

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：32666  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2017～2020  
課題番号：17K10526  
研究課題名(和文) 外科侵襲における脂肪組織のミトコンドリア/小胞体ストレス誘導性アポトーシスの解明  
研究課題名(英文) Mitochondrial/endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in adipose tissue during surgical stress  
研究代表者  
松谷 毅 (Matsutani, Takeshi)  
日本医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：50366712  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：外科的侵襲によって誘導されるアポトーシスと小胞体ストレスの関連を解明することを目的とする。内臓脂肪型肥満マウスCLP後の生存率を観察し、脂肪組織中のA1AT発現量との関連とラパマイシン投与による効果を解析した。siRNA導入でA1ATを欠損した脂肪細胞株にタプシガルギンで小胞体ストレスを誘導した場合と、タプシガルギン処置した後にラパマイシンで処置した場合で、炎症性サイトカインやCHOP発現を測定した。脂肪細胞でのA1AT発現とラパマイシンによる小胞体ストレスの軽減は炎症の過剰反応を阻止し、脂肪組織の機能破綻を改善した。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

外科的侵襲によって誘導される細胞死に小胞体ストレスによるアポトーシスが関与していることが解明された。内臓脂肪細胞にA1ATが発現し、過剰な炎症性アディポカイン産生を抑制していること、さらにA1ATは小胞体ストレス活性化に伴う脂肪組織の機能障害を防御していることが示された。またmTORシグナル経路の阻害が小胞体ストレスを伴うアディポカイン産生異常を抑制するのであれば、小胞体ストレスの軽減は脂肪組織の機能破綻や生存率を改善する可能性が考えられた。外科的侵襲と小胞体ストレスとの機構を考慮した手術侵襲後の合併症・臓器障害の病態解明は外科学にとって極めて重要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the relationship between apoptosis induced by surgical stress and endoplasmic reticulum (ER) stress, we will examine (1) whether alpha-1 antitrypsin (A1AT) expression in adipocytes plays a role in regulating inflammation in adipocytes under endoplasmic reticulum stress and (2) whether rapamycin, which reduces endoplasmic reticulum stress, inhibits apoptosis induced by surgical stress. The survival rate after CLP in visceral obese mice was observed, and the relationship between (1) A1AT expression in adipose tissue and (2) the effect of rapamycin administration was analyzed. Inflammatory cytokines and CHOP expressions were measured in adipocytes lacking A1AT by siRNA transduction and ER stress induced by thapsigargin, and in adipocytes treated with thapsigargin followed by rapamycin. A1AT expression in adipocytes and reduction of ER stress by rapamycin prevented the overreaction of inflammation and improved the functional breakdown of adipose tissue.

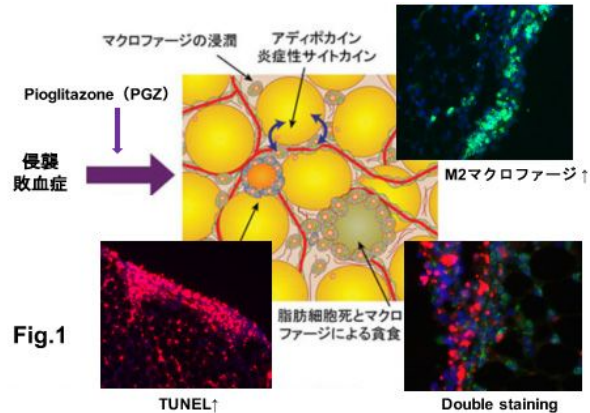
研究分野：医歯薬学

キーワード：脂肪細胞 小胞体ストレス アポトーシス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

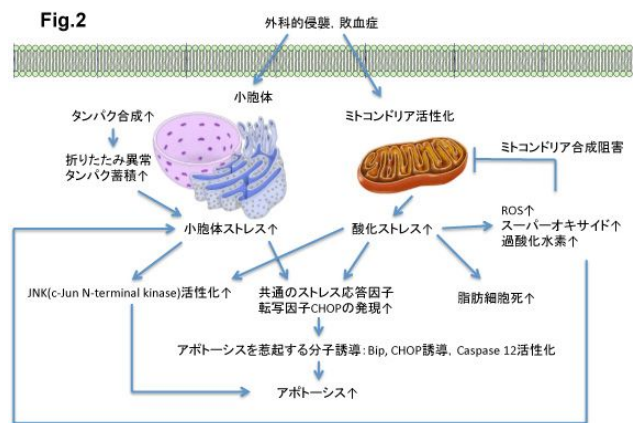
### 1. 研究開始当初の背景

Metabolic syndrome では、M1 (炎症性) M2 (抗炎症性) マクロファージが脂肪組織に浸潤し、脂肪細胞や他の免疫細胞とコミュニケーションして炎症プロセスを制御している (Fig.1) . われわれは外科的侵襲後の生体防御反応においても脂肪組織が免疫細胞として重要な役割を担い、脂肪組織へ浸潤した M1/M2 マクロファージと脂肪細胞のクロストーク機構が細胞・臓器障害の病態と密接に関連していること、細胞・臓器障害の機序としてアポトーシスが一因であることを報告してきた . 最近では、アポトーシスの原因として DNA 障害に加えて、細胞内オルガネラであるミトコンドリア機能障害や小胞体機能の破綻 (小胞体ストレス) が関与する経路が存在することが明らかとなり、metabolic syndrome においてもその重要性が認識され研究が進められている . また酸化ストレスと小胞体ストレスの間にはクロストーク機構が存在すると報告されている (Fig.2) .



肥満に起因する小胞体ストレスあるいはミトコンドリアによる酸化ストレスは、脂肪組織における低悪性度の慢性炎症の原因となる . 肥満によるこれらのストレスは、脂肪組織における低悪性度の慢性炎症の原因となり、糖尿病や脂質異常症などの代謝異常を引き起こす可能性がある .

外科的侵襲によって誘導される細胞死にもミトコンドリアによる酸化ストレスや小胞体ストレスによるアポトーシス経路が関与していることが推測される . また酸化ストレスと小胞体ストレスとのクロストーク機構を解明し、これを考慮した手術侵襲後の合併症・臓器障害の病態解明は外科学にとって極めて重要であると考えられる .



### 2. 研究の目的

外科的侵襲による脂肪・間質細胞の炎症反応において、小胞体ストレス応答反応や誘導性アポトーシス経路の関与を明らかにする .

#### 【脂肪組織における A1AT 発現と敗血症の関連】

臓器保護作用を示す循環型セリンプロテアーゼインヒビター- $\alpha$ -1 アンチトリプシン (A1AT) がマウスの脂肪組織や脂肪細胞に高発現していることから、小胞体ストレス下の脂肪細胞における A1AT の発現が、脂肪細胞のホメオスタシスと炎症の制御に果たす役割を盲腸結紮穿刺術 (CLP) 施行した敗血症モデル動物とヒト脂肪細胞を用いて明らかにする .

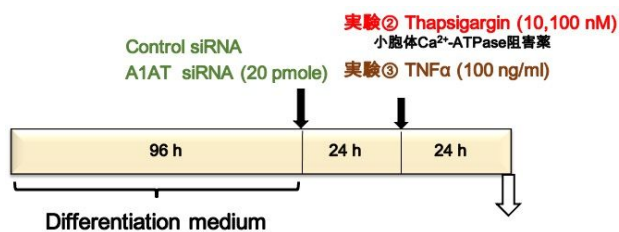
#### 【小胞体ストレス誘発後の脂肪細胞機能に及ぼすラパマイシンの作用】

mTORC1 阻害薬であるラパマイシンは、小胞体ストレスを軽減し、オートファジーを促して小胞体ストレス誘導性のアポトーシスを抑制することが報告されている . 内臓脂肪型肥満マウスの CLP を施行した敗血症モデルでの内臓脂肪の小胞体ストレスとラパマイシンの影響を検討し、さらに薬剤性に小胞体ストレスを負荷し、マクロファージと共培養した脂肪細胞の機能変化とラパマイシン投与の影響を明らかにする .

### 3. 研究の方法

#### 【脂肪組織における A1AT 発現と敗血症の関連】

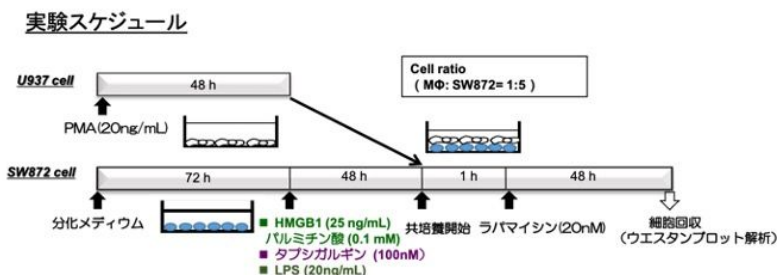
内臓脂肪型肥満 (TSOD) マウスとその対照動物 (TSNO) における CLP 後の生存率を比較し、脂肪組織中の A1AT 発現を解析する。 *in vitro* 敗血症モデルとして A1AT siRNA で導入し A1AT を欠損した培養ヒト脂肪前駆細胞株 SW872 培養系に化学的に小胞体ストレス惹起因子タブシガルギンを用いて小胞体ストレスを誘導し、アディポカイン発現を qRT-PCR 法、メディウム中 IL-6 レベルは ELISA にて定量する。



### 【小胞体ストレス誘発後の脂肪細胞機能に及ぼすラパマイシンの作用】

TSOD マウスと TSNO マウスまた他の非肥満マウス系統 (IVCS 系と ddy 系) における CLP 後の生存率を比較した。マウスは、sham, CLP, CLP にラパマイシン 1mg/kg を腹腔内投与した 3 群を作成し、術後 24 時間に腹腔内脂肪組織を採取、溶解し抽出したタンパク質で核内蛋白の CHOP と小胞体内蛋白の GRP78 をウエスタンブロットで解析し、脂肪組織のパラフィン切片を作成し、TUNEL 法でアポトーシス細胞の検出する。

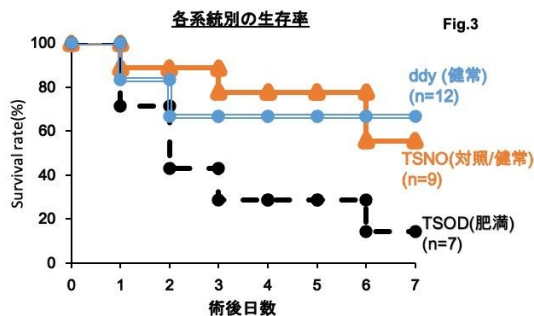
タブシガルギン 100 nM 処置したヒト脂肪前駆細胞 SW872 と分化誘導させた組織球性リンパ腫細胞株 U937 を Cell ratio が 5:1 になるように共培養させ、1 時間後にラパマイシン 20nM で処置。さらに LPS またはタブシガルギンで処理し、48 時間培養。回収した脂肪細胞から IL-6 mRNA 量を qRT-PCR、GRP78/Bip と CHOP 蛋白量をウエスタンブロットで解析する。



## 4. 研究成果

### 【脂肪組織における A1AT 発現と敗血症の関連】

TSOD マウスは CLP 後 2 日にて全例が死亡し、敗血症誘発による TSOD マウスの死亡率が TSNO, ddy 系マウスと比較して高かった (Fig.3)。小胞体ストレスマーカーである CCAAT-Enhancer-Binding protein homologous protein (CHOP) は、TSNO では CLP で増加し、TSOD では sham 群でも CHOP 発現が認められ、内臓脂肪型肥満マウスで小胞体ストレスが強く誘導されていた。敗血症誘起マウスの脂肪組織内 A1AT 発現量は、TSOD マウスでは著しく低下していたが、肝臓と比べ高値であった。CLP 群は Sham 群と比較して低下していた。



脂肪細胞培養系における IL-6 発現並びに分泌量は小胞体ストレス惹起因子タブシガルギン処置で促進され、この上昇は A1AT 処置により抑制された。Control siRNA あるいは A1AT siRNA (20 pmol) で導入した分化した脂肪細胞で、小胞体ストレスマーカーの CHOP は、タブシガルギン (100nM) によって誘導されたが、A1AT を欠損した脂肪細胞では、CHOP の誘導が低下した。タブシガルギン処置により A1AT 発現は上昇した (Fig.4)。タブシガルギンは、脂肪細胞の構成的 IL-1、IL-6、IL-8 発現量を著しく上昇させた。このタブシガルギンによるこれらの上昇は A1AT ノックダウンにより増強され、また TNF $\alpha$  誘導性の炎症性サイトカイン遺伝子の発現量も増加させた (Fig.5)。

以上の結果から、内臓脂肪細胞において A1AT が発現し、過剰な炎症性アディポカイン産生を抑制していること、さらに A1AT は小胞体ストレス活性化に伴う脂肪組織の機能障害を防御していることが示唆された。

Fig.4

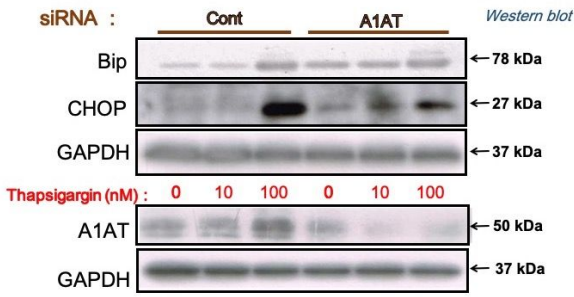
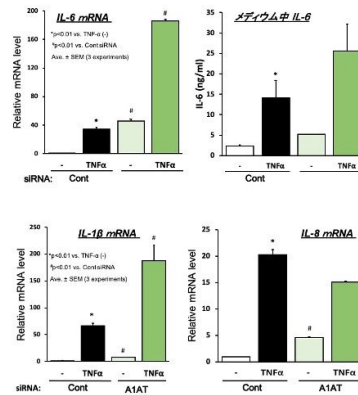


Fig.5



【小胞体ストレス誘発後の脂肪細胞機能に及ぼすラパマイシンの作用】

TSOD は、CLP 後 2 日目に全例が死亡したのに対し、TSNO は 1 週間以上生存した。IVCS 系と ddy 系の 7 日目の生存率は、それぞれ 25、30%であった (Fig.6)。また、TSOD への術後のラパマイシン投与による生存率の改善効果はなかった。

小胞体ストレス応答因子の発現レベルは、TSNO より TSOD で高かった。小胞体分子シャペロン GRP78/Bip の発現は、CLP により低下し、ラパマイシン投与で回復したが、CHOP 蛋白量に変化はなかった。

TSOD の CLP 後に脂肪組織中で TUNEL 陽性のアポトーシス細胞が出現したが、ラパマイシン投与により減少する傾向がみられた (Fig.7)。

培養脂肪細胞における小胞体ストレス負荷時のアディポカインの変化とラパマイシンの効果：アディポカインである IL-6 の mRNA 発現は、タプシガルギン処置により有意に促進され、ラパマイシン処理により抑制される傾向にあった。LPS またはタプシガルギンとラパマイシンを処置した脂肪細胞にける小胞体ストレス

因子による ER ストレス応答因子量の変化：タプシガルギン処置は、小胞体分子シャペロン GRP78/Bip 量を低下させたが、CHOP 蛋白量を増加させた。この CHOP の増加はラパマイシン処置により抑制された (Fig.8)。内在性 ER ストレス因子として用いた HMGB1/パルミチン酸蛋白量は、ラパマイシン処置による有意な変化はなかった。

以上の結果から、内臓脂肪型肥満では CLP 後に死亡に至る数が、健常動物と比べて有意に高いことが判明した。CLP により脂肪細胞において小胞体ストレスがかかり、GRP78/Bip が消費されること、また脂肪組織中のアポトーシス細胞はラパマイシン投与により減少することから、mTOR の阻害は一部、小胞体ストレスを軽減したと考えられるが、その効果は生存率改善にまでには至らなかった。タプシガルギン処置した培養脂肪細胞では、IL-6 の mRNA 量および CHOP 蛋白量が上昇し、ラパマイシンで抑制された。ラパマイシンは、小胞体ストレスの軽減とアディポカイン発現を制御し、脂肪組織の機能破綻を改善する可能性が示唆された。

Fig.6

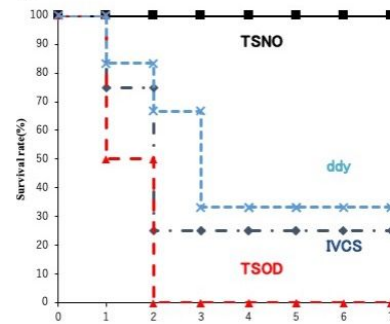


Fig.7

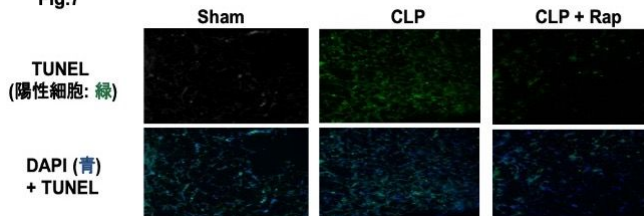
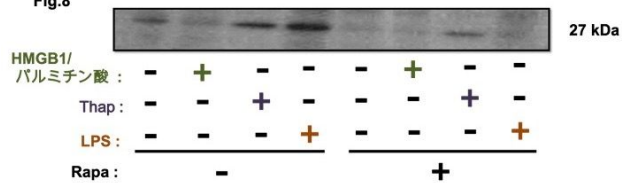


Fig.8



今後の展望および課題：in vivo での mTOR シグナルの阻害によるアディポカイン発現・産生の変化については検討しなければならないが、もし mTOR シグナル経路の阻害が小胞体ストレスを伴うアディポカイン産生異常を抑制するのであれば、小胞体ストレスの軽減は脂肪組織の機能破綻や生存率を改善する可能性が示唆された。

PPAR- アゴニスト投与による脂肪細胞・マクロファージ機能の変化と小胞体・ミトコンドリアによる酸化ストレス誘導性アポトーシスとの関連は、十分な結果が得られていないため遅れているが、これらの機序の解明も重要である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

|                                                                                                                                                                                         |                         |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Matsuda Akihisa, Yamada Marina, Matsumoto Satoshi, Sakurazawa Nobuyuki, Kawano Youichi, Sekiguchi Kumiko, Yamada Takeshi, Matsutani Takeshi, Miyashita Masao, Yoshida Hiroshi | 4. 巻<br>86              |
| 2. 論文標題<br>Blood Galectin-3 Levels Predict Postoperative Complications after Colorectal Cancer Surgery                                                                                  | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Nippon Medical School                                                                                                                                              | 6. 最初と最後の頁<br>142 ~ 148 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1272/jnms.JNMS.2019_86-302                                                                                                                                | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）                                                                                                                                                   | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>松田明久, 宮下正夫, 山田真吏奈, 関口久美子, 松谷 毅, 内田英二                                                                                                                                          | 4. 巻<br>42              |
| 2. 論文標題<br>炎症と脂質メディエーター                                                                                                                                                                 | 5. 発行年<br>2018年         |
| 3. 雑誌名<br>ICUとCCU                                                                                                                                                                       | 6. 最初と最後の頁<br>9-16      |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし                                                                                                                                                           | 査読の有無<br>無              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難                                                                                                                                                  | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>松田明久, 宮下正夫, 山田真吏奈, 松本智司, 櫻澤信行, 川野陽一, 関口久美子, 松谷 毅, 山田岳史, 吉田 寛                                                                                                                  | 4. 巻<br>21              |
| 2. 論文標題<br>脂質メディエーターからみた外科侵襲学の新知見                                                                                                                                                       | 5. 発行年<br>2018年         |
| 3. 雑誌名<br>エンドトキシン・自然免疫研究                                                                                                                                                                | 6. 最初と最後の頁<br>12-17     |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし                                                                                                                                                           | 査読の有無<br>無              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難                                                                                                                                                  | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>Matsutani T, Tamura K, Kutsukake M, Matsuda A, Tachikawa E, Uchida E.                                                                                                         | 4. 巻<br>40              |
| 2. 論文標題<br>Impact of Pioglitazone on Macrophage Dynamics in Adipose Tissues of Cecal Ligation and Puncture-Treated Mice                                                                 | 5. 発行年<br>2017年         |
| 3. 雑誌名<br>Biol Pharm Bull                                                                                                                                                               | 6. 最初と最後の頁<br>638-644   |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1248/bpb.b16-00883                                                                                                                                        | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）                                                                                                                                                   | 国際共著<br>該当する            |

|                                                                                                                                                               |                      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| 1. 著者名<br>Yukari Ando, Akito Kuroda, Kazuya Kusama, Takeshi Matsutani, Akihisa Matsuda, Kazuhiro Tamura                                                       | 4. 巻<br>26           |
| 2. 論文標題<br>Impact of serine protease inhibitor alpha1-antitrypsin on expression of endoplasmic reticulum stress-induced proinflammatory factors in adipocytes | 5. 発行年<br>2021年      |
| 3. 雑誌名<br>Biochemistry and Biophysics Reports                                                                                                                 | 6. 最初と最後の頁<br>100967 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.bbrep.2021.100967                                                                                                       | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている(また、その予定である)                                                                                                                         | 国際共著<br>-            |

〔学会発表〕 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

|                                         |
|-----------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>松谷 毅                         |
| 2. 発表標題<br>敗血症誘発性小胞体ストレス反応に及ぼすラバマイシンの作用 |
| 3. 学会等名<br>第120回日本外科学会定期学術集会            |
| 4. 発表年<br>2020年                         |

|                                                      |
|------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>黒田陽仁, 田村和弘, 安藤友香理, 吉江幹浩, 松谷 毅, 松田明久, 内田英二 |
| 2. 発表標題<br>脂肪組織における 1-アンチトリプシン発現と敗血症発症における意義         |
| 3. 学会等名<br>第33回日本Shock学会総会                           |
| 4. 発表年<br>2018年                                      |

|                                                                         |
|-------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>松田明久, 関口久美子, 山田真吏奈, 横室茂樹, 松本智司, 櫻澤信行, 川野陽一, 松谷 毅, 宮下正夫, 吉田 寛 |
| 2. 発表標題<br>血中Osteopontin値は消化器手術における術後合併症予測因子である                         |
| 3. 学会等名<br>第33回日本Shock学会総会                                              |
| 4. 発表年<br>2018年                                                         |

|                                                    |
|----------------------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>黒田陽仁、田村和広、松谷 毅、松田明久、内田英二、吉江幹浩、桑原直子、立川英一 |
| 2. 発表標題<br>敗血症モデルにおける内臓脂肪内SerpinA1aの発現と その意義について   |
| 3. 学会等名<br>第137回日本薬理学会関東支部会                        |
| 4. 発表年<br>2017年                                    |

|                                                                    |
|--------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>松谷 毅、田村 和弘、谷合 信彦、水谷 聡、千原 直人、埴 秀暁、三島 圭介、松田 明久、萩原 信敏、吉田 寛 |
| 2. 発表標題<br>小胞体ストレス誘発後の脂肪細胞機能に及ぼすラパマイシンの作用                          |
| 3. 学会等名<br>第121回日本外科学会定期学術集会                                       |
| 4. 発表年<br>2021年                                                    |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

#### 6. 研究組織

|           | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                           | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)            | 備考 |
|-----------|-----------------------------------------------------|----------------------------------|----|
| 研究<br>分担者 | 萩原 信敏<br><br>(Hagiwara Nobutoshi)<br><br>(00328824) | 日本医科大学・医学部・講師<br><br><br>(32666) |    |
| 研究<br>分担者 | 松田 明久<br><br>(Matsuda Akihisa)<br><br>(00366741)    | 日本医科大学・医学部・助教<br><br><br>(32666) |    |

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|