

令和元年6月10日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09759

研究課題名(和文) TNF 変換酵素による白色脂肪細胞ブラウニング制御を応用した生活習慣病治療法構築

研究課題名(英文) Inhibitory effect of TACE on WAT browning

研究代表者

本島 寛之 (Motoshima, Hiroyuki)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・特任准教授(寄附講座)

研究者番号：40398201

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)：酢酸刺激により白色脂肪組織(WAT)は褐色細胞に類似した形質を獲得(ブラウニング)しうるが、不完全なブラウニングに留まる。TNF α -converting enzyme (TACE)活性がブラウニングに影響するかは不明である。高脂肪食負荷により軽微な肥満を誘導したC57BL6マウス及び初代培養マクロファージを用い、酢酸及びTACE阻害薬のTNF α 、TACE、iNOSの発現やブラウニングへの影響を検討した。マウスWAT及びマクロファージにおいてTACE阻害薬はブラウニングを弱く誘導するとともにTNF α 、TACE及びiNOSの発現を抑制、TACE活性を低下させる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内臓脂肪組織におけるTACEの発現や活性がTNF α 、TNF α 受容体、JNK活性化、iNOS誘導により促進されること、肥満で活性化した同経路を阻害することでWATブラウニングが促進できるかも知れないという実験結果は、国内外を通じ未報告であり、当該分野におけるインパクトは大きい。酢酸によるブラウニング刺激効果がiNOS阻害やTACEの阻害によって導けることも報告されていない。様々な抗炎症作用を示す薬剤がiNOS抑制を介したTACE活性抑制を実現できる可能性があり、本研究が提唱したストラテジーは大きな広がり期待できる。臨床応用を勘案した基礎データの蓄積が必要である。

研究成果の概要(英文)：Acetate induces browning in WAT of obese mice but its effect is small. It has not been investigated whether TNF α -converting enzyme (TACE) could affect to the browning of visceral white adipose tissue (WAT) in obese mice given a high-fat diet (HFD) and enhance the acetate-induced browning of WAT. Feeding of a HFD induced obesity in C57BL6 mice and increased the expression of TNF α , TACE and inducible NO synthase (iNOS) in WAT. Acetate and TACE inhibitors could induce browning in the mice fed with HFD. We observed the additional effect of acetate and the inhibitor on browning. TNF α , TACE and iNOS expressed at the higher level in stromal vascular fraction that in adipocyte fraction, especially in macrophages. An iNOS inhibitor, 1400W, could suppress the expression and activity of TACE in WAT of mice fed HFD and in macrophages derived from bone marrow. These results may indicate that inflammatory signal via TNF receptor-iNOS in WAT of obese mice triggers the induction of TACE in WAT.

研究分野：糖尿病学

キーワード：ブラウニング TNF 変換酵素 白色脂肪組織 肥満 糖尿病 炎症 インスリン抵抗性 リモデリング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

白色脂肪組織 (white adipose tissue; WAT) において寒冷被爆等の刺激が褐色化 (ブラウニング; Browning) を誘導、ベージュ脂肪細胞へと変化させることが明らかとなっている。ベージュ脂肪細胞は褐色脂肪細胞同様に熱産生を介しエネルギーを消費することに長けた細胞であり、ブラウニング誘導の肥満治療への応用が期待されている (Nat Med. 19: 1252-, 2013)。

一方、消化管内微生物は食物繊維の分解過程 (発酵) における短鎖脂肪酸 (short-chain fatty acids; SCFA) の産生を介し宿主のエネルギー代謝に影響を及ぼしている。酢酸の主成分である酢酸は、消化管内微生物により産生される主要な SCFA であり、内臓脂肪の減少や体重の減少、耐糖能の改善等の効果が報告されている。酢酸による抗肥満・抗糖尿病作用の機序として、肝臓の AMP キナーゼ (AMP-activated protein kinase; AMPK) 活性化や摂食中枢における食欲抑制等が報告されているものの、コンセンサスが得られているとは言い難く、不明な点が多く存在する。SCFA は G 蛋白質共役受容体 (GPR41 及び GPR43) に結合、細胞内シグナルを発生させる。GPR43 は腸管や脂肪組織、免疫細胞に多く発現しているが、腸管における GLP-1 分泌促進 (Diabetes 61: 364-, 2012) 脂肪組織での脂肪蓄積の抑制等の作用を有することが示された (Nat Commun. 4: 1829-, 2013)。

申請者は、遺伝性および食事誘導性肥満動物の内臓 WAT において TNF α 発現および TACE の発現と活性が増加すること、食事制限による減量にてこれらが解除されることを示し、さらに TNF α が TNF α 受容体を介し JNK1 経路を活性化して TACE 活性を上昇させること、TACE 誘導に JNK のみならず PKC も関与することを明らかとした (川崎修二、他、2012 年度日本糖尿病学会若手研究奨励賞、2012 年度日本体質医学会若手研究奨励賞を受賞。Biochem Biophys Res Commun. 430:1189-, 2013)。また、酢酸の経口投与にて肥満糖尿病動物 KK-Ay マウスの内臓 WAT にブラウニング刺激が誘導されることを報告 (J Clin Biochem Nutr. 59: 207-214, 2016)。 β 3 受容体刺激などの既存のブラウニング刺激と比較して酢酸によるブラウニングは不完全で軽微であることを知りえていた。

2. 研究の目的

本研究は、TNF α -converting enzyme (TACE ; TNF α 変換酵素) による WAT のブラウニングへの影響を明らかとすることを旨とするものである。すなわち、TACE 活性の亢進が WAT のブラウニング抑制を、一方 TACE 活性の抑制が WAT のブラウニングを促進するという仮説を、動物実験および細胞実験により検討することである。さらに、申請者が明らかとした肥満糖尿病動物における「酢酸による内臓脂肪組織 (visceral WAT; VAT) の不完全なブラウニング誘導」を、SCFA 刺激と TACE 活性抑制の同時達成することで完全なる VAT のブラウニング誘導が生じるのかを証明することを目指した。解明した分子機序を、ヒトにおける肥満および肥満関連代謝異常の予防や治療に応用する基礎研究的基盤形成を目指すものである。

具体的には、研究開始時点で未だ明らかとされていなかった以下の (i) ~ (v) を実験により検討する。(i) 肥満で誘導される TNF α や TACE の発現が脂肪細胞に局在するのか、あるいはマクロファージ等の炎症細胞に局在するのかを決定、(ii) 肥満動物レベルで、TACE 活性亢進が WAT のブラウニングを阻害すること、逆に TACE 活性の抑制がブラウニングを促進することを明らかとし、次に (iii) 細胞レベルで、TACE 活性亢進が WAT のブラウニングを阻害すること、逆に TACE 活性の抑制がブラウニングを促進することを明らかとする。(iv) TACE 活性抑制を達成した条件下に、肥満動物へ酢酸を経口投与すると WAT のブラウニングが亢進すること、これを介してエネルギー代謝および糖・脂質代謝が改善することを検討する。さらに、(v) TNF α 受容体シグナルのどの経路がブラウニング阻害に寄与しているのか検討、当該経路を特異的に阻害することでブラウニング促進によるエネルギー代謝および糖・脂質代謝改善が得られるか検討することを目指した。

3. 研究の方法

肥満糖尿病動物 KK-Ay マウス由来の WAT を、コラゲナーゼ処理後にフィルター処理、遠心分離を行うことで前駆脂肪細胞、血管構成細胞、マクロファージ等から構成される間質細胞画分 (stromal vascular fraction; SV 画分) と成熟脂肪細胞画分とに分離、得られたそれぞれの画分におけるブラウニング関連分子、TACE および TNF α の mRNA 発現を定量的 real-time RT-PCR 解析にて、蛋白発現をウエスタンブロット解析にて、TACE 活性を活性測定キットにて測定した。さらに、KK-Ay マウスに inducible NO synthase; iNOS 特異的阻害薬 1400W を 1 週間投与し、TACE、TNF α 、iNOS の分子発現を定量した。

高脂肪食負荷 C57BL/6 マウス由来の WAT における TNF α と TACE の分子発現を、同様の方法を用いて解析した。

動物レベルでの TACE 活性化状態のブラウニングへの影響を検討するため、酢酸の経口投与の存在下・非存在下に、TACE 発現阻害薬として 1400W を高脂肪食負荷 C57BL/6 マウスおよびコントロール食負荷マウスに投与、WAT を含む各種臓器を凍結保存した。WAT における TACE、TNF α 、iNOS の分子発現を定量、また TACE 活性を定量した。さらに、ブラウニング関連分子の発現を検討した。

C57BL/6マウスのWAT由来のSV画分から前駆脂肪細胞を酢酸あるいは1400Wの投与下に成熟脂肪細胞に分化誘導し、ブラウニング関連分子発現を検討した。

GPR43 shRNAを初代培養脂肪細胞に導入、酢酸あるいは1400Wによるブラウニング誘導への影響を検討した。

高脂肪食負荷マウスのWATのSV画分からマクロファージを単離、TACE、TNF α 、iNOS等の発現を検討した。マウス骨髄由来マクロファージを酢酸あるいは1400W存在下に前処置、TNF α によるTACE活性化が影響されるか検討した。酢酸のマクロファージ増殖への影響を検討した。

4. 研究成果

肥満糖尿病動物KK-Ayマウス由来のWATでは、SV画分と成熟脂肪細胞画分の両方にTACEとTNF α の両分子のmRNA発現、蛋白発現を確認した。両分子の発現は、脂肪細胞画分に比べSV画分での発現がより高いことが明らかとなった。TACE活性についてもSV画分において有意に高い活性を示した。一方、最も重要なブラウニング関連分子であるUCP-1のmRNAおよび蛋白発現は、脂肪細胞画分において高く、SV画分における発現は著しく低かった。iNOS阻害薬はKK-AyマウスWATにおけるTACE、TNF α 、iNOSの分子発現を有意に低下させた。

高脂肪食負荷C57BL/6マウス由来のWATでも、TNF α とTACEの発現は上記同様に両分子が脂肪細胞画分とSV画分の両画分に存在しており、SV画分により高く発現していた。高脂肪食による内臓脂肪蓄積に伴い両分子の発現は上昇（いずれも16週 > 8週 > 4週で高発現）したが、16週以降は両分子発現の上昇はプラトーに達することが示唆された。

酢酸投与をしたマウスのWATでは、非投与マウスのWATと比較して、TACE、TNF α およびiNOSのmRNA発現が低い傾向を示した。ブラウニング関連分子UCP-1、PRDM16、PGC-1 α 等のmRNA発現が上昇した。一方、1400Wを投与したウス由来のWATでは、非投与マウスのWATと比較してTACE、TNF α およびiNOSのmRNAおよび蛋白発現が有意に低下した。同様にTACE活性も低下、ブラウニング関連分子のUCP-1、PRDM16、PGC-1 α 等のmRNA発現も上昇した。酢酸および1400Wの両方を投与したマウスでは、弱いながらも相加的なブラウニング増強効果が認められた。

マウス初代培養前駆脂肪細胞を用いた実験系において、酢酸はブラウニング関連分子の発現を増強したが、1400W添加で影響は認めなかった。同時添加による作用増強も認めなかった。

GPR43 shRNAの脂肪細胞への導入は、酢酸によるブラウニング関連分子の発現増強を有意に低下させた。1400W投与の系への影響は認めなかった。

高脂肪食負荷マウス由来マクロファージにおけるTACE、TNF α 、iNOSのmRNA発現はコントロール食負荷マウスに比べ上昇していた。さらに、マウス骨髄由来マクロファージにおいて1400W前処置にてTNF α によるTACE活性化が抑制された。TNF α によりTACEおよびiNOS発現が上昇した。1400W共培養にて、TNF α によるTACEおよびiNOS発現増強は阻害された。酢酸の添加はマクロファージ増殖を抑制した。

以上の検討により、(i)内臓脂肪蓄積や肥満で誘導されるTNF α やTACEの発現は脂肪細胞よりマクロファージに高度に誘導され、(ii)動物レベルで、高脂肪食誘導肥満によるTACE活性亢進がWATのブラウニングを阻害、一方1400WによるTACE活性抑制がブラウニングを促進する可能性を示した。さらに、(iii)細胞レベルで、TACE活性亢進がWATのブラウニングに抑制的に作用し、逆にTACE活性抑制がブラウニングを促進する可能性を示した。(iv) TACE活性抑制を達成した条件下に、動物へ酢酸を経口投与するとWATのブラウニングが増強することが判明した。加えて、(v) TNF α 受容体シグナルのJNK-iNOS経路の活性化がブラウニング阻害に作用しているが、iNOS特異的阻害薬1400Wの投与は動物レベル、細胞レベルでブラウニング促進的に作用しうる可能性が示された。

内臓脂肪組織TACEの発現や活性がTNF α →TNF α 受容体→JNK活性化→iNOS誘導により促進されること、肥満で活性化している同経路を阻害することでWATブラウニングが促進できるかも知れないという実験結果は、これまでの国内外の報告では未報告であり、当該分野におけるインパクトは大きいと考えられる。酢酸による効果がGRP43を介した効果であるのか、1400Wの効果がiNOS発現を介したものであるかを、発生学的・分子生物学的アプローチで確認する必要がある。また、酢酸とTACE阻害を同時達成することでブラウニング促進が起こり、エネルギー代謝および糖・脂質代謝の改善が得られるかの検討を行う必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計10件)

以下の論文は全て査読あり。

Murakami-Nishida S, Matsumura T, Senokuchi T, Ishii N, Kinoshita H, Yamada S, Morita Y, Nishida S, Motoshima H, Kondo T, Komohara Y, Araki E. Pioglitazone suppresses macrophage

- proliferation in apolipoprotein-E deficient mice by activating PPAR γ . *Atherosclerosis*. 286: 30-39, 2019. 【doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2019.04.229.】
- Goto R, Kondo T, Ono K, Kitano S, Miyakawa N, Watanabe T, Sakaguchi M, Sato M, Igata M, Kawashima J, Motoshima H, Matsumura T, Shimoda S, Araki E. Mineralocorticoid Receptor May Regulate Glucose Homeostasis through the Induction of Interleukin-6 and Glucagon-Like peptide-1 in Pancreatic Islets. *J Clin Med*. 8. pii: E674, 2019. 【doi: 10.3390/jcm8050674.】
- Kondo T, Nakamura M, Kawashima J, Matsumura T, Ohba T, Yamaguchi M, Katabuchi H, Araki E. Hyperemesis gravidarum followed by refeeding syndrome causes electrolyte abnormalities induced rhabdomyolysis and diabetes insipidus. *Endocr J*. 66: 253-258, 2019. 【doi: 10.1507/endocrj.EJ18-0496.】
- Kitano S, Kondo T, Matsuyama R, Ono K, Goto R, Takaki Y, Hanatani S, Sakaguchi M, Igata M, Kawashima J, Motoshima H, Matsumura T, Kai H, Araki E. Impact of hepatic HSP72 on insulin signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 316: E305-E318, 2019. 【doi: 10.1152/ajpendo.00215.2018.】
- Kondo T, Nakamura M, Kitano S, Kawashima J, Matsumura T, Ohba T, Yamaguchi M, Katabuchi H, Araki E: The clinical course and pathophysiological investigation of adolescent gestational diabetes insipidus: a case report. *BMC Endocr Disord* 18: 4, 2018. 【doi: 10.1186/s12902-018-0234-6.】
- Ono K, Igata M, Kondo T, Kitano S, Takaki Y, Hanatani S, Sakaguchi M, Goto R, Senokuchi T, Kawashima J, Furukawa N, Motoshima H, Araki E: Identification of microRNA that represses IRS-1 expression in liver. *PLoS One* 13: e0191553, 2018. 【doi: 10.1371/journal.pone.0191553.】
- Yamada S, Senokuchi T, Matsumura T, Morita Y, Ishii N, Fukuda K, Murakami S, Nishida S, Kawasaki S, Motoshima H, Furukawa N, Komohara Y, Fujiwara Y, Koga T, Yamagata K, Takeya M, Araki E: Inhibition of local macrophage growth ameliorates focal inflammation and suppresses atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 38: 994-1006, 2018. 【doi: 10.1161/ATVBAHA.117.310320.】
- Kondo T, Miyakawa N, Motoshima H, Hanatani S, Ishii N, Igata M, Yoshinaga K, Kukidome D, Senokuchi T, Kawashima J, Furukawa N, Matsumura T, Araki E: Impacts of the 2016 Kumamoto Earthquake on glycemic control in patients with diabetes. *J Diab Investig*. 10: 521-530, 2018. 【doi: 10.1111/jdi.12891.】
- Hanatani S, Motoshima H, Takaki Y, Kawasaki S, Igata M, Matsumura T, Kondo T, Senokuchi T, Ishii N, Kawashima J, Kukidome D, Shimoda S, Nishikawa T, Araki E. Acetate alters expression of genes involved in beige adipogenesis in 3T3-L1 cells and obese KK-Ay mice. *J Clin Biochem Nutr*. 59: 207-214, 2016. 【<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27895388>】
- Sada K, Nishikawa T, Kukidome D, Yoshinaga T, Kajihara N, Sonoda K, Senokuchi T, Motoshima H, Matsumura T, Araki E. Hyperglycemia Induces Cellular Hypoxia through Production of Mitochondrial ROS Followed by Suppression of Aquaporin-1. *PLoS One*. 11: e0158619, 2016. 【doi: 10.1371/journal.pone.0158619.】

〔学会発表〕(計 8 件)

本島寛之, 井形元維, 近藤龍也, 久木留大介, 花谷聡子, 吉永佳代, 瀬ノ口隆文, 河島淳司, 松村剛, 荒木栄一: 糖尿病腎症 4 期の患者への GLP-1 受容体作動薬 (GLP-1RA) 使用の効

果と注意点. 第56回日本糖尿病学会九州地方会. 2019年

氏川かおり, 本島寛之, 川畑まり, 上藤由美, 深水由美, 堤厚之, 堤悦朗, 岩下裕一, 荒木栄一, 山口康平: 当院におけるFGM(Flash Glucose Monitoring)使用経験とその効果. 第56回日本糖尿病学会九州地方会. 2019年

吹原美帆, 本島寛之, 前中あおい, 得能香菜子, 野口あかね, 上拾石智子, 近藤龍也, 長瀬博美, 三島裕子, 荒木栄一: 被災糖尿病患者への栄養指導の有用性: 被災早期の栄養指導は血糖管理の悪化を抑制するか?. 第56回日本糖尿病学会九州地方会. 2019年

得能香菜子, 本島寛之, 前中あおい, 吹原美帆, 野口あかね, 上拾石智子, 近藤龍也, 長瀬博美, 三島裕子, 荒木栄一: 被災糖尿病患者に対し早期に実施した栄養指導の有用性について. 第22回日本病態栄養学会年次学術集会. 2019年

本島寛之: 糖尿病診療に必要な知識(教育講演): 災害時の糖尿病診療 - 災害時に糖尿病患者を守るために -. 第52回糖尿病学の進歩. 2018年

本島寛之, 石井規夫, 西田健朗, 河島淳司, 久保田恭鼓, 久木留大介, 井形元維, 佐田公範, 花谷聡子, 高木優樹, 可徳美里, 三島裕子, 瀬ノ口隆文, 近藤龍也, 松村剛, 荒木栄一: 熊本地震の糖尿病関連入院への影響 入院レセプトデータからの入院理由・数の推定と被災患者支援のあり方. 第60回日本糖尿病学会年次学術集会. 2017年

本島寛之, 高木優樹, 花谷聡子, 川崎修二, 井形元維, 吉永佳代, 河島淳司, 瀬ノ口隆文, 近藤龍也, 松村剛, 古川昇, 荒木栄一: 正常およびGTG誘発性肥満マウスの肝における既知の細胞老化マーカーの検討. 第3回肝臓と糖尿病・代謝研究会. 2016年

花谷聡子, 本島寛之, 井形元維, 川崎修二, 高木優樹, 河島淳司, 近藤龍也, 吉永佳代, 瀬ノ口隆文, 荒木栄一: 酢酸の経口摂取による抗肥満作用の検討. 第54回日本糖尿病学会九州地方会. 2016年

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 近藤 龍也

ローマ字氏名: (Kondo, tatsuya)

所属研究機関名: 熊本大学

部局名: 医学部附属病院

職名: 講師

研究者番号(8桁): 70398204

研究分担者氏名: 松村 剛

ローマ字氏名: (Matsumura, takeshi)

所属研究機関名: 熊本大学

部局名: 大学院生命科学研究部

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 20398192

研究分担者氏名: 井形 元維

ローマ字氏名: (Igata, motoyuki)

所属研究機関名: 熊本大学

部局名: 医学部附属病院

職名：助教（寄附講座教員）
研究者番号（8桁）：40599099

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。