

令和元年5月31日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15985

研究課題名(和文) 脂肪前駆細胞が引き金を引く老化・肥満に伴う慢性炎症の分子機序解明

研究課題名(英文) Mechanism of adipocyte progenitor cells-induced chronic inflammation during aging and obesity

研究代表者

幸 龍三郎 (Yuki, Ryuzaburo)

日本医科大学・大学院医学研究科・研究生

研究者番号：20779897

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)：加齢に伴って血中炎症性サイトカイン量が増加するなど、基礎的な炎症レベルが高まっている。加齢関連疾患は慢性炎症性疾患であることが多く、加齢に伴う炎症の誘導が加齢関連疾患発症に関わることが考えられる。本研究では内臓脂肪組織に着目し、加齢による変化を解析した。その結果、老化脂肪組織は炎症が誘導されることが明らかとなり、肥満において以前我々が同定した新規炎症惹起細胞が蓄積することが分かった。シングルセルRNA-seqの結果、炎症惹起細胞の特異的マーカーを同定するとともに、分化に重要な転写因子候補が見つかった。更に、*ex vivo*での培養系を基に炎症惹起細胞への分化に重要な転写因子群を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

年を取るとともに糖尿病や脳梗塞・心筋梗塞など動脈硬化性疾患などを発症しやすくなる。これらは肥満によっても発症リスクが増大する疾患であり、近年慢性的な炎症状態が病期にかかりやすい一因であることが分かってきた。高齢者では基礎的なレベルでの炎症度合いが高まっているなど、老化と炎症がリンクする「炎症老化」が注目を集めている。私たちはこれまでに、肥満の際に脂肪に炎症のトリガーを引く新たな細胞を見出しました。本研究を通して、老化した脂肪においても炎症惹起細胞が蓄積していることを見出し、老化による脂肪炎症が様々な加齢関連疾患の発症に繋がっている可能性が示唆されました。

研究成果の概要(英文)：During aging, blood inflammatory cytokines are upregulated and basal level of inflammation is enhanced. Since aging-related diseases are overlapped to inflammatory diseases, aging-induced inflammation might be relevant to onset of aging-related diseases. In this study, we focused on the visceral adipose tissue and analyzed characteristic changes during aging. In aged adipose tissue, inflammation is induced and the inflammation-inducing cells, we previously discovered, is accumulated. Based on the single cell RNA-seq, we could find specific surface markers of its cells and candidates of transcription factors responsible for its differentiation. Furthermore, we could identify responsible transcription factors for its differentiation using an *ex vivo* culture.

研究分野：循環器内科学

キーワード：エピジェネティクス 炎症 老化 肥満 幹・前駆細胞 分化

1. 研究開始当初の背景

わが国では超高齢者社会に突入しており、今後も高齢者医療費の増大が見込まれている。そのため、健康寿命を延伸させるためにも加齢に伴って発症率が增大する加齢関連疾患の治療法開発は喫緊の課題となっている。一方で、食の欧米化に伴って肥満人口はこれまで増加しており、糖尿病や動脈硬化をはじめとする心血管代謝疾患の有病率は増加してきた。その病態基盤の一つとして「慢性炎症」が注目を集めている。慢性的な炎症は恒常性の維持にも関わる一方で、組織リモデリングによる組織機能障害に至ることで様々な疾患発症に繋がっていると考えられる。我々はこれまでにメタボリックシンドロームや心血管代謝疾患の発症に慢性炎症が必須の役割を果たしていることを明らかにしてきた (*Nat Med* 2009, *JCI* 2008, 2010, 2011, *Cell Metab* 2012, 2013 等)。肥満に伴って内臓脂肪組織では炎症が誘導される。この炎症が遊離脂肪酸の放出を誘導することで、膵島へ炎症を拡大し、細胞の機能障害とともに糖尿病を誘導することを報告した (*Cell Metab* 2012)。高齢者では血中の炎症サイトカインレベルが上昇するなど、基礎的なレベルでの炎症が高まっている。実際に老齢マウスにおける内臓脂肪組織では炎症が誘導されていることが分かった。そのため、加齢に伴って誘導される炎症が加齢関連疾患を誘導する可能性は高いが、その分子機序は分かっていない。

我々は最近、肥満に伴って早期に出現するとともに、炎症性サイトカインを分泌する新規炎症惹起細胞を同定した。この細胞は、CCL2 ケモカインも分泌し、炎症性単球を内臓脂肪組織に誘引しマクロファージとして定着させることで、脂肪組織炎症のトリガーを引いていることが明らかとなった(図 1)。血管新生誘導能を持つことから、生理的な意義としては脂肪組織の支持に重要な一方で、炎症誘導能を持つため、肥満状態ではバランスが崩れて慢性炎症状態になっていると考えられる。興味深いことに老化脂肪組織において新規炎症惹起細胞の数が増加していた。そのため、この新規炎症惹起細胞が加齢に伴う脂肪組織炎症の誘導に関わっている可能性が高く、既存とは異なる全く新たな加齢関連疾患の標的創出に繋がると考えられる。

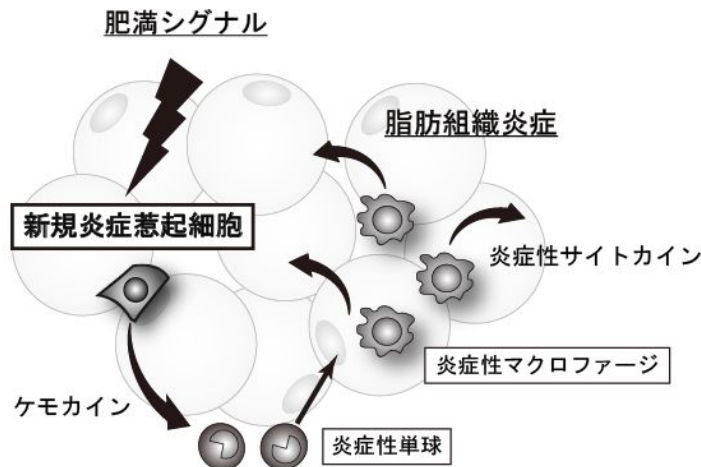


図 1. 肥満に伴う新規炎症惹起細胞が誘導する脂肪組織炎症

2. 研究の目的

我々が見出した新規炎症惹起細胞が老化に伴って内臓脂肪組織炎症を誘導しているのかを明らかにするとともに、炎症誘導機序および老化脂肪組織に蓄積する機序について解析を行う。更には、加齢関連疾患の誘導に関わっているのかどうかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

次世代シーケンサーを用いた RNA-seq, ChIP-seq, ATAC-seq、シングルセル RNA-seq によって新規炎症惹起細胞の起源、加齢・肥満による維持機構・分化機構を推測するとともに、ex vivo 培養系・マウスを用いてその機序を明らかにする。

4. 研究成果

新規炎症惹起の細胞を in vivo で特異的に除去するために、特異的な表面マーカーの探索を行った。RNA-seq およびシングルセル RNA-seq を行ったところ、表面マーカーとしていくつかを同定し、FACS の解析でもその集団を検出可能となった。現在、中和抗体の検討および DTR の系を用いた除去系を行っている。

新規炎症惹起細胞の起源を探索したところ、骨髄由来でないことが分かった。また、上記のシングルセル RNA-seq に基づく pseudotime 解析から脂肪組織内の間質細胞に由来することが明らかとなった。分化機序の詳細を明らかにするために、RNA-seq およびオープンクロマチン領域を同定する ATAC-seq を行ったところ、加齢に伴って脂肪間質細胞の一部に新規炎症惹起細胞のトランスクリプトームを獲得し始める細胞集団が存在した。また、エピゲノムレベルでも加齢による変化が誘導される。転写因子に着目して新規炎症惹起細胞への分化に寄与する分子を調べたところ、PU.1 をはじめとする免疫細胞に発現する転写因子が強く発現し始めることが分

かった。更には脂肪間質細胞にこれら転写因子群を発現させると、炎症惹起細胞へ分化することが明らかとなった。そこで、脂肪間質細胞特異的な cre の系を用いてどの転写因子が in vivo で炎症惹起細胞分化に重要なか、flox マウスを用いて解析するとともに、加齢や肥満に伴う耐糖能異常や心血管異常における寄与を調べる。

興味深いことに RAD51 のヘテロ接合性マウスにおいては、肥満状態で炎症惹起細胞の数が低下していることが分かった。RAD51 は DNA 損傷応答に重要な DNA 結合因子であることから、DNA 損傷応答系と炎症惹起細胞の維持に重要な転写因子との相互作用がある可能性がある。そのため、RAD51 の ChIP-seq を行ったところ、一部炎症惹起細胞で発現している遺伝子座に結合することが分かった。一方、老化細胞においては DNA 損傷応答系が活性化していることが知られている。そのため肥満や加齢に伴う外因的・内因的な DNA 損傷応答系の活性化がエピゲノムを変化させることで、炎症惹起細胞への分化や維持に重要であると示唆された(図 2)。

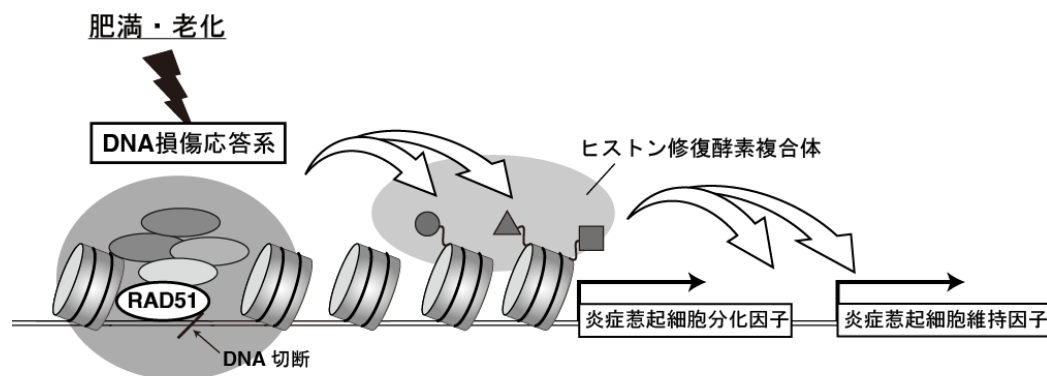


図 2. 肥満や老化がもたらす DNA 損傷応答系活性化を通じた炎症惹起細胞の分化と維持

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

Yuki, R., Tatewaki, T., Yamaguchi, N.-t., Aoyama, K., Honda, T., Kubota, S., Morii, M., Manabe, I., Kuga, T., Tomonaga, T., and Yamaguchi, N. Desuppression of TGF-beta signaling via nuclear c-Abl-mediated phosphorylation of TIF1gamma/TRIM33 at Tyr-524, -610, and -1048. *Oncogene*, 38: 637-655, 2019. doi: 10.1038/s41388-018-0481-z.

Sun, Y., Harada, M., Ide, H., Shimozato, O., Zhou, X., Higashi, K., Yuki, R., Yamaguchi, N., Hofbauer, J.P., Guttman-Gruber, C., Anzai, N., Akita, H., Chiba, K., and Furihata, T. Cancer-type OATP1B3 mRNA in extracellular vesicles as a promising candidate for a serum-based colorectal cancer biomarker. *Biol. Pharm. Bull.*, 41: 445-449, 2018. doi: 10.1248/bpb.b17-00743.

Takakura, Y., Yamaguchi, N.-t., Honda, T., Morii, M., Yuki, R., Nakayama, Y., and Yamaguchi, N. The truncated isoform of the receptor tyrosine kinase ALK generated by alternative transcription initiation (ALKATI) induces chromatin structural changes in the nucleus in a kinase activity-dependent manner. *Biol. Pharm. Bull.*, 40: 1968-1975, 2017. doi: 10.1248/bpb.b17-00548.

Kuki, K., Yamaguchi, N.-t., Iwasawa, S., Takakura, Y., Aoyama, K., Yuki, R., Nakayama, Y., Kuga, T., Hashimoto, Y., Tomonaga, T., and Yamaguchi, N. Enhancement of TGF-beta-induced Smad3 activity by c-Abl-mediated tyrosine phosphorylation of its coactivator SKI-interacting protein (SKIP). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 490: 1045-1051, 2017. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.06.163.

[学会発表](計 16 件)

幸 龍三郎, 松本佐保姫, 大沢沙弓, 工藤藤美, 高野博之, 真鍋一郎. Biased adipocyte differentiation induces visceral adipose inflammation in obesity and aging. 第 83 回日本循環器学会学術集会 (横浜, 2019. 3)

石井貴浩, 幸 龍三郎, 工藤藤美, 柴田宗彦, 山口憲孝, 高野博之, 真鍋一郎. 常在性の心臓マクロファージは、心筋細胞の代謝調節によって心保護に関与している. 第 139 回日本薬学会年会 (千葉, 2019. 3)

大沢沙弓, 幸 龍三郎, 工藤藤美, 高野博之, 山口憲孝, 真鍋一郎. 老化と肥満が誘導する

脂肪前駆細胞の分化変調機序の解析. 第 139 回日本薬学会年会 (千葉, 2019. 3)

幸 龍三郎, 山口憲孝, 帯刀 隆, 眞鍋一郎, 山口直人. c-Abl による TIF1 γ のリン酸化を介した TGF- β シグナル活性化メカニズムの解析. 第 139 回日本薬学会年会 (千葉, 2019. 3)

幸 龍三郎. 老化は脂肪前駆細胞の分化を変調させることで脂肪炎症を誘導する. 第 2 回老化メカニズムの解明・制御プロジェクト リトリート (淡路島, 2018. 12)

幸 龍三郎, 松本佐保姫, 工藤藤美, 眞鍋一郎. 老化と肥満が誘導する内臓脂肪組織炎症の新規機序の解明. 第 39 回肥満学会 (神戸, 2018. 10)

大沢沙弓, 幸 龍三郎, 工藤藤美, 高野博之, 眞鍋一郎. 肥満と老化に伴う脂肪前駆細胞の機能変調の解析. 第 139 回日本薬理学会関東支部会 (東京, 2018.10)

幸 龍三郎, 松本佐保姫, 工藤藤美, 眞鍋一郎. 老化・肥満は脂肪前駆細胞の分化変調をもたらす脂肪組織炎症を誘導する. 予防を科学する炎症細胞社会学 平成 30 年度第 13 回ワークショップ (富山, 2018. 5)

高倉勇氣, 山口憲孝, 本田拓也, 森井真理子, 幸 龍三郎, 山口直人. ALKATI はキナーゼ活性依存的にクロマチン構造変換を誘導する. 第 138 回日本薬学会年会 (金沢, 2018. 3)

石井貴浩, 幸 龍三郎, 工藤藤美, 柴田宗彦, 高野博之, 眞鍋一郎. 心臓組織性マクロファージは心筋細胞の代謝を制御することで心機能を保護している. 第 138 回日本薬理学会関東支部会 (東京, 2018. 3)

幸 龍三郎, 松本佐保姫, 工藤藤美, 眞鍋一郎. Obesity and aging induce adipose inflammation through a biased adipocyte differentiation. 第 82 回日本循環器学会学術集会 (大阪, 2018. 3)

幸 龍三郎. 老化による脂肪前駆細胞の分化不調は脂肪組織炎症を誘導する. 第 1 回老化メカニズムの解明・制御プロジェクト リトリート (淡路島, 2018. 2)

幸 龍三郎, 松本佐保姫, 工藤藤美, 眞鍋一郎. 老化・肥満による脂肪前駆細胞の分化変調は脂肪組織炎症を誘導する. ステムセルエイジング-細胞競合 若手の会 (熱海, 2018. 2)

幸 龍三郎, 松本佐保姫, 工藤藤美, 眞鍋一郎. 脂肪細胞分化異常が老化による脂肪組織炎症を誘導する. 第 38 回肥満学会 (大阪, 2017. 10)

高倉勇氣, 山口憲孝, 本田拓也, 森井真理子, 幸 龍三郎, 山口直人. チロシンキナーゼ ALKATI によるクロマチン構造変換. 第 61 回日本薬学会関東支部大会 (東京, 2017. 9)

幸 龍三郎. 脂肪前駆細胞の老化に伴う分化異常のメカニズム解析. 「生殖エピゲノム」「幹細胞老化と疾患」「クロマチン動構造」合同若手会 (南紀白浜, 2017. 6)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

[http:// http://plaza.umin.ac.jp/manabe/](http://plaza.umin.ac.jp/manabe/)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

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。