルコース培養によるIL-10分泌レベル低下に及ぼすRev-erb α ノックダウンの影響。RAW264.7細胞を5.5mMまたは25mMのグルコース濃度条件下で1週間培養・継代した後、control siRNAまたはRev-erb α siRNAを導入した。細胞をLPS(100 ng/ml)で6時間刺激した後、培養液中のIL-10濃度を定量した。CON: control。平均値 \pm 標準誤差 ($n = 3$)。

以上の結果より、1) マクロファージのRev-erb α タンパク質発現レベルは高グルコース培養によりプロテアソームの活性低下を介して増加し、そのメカニズムにはO-GlcNAc修飾亢進が関与していること、2) 高グルコース

培養によるマクロファージのIL-10産生能低下にはRev-erb α タンパク質の発現増加が一部関与していることが明らかとなった。これらの知見から2型糖尿病の発症や進行に深く関わっている全身性慢性炎症におけるマクロファージ時計遺伝子の役割が示唆された。

現在, *db/db*マウスから採取した初代培養マクロファージの解析を進めている。これまでにマクロファージのO-GlcNAcレベルは*db/db*マウスの方がヘテロマウスに比べて有意に高いことを明らかにした(data not shown)。今後, Rev-erb α の発現量やプロテアソーム活性の分析を実施すると共に, 慢性炎症性代謝疾患に対する運動の予防効果におけるマクロファージRev-erb α 遺伝子の役割を明らかにしていく。

【発表論文】

- 1) Kizaki, T., Sato, S., Shirato, K., Sakurai, T., Ogasawara, J., Izawa, T., Ohira, Y., Suzuki, K., Ohno, H.: Effect of circadian rhythm on clinical and pathophysiological conditions and inflammation. *Crit. Rev. Immunol.*, 35(4): 261-275, 2015.
- 2) Ogasawara, J., Izawa, T., Sakurai, T., Shirato, K., Ishibashi, Y., Ohira, Y., Ishida, H., Ohno, H., Kizaki, T.: Habitual exercise training acts as a physiological stimulator for constant activation of lipolytic enzymes in rat primary white adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 464(1): 348-353, 2015.
- 3) Ogasawara, J., Izawa, T., Sakurai, T., Sakurai, T., Shirato, K., Ishibashi, Y., Ishida, H., Ohno, H., Kizaki, T.: The molecular mechanism underlying continuous exercise training-induced adaptive changes of lipolysis in white adipose cells. *J. Obes.*, 2015: 473430, 2015.
- 4) Sakurai, T., Ogasawara, J., Shirato, K., Ishibashi, Y., Kato, H., Izawa, T., Ohira, Y., Ohno, H., Kizaki, T.: The TGF- β -TIMP1 pathway, which inhibits glucose uptake in adipocytes, is attenuated by exercise training. The 16th International Biochemistry of Exercise Conference (IBEC2015), Sao Paulo, Brazil, September 7-9, 2015.
- 5) 白土 健, 櫻井拓也, 小笠原準悦, 石橋義永, 今泉和彦, 大野秀樹, 木崎節子: マウス腹腔マクロファージのO-結合型N-アセチルグルコサミン修飾に及ぼす自発性走運動の影響。第70回日本体力医学会大会, 和歌山, 2015年9月18-20日。
- 6) 櫻井拓也: 運動ですてきな老後を〜認知症・アルツハイマー病予防の観点から〜。第165回日本体力医学会関東地方会, 三鷹, 2015年11月28日。
- 7) 白土 健, 櫻井拓也, 小笠原準悦, 楊 國昌, 大野秀樹, 木崎節子: 加齢性慢性炎症性疾患に対する運動効果: マクロファージ時計遺伝子をプローブとして。第44回杏林医学会総会, 三鷹, 2015年11月21日。
- 8) 白土 健, 櫻井拓也, 小笠原準悦, 今泉和彦, 谷口直之, 大野秀樹, 木崎節子: マクロファージのO-結合型N-アセチルグルコサミン修飾調節機構に及ぼす運動トレーニングの影響。第88回日本生化学会大会, 神戸, 2015年12月1-4日。
- 9) 白土 健: 運動は糖尿病をどのように改善するか? 早稲田大学人科生命科学系公開シンポジウム「生命の理解からはじまる人間科学」, 所沢, 2016年2月7日。
- 10) 小笠原準悦, 櫻井拓也, 白土 健, 石橋義永, 大野秀樹, 木崎節子: 急性の水泳運動は肩甲周囲骨格筋の褐色脂肪細胞化を促進する。第93回日本生理学会大会, 札幌, 2016年3月22-24日。

【講演記録】

- 1) 櫻井拓也, 小笠原準悦, 白土 健, 石橋義永, 井澤鉄也, 大野秀樹, 木崎節子: 運動トレーニングは脂肪組織の