

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15067

研究課題名(和文) 間欠的低酸素によるアディポカイン発現とその分子機構の解明

研究課題名(英文) Expression of Adipokines by Intermittent Hypoxia and Its Molecular Mechanism

研究代表者

内山 智子(Uchiyama, Tomoko)

奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員

研究者番号：80745448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：睡眠時無呼吸症候群(SAS)における間欠的低酸素(IH)はインスリン抵抗性をもたらす。In vitroで脂肪細胞の関与について調べるため、脂肪細胞をIH群、対照群で培養を行い、各種アディポカイン発現量を測定した。IH群で有意にResistin, TNF α , CCL2発現が増加した。これら遺伝子の転写活性は上昇せず、これらmRNAと相補性を有するmicroRNA-452発現量が有意に低下していた。SAS患者の脂肪細胞ではIHによりmiR-452が減少してResistin, TNF α , CCL2遺伝子発現が増加し、インスリン抵抗性悪化を引き起こす可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は睡眠時無呼吸症候群患者が曝露される間欠的低酸素とインスリン抵抗性の関連に着目したものであり、関与する諸臓器のうち、脂肪細胞から分泌されるアディポカインの発現量の変化及び発現調節機構を解明しようとしたものである。IH曝露が脂肪細胞のアディポカイン分泌に影響を与え、インスリン抵抗性を増悪させる可能性が示唆されたため、今後、SAS患者を対象として、アディポカインをターゲットとした糖尿病予防・治療につながる研究に発展させられる可能性がある。また、アディポカイン発現調節機構には、microRNAの関与が考えられたため、これについても治療ターゲットとなる可能性を示す事が出来た。

研究成果の概要(英文)：IH (intermittent hypoxia) is considered to cause adipose tissue inflammation, leading to insulin resistance. In this study, we exposed mouse 3T3-L1 and human SW872 adipocytes to experimental IH or normoxia, and analyzed mRNA expression of several adipokines. We found that the mRNA levels of RETN, TNF α , and CCL2 in SW872 cells and 3T3-L1 adipocytes were significantly increased by IH. RETN, TNF α , and CCL2 in IH-treated cell medium were also increased. The promoter activities of these genes were not increased by IH. Target mRNA search of microRNA (miR)s revealed that all the mRNAs have a potential target sequence for miR-452. The miR-452 level of IH-treated cells was significantly decreased. These results indicate that IH stress down-regulates the miR-452 in adipocytes, resulting in the increased levels of RETN, TNF α , and CCL2 mRNA, leading SAS patients to insulin resistance.

研究分野：Diagnostic Pathology

キーワード：sleep apnea syndrome intermittent hypoxia adipokine insuline resistance micro RNA

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームは一般的に、肥満に関連する病態として認識されているが、睡眠時無呼吸症候群 (Sleep Apnea Syndrome: SAS) とインスリン抵抗性の関係については、必ずしも肥満の程度と関連せず、SAS は肥満とは独立した 2 型糖尿病の危険因子と考えられている。SAS 患者が夜間に曝露される間欠的低酸素状態 (Intermittent Hypoxia: IH) に着目し、IH 曝露が 2 型糖尿病におけるインスリン抵抗性をもたらすメカニズムの検討を行うこととした。IH は多臓器の遺伝子発現や細胞増殖に影響を与え、また臓器間の相互作用にも影響する病態であると考えられている。今回、脂肪細胞から分泌され、インスリン抵抗性の発症に中心的役割を果たすアディポカインの発現に対する IH の直接の影響及び、発現の調節機構を明らかにする。また、脂肪細胞の分化過程に着目し、マウス線維芽細胞 3T3-L1 を用いて pre-adipocytes から adipocytes への分化誘導を行い、IH の影響がどの分化段階の脂肪細胞に及ぶのかを明らかにする。本研究を行う教室では、これまでに、IH 曝露がブドウ糖刺激によるインスリン分泌の低下をもたらすこと (Ota H, et al. *Life Sciences* 2012) や、膵細胞の増殖をもたらし、高インスリン血症や肥満の原因となりうることを報告した (Ota H, et al. *Life Sciences* 2013)。また、IH 条件下では肝臓から分泌されるタンパクである SELENOP と、肝細胞増殖因子である HIP/PAP が増加すること及び 2 つの遺伝子発現調節への miRNA の関与について報告した。これらの研究に加えて、IH 曝露が脂肪細胞に与える影響を明らかにすることで、SAS 患者のインスリン抵抗性悪化の機序についてより包括的・総合的に病気のメカニズムを考え治療戦略へと道を拓きうるのではないかと、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

脂肪細胞を用いて、IH 曝露の影響を *in vitro* で検討する。IH 曝露が脂肪細胞のアディポカイン分泌に影響を与え、インスリン抵抗性を増悪させることが明らかにできれば、SAS 患者を対象として、アディポカインをターゲットとした糖尿病予防・治療につながる研究に発展させられる可能性がある。また、アディポカイン分泌量の変化と、脂肪細胞の分化段階との関係も明らかにできれば、治療ターゲットとすべき細胞が pre-adipocytes か、adipocytes かを定めることができる。また、遺伝子発現の調節機構を明らかにすることが出来れば、それらの分子も治療ターゲット、創薬ターゲットとなる可能性も考えられる。

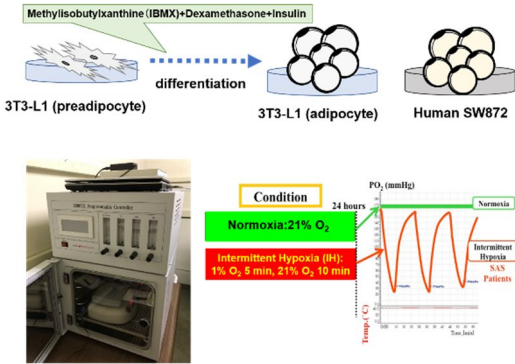
3. 研究の方法

1. マウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 の脂肪細胞への分化誘導; 3T3-L1 細胞は薬剤で処理し脂肪細胞に終末分化する方法がすでに確立されている。
間欠的低酸素 (IH) 曝露; 睡眠時無呼吸症候群 (SAS) 患者の呼吸モデルとして、5 分間の低酸素 (1% O₂・5% CO₂) と 10 分間の正常酸素 (21% O₂・5% CO₂) を 64 サイクル、24 時間行う、専用の細胞培養装置を現在使用しており準備は整っている。
2. 間欠的低酸素 (IH) 曝露によって影響を受けるアディポカイン遺伝子を探索; マウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 と分化後の脂肪細胞を IH 曝露し細胞から RNA を抽出する。逆転写した cDNA を鋳型に数種類のアディポカイン、炎症性サイトカインなど (例: レプチン、アディポネクチン (ADIP)、レジスチン、UCP、CCL2、TNF、IL-6) 候補となるものの遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR で明らかにする。
3. 候補アディポカインのタンパクレベルでの変化; 前駆脂肪細胞と脂肪細胞の IH 曝露時に培養上清を採取しておく。遺伝子発現に影響を受けた候補アディポカインのタンパクレベルでの発現についても ELISA 法で明らかにする。
4. 候補アディポカイン遺伝子のプロモーター領域 (シス領域) を同定; 候補アディポカイン遺伝子の種々の長さのプロモーター領域を単離し、ルシフェラーゼなどのレポーター遺伝子を持つプラスミドに挿入する。このプラスミドを分化誘導した脂肪細胞に導入して IH 曝露を行い、転写活性を測定する。IH 曝露により転写活性が影響を受けるシス領域を同定する。
5. 絞り込んだプロモーター領域に結合する転写調節因子 (トランス因子) をオンシリコ解析により探索する。
6. アディポカイン遺伝子発現の転写調節因子の解析; アディポカイン遺伝子の転写調節因子結合配列に変異を導入したプロモーター解析用プラスミドを作成し 4 と同様にレポーター解析を行い、転写調節因子を同定する。
7. アディポカイン遺伝子の転写調節機構の解明; 培養脂肪細胞の転写調節因子を siRNA によりノックダウンした後、IH 曝露を行い 2 と同様に細胞から RNA を抽出しアディポカイン遺伝子の発現をリアルタイム RT-PCR で確認する。また採取した培養上清についてタンパクレベルでの発現を ELISA 法で確認する。

4. 研究成果

申請書の研究計画に基づき、マウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 の脂肪細胞への分化誘導を行い、非分化誘導細胞と分化誘導後の 3T3-L1 細胞を得た。これら 2 種類のマウス脂肪細胞及び、ヒト脂肪細胞 SW872 の合計 3 種類の脂肪細胞について、専用の細胞培養装置(右図)を用いて間歇的低酸素(IH)条件下(1%O₂・5%CO₂の5分間の低酸素、21%O₂・5%CO₂の10分間の正常酸素を交互に繰り返す)におき、対照として通常酸素条件下に24時間曝露した。

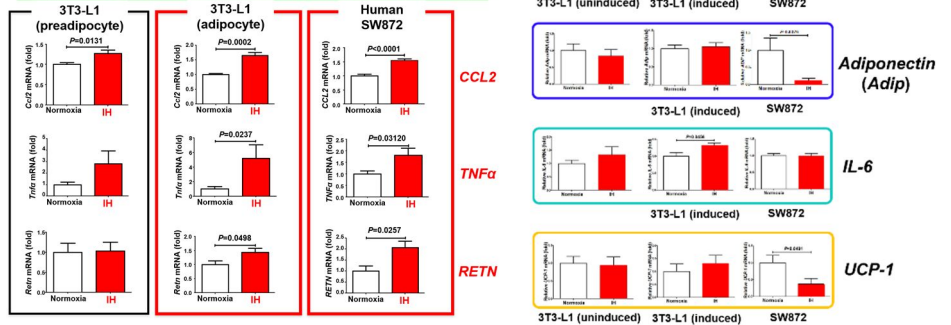
<Materials & Methods>



次に、IH曝露後、細胞からRNAを抽出し、逆転写したcDNAを鋳型に数種類のアディポカインや炎症性サイトカイン等について、IH曝露により影響を受ける遺伝子の探索をリアルタイム RT-PCR法にて行った。その結果、非分化誘導の3T3-L1細胞ではIH群で有意にCcl2 mRNA発現が増加、分化誘導後の3T3-L1細胞でIH群では有意にRetn (Resistin), TNF, IL-6, Ccl2 (Mcp-1) mRNA発現が増加した。ヒトSW872細胞においてはIH群で有意にADIP発現が低下し、RETN, TNF, CCL2 mRNA発現が増加した。

<Results>

IH条件下でCCL2, TNFα, and Resistin (Retn) mRNA発現が上昇

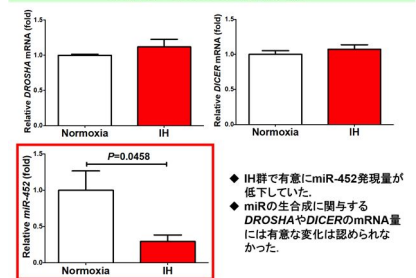


更に、それぞれの脂肪細胞の培養上清を採取しておき、ELISA法を用いて遺伝子発現の変化がみられた遺伝子についてタンパク発現についても検討したところ、IH群でRETN, TNF, CCL2が有意に上昇していた。

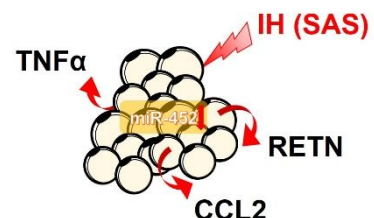
次に、間歇的低酸素(IH)曝露により影響を受けたアディポカイン遺伝子の転写調節機構の解明についての実験を行った。候補アディポカイン遺伝子(RETN, TNF, CCL2)のプロモーター領域を同定するため、それぞれの遺伝子について種々の長さのプロモーター領域を単離し、ルシフェラーゼなどのレポーター遺伝子を持つプラスミドに挿入。このプラスミドを分化誘導した脂肪細胞に導入してIH曝露を行い、転写活性を測定。IH曝露により転写活性が影響を受けるシス領域の同定を試みた。ヒトCCL2, TNF, RETNの転写開始点から上流約1kb~3.5kbをルシフェラーゼ遺伝子に連結したプラスミドをSW872に導入し、24時間Normoxia, IH曝露を行い転写活性を測定した。その結果、CCL2, TNF, RETNの転写活性はIHによって上昇しなかった。

そこで転写後調節の可能性を検討する事とした。RETN, TNF, CCL2 mRNAと相補性を有するmiRをin silicoで検索した結果、miR-452が候補と考えられた。IH群では、有意にmiR-452発現量が低下していた(P=0.0458)。miRの合成に関与するDROSHAやDICERのmRNA量には有意な変化は認められなかった。miR-452 mimicの導入により、IH群で観察されたRETN, TNF, CCL2 mRNA発現量の増加がみられなくなった。

IH曝露にてmiR-452発現が減少



よって、SAS患者の脂肪細胞ではIHによって、miR-452が減少し、miR-452を介したRETN, TNF, CCL2 mRNA分解機構が减弱し、RETN, TNF, CCL2の発現上昇が起こると考えられた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Akasaka J, Naruse K, Sado T, Uchiyama T, Makino M, Yamauchi A, Ota H, Sakuramoto-Tsuchida S, Itaya-Hironaka A, Takasawa S, Kobayashi H	4. 巻 20
2. 論文標題 Involvement of Receptor for Advanced Glycation Endproducts in Hypertensive Disorders of Pregnancy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 E5462
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20215462	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Mikami Shinji, Ota Ichiro, Masui Takashi, Uchiyama Tomoko, Okamoto Hideyuki, Kimura Takahiro, Takasawa Shin, Kitahara Tadashi	4. 巻 42
2. 論文標題 Resveratrol-induced REG III expression enhances chemo- and radiosensitivity in head and neck cancer in xenograft mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 436-442
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2019.7137	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Uchiyama Tomoko, Itaya-Hironaka Asako, Yamauchi Akiyo, Makino Mai, Sakuramoto-Tsuchida Sumiyo, Shobatake Ryogo, Ota Hiroyo, Takeda Maiko, Ohbayashi Chiho, Takasawa Shin	4. 巻 20
2. 論文標題 Intermittent Hypoxia Up-Regulates CCL2, RETN, and TNF mRNAs in Adipocytes via Down-regulation of miR-452	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 E1960
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20081960	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Shobatake Ryogo, Itaya-Hironaka Asako, Yamauchi Akiyo, Makino Mai, Sakuramoto-Tsuchida Sumiyo, Uchiyama Tomoko, Ota Hiroyo, Takahashi Nobuyuki, Ueno Satoshi, Sugie Kazuma, Takasawa Shin	4. 巻 20
2. 論文標題 Intermittent Hypoxia Up-Regulates Gene Expressions of Peptide YY (PYY), Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1), and Neurotensin (NTS) in Enteroendocrine Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 E1849
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20081849	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Shobatake, R., Takasawa, K., Ota, H., Itaya-Hironaka, A., Yamauchi, A., Sakuramoto-Tsuchida, S., Uchiyama, T., Makino, M., Sugie, K., Takasawa, S. and Ueno, S.	4. 巻 95
2. 論文標題 Up-regulation of POMC and CART mRNAs by intermittent hypoxia via GATA transcription factors in human neuronal cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int. J. Biochem. Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 100, 107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biocel.2017.12.012.	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Takasawa Shin, Tsuchida Chikatsugu, Sakuramoto-Tsuchida Sumiyo, Takeda Maiko, Itaya-Hironaka Asako, Yamauchi Akiyo, Misu Masayasu, Shobatake Ryogo, Uchiyama Tomoko, Makino Mai, Ohbayashi Chiho	4. 巻 66
2. 論文標題 Expression of human REG family genes in inflammatory bowel disease and their molecular mechanism	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Immunologic Research	6. 最初と最後の頁 800 ~ 805
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12026-019-9067-2	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 9件)

1. 発表者名 Uchiyama, T., Itaya-Hironaka, A., Yamauchi, A., Makino, M., Sakuramoto-Tsuchida, S., Shobatake, R., Ota, H., Takeda, M., Ohbayashi, C., and Takasawa, S.
2. 発表標題 Up-regulation of RETN, TNF , and CCL2 mRNAs in Adipocytes by Intermittent Hypoxia and Its MicroRNA-Mediated Mechanism.
3. 学会等名 79th American Diabetes Association Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Uchiyama, T., Itaya-Hironaka, A., Yamauchi, A., Makino, M., Sakuramoto-Tsuchida, S., Shobatake, R., Ota, H., Takeda, M., Ohbayashi, C., and Takasawa, S.
2. 発表標題 Up-regulation of RETN, TNF , and CCL2 mRNAs in adipocytes by intermittent hypoxia via down-regulation of miR-452.
3. 学会等名 The 55th EASD Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名 Ryogo Shobatake, Hiroyo Ota, Asako Itaya-Hironaka, Akiyo Yamauchi, Mai Makino, Sumiyo Sakuramoto-Tsuchida, Tomoko Uchiyama, Nobuyuki Takahashi, Satoshi Ueno, Kazuma Sugie1 and Shin Takasawa
2 . 発表標題 Up-regulation of expressions of PYY, GLP-1, and NTS by intermittent hypoxia in enteroendocrine cells
3 . 学会等名 55th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Ryogo Shobatake, Hiroyo Ota, Asako Itaya-Hironaka, Akiyo Yamauchi, Mai Makino, Sumiyo Sakuramoto-Tsuchida, Tomoko Uchiyama, Nobuyuki Takahashi, Satoshi Ueno, Kazuma Sugie and Shin Takasawa
2 . 発表標題 Up-regulation of PYY, GLP-1, and NTS by Intermittent Hypoxia in Enteroendocrine Cells
3 . 学会等名 79th American Diabetes Association Scientific Sessions (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Shin Takasawa, Ryogo Shobatake, Asako Itaya-Hironaka, Akiyo Yamauchi, Mai Makino, Sumiyo Sakuramoto-Tsuchida, Tomoko Uchiyama, Chikatsugu Tsuchida, Hiroyo Ota
2 . 発表標題 Up-regulation of diabetes-associated myokines by intermittent hypoxia in mammalian skeletal muscle cells
3 . 学会等名 International Diabetes Federation Congress 2019 (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Ryogo Shobatake, Hiroyo Ota, Asako Itaya-Hironaka, Akiyo Yamauchi, Mai Makino, Sumiyo Sakuramoto-Tsuchida, Tomoko Uchiyama, Nobuyuki Takahashi, Satoshi Ueno, Kazuma Sugie and Shin Takasawa
2 . 発表標題 Intermittent Hypoxia Up-regulates PYY, GLP-1, and NTS by in Enteroendocrine Cells
3 . 学会等名 XXIV World Congress of Neurology (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 Makino, M., Itaya-Hironaka, A., Yamauchi, A., Sakuramoto-Tsuchida, S., Uchiyama, T., Shobatake, R., and Takasawa, S.
2. 発表標題 The involvement of exon 75 of ryanodine receptor on insulin biosynthesis in pancreatic cells.
3. 学会等名 World Diabetes Congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takasawa, S., Shobatake, R., Itaya-Hironaka, A., Yamauchi, A., Makino, M., Sakuramoto-Tsuchida, S., Uchiyama, T., Tsuchida, C., and Ota, H.
2. 発表標題 Up-regulation of diabetes-associated myokines by intermittent hypoxia in mammalian skeletal muscle cells.
3. 学会等名 World Diabetes Congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田浩世、内山智子、山内基雄、藤田幸男、広中安佐子、土田澄代、山内晶世、牧野 舞、友田恒一、高沢 伸、吉川雅則、室 繁郎
2. 発表標題 脂肪細胞は間歇的低酸素曝露でResistin, TNF , CCL2の発現上昇、分泌増加を引き起こす
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 正島良悟、太田浩世、広中安佐子、山内晶世、土田澄代、内山智子、牧野 舞、高橋信行、上野 聡、杉江和馬、高沢 伸
2. 発表標題 間歇的低酸素は腸管内分泌細胞において食欲抑制性のPYY, GLP-1, NeurotensinのmRNAを増加させる
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内山智子、正畠良悟、広中安佐子、山内晶世、牧野 舞、土田澄代、太田浩世、武田麻衣子、大林千穂、高沢 伸
2. 発表標題 間歇的低酸素による脂肪細胞のResistin, TNF , CCL2の発現上昇はmicroRNA-452の発現低下を介する
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 牧野 舞、広中安佐子、山内晶世、土田澄代、内山智子、正畠良悟、高沢 伸
2. 発表標題 膵 細胞での2型リアノジン受容体の組織特異的スプライシングバリエントの役割
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内山智子、正畠良悟、広中安佐子、山内晶世、牧野舞、土田澄代、太田浩世、武田麻衣子、大林千穂、高沢伸
2. 発表標題 脂肪細胞では間歇的低酸素によりインスリン抵抗性をもたらすアディポカイン遺伝子発現が増加する
3. 学会等名 日本糖尿病学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shobatake, R., Itaya-Hironaka, A., Yamauchi, A., Makino, M., Sakuramoto-Tsuchida, S., Uchiyama, T., Ota, H., Sugie, K., Ueno, S. and Takasawa, S.
2. 発表標題 Intermittent hypoxia up-regulates peptide YY, glucagon-like peptide-1, and neurotensin mRNAs in human enteroendocrine Caco-2 cells.
3. 学会等名 The 41st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田浩世、内山智子、山内基雄、藤田幸男、広中安佐子、土田澄代、山内晶世、牧野 舞、友田恒一、高沢 伸、吉川雅則、木村 弘
2. 発表標題 間歇的低酸素はmiR-203の発現低下を通じてselenoprotein PとHIP/PAPの発現上昇を引き起こす
3. 学会等名 第58回日本呼吸器病学会学術講演会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------