

平成 30 年 9 月 14 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09414

研究課題名(和文) PKG/VASPシグナルの糖代謝に与える影響の解明

研究課題名(英文) Role of PKG/VASP signaling on glucose metabolism

研究代表者

楯谷 三四郎 (TATEYA, SANSHIRO)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：70639260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：eNOS由来NOの欠損したeNOS^{-/-}マウスは普通食飼育にも関わらずKupffer細胞のM1化と肝臓慢性炎症、肝インスリン抵抗性が出現したが、C57BL6マウスにPDE5阻害剤、sildenafilを投与しcGMP濃度を増加させるとHFDに伴うKupffer細胞のM1化と肝インスリン抵抗性が改善した。NO/cGMP/VASPシグナルが主要なインスリン感受性臓器である肝臓に在住するマクロファージ、Kupffer cells内や脂肪組織在住マクロファージ内の炎症を抑制し、糖尿病モデルマウスのインスリン抵抗性発症を抑えることを初めて明らかとした。

研究成果の概要(英文)：We show that high-fat feeding induces proinflammatory activation of Kupffer cells in wild-type mice coincident with reduced liver endothelial nitric oxide synthase activity and NO content while, conversely, enhancement of signaling downstream of endogenous NO by phosphodiesterase-5 inhibition protects against high fat-induced inflammation in Kupffer cells. Furthermore, proinflammatory activation of Kupffer cells is evident in eNos^(-/-) mice even on a low-fat diet. These results collectively imply a physiological role for endothelial NO to limit obesity-associated inflammation and insulin resistance in hepatocytes and support a model in which Kupffer cell activation during high-fat feeding is dependent on reduced NO signaling. Our findings also identify the NO/VASP pathway as a novel potential target for the treatment of obesity-associated liver insulin resistance.

研究分野：糖尿病

キーワード：インスリン抵抗性 一酸化窒素

1. 研究開始当初の背景

糖尿病・肥満状態では脂肪組織や肝臓といったインスリン感受性臓器で免疫細胞の活性化を伴う慢性炎症を呈していることが 2006 年以降明らかとなり、炎症の抑制が治療薬開発のターゲットになりうると思われるようになったが、未だ有望な薬剤は開発されていない。

2. 研究の目的

申請者が明らかとした CCL2/CCR2 パスウェイならびに一酸化窒素(NO)/cGMP/VASP (Vasodilator-stimulated phosphoprotein) シグナルという炎症を制御する分子メカニズムをマクロファージを中心とした細胞特異的アプローチで統合的に検証し、実際に治療薬の候補となりえるのかを抗炎症メカニズムの解明とともに明らかとする。世界的に急増する糖尿病を治療するための分子基盤の確立をめざす。

3. 研究の方法

(1) C57BL/6 マウスを普通食あるいは高脂肪食で飼育し肝臓、脂肪組織、骨格筋での eNOS リン酸化、NO 含量、Akt リン酸化を評価する。eNOS 欠損マウスを普通食あるいは高脂肪食で飼育したあと、肝臓、脂肪組織、骨格筋での慢性炎症やインスリン抵抗性を評価する。高脂肪食飼育マウスに sildenafil を 2 週間経口投与しその後、各臓器の慢性炎症とインスリン抵抗性を評価する。VASP 欠損マウスを普通食で飼育し各臓器の慢性炎症とインスリン抵抗性を評価する。

(2) マクロファージ VASP が慢性炎症を抑制し、インスリン抵抗性を改善させるか細胞特異的アプローチを用い *in vivo* で解析する。骨髄移植は免疫細胞の放射線感受性が他の細胞に比べ極端に高いことを利用し、マクロファージを初めとする免疫細胞特異的に遺伝子改変マウスを作製する手法として確立されている。970rads の放射線を照射した野生型マウスに VASP 欠損マウスより単離した骨髄由来マクロファージ (BMDM) を移植し普通食で飼育させ、肝臓、脂肪組織マクロファージの慢性炎症の状態の評価や、インスリン抵抗性の有無をそれぞれ RT-PCR やインスリン負荷テストなどで検討する。

4. 研究成果

(1) 血管内皮細胞の機能の一つに eNOS 活性化を介した nitric oxide (NO) の産生がある。NO の産生により血管平滑筋が弛緩される。高脂肪食飼育に伴う炎症とインスリン抵抗性 (インスリン依存的 Akt セリン 473 の抑制) 発症がどのような順序でおきるのか、各臓器細胞の相互作用を解明するために肝臓、骨格筋、脂肪組織、血管の炎症 (RT-PCR による炎症性サイトカインの発現、並びに I κ B のリン酸化) とインスリン抵抗性 (インスリン依存的 Akt セリン 473 の抑制)、肝臓クッパー

細胞の炎症 (RT-PCR による炎症性サイトカインの発現) を検討した。血管内皮細胞での炎症とインスリン抵抗性がまず初めにおこり、ほぼ同時か多少遅れてクッパー細胞の炎症、そして最後に肝臓、骨格筋、脂肪組織の炎症とインスリン抵抗性が起きることが明らかとなった。

血管内皮の炎症とインスリン抵抗性は eNOS リン酸化の低下を伴うことから、eNOS の不活性化が原因である可能性を考えた。実際 eNOS 欠損マウスは通常食飼育下にもかかわらず炎症はクッパー細胞、脂肪組織でみられ、インスリン抵抗性も肝臓、脂肪組織、血管でみられた。eNOS によって生成される NO が近隣の肝細胞や脂肪細胞に働き、抗炎症作用を發揮しているのではと考え、NO の下流分子 cGMP に着目した。cGMP は PDE5 により分解される。PDE5 阻害剤、sildenafil は直接的な NO 投与による副作用、例えば血管の弛緩に伴う低血圧などを起こさずに内因性の NO シグナルを増強させることができる。Sildenafil (30mg/kg/day) を高脂肪食飼育の最後の 2 週間の間投与し細胞内 cGMP 濃度を上昇させると、炎症の改善は肝臓 (クッパー細胞、肝細胞)、脂肪組織 (マクロファージ、脂肪細胞) で見られ、インスリン抵抗性も両組織で改善していた。NO/cGMP が抗炎症作用を發揮する際の下流分子として VASP (Vasodilator Stimulated Phosphoprotein) に着目した。VASP は cGMP により Ser239 がリン酸化され活性化される。VASP 欠損マウスは通常食にも関わらず炎症 (クッパー細胞、脂肪組織マクロファージ) とインスリン抵抗性 (肝臓、脂肪組織) がみられた。NO/cGMP/VASP シグナルによるマクロファージ、肝細胞での抗炎症作用は *in vitro* でも観察された。骨髄由来マクロファージ、マウス初代肝細胞に NO 供与体、DETA-NO、あるいは 8Br-cGMP を投与すると LPS 刺激に伴う M1 化 (TNF、iNOS、IL6、CD11c mRNA の上昇と I κ B リン酸化の上昇) が抑制され、株化マクロファージ RAW 細胞、株化肝細胞 AML12 細胞にレトロウイルスを用いて野性型 VASP を過剰発現させても LPS に伴う M1 化が抑制された。

一方 VASP 欠損マウス由来腹腔マクロファージ、そして VASP 欠損マウス初代肝細胞は非刺激にも関わらず、M1 化を呈しており、NO/cGMP/VASP シグナルはマクロファージ、肝細胞の両方で抗炎症的に作用することが明らかとなった。

(2) 骨髄移植の手法を用い、骨髄細胞特異的に VASP を欠損させたとき、マクロファージの慢性炎症が誘導されインスリン抵抗性を発症するかどうか検討を行った。骨髄移植は免疫細胞の放射線感受性が他の細胞に比べ極端に高いことを利用し、マクロファージを初めとする免疫細胞特異的に遺伝子改変マウスを作製する手法として確立されている。970rads の放射線を照射した野生型マウスに VASP 欠損マウスより単離した骨髄由来

マクロファージ (BMDM) を移植したところ、普通食飼育にもかかわらず肝臓、脂肪組織マクロファージは TNF の上昇など慢性炎症の状態を呈し、インスリン抵抗性を認めた。

In vivo の結果とあわせ、肝臓の血管内皮細胞によって生成される NO は近隣のクッパー細胞と肝細胞の両者に作用し、各々の細胞内の cGMP/VASP シグナルを経て抗炎症作用、インスリン改善作用を発揮するものと考えられた。

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 11 件)

Kawano Y, Nakae J, Watanabe N, Kikuchi T, Tateya S, Tamori Y, Kaneko M, Abe T, Onodera M, Itoh H. Colonic Pro-inflammatory Macrophages Cause Insulin Resistance in an Intestinal Ccl2/Ccr2-Dependent Manner. *Cell Metab* 2016;24(2):295-310. (査読あり)

Lee WJ, Tateya S, Cheng AM, Rizzo-DeLeon N, Wang NF, Handa P, Wilson CL, Clowes AW, Sweet IR, Bomszyk K and others. M2 Macrophage Polarization Mediates Anti-inflammatory Effects of Endothelial Nitric Oxide Signaling. *Diabetes* 2015;64(8):2836-46 (査読あり)

Cheng AM, Rizzo-DeLeon N, Wilson CL, Lee WJ, Tateya S, Clowes AW, Schwartz MW, Kim F: Vasodilator-stimulated phosphoprotein protects against vascular inflammation and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 307:E571-579. 2014(査読あり)

Tateya S*, Rizzo NO, Handa P, Cheng AM, Morgan-Stevenson V, Ogimoto K, Kanter JE, Bornfeldt KE, Daum G, Clowes AW, Chait A,

Kim F: VASP increases hepatic fatty acid oxidation by activating AMPK in mice. *Diabetes*. 62:1913-1922. 2013 (査読あり)

*first and corresponding author

Cheng AM, Handa P, Tateya S, Schwartz J, Tang C, Mitra P, Oram JF, Chait A, Kim F: Apolipoprotein A-I Attenuates Palmitate-Mediated NF- κ B Activation by Reducing Toll-Like Receptor-4 Recruitment into Lipid Rafts. *PLoS One* 7:e33917. 2012 (査読あり)

Tateya S, Rizzo NO, Handa P, Cheng AM, Morgan-Stevenson V, Daum G, Clowes AW, Morton GJ, Schwartz MW, Kim F: Endothelial NO/cGMP/VASP signaling attenuates Kupffer cell activation and hepatic insulin resistance induced by high-fat feeding. *Diabetes* 60:2792-2801. 2011 (査読あり)

Handa P, Tateya S, Rizzo NO, Cheng AM, Morgan-Stevenson V, Han CY, Clowes AW, Daum G, O'Brien KD, Schwartz MW, Chait A, Kim F: Reduced vascular nitric oxide-cGMP signaling contributes to adipose tissue inflammation during high-fat feeding. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31:2827-2835. 2011 (査読あり)

Tateya S, Tamori Y, Kawaguchi T, Kanda H, Kasuga M: An increase in the circulating concentration of monocyte chemoattractant protein-1 elicits systemic insulin resistance irrespective of adipose tissue inflammation in mice. *Endocrinology* 151:971-979. 2010 (査読あり)

Rizzo NO, Maloney E, Pham M,

Luttrell I, Wessells H, **Tateya S**,
Daum G, Handa P, Schwartz MW,
Kim F. Reduced NO-cGMP
signaling contributes to vascular
inflammation and insulin resistance
induced by high-fat feeding.
Arterioscler Thromb Vasc Biol
2010;30(4):758-65. (査読あり)
Maloney E, Sweet IR, Hockenbery
DM, Pham M, Rizzo NO, **Tateya S**,
Handa P, Schwartz MW, Kim F:
Activation of NF-kappaB by
palmitate in endothelial cells: a key
role for NADPH oxidase-derived
superoxide in response to TLR4
activation. *Arterioscler Thromb Vasc
Biol* 29:1370-1375. 2009 (査読あ
り)
Kanda H*, **Tateya S***, Tamori Y,
Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R,
Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S,
Egashira K, Kasuga M: MCP-1
contributes to macrophage
infiltration into adipose tissue,
insulin resistance, and hepatic
steatosis in obesity. *J Clin Invest*
116:1494-150. 2006 (査読あり)

*Co-first authors

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
楯谷 三四郎 (SANSHIRO TATEYA)
神戸大学
医学研究科
医学研究員
研究者番号：70639260

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()