

先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム) 実績報告書

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	慢性炎症性疾患の運命決定を担う未知核内エピゲノム制御メカニズムの探索
研究機関・部局・職名	群馬大学・生体調節研究所・教授
氏名	北川 浩史

1. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成26年3月31日

2. 収支の状況

(単位:円)

	交付決定額	交付を受けた額	利息等収入額	収入額合計	執行額	未執行額	既返還額
直接経費	128,000,000	128,000,000	0	128,000,000	127,419,875	580,125	0
間接経費	38,400,000	38,400,000	0	38,400,000	38,400,000	0	0
合計	166,400,000	166,400,000	0	166,400,000	165,819,875	580,125	0

3. 執行額内訳

(単位:円)

費目	平成22年度	平成23年度	平成24年度	平成25年度	合計
物品費	16,046,103	38,066,475	18,304,797	18,289,047	90,706,422
旅費	0	933,570	23,220	122,950	1,079,740
謝金・人件費等	332,953	8,285,457	9,518,067	9,598,816	27,735,293
その他	2,110	3,753,207	2,153,916	1,989,187	7,898,420
直接経費計	16,381,166	51,038,709	30,000,000	30,000,000	127,419,875
間接経費計	6,215,100	14,184,900	9,000,000	9,000,000	38,400,000
合計	22,596,266	65,223,609	39,000,000	39,000,000	165,819,875

4. 主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関名
高速冷却遠心機	久保田 AG508CA	1	1,784,160	1,784,160	2011/3/22	群馬大学
グラジエントミキサー	Bioruptor UCW-310	1	1,701,000	1,701,000	2011/3/24	群馬大学
超遠心機用ローター	日立 P28S	1	1,974,000	1,974,000	2011/3/25	群馬大学
LS-MS比較定量解析ソフトウェア(ライセンス+設置)	Progenesis LC-MSベースパッケージ1年ライセンス	1	2,721,600	2,721,600	2011/3/30	群馬大学
CBB牛胎児血清50本		1	1,312,500	1,312,500	2011/6/14	群馬大学
オールインワン蛍光顕微鏡	BZ-9000	1	9,724,050	9,724,050	2011/6/30	群馬大学
クロマトグラフィシステム 1式	AKTAavanti25	1	10,176,285	10,176,285	2011/6/30	群馬大学
超純水製造装置 1式	ミリポア・ARXQ005JPなど	1	2,424,450	2,424,450	2011/7/12	群馬大学
CBB牛胎児血清25本		1	656,250	656,250	2011/10/31	群馬大学
CO2インキュベーター 1台	Thermo 310	1	714,000	714,000	2011/12/21	群馬大学
高速冷却遠心機 1式	ベックマン Avanti-J-Eなど	1	2,824,500	2,824,500	2012/3/30	群馬大学
LC-MS用定量解析ソフトウェア Progenesis LC-MS	(英国)Nonlinear Dynamics社製	1	2,621,535	2,621,535	2012/5/31	群馬大学
超音波ホモジナイザー 1式	BRANSON SONIFIER model1450Advanced	1	996,030	996,030	2013/2/22	群馬大学
Agilent 3100 OFFGEL Fractionator	アジレント G3100AA	1	1,995,000	1,995,000	2013/2/27	群馬大学
遺伝子発現受託解析	遺伝子発現受託解析 LOT:JK1161 ONCO-J0002 MBL	1	840,000	840,000	2013/7/31	群馬大学

様式20

CONSUM GREEN BASKET MQ Integral5	CONSUM GREEN BASKET MQ Integral5 バイオタ イブ 奇数年	1	508,305	508,305	2013/8/19	群馬大学
自動現像機	フジ 自動現像機 FPM100	1	661,500	661,500	2013/12/10	群馬大学
Neon Transfection System	インビトロジェン・ Neon Transfection System MPK5000	1	850,500	850,500	2014/1/9	群馬大学

5. 研究成果の概要

本プロジェクトは、「慢性炎症新規治療方向開発を目指した新しい創薬標的の開発」を目指し、その基盤となる核内因子の機能制御機構および未知エピゲノム関連疾患原因因子の同定を行った。期間内の解析により、核内受容体であるグルコルチコイド受容体 (GR)が、高血糖状態で糖化修飾により機能制御がなされること、および、アンドロゲン受容体 (AR) の肥満および糖尿病発症における重要性が明らかになった。一方で慢性炎症病態の予後を左右する現象である「炎症収束機構の破綻」、および「血管内皮間葉分化制御機構の異常」においてその制御を司る未知因子の同定に成功し、その生理的な役割の解析を引き続き進めている。

課題番号	LS019
------	-------

先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム) 研究成果報告書

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名 (下段英語表記)	慢性炎症性疾患の運命決定を担う未知核内エピゲノム制御メカニズムの探索
	Investigation of unknown epigenetic mechanism determining the fate of chronic inflammatory diseases
研究機関・部局・職名 (下段英語表記)	群馬大学・生体調節研究所・教授
	Professor, Institute for Molecular and Cellular Regulation, Gunma University
氏名 (下段英語表記)	北川 浩史
	Hirochika Kitagawa

研究成果の概要

(和文):

本プロジェクトは、「慢性炎症新規治療方向開発を目指した新しい創薬標的の開発」を目指し、その基盤となる核内因子の機能制御機構および未知エピゲノム関連疾患原因因子の同定を行った。期間内の解析により、核内受容体であるグルココルチコイド受容体(GR)が、高血糖状態で糖化修飾により機能制御がなされること、および、アンドロゲン受容体(AR)の肥満および糖尿病発症における重要性が明らかになった。一方で慢性炎症病態の予後を左右する現象である「炎症収束機構の破綻」、および「血管内皮間葉分化制御機構の異常」においてその制御を司る未知因子の同定に成功し、その生理的な役割の解析を引き続き進めている。

(英文):

This project has focused on the 'epigenetic switch' between the regulation of inflammation and energy metabolism for the purpose of developing a new therapy for lifestyle-related diseases. Using both *in vitro* and *in vivo* techniques, we have tried to decipher the molecular mechanism of steroid hormone function especially in the nucleus. With this approach, we have found 1) the function of

O-glycosylated Glucocorticoid Receptor (GR) 2) the importance of Androgen Receptor (AR) in the progression of obesity and hyperglycemia. Concomittantly we have identified several nuclear factors responsible for ‘inflammatory resolution’ and ‘Endothelial-to Mesenchymal Transition (Endo-MT)’, which are the determinants of the prognosis of chronic-inflammatory diseases, the biological significance of which we are ongoingly analyzing.

1. 執行金額 165,819,875 円
(うち、直接経費 127,419,875 円、間接経費 38,400,000 円)

2. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成26年3月31日

3. 研究目的

本プロジェクトは、全体として「炎症とエネルギー代謝の接点におけるエピゲノム制御メカニズム解析」とともに「慢性炎症新規治療方向開発を目指した新しい創薬標的の開発」を目指し、核内に存在するエピゲノム関連疾患原因因子の同定とその機能解析を進めている。目標は、開始当初から進めている転写因子 GR, AR の慢性炎症病態における新規機能の探索に加えて、新たに慢性炎症病態を制御する未知の転写因子やエピゲノム制御因子の同定を目指したスクリーニングを行い、病態を制御する新しい創薬標的を同定することである。具体的には、以下の4点をテーマ（プロジェクト）として掲げている。

1) 炎症とエネルギー代謝の接点で機能するグルココルチコイド受容体(GR)の様々な局面における機能変換メカニズムの探索

GRの修飾依存性の転写制御の存在を明らかにし、その機能制御スイッチ機構を明らかにする。その過程で、炎症および代謝シグナル依存性の未知修飾を同定できるシステム構築を完成し、様々な時期場所特異的な修飾依存性機能変換メカニズムの解析を進めていく。

2) 慢性炎症病態に関与する炎症・代謝シグナルとステロイドホルモン受容体転写制御機構（ステロイドホルモンシグナル）のクロストークの解析

主にAR, GRに関して様々な組織特異的なノックアウトマウスの解析と *in vitro* 解析を組み合わせ、組織特異的な受容体の作用と細胞内シグナルとの関連を明らかにする。*in vitro* 解析は、炎症微小環境再現システムとしての「脂肪-マクロファージ共培養系」を用いる。

3) 血管内皮慢性炎症病態における血管内皮の分化を制御するエピゲノム制御メカニズムの探索と新規病態制御標的の同定

in vitro のスクリーニング系を用いて、病態を制御する転写因子、およびエピゲノム制御因子を明らかにし、新たな治療標的としての可能性を追求する。スクリーニングには2)で確立した「共培養系」を応用した「血管内皮細胞-マクロファージ共培養系」を用いる。

4) 慢性炎症における炎症収束機構の破たんに関連するエピゲノム制御メカニズムの探索

と新規病態制御標的の同定

3)に同じく、*in vitro* のスクリーニング系を新たに構築して、病態を制御する転写因子、およびエピゲノム制御因子を明らかにし、新たな治療標的を探索する。使用細胞は、2)3)などの系への将来的な応用を考慮してマクロファージを用いることとする。

4. 研究計画・方法

1) 炎症とエネルギー代謝の接点で機能するグルココルチコイド受容体(GR)の様々な局面における機能変換メカニズムの探索

In vitro 解析を中心に転写制御メカニズムを明らかにしていく。

- a) グルココルチコイド受容体 (GR) のグルコシル化(*O*-glycosilation) の解析
糖濃度依存性に制御されるGRの転写制御メカニズムに関するエピゲノム制御因子を同定し、その制御メカニズムを明らかにする。
- b) GRの新規リン酸化依存性の機能制御メカニズムの解析
新規リン酸化依存性の GR の転写制御メカニズムの探索を行う。
- c) マイクロRNAが仲介するエピゲノム制御メカニズムの探索
炎症およびグルココルチコイド依存性に制御されるマイクロ RNA をスクリーニングし、その生理的意義を明らかにする。
- d) 心血管における GR の機能解析

*In vitro*における GR の転写活性化と抑制化制御の組織特異性に注目し、その原因を明らかにするとともに、組織特異的な GR 遺伝子欠損動物を作成し、その病態における役割を明らかにする。

2) 慢性炎症病態に関与する炎症・代謝シグナルとステロイドホルモン受容体転写制御機構(ステロイドホルモンシグナル)のクロストークの解析

- a) 脂肪組織微小環境再現によるアンドロゲンの抗炎症作用メカニズムの探索
マクロファージと脂肪細胞の共培養系を用いて、脂肪組織における微小環境を再現し、アンドロゲンによる炎症制御メカニズムの存在とそのメカニズムを明らかにする。
- b) アンドロゲンシグナルによる肥満および糖尿病発症制御メカニズムの解析
複数の組織特異的なAR遺伝子欠損動物を作成し、全身AR欠損動物との表現型の差異から、アンドロゲンシグナルによる病態制御メカニズムを明らかにする。

3) 血管内皮慢性炎症病態における血管内皮の分化を制御するエピゲノム制御メカニズムの探索と新規病態制御標的の同定

「慢性炎症 Endo-MT の *in vitro* モデル」を作成し、それを用いて未知病態制御責任転写因子、および責任エピゲノム制御因子スクリーニングを行う。その後取得候補因子の機能制御メカニズムを明らかにする。

4) 慢性炎症における炎症収束機構の破たんに関連するエピゲノム制御メカニズムの探索と新規病態制御標的の同定

「*in vitro* inflammatory-resolution model」を構築し、それを用いて未知病態制御責任転写因子のスクリーニングを行う。その後取得候補因子の炎症収束制御における役割を明

らかにする。

5. 研究成果・波及効果

以下、個々のテーマについて記述する。

1) 炎症とエネルギー代謝の接点で機能するグルココルチコイド受容体 (GR) の様々な局面における機能変換メカニズムの探索

a) GRのグルコシル化による機能制御メカニズムの解析とその生理的意義の考察

GRのグルコース依存性の転写活性制御を明らかにし、そのメカニズムの解析の過程でGRにグルコース濃度依存性にO-グリコシル化修飾がかかることが明らかになった。さらに制御メカニズムには、p300によるOGTのアセチル化の関与が明らかになり、グルコース濃度上昇によるGRの転写活性化は、GRのグルコシル化に伴い、エピゲノム制御因子の結合が阻害されることに起因することが明らかになった。また、肥満および糖尿病マウスを用いた解析により、グルコース濃度依存性のGRの修飾変化が確認できた。

b) GRの未知リン酸化による機能制御メカニズムの探索

Phos-tagゲルを用いることによって、未知のリン酸化サイトの存在が明らかになった。さらにいくつかのリン酸化酵素を試した結果、CDK5が、この未知のリン酸化を介してGRの転写をリガンド非依存性に抑制している可能性が明らかになった。LC-MS/MS系の準備を整い、現在CDK5依存性に制御される未知修飾残基を同定中である。

c) グルココルチコイド依存性に制御されるマイクロRNAの探索とその機能解析

マクロファージ細胞においてマイクロRNAのスクリーニングを行い、炎症刺激によって発現上昇され、グルココルチコイドによって抑制されるいくつかのマイクロRNAを同定した。さらに二次スクリーニングを行い、その制御の確認を終了した。現在、その制御機構およびその役割に注目している。

d) 心血管におけるGRの機能解析

マクロファージで血管内皮特異的なGR欠損マウスの作成が進行中である一方、*in vitro*では、GRのマクロファージ細胞と血管内皮細胞内での転写活性化と抑制化制御を比較することによって、血管内皮特異的な転写制御メカニズムの存在を探索しており、血管細胞内におけるGRの特異的な挙動が明らかになりつつある。

2) 慢性炎症病態に関与する炎症・代謝シグナルとステロイドホルモン受容体転写制御機構 (ステロイドホルモンシグナル) のクロストークの解析

a) 脂肪組織微小環境再現によるアンドロゲンの抗炎症作用メカニズムの探索

脂肪細胞とマクロファージの共培養系を用いてアンドロゲンによって発現抑制される因子を探索した結果、MCP-1の発現が強く抑制されることを明らかにした。さらにこの抑制は、M1マクロファージとの共培養によって強く認められ、NF- κ Bを介する転写の抑制によってなされることが明らかになった。現在引き続き、AR遺伝子欠損マウスが遅発性に肥満を呈すること、および男性閉経 (Late Onset Hypogonadism) において、慢性炎症性疾患が発症することとの関連に注目し、制御にかかわる細胞内シグナルの同定を急いでいる。

b) アンドロゲンシグナルによる肥満および糖尿病発症制御メカニズムの解析

複数の組織特異的なAR遺伝子欠損動物 (マクロファージ、脂肪、膵臓、肝臓) を

成し、全身AR欠損動物との表現型の差異を検証したが、全身遺伝子欠損動物と同様の表現型(肥満、および糖尿病発症)が出現しないことが明らかになった。引き続き、別の組織特異的なAR遺伝子欠損動物を作成するとともに、高脂肪食などを含めた負荷による表現型の出現の可能性を追求している。

3) 血管内皮慢性炎症病態における血管内皮の分化を制御するエピゲノム制御メカニズムの探索と新規病態制御標的の同定

慢性炎症病態の運命決定を担う重要なメカニズムの一つである内膜間葉変換(Endo-MT)に着目し、その分化制御を規定する転写因子、およびエピゲノム制御因子スクリーニング系を確立するため *in vitro* において炎症による分化を再現する系を構築した。その結果、異なる炎症刺激を行ったマクロファージによって、分化状態が様々に変化することを明らかにした。引き続き、行ったスクリーニングによってこの分化を制御する転写因子5種類、エピゲノム制御因子3種類を取得し、現在その機能解析を進めている。

4) 慢性炎症における炎症収束機構の破たんに関連するエピゲノム制御メカニズムの探索と新規病態制御標的の同定

マクロファージの機能制御における責任転写因子、およびエピゲノム制御因子スクリーニング系を確立するために *in vitro* においてファゴサイトーシス依存性に炎症収束が生じるシステム作成を開始した。その結果、その過程でM1 マクロファージからM2 マクロファージへ、とM2 マクロファージから resolution マクロファージへ、という二段階の極性変換を再現するシステムが構築できた。引き続き、行ったスクリーニングによって、この二段階の極性変換それぞれを制御する転写因子を5種類同定し、現在その機能解析を進めている。

6. 研究発表等

<p>雑誌論文 計1件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計1件 Fujiki R, Hashiba W, Sekine H, Yokoyama A, Chikanishi T, Ito S, Imai Y, Kim J, He HH, Igarashi K, Kanno J, Ohtake F, Kitagawa H, Roeder RG, Brown M, Kato S. GlcNAcylation of histone H2B facilitates its monoubiquitination. Nature. 2011 Nov 27;480(7378):557-60.</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計0件</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計0件</p> <p>(未掲載) 計0件</p>
<p>会議発表 計18件</p>	<p>専門家向け 計17件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 北川 浩史 他: ステロイドホルモンによる新規慢性炎症性疾患制御法の探索 第84回 日本内分泌学会総会 2011.4.21-23 開催地:神戸 2. 佐藤 隆史 他: 男性ホルモンによる代謝機能制御機構の解析 第84回 日本内分泌学会総会 2011.4.21-23 開催地:神戸 3. 沢津橋俊 他: 炎症とエネルギー代謝の切り換えを担う未知核内エピゲノム制御メカニズムの探索 第84回 日本内分泌学会総会 2011.4.21-23 開催地:神戸 4. 北川 浩史 他: クロマチンレベルにおける新規グルココルチコイドレセプター転写抑制メカニズムの解明 第84回日本生化学会総会 2011.9.21-24 開催地:京都 5. 沢津橋 俊 他: グルココルチコイドレセプターによるエネルギー代謝と炎症の切り換えを担う未知核内エピゲノム制御メカニズムの探索 第84回日本生化学会総会 2011.9.21-24 開催地:京都 6. 北川 浩史 他: 男性ホルモンによる肥満法制機構の解析 第32回日本肥満学会 2011.9.23-24 開催地: 淡路島 7. 北川 浩史 他: 炎症とエネルギー代謝の接点におけるステロイド受容体の新しい作用メカニズムの探索 第19回日本ステロイドホルモン学会 2011.11.26 開催地:福岡 8. 佐藤 隆史 他: 第19回日本ステロイドホルモン学会学術集会 第19回日本ステロイドホルモン学会 2011.11.26 開催地:福岡 9. 北川 浩史 他: Novel functional mode of nuclear hormone receptors at an epigenetic interface between inflammation and energy metabolism 第34回日本分子生物学会 2011.12.13-16 開催地:横浜 10. 佐藤 隆史 他: 小胞体ストレス制御を介した新規アンドロゲン作用メカニズムの解析 第34回日本分子生物学会 2011.12.13-16 開催地:横浜 11. 沢津橋 俊 他: グルココルチコイドレセプターによるエネルギー代謝と炎症の切り換えを担う未知核内エピゲノム制御メカニズムの探索 第34回日本分子生物学会 2011.12.13-16 開催地:横浜 12. 木下 優美他: エネルギー代謝シグナルによるグルココルチコイドレセプターの分解制御機構の探索 第34回日本分子生物学会 2011.12.13-16 開催地:横浜 13. 諸岡 信克他: 脂肪組織慢性炎症における性ホルモンの抗炎症作用のメカニズム解析 「修飾シグナル病」第2回公開シンポジウム 2012.1.28 開催地:東京 14. 佐藤 隆史 他: アンドロゲン受容体欠損マウスの肥満は視床下部の小胞体ストレス制御破

	<p>綻に起因する 第 85 回日本内分泌学会学術総会 2012.4.19-21 開催地:名古屋</p> <p>15. 佐藤 隆史 他: 小胞体ストレス制御を介した男性ホルモン新規作用機構 第 11 回 生体機能研究会 2012.7.21-22 開催地:箱根</p> <p>16. 沢津橋 俊、北川 浩史 他: 栄養情報が制御するグルココルチコイドレセプター機能切り換えの分子メカニズム解析 第 86 回日本内分泌学会学術総会 2013.4.25-27 開催地:宮城県(仙台)</p> <p>17. 沢津橋 俊、北川 浩史 他: 栄養情報が制御するグルココルチコイドレセプターの分子機能解析 第 12 回 生体機能研究会 2013.7.28-29 開催地:群馬(伊香保)</p> <p>一般向け 計 1 件</p> <p>1. 北川 浩史: 慢性炎症性疾患の運命決定を担う未知エピゲノム制御メカニズムの探索 最先端研究開発支援プログラム FIRST シンポジウム 2014.2.28 開催地:東京(新宿)</p>
図書 計1件	<p>1. 水島 昇 監修 イラストレイテッド細胞分子生物学 (リップンコットシリーズ) 分担執筆 (翻訳) (丸善出版 2012 年 1 月出版) (272ページ)</p>
産業財産権 出願・取得 状況 計0件	<p>(取得済み) 計0件</p> <p>(出願中) 計0件</p>
Webページ (URL)	<p>所属研究室のホームページ: http://kakunai.dept.showa.gunma-u.ac.jp/kitagawa/</p> <p>所属研究所のホームページ: http://www.imcr.gunma-u.ac.jp/</p>
国民との科学・技術対話の実施状況	<p>1. ちびっこ大学「レバーのふしぎ」 2011 年 8 月 12/13 日開催 高崎 ヤマダ電機 LABI にて ブース参加者 1600 名(小中学生とその父兄対象) 科学実験を行うとともにラボの研究内容を紹介(研究室員全員にて)</p> <p>2. まちなかキャンパス(市民講座)「メタボと老化をつなぐ慢性炎症とホルモンの作用～新しいアンチエイジング薬開発に向けて～」 2011 年 10 月 13 日 前橋元気プラザにて 参加者 約 40 名(市民希望者) 研究内容紹介(北川 浩史)</p> <p>3. まちなかキャンパス(市民講座)「性ホルモンがつくりだす、男性と女性の健康」 2011 年 11 月 8 日 前橋元気プラザにて 参加者 約 30 名(市民希望者) 研究内容紹介(佐藤 隆史)</p> <p>4. まちなかキャンパス(市民講座)「老化関連疾患とホルモン ～骨粗鬆症とメタボの治療と予防のコツ～」 2012 年 10 月 18 日 前橋元気プラザにて 参加者 約 50 名(市民希望者) 研究内容紹介(北川 浩史)</p> <p>5. まちなかキャンパス(市民講座)「老化関連疾患とホルモン ～骨粗鬆症とメタボの治療と予防のコツ(2013 年度版)～」 2013 年 10 月 30 日 前橋元気プラザにて 参加者 約 40 名(市民希望者) 研究内容紹介(北川 浩史)</p>
新聞・一般雑誌等掲載 計0件	
その他	

様式21

7. その他特記事項