

平成30年6月11日現在

機関番号：84305

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07498

研究課題名(和文) DOHaD概念に基づく 3不飽和脂肪酸摂取による新規生活習慣病発症予防法の開発

研究課題名(英文) Development of Novel Strategies for Metabolic Syndrome by Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Intake Based on DOHaD Concept.

研究代表者

井上 隆之 (Inoue, Takayuki)

独立行政法人国立病院機構(京都医療センター臨床研究センター)・内分泌代謝高血圧研究部・研究員

研究者番号：50581386

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：肥満や糖尿病に伴い脳内炎症が亢進するが、本研究では、脳内炎症を担う脳内マクロファージ・ミクログリアに対する魚油成分・3系不飽和脂肪酸の作用効果・機序の検討から、当該不飽和脂肪酸は、長寿遺伝子SIRT1活性化を介して抗炎症作用を発揮することを初めて明らかにした。また、肥満では骨格筋の再生不良が起こるが、肥満性刺激により骨格筋にて液性因子CXCL1の発現が亢進し、さらに筋管形成促進に関わることを認め、肥満における筋量維持のためのCXCL1の新たな機能的意義を明らかにした。本研究成果は、肥満症・糖尿病に伴う認知機能低下や筋萎縮の予防・改善のための効果的栄養指導法・新規治療戦略の開発に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Cerebral inflammation is exacerbated in obese/diabetic conditions, and microglia is the main cell type for neuroinflammation. In the present study, we demonstrated that omega-3 polyunsaturated fatty acids exhibited the novel anti-inflammatory effects on microglia through stimulating SIRT1-mediated pathway. Additionally, we found that CXC chemokine-ligand-1 (CXCL1), a myokine, was elevated in skeletal muscle cells by obese stimuli in which the skeletal muscle regeneration was reportedly aggravated. We further demonstrated that the elevated CXCL1 was implicated in promoting myogenesis, thereby suggesting the novel functional significance of CXCL1 in maintaining skeletal muscle mass despite obese conditions. These findings would contribute to development of effective nutrition guidance and novel therapeutic strategies for prevention/improvement of obesity/diabetes-related diseases including cognitive impairment and muscle atrophy.

研究分野：糖尿病・内分泌・代謝

キーワード：生活習慣病 慢性炎症 脂肪酸 ミクログリア 骨格筋 DOHaD

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病は環境因子と遺伝因子の相互作用により発症し、心血管病の高リスク因子である。Barkerらの疫学的調査から、低出生体重児は成人期に糖尿病・肥満・メタボリックシンドロームに罹患しやすく、心血管障害死亡リスクが高いことを見だし、出生時体重が成人期の心血管病発症リスクを規定するという概念 (Barker 仮説) を提唱した (Lancet, 1986)。この概念に基づき、近年、多くの疫学調査や動物実験により、胎児期や新生児期の生育環境が生後の健康や疾病の罹患を規定するという Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) 概念が注目されている (Science, 2004)。例えば、妊娠中の高脂肪食摂取はマウス仔の神経形成を阻害すると報告されている (FASEBJ, 2009)。また、魚油に含まれるエイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) 等の ω 3 不飽和脂肪酸 (ω 3PUFA) が不足した食事の長期摂取により、仔の鬱性の表現型が引き起こされるが、その機序として脳内炎症亢進による神経系性障害が考えられる (J Lipid Res, 2006)。一方、臨床的にも妊娠期～授乳期の母体において ω 3PUFA 摂取により、児の認知・情動機能が向上する (Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2014; Pharmacol Ther, 2014)。しかし、この様な母胎の ω 3PUFA 摂取による新生児の脳内炎症・神経形成改善が成人期における生活習慣病・心血管病改善に繋がるか、またその予防機序は不明である。

成人における生活習慣病予防には、脂肪代謝亢進によるエネルギー消費量の増大が重要であり、その役割を担う最大の臓器が骨格筋である。近年、生活習慣病に伴う全身性慢性炎症により、筋分解系亢進を介した骨格筋量減少 (サルコペニア) が発症し、肥満・糖尿病が進展すると報告された (Clin Nutr Metab Care, 2008; Nat Rev Endocrinol, 2012)。以上より「全身性慢性炎症－骨格筋量減少－生活習慣病 (糖尿病・肥満) 病態」の悪循環な連関が考えられる。骨格筋には、抗疲労性の遅筋線維と易疲労性の速筋線維が存在し、生活習慣病予防には脂肪代謝の亢進を図るため遅筋線維の増加が有効な手段であると考えられている (Endocrinology, 2009)。これまで遅筋線維を増加させるための効果的な方法は報告されていなかったが、生後マウスへの魚油摂取が、速筋ミオシン重鎖組成を脂肪酸酸化能力が高いタイプ、つまり遅筋型へ変化することが示されている (PLoS ONE, 2013)。申請者らも、成獣ラットへの ω 3PUFA 投与により、速筋筋線維組成が遅筋タイプに移行すること、すなわち「 ω 3PUFA による速筋の質的变化 (遅筋化)」を見出した (Mol Cell Biochem, 2016)。さらに、申請者らは、国内で初めて構築した多施設共同糖尿病・肥満症コホートを基盤に、糖尿病・肥満患者において ω 3PUFA による炎症指標の低下 (高感度 CRP 低下)、抗炎症ホルモン・アディポネクチンの上昇、動

脈硬化指標や単球・マクロファージ M1/M2 タイプの改善など様々な抗炎症・抗動脈硬化作用を見出し、 ω 3PUFA による生活習慣病における心血管病発症予防効果を多数報告してきた (Diabetes Care 2006, 2012; ATVB 2007, 2008; Hypertens Res 2009)。近年、Barker 仮説や DOHaD 概念により低出生体重児のリスクが注目されているが、これまで母体の栄養状態による生体最大のエネルギー消費器官である骨格筋への影響を検討した報告はなく、また妊娠期 ω 3PUFA 摂取による生後の骨格筋量・筋線維組成に対する影響は不明である。一方、最近、筋力低下と認知・情動機能低下との関連が報告されており、特に高齢者では、認知・情動機能が加齢性筋萎縮 (サルコペニア) に関連することが報告されている (Neuroepidemiology, 2008; Geriatr Gerontol Int, 2014)。生活習慣病の基盤として注目されている全身性慢性炎症は液性因子 (血中炎症性サイトカイン等) や神経系を介して脳内に影響し、脳においても恒常性維持を担うミクログリアを活性化して炎症性サイトカインを産生させることで、神経機能傷害とそれに伴う認知・情動機能低下を誘導する可能性が指摘されている (Brain Behav Immun, 2016)。また、DOHaD 概念に基づく認知・情動機能の関連も示唆 (Br J Nutr, 2013; Stem Cells, 2015) されている。加齢や神経筋疾患における筋力低下の原因として神経原性変化に起因した運動単位数の減少が示唆されており、脳内慢性炎症による神経変性が筋力低下に関与している可能性があるが、未だその詳細は不明である。また、妊娠期 ω 3PUFA 摂取が、新生児の脳内神経形成を改善し、成人期における認知・情動機能や骨格筋量・組成を改善させるメカニズムや、またそれが将来的に生活習慣病や重篤な心血管病発症を予防することに繋がるかは不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は DOHaD 概念に基づき、妊娠期の ω 3PUFA 摂取による新生児の脳内炎症・神経形成改善により、成人期の認知・情動機能およびサルコペニアの改善から生活習慣病・心血管病予防に繋がるかを検証し、効果的な栄養指導法・新規治療戦略を確立することである。

3. 研究の方法

①多価不飽和脂肪酸摂取によるミクログリア細胞株を用いた抗慢性炎症効果の検証
本実験では、ミクログリアを用いた他の先行研究 (J Neurochem, 2008 など) を参考に、 ω 3・ ω 6PUFA 負荷の有無別に、LPS 刺激による炎症性サイトカイン誘導に対する影響を比較検討する。投与後の培養上清や培養細胞における炎症性サイトカイン、酸化ストレスやその関連シグナル・転写因子の発現を FACS、qPCR、Western blot などを用いて解析する。

②骨格筋へのパルミチン酸負荷によるマイオカイン・CXCL1 分泌が Notch シグナルと筋再生に及ぼす作用を検証。

本実験では、筋管細胞に飽和脂肪酸であるパルミチン酸を負荷し、分泌されるマイオカインを抗体アレイで同定した。次に、パルミチン酸負荷がそのマイオカインの遺伝子発現を増加させる筋細胞内カニズムを調べた。さらに、骨格筋の幹細胞であるサテライト細胞が筋管細胞へと分化する過程に対し、そのマイオカインがどのような影響を及ぼすかを、RNAi法を用いて検討するとともに、筋細胞分化を調節するシグナルとして知られる Notchシグナルをどのように調節するのかを調べた。最後に、CXCL1受容体である CXC receptor 2 (CXCR2) 遺伝子発現に対するパルミチン酸負荷の影響を検討した。

4. 研究成果

本研究では、まず、ミクログリア細胞株 (MG6) を用いた慢性炎症発症およびその抑制機構を実証するため、オメガ 3 不飽和脂肪酸負荷の有無別に、LPS 刺激による炎症性サイトカイン誘導に対する影響を分子遺伝学的・生化学的解析を用いて比較検討した。

1. ω 3PUFA (EPA+DHA) 添加群では、EPA 単独または DHA 単独投与より、LPS 刺激 6 時間後および 24 時間後の TNF- α と IL-6 の遺伝子および蛋白発現の有意な抑制を認めた ($P < 0.01$)。また、 ω 3PUFA 添加群では、LPS 刺激 3 時間後の SIRT1 活性化が有意に増加し ($P < 0.05$)、6 時間後には SIRT1 mRNA 発現が有意に増加したが ($P < 0.05$)、SIRT1 阻害剤の前処理により SIRT1 活性化および SIRT1 mRNA 発現は有意に減少した ($P < 0.01$)。さらに、 ω 3PUFA 添加群では、LPS 刺激 6 時間後の NF- κ B リン酸化が有意に減少したが ($P < 0.01$)、SIRT1 阻害剤の前処理により NF- κ B リン酸化は有意に増加した ($P < 0.01$)。また、 ω 3PUFA 添加群では、LPS 刺激 24 時間後にオートファジーマーカーである LC3-II/LC3-I 比が増加したが ($P < 0.01$)、その効果は SIRT1 阻害剤の前処理により有意に抑制された ($P < 0.01$)。オメガ 3 不飽和脂肪酸は、ミクログリアにて NAD⁺依存性脱アセチル化酵素である SIRT1 活性化を介して転写因子 NF- κ B を抑制し、過剰な炎症抑制とともに、SIRT1 依存的にオートファジーを誘導することが示唆された。

2. また、NAD recycling における律速酵素 NAMPT の選択的阻害実験により、IL-6 産生に変化はなかったことを示した。

3. 以上より、オメガ 3 不飽和脂肪酸は、ミクログリアにて SIRT1 を特異的に活性化させ、NF- κ B リン酸化を抑制することにより炎症性サイトカイン産生を抑制し、細胞小器官の品質管理・細胞機能維持に寄与する可能性を初めて明らかにした (Inoue et al., *Biochim Biophys Acta (BBA)*, 2017)。

次いで、飽和脂肪酸によって分泌が誘導されるマイオカインを同定し、筋再生における作用について検討した。】ヒト初代筋管細胞および C1C12 筋管細胞を用い、パルミチン酸によって分泌されるマイオカインとして Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL1) を同

定した。また、パルミチン酸負荷によって亢進した CXCL1 遺伝子発現は NF- κ B 阻害剤によって抑制された ($P < 0.05$) ことから、パルミチン酸負荷による CXCL1 遺伝子発現の増加には NF- κ B シグナルが関与する可能性が示唆された。次に、マウス骨格筋から採取したサテライト細胞に CXCL1 RNAi を行い、その後分化誘導を行ったところ、細胞増殖の低下、筋管形成の低下、サテライト細胞の自己複製の低下が認められた。さらに、CXCL1 RNAi による Notch シグナルの変化を検討したところ、RNAi 24 時間後の Notch2 細胞内ドメインのタンパク質量が有意に低下した ($P < 0.05$)。また、Pax7, MyoD 遺伝子発現量も RNAi によって有意に低下した ($P < 0.05$)。RNAi 96 時間後には Notch1 細胞内ドメインのタンパク質量が有意に低下し、Notch のターゲットである HeyL 遺伝子の有意な低下および MyoD 遺伝子発現の有意な増加が観察された ($P < 0.05$)。さらに、CXCR2 遺伝子は分化した筋管細胞よりも未分化な筋細胞に多く発現しているが、パルミチン酸負荷によって特に未分化細胞で発現量の顕著な増加が認められた ($P < 0.05$)。

飽和脂肪酸負荷は筋再生不良の原因となる活性酸素種の発生や NF- κ B シグナルの活性化を促すが、それと同時にパルミチン酸負荷は CXCL1 分泌を惹起する。本研究の結果、CXCL1 はサテライト細胞の Notch シグナルを制御し、筋管形成を円滑に進めることで骨格筋の恒常性を維持する作用を有するマイオカインである可能性が示唆された。CXCL1 の作用の減弱が、肥満・糖尿病における将来の筋量低下・サルコペアに繋がる可能性が推察され (Masuda et al., *Acta Physiologica* 2017)、現在、マウス母胎への ω 3 不飽和脂肪酸・飽和脂肪酸投与による胎児の脳・骨格筋形成への影響を検討している。

以上、本研究の成果は、 ω 3PUFA 摂取による脳内炎症・神経形成改善により、成人期の認知・情動機能の改善や飽和脂肪酸によって同定されたマイオカインをターゲットにしたサルコペアの改善から生活習慣病・心血管病予防に繋がるかを初めて立証した。肥満症・糖尿病に合併する認知症やサルコペアに対する、効果的な栄養指導法・新規治療戦略の確立に大きく貢献できると考えられる。

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 9 件)

1. Masuda S, Inoue T, Satoh-Asahara N et al. (他 8 名, 3 番目) Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 is a myokine induced by palmitate and is required for myogenesis in mouse satellite cells. *Acta Physiologica*. 222:e12975, 2017 (査読あり)
2. Tanaka M, Inoue T, Satoh-Asahara N et al. (他 4 名, 3 番目) . A Novel TREM2-Mediated Link between Diabetes and

Cognitive Impairment: Recent Findings and Future Perspectives. J Alzheimers Dis Parkinsonism, 7: 380. doi: 10.4172/2161-0460.1000380, 2017 (査読あり)

3. Ohue-Kitano R, **Inoue T**, Satoh-Asahara N et al. (他22名、16番目) α -Linolenic acid-derived metabolites from gut lactic acid bacteria induce differentiation of anti-inflammatory M2 macrophages through G protein-coupled receptor 40. FASEB J. 32:304-318, 2018 (査読あり)
4. Yuki N, **Inoue T** et al. (他6名、4番目) Acute painful auto-immune neuropathy; a variant of Guillain-Barré Syndrome. Muscle Nerve. 57:320-324, 2017 (査読あり)
5. Inoue R, **Inoue T**, Satoh-Asahara N et al. (他9名、6番目) Prediction of functional profiles of gut microbiota from 16S rRNA metagenomic data provides a more robust evaluation of gut dysbiosis occurring in Japanese type 2 diabetic patients. JCBN. 61:217-221, 2017 (査読あり)
6. Tanaka M, **Inoue T**, Satoh-Asahara N et al. (他19名、4番目) Serum soluble TREM2 is a potential novel biomarker of cognitive impairment in Japanese non-obese diabetic patients. Diabetes Metab. S1262-3636: 30470-30476, 2017 (査読あり)
7. **Inoue T**, Satoh-Asahara N et al. (他9名、1番目) Omega-3 polyunsaturated fatty acids suppress the inflammatory responses of lipopolysaccharide-stimulated mouse microglia by activating SIRT1 pathways. Biochim Biophys Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids 1862:552-560, 2017 (査読あり)
8. Hashimoto M, **Inoue T** et al. (他6名、2番目) Differential effects of docosahexaenoic and arachidonic acid on fatty acid composition and myosin heavy chain-related genes of slow- and fast-twitch skeletal muscle tissues. Mol Cell Biochem. 415: 169-181, 2016 (査読あり)
9. Devaux JJ, **Inoue T** et al. (他9名、4番目) Neurofascin-155 IgG4 in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. Neurology. 86: 800-807, 2016 (査読あり)

[学会発表] (計 5 件)

1. **井上隆之**, 田中将志, 増田慎也, 山陰一, 北野隆司, 村中和哉, 日下部徹, 和田啓道, 長谷川浩二, 島津章, 浅原哲子 ω 3 不飽和脂肪酸による SIRT1 経路を介したマイクログリア活性化抑制 第38回日本肥満学会 2017年

2. **井上隆之**, 田中将志, 増田慎也, 山陰一, 北野隆司, 村中和哉, 日下部徹, 和田啓道, 長谷川浩二, 島津章, 浅原哲子 ω 3 系多価不飽和脂肪酸による SIRT1 経路活性化を介したマウス活性化マイクログリアにおける炎症抑制作用機序の解明 第22回アディポサイエンスシンポジウム 2017年
3. **井上隆之**, 田中将志, 増田慎也, 山陰一, 北野隆司, 村中和哉, 日下部徹, 和田啓道, 長谷川浩二, 島津章, 浅原哲子 ω 3 不飽和脂肪酸による SIRT1 を介した抗炎症作用とマイクログリア活性化抑制機序の解明 第60回日本糖尿病学会 2017年
4. **井上隆之**, 田中将志, 増田慎也, 山陰一, 北野隆司, 村中和哉, 日下部徹, 和田啓道, 長谷川浩二, 島津章, 浅原哲子 マウス活性化マイクログリアにおける ω 3 不飽和脂肪酸による SIRT1 を介した炎症抑制作用機序の解明 第90回日本内分泌学会 2017年
5. **井上隆之**, 田中将志, 増田慎也, 山陰一, 北野隆司, 村中和哉, 和田啓道, 長谷川浩二, 島津章, 浅原哲子. 活性化マイクログリアにおける SIRT1 を介した ω 3 不飽和脂肪酸による炎症抑制作用機序の解明 第37回日本肥満学会 2016年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 隆之 (InoueTakayuki)
国立病院機構京都医療センター
臨床研究センター
内分泌代謝高血圧研究部研究員
研究者番号: 50581386

(4) 研究協力者

浅原 哲子 (SATO-ASA-HARA, Noriko)
国立病院機構京都医療センター
臨床研究センター
内分泌代謝高血圧研究部・研究部長

大谷 浩 (Otani Hiroki)
島根大学医学解剖学講座
発生生物学教授