

## 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 24 年 5 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22792086

研究課題名（和文） 抗炎症作用を有する薬剤が脂肪細胞・マクロファージ共培養系へ及ぼす影響の網羅的解析

研究課題名（英文） Global analysis of adipocytes co-cultured with macrophages treated with anti-inflammatory substance

研究代表者

山下 明子 (AKIKO YAMASHITA)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：70511319

研究成果の概要（和文）：

マクロファージと脂肪細胞の共培養下に LPS 刺激を与えた際に惹起される炎症反応にエピカテキンが及ぼす影響を調べ、その分子機序を調べた。LPS 刺激下にてマウスマクロファージ細胞とマウス脂肪細胞を共培養し、DNA マイクロアレイや Real-time PCR 等を用いた。その結果、LPS 刺激下でエピカテキンを添加したものでは、無添加のものと比較して、LPS 誘導性の炎症増幅を抑制すること、NF- $\kappa$ B 転写制御を抑制すること、LPS 誘導性の酸化ストレス系反応を緩和することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed protein and genes differentially expressed in LPS stimulated adipocytes when co-cultured with macrophages in the presence of epicatechin. Murine macrophage cell line and murine adipocytes were co-cultured. We used DNA microarray method, Real-time PCR method and so on. According to the results, we revealed that epicatechin reduced LPS-induced inflammatory reaction, it depressed NF- $\kappa$ B transcriptional regulation, and LPS-induced oxidative stress reaction was eased by epicatechin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：アディポサイトカイン、歯周病、メタボリックシンドローム

## 1. 研究開始当初の背景

肥満はインスリン抵抗性を基盤として2型糖尿病・動脈硬化性疾患といった代謝性疾患に対する最大の危険因子である。これには、内臓脂肪細胞から産生される一連の生理活性物質（アディポサイトカイン）の分泌異常が深く関わっている。これまでに、アディポサイトカイン産生に、マクロファージが関与する脂肪細胞・マクロファージ相互作用説が報告された (Kathryn E *et al.*, *J Clin Invest*, 2003)。

申請者は、歯周病による局所の感染が全身に影響を及ぼすほどに増幅される機序を脂肪細胞・マクロファージ相互作用の観点から追及してきた。これまでに、脂肪細胞とマクロファージの共培養系を確立し (Yamashita A *et al.*, *obesity*, 2007), 両細胞を低濃度 LPS 刺激した際に発現量が変動する脂肪細胞中遺伝子群の網羅的解析を行い、血管病変やインスリン抵抗性といった2型糖尿病やメタボリックシンドローム関連遺伝子の動態が大きく変化することを報告した (Yamashita A. *et al.*, *Int J Obese.*, 2008)。一方、近年行われた前向き研究で軽微な炎症の存在が心血管イベント発生には非常に重要であることが報告された。(Ridker PM. *et al.*, *N Engl J Med.*, 2008) また、フラボノイド類は炎症性サイトカインの産生を抑制することやココアの摂取量が増加すると心血管イベントによる死亡率が低下する報告がある。軽微な炎症の原因説として脂肪細胞・マクロファージ相互作用説が最も注目されており、抗炎症作用の作用点として、この脂肪細胞とマクロファージの相互作用が最も疑われる。以上から、低濃度 LPS 刺激下マクロファージ-脂肪細胞の共培養系に抗炎症作用を有する薬剤を作用させることで、血管病変やインスリン抵抗性を惹起する遺伝子の発現が抑制されるとの仮説を設けた。

## 2. 研究の目的

本研究は、申請者が継続的に検討を続けてきた低濃度 LPS 感染によるマクロファージ-脂肪細胞相互作用に伴う過剰炎症反応をスタチンやフラボノイド類が抑制し、結果として血管病変やインスリン抵抗性が改善するとの仮説を設け検証しようとするものである。歯周病などの局所の炎症が全身に影響を及ぼすほどに増幅される機序をふまえ、その機序に基づいて（すなわち病態に応じて）スタチンやフラボノイド類を用いる際の有効性を機序の面から明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

- (1) 脂肪細胞 (3T3-L1) とマクロファージ (RAW264) の共培養: 共培養には申請者がすでに確立した手法である細胞非接触型のトランスウェルシステムを用いる。
  - (2) 共培養系での抗炎症作用の確認: LPS 刺激下でスタチンまたは、エピカテキンを上記の共培養系に添加し、同系での炎症性サイトカインの産生量を ELISA 法にて測定し、抗炎症作用効果を検討する。
  - (3) LPS 刺激下でエピカテキン作用なしのマイクロアレイ解析: 数時間ごとのタイムコースを設定し、共培養した脂肪細胞の mRNA を回収し、マイクロアレイ法を用いて遺伝子発現を解析する。
  - (4) LPS 刺激下でエピカテキン作用ありのマイクロアレイ解析: 3. と同様にタイムコースを設定し、共培養した脂肪細胞の mRNA を回収し、マイクロアレイ法を用いて遺伝子発現を解析する。
  - (5) 上記 3 と 4 の結果を比較し産生性に著明な変化の遺伝子をピックアップする (講座主任: 西村英紀の助言を得て重要と考えられる遺伝子に焦点を絞る)。
  - (6) タンパクの定量: 5. で遺伝子発現量の変化が著明に確認できたものに関して、細胞上清中の産生性をタンパクレベルで定量的な濃度測定を行う。この濃度測定には市販の ELISA 測定キットを用いる。
  - (7) mRNA レベルの測定: 5. と同様に、4 で遺伝子発現量の変化が著明に確認できたものに関して、RNA レベルでの追試をリアルタイム PCR 法により行う。
  - (8) 統計処理: LPS 刺激下エピカテキン作用なしおよびスタチン作用ありでのアディポサイトカイン産生性についてタンパクおよび mRNA レベルで統計学的な差異を検討し、エピカテキンが脂肪細胞・マクロファージ相互作用に及ぼす影響を網羅的に解析する。統計処理は市販の統計ソフトを用いて行う。
- ## 4. 研究成果
- (1) LPS 刺激下でスタチンまたはエピカテキンを上記の共培養系に添加し、同系での炎症性サイトカインの産生量を ELISA 法にて測定し、抗炎症作用の効

果を検討したところ、エピカテキン添加群ではIL-6産生量が有意に減少したが、スタチンでは添加ありとなしで、IL-6産生量に有意な差が無かった。申請者らのこれまでにIL-6は共培養系にLPS刺激を加えることで著明に産生量が増加する炎症性サイトカインの一つであることを報告しており (Yamashita A. et al., *Int J Obese.*, 2008), 研究を継続するにあたり, IL-6をコントロールとすることで, 比較検討や再現性がより容易となる為, 今回は以降の研究を抗炎症作用を有する薬剤としてエピカテキンを用いた。

- (2) DNA マイクロアレイ法とリアルタイム PCR 法によってエピカテキンの添加によって共培養系における脂肪細胞の炎症性サイトカインやケモカインの遺伝子発現が減少し, 炎症マーカーである蛋白の遺伝子発現も有意に減少することが明らかとなった。ゆえに, エピカテキンは肥満脂肪組織モデルにおける LPS 誘導性の炎症増幅を抑制することが示唆された。
- (3) 本共培養系に作用させたエピカテキンによって LPS 効果が変動した遺伝子群から heat map を作成しクラスタリング解析を行うことで, これらの遺伝子群の上流に位置する転写調節領域を検討した。その結果, エピカテキンは特に NF- $\kappa$ B 転写制御を抑制することで炎症を抑制し, また LPS 誘導性の酸化ストレス系の反応も緩和することが示唆された。

#### 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 1 件)

1. Nakarai H., Yamashita A., Nagayasu S., Iwashita M., Kumamoto S., Ohyama H., Hata M., Soga Y., Kushiyama A., Asano T., Abiko Y., Nishimura F., Adipocyte-macrophage interaction may mediate LPS-induced low-grade inflammation: potential link with metabolic complications *Innate Immunity*, 2012 Feb;18(1):164-70 査読あり

[学会発表] (計 12 件)

1. Shintaro Nagayasu, Akiko Yamashita, et al, Adipose tissue inflammation and

smoking synergistically suppress leptin expression in Japanese obese males: Potential mechanism of resistance to weight loss among obese smokers, 4th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry, 2011.10. 9-10., Hiroshima

2. 永安慎太郎, 山下明子 他, 喫煙がレプチン産生に与える影響についての検討, 第 54 回日本歯周病学会秋季学術大会, 2011.9.24., 下関
3. 永安慎太郎, 山下明子 他, 2 型糖尿病患者におけるココアフラボノールの心血管イベント抑制効果機序の検討 ~ 脂肪細胞・マクロファージ相互作用の観点から~, 第 54 回日本歯周病学会春季学術大会, 2011.5.27-28., 福岡
4. 山下明子 他, ココアフラボノイドの心血管イベント抑制効果機序の解析—脂肪細胞マクロファージ相互作用の観点から, 第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2011.5.19 - 20., 札幌
5. Nakarai H., Yamashita A., Nishimura F.: Periodontal disease may up-regulate triglycerides in Japanese via enhanced lipolysis: The 89<sup>th</sup> International and American Association for Dental Research, 2011. 3. 16-19, San Diego, U.S.A.
6. Shintaro Nagayasu, Akiko Yamashita, Shigeki Suzuki, Yoshimitu Abiko, Fusanori Nishimura: Study on inhibitory effects of Cacao flavonol on arteriosclerosis by its anti-inflammatory action : 3<sup>rd</sup> International Workshop on BioDental Education and Research, 2011. 1. 28~30, Hiroshima
7. 永安 慎太郎, 山下 明子 他ココアフラボノールの心血管イベント抑制効果機序の検討—脂肪細胞・マクロファージ相互作用の観点から, 第 25 回日本糖尿病合併症学会, 2010.10.22 - 23., 大津
8. 永安 慎太郎, 山下 明子 他, ココアフラボノールの心血管イベント抑制効果の機序の検討—脂肪細胞・マクロファージ相互作用の観点から, 第 53 回日本歯周病学会秋季学術大会 2010.9.19., 高松
9. 半井 英雄, 山下 明子 他, マクロファージは TNF- $\alpha$  を介して脂肪分解を誘導

し中性脂肪の上昇に関与する, 第 53 回  
日本歯周病学会秋季学術大会, 2010.9.19.  
高松

10. Yamashita A, et al, Periodontal tissue destruction is associated with high triglycerides in Japanese., The International and American Association for Dental Research, 2010.7. 14-17, Barcelona, Spain
11. 米廣 純子, 山下 明子 他, フラボノイドによる歯髄炎症制御の応用～リン酸化プルランセメントを用いての検討, 第 132 回日本歯科保存学会春季学術大会, 2010.6.4-5., 熊本
12. 半井 英雄, 山下 明子 他, 脂肪細胞はマクロファージと共存することで LPS 刺激によって急性期タンパク SAA を高産生する, 第 53 回日本糖尿病学会, 2010.5.27-29., 岡山

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

山下 明子 (Akiko Yamashita)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号 : 70511319