

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09416

研究課題名(和文) 肥満・糖尿病に基づく動脈硬化形成における小胞体ストレスの役割の解明

研究課題名(英文) The role of endoplasmic reticulum stress response in the development of atherosclerosis resulted from obesity and diabetes.

研究代表者

石垣 泰 (Ishigaki, Yasushi)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号：50375002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：高度肥満者の内臓脂肪組織では炎症性サイトカインTNF- α の発現が非肥満者の約4.0倍($p=0.0082$)、小胞体ストレス応答蛋白CHOPの発現が約1.7倍($p=0.0034$)上昇していた。日本人高度肥満者でもマウスでの報告と同様の炎症反応、小胞体ストレス反応の増強がおきている。肥満状態の脂肪組織ではM1マクロファージの浸潤増加がインスリン抵抗性の原因となっている。CHOP欠損マウスを用いた解析から、小胞体ストレス応答の調節によって好酸球誘導を介してマクロファージの極性が変化し、肥満にともなうインスリン抵抗性増悪が抑制されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We examined the gene expressions of visceral adipose tissue related to inflammation and endoplasmic reticulum (ER) stress response in Japanese subjects with morbid obesity. The expressions of TNF- α increased 4.0fold($p=0.0082$), CHOP 1.7 fold ($p=0.0034$), compared to non-obese subjects. These results showed that inflammation and ER stress response were aggravated in adipose tissue with obesity as reported in animal experiment. Obesity represents chronic inflammatory states promoted by pro-inflammatory M1-macrophage infiltration into adipose tissue, thereby inducing insulin resistance. Obesity enhances ER stress with CHOP upregulation in adipocytes. CHOP deficiency prevents obesity induced insulin resistance with M2 macrophage predomination and Th2 cytokine upregulation in WAT. Whereas ER stress suppresses Th2 cytokine expression in cultured adipocytes, CHOP knockdown inhibits this downregulation. This molecular mechanism may link adipose ER stress with systemic insulin resistance.

研究分野：代謝学

キーワード：肥満 インスリン抵抗性 小胞体ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

全身の様々な病態に關与している生体反応として、小胞体ストレス応答が重要視されている。動脈硬化の発症・進展には、肥満・糖尿病を基盤にした病態機序が重要であり、この経路における生体反応として小胞体ストレスの役割を解明したいと考えた。研究代表者は、これまでに動脈硬化の進展には酸化LDLに由来する酸化ストレスが重要な役割を果たしていること(*Circulation* 2008)や、小胞体ストレス応答蛋白 C/EBP homologous protein (CHOP) の欠損マウスを用いた解析で、粥状動脈硬化進展や炎症にともなう血管リモデリングが抑えられており、血管壁では小胞体ストレス応答のみならず炎症反応や酸化ストレス反応の抑制が認められ、生体内反応が相互に影響を及ぼしあうことの重要性を明らかにしてきた(*Circulation* 2011)。

一方、岩手県は肥満者が多いことが特徴的であり、肥満に関わる健康障害の研究は地域のニーズに合致する。また岩手医科大学では国内においても先進的に肥満外科手術を手掛けており、数多くの症例の組織検体が蓄積されている。この手術を受けた高度肥満者の脂肪や肝臓組織は、肥満・インスリン抵抗性をもっとも特徴的に体现しており、基礎的研究で培われた知見をヒトで検討する上で非常に優れたモデルであると考えられる。そこで、これまでの研究成果、経験と基礎的研究手技を基盤にして、国内では稀有な肥満外科手術の豊富な検体を解析することで、本研究では肥満・インスリン抵抗性に関する新たなメカニズムを明らかにし、さらには動脈硬化へと続く新たな病態理解につなげるという研究を着想した。

2. 研究の目的

- 1) 肥満外科手術例の組織標本を対象に遺伝子解析を行うことで、肥満状態でヒトの生体内で何が起きているのか解明し、肥満・インスリン抵抗性の新たな病態の理解につなげる。
- 2) 脂肪組織や肝臓、動脈における遺伝子発現を解析することで、生活習慣病の終末像としての動脈硬化形成に至る機序を明らかにできる。
- 3) 培養細胞の実験系を組み合わせることで、生体内ストレスを负荷した状態の *in vitro* の系で各臓器での生体反応を検討する。

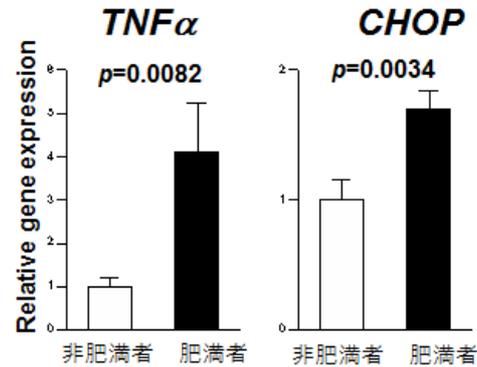
3. 研究の方法

- 1) 岩手医科大学外科学講座で施行された肥満外科手術症例の内臓脂肪組織である大網から total RNA を抽出し半定量 RT-PCR を行う。対照として非肥満早期胃癌患者の大網組織を用いる。
- 2) 肥満マウス脂肪組織を用いて小胞体ストレス応答因子の発現を解析する。マウス脂肪組織での小胞体ストレスとマクロファージの役割を解析する。

- 3) 培養脂肪細胞を用いて小胞体ストレス応答とインスリン抵抗性調節因子の関係を検討する。
- 4) ヒトにおける脂肪蓄積、インスリン抵抗性と動脈硬化に關連する臨床的検討を行い、本研究の基礎的データを補完する。

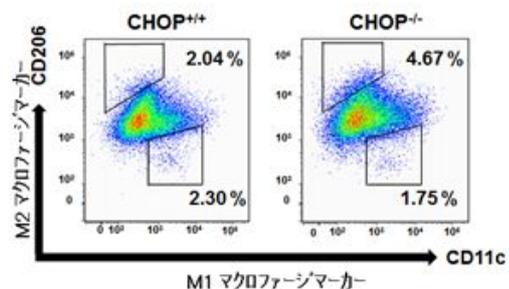
4. 研究成果

1) 内臓脂肪組織における遺伝子発現の検討
 非肥満健常者と高度肥満者の内臓脂肪組織の遺伝子発現を半定量 RT-PCR を用いて解析した。その結果、高度肥満者の内臓脂肪組織では炎症性サイトカイン TNF の発現が約 4.0 倍 ($p=0.0082$)、小胞体ストレス応答蛋白 CHOP の発現が約 1.7 倍 ($p=0.0034$) 上昇していた。他に検討した炎症性因子や小胞体ストレス応答因子の発現も高度肥満者で上昇しており、ヒトの肥満状態でもマウスでの報告と同様の状況がおきていることが明らかになった。他の遺伝子解析結果と合わせて投稿準備中である。



2) 肥満マウス脂肪組織における小胞体ストレス応答調節

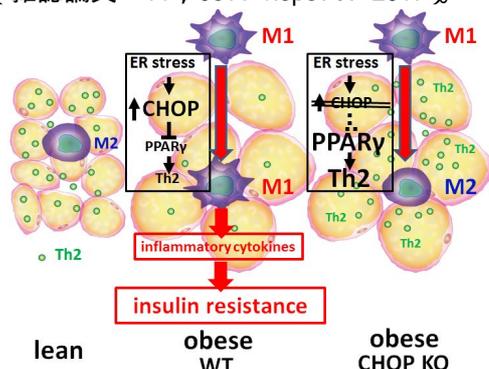
CHOP 欠損マウスは肥満する表現型の一方で、インスリン抵抗性が軽度であることを明らかにした。その原因として、CHOP 欠損マウスの脂肪組織では肥満にともなう小胞体ストレス応答や炎症反応、酸化ストレスが抑制されていることが分かった。その機序として、このマウスでは脂肪組織に集積するマクロファージの数には差がないものの、その極性が炎症惹起性の M1 タイプから炎症抑制性の M2 タイプにシフトしていることが明らかとなった。さらにその原因を追究したところ、CHOP 欠損マウスの脂肪組織では、マクロファ



ージの極性を M2 に誘導する IL-4 と IL-13 が高く発現していた。こうした変化は好酸球が多く浸潤していることで説明できると考えられた。

3) 培養脂肪細胞における小胞体ストレス応答の検討

培養脂肪細胞 3T3-L1 を用いて、CHOP をノックダウンしたところ、好酸球誘導因子の発現やマクロファージ極性誘導因子の発現が増強し、マウス脂肪組織でみられた表現型は CHOP を中心とした小胞体ストレス応答によって調節されていることが明らかとなった (雑誌論文 11; Cell Report. 2017)。



4) ヒトにおける脂肪蓄積、インスリン抵抗性と動脈硬化に関する検討

本研究のテーマと関連して、いくつかの臨床解析を行った。

高血糖にともなう血管合併症の機序として重要である終末糖化産物 (AGE) の皮膚蓄積は 2 型糖尿病の動脈硬化と強く関連すること (雑誌論文 5)。2 型糖尿病の動脈硬化早期診断に超音波を用いた赤血球凝集評価が適応できる可能性があること (雑誌論文 8)。動脈硬化の早期変化である血管内皮機能と脂肪細胞由来レプチンの血中濃度が関連すること (雑誌論文 10)。内臓脂肪蓄積とサルコペニアを合併すると動脈硬化進展がみられること (雑誌論文 12)。動脈硬化進展と関連する心臓周囲脂肪蓄積と血中シスタチン C 濃度が関連すること (雑誌論文 18)。糖尿病動脈硬化早期診断における超音波位相差トラッキング法の可能性 (雑誌論文 24)。超高磁場 MRI を用いた糖尿病患者の脳動脈硬化の検討 (雑誌論文 25)。

高度肥満者に対する外科手術の日本人における有効性や長期成績 (雑誌論文 9、26)。術後には減量とともに臍脂肪の減少が認められること (雑誌論文 14)。

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 29 件)

1. Yashiro S, Kameda H, Chida A, Todate Y, Hasegawa Y, Nagasawa K, Uwano I, Sasaki M, Ogasawara K, Ishigaki Y. Evaluation of Lenticulostriate Arteries Changes by 7 T

Magnetic Resonance Angiography in Type 2 Diabetes. J Atheroscler Thromb. 2018 doi: 10.5551/jat.43869.

2. Hasegawa Y, Ikeda K, Chen Y, Alba DL, Stiffler D, Shinoda K, Hosono T, Maretich P, Yang Y, Ishigaki Y, Chi J, Cohen P, Koliwad SK, Kajimura S. Repression of Adipose Tissue Fibrosis through a PRDM16-GTF2IRD1 Complex Improves Systemic Glucose Homeostasis. Cell Metab. 2018; 27(1):180-194.e6.
3. Kaneko R, Sawada S, Tokita A, Honkura R, Tamura N, Kodama S, Izumi T, Takahashi K, Uno K, Imai J, Yamada T, Miyachi Y, Hasegawa H, Kanai H, Ishigaki Y, Katagiri H. Serum cystatin C level is associated with carotid arterial wall elasticity in subjects with type 2 diabetes mellitus: A potential marker of early-stage atherosclerosis. Diabetes Res Clin Pract. 2018; 139:43-51.
4. Naitoh T, Kasama K, Seki Y, Ohta M, Oshiro T, Sasaki A, Miyazaki Y, Yamaguchi T, Hayashi H, Imoto H, Tanaka N, Unno M. Efficacy of Sleeve Gastrectomy with Duodenal-jejunal Bypass for the Treatment of Obese Severe Diabetes Patients in Japan: a Retrospective Multicenter Study. Obes Surg. 2018;28(2):497-505.
5. Yamashita M, Ogasawara M, Kawasaki Y, Niisato M, Saito H, Kasai S, Maesawa C, Maemondo M, Yamauchi K. Deficiency of protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyl-transferase expression under endoplasmic reticulum stress promotes epithelial mesenchymal transition in lung adenocarcinoma. Oncotarget. 2018; 9(17): 13287-13300
6. Ogasawara N, Kudo T, Sato M, Kawasaki Y, Yonezawa S, Takahashi S, Miyagi Y, Natori Y, Sugiyama A. Reduction of Membrane Protein CRIM1 Decreases E-Cadherin and Increases Claudin-1 and MMPs, Enhancing the Migration and Invasion of Renal Carcinoma Cells. Biol Pharm Bull. 2018;41(4):604-611
7. Ho CM, Wakabayashi G, Yeh CC, Hu RH, Sakaguchi T, Hasegawa Y, Takahara T, Nitta H, Sasaki A, Lee PH. Comprehensive evaluation of liver resection procedures: surgical mind development through cognitive task analysis. J Vis Surg. 2018; 4:21. doi: 10.21037/jovs.2018.01.08.
8. Haruta H, Kasama K, Ohta M, Sasaki A, Yamamoto H, Miyazaki Y, Oshiro T, Naitoh T, Hosoya Y, Togawa T, Seki Y, Lefor AK, Tani T. Long-Term Outcomes of Bariatric and Metabolic Surgery in Japan: Results of a Multi-Institutional Survey. Obes Surg. 2017; 27(3):754-762.
9. 中川理友紀、高橋義彦、村井智美、八代

- 諭、中野理恵子、長澤 幹、梶原 隆、武部典子、佐藤 譲、石垣 泰：2型糖尿病患者における血流依存性血管拡張反応と高レプチン血症の関連：Journal of Iwate Medical Association 68(4):175-188、2016
10. Suzuki T, Gao J, Ishigaki Y, Kondo K, Sawada S, Izumi T, Uno K, Kaneko K, Tsukita S, Takahashi K, Asao A, Ishii N, Imai J, Yamada T, Oyadomari S, Katagiri H. ER Stress Protein CHOP Mediates Insulin Resistance by Modulating Adipose Tissue Macrophage Polarity. *Cell Rep*. 2017; 18(8): 2045-2057.
 11. Nakano R, Takebe N, Ono M, Hangai M, Nakagawa R, Yashiro S, Murai T, Nagasawa K, Takahashi Y, Satoh J, Ishigaki Y. Involvement of oxidative stress in atherosclerosis development in subjects with sarcopenic obesity. *Obesity Science & Practice*. 2017; 3(2): 212-218.
 12. Takahara T, Wakabayashi G, Nitta H, Hasegawa Y, Katagiri H, Umemura A, Takeda D, Makabe K, Otsuka K, Koeda K, Sasaki A. The First Comparative Study of the Perioperative Outcomes Between Pure Laparoscopic Donor Hepatectomy and Laparoscopy-Assisted Donor Hepatectomy in a Single Institution. *Transplantation*. 2017; 101(7):1628-1636.
 13. Umemura A, Sasaki A, Nitta H, Baba S, Ando T, Kajiwara T, Ishigaki Y. Pancreas volume reduction and metabolic effects in Japanese patients with severe obesity following laparoscopic sleeve gastrectomy. *Endocr J*. 2017 ;64(5):487-498
 14. Teramoto T, Kondo A, Kiyosue A, Harada-Shiba M, Ishigaki Y, Tobita K, Kawabata Y, Ozaki A, Baccara-Dinet MT, Sata M. Efficacy and safety of alirocumab in patients with hypercholesterolemia not adequately controlled with non-statin lipid-lowering therapy or the lowest strength of statin: ODYSSEY NIPPON study design and rationale. *Lipids Health Dis*. 2017; 16(1):121.
 15. Hasegawa Y, Wakabayashi G, Nitta H, Takahara T, Katagiri H, Umemura A, Makabe K, Sasaki A. A novel model for prediction of pure laparoscopic liver resection surgical difficulty. *Surg Endosc*. 2017; 31(12):5356-5363.
 16. Hasegawa Y, Ishigaki Y. Heparin Cofactor II: A Novel Plausible Link of Obesity and Diabetes with Thrombosis. *J Atheroscler Thromb*. 2017; 24(12):1202-1203.
 17. Murai T, Takebe N, Nagasawa K, Todate Y, Nakagawa R, Nakano R, Hangai M, Hasegawa Y, Takahashi Y, Yoshioka K, Ishigaki Y. Association of epicardial adipose tissue with serum level of cystatin C in type 2 diabetes. *PLoS One*. 2017; 12(9):e0184723.
 18. Yamamoto J, Imai J, Izumi T, Takahashi T, Kawana Y, Takahashi K, Kodama S, Kaneko K, Gao J, Uno K, Sawada S, Asano T, Kalinichenko VV, Susaki EA, Kanzaki M, Ueda HR, Ishigaki Y, Yamada T, Katagiri H. Neuronal signals regulate obesity induced β -cell proliferation by FoxM1 dependent mechanism. *Nat Commun*. 2017; 8(1): 1930.
 19. Ueki K, Sasako T, Okazaki Y, Kato M, Okahata S, Katsuyama H, Haraguchi M, Morita A, Ohashi K, Hara K, Morise A, Izumi K, Ishizuka N, Ohashi Y, Noda M, Kadowaki T; J-DOIT3 Study Group. Effect of an intensified multifactorial intervention on cardiovascular outcomes and mortality in type 2 diabetes (J-DOIT3): an open-label, randomised controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2017;5(12): 951-964.
 20. Hachiya T, Komaki S, Hasegawa Y, Ohmomo H, Tanno K, Hozawa A, Tamiya G, Yamamoto M, Ogasawara K, Nakamura M, Hitomi J, Ishigaki Y, Sasaki M, Shimizu A. Genome-wide meta-analysis in Japanese populations identifies novel variants at the TMC6-TMC8 and SIX3-SIX2 loci associated with HbA1c. *Sci Rep*. 2017; 7(1): 16147.
 21. Umemura A, Takahara T, Nitta H, Hasegawa Y, Sasaki A. Is sarcopenia a prognostic factor after living donor liver transplantation? *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2017 Aug;6(4):258-259.
 22. Hangai M, Takebe N, Honma H, Sasaki A, Chida A, Nakano R, Togashi H, Nakagawa R, Oda T, Matsui M, Yashiro S, Nagasawa K, Kajiwara T, Takahashi K, Takahashi Y, Satoh J, Ishigaki Y. Association of Advanced Glycation End Products with coronary Artery Calcification in Japanese Subjects with Type 2 Diabetes as Assessed by Skin Autofluorescence. *J Atheroscler Thromb*. 2016 ;23(10):1178-1187
 23. Kawasaki Y, Yokobayashi E, Sakamoto K, Tenma E, Takaki H, Chiba Y, Otashiro T, Ishihara M, Yonezawa S, Sugiyama A, Natori Y. Angiostatin prevents IL-1 β -induced down-regulation of eNOS expression by inhibiting the NF- κ B cascade. *J Pharmacol Sci*. 2015;129(3):200-4.
 24. Suzuki T, Sawada S, Ishigaki Y, Tsukita S, Kodama S, Sugisawa T, Imai J, Yamada T, Yamaguchi T, Murano T, Katagiri H. Lipoprotein Lipase Deficiency (R243H) in a Type 2 Diabetes Patient with Multiple Arterial Aneurysms. *Intern Med*. 2016;55 (9):1131-6.

25. Kurokawa Y, Taki H, Yashiro S, Nagasawa K, Ishigaki Y and Kanai H. Estimation of size of red blood cell aggregates using backscattering property of high-frequency ultrasound: In vivo evaluation. Japanese Journal of Applied Physics. 2016; 55, 07KF12
26. Uno K, Yamada T, Ishigaki Y, Imai J, Hasegawa Y, Sawada S, Kaneko K, Ono H, Asano T, Oka Y, Katagiri H. A hepatic amino acid/mTOR/S6K-dependent signalling pathway modulates systemic lipid metabolism via neuronal signals. Nat Commun. 2015;6(8): 7940.
27. Tanji Y, Yamaguchi S, Ishigaki Y, Katagiri H, Oka Y, Ishihara H. DPP-4 Inhibition Ameliorates Pancreatic beta-cell Failure and Improves Glucose Tolerance in the Mouse Model of Wolfram Syndrome. J Diabetes Mellitus. 2015; 5: 72-80.
28. Honma H, Takahashi Y, Matsui M, Satoh T, Fukuda I, Takahashi K, Takebe N, Nagasawa K, Ono M, Sasai T, Kajiwara T, Sugai T, Satoh J, Ishigaki Y. Non-Islet Cell Tumor Hypoglycemia Is Caused by Big IGF-II in a Patient with a Carcinosarcoma of the Uterus. Intern Med. 2015; 54(24):3165-9.
29. 富樫弘文、高橋義彦、梶原 隆、本間博之、長澤 幹、笹井賢良、中川理友紀、武部典子、佐藤 譲、石垣 泰：日本人 2 型糖尿病患者における HbA1c の変動と腎症進展・腎機能低下の関連：Journal of Iwate Medical Association 67(4):157-170、2015

〔学会発表〕(計 23 件)

1. Ishigaki Y：Current issues in the treatment of type2 diabetes in Japan：Asia Pacific Metabolic and Bariatric Surgery Society Congress 2018 Symposium13, 2018.3.30,Tokyo
2. 石垣 泰：DPP4阻害薬に血管合併症抑制効果は期待できる：第60回日本糖尿病学会年次学術集会 デイバートセッション1、2017.05.18、名古屋
3. 石垣 泰：糖尿病大血管障害の予防に向けた脂質異常管理：第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会シンポジウム 24、2017.05.20、名古屋
4. 石垣 泰：これからの食事療法の展望 日本肥満学会より：第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会、2017.05.20、名古屋
5. 石垣 泰：内科の立場から 肥満外科治療の普及は限定的である：第 35 回日本肥満症治療学会学術集会、2017.6.23
6. Ishigaki Y. Comprehensive risk management for CVD prevention in diabetes：第 65 回日本心臓病学会学術集会、2017.9.30、大阪
7. 石垣 泰：動脈硬化の診断と発症関連因子：第 32 回日本糖尿病合併症学会シンポジウム 1、2017.10.28、東京
8. 片桐 秀樹、石垣 泰、廣田 勇士、門脇 弘子、依藤 亨、赤水 尚史、小川 渉：本邦におけるインスリン抵抗症の実態：第 27 回臨床内分泌代謝 Update Update7、2017.11.24、神戸
9. 石垣 泰：肥満症診療 Update：第 27 回臨床内分泌代謝 Update Meet the Expert2、2017.11.24、神戸
10. Nagasawa K, Hasegawa Y, Ishigaki Y. The Association of False-Positive Elevation of both CA 19-9 and CEA with glycemic control.：77th Scientific Sessions American Diabetes Association; 2017; SanDiego, U.S.A
11. Yashiro S, Nagasawa K, Sasaki M, Ishigaki Y. Evaluation of cerebral small vessel disease by 7T MRI in type 2 diabetes.：77th Scientific Sessions American Diabetes Association; 2017; SanDiego, U.S.A
12. 石垣 泰：日本肥満学会における栄養療法の取り組みと現状：第 19 回日本病態栄養学会年次学術集会 栄養療法協議会合同パネルディスカッション、2016.1.9、横浜
13. 石垣 泰：動脈硬化予防を考えた生活習慣病診療：日本動脈硬化学会 明日の動脈硬化を考えるシンポジウム、2016.1.16、仙台
14. 石垣 泰：境界型耐糖能障害をどのように扱うか：第 50 回 糖尿病学の進歩、2016.2.19、東京
15. Honma H, Ishigaki Y. Positive Association between Diabetic Retinopathy and Coronary Artery Calcification in Japanese Subjects with Type 2 Diabetes：76th Scientific Sessions American Diabetes Association; 2016; NewOrleans, U.S.A.
16. Nakagawa R, Ishigaki Y. Beneficial Effects of Leptin on Vascular Endothelial Function in Japanese Patients with Type 2 Diabetes：76th Scientific Sessions American Diabetes Association; 2016; NewOrleans, U.S.A.
17. 石垣 泰：ライフステージや合併疾患に応じた食事療法：第 38 回日本肥満学会教育講演 5、2017.10.7、大阪
18. 石垣 泰：糖尿病大血管障害予防に向けた新しい展開：第22回日本糖尿病眼学会総会 教育セミナー、2016.10.8、仙台
19. 石垣 泰：糖尿病患者における血糖管理と動脈硬化予防：第31回日本糖尿病合併症学会 サテライトシンポジウム、2016.10.8、仙台
20. 石垣 泰：糖尿病治療としての減量手術の可能性：第 33 回日本肥満症治療学会学術集会、シンポジウム、2015.06.27、千葉

21. Hangai M, Takebe N, Satoh J, Ishigaki Y. Association of advanced glycation end-product assessed by skin autofluorescence with coronary artery calcification in the subjects with type 2 diabetes. 75th Scientific Sessions American Diabetes Association; 2015; Boston, U.S.A.
22. Ishigai Y. Living Donor Liver Transplantation for Homozygous Familial Hypercholesterolemia : 17th International Society of Atherosclerosis, The Satellite Symposium of the ISA 2015 in Tokyo, 2015.05.21, Tokyo.
23. 石垣 泰:災害時における栄養事情と疾患重症化予防:第 37 回日本臨床栄養学会総会、教育講演 2015.10.04、東京

〔図書〕(計 3 件)

1. 石垣 泰.代謝異常に伴う小胞体ストレスと動脈硬化. Annual Review2016 糖尿病・代謝・内分泌 中外医学社; 2016:111-8
2. 石垣 泰. 2 型糖尿病. 今日の治療指針 医学書院; 2017:691-6
3. 石垣 泰. 食事療法 肥満・糖尿病の外科治療 メディカ出版; 2017:33-37

6. 研究組織

(1)研究代表者

石垣 泰 (ISHIGAKI YASUSHI)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号: 50375502

(2)研究分担者

佐々木 章 (SASAKI AKIRA)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号: 40275540

川崎 靖 (KAWASAKI YASUSHI)
岩手医科大学・薬学部・助教
研究者番号: 60385549