

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月10日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21689026

研究課題名（和文） メタボリックシンドロームにおける遊離脂肪酸ダイナミズムの分子機構の解明

研究課題名（英文） Pathophysiologic role of saturated fatty acids in the metabolic syndrome

研究代表者

菅波 孝祥（SUGANAMI TAKAYOSHI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座教授

研究者番号：50343752

研究成果の概要(和文)：

過剰な飽和脂肪酸による広義の脂肪毒性は、メタボリックシンドロームの基盤病態と考えられる。本研究では、脂肪細胞とマクロファージの相互作用に注目して、肥満の脂肪組織炎症の新しい制御分子を探索し、マクロファージに発現する炎症抑制性転写因子 ATF3 と新規病原体センサー Mincle を同定した。肥満の脂肪組織において、飽和脂肪酸は肥大化した脂肪細胞から大量に放出され、血中を介して遠隔臓器に脂肪毒性を誘導するだけでなく、脂肪組織局所においても炎症反応を制御することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：

Overproduction of saturated fatty acids is considered to be a molecular basis of the metabolic syndrome. In this study, we focused on the intimate crosstalk between adipocytes and macrophages in obese adipose tissue and identified ATF3, an anti-inflammatory transcription factor, and Mincle, a pathogen sensor for mycobacterium tuberculosis, as novel regulators of adipose tissue inflammation. Thus, saturated fatty acids, which are released abundantly from hypertrophied adipocytes in obesity, may induce inflammatory changes in adipose tissue as well as lipotoxicity in remote organs such as liver and skeletal muscle.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2010年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2011年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
年度			
年度			
総計	20,700,000	6,210,000	26,910,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:内分泌学

キーワード:肥満、脂肪組織、マクロファージ、慢性炎症、飽和脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

脂肪組織は単なるエネルギー貯蔵器官としてのみならず、多くのアディポサイトカインを分泌する内分泌器官として多彩な生命現象に関与する。遊離脂肪酸は、脂肪組織に由来する脂質アディポサイトカインであり、肥満や過栄養において過

剰に産生され、骨格筋や肝臓におけるインスリン抵抗性、膵β細胞におけるインスリン分泌障害、血管内皮機能障害などの「脂肪毒性 (lipotoxicity)」と呼ばれる病態をもたらす。しかしながら、「脂肪毒性」の分子機構には組織(細胞)特異性が存在し、脂肪酸の作用は複数の受

容体や種々の中間代謝産物を介するなど一様ではない。最近では、脂肪酸の量的変化のみならず、鎖長や不飽和度などの質的变化がメタボリックシンドロームの病態形成に重要であることが報告され、遊離脂肪酸を、蛋白ホルモンである多くのアディポサイトカインと区別して、「リポカイン (lipokine)」と称する考え方もある。このような、「遊離脂肪酸のダイナミズム」とも言うべき遊離脂肪酸の多様性と作用機構の複雑性が生体の代謝応答を調節する分子機構の全貌は未解明である。

申請者らは既に、脂肪細胞とマクロファージの共培養系を新たに確立し、肥大化した脂肪細胞に由来する飽和脂肪酸とマクロファージに由来する TNF α をメディエータとするパラクリン調節系が脂肪組織炎症を増悪する「悪循環」を形成することを提唱した。特に、飽和脂肪酸が 4 型 Toll 様受容体 (TLR4) を介してマクロファージの NF- κ B 経路を活性化すること、TLR4 遺伝子変異を有する C3H/HeJ マウスを用いて、TLR4 シグナルの阻害が脂肪組織の炎症性変化と全身の糖脂質代謝障害を改善することを証明し、炎症性サイトカインとしての飽和脂肪酸の病態生理的意義を明らかにした。しかしながら、脂肪酸の炎症誘導作用に構造特異性があり、遊離脂肪酸の質的变化によるマクロファージ機能調節の分子機構や病態生理的意義についてはようやく研究の端緒に付いたばかりである。

2. 研究の目的

このような背景を踏まえて、本研究では、「遊離脂肪酸のダイナミズム」とも言うべき遊離脂肪酸の多様性と作用機構の複雑性を解明する目的で、遊離脂肪酸の産生調節機構と作用機構に関して検討を行う。

3. 研究の方法

(1) マウス;

マクロファージ特異的 ATF3 トランスジェニックマウスは、SR-A プロモーターを用いて作製し、発現量の異なる 2 ラインを実験に供した。食餌誘導性肥満は、高脂肪食飼料 (リサーチダイエツ社、D12492) を用いて作製し、16 週間観察した。

(2) 培養細胞;

培養脂肪細胞として、定法に従って脂肪細胞に分化誘導した 3T3-L1 を用いた。培養マクロファージとして、RAW264 マクロファージ細胞株、腹腔内マクロファージ、M-CSF により分化誘導した骨髄由来マクロファージを用いた。骨髄由来マクロファージを IFN- γ および IL-4 により、炎症促進性 M1、炎症抑制性 M2 マクロファージに誘導した。

(3) マイクロアレイ解析;

肥満マウスの脂肪組織、飽和脂肪酸 (パルミチン酸 200 μ M) で刺激した RAW264 マクロファ

ージ、3T3-L1 脂肪細胞と RAW264 の共培養より RNA を調整し、Affymetrix 社の mouse genome 430A 2.0 を用いてトランスクリプトーム解析を施行した。

(4) Yeast 2-hybrid 法;

全長 ATF3 を bait、Ca イオノフォアと LPS で刺激した培養マクロファージの cDNA ライブラリーを prey として、yeast 2-hybrid 法により ATF3 結合蛋白をスクリーニングした。

(5) Real-time PCR;

培養細胞や脂肪組織より total RNA を調整し、Real-time PCR 法により mRNA レベルを測定した。

(6) Western blotting;

培養マクロファージより核蛋白、細胞質蛋白を抽出し、Western blotting を施行した。

(7) プロモーター解析;

IL-6 プロモーターにルシフェラーゼレポーターを連結したコンストラクトを RAW264 マクロファージに一過性にトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を測定した。

4. 研究成果

(1) 肥満の脂肪組織炎症における ATF3 の意義に関する研究;

我々は既に、脂肪細胞とマクロファージの相互作用が脂肪組織炎症の増強を介して遊離脂肪酸の過剰産生を誘導することを提唱している。この際、脂肪細胞に由来する飽和脂肪酸が TLR4 の内在性リガンドとしてマクロファージを活性化することを証明し、メタボリックシンドロームの病態形成に関与することを見出した。本研究では、DNA マイクロアレイ法により、マクロファージにおける飽和脂肪酸の標的分子として ATF3 を同定し、ATF3 が肥満の脂肪組織に浸潤するマクロファージに高発現することを証明した。培養マクロファージを用いた検討により、ATF3 は飽和脂肪酸/TLR4/NF- κ B 経路の負の制御因子として作用することが明らかになった。実際、SR-A プロモーターを用いて、ATF3 をマクロファージ特異的に過剰発現するトランスジェニックマウスを作製したところ、肥満に伴うマクロファージの活性化が減弱しており、ATF3 が慢性炎症を基盤とするメタボリックシンドロームの新しい創薬ターゲットとなる可能性が示唆された。(Circ. Res. 105:25-32, 2009)

LysM-Cre マウスと ATF3 floxed マウスを交配することにより、マクロファージ特異的 ATF3 欠損マウス (ATF3 KO) を作出した。腹腔内マクロファージを調整し、ATF3 の mRNA、蛋白レベルがそれぞれ 80-90% ノックアウトされていることを確認した。ATF3 KO に高脂肪食を負荷すると、野生型マウスで認められる ATF3 mRNA レベルの上

昇がほぼ抑制されたことより、肥満で増加する脂肪組織の ATF3 は主に浸潤マクロファージに由来することが明らかになった。

(2)炎症抑制性転写因子 ATF3 の作用機構に関する研究;

Yeast 2-hybrid 法を用いて、マクロファージにおける ATF3 結合蛋白をスクリーニングし、ATF4 を同定した。ATF4 は飽和脂肪酸により誘導されるが、その分子機構は TLR4 非依存性であった。ATF4 を欠損、あるいはノックダウンしたマクロファージは、飽和脂肪酸による IL-6 産生が有意に減弱した。一方、ATF4 を選択的に活性化、あるいは過剰発現すると、LPS による IL-6 産生がさらに増強した。このメカニズムとして、ATF4 は飽和脂肪酸による NF- κ B の活性化に重要であることが明らかになった。また、IL-6 プロモーター上に ATF4 の結合配列が存在し、ATF4 が直接的に IL-6 の転写を活性化することを見出した。

(3)へパリン結合上皮成長因子様増殖因子 (HB-EGF)の産生調節機構に関する研究;

HB-EGF は膜蛋白質として合成され、切断酵素により切断されて細胞より放出される。肥満患者の血清 HB-EGF は高値を示し、肥満の病態形成に関与すると想定されるが、その産生機構は明らかでなかった。本研究では、アルカリフォスファターゼ融合 HB-EGF を安定発現する 3T3-L1 脂肪細胞を作出し、HB-EGF 放出の分子機構を検討した。インスリンあるいはリコンビナント HB-EGF は分化脂肪細胞において HB-EGF 放出を誘導し、少なくとも一部は ADAM17 によることが示唆された。切断酵素による HB-EGF 放出の分子機構の解明は、内分泌細胞としての脂肪細胞の生物学に新しい洞察をもたらすと考えられる。(Obesity 18:1888-1894, 2010)

(4)遊離脂肪酸の標的分子の探索:

本研究では、脂肪細胞とマクロファージの共培養を用いたトランスクリプトーム解析を施行し、肥満の脂肪組織における新たな炎症関連遺伝子として、macrophage-inducible C-type lectin (Mincle, clec4e)を同定した。Mincle は、遺伝性あるいは食餌誘導性肥満マウスの脂肪組織において著しい発現亢進を認めた。培養マクロファージにおいて、Mincle は飽和脂肪酸/TLR4/NF- κ B 経路により誘導され、M1 マクロファージ選択的に発現した。従来、Mincle は、結核菌や病原性真菌に対する病原体センサーとして生体の感染防御に働くことが知られていたが、本研究により、肥満の脂肪組織に高発現することが明らかになった。一方、Mincle は、死細胞に対するセンサーとしても作用することが報告されている。肥満の脂肪組織において、M1 マクロファージは細胞死に至った脂肪細胞を取り囲むように存在 (crown-like structure) し、脂肪細

胞死が脂肪組織炎症の程度と相関することが知られているため、脂肪組織炎症における Mincle の病態生理的意義が示唆される。(Diabetes 60:819-826, 2011)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

1. N. Satoh-Asahara, A. Shimatsu, Y. Sasaki, H. Nakaoka, A. Himeno, M. Tochiya, S. Kono, T. Takaya, K. Ono, H. Wada, T. Suganami, K. Hasegawa, Y. Ogawa. Highly purified eicosapentaenoic acid increases interleukin-10 levels of peripheral blood monocytes in obese patients with dyslipidemia. **Diabetes Care** 35: 2631-2639, 2012. doi: 10.2337/dc12-0269
2. T. Suganami, M. Tanaka, Y. Ogawa. Adipose tissue inflammation and ectopic lipid accumulation. **Endocr. J.** 59: 849-857, 2012. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22878669>
3. M. Ichioka, T. Suganami, N. Tsuda, I. Shirakawa, Y. Hirata, N. Satoh-Asahara, Y. Shimoda, M. Tanaka, M. Kim-Saijo, Y. Miyamoto, Y. Kamei, M. Sata, Y. Ogawa. Increased expression of macrophage-inducible C-type lectin in adipose tissue of obese mice and humans. **Diabetes** 60: 819-826, 2011. doi: 10.2337/db10-0864
4. M. Itoh, T. Suganami, N. Nakagawa, M. Tanaka, Y. Yamamoto, Y. Kamei, S. Terai, I. Sakaida, Y. Ogawa. Melanocortin-4 receptor-deficient mice as a novel mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. **Am. J. Pathol.** 179: 2454-2463, 2011. doi: 10.4061/2011/720926
5. T. Suganami, Y. Ogawa. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. **J. Leukoc. Biol.** 88: 33-39, 2010. doi: 10.1189/jlb.0210072
6. N. Satoh, A. Shimatsu, A. Himeno, Y. Sasaki, H. Yamakage, K. Yamada, T. Suganami, Y. Ogawa. Unbalanced M1/M2 phenotype of peripheral blood monocytes in obese diabetic patients: effect of pioglitazone. **Diabetes Care** 33: e7, 2010. doi: 10.2337/dc09-1315
7. A. Sato, H. Kawano, T. Notsu, M. Ohta, M. Nakakuki, K. Mizuguchi, M. Itoh, T. Suganami, Y. Ogawa. Anti-obesity effect of eicosapentaenoic acid in high-fat/high-sucrose diet-induced obesity: importance of hepatic lipogenesis. **Diabetes** 59: 2495-2504, 2010. doi: 10.2337/db09-1554
8. K. Yamashiro, T. Sasano, K. Tojo, I.

- Namekata, J. Kurokawa, N. Sawada, T. Suganami, Y. Kamei, H. Tanaka, N. Tajima, K. Utsunomiya, Y. Ogawa, T. Furukawa. Role of transient receptor potential vanilloid 2 in LPS-induced cytokine production in macrophages. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 398: 284-289, 2010. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.06.082
9. T. Yamamoto, T. Suganami, M. Kiso-Narita, PA. Scherle, Y. Kamei, M. Isobe, S. Higashiyama, Y. Ogawa. Insulin-induced ectodomain shedding of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in adipocytes in vitro. **Obesity** 18: 1888-1894, 2010. doi: 10.1038/oby.2010.2
10. T. Suganami, X. Yuan, Y. Shimoda, K. Uchio-Yamada, N. Nakagawa, I. Shirakawa, T. Usami, T. Tsukahara, K. Nakayama, Y. Miyamoto, K. Yasuda, J. Matsuda, Y. Kamei, S. Kitajima, Y. Ogawa. Activating transcription factor 3 constitutes a negative feedback mechanism that attenuates saturated fatty acid/Toll-like receptor 4 signaling and macrophage activation in obese adipose tissue. **Circ. Res.** 105: 25-32, 2009. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.196261

[学会発表] (計 9 件)

1. T. Suganami, *et al.* Adipose tissue inflammation and ectopic fat accumulation. International Symposium for the Study of Obesity, 2012.10.13 ~ 2012.10.14, Kyoto (招待講演)
2. 菅波孝祥他、脂肪組織炎症における飽和脂肪酸の意義、第 85 回日本内分泌学会学術総会、2012 年 4 月 19 日 ~ 2012 年 4 月 21 日、名古屋 (招待講演)
3. 菅波孝祥他、脂肪組織炎症における病原体センサーの意義、第 55 回日本糖尿病学会学術集会、2012 年 5 月 17 日 ~ 2012 年 5 月 19 日、横浜 (招待講演)
4. 菅波孝祥他、脂肪組織の慢性炎症と飽和脂肪酸、第 33 回日本炎症・再生医学会、2012 年 7 月 5 日 ~ 2012 年 7 月 6 日、福岡 (招待講演)
5. T. Suganami, *et al.* Obesity and adipose tissue inflammation. 第 19 回日本血管生物医学会、2011.12.8 ~ 2012.12.10, 東京 (招待講演)
6. T. Suganami, *et al.* Obesity and adipose tissue inflammation. 第 34 回日本分子生物学会年会、2011.12.13 ~ 2012.10.16, 横浜 (招待講演)
7. 市岡誠之、菅波孝祥他、肥満の脂肪組織における新たな炎症関連遺伝子の探索、第 31 回日本肥満学会学術大会、2010 年 10 月 1 日 ~ 2010 年 10 月 2 日、前橋
8. 菅波孝祥他、肥満脂肪組織の炎症性変化における脂肪細胞とマクロファージの相互作用の意義、第 82 回日本内分泌学会学術総会、2009 年 4 月 23 日 ~ 2009 年 4 月 25 日、前橋 (招待講演)
9. 菅波孝祥他、肥満の脂肪組織炎症性における脂肪細胞とマクロファージの相互作用、第 30 回日本肥満学会学術大会、2009 年 10 月 9 日 ~ 2009 年 10 月 10 日、浜松 (招待講演)

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称: 脂肪細胞の炎症性変化を抑制する物質のスクリーニング系及びそれを用いたスクリーニング方法

発明者: 小川佳宏、菅波孝祥

権利者: 国立大学法人 東京医科歯科大学

番号: 4862160 号

取得年月日: 2011 年 11 月 18 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/grad/cme/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅波 孝祥 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・寄附講座教授)

研究者番号: 50343752

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: