

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790863

研究課題名 (和文) 新規薬剤を用いた脂肪組織における
M1/M2 マクロファージ制御機構の解明研究課題名 (英文) Research of the mechanism of M1/M2 macrophage
in adipose tissue by using newly agent.

研究代表者

羽田 裕亮 (HADA YUSUKE)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 20436463

研究成果の概要 (和文)：

我々はアディポネクチンやアディポネクチン受容体欠損マウスにおける MCP-1 と M1/M2 マクロファージの働きを解明することによりメタボリックシンドロームにおける炎症抑制作用について解析を行い、炎症組織におけるその役割について部分的に明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

We made a research on the anti-inflammatory effects of MCP-1 and M1/M2 macrophage in state of metabolic syndrome, using Adiponectin KO mice and Adiponectin receptor KO mice. And we have partially revealed its role in the inflammatory tissue.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：糖尿病・脂肪細胞・アディポネクチン

1. 研究開始当初の背景

肥満がメタボリックシンドロームを惹起するメカニズムとして、ケモカインである MCP-1 が脂肪組織にマクロファージを引き寄せ、炎症性サイトカインを増加させることが重要な役割を担っている事を脂肪細胞特異的な MCP-1 の過剰発現マウスを用いて実証してきた。

本研究ではメタボリックシンドロームの発症において、MCP-1 の発現誘導とマクロファージの浸潤は本当に脂肪組織のみにおいて重要であるのかどうかを明らかにする事を目的として、脂肪組織が無いことによって著明な脂肪肝となり、糖尿病と脂質代謝異常を

呈する脂肪委縮性糖尿病のモデルマウスを用いて端的に示す事を試みた。そして MCP-1 欠損マウスとの掛け合わせにより、脂肪委縮性糖尿病の病態における MCP-1 の意義を明らかにすることを目指した。さらに脂肪委縮性 A-ZIP-Tg 糖尿病モデルマウスで低下しているアディポネクチン (Ad) と Ad 受容体 (AdipoR) を補充することが、病態の改善に繋がるかどうかを検討した。メタボリックシンドロームの発症において、MCP-1 の発現誘導とマクロファージの浸潤は本当に脂肪組織のみにおいて重要であるのかどうかを明らかにする事を目的として、脂肪組織が無いことによって著明な脂肪肝となり、糖尿病と脂

質代謝異常を呈する脂肪委縮性 A-ZIP-Tg 糖尿病マウスを用いて端的に示す事を試みた。

2. 研究の目的

我々は、脂肪細胞から分泌される生理活性物質アディポカインの中で、肥満に伴って Ad が低下することがメタボリックシンドロームや糖尿病激増の主因になっていること、Ad を補充することがこれらの治療法になり得ることを示してきた (Nat. Med. 7: 941, 2001; Nat. Genet 30: 221, 2002; Nat. Med. 8: 1288, 2002)。さらに培養細胞においてこの Ad の結合・作用に必須の受容体として AdipoR を世界ではじめて同定してきた (Nature 423: 762, 2003)。これら一連の研究に引き続き、AdipoR が個体レベルにおいて Ad の結合・作用に必須の受容体であることを証明し、インスリン感受性、糖・脂質・エネルギー代謝の制御において生理的に重要な役割を果たすこと、さらに病態で低下した AdipoR をアデノウイルスを用いて増加させることが病態を改善させることも示した (Nat. Med. 13: 332, 2007)。一方、肥満症・メタボリックシンドロームの病態において、インスリン抵抗性惹起アディポカインが協調的・統一的に増加してくるメカニズムとして、ケモカインである MCP-1 が脂肪組織にマクロファージを引き寄せ、炎症性サイトカインを増加させることが重要な役割を担っている事を脂肪細胞特異的な MCP-1 の過剰発現マウスを用いて実証してきた (J. Biol. Chem. 281: 26602, 2006)。肥満症・メタボリックシンドロームの病態において、インスリン抵抗性惹起アディポカインが協調的・統一的に増加することと、インスリン感受性アディポカインである Ad が低下することの相互関係として、肥満においては Ad/AdipoR 作用が低下し、酸化ストレスの増加などを介して MCP-1 の発現が誘導されることを、遺伝子欠損マウスなどを用いて示した (Nat. Med. 13: 332, 2007)。これらの研究成果を踏まえ、メタボリックシンドロームの発症において MCP-1 の増加やマクロファージの浸潤は脂肪組織で起こることのみが本当に重要であるのかどうかを明らかにすることが重要であると考えようになり、脂肪委縮性糖尿病モデルマウス (A-ZIP-Tg マウス) で検討するという着想に至った。このモデルマウス (J. Clin. Invest. 108: 1001, 2001) においては、脂肪組織が無いことによって Ad が枯渇しているが (Nat. Med. 7: 941, 2001)、さらに AdipoR も低下しているため、外因性に Ad を補充しても Ad 作用が伝わらないことを以前に報告している (Diabetes 51: 2727, 2002)。このモデルマウスを用いることによって、Ad/AdipoR 作用と MCP-1 の相互作用も明らかにすることが出来るという着想に至り、本研

究を実施することとした。また IKK β 阻害剤や ARB によりマクロファージの働きが阻害されることが従来より知られており、肥満とそれに伴うインスリン抵抗性に起因する炎症反応の阻害に MCP-1 の働きとあわせてその役割の検討を行った。

3. 研究の方法

肥満がメタボリックシンドロームを惹起するメカニズムとして、MCP-1 による炎症性サイトカインを増加が重要な役割を担っている事が知られている。本研究ではメタボリックシンドロームの発症において、MCP-1 の発現誘導とマクロファージの浸潤が脂肪組織のみにおいて重要であるのかどうかを明らかにする事を目的のひとつとして、糖尿病と脂質代謝異常を呈する脂肪委縮性 A-ZIP-Tg 糖尿病マウスを用いて端的に示す事を試みた。また、アディポサイトカインである Ad や AdipoR 欠損マウスにおける MCP-1 と M1/M2 マクロファージの働きを解明することにより Ad と AdipoR のメタボリックシンドロームにおける炎症抑制作用について解明を試みた。さらに、ARB や IKK β 阻害剤によって炎症抑制作用がマクロファージを通じて行われているのかの有無とその機構について解明を目指した。

(1) 脂肪委縮性 A-ZIP-Tg 糖尿病マウスにおいて肥満症マウスのように MCP-1 レベルの増加の臓器特異性の有無を検討し、マクロファージの浸潤が増加している組織があったならば、IL-6 や iNOS 等のインスリン抵抗性惹起因子を多く発現する classical に活性化されたいわゆる悪玉の M1 マクロファージなのか、Arginase や IL-10 等を多く発現し組織修復等を司る alternative に活性化されたいわゆる善玉の M2 マクロファージなのかを明らかにすることを試みた。次に脂肪委縮性 A-ZIP-Tg 糖尿病マウスと MCP-1 欠損マウスとを掛け合わせ、MCP-1 欠損脂肪委縮性 A-ZIP-Tg マウスを作製し、同様の検討を行い、脂肪委縮性糖尿病の病態における MCP-1 の意義を、M1/M2 マクロファージの制御も含めて明らかにすることを試みた。

(2) さらに脂肪委縮性 A-ZIP-Tg 糖尿病モデルマウスで低下している Ad (Nat. Med. 7: 941, 2001; Nat. Med. 8: 1288, 2002) と AdipoR (Nature 423: 762, 2003; Nat. Med. 13: 332, 2007) を補充することが、糖・脂質・エネルギー代謝、マクロファージの浸潤や炎症など病態の改善に繋がるかどうか、M1/M2 マクロファージの制御も含めて検討を行った。

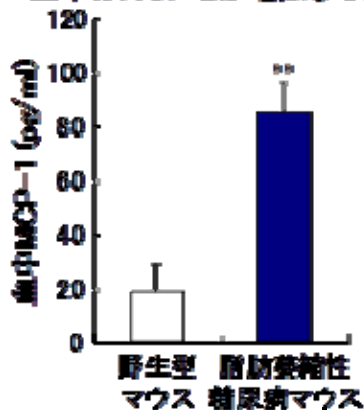
(3) この M1/M2 マクロファージの制御において、既に Ad や AdipoR の作用を増強させることが知られている ARB や IKK β 阻害剤が果たす役割について検討を行い、そのマクロファ

ージ制御を通じた抗炎症作用について検討した。

③ 当該分野における本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義我々は、Adの低下がメタボリックシンドロームと糖尿病を惹起することを明らかにしてきた(Nat. Med. 7: 941, 2001; Nat. Genet 30: 221, 2002; Nat. Med. 8: 1288, 2002)。そして非特異的な結合も多く世界中の誰もが成功しなかったAdの特異的受容体AdipoRの同定を dual 蛍光標識による特異的結合を指標にした発現クローニングという独創的な着想によって成し遂げてきた(Nature 423: 762, 2003)。

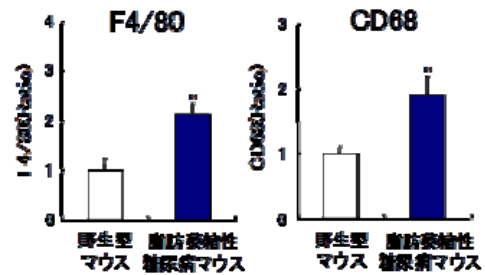
さらに病態で低下したAdipoRをアデノウイルスを用いて増加させることが耐糖能障害の改善に繋がること、しかしながらAdを欠損させた病態モデルでは、AdipoRの抗糖尿病作用は認められなくなることを示してきた(Nat. Med. 13: 332, 2007)。そして肥満がメタボリックシンドロームを惹起するメカニズムとして、MCP-1が脂肪組織にマクロファージを引き寄せ、炎症性サイトカインを増加させることが重要な役割を担っている事を脂肪細胞特異的なMCP-1の過剰発現マウスを用いて実証してきた(J. Biol. Chem. 281: 26602, 2006)。予備検討により、世界ではじめて、脂肪委縮性糖尿病モデルマウスの血中でMCP-1が増加していることを見出している(図1)(未発表データ)。

脂肪委縮性糖尿病モデルマウスでは血中のMCP-1が増加していた



さらに通常の肥満では認められない肝臓や骨格筋へのマクロファージの浸潤が脂肪委縮性糖尿病マウスでは認められることを、世界ではじめて見出している(図2)。

独創的な試みにより、肝臓へのマクロファージの浸潤が脂肪委縮性糖尿病マウスで認められることを世界で初めて見出した



そして脂肪委縮性糖尿病の場合、MCP-1以外のケモカインが肝臓や骨格筋へのマクロファージの浸潤を代償的に誘導し得ること、Ad/AdipoR同時補充はこれら全てを改善させ得ることを見出している。これらの成果は脂肪委縮性糖尿病のみならず、肥満に基づくメタボリックシンドローム・糖尿病の成因と治療の開発に画期的な意義をもたらす。

④ 本研究の斬新な着想、又は領域を越えた新しい研究である点等これまで脂肪委縮性糖尿病は、脂肪組織が無いために肝臓等に中性脂質が大量に蓄積することによる病態と捉えられていたが、MCP-1やマクロファージの浸潤が関与する慢性炎症の病態であるという着想は斬新である。ARBやIKKβ阻害剤を通じたAdやAdipoRによるM1/M2マクロファージの制御は代謝と免疫の領域を超えた新しい研究である。

4. 研究成果

MCP-1欠損脂肪委縮性A-ZIP-Tgマウスを作製し、同様の検討を行い、組織特異性の検討を行った。MCP-1欠損脂肪委縮性糖尿病マウスの作製は既に完了しており、その予備的解析により、MCP-1の新規の役割として肝臓内の中性脂質含量の制御等、糖・脂質・エネルギー代謝に対する作用を有すること、及びインスリンシグナル伝達に対する直接的な抑制作用を有することを見出している(未発表データ)。

さらに脂肪委縮性A-ZIP-Tg糖尿病モデルマウスで低下しているAdiponectin(Nat. Med. 7: 941, 2001; Nat. Med. 8: 1288, 2002)とAdipoR(Nature 423: 762, 2003; Nat. Med. 13: 332, 2007)を補充することが、糖・脂質・エネルギー代謝、マクロファージの浸潤や炎症など病態の改善に繋がるかどうか、M1/M2マクロファージの制御も含めて検討を行った。具体的には、全長Adは1日1回の腹腔内投与による補充を行い、AdipoRはアデノウイルスを用いて肝臓に過剰発現させ、体重・摂食量の測定、空腹時・随時の血糖値、インスリン値の測定、インスリン感受性試験、糖負荷試験、ピルビン酸負荷試験、正常血糖・

高インスリンランプ試験の実施、空腹時・随時の血清中性脂肪値、FFA 値の測定、中性脂質負荷試験の実施、組織内中性脂質の測定、ウエスタンブロット法によるインスリン受容体・インスリン受容体基質 1, 2 の肝臓・骨格筋における総量の測定とチロシンリン酸化量・セリンリン酸化量の測定、PI3 キナーゼ活性の測定、ウエスタンブロット法による Akt のリン酸化量、総量の測定、MAP キナーゼや p38MAP キナーゼ、JNK のリン酸化量、総量の測定を行った。マクロファージ浸潤の特異性、M1 マクロファージ・M2 マクロファージの比について検討を行った。続いて、抗炎症作用があり、マクロファージ浸潤を抑制することが報告されている ARB や IKK β 阻害剤を Ad 欠損マウス、AdipoR 欠損マウスに投与した。具体的には、体重・摂食量の測定、空腹時・随時の血糖値、インスリン値の測定、インスリン感受性試験、糖負荷試験、ビルビン酸負荷試験、正常血糖・高インスリンランプ試験の実施、空腹時・随時の血清中性脂肪値、FFA 値の測定、中性脂質負荷試験の実施、組織内中性脂質の測定、ウエスタンブロット法によるインスリン受容体・インスリン受容体基質 1, 2 の肝臓・骨格筋における総量の測定とチロシンリン酸化量・セリンリン酸化量の測定、PI3 キナーゼ活性の測定、ウエスタンブロット法による Akt のリン酸化量、総量の測定、MAP キナーゼや p38MAP キナーゼ、JNK のリン酸化量、総量の測定を行った。これらの研究から、M1 マクロファージ・M2 マクロファージの炎症における細胞生物学的な特性が明らかになってきており、炎症機構と動脈硬化作用に対するさらなる研究に臨んでいるところである。

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 9 件)

- (1) 糖尿病の病態と分類 羽田裕亮、山内敏正、門脇孝 からだの科学 2011(269) 5-9 査読なし
- (2) 糖尿病の食事療法で何を制限すべきか? (低炭水化物食 vs. 低脂肪食) 羽田裕亮、山内敏正、門脇孝 内分泌・糖尿病・代謝内科 2011(32) 346-354 査読なし
- (3) 病的肥満の動向と診断基準 羽田裕亮、山内敏正、門脇孝 LiSA MEDSi 18 94-96 査読なし
- (4) NICE Guideline 2009 (特集 2 型糖尿病治療の新時代--治療薬選択のパラダイムシフト) 羽田裕亮、山内敏正、門脇孝 月刊糖尿病 医学出版 2-5 p41-46 査読なし
- (5) 糖尿病(インクレチン関連薬) 羽田裕亮、山内敏正、門脇孝 日本臨床 2010 (68)

1900-1905 査読なし

- (6) 現行の糖尿病治療薬選択のガイドライン 羽田裕亮、山内敏正、門脇孝 NICE Guideline 2009 2010 (2) 41-46 査読なし
- (7) 高度肥満症を伴う重症 2 型糖尿病の 1 例 羽田裕亮、山内敏正、門脇孝 Medical Practice 2009 (26) 670-675 査読なし
- (8) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist rosiglitazone increases expression of very low density lipoprotein receptor gene in adipocytes. Takazawa T, Ymauchi T, Tsuchida A, Takata M, Hada Y, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Ueki K, Kadowaki T. J Biol Chem. 2009; 284(44): 300049-40057 査読あり
- (9) 超低カロリー食の評価 羽田裕亮、山内敏正、門脇孝 内分泌・糖尿病科 2009 (28) 177-182 査読なし

[学会発表] (計 3 件)

- (1) The IFSO-APC & JSSO Congress 2011 "Intragastric Balloon therapy" 2011 年 2 月 24 日 (招待) 北海道留寿都村・ルスツリゾートホテル
- (2) 第 31 回日本肥満学会 野菜・果物などからのアディポネクチン受容体 AdipoR のアゴニストの探索・解析 2010 年 10 月 1 日 前橋
- (3) 第 53 回日本糖尿病学会 野菜・果物などからのアディポネクチン受容体 AdipoR のアゴニストの探索・解析 2010 年 5 月 29 日 岡山

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

羽田 裕亮 (HADA YUSUKE)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 20436463

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし