

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：34507

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06425・19K21501

研究課題名（和文）インスリン抵抗性発現による遊離核酸断片の蓄積とその栄養学的意義の解明

研究課題名（英文）Elucidation of nutritional significance in accumulated cfDNA in the development of insulin resistance

研究代表者

西本 幸子（Nishimoto, Sachiko）

甲南女子大学・医療栄養学部・助教

研究者番号：90824053

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：肥満によりインスリン抵抗性と慢性炎症を惹起された脂肪組織におけるDNA分解機構への影響を検討した。食餌誘導性肥満マウスの脂肪組織においてマクロファージ浸潤および炎症性サイトカインの発現の上昇がみられるとともに、血中遊離核酸濃度が上昇した。さらにDNase II活性の上昇も観察されたことから、脂肪組織におけるDNA分解機構の変化が、インスリン抵抗性の発現に関与することが推定された。また、マクロファージ細胞株を用いた実験により、マクロファージのTLR経路活性化による炎症惹起がDNA分解機構に影響を与えることが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
機能障害を起こした細胞から遊離するダメージ関連分子パターンを介した、マクロファージの自然免疫機構の活性化が、慢性炎症疾患の病態として重要な役割を果たす。本研究では、新たに、肥満動物を用いた実験により、血中遊離核酸の蓄積と、インスリン抵抗性をともなう脂肪組織慢性炎症における核酸分解機構との関係を報告した。慢性炎症は動脈硬化症など他の生活習慣病の発症にも関与している。それらの機序にも核酸断片の分解・認識に関わる自然免疫機構の関与が推測され、生活習慣病の新たな治療・予防方法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：We examined the influence of the degradation system of DNA in adipose tissue inflammation against obesity-related insulin resistance. Diet-induced obese mice showed increased macrophages, expression of cytokines, and DNase II activity in adipose tissue with higher cell-free DNA in plasma compared with control mice. In vitro experiments using macrophage cell line indicated that the activation of TLR pathway in macrophages influences the degradation system of DNA.

研究分野：栄養学

キーワード：インスリン抵抗性 肥満 DNA断片 核酸分解酵素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肥満に基づくインスリン抵抗性は、糖尿病だけでなく脂質異常症や高血圧などを含む生活習慣病を発症する基盤になる。インスリン抵抗性は、脂肪組織におけるマクロファージを中心とした無菌性慢性炎症が原因で生じると考えられているが、脂肪組織浸潤マクロファージを中心とした慢性炎症を惹起するメカニズムについては、十分に明らかになっていない。近年、機能障害を起こした細胞から遊離する DAMPS (ダメージ関連分子パターン) を介した、マクロファージの自然免疫機構の活性化が、慢性炎症疾患の病態として重要な役割を果たすことが明らかになってきた (Goulopoulou et al. Pharmacol Rev, 2016)。このような背景から、研究代表者らはこれまでに、心血管代謝異常を引き起こす DAMPS の中でも自己由来の核酸断片 (cell free DNA; cfDNA) とその受容体に関する研究に取り組み、cfDNA が、DAMPs の一種として脂肪組織マクロファージの Toll like receptor (TLR) 9 を刺激し炎症反応を惹起することに注目して、TLR9-cfDNA 経路活性化がインスリン抵抗性の発現に関与することを報告してきた。一方で、核酸分解機構の変化をきたすことにより、cfDNA 蓄積、脂肪組織マクロファージ活性化に続く慢性炎症やインスリン抵抗性を惹起する可能性が考えられるが、cfDNA 蓄積と肥満脂肪組織における核酸分解機構の関わりは検討されていない。

2. 研究の目的

本研究では、肥満によりインスリン抵抗性と慢性炎症を惹起された脂肪組織における DNA 分解機構の影響と、その分子機構を明らかにすることを目的とした。慢性炎症は動脈硬化症など他の生活習慣病の発症にも関与しており、それらの機序にも核酸断片の蓄積・分解・認識に関わる自然免疫機構の関与が推測される。

3. 研究の方法

(1) マクロファージ活性化における DNase の役割の検討

3T3-L1 脂肪細胞に対して、Tumor necrosis factor- α (TNF- α) や飽和脂肪酸などにより細胞死を誘導し得られた培養上清中の DNase 活性、cfDNA 蓄積を無処理の培養上清と比較する。得られた培養上清を用いてマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞を刺激し、炎症性質の程度を qPCR 法などの分子生物学的手法を用いて比較する。

(2) 肥満マウスの脂肪組織 DNase 活性と cfDNA 蓄積の関係性の解析

野生型マウスに高脂肪食 (60% Fat) を 2~3 か月間負荷し、食餌誘導性肥満マウスを作製する。食事誘導性肥満マウスと通常食マウスのインスリン抵抗性発現、脂肪組織 DNase 活性と cfDNA 蓄積の程度を比較し、経時的な変化を含めて解析する。

(3) cfDNA 蓄積からのシグナル伝達機構の解析

これまでに、TLR9 の活性化には、エンドソームに局在し酸性下で働く DNase II の活性化が必要であると報告されている。肥大した脂肪組織においても同様のシグナル伝達が予想される。DNase 活性化シグナルの伝達機構の解明のための実験を行う。

4. 研究成果

(1) マクロファージ活性化における DNase の役割

マクロファージ活性化における DNase II の役割を調べるため、LPS を用いてマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞を刺激した。その結果、コントロールに比べて DNase II 活性は減少する傾向がみられた。また、TNF- α により細胞傷害を与えられた 3T3-L1 脂肪細胞の培養上清により、RAW264.7 細胞を刺激すると、RAW264.7 細胞の炎症性サイトカイン遺伝子発現はコントロール (未刺激) に比べて上昇した。in vitro において傷害を受けた脂肪細胞の培養上清に含まれる DAMPS がマクロファージを活性化することがわかったが、DNase II 活性への影響は観察されなかった。

(2) 肥満マウスの脂肪組織における DNase II 活性と cfDNA 蓄積

野生型マウスへの脂肪食負荷を開始後約 3 か月で体重増加のピークを迎えたが、2 か月の時点ですでに血中 cfDNA 蓄積が観察された。すなわち肥満進行の早期から血中あるいは脂肪組織におけるマクロファージの DNA 分解機構の機能障害が示唆された。食餌誘導性肥満マウスでは、通常食マウスに比べてインスリン抵抗性が悪化するとともに、血中 cfDNA 濃度は、通常食マウスに比べて上昇した。食餌誘導性肥満マウスの内臓脂肪組織では、マクロファージ浸潤および炎症性サイトカインの発現の上昇がみられるとともに、DNase II の遺伝子発現と活性の上昇が観察された。in vivo において脂肪組織における DNA 分解機構の変化が、インスリン抵抗性の発現に関与することが推定される。

(3) cfDNA 蓄積からのシグナル伝達機構

RAW264.7 細胞や腹腔内マクロファージに対して飽和脂肪酸 (パルミチン酸) あるいは TLR アゴニストを用いて刺激することで、炎症性分子や細胞接着因子の遺伝子発現が増加した。一方で、TLR4 のリガンドである LPS やパルミチン酸による刺激は、DNase II 活性を軽微に低下させることがわかった。TLR9 リガンドである CpG-DNA は、DNase II 活性を軽微に上昇させた。これらの

ことから、マクロファージの TLR 経路活性化による炎症惹起が DNA 分解機構に影響を与えることが推定される。

当初予定していた核酸分解酵素 DNase I 活性測定に関する解析は、使用を想定していた試薬が入手困難であり継続困難となったため、DNase II の役割を中心に研究を進めた。

慢性炎症は動脈硬化症など他の生活習慣病の発症にも関与している。それらの機序にも核酸断片の分解・認識に関わる自然免疫機構の関与が推測され、生活習慣病の新たな治療・予防方法の開発につながる可能性があるといえる。今後継続して、代謝疾患と cfDNA の関わりについて詳細な作用機序の解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fukuda D, Nishimoto S, Aini K, Tanaka A, Nishiguchi T, Kim-Kaneyama JR, Lei XF, Masuda K, Naruto T, Tanaka K, Higashikuni Y, Hirata Y, Yagi S, Kusunose K, Yamada H, Soeki T, Imoto I, Akasaka T, Shimabukuro M, Sata M	4. 巻 8
2. 論文標題 Toll Like Receptor 9 Plays a Pivotal Role in Angiotensin II-Induced Atherosclerosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the American Heart Association	6. 最初と最後の頁 e010860
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/JAHA.118.010860	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 Nishimoto Sachiko, Aini Kunduziayi, Fukuda Daiju, Higashikuni Yasutomi, Tanaka Kimie, Hirata Yoichiro, Yagi Shusuke, Kusunose Kenya, Yamada Hirotsugu, Soeki Takeshi, Shimabukuro Michio, Sata Masataka	4. 巻 5
2. 論文標題 Activation of Toll-Like Receptor 9 Impairs Blood Flow Recovery After Hind-Limb Ischemia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Cardiovascular Medicine	6. 最初と最後の頁 144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcvm.2018.00144	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nishimoto Sachiko, Fukuda Daiju, Usami Makoto, Sata Masataka
2. 発表標題 Toll-like receptor 9 plays an important role in angiotensin II-induced atherosclerosis
3. 学会等名 The 41st ESPEN Congress（国際学会）
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
---------------------------	-----------------------	----