

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：34507

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K19695

研究課題名（和文）脂肪組織の無菌性慢性炎症を中心とした核酸の新規機能の解析

研究課題名（英文）Analysis of new function of nucleic acid in adipose tissue inflammation

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：インスリン抵抗性発現には、脂肪組織マクロファージを中心とした慢性炎症が関与するが、機能障害を起こした細胞から遊離する分子のひとつである自己遊離核酸や核酸分解・認識機構との関係は不明である。肥満がDNase活性へ与える影響を検討した結果、肥満マウスは対照群より内臓脂肪組織DNase活性が増強し、血中DNase活性は上昇傾向であった。マクロファージに核酸認識型TLRリガンドやcGAMPで刺激を行うと、複数のDNA分解酵素やSTINGシグナル関連分子の遺伝子発現に影響を及ぼした。以上からインスリン抵抗性発現とマクロファージを介した炎症惹起に複数の核酸認識・分解機構が関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、脂肪組織のインスリン抵抗性とマクロファージを介した炎症性質の発現に複数の核酸認識・分解機構が関与する可能性が示唆された。今後、脂肪組織の慢性炎症進展とDNA認識制御および分解能の関連性を、シグナル伝達機構を含め詳細に明らかにすることで、全身の代謝状態が問題となる生活習慣病に対する新たな予防・治療方法の開発への応用が期待される。cfDNAが関わる病態には、血管の慢性炎症である動脈硬化症にも関与することが示唆されており、全身の代謝調節に関わる核酸の栄養生理学的意義を明らかにすることで、生活習慣病に対する新たな予防・治療方法の開発への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：Chronic inflammation centered macrophages in adipose tissue participates the development of insulin resistance. It is suggested relationship between insulin resistance and cell free DNA, which is one of the molecules released from damaged cells triggered by stress such as over nutrition. This study aimed to explore the relationship between insulin resistance and the mechanism of recognizing and breaking down DNA. Measuring activities of DNase in visceral adipose tissue in obese mice revealed that increased DNase activity in obese adipose tissue. The results of in vitro experiments revealed that TLR agonists or cGAMP affected mRNA expression of Trex 1 and molecules associated STING. These results suggested that the mechanism of recognizing and breaking down DNA may involved in the mechanism of the development of insulin resistance and chronic inflammation through macrophages in visceral adipose tissue.

研究分野：代謝栄養学

キーワード：慢性炎症 肥満 脂肪組織 自己遊離核酸 インスリン抵抗性 DNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病で問題となるインスリン抵抗性の発現には、脂肪組織におけるマクロファージを中心とした慢性炎症が重要な役割を果たしている。自己由来の遊離核酸断片 (cell free DNA; cfDNA) は、病原体センサーのひとつである核酸受容体に認識され、慢性炎症を惹起することから、インスリン抵抗性との関係が示唆されている。しかしながら、肥大した脂肪組織の炎症における核酸の分解と認識に関わる自然免疫機構の詳細は明らかではない。また、肥満や動脈硬化症を含む生活習慣病の発症機序において、核酸断片の分解・認識による自然免疫機構の関与については詳細な検討はなされておらず未解明である。本来、血液中に遊離した DNA 断片は速やかに分解されるが、申請者らのこれまでの検討により、高脂肪食負荷により cfDNA 蓄積と脂肪組織における炎症性物質の増加を伴う DNase II 活性の上昇を見出している。インスリン抵抗性と cfDNA 蓄積との関連が示唆されているが、インスリン抵抗性発現と核酸分解酵素の関連を含めた核酸分解・認識機構との関係性は未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究は、過栄養による脂肪組織の慢性炎症と核酸分解能の関連性を調べるとともに、遊離核酸断片の質、量の変化を解析し、栄養状態及び全身の代謝状態と核酸分解・認識機構との関係を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 肥大脂肪組織における慢性炎症と DNase II 活性の関連を解析する (in vivo)

高脂肪食 (60% Fat/cal) を 8~12 週間与えて作成した肥満マウスの内臓脂肪組織の DNase II 活性を Single radial enzyme diffusion (SRED) 法で測定し、通常食マウスと比較する。あわせて、血漿中 cfDNA 濃度との関係性を解析する。

(2) 肥満により蓄積する cfDNA の質・量の評価

申請者の予備検討では、野生型マウスに高脂肪食負荷を開始後約 12 週間で体重増加のピークを迎えるが、8 週間の時点ですでに血中 cfDNA 蓄積が観察される。すなわち肥満進行の早期から脂肪組織の DNA 分解の制御機構の機能障害が示唆される。そこで、肥満マウスと通常食マウスのインスリン抵抗性発現をインスリン負荷試験により評価するとともに、両者の cfDNA からミトコンドリア DNA の多寡を調べるためにミトコンドリア関連遺伝子を qPCR 法により定量する。また、cfDNA のメチル化測定により質を評価する。

(3) マクロファージの炎症惹起と細胞内局在型 DNA 認識シグナル伝達機構の解析

内因性リガンドによる TLR9 の活性化には、マクロファージがリガンドとなりうる DNA 断片を細胞外からエンドソームに取り込んで認識するエンドサイトーシスが必要である。一方、細胞内型 DNA センサーのひとつである Stimulator of interferon genes (STING) は、セカンドメッセンジャーである cyclic GMP-AMP (cGAMP) を介して炎症を誘導する。そこで、マクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞に対して、CpG-ODN, poly:IC などの核酸認識型 TLR に対するリガンドや、肥満に関連して増加する酸化 LDL、また cGAMP を用いて刺激を行い、炎症性物質および炎症の程度と核酸認識・分解酵素の遺伝子発現の変化を qPCR 法などの分子生物学的手法を用いて比較する。

4. 研究成果

(1) 内臓脂肪組織肥大に伴う炎症活性化と DNA 分解酵素の関係

高脂肪食を 8 週間与えた肥満マウスの内臓脂肪組織において、炎症性物質の遺伝子発現と DNase II 活性はともに通常食マウスに比べて上昇した。高脂肪食を与える期間が長かった肥満マウス (12 週間) の DNase II 活性はさらに上昇していた。血中の cfDNA 濃度は肥満マウスで増加傾向であった。一方、血中に分泌され中性下ではたらく DNase II 活性を調べるために、血漿中の DNase II 活性を測定したところ、8 週間および 12 週間の時点で、両群間に差は認められなかったものの、肥満マウスの血漿中でやや上昇する傾向がみられた。しかし、肥満マウスの内臓脂肪組織局所においては、DNase II の遺伝子発現は低下することがわかった。また、肥満マウスの内臓脂肪組織では、通常食マウスに比べて、DNA 分解酵素のひとつである Three Prime Repair Exonuclease 1 (Trex1) の遺伝子発現は減少傾向であることがわかった。

(2) 肥満により蓄積する cfDNA の質・量の評価

肥満マウス (8 週間、12 週間高脂肪食) は通常食マウスに比べてインスリン抵抗性を生じていた。肥満マウスの血漿から抽出した cfDNA について、ミトコンドリア DNA 量の比較を行うためにミトコンドリア関連遺伝子配列を用いて qPCR 法で定量したところ、高脂肪食を 8 週間、12 週間与えた肥満マウスともに、通常食マウスとの間で差は観察されなかった。また、cfDNA のメチル化レベルの測定を行ったところ、8 週間、12 週間のいずれの時点においても両群間に差は観察さ

れなかった。

(3) DNA 認識による炎症シグナル誘導と細胞内局在型 DNA 認識シグナル伝達

in vitro 実験により RAW264.7 細胞への CpG-ODN 刺激では、TREX1 遺伝子発現は CpG-ODN 濃度依存的に上昇した。cGAMP による刺激では、TREX1 発現は上昇した。一方、肥満マウスの内臓脂肪組織は、通常食マウスに比べて、STING の mRNA は低発現であったが、興味深いことに、近年 STING 関連分子のひとつとして報告されているカルシウムセンサー-stromal interaction molecule 1 (STIM1) (*Nat Immunol.* 2019 :152-162) の発現は、高脂肪食負荷の期間が長いほど低下することがわかった。そこで、RAW264.7 細胞に対して LPS により炎症を誘導させると、STIM1 の mRNA 発現が低下することがわかった。3T3-L1 細胞の脂肪細胞化実験をおこなったところ、脂肪細胞分化過程における STIM1 発現の変化はみられなかったことから、肥満マウスの内臓脂肪組織における STIM1 発現の変化は、炎症惹起によるマクロファージ活性化に關与する可能性が示唆された。さらに、炎症惹起による細胞内局在型 DNA 認識シグナルへの關与を検討するために、LPS 以外の刺激 (CpG, poly:IC, 酸化 LDL) による STING と STIM1 発現の変化を調べた。CpG-ODN や Poly:IC による刺激を行ったところ、STING と STIM1 の mRNA 発現をともに低下させたが、酸化 LDL による刺激は影響しなかった。STING のリガンドである cGAMP による刺激は、cGAMP 濃度依存的に STIM1 を減少させた。

脂肪組織肥大化が内臓脂肪組織局所と全身の核酸認識・分解の活性化へ与える影響を検討した結果、肥満マウスの cfDNA 中の特定の遺伝子配列はみとめられなかったものの、食事誘導性肥満マウスは通常食マウスに比べて血中 DNase I 活性がやや増強した。高インスリン血症や内臓脂肪組織の炎症性質と DNase I 活性の上昇との關連が見いだされた。in vitro 実験において、マクロファージに対して、TLR アゴニストや、cGAMP による炎症誘導刺激を与えると、細胞内局在型 DNA 認識シグナル関連分子の遺伝子発現に影響を及ぼすことを見出した。

以上から、脂肪組織のインスリン抵抗性とマクロファージを介した炎症性質の発現に複数の核酸認識・分解機構が關与する可能性が示唆された。今後、脂肪組織の慢性炎症進展と DNA 認識制御および分解能の關連性を、シグナル伝達機構を含め詳細に明らかにすることで、全身の代謝状態が問題となる生活習慣病に対する新たな予防・治療方法の開発への応用が期待される。cfDNA が關わる病態には、血管の慢性炎症である動脈硬化症にも關与することが示唆されており、全身の代謝調節に關わる核酸の栄養生理学的意義を明らかにすることで、生活習慣病に対する新たな予防・治療方法の開発への応用が期待される。

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 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nishimoto Sachiko, Sata Masataka, Fukuda Daiju	4. 巻 9
2. 論文標題 Expanding role of deoxyribonucleic acid-sensing mechanism in the development of lifestyle-related diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cardiovascular Medicine	6. 最初と最後の頁 881181
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcvm.2022.881181	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 Pham Phuong Tran, Fukuda Daiju, Nishimoto Sachiko, Kim-Kaneyama Joo-Ri, Lei Xiao-Feng, Takahashi Y, Sato T, Tanaka K, Suto K, Kawabata Y, Yamaguchi K, Yagi S, Kusunose K, Yamada H, Soeki T, Wakatsuki T, Shimada K, Kanematsu Y, Takagi Y, Shimabukuro M, Setou M, Barber Glen N, Sata Masataka	4. 巻 42
2. 論文標題 STING, a cytosolic DNA sensor, plays a critical role in atherogenesis: a link between innate immunity and chronic inflammation caused by lifestyle-related diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Heart Journal	6. 最初と最後の頁 4336 ~ 4348
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/eurheartj/ehab249	査読の有無 無
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 Miyashita Masahiro, Mitani Naoya, Kitanaka Atsushi, Yakio Mao, Chen Ming, Nishimoto Sachiko, Uchiyama Hironobu, Sue Masayuki, Hotta Hak, Nakagawa Yoshiaki, Miyagawa Hisashi	4. 巻 191
2. 論文標題 Identification of an antiviral component from the venom of the scorpion <i>Liocheles australasiae</i> using transcriptomic and mass spectrometric analyses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxicon	6. 最初と最後の頁 25 ~ 37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.toxicon.2020.12.007	査読の有無 無
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 Nishimoto Sachiko, Fukuda Daiju, Sata Masataka	4. 巻 40
2. 論文標題 Emerging roles of Toll-like receptor 9 in cardiometabolic disorders	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41232-020-00118-7	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 Miyashita Masahiro, Mitani Naoya, Kitanaka Atsushi, Yakio Mao, Chen Ming, Nishimoto Sachiko, Uchiyama Hironobu, Sue Masayuki, Hotta Hak, Nakagawa Yoshiaki, Miyagawa Hisashi	4. 巻 191
2. 論文標題 Identification of an antiviral component from the venom of the scorpion <i>Liocheles australasiae</i> using transcriptomic and mass spectrometric analyses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxicon	6. 最初と最後の頁 25～37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.toxicon.2020.12.007	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0件

〔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
---------	---------