慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	Elucidation of the intracellular metabolic dynamics of immune cells stimulated with gut microbiota-derived antigen.
Sub Title	腸内細菌由来抗原刺激を受けた免疫細胞の細胞内代謝動態解明
Author	伊藤, 優太郎
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2014
Jtitle	生命と情報 No.21 (2014.) ,p.99- 107
JaLC DOI	
Abstract	近年, 宿主と共生細菌との相互作用が互いの生理機能に様々な影響を与えることが報告されており, 宿主と共生細菌とが織りなす複雑で洗練された複合生態系を包括的に理解することが, 真の生命体の理解につながると考えられる。卒業論文ではこのような宿主と共生細菌との相互作用を, マルチオミクス解析を用いて解明すべく,「植物疾患における土壌細菌叢の影響解明」,「腸内細菌由来の刺激による哺乳類免疫細胞の応答性解明」という2つのテーマにおける研究結果を報告する。本卒業論文ダイジェストでは後者に関して簡潔にまとめる。ヒトの腸内には約100兆個, 数百種類の腸内細菌が存在するといわれている。こうした腸内細菌は宿主の免疫細胞と相互に作用し合い, 疾患や恒常性の維持など様々な形で宿主に影響を与えていることが知られている。我々はこれまでに, 生体内の自然免疫系において重要な役割を担うマクロファージへの微生物刺激による応答性を, 遺伝子発現レベルや, 代謝物レベルで解析してきた。メタボローム解析の結果, マクロファージ様細胞にグラム陰性菌の細胞膜構成成分であるリポ多糖(Lipopolysaccharide ; LPS)刺激を加えることで, DNAメチル化の基質として利用されるS-アデノシルメチオニン(S-adenosylmethionine ; SAM)が細胞内に蓄積するという知見を得た。この結果はLPS刺激によってマクロファージDNAのメチル化が生じ, その後の応答性の変化に関与する可能性を示唆している。先行研究において, 免疫細胞に対するLPS刺激によるSAM蓄積の明確なメカニズムは報告されておらず, どのようにしてSAMが細胞内に蓄積するのかは不明瞭である。したがつて本研究ではSAM蓄積のメカニズム解明に向け, LPS刺激直後のマクロファージ細胞内代謝物の変動をメタボローム解析により網羅的に探ることで, 代謝物レベルでの細胞動態を明らかにすることを目指した。その進渉を本卒業論文ダイジェストで報告する。
Notes	慶應義塾大学湘南藤沢キャンパス先端生命科学研究会 2014年度学生論文集 卒業論文ダイジェスト
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO92001004-00000021-0099

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Elucidation of the intracellular metabolic dynamics of immune cells stimulated with gut microbiota-derived antigen.

腸内細菌由来抗原刺激を受けた免疫細胞の細胞内代謝動態解明

慶應義塾大学　総合政策学部4年
伊藤優太郎

要旨

近年，宿主と共生細菌との相互作用が互いの生理機能に様々な影響を与えることが報告されており，宿主と共生細菌とが織りなす複雑で洗練された複合生態系を包括的に理解することが，真の生命体の理解につながると考えられる．卒業論文ではこのような宿主と共生細菌との相互作用を，マルチオミクス解析を用いて解明すべく，「植物疾患における土壌細菌叢の影響解明」，「腸内細菌由来の刺激による哺乳類免疫細胞の応答性解明」という2つのテーマにおける研究結果を報告する．本卒業論文ダイジェストでは後者に関して簡潔にまとめる．ヒトの腸内には約100兆個，数百種類の腸内細菌が存在するといわれている．こうした腸内細菌は宿主の免疫細胞と相互に作用し合い，疾患や恒常性の維持など様々な形で宿主に影響を与えていることが知られている．我々はこれまでに，生体内の自然免疫系において重要な役割を担うマクロファージへの微生物刺激による応答性を，遺伝子発現レベルや，代謝物レベルで解析してきた．メタボローム解析の結果，マクロファージ様細胞にグラム陰性菌の細胞膜構成成分であるリポ多糖 (Lipopolysaccharide; LPS)刺激を加えることで，DNAメチル化の基質として利用されるS-アデノシルメチオニン (S-adenosylmethionine; SAM)が細胞内に蓄積するという知見を得た．この結果はLPS刺激によってマクロファージDNAのメチル化が生じ，その後の応答性の変化に関与する可能性を示唆している．先行研究において，免疫細胞に対するLPS刺激によるSAM蓄積の明確なメカニズムは報告されておらず，どのようにしてSAMが細胞内に蓄積するのかは不明瞭である．したがって本研究ではSAM蓄積のメカニズム解明に向け，LPS刺激直後のマクロファージ細胞内代謝物の変動をメタボローム解析により網羅的に探ることで，代謝物レベルでの細胞動態を明らかにすることを目指した．その進捗を本卒業論文ダイジェストで報告する．

Keyword: 腸内細菌，マクロファージ，SAM，LPS，メタボローム解析

1. 背景

1.1. 腸内細菌による宿主免疫細胞のエピジェネティクス制御

エピジェネティクスとは，「DNA配列の変化を伴わない細胞分裂後も継承される遺伝子機能を研究する学問である」とRiggsらは1996年に提唱した (Riggs *et al.*, 1996). 現在ではDNA，ヒストン修飾によるエピジェネティック制御が免疫記憶や細胞増殖など，宿主の免疫応答において重要な役割を担うことが知られている．さらに近年，そうしたエピジェネティック制御が共生細菌によって引き起こされ，宿主の生体応答に影響を与えることが明らかとなってきた．腸内細菌に対する過剰な免疫応答を防ぐメカニズムとして，腸管上皮細胞のToll様受容体 (Toll like receptor; TLR)4遺伝子が腸内細菌によるエピジェネティック制御を受けることで抑制されることや (Takahashi., 2010), Clostridialesの産生する酪酸がナイーブT細胞のヒストンアセチル化を促進することで制御性T細胞への分化を誘導し，腸内の恒常性の維持に関わることが報告されている (Furusawa *et al.*, 2013). さらに腸内細菌と宿主の共生にもエピジェネティックな制御が関与することが報告されている (Obata *et al.*, 2014).

これまでの実験において，腸内細菌由来の核酸やグラム陰性菌の膜の構成要素であるリポ多糖 (Lipopolysaccharide; LPS)といった微生物抗原をマクロファージ様細胞であるRAW264.7に添加した際の細胞の遺伝子発現，および代謝動態を解析してきた．その中で，微生物抗原刺激によりS-アデノシルメチオニン (S-adenosylmethionine; SAM)の細胞内蓄積がRAW264.7において生じるという知見が得られている (図1). SAMはメチルトランスフェラーゼがDNAやヒストンのメチル化を起こす際の基質として利用されることが知られている．従って，この結果は腸内細菌由来抗原刺激により免疫細胞にエピジェネティックな変化が起き，免疫細胞のその後の応答性に影響を及ぼすことが示唆されている．近年，マクロファージの分化や機能にエピジェネティックな制御が関与することが注目されているが (Ivashkiv., 2013), マクロファージの代謝研究の領域において，エピジェネティック制御にかかわるSAMを含むメチオニン代謝の動態は着目されていない (Ghesquiere *et al.*, 2014). したがって本研究では，腸内細菌由来抗原の1つであるLPS刺激による免疫細胞のエピジェネティック制御を，細胞代謝動態の観点から明らかにすることを目指した．

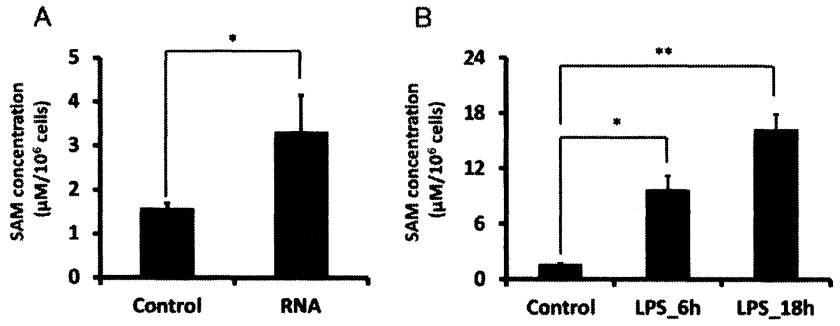

図1 RAW264.7における，細胞内SAMの蓄積

(A) 3 μg/μlの濃度で腸内細菌由来RNAを6時間添加した際のRAW264.7細胞内のSAMの蓄積量を示す．Mann-WhitneyのU検定を用いて統計解析を行った． (B)500 ng/μlの濃度でLPSを6時間，18時間添加した際の細胞内SAM蓄積量．Convert-Iman法を用いて統計解析を行った．縦軸は1×10^6細胞当たりの代謝物濃度 (μM)を表す． *$p<0.05$, **$p<0.005$を示す．各試験群はn=3で実施し，エラーバーは標準偏差を示す．

1.2. 抗原刺激と内毒素耐性 (Endotoxin tolerance)

Endotoxin toleranceとは，細胞に対してLPS等の抗原刺激を2回行うと，2回目の刺激に対してTNF-α等の炎症性サイトカインの遺伝子発現を抑制するのに対し，IL-10のような抗炎症性サイトカインは抑制されない現象のことである (Biswas *et al*., 2009)，この現象は1946年，Millerらがウサギに対し，腸チフスのワクチンを複数回投与すると，ワクチンが引き起こす熱が弱まることを報告したものが最初の知見にあたる (Miller *et al*., 2006)．その後ヒトにおいても同様の現象が起こることが報告されており，現在ではがんや敗血症，嚢胞性線維症といった難病患者の細胞にみられる現象として知られている (Lopez-Collazo *et al*., 2013)．その分子メカニズムはTLRシグナル経路におけるキナーゼの不活性化や，micro RNAによる転写後調節，エピジェネティックな制御が示唆されている (Biswas et al., 2009)．本研究では，この現象のメカニズムの一つであるエピジェネティック制御が，抗原刺激によるSAM生産に向けた代謝のリプログラミングにより生じているという仮説の検証を目的としている．

2. 対象と手法

2.1. LPS刺激直後の細胞内代謝物動態解析

マウスのマクロファージ様細胞株であるRAW264.7細胞にLPS刺激を行った際の細胞内代謝物動態を調べるため，LPSの有無やLPS刺激時間を変えた6群を用意し，細胞内の代謝物を比較した (図2)．RAW264.7は500 mlのダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium培地; DMEM培地, SIGMA)に50 mlのウシ胎児血清 (Fetal bovine serum; FBS)と5 mlの抗生物質の混合液 (ペニシリン 10,000 unit/ml, ストレプトマイシン 10,000 μg/ml, アムホテリシンB 25 μg/ml)を加えたもので培養した．2度継代を行ったRaw264.7を6-wellプレートに6×10^5細胞ずつ播種し，培地を2 mlずつ加えた状態で24時間の前培養を行った．24時間後，1×リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline; PBS)でウォッシュを1度行った後，最終濃度が500 ng/mlになるようにLPS (*Escherichia coli* O55:B5, SIGMA)を培地に添加した．対照群に対しては，1×PBSでウォッシュ後，培地交換のみ行った．LPS刺激から10, 60, 180, 360分のタイミングで，代謝物測定用の前処理を行った．

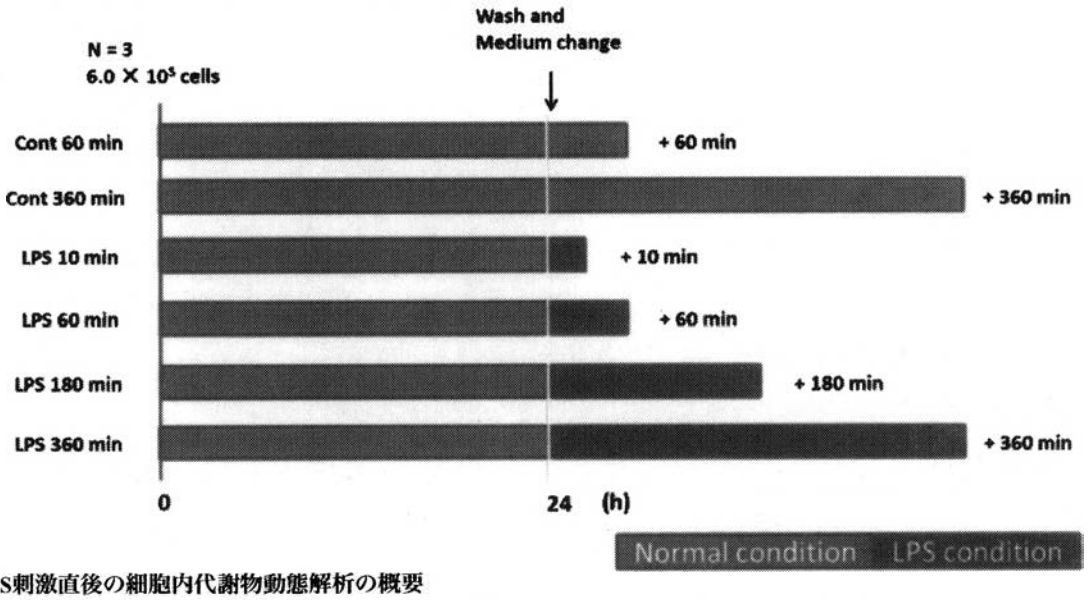

図2 LPS刺激直後の細胞内代謝物動態解析の概要

RAW264.7細胞を6.0×10^5細胞ずつ各ウェルに添加し，24時間前培養した．24時間後 1×PBSでウォッシュを1度行い，LPSを最終濃度が500 ng.mlになるように添加した．また対照群として培地交換を行った群を設けた． LPS刺激から10, 60, 180, 360分のタイミングで細胞を回した．赤色のバーは培地のみの状態を，黒色のバーはLPSを培地に添加している状態を示す．

2.2. メタボローム解析の前処理

2.1.に示した条件で細胞を処理した後，アスピレーターを用いて各wellの培地を除去し，5% (w/v)のマンニトールを含むUltra Pure Distilled Water (Pure Water, Invitrogen)を5 ml添加しウォッシュを行った．ウォッシュ後この溶液を抜き，再び1 mlの5% (w/v)のマンニトールを含むPure Waterを添加した．添加後Cell Lifter (SIGMA)を用いて細胞を剥がし，この溶液を1.5 mlチューブに移した．再度各wellに350 μlの5% (w/v)のマンニトールを含むPure Waterを添加し細胞の回収を行った．この溶液をよく撹拌し，50 μlを回収して血球計算盤を用いて細胞数のカウントを行った．残りの細胞は13,000×g, 1 min, 4°Cの条件で遠心分離を行い，上清を完全に除いた．その後，細胞ペレットが入っているチューブをチューブラックにこすりつけてペレットをほぐし，400 μlの内部標準入りメタノール (20 μM L-メチオニンスルホン, 20 μM 2-モルホリノエスルホン酸, 20 μM D-10-カンファースルホン酸)を添加して使用時まで-80°Cで保存した．

400 μlの内部標準入りメタノールを添加した細胞溶液に対し400 μlのクロロホルムと200 μlのMilli-Qを加え，よく撹拌した後9,100×g, 15 min, 4°Cの条件で遠心分離を行った．400 μlの水層を限外濾過カラム(Millipore)に移し，9,100×g, 180 min, 4°Cの条件で限外濾過を行った．フロースルーを濃縮遠心乾燥機(LABCONCO)を用いて乾固し，25 μlの内部標準入りMilli-Q (200 μM 3-アミノピロリジン, 200 μM 1,3,5-ベンゼントリカルボニルトリクロリド)を用いて溶解した．この溶液をキャピラリー電気泳動時間飛行型質量分析 (CE-TOFMS)に用いることで代謝物の測定を行った．

2.3. SAM阻害剤を用いた細胞の応答性解析

RAW264.7細胞におけるSAMの役割を調べるべく，メチオニンからのSAMを合成するメチオニンアデノシル基転移酵素2 (Methionine adenosyltransferase; Mat2)の阻害剤であるシクロロイシン (Cycloleucine)や，DNAメチル化酵素であるDNAメチル基転移酵素 (DNA metyltransferase; DNMT)の阻害剤として働く5-アザシチジン (5-azacytidine)を利用した実験を行った．2回継代を行ったRAW264.7細胞を，6-wellプレートに6.0×10^5細胞ずつ播種した．24時間培養の後，阻害剤としてCycloleucin (最終濃度10 mM), 5-azacytidine (最終濃度100 μM)をLPS (最終濃度500 ng/ml)と共添加した．また，対照群として同様の条件においてLPS非添加群，ジメチルスルホキシド (Dimethyl sulfoxide; DMSO)添加群を用意した．12時間培養後，LPS刺激を行っていない群では培地交換のみを行い，LPS刺激を行った群では最終濃度が500 ng/mlになるよう培地交換を行った．6時間培養後，これらの細胞に対し，1%の2-メルカプトエタノール(2-mercaptoethanol)を含んだ600 μl のBuffer RLT (RNeasy Plus Mini Kit)を添加して細胞を回収し，使用時まで-80°Cで保存した．

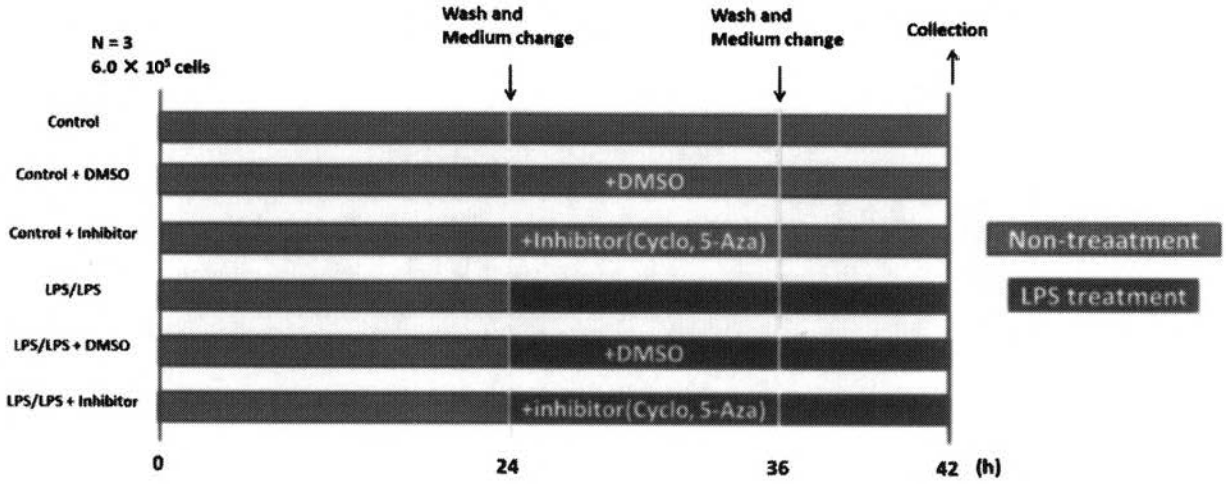

図3 阻害剤による細胞応答性解析実験の概要

RAW264.7細胞を6.0×10^5細胞ずつ各ウェルに添加し，24時間前培養した．24時間後 1×PBSでウォッシュを1度行い，LPSを最終濃度が500 ng/ml，Cycloleucineを最終濃度が10 mM，5-azacytidineを最終濃度が 100 μMになるように添加した．DMSOは5-azacytidineの対照群として等量添加した．処理後12時間経過時，再度1×PBSでウォッシュを1度行い，LPSを最終濃度が500 ng/mlになるよう添加した．また対照群として培地交換を行った群を設けた．処理後6時間時に各細胞を回収した．赤色のバーは培地のみの状態を，黒色のバーはLPSを培地に添加している状態を示す．

2.4. 培養細胞の遺伝子発現量解析

RNA抽出にはRNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN)を用いた．各処理の後，1%の2-mercaptoethanol を含んだBuffer RLTに溶解した状態で-80 °Cで保存していた溶液全量をgDNA Eliminationカラム (RNeasy Plus Mini Kit付属)に移し，8,000×g, 25°C, 1 minの条件で遠心分離した．その後はキットに付属のプロトコルに従いRNA抽出処理を行った．抽出したRNAはNanodrop (Thermo)で濃度，純度の測定を行った．

抽出したRNAをReverTra Ace (TOYOBO)を用い，30°C, 10 min，42°C, 20 min，99°C, 5 minの条件で逆転写し，cDNAを合成した．合成されたcDNAは各種サイトカイン (TNF-α, IL-6，IL-10)の遺伝子に特異的なプライマーを用い，95°C，30秒の初期変性の後，95°C，5秒，60°C, 30秒の条件で40サイクルのq-PCRを行った．また，比較定量法を行うために，ハウスキーピング遺伝子である*Gapdh*の特異的プライマーを用い，内部標準として利用することで遺伝発現量の正規化を行った．各特異的プライマーの塩基配列を表1に示す．

表1本研究で使用したプライマー

プライマー名	プライマー配列ペア (5'–3')	参考文献
Gapdh	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG	Fukuda *et al.*, 2011
Tnf	CTGGGACAGTGACCTGGACT GCACCTCAGGGAAGAGTCTG	Kawashima *et al.*, 2013
Il6	AGTTGCCTTCTTGGGACTGA TCCACGATTTCCCAGAGAAC	Kawashima *et al.*, 2013
IL10	GATTTTAATAAGCTCCAAGACCAAGGT CTTCTATGCAGTTGATGAAGATGTCAA	Atarashi *et al.*, 2011

2.5. データ解析

CE-TOFMSによって得られたデータはマスターハンズを用いてピークの切り出し，濃度の決定を行った．ヒートマップはEXCELによりz-scoreを算出し，各代謝物のz-scoreの値をもとにMeVで描写した．描写されたヒートマップはスピアマンの相関係数を用いた階層的クラスタリングによりクラスタリングされた．各代謝物群の関与する代謝経路はMetacoreを用いて解析した．また，本研究では各種サイトカインの遺伝子発現に関して統計的な検定を行った．2群間比較として，EXCELを用いたStudentのT検定を行った．

3. 結果

3.1. SAM蓄積の代謝経路探索

これまでの研究により，LPS刺激後6時間，18時間後にSAMの細胞内蓄積が生じること示された (図1). SAMの細胞内蓄積のさらなる知見を得るべく，LPS刺激直後である10分から360分後の細胞内の代謝物を測定し，その動態を代謝物ごとにz-scoreで標準化することでヒートマップを作成した (図4A). 赤枠で囲った代謝物群の多くはグルタミン代謝やアルギニン代謝，クエン酸回路 (TCA回路)，γ-アミノ酪酸 (GABA)合成経路，メチオニン代謝等に関わる代謝物であることが示された．またグレーで囲った代謝物はLPS刺激後180分の時点では多く存在するのに対し，360分時に減少している代謝物を示す．これらの代謝物はベータアラニン代謝やグリシン代謝，メチオニン代謝，アルギニン代謝，リジン代謝，タウリン代謝に関わる代謝物であることが示された．特にグリシン代謝，メチオニン代謝，タウリン代謝はSAM周辺の代謝経路であった (図4B).

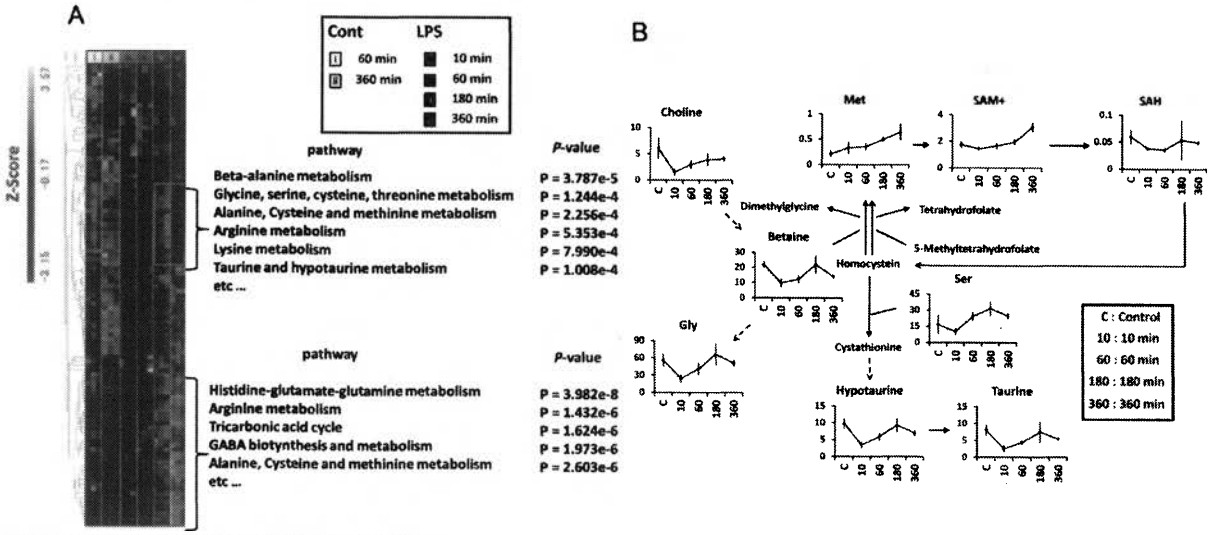

図4 LPS刺激直後の細胞内代謝物動態解析

(A) LPS刺激直後の細胞内代謝物動態を，z-scoreを用いたヒートマップで示した．縦軸に各代謝物を，横軸に各試験群を示す．対照群として培地交換後10, 360分時の細胞内代謝物，LPS刺激後のタイムコースとして10, 60, 180, 360分の細胞内代謝物を測定し，対照群，LPS刺激群の順番で時間経過ごとにi-viと番号を振り横軸に示した．青で示すプロットは細胞内に少ない代謝物を，黄色で示すプロットは細胞内に多い代謝物を示す．本研究では四角で囲った代謝物群に着目しており，Metacoreを用いて算出されたこれらの代謝物の関与する代謝経路とそのP値を横に記した．代謝経路はそのP値の値が小さなものから順に上から記した．グレーで囲った代謝物群はLPS刺激後180分時に増加し，360分時に減少していた代謝物群を示す．赤で囲った代謝物群はLPS刺激時180分から360分にかけて増加した代謝物群を示す．(B) SAM周辺の代謝物の濃度変化をKEGG pathwayに基づいてマッピングしたもの．グラフのない代謝物は，本研究で測定できなかった代謝物を示す．横軸のCは対象群，10, 60, 180, 360はそれぞれ10, 60, 180, 360分のLPS刺激群を示す．縦軸は1×10^6細胞当たりの代謝物の濃度 (μM)を表す．矢印は1つの酵素による反応を，破線矢印は複数の酵素による反応を示す．各試験はn=3で実施されており，エラーバーは標準偏差を示す．

3.2. SAM阻害剤利用による細胞の遺伝子発現動態

Cycloleucineを用いたSAM合成阻害，および5-azcytidineを用いたDNAメチル化阻害による細胞の遺伝子発現動態を調べた．LPSとCycloleucine共添加時のTNF-αやIL-6，IL-10の遺伝子発現量は，Cycloleucine非添加時と比べ有意に減少した (図5A). それに対しLPSと5-azacytidineの共添加を行うと，5-azacytidine非添加時と比べTNF-αの遺伝子発現量は有意に減少するがIL-10は変化がなく，IL-6に関しては有意に上昇した (図5B). またLPS非添加群において，5-azacytidineの添加はIL-10やIL-6の遺伝子発現量を有意に上昇させた．これに対し，Cycloleucineの添加はIL-6の遺伝子発現量を有意に減少させた．

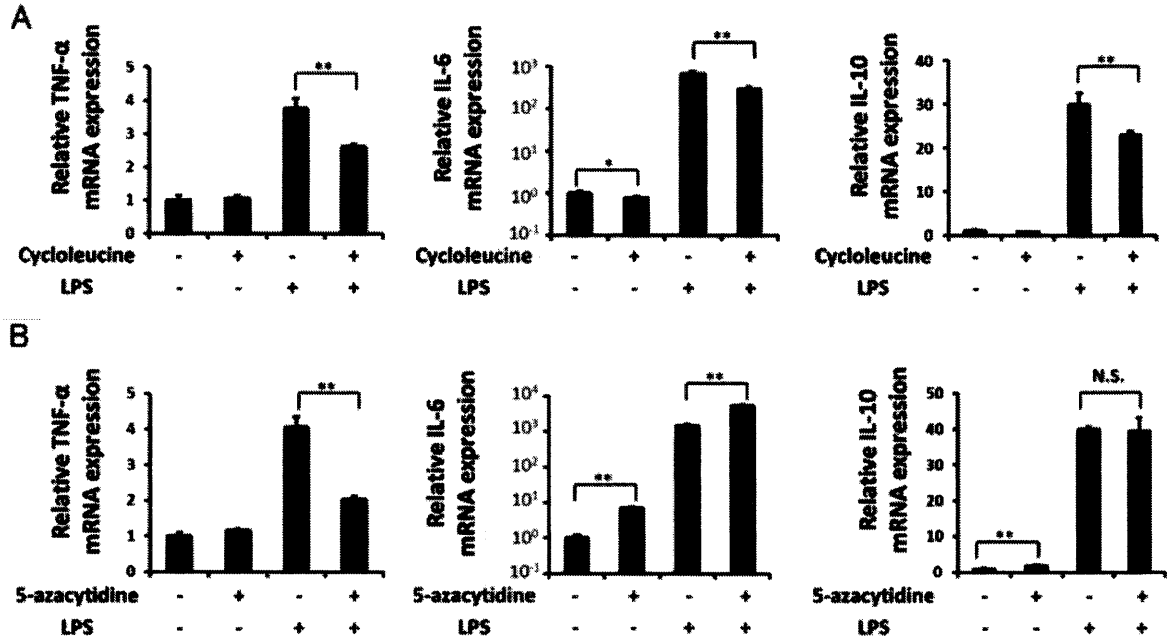

図5 SAM阻害によるLPS2回刺激時のサイトカイン遺伝子発現量解析

(A)LPSとCycloleucineの共添加によるTNF-α，IL-6，IL-10の遺伝子発現量への影響を調べた．(B)LPSと5-azacytidineの共添加によるTNF-α，IL-6，IL-10の遺伝子発現量への影響を調べた．LPSはLPSの2回刺激を行った群を示す．-は各処理を行っていないものを，+は各処理を行ったものを示す．IL-6の縦軸は対数軸で表示している．各試験はn=3で実施しており，エラーバーは標準偏差を示す．統計検定は2群検定のStudentのTテストを行っている．*p<0.05，**p<0.005を，NSは統計的に有意差がないことを示す．

4. 議論

4.1. 細胞内SAM蓄積の代謝経路解明

本研究により得られている知見であるSAMの細胞内蓄積について，どのような経路を介して生じているのかを調べるべく，LPS刺激直後の細胞内代謝物動態を調べた (図4A)．LPS刺激後180，360分後に多くの代謝物が増加していることが明らかとなった．これらの代謝物はグルタミン摂取の増加によるTCA回路物質の上昇やGABAシャントによるコハク酸の増加，アルギニン代謝による一酸化窒素産生など，炎症性マクロファージの代謝物指標として知られる代謝経路と関連していることが示唆された (Ghesquiere *et al.*, 2014, Mills *et al.*, 2014)．次にグレーの枠で囲われた180分に増加し，360分で減少している代謝物群に着目した．これらの代謝物群の関わる代謝経路のうち，グリシン代謝，メチオニン代謝，タウリン代謝はSAM周辺の代謝経路である (図4B)．SAM周辺の代謝物が180分から360分の間で減少しているのに対し，SAM自体は180分から360分の間で増加している．この結果から，細胞はLPS刺激後180分から360分の間にSAM生産に向けて代謝のリプログラミングを行っている可能性が示唆された．赤枠で囲った代謝物群は180分の時点で増加しているのに対し，グレーの枠の180分から360分で変動している代謝物は比較的遅い応答性を示していると考えられ，LPS刺激からの直接的な応答ではなく，2次応答のような形で応答していると考えられる．グレーの枠内であげられているアルギニン代謝はサイトカインであるIFN-βを介して亢進することが知られており (Jacobs *et al.*, 2001)，SAM生産の増加もLPS刺激によって生じるサイトカイン等を介していると推測している．

4.2. 細胞内SAM蓄積の役割の解明

次に，細胞内のSAM蓄積の役割を解明することを目指した．これまでに報告されているSAMの働きとして，外因性のSAM投与によるSAMの細胞内蓄積は，免疫細胞のエピジェネティック修飾を介して

TNF-αなどの炎症性サイトカイン生産を抑制し，IL-10などの抗炎症性サイトカイン生産を促進することが報告されている (Kharbanda *et al.*, 2013, Pfalzer *et al.*, 2014.)．これらの炎症抑制能は外因性のSAMに起因するとされているが，本研究での免疫細胞におけるSAMの蓄積の結果から，細胞内でこれらの応答が生じていると考えられる．つまり微生物抗原による炎症刺激の後，細胞の代謝がSAM生産へとリプログラミングされ，TNF-α等の炎症性サイトカインがエピジェネティック制御によりコントロールされることで炎症終結に寄与するのではないかという仮説である．

その仮説を検証すべく，本研究ではEndotoxin toleranceと呼ばれる現象に着目した．Endotoxin toleranceは抗原に対する過剰応答による宿主へのダメージを抑制する，いわば炎症終結機能の1つである．この現象ではLPSの2回刺激によってTNF-α等の炎症性サイトカインの抑制が生じることが知られているが，1度目のLPS刺激後に起こるSAM蓄積やエピジェネティック制御を阻害することで，2度目のLPS刺激の際に炎症性サイトカインが抑制されないのではないかと考えた (図5)．しかしながら，予想していた結果とは逆に，2回刺激時のTNF-αの遺伝子発現量は対照群と比べ，抑制されているという結果が得られた．Cycloleucineを用いた際にはIL-6，IL-10も同様に，対照群と比べて抑制されている．これらの結果から， Cycloleucineは1度目のLPS刺激の炎症抑制を促しており，2度目の刺激後にこれらのサイトカインの遺伝子発現が減少しているように観察されたのではないかと考えている．

一方IL-6の遺伝子発現量は，Cycloleucine処理では有意に抑制されるが，5-azacytidine処理では有意に増加した．膵臓がん細胞において，IL-6はDNAのメチル化修飾により遺伝子発現が抑制されており，5-azacytidineによるDNAメチル化の阻害はIL-6の発現を上昇させることが報告されている (Dandrea *et al.*, 2009)．マクロファージにおいてもIL-6は同様の発現抑制機構を備えている可能性が考えられる．これらの結果を踏まえると，今回行った実験系ではSAM蓄積による炎症終結が生じるという仮説を証明することはできなかった．今後は阻害剤を入れるタイミングの変更やCE-TOFMSを用いた阻害剤の効果の検討などを行い，より詳細な検証を重ねていく．

謝辞

本研究を行うにあたり，実験から解析の方法まで，幾度となくミーティングを行ってくださいました福田真嗣特任准教授には大変感謝いたします．また，細胞の扱いや結果などに関しまして相談してくださいました田畑祥特任助教にも大変感謝いたします．さらに，アドバイザーとしてTPの添削等行ってくださいました村上慎之介氏にもこの場をお借りして御礼申し上げます．最後に，このような研究の場を与えてくださった冨田勝教授に感謝申し上げます．

参考文献

Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., *et al.* (2011). Induction of colonic regulatory T cells by indigenous clostridium species. *Science (New York, N.Y.), 331*(6015), 337-341.

Biswas, S. K., & Lopez-Collazo, E. (2009). Endotoxin tolerance: New mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends in Immunology, 30*(10), 475-487.

Dandrea, M., Donadelli, M., Costanzo, C., Scarpa, A., & Palmieri, M. (2009). MeCP2/H3meK9 are involved in IL-6 gene silencing in pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Nucleic Acids Research, 37*(20), 6681-6690.

Edward S. Miller and Paul B. Beeson. (1946) Murine typhus fever. *Medicine, 25*(1), 1-16.

Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., *et al.* (2011). Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature, 469*(7331), 543-547.

Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T. A., Nakato, G., Takahashi, D., *et al.* (2013). Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature, 504*(7480), 446-450.

Ghesquiere, B., Wong, B. W., Kuchnio, A., & Carmeliet, P. (2014). Metabolism of stromal and immune cells in health and disease. *Nature, 511*(7508), 167-176.

Ivashkiv, L. B. (2013). Epigenetic regulation of macrophage polarization and function. *Trends in Immunology, 34*(5), 216-223.

Jacobs, A. T., & Ignarro, L. J. (2001). Lipopolysaccharide-induced expression of interferon-beta mediates the timing of inducible nitric-oxide synthase induction in RAW 264.7 macrophages. *The Journal of Biological Chemistry, 276*(51), 47950-47957.

Jacobs, A. T., & Ignarro, L. J. (2001). Lipopolysaccharide-induced expression of interferon-beta mediates the timing of inducible nitric-oxide synthase induction in RAW 264.7 macrophages. *The Journal of Biological Chemistry, 276*(51), 47950-47957.

Kawashima, T., Kosaka, A., Yan, H., Guo, Z., Uchiyama, R., Fukui, R., *et al.* (2012) Double-Stranded RNA of Intestinal Commensal but Not Pathogenic Bacteria Triggers Production of Protective Interferon-β. *Immunity.* **38**,1187-97.

Kharbanda, K. K., Bardag-Gorce, F., Barve, S., Molina, P. E., & Osna, N. A. (2013). Impact of altered methylation in cytokine signaling and proteasome function in alcohol and viral-mediated diseases. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research, 37*(1), 1-7.

Lopez-Collazo, E., & del Fresno, C. (2013). Pathophysiology of endotoxin tolerance: Mechanisms and clinical consequences. *Critical Care (London, England), 17*(6), 242.

Mills, E., & O'Neill, L. A. (2014). Succinate: A metabolic signal in inflammation. *Trends in Cell Biology, 24*(5), 313-320.

Obata, Y., Furusawa, Y., Endo, T. A., Sharif, J., Takahashi, D., Atarashi, K., et al. (2014). The epigenetic regulator Uhrf1 facilitates the proliferation and maturation of colonic regulatory T cells. *Nature Immunology, 15*(6), 571-579.

Obata, Y., Furusawa, Y., Endo, T. A., Sharif, J., Takahashi, D., Atarashi, K., *et al.* (2014). The epigenetic regulator Uhrf1 facilitates the proliferation and maturation of colonic regulatory T cells. *Nature Immunology, 15*(6), 571-579.

Pfalzer, A. C., Choi, S. W., Tammen, S. A., Park, L. K., Bottiglieri, T., Parnell, L. D., *et al.* (2014). S-adenosylmethionine mediates inhibition of inflammatory response and changes in DNA methylation in human macrophages. *Physiological Genomics, 46*(17), 617-623.

Riggs AD., Russo VEA., Martienssen RNA. 1996. Epigenetic mechanism of gene regulation. *Plainview, N.Y:Cold Spring Harbor Laboratory Press.*

Takahashi, K. (2010). Interaction between the intestinal immune system and commensal bacteria and its effect on the regulation of allergic reactions. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 74*(4), 691-695.