

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401  
研究種目：若手研究  
研究期間：2019～2022  
課題番号：19K16982  
研究課題名(和文) インスリン抵抗性及び分泌低下に対するマクロファージ増殖の病態生理学的意義の検討  
  
研究課題名(英文) Pathophysiological implications of macrophage proliferation for insulin resistance and hyposecretion  
  
研究代表者  
前田 沙梨恵 (Maeda, Sarie)  
  
熊本大学・病院・医員  
  
研究者番号：30836234  
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)：高脂肪食を負荷した肥満・耐糖能異常マウスにおいて、内臓脂肪や肝臓マクロファージ(M $\phi$ )の有意な増殖を認めた。次にスカベンジャー受容体のプロモーター制御下にp27kipを発現するM $\phi$ 特異的増殖抑制マウス(Tg群)を作成し高脂肪食負荷を行い、Tg群における耐糖能異常及びインスリン抵抗性の改善(全身の糖利用率及び骨格筋の糖取り込み率の改善、肝からの糖産生率の減少)を確認した。さらにTg群にて内臓脂肪や肝臓の炎症、酸化ストレスの軽減、肝臓の脂肪蓄積及び線維化の改善を認めた。また糖尿病モデルのdb/dbマウスにおける膵島M $\phi$ の増殖、さらにdb/db-Tgにおける膵島増大の抑制傾向を認めた。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では膵島におけるマクロファージ増殖に着目し、マクロファージ特異的増殖抑制マウスを用い、2型糖尿病における細胞減少及びそれに伴うインスリン分泌低下に対するマクロファージ増殖の病態生理学的意義を明らかにすること、さらにこれらの結果より糖尿病のインスリン抵抗性及び細胞容量減少に伴うインスリン分泌低下について、マクロファージ増殖を基盤とした共通の進展機序を提唱することに学術的意義があると考え

る。また将来的にはマクロファージ増殖を標的とした糖尿病治療の開発につながる可能性があり、その点で社会的意義のある研究であると考え

研究成果の概要(英文)：In obese and glucose intolerant mice fed a high-fat diet, significant proliferation of visceral fat and liver macrophages (M $\phi$ ) was observed. Next, M $\phi$ -specific growth suppression mice (Tg group) expressing p27kip under the control of a scavenger receptor promoter were created and subjected to a high-fat diet, and improvement of glucose intolerance and insulin resistance (improvement of systemic glucose utilization and skeletal muscle glucose uptake rate and decrease in hepatic glucose production rate) were confirmed in the Tg group. In addition, the Tg group showed reduction of inflammation and oxidative stress in visceral fat and liver, and improvement of lipid accumulation and fibrosis in the liver.

We confirmed islet M $\phi$  proliferation in db/db mice, a model of diabetes, and also observed a trend toward suppression of islet enlargement in db/db-Tg mice.

研究分野：糖尿病

キーワード：マクロファージ増殖 インスリン抵抗性 インスリン分泌低下

1. 研究開始当初の背景

わが国の脂肪摂取量の増加及び身体活動量の低下による肥満とそれに伴う糖尿病は年々増加し、動脈硬化症を主体とした致死血管合併症の急増が深刻な社会的問題となっている。申請者のグループは、動脈硬化の発症・進展には、マクロファージの浸潤のみならず、局所でのマクロファージの増殖が病態に關与することに着目し、マクロファージ増殖の分子メカニズム (Atherosclerosis.176:233-245 2004)や、マクロファージの増殖制御による抗動脈硬化作用の機序 (J Biol Chem.280:6627-6633 2005、Circ Res.100:1442-1451 2007)等、マクロファージ増殖に關連した報告を多数行っている。さらに申請者は、動脈硬化の発症及び進展に対するマクロファージ増殖の影響について解析するため、スカベンジャー受容体のプロモーター/エンハンサー制御下に p27kip を発現するマクロファージ特異的増殖抑制マウス (mac-p27Tg) を作製した。このマウスは腹腔・骨髓由来マクロファージの増殖が有意に抑制されることを確認しており、一方でマクロファージの貪食能、コレステロール引き抜き能、遊走能、炎症性サイトカイン発現に有意差がないこと、マクロファージの前駆細胞である単球の増殖能、炎症活性についても有意差がないことを確認している。申請者は、mac-p27Tg マウスと ApoE<sup>-/-</sup> マウスと交配させ (ApoE<sup>-/-</sup> × Tg)、動脈硬化性プラークにおけるマクロファージ増殖を抑制することで、マクロファージ増殖がプラーク形成だけでなくプラークの不安定化にも影響を与えることを明らかにしている (Arterioscler Thromb Vasc Biol. 38(5):994-1006.2018)。

また、2 型糖尿病の病態は膵島からのインスリンの分泌不全と末梢臓器におけるインスリン抵抗性により特徴づけられるが、インスリン抵抗性の基盤となる内臓脂肪での慢性炎症において、肥満により肥大化した脂肪細胞とマクロファージが相互に作用し炎症を増幅することで、インスリン抵抗性を引き起こすと報告されている (Annu Rev Immunol.29:415-445 2011)。さらに肥満モデルマウスの内臓脂肪組織においてマクロファージ増殖を認める報告があり (Cell metabolism.19:162-171 2014.)、マクロファージの増殖がインスリン抵抗性の病態に關与する可能性が考えられた。申請者は mac-p27Tg マウスに高脂肪食負荷 (HFD) をかけたマウスを用いて、マクロファージ増殖抑制による耐糖能及びインスリン抵抗性の改善 (図 1)、脂肪組織におけるマクロファージ減少と炎症性サイトカイン発現減少の知見を得ている (75th American Diabetes Association, 2015 にて発表)。

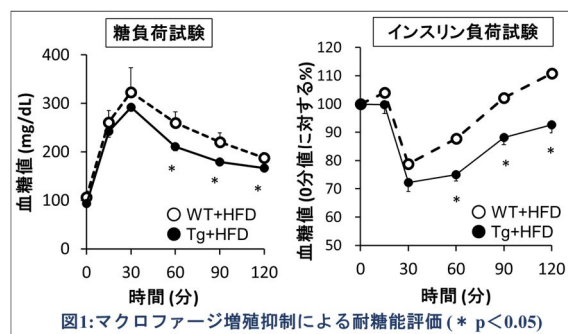


図1: マクロファージ増殖抑制による耐糖能評価 (\* p < 0.05)

一方、インスリン分泌低下を伴う 2 型糖尿病においても、膵島へのマクロファージ浸潤が報告されている (Diabetes. 56: 2356-2370, 2007. Diabetologia. 52:1686-168, 2009)。さらに肥満糖尿病モデルマウスにおいて、マクロファージの膵島への浸潤による慢性炎症が膵細胞の機能障害を起こすことが報告され、マクロファージがインスリン分泌低下に寄与する可能性が示されている (Cell Metabolism, 15: 518-533, 2012)。

申請者は、内臓脂肪だけでなく、db/db マウスの肝臓や膵臓におけるマクロファージの増殖を免疫染色によって確認している。HFD 負荷マウスにおいても同様の結果を認めており、このことから、肝臓及び内臓脂肪のインスリン抵抗性及び膵島細胞からのインスリン分泌低下に対し、マクロファージの増殖が關与する事が示唆される。

2. 研究の目的

本研究では、肝臓、内臓脂肪、及び膵島におけるマクロファージ増殖に着目し、マクロファージ特異的増殖抑制マウスを用い、2 型糖尿病におけるインスリン抵抗性及びインスリン分泌低下に対するマクロファージ増殖の病態生理学的意義を明らかにすることが目的である。さらにこれらの結果より、動脈硬化、糖尿病のインスリン抵抗性及びβ細胞容量減少に伴うインスリン分泌低下について、マクロファージ増殖を基盤とした共通の進展機序を提唱することを目的としている (図 2)。

3. 研究の方法

肥満・糖尿病モデルマウスにおけるマクロファージ増殖の評価

本研究では HFD 負荷マウス及び db/db マウスの膵島及び肝臓、内臓脂肪における組織マクロファージ増殖をより詳細に評価するため、免疫染色及びフローサイトメトリー (FCM) を用いて、各組織におけるマクロファージの増殖について定量的解析を行った。さらに FCM にて M1 (炎症性)、M2 (抗炎症性) マクロファージを分類し M1/M2 比を評価した。

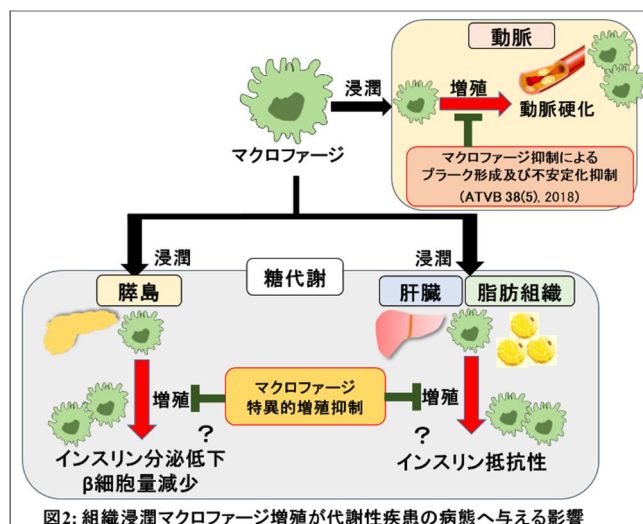


図2: 組織浸潤マクロファージ増殖が代謝疾患の病態へ与える影響

マクロファージ特異的に増殖抑制する肥満糖尿病モデルマウスの作成

肥満・糖尿病モデルマウスの内臓脂肪・肝臓におけるマクロファージの増殖がインスリン抵抗性及び分泌能に及ぼす影響を検討するため、申請者が過去の研究で用いたマクロファージ特異的増殖抑制マウス(mac-p27Tg)に対し10週間HFDを負荷し、mac-p27Tgマウス(HFD-Tg)を作成した。これを用いて以下からの検討を行った。

マクロファージ特異的増殖抑制マウスにおける耐糖能及びインスリン分泌能の評価

で作成したマウスに腹腔内ブドウ糖負荷試験を施行し、血糖と血中のインスリン濃度を測定した。

マクロファージ特異的増殖抑制マウスにおけるインスリン抵抗性の評価

HFD-WTマウスに対し、HFD-Tgマウスではインスリン抵抗性が改善することを既に確認している。グルコースクランプ法を行い、glucose infusion rate、Rate of glucosedisappearance、hepatic glucose productionを測定し、全身のインスリン抵抗性のみならず、肝臓、内臓脂肪のインスリン抵抗性の状態についても評価する。またインスリン静脈注射後の各臓器におけるインスリンシグナル(インスリン受容体、IRS-1、p-Akt)を評価した。

マクロファージ特異的増殖抑制マウスにおける肝臓、内臓脂肪における慢性炎症及び酸化ストレスの評価

マクロファージ増殖抑制によって肝臓、内臓脂肪の慢性炎症及び酸化ストレスに与える影響についてmRNAの発現を測定した。

膵島細胞量減少に対するマクロファージ増殖抑制の影響の検討

細胞量減少の病態に対するマクロファージ増殖抑制の影響を明らかにするために、db/dbマウスをコントロールとして、db/db×Tgマウスにおける細胞の容量及び増殖を免疫染色にて評価した。

#### 4. 研究成果

WTマウスに高脂肪食(HFD)を負荷することで、内臓脂肪及び肝臓のマクロファージが有意に増殖することを免疫染色及びFCMにて証明した。またM1/M2の比が対照群(HFD-WT)に比べHFD-Tgで有意に低下することを認めた。

mac-p27Tgマウス(HFD-Tg)と対照群(HFD-WT)において、経時的体重及び随時血糖、摂餌量を測定したが、両者に有意差は認めなかった。

HFD-WT及びHFD-Tgに対し腹腔内ブドウ糖負荷試験を施行したところ、前頁に記載した通りHFD-Tgにおいて有意な耐糖能の改善を認めていた。このとき血清インスリンを同時に測定したところ両者に有意差は認めなかった。

グルコースクランプ法において、HFD-WTに比しHFD-Tgでは、全身の糖利用率及び骨格筋の糖取り込み率が改善し、肝からの糖産生率が減少することを証明できた。

インスリン注射にて、HFD-WTの肝臓・内臓脂肪におけるAktリン酸化が誘導されたが、HFD-TgではAktリン酸化が有意に亢進しており、HFD-Tgの肝臓・内臓脂肪におけるインスリン感受性の改善が確認できた。

HFD-Tgマウスでは肝臓のG6PaseやPEPCKのmRNA発現及び酵素活性が低下しており、糖新生の抑制が予測された。

HFD-Tgマウスの内臓脂肪及び肝臓ではマクロファージの増殖抑制やM1/M2比の減少が観察され、炎症や酸化ストレスの軽減を認めた。またHFD-Tgにおける肝臓の脂肪蓄積及び線維化の抑制、血清中の遊離脂肪酸の濃度減少も確認された。

db/dbマウスにて膵島マクロファージが増殖することを免疫染色で証明した。また血糖および血清インスリン値についてdb/dbとdb/db-Tgマウス間で比較したところ有意差は認めなかったが、db/dbマウスで認める膵島増大がdb/db-Tgでは抑制傾向にあった。

以上、マクロファージ増殖抑制による組織マクロファージ数の制御が、内臓脂肪及び肝臓の機能を改善することが示された。それにより、増殖による組織マクロファージの増加が、インスリン抵抗性の形成に関与していることを明らかにし、マクロファージ増殖の抑制がインスリン抵抗性の新たな治療標的となり得ることが示された。

一方インスリン分泌能に対する膵島マクロファージ増殖の関与については現時点で明確に証明できておらず、今後更なる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Morita Yutaro, Senokuchi Takafumi, Yamada Sarie, Wada Toshiaki, Furusho Tatsuya, Matsumura Takeshi, Ishii Norio, Nishida Saiko, Nishida Syuhei, Motoshima Hiroyuki, Komohara Yoshihiro, Yamagata Kazuya, Araki Eiichi	4. 巻 8
2. 論文標題 Impact of tissue macrophage proliferation on peripheral and systemic insulin resistance in obese mice with diabetes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMJ Open Diabetes Research & Care	6. 最初と最後の頁 e001578 ~ e001578
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/bmjdr-2020-001578	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shi Y, Senokuchi T, Yamada S, Morita Y, Wada T, Furusho T, Kazihara N, Fukuda K, Ishi N, Matsumura T, Araki E
2. 発表標題 Impacts of Local Macrophage Proliferation on Atherosclerotic Plaque Progression and Insulin Resistance in Obesity-associated Adipose Tissue.
3. 学会等名 19th International Symposium on Atherosclerosis.（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Wada T, Senokuchi T, Yamada S, Morita Y, Motoshima H, Ishi N, Matsumura T, Araki E.
2. 発表標題 Inhibition of tissue macrophage proliferation improves insulin resistance in liver and adipose tissue.
3. 学会等名 The 80th ADA scientific meeting（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 瀬ノ口 隆文、山田 沙梨恵、守田 雄太郎、和田 敏明、古荘 達哉、松村 剛、荒木 栄一
2. 発表標題 肝および脂肪組織インスリン抵抗性における組織マクロファージ増殖の意義の検討
3. 学会等名 第35回日本糖尿病合併症学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田 沙梨恵
2. 発表標題 動脈硬化及び耐糖能異常におけるマクロファージ増殖の病態生理学的意義の解明
3. 学会等名 第70回日本体質医学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 守田 雄太郎、瀬ノ口 隆文、山田 沙梨恵、和田 敏明、本島 寛之、松村 剛、荒木 栄一
2. 発表標題 組織マクロファージ増殖の肝および脂肪組織インスリン抵抗性における役割
3. 学会等名 第31回 分子糖尿病学会シンポジウム
4. 発表年 2019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