

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：13201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590971

研究課題名（和文）脂肪組織マクロファージとインターロイキン 10 による代謝調節に関する研究

研究課題名（英文）Metabolic regulation by adipose tissue macrophage and interleukin-10

研究代表者

薄井 勲 (USUI ISA0)

富山大学・大学病院・講師

研究者番号：50377272

研究成果の概要（和文）：

本研究計画で我々は、脂肪組織 M1/M2 マクロファージ (M ϕ) とインスリン感受性との関連について、特に M2M ϕ とインターロイキン 10 (IL-10) の働きに注目し検討した。PPAR γ 活性化作用を持つテルミサルタンは脂肪組織 M ϕ の M2 極性を誘導し、一方脂肪組織低酸素は M1 極性を誘導した。ジフテリアトキシンの投与により M2M ϕ を欠失することができる M2M ϕ ablation マウスは脂肪細胞が小型化し、インスリン感受性が改善した。視床下部の IL-10 シグナルの活性化は骨格筋のミトコンドリア関連遺伝子の発現を増強させ、耐糖能を改善させた。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we investigated the relationship between adipose tissue M1/M2 macrophages and insulin sensitivity, focusing on the roles of M2 macrophage and interleukin10 (IL-10). Telmisartan, an angiotensin II type I receptor blocker, induced M2 polarity of adipose tissue macrophages with its PPAR γ -stimulating activity, while adipose tissue hypoxia induced the M1 polarity. M2 macrophage ablation mice, in which the number of M2 macrophage could be decreased by adding diphtheria toxin, showed smaller adipocyte size and improved insulin sensitivity. The activation of IL-10 signaling in hypothalamus increased the expression of mitochondria-related genes in skeletal muscle and improved insulin sensitivity.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2010 年度 | 2,700,000 | 810,000 | 3,510,000 |
| 2011 年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 2012 年度 | 400,000 | 120,000 | 520,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,800,000 | 1,140,000 | 4,940,000 |

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：インターロイキン 10、マクロファージ、メタボリックシンドローム、脂肪組織

1. 研究開始当初の背景

肥満に伴い認められるインスリン抵抗性状態では、マクロファージの浸潤や炎症性サイトカインの産生亢進など、脂肪組織が慢性炎症の特徴を持つ。我々はこれまでに、IL-1 や TNF α などの炎症性サイトカインがインスリンシグナルを抑制する機序について検討してきた (Diabetes 56; 795-803. 2009,

Endocrinology 148; 2994-3003. 2007, Mol Endocrinol. 20; 114-124. 2006, Biochem Biophys Res Commun. 335; 836-842. 2005)。脂肪組織に存在するマクロファージは、炎症性サイトカインを高発現する M1 マクロファージ (M1M ϕ) と、抗炎症性の特徴を持つ M2 マクロファージ (M2M ϕ) に分けられる。それまでも M1M ϕ に由来する慢性炎症が

インスリン抵抗性に関与することは知られていたが、M2Mφが代謝に与える影響は不明であった。我々は最近フローサイトメトリーを用いて、マウス精巣上体脂肪に浸潤するマクロファージの特徴を詳細に解析した。その結果、表面マーカーとして CD11c、CD206 を用いることにより、M1Mφと M2Mφを分離することに成功した。非肥満のインスリン感受性状態では M1Mφ/M2Mφ比が低く、肥満でインスリン抵抗性の状態ではこれが高比率であった。また肥満状態であっても、インスリン抵抗性改善薬であるピオグリタゾン投与すると M1Mφ/M2Mφ比が低下し、M2Mφにおいてインターロイキン10 (IL-10) の発現が選択的に上昇した (Diabetes 58; 2574-2582, 2009)。このような解析結果から我々は、M2Mφとそこに発現する IL-10 が代謝の改善に関与しているのではないかと、との仮説を得た。

本研究で我々は、特にM2MφとIL-10の働きに注目し、脂肪組織M1/M2Mφとインスリン感受性との関連について明らかにすることを目標とした。そのためにまず、脂肪組織においてM1/M2Mφの極性を決める新たな因子を同定することを試みることにした。M1/M2Mφの極性を誘導する因子について、それまでもいくつかの報告があった。たとえば、*in vitro*でTh1 サイトカインはM1Mφを、Th2 サイトカインはM2Mφを誘導する (Trends Immunol. 25; 677-686, 2004, Cell Metab. 7; 485-495, 2008)。また*in vivo*ではPPAR γ やPPAR β/δ などの転写因子の活性化がM2Mφを誘導する、と報告されていた (Nature 447; 1116-1121, 2007, Cell Metab. 6; 137-143, 2007)。以前我々は、アンギオテンシンII受容体拮抗薬 (ARB) の中でもとくにPPAR γ 活性化作用を有するテルミサルタンを糖尿病患者に投与すると、インスリン抵抗性が改善することを報告していた (Diabetes Res Clin Pract. 77; 210-4, 2007)。そこでまず我々は、テルミサルタンが脂肪組織のマクロファージのM2 極性を誘導しているのではないかと考えた。一方、肥満すると脂肪組織が低酸素状態となることが知られていた。また我々のそれまでの検討で、M1MφではM2Mφに比べ、HIF1 α 、VEGFA、Glut1 など低酸素関連遺伝子の発現レベルが高いことを確認していた。これらの結果から我々は、肥満脂肪組織に認められる低酸素が、マクロファージのM1 極性を誘導するのではないかと、との仮説を立てた。

次に我々は、M2Mφがインスリン感受性に与える影響を網羅的に知ることを計画した。このためには、M2Mφ数を減少させることが有効であると考えた。上記のように我々は、CD206 が M2Mφを認識する優れたマーカーであることを確認していた (Fujisaka, Usui et al. Diabetes 2009)。そこで、CD206 のプロモーター領域の下流にジフテリアトキシン受容体の sequence を結合した遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを作成した。マウスには内因性ジフテリアトキシン受容体が発現していないため、ジフテリアトキシンの投与は野生型マウスに影響を与えない。一方本トランスジェニックマウスではジフテリアトキシンの投与によって、CD206 陽性 M2Mφ が選択的に欠失される (M2Mφ ablation マウス)。本マウスの解析を通じ、M2Mφが代謝に与える影響とその機

序を解明することとした。

最後に、IL-10 がインスリン感受性に与える影響について解明を試みることにした。本研究計画の採択前より我々は、アデノウイルスベクターによる IL-10 の過剰発現がマウスの糖代謝に与える影響について検討を開始していた。IL-10 の一過性過剰発現は摂餌量には影響を与えず、糖負荷試験やインスリン負荷試験における血糖値を有意に低下させた。また骨格筋においてミトコンドリアの β 酸化や酸化的リン酸化に関わる遺伝子発現を増強した。これらの結果を進展させ、中枢神経 IL-10 シグナルの活性化が骨格筋のミトコンドリア数や形態、骨格筋の機能に与える影響について明らかにすることとした。

2. 研究の目的

本研究計画の目的は、脂肪組織 M1/M2Mφ とインスリン感受性との関連について明らかにすることである。特に M2Mφ と IL-10 の働きに注目し、具体的には次の3点を明らかにする。

- (1) 脂肪組織において M1/M2Mφ の極性に影響を与える新たな因子を同定する。
- (2) ジフテリアトキシンの投与により M2Mφ を欠失することができるマウス (M2Mφ ablation マウス) の解析を通じ、M2Mφ が代謝に与える影響を解明する。
- (3) インターロイキン 10 (IL-10) が、中枢神経の IL-10 シグナルの活性化を介し、全身の代謝に与える影響について明らかにする。

3. 研究の方法

(実験 1-1) テルミサルタン投与実験：
30%(kcal)高脂肪食投与を 24 週間行い肥満したマウスにテルミサルタンまたはカンデサルタンを 3mg/kg/day となるように飲水に混じり、5 週間投与した。血圧、体重、インスリン負荷試験、糖負荷試験にて耐糖能の評価を行ったのち、精巣上体脂肪組織を摘出し、重量、脂肪細胞の面積測定を行い、その遺伝子発現レベルをマイクロアレイ法及び RT-PCR 法で測定した。また精巣上体脂肪組織の M1/M2 Mφ を免疫組織染色及び、フローサイトメトリーで解析した。

(実験 1-2) 脂肪組織低酸素と Mφ 極性の評価：普通食または高脂肪食を投与したマウスに低酸素マーカーであるピモニダゾールを 60mg/kgBW 腹腔内投与し、30 分後に解析を行った。マウスの解析方法は実験 1-1 に準じて行った。また、マウス骨髄由来 Mφ または精巣上体脂肪の間質細胞 (stromal vascular fraction) を 1%O₂ の低酸素培養器で培養し、遺伝子発現レベルを RT-PCR 法で検討した。

(実験 2) M2Mφ ablation マウスの解析：
CD206 のプロモーター領域の下流にジフテリアトキシン受容体の sequence を結合した遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを作成した。5ng/kgBW のジフテリアトキシンを隔日で 4 回腹腔内に投与後、8 日目に解析を行った。マウスの解析方法は実験 1-1 に準じて行った。

(実験 3) 中枢神経の IL-10 シグナルの解析：
IL-10 アデノウイルスを腹腔内投与し、4 日後、高 IL-10 血症モデルマウスとして解析をおこなった。中枢神経における IL-10 シグナルの役割を評価するために、側脳室内に留置したカテーテルより IL-10 中和抗体を

osmotic pump を用いて同時に持続投与した。また、リコンビナント IL-10 を 1pg/h で直接に側脳室内に投与し中枢神経でのみ IL-10 シグナルを活性化、4 日後に実験 1-1 に準じてマウスの解析を行った。

4. 研究成果

(実験 1-1) テルミサルタン投与実験：テルミサルタンは血圧を低下させ、摂餌量を変えずに高脂肪食投与期間中の体重増加を抑制した。内臓脂肪である後腹膜脂肪の量を減少させ、脂肪細胞のサイズを縮小した。またインスリン負荷試験において、高脂肪食投与によるインスリン抵抗性を有意に改善した。また、テルミサルタンは高脂肪食投与肥満マウスにおける内臓脂肪 M1Mφ の数と比率を低下させ、逆に M2 Mφ の比率を上昇させた。このとき PPAR γ の標的遺伝子である Adiponectin や PEPCK などの遺伝子発現は増加していた。これらの結果から、テルミサルタンは、降圧作用のみならず、PPAR γ 活性化作用を介して脂肪組織における炎症性 M1 Mφ を減少させ、抗炎症性 M2Mφ の比率を増加させ、インスリン感受性を改善させる作用があることが示された(Endocrinology 152: 1789-1799, 2011)。

(実験 1-2) 脂肪組織低酸素と Mφ 極性の評価：低酸素マーカーであるピモニダゾールを用いて低酸素レベルを評価すると、肥満脂肪組織は非肥満脂肪組織よりピモニダゾールの取り込みが強く、ピモニダゾール取り込みの強い M1 Mφ の数が著増していた。次に、M1 Mφ と M2 Mφ の低酸素レベルを比較すると、肥満状態では M1 Mφ が M2 Mφ よりピモニダゾールの取り込みが強く、低酸素状態であった。これらの結果から肥満状態では、内臓脂肪組織が低酸素にさらされており、そこに増加する M1 Mφ は M2 Mφ より著明に低酸素状態になっていることが示唆された。次に、マウス骨髄由来 Mφ (BMDM) および stromal vascular fraction を低酸素下(1%O $_2$)で培養したところ、CD11c や IL-1 β 、IL-6 など M1 マーカーが増加した。低酸素が Mφ の炎症性 M1 極性誘導を促進することが示唆された。一方、M2Mφ への誘導刺激として知られる IL-4 を低酸素刺激と同時に処置すると、低酸素誘導性の炎症反応が著明に抑制された。これらの結果から、肥満による内臓脂肪組織の低酸素環境が炎症性の M1 Mφ の極性誘導に関与し、これがインスリン抵抗性増悪の一因となると考えられた (Diabetologia 56: 1403-1412, 2013)。

(実験 2) M2Mφ ablation マウスの解析：ジフテリアトキシンの投与により M2 Mφ を生後欠失させることのできるマウス (M2Mφ ablation マウス) を独自に作成し、解析した。ジフテリアトキシンの投与 (5ng/kg/BW 隔日 X4 回) は、精巢上体脂肪組織の CD206 陽性細胞数を 50-70% 減らした。それまで脂肪組織の M2Mφ は代謝に好ましい作用を有すると報告されていたため、実験前には M2Mφ の欠失が代謝を悪化させると予想していた。しかし予想に反して、M2Mφ ablation マウスでは耐糖能およびインスリン感受性が改善していた。このとき体重や摂餌量には変化がなかった。骨格筋や脂肪組織では、脂肪酸酸化

に関連した遺伝子発現が上層していた。また興味深いことに、精巢上体脂肪組織の脂肪細胞が小型化し、かつその数が増加していた。この脂肪細胞のサイズと数の変化が、代謝改善と関係している可能性がある。次に、脂肪細胞小型化の機序について検討を進めた。精巢上体脂肪の間質分画 (SVF) に含まれる細胞を、Sca1 と Lin をマーカーに preadipocyte, hematopoietic cell, non-preadipocyte の 3 分画にわけ、遺伝子発現を検討した。その結果、3 分画全てにおいて細胞増殖関連遺伝子の発現が上昇していた。前駆脂肪細胞の増殖分化に関わる Hippo 経路および Wnt 経路の関与について現在検討を進めている。これらの結果を日本糖尿病学会総会で発表した。

(実験 3) 中枢神経の IL-10 シグナルの解析：アデノウイルスベクターをもちいた IL-10 の過剰発現は肥満マウスの耐糖能を改善した。体重や摂餌量に有意な変化は認められなかった。骨格筋のミトコンドリア関連遺伝子の発現が増強しており、耐糖能改善の機序のひとつにこれが関与している可能性が示唆された。このような IL-10 過剰発現の効果は、中枢への IL-10 中和抗体の投与によって抑制された。また、リコンビナント IL-10 の側脳室への直接投与によって、再現された。このことから、中枢神経における IL-10 シグナルの活性化は、骨格筋のミトコンドリア機能の増強を介して全身の糖代謝を改善させると考えた。

さらに、IL-10 同様に STAT3 活性化作用を持つレプチンおよび IL-6、CNTF、LIF を中枢投与しその効果を比較検討した。強い摂食抑制や体重減少効果を持つのは IL-6 とレプチンであり、これらは視床下部の弓状核、腹内側核などの核に局限した STAT3 リン酸化の染色パターンを示した。一方、IL-10 の中枢投与による視床下部の STAT3 リン酸化は、広く視床下部全体にびまん性に認められた。摂食抑制作用の弱い CNTF や LIF と同様の染色パターンであった。このことから、STAT3 の活性化部位の違いが、摂食抑制作用の違いと関連している可能性があると考えた。結果を日本糖尿病学会のシンポジウム会で発表した。現在論文投稿準備中である。

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 4 件)

1. Fujisaka S, Usui I, Ikutani M, Aminuddin A, Takikawa A, Tsuneyama K, Mahmood A, Goda N, Nagai Y, Takatsu K, Tobe K. Adipose tissue hypoxia induces inflammatory M1 polarity of macrophages in an HIF-1 α -dependent and HIF-1 α -independent manner in obese mice. Diabetologia. 2013; 56(6):1403-12. 査読あり
2. Watanabe Y., Nakamura T., Ishikawa S., Fujisaka S., Usui I., Tsuneyama K., Ichihara Y., Wada T., Hirata Y., Suganami T., Izaki H., Akira S., Miyake K., Kanayama H., Shimabukuro M., Sata M., Sasaoka T.,

Ogawa Y., **Tobe K.**, Takatsu K., and Nagai Y. The Radioprotective 105/MD-1 complex contributes to diet-induced obesity and adipose tissue inflammation. *Diabetes*. 2012; 61(5):1199-209. 査読あり

3. Fujisaka S., **Usui I.**, Kanatani Y., Ikutani M., Takasaki I., Tsuneyama K., Tabuchi Y., Bukhari A., Yamazaki Y., Suzuki H., Senda S., Aminuddin A., Nagai Y., Takatsu K., Kobayashi M., **Tobe K.** Telmisartan improves insulin resistance and modulates adipose tissue macrophage polarization in high-fat-fed mice. *Endocrinology* 2011;152(5):1789-99. 査読あり

4. Suzuki H., **Usui I.**, Kato I., Oya T., Kanatani Y., Yamazaki Y., Fujisaka S., Senda S., Ishii Y., Urakaze M., Mahmood A., Takasawa S., Okamoto H., Kobayashi M., **Tobe K.**, Sasahara M. Deletion of platelet-derived growth factor receptor- β improves diabetic nephropathy in Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II α (Thr286 Asp) transgenic mice. *Diabetologia* 2011; 54:2953-2962. 査読あり

[学会発表] (計 10 件)

1. Aminuddin A., Fujisaka S., Mori H., Kohno K., **Usui I.**, **Tobe K.** Depletion of CD206-positive cells is associated with increased WAT proliferation and improved insulin sensitivity(英語口演). 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会、2013 年 5 月 17 日、熊本

2. **薄井 勲**、藤坂志帆、瀧川章子、Arshad Mahmood、**戸邊一之**、脂肪組織低酸素とインスリン抵抗性。第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会、2013 年 5 月 17 日、熊本

3. Fujisaka S., **Usui I.**, Ikutani M., Aminuddin A., Senda S., Takikawa A., Ishiki M., Koshimizu Y., Tsuneyama K., Nagai Y., Takatsu K., **Tobe K.** Impact of Adipose Tissue Hypoxia on Macrophage Polarization in Diet-induced Obese Mice. American Diabetes Association 72nd Scientific Sessions. 2012 年 6 月 9 日, Philadelphia, USA

4. Takikawa A., **Usui I.**, Senda S., Fujisaka S., Hattori S., Tsuneyama K., Aminuddin A., Mahmood A., Sasaoka T., Mori H., **Tobe K.** Myeloid Cell-specific Deletion of SIRT1 Impairs Glucose Metabolism and Enhanced Inflammatory Response to Hypoxia. American Diabetes Association 72nd Scientific Sessions. 2012 年 6 月 9 日, Philadelphia, USA

5. **薄井 勲**、藤坂志帆、瀧川章子、金谷由紀子、**戸邊一之**、慢性炎症とインスリン

抵抗性 脂肪組織マクロファージと SIRT1 (シンポジウム)、第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、2012 年 5 月 17 日、横浜

6. Senda S., Inoue A., Suzuki R., Kamei N., Watanabe T., Mahmood A., Takikawa A., Aminuddin A., Fujisaka S., Koshimizu Y., Ishiki M., **Usui I.**, Kadowaki T., **Tobe K.** Hyperleptinemia induces leptin resistance and further worsening obesity. American Diabetes Association's 71st Scientific Sessions, 2011 年 6 月 26 日, San Diego, USA

7. Fujisaka S., **Usui I.**, Ikutani M., Kanatani Y., Senda S., Takikawa A., Aminuddin, Suzuki H., Ishiki M., Iwata M., Nagai Y., Takatsu K., **Tobe K.** Obesity-induced hypoxia regulates the polarization of adipose tissue macrophages., American Diabetes Association's 71st Scientific Sessions, 2011 年 6 月 26 日, San Diego, USA

8. **薄井 勲**、藤坂志帆、瀧川章子、仙田聡子、小清水由紀子、**戸邊一之**、インスリン抵抗性のメカニズムと新しい治療戦略 脂肪組織マクロファージとインスリン抵抗性。(シンポジウム) 第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会、2011 年 5 月 21 日、札幌

9. 藤坂志帆、**薄井 勲**、生谷尚士、仙田聡子、瀧川章子、Aminuddin Aminuddin、金谷由紀子、長井良憲、石木学、**戸邊一之**、低酸素環境に対する M1/M2 マクロファージの反応性に関する検討。第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会、2011 年 5 月 21 日、札幌。

10. **薄井 勲**、**戸邊一之**、肥満脂肪組織の低酸素がマクロファージの極性に与える影響。(シンポジウム)。第 32 回日本肥満学会、2011 年 9 月 23 日、兵庫

[図書] (計 6 件)

1. **薄井 勲**、**戸邊一之** : 【最新臨床糖尿病学 上—糖尿病学の最新動向—】糖尿病研究の進歩 インスリン作用およびインスリン抵抗性発現機序 インスリン抵抗性発現の分子機構 インスリン抵抗性における炎症の役割. 日本臨床, 70: 191-195, 2012. 日本臨床社

2. **薄井 勲**、**戸邊一之** : 【自然免疫 Update-研究最前線】自然免疫の関わる病態と治療への応用 M2 マクロファージと疾患. 医学のあゆみ, 243: 129-134, 2012. 医歯薬出版

3. **薄井 勲**、藤坂志帆、**戸邊一之** : 脂肪組織におけるマクロファージとインスリン抵抗性. *Diabetes Journal*, 39(2) : 50-55, 2011. 協和企画

4. **薄井 勲**、**戸邊一之** : インスリン作用発現とその制御機構. 日本臨床, 69 : 138-144, 2011. 日本臨床社

5. **薄井 勲**、**戸邊一之** : 2 型糖尿病のイ

ンスリン抵抗性における炎症の役割. 日本臨床, 69: 555-562, 2011. 日本臨床社

6. **薄井勲、戸邊一之**: 脂肪組織でのインスリン作用とインスリン抵抗性. ホルモンと臨床, 389-393, 2011. 医学の世界社

6. 研究組織

(1) 研究代表者

薄井 勲 (USUI ISAO)
富山大学・大学病院・講師
研究者番号: 50377272

(2) 研究分担者

戸邊 一之 (TOBE KAZUYUKI)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・教授
研究者番号: 30251242

(3) 連携研究者

箕越 靖彦 (MINOKOSHI YASUHIKO)
生理学研究所・発達生理学研究室・教授
研究者番号: 10200099