

令和元年6月12日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19532

研究課題名(和文)遊離脂肪酸の量的・質的变化と好中球の動態変化による内臓脂肪組織炎症の解明

研究課題名(英文) Free fatty acids-mediated dynamic changes of neutrophils induce adipose tissue inflammation

研究代表者

渡邊 康春 (Watanabe, Yasuharu)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・客員准教授

研究者番号：80646307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：肥満に伴い増加した遊離脂肪酸は、免疫細胞の浸潤を促し内臓脂肪組織(VAT)炎症を惹起・増悪することによって2型糖尿病の発症に深く関与する。本研究では遊離脂肪酸が引き金となりロイコトリエンB4が産生され、好中球がVATへと浸潤しることがわかった。また、好中球は脂肪細胞との相互作用によりNF-kappa B経路を介して炎症性サイトカインIL-1 beta前駆体をマクロファージよりも高発現することを見出した。好中球は成熟IL-1 betaを産生し、マクロファージの遊走因子であるS100A8を誘導することによってマクロファージのVAT浸潤を促進し、早期VAT炎症に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者は、遊離脂肪酸の増加が1つのトリガーとなり、好中球がVATに浸潤し、脂肪細胞と相互作用することによりVAT炎症やマクロファージの浸潤に関与する一連のVAT炎症の誘導機序を見出した。本研究により、好中球はマクロファージよりも早期のVAT炎症に大きく寄与していることから、好中球は2型糖尿病の予防薬や機能性食品のターゲットの1つになりうることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：Obesity-associated adipose tissue inflammation contributes to the development of type 2 diabetes. In obese adipose tissue, free fatty acids (FFAs) are released from hypertrophied adipocytes and considered as trigger for adipose tissue inflammation by recruiting immune cells including macrophages. In this study, we found that FFAs induce the infiltration of neutrophils into adipose tissue via LTB4 production from adipose tissue. Infiltrated neutrophils interacted with adipocytes and increased pro-IL-1 beta expression through NF-kappa B pathway activation. IL-1 beta was produced from neutrophils and induced S100A8 production from adipocytes, which promoted macrophage infiltration into adipose tissue and exacerbated the inflammation. We have provided novel insights related to adipose tissue neutrophils and IL-1 beta, and dissected their roles in the initiation of adipose tissue inflammation.

研究分野：免疫学

キーワード：好中球 脂肪細胞 IL-1 beta 内臓脂肪組織 炎症

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

1. 研究開始当初の背景

肥満に伴う内臓脂肪組織 (Visceral Adipose Tissue: VAT) の慢性炎症が、インスリン抵抗性を誘導し糖尿病に病態を誘発することが明らかになっている。肥満に伴い脂肪細胞に蓄積した中性脂肪は、必要に応じて脂肪酸とグリセロールに分解され、遊離した脂肪酸は心臓や骨格筋等の重要なエネルギー源となる。しかし肥満状態においては、脂肪細胞の脂肪分解の亢進や遊離脂肪酸のクリアランスの低下によって、血中の脂肪酸濃度が増加し、小胞体ストレスや自然免疫センサーを介した VAT 炎症が誘導される。

これまで、その VAT の慢性炎症を誘導する免疫細胞として、マクロファージが最も精力的に解析されてきた。マクロファージは、Toll-like receptor 4 や NLRP3 インフラマソームによってパルミチン酸等の飽和脂肪酸を認識して活性化し、TNF- α や IL-1 β 等の炎症性サイトカイン産生を誘導してインスリンシグナルの障害に関与することが知られている。しかし、VAT にはマクロファージ以外にも様々な免疫細胞が存在し、その中でも好中球は高脂肪食摂取後、最も早期に VAT に浸潤し、マクロファージを動員して炎症反応およびインスリン抵抗性を誘導することが明らかになっている (*Nat. Med.* 18:1407, 2012, *Cell Metab.* 17:534, 2013)。従って、好中球は VAT 炎症の誘導早期に重要な免疫細胞の 1 つと考えられている。しかし、VAT 好中球の性状や動態については不明な点が多く、遊離脂肪酸と好中球の関係については殆どわかっていない。

2. 研究の目的

研究代表者は、定常状態において VAT の好中球がマクロファージよりも IL-1 β を高発現し、その発現増加には脂肪細胞とのクロストークが重要であることを見出した。すなわち、このような VAT 好中球の性状が、肥満状態において好中球が早期に活性化する要因の 1 つと考えられた。また、遊離脂肪酸が引き金となり、マクロファージよりも先行して、多数の好中球が VAT に浸潤し、IL-1 β を産生して VAT 炎症やインスリンシグナル障害に関与することも見出した。

そこで本研究では、遊離脂肪酸増加に伴う好中球による VAT 炎症の惹起・増悪機序を解明するため、次の点を明らかにする。

- (1) 遊離脂肪酸の増加による好中球の VAT 浸潤に関与する遊走因子の同定
- (2) 脂肪細胞との相互作用による好中球の活性化機序の解明
- (3) IL-1 β 産生の誘導機構
- (4) 好中球によるマクロファージの VAT 浸潤促進機序の解析

3. 研究の方法

(1) 遊離脂肪酸の増加による好中球の VAT 浸潤に関与する遊走因子の同定

研究代表者は、脂肪細胞に発現する β 3-アドレナリン受容体のアゴニスト CL316,243 のマウス腹腔内投与により遊離脂肪酸増加し、VAT のケモカイン (CXCL1, 2, 5) や脂質メディエーターであるロイコトリエン B4 (LTB4) などの遊走因子が増加することを見出している。

好中球の VAT 浸潤にどの遊走因子が関与するのか同定するため、CXCL1, 2, 5 のレセプター CXCR2 の阻害剤や CXCL2 中和抗体の投与が、CL316,243 投与による好中球の VAT 浸潤を抑制するのか、フローサイトメトリー法により細胞数を解析した。

LTB4 の関与を明らかにするため、CL316,243 投与後 VAT を期間培養し、上清中の LTB4 を ELISA 法により定量した。さらに LTB4 の生合成酵素である 5-リボキシゲナーゼ (5-Lox) 欠損マウスに CL316,243 を投与し、野生型マウスと比較して好中球の VAT 浸潤が軽減するのか細胞数を解析した。

(2) 脂肪細胞との相互作用による好中球の活性化機序の解明

脂肪細胞との相互作用による好中球の活性化が、接触性相互作用と液性因子のどちらに因るのか明らかにする。トランスウェルを用いて 3T3-L1 脂肪細胞と骨髄由来好中球を分離しながら共培養し、好中球の活性化を IL-1 β の遺伝子発現を指標にリアルタイム PCR 法で解析した。コントロールとして、3T3-L1 脂肪細胞と共培養していない好中球を用いた。IL-1 β の発現増加には、NF- κ B 経路の活性が重要であることが報告されている。そこで、3T3-L1 脂肪細胞と骨髄由来好中球の共培養による IL-1 β の発現増加が、IKK 阻害剤によって抑制されるのかリアルタイム PCR 法で解析した。

脂肪組織の好中球と骨髄由来好中球をセルソーターで単離し、NF- κ B P65 の核内移行を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(3) IL-1 β 産生の誘導機構

遊離脂肪酸による好中球の IL-1 β 産生に、インフラマソームの活性化が必須であるのか明らかにする。NLRP3 インフラマソームの構成成分である NLRP3, ASC, ICE (Caspase-1/11) の遺伝子欠損マウスに CL316,243 を投与し、IL-1 β による好中球の VAT 浸潤が、遺伝子欠損マウスで軽減するのかフローサイトメトリー法で解析した。

(4) 好中球によるマクロファージの VAT 浸潤促進機序の解析

好中球によるマクロファージの VAT 浸潤因子を調べるため、3T3-L1 脂肪細胞と骨髄由来好中球の共培養により増加するマクロファージ遊走因子の遺伝子発現変化を DNA マイクロアレイで網羅的に解析した。

好中球を抗 Gr-1 抗体で除去し、高脂肪食摂餌によるマクロファージの VAT 浸潤やマクロファージに遊走因子の発現増加が、好中球の除去により抑制されるのかフローサイトメトリー法で解析した。さらに、5-Lox 遺伝子欠損マウスは、高脂肪食摂餌による好中球の VAT 浸潤が軽減し、高脂肪食摂餌した野生型マウスの VAT で増加するマクロファージ遊走因子の遺伝子発現が、5-Lox 欠損マウスの VAT で軽減するのか調べた。

IL-1 β によりマクロファージに遊走因子の遺伝子発現が増加するのか、3T3-L1 脂肪細胞ならびに VAT の器官培養に IL-1 β を添加しリアルタイム PCR 法で解析した。

4. 研究成果

(1) 遊離脂肪酸の増加による好中球の VAT 浸潤に関与する遊走因子の同定

CXCL1,2,5 のレセプター CXCR2 の阻害剤、Anti-CXCL2 中和抗体は、CL316,243 投与により好中球の VAT 浸潤を抑制しなかった。一方、CL316,243 投与により、VAT から LTB4 が産生されることがわかった。また、5-Lox 欠損マウスは、CL316,243 投与によるから LTB4 の産生が顕著に軽減し、好中球の VAT 浸潤が抑制された。

以上より、CL316,243 投与による遊離脂肪酸の増加に伴い LTB4 が VAT から産生され、LTB4 が好中球の VAT 浸潤に関与することが示唆された。

(2) 脂肪細胞との相互作用による好中球の活性化機序の解明

骨髄由来好中球と脂肪細胞株のトランスウェルを用いて共培養では、IL-1 β の遺伝子発現は増加しなかったことから、接触性の相互作用が IL-1 β の発現に重要であることがわかった。また、接触性共培養による IL-1 β の発現増加は IKK 阻害剤により抑制された。さらに VAT 好中球は NF- κ B p65 の核内移行が骨髄由来の好中球より亢進していたことから、VAT 好中球は脂肪細胞との相互作用により NF- κ B 経路を介して、IL-1 β の発現を増加することが示唆された。

(3) IL-1 β 産生の誘導機構

CL316,243 投与による好中球の VAT 浸潤は、ASC 欠損または ICE 欠損マウスでは著減していたが、NLRP3 欠損マウスでは野生型マウスと同程度であった。従って、NLRP3 非依存性の ASC 依存性のインフラマソームが好中球の IL-1 β 産生に関与することが示唆された。

(4) 好中球によるマクロファージの VAT 浸潤促進機序の解析

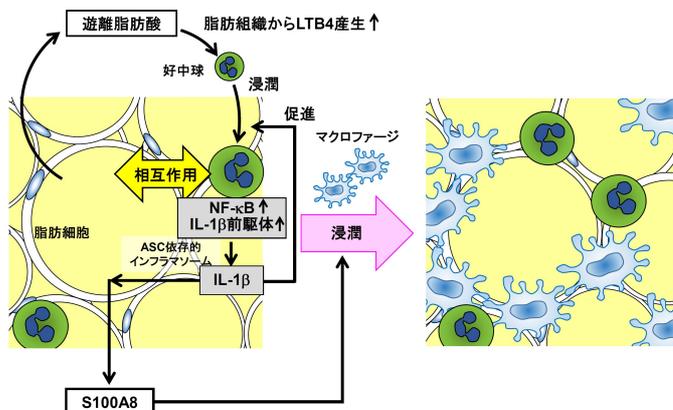
3T3-L1 脂肪細胞と骨髄由来好中球の共培養による遺伝子変化を DNA マイクロアレイで網羅的に解析し、遺伝子発現が 2 倍以上に変化する 58 遺伝子を同定した。その中には、マクロファージの VAT 浸潤に関与する遊走因子 S100-Calcium-Binding Protein A8 (S100A8) も含まれていた。抗体を用いた好中球の除去により、高脂肪食摂餌によって誘導される VAT の S100A8 の発現増加が軽減し、マクロファージの VAT 浸潤も軽減した。さらに 5-Lox 遺伝子欠損マウスでは、高脂肪食摂餌による好中球の VAT 浸潤が軽減し、VAT における S100A8 の発現が軽減すると共にマクロファージの VAT 浸潤も軽減することを確認した。また、IL-1 β で 3T3-L1 脂肪細胞や VAT を刺激することにより、S100A8 の発現が増加することを見出した。さらに、IL-1 β の産生に関与する ASC の欠損マウスは、高脂肪食摂餌による VAT の IL-1 β 産生が軽減し、S100A8 の発現やマクロファージの VAT 浸潤も軽減した。

まとめ

研究代表者は、図に示す肥満に伴い増加する遊離脂肪酸が引き金となる、好中球を中心にした VAT 炎症の惹起・増悪機構を予想している。遊離脂肪酸の増加に伴い、VAT から LTB4 が産生され、好中球が先だって VAT に浸潤する。浸潤した好中球は、脂肪細胞との接触性

相互作用により NF- κ B 経路を介して IL-1 β 前駆体を高発現する。NLRP3 非依存性 ASC 依存性インフラマソームの活性化により産生された成熟 IL-1 β は、好中球の VAT 浸潤の促進やインスリンシグナルの障害に関与する。更に、脂肪細胞の S100A8 の発現を誘導し、マクロファージの VAT 浸潤を促進し、炎症の増悪の起点になることが示唆された。

好中球による内臓脂肪組織炎症の誘導機構



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- Okamoto N, Mizote K, Honda H, Saeki A, Watanabe Y, Yamaguchi-Miyamoto T, Fukui R, Tanimura N, Motoi Y, Akashi-Takamura S, Kato T, Fujishita S, Kimura T, Ohto U, Shimizu T, Hirokawa T, Miyake K, Fukase K, Fujimoto Y, Nagai Y, Takatsu K. Funiculosin variants and phosphorylated derivatives promote innate immune responses via the Toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor-2 complex. *J. Biol. Chem.* 292(37):15378-15394, 2017. DOI:10.1074/jbc.M117.791780. 査読あり
- Watanabe Y, Nagai Y, Honda H, Okamoto N, Yamamoto S, Hamashima T, Tanaka M, Suganami T, Sasahara M, Miyake K, Takatsu K. Isoliquiritigenin Attenuates Adipose Tissue Inflammation *in vitro* and Adipose Tissue Fibrosis through Inhibition of Innate Immune Responses in Mice. *Sci. Rep.* 6:23097, 2016. DOI:10.1038/srep23097. 査読あり
- Takikawa A, Mahmood A, Nawaz A, Kado T, Okabe K, Yamamoto S, Aminuddin A, Senda S, Tsuneyama K, Ikutani M, Watanabe Y, Igarashi Y, Nagai Y, Takatsu K, Koizumi K, Imura J, Goda N, Sasahara M, Matsumoto M, Saeki K, Nakagawa T, Fujisaka S, Usui I, Tobe K. HIF-1 in Myeloid Cells Promotes Adipose Tissue Remodeling Toward Insulin Resistance. *Diabetes* 65(12):3649-3659, 2016. DOI:10.2337/db16-0012. 査読あり
- Jennings RT, Odkhuu E, Nakashima A, Morita N, Kobayashi T, Yamai I, Tanaka M, Suganami T, Haga S, Ozaki M, Watanabe Y, Nagai Y, Takatsu K, Kikuchi-Ueda T, Ichimonji I, Ogawa Y, Takagi H, Yamazaki T, Miyake K, Akashi-Takamura S. Inflammatory responses increase secretion of MD-1 protein. *Int. Immunol.* 28(10):503-512, 2016. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxw031>. 査読あり
- Nakamura T, Nishibu A, Yoshida N, Yasoshima M, Anzawa K, Watanabe Y, Nagai Y, Takatsu K, Ogawa K, Mochizuki T. Glycyrrhetic acid inhibits contact hypersensitivity induced by trichophytin via dectin-1. *Exp. Dermatol.* 25(4):299-304, 2016. DOI: 10.1111/exd.12931. 査読あり

〔学会発表〕(計 11 件)

- Watanabe Y, Nagai Y, Takatsu K. Crosstalk between neutrophils and adipocytes exacerbates adipose tissue inflammation in progression of type 2 diabetes. 5th Toyama-Basel Joint Symposium, 2018, 8, 23-24, Toyama, Japan.
- 渡邊康春, 長井良憲, 高津聖志: 遊離脂肪酸を起点とした好中球と脂肪細胞との相互作用は、IL-1 産生とマクロファージの内臓脂肪組織浸潤に関与する. 第 39 回日本炎症・再生医学会, 2018, 7, 11, 東京
- 本田裕恵, 渡邊康春, 長井良憲, 松永孝之, 岡本直樹, 平井嘉勝, 高津聖志: 糖尿病モデルマウスの内臓脂肪組織に対するイソリクイリチゲニンの抗炎症・抗線維化作用の解析. 日本薬学会 第 138 年会, 2018, 3, 26, 金沢.

4. Watanabe Y, Nagai Y, Takatsu K: The interaction of neutrophils with adipocytes plays a key role in the infiltration of macrophage into the adipose tissue. 第46回日本免疫学会学術集会, 2017, 12, 12, 宮城.
5. Watanabe Y, Nagai Y, Takatsu K: Adipose tissue neutrophils are primed by the interaction with adipocytes. 第45回日本免疫学会学術集会, 2016, 12, 7, 沖縄.
6. 大山拓郎, 富田勇, 螺澤太郎, 松本隼, 守田雅志, 渡辺志朗, 渡邊康春, 長井良憲, 高津聖志, 山本誠二, 石井陽子, 笹原正清, 今中常雄: 骨髄移植による副腎白質ジストロフィー 発症抑制機構の解明: レシピエントマウスの生化学的解析. 第128回薬学会北陸支部会, 2016, 11, 27, 石川.
7. 渡邊康春: メタボリック症候群の基盤病態である内臓脂肪組織の炎症・線維化機序の解析とそれを制御する天然物の探索, 第9回北陸合同バイオシンポジウム, 2016, 11, 4, 福井.
8. 渡邊康春, 長井良憲, 本田裕恵, 高津聖志: 天然薬物イソリクイリチゲニンは自然免疫系に作用し、内臓脂肪組織の線維化を抑制する. 第37回日本肥満学会, 2016, 10, 8, 東京.
9. 本田裕恵, 渡邊康春, 長井良憲, 松永孝之, 岡本直樹, 平井嘉勝, 高津聖志: 甘草成分イソリクイリチゲニンは内臓脂肪組織の炎症・線維化を抑制する. 日本生薬学会第63回年会, 2016, 9, 25, 富山.
10. Watanabe Y, Nagai Y, Takatsu K. The exploration of innate immune sensors and natural products that regulate obesity-associated adipose tissue inflammation, 4th Toyama-Basel Joint Symposium on Pharmaceutical Research and Drug Development, 2016, 8, 26, Basel, Switzerland.
11. 渡邊康春, 長井良憲, 高津聖志: TLRのアダプター分子 TRIF を介した視床下部炎症と摂食制御異常の解析. 第37回日本炎症・再生医学会, 2016, 6, 17, 京都.

〔図書〕(計1件)

1. Nagai Y, Watanabe Y, Honda H, Takatsu K. Chapter 8 Isoliquiritigenin: A unique licorice component that attenuates adipose tissue inflammation and fibrosis by targeting the innate immune sensors. In “Biological activities and action mechanisms of licorice ingredients” (Ed. by H. Sakagami), InTech, Zagreb, pp. 121-134, ISBN 978-953-51-3119-9, 2017.

〔その他〕

ホームページ

<http://www.med.u-toyama.ac.jp/immbio/>

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名: 高津 聖志

ローマ字氏名: TAKATSU, Kiyoshi)

所属研究機関名: 富山大学

部局名: 大学院医学薬学研究部(医学)

職名: 客員教授

研究者番号: 10107055

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 長井 良憲

ローマ字氏名: NAGAI, Yoshinori)

所属研究機関名: 富山県立大学

部局名: 工学部

職名: 教授

研究者番号: 30431761