

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590567

研究課題名(和文) 肥満による慢性炎症性病変の新規制御機構の解析

研究課題名(英文) Regulation of diseases by chronic inflammation and obesity

研究代表者

緒方 正人(OGATA, Masato)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60224094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：肥満は、代謝症候群と密接な関係を有し、脂肪組織の慢性炎症を誘導することによって耐糖能の低下などを引き起こすと考えられている。p38alpha遺伝子を血球系で特異的に欠くコンディショナルノックアウトマウスを作成し解析したところ、肥満による脂肪組織の慢性炎症の軽減と耐糖能の改善を認めたことから、血球系細胞のp38alpha経路が肥満による慢性炎症と病態の制御に関わることが示された。

研究成果の概要(英文)：It is well established that obesity can exacerbate metabolic syndrome and glucose tolerance through induction of chronic inflammation. We have established p38alpha mutant mice in which p38 alpha gene is disrupted in the hematopoietic cells. It is found that high fat diet-induced chronic inflammation in the adipose tissue and glucose tolerance is ameliorated in the mutant mice, suggesting that the p38alpha signaling cascade in the hematopoietic cells could be involved in the regulation of obesity-induced chronic inflammation and metabolic syndrome.

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：慢性炎症 MAPキナーゼ 血液細胞 代謝症候群 p38 遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

肥満による慢性炎症は、代謝症候群や肝がんの発生に関わるとされる。肥満がインスリン抵抗性(血糖値上昇)の増悪因子として働くことは広く認められている。また、肥満でがんによる死亡が約 1.5 倍上昇し、特に肝がんのリスクは約 4.5 倍に高まると報告されている。

肥満が慢性炎症を生じる機構は、おおむね以下のように考えられている。肥大した脂肪細胞や CD8⁺ T 細胞からケモカイン MCP1 が産生され、M1 様のマクロファージ (F4/80⁺ CD11c⁺) が脂肪組織に浸潤する。そして、マクロファージから産生された TNF-alpha や IL-6 などの炎症性サイトカインが、脂肪細胞などに作用してインスリンのシグナル伝達を阻害し、糖尿病の原因となる、というモデルである。肥満による脂肪組織へのマクロファージ浸潤は、ヒトでも確認されている。また、その重要性は、MCP1 の遺伝子ノックアウトマウスでマクロファージの脂肪組織への遊走を阻止すると、肥満によるインスリン抵抗性が大きく改善するという動物実験でも裏付けられている。最近、成人病の背景である老化と関連する p53 経路がこの炎症過程に関わることも報告されている。

肥満の炎症過程で NF-kappaB や JNK などのシグナル経路に関わることが既に報告されているが、p38 MAP キナーゼ経路の関与については明らかでない。我々はこれまで、ERK や p38 などの MAP キナーゼの遺伝子改変マウスを作成し、それらがリンパ球の機能や分化 (Sanjo et al. Mol Cell Biol 2006; Yasuda et al., Immunity 2008) 初期発生 (Hatano et al. Genes to Cells 2003; Okada et al., Nat Biotechnol 2007) に関わることを明らかにしてきた。その過程で作成した p38alpha の血球特異的なコンディショナルノックアウトマウスで、高脂肪食による慢性炎症性病態が大きく改善されることを見出した。この実験系を用いて解析を進めることで、血球系細胞の p38 MAP キナーゼ経路が肥満による慢性炎症を制御する新しい制御機構を解析することが可能になると考えられた。

2. 研究の目的

慢性炎症の誘引は様々であるが、特に成人病との関連では肥満が目目されている。肥満による慢性炎症は、代謝症候群やがんなどを促進する。そのシグナル経路については、NF-kappaB や JNK などが関わることは既に報告されているが、p38alpha MAP キナーゼ経路の意義は明らかでない。

我々は、肥満による慢性炎症と代謝症候群の進行が p38alpha の血球特異的なコンディ

ショナルノックアウトマウスで抑制されることを見出した。この知見を基に、p38 MAP キナーゼ経路による肥満と慢性炎症性病変の新規制御機構について解析する。

3. 研究の方法

肥満による慢性炎症の制御機構には、多様な細胞の相互作用が関わり、また、それを支える多様なリガンド、受容体、シグナル伝達が働くと考えられる。さらに、肥満による慢性炎症が病態に影響を及ぼす過程においても、様々な免疫細胞・非免疫細胞の相互作用や細胞遊走が含まれると考えられる。多様な細胞間の複雑な相互作用を試験管内で完全に再構成して解析することは困難である。そこで、それらの細胞が実際に相互作用する「場」である生体レベルでの研究が重要になる。一方、炎症関連シグナルは多様な細胞で働くため、組織特異的な遺伝子改変動物を用い、細胞ごとに区別して解析することが重要になる。

そこで本研究では、p38alpha 経路によるシグナル伝達経路に焦点を当て、また、組織特異的なコンディショナルノックアウトマウスを対象とする細胞を限定して肥満による慢性炎症病態を生じる過程で p38alpha 経路が、どの細胞でどのように働か解析した。

(1) 最初に Tie2-Cre トランスジェニックマウスを利用して作成した p38alpha の血球系特異的なコンディショナルノックアウトマウスを用い、高脂肪食を与え実験に使用した。

肥満関連病態の評価については、脂肪細胞の肥大、耐糖能、インスリン抵抗性、空腹時のインスリンレベル、体重などを測定した。

慢性炎症の状態の評価については、組織に浸潤した炎症性細胞の細胞表面マーカーをフローサイトメーターで解析した。また、炎症性サイトカイン遺伝子の発現について、組織全体や、浸潤した血球系細胞を細胞表面マーカーを指標にフローサイトメーターで単利精製した細胞から抽出した RNA を用い、定量的な RT-PCR で検討した。

(2) 次に p38alpha が作動する細胞をより詳細に絞り込む目的で、CD11c-Cre トランスジェニックマウスを用いた p38alpha の CD11c 陽性細胞特異的なコンディショナルノックアウトマウスを作成し高脂肪食を与え実験に使用した。

4. 研究成果

生体内で p38alpha シグナル系が果たす役割について、特に血球系細胞での役割に焦点を当て以下の解析を行った。

(1) 肥満による慢性炎症モデルにおける解析

Tie2-Cre トランスジェニックマウスを利用して血球系細胞で特異的に p38alpha 遺伝子が破壊されたコンディショナルノックアウトマウスを作成した。このマウスに高脂肪食を投与し 20 週後に脂肪組織における慢性炎症について解析した。なお、少なくとも末梢血液細胞においては、高脂肪食の投与で p38alpha のリン酸化が亢進することを認めている。

まず、脂肪組織に浸潤した炎症細胞をフローサイトメーターで解析した。p38alpha コンディショナルノックアウトマウスでは、炎症促進作用を有する M1 様マクロファージ (F4/80⁺, CD11c⁺) の比率が野生型マウスの 7 分の 1 程度まで大きく減少していた。また、脂肪組織における炎症性サイトカインの遺伝子発現を定量的 RT-PCR で検討したところ、MCP-1, IL-6, IL-1beta, TNF-alpha などの遺伝子発現も低下していた。

以上の結果は、血球系細胞で p38alpha が関わるシグナル経路が、肥満による慢性炎症の促進作用を持つこと示唆するものと言える。慢性炎症はインスリン抵抗性に影響を及ぼすと考えられている。事実、耐糖能試験において血球系細胞特異的な p38alpha コンディショナルノックアウトマウスは、通常食摂取時には野生型マウスと差を認めなかったが、高脂肪食摂取後 16 週では、野生型マウスで見られる血糖値の上昇が有意に抑制されていた。また、高脂肪食摂取後 20 週では、野生型マウスの空腹時の血中インスリンレベルが上昇するが、これも p38alpha コンディショナルノックアウトマウスで抑制されていた。空腹時のインスリンレベルの上昇は、インスリン抵抗性を反映すると考えられるが、事実外部からインスリンを投与し血糖値の低下を調べるインスリン感受性試験においても、高脂肪食を摂取した野生型マウスに比べ p38alpha コンディショナルノックアウトマウスでインシュリン感受性が高いことが明らかになった。

次に、肥満時に脂肪組織に浸潤した M1 様マクロファージをフローサイトメーターで分取し、各種遺伝子発現を RT-PCR で検討した。MCP-1, IL-6, IL-1beta などの炎症性サイトカイン遺伝子発現は、上記のように脂肪組織全体では p38alpha コンディショナルノックアウトマウスで低下していた。しかし、脂肪組織から単離した M1 様マクロファージでは大きな変化は見出さなかった。従って、脂肪組織で見られた炎症性サイトカイン遺伝子発現の低下は、M1 様マクロファージのサイトカイン産生能の低下というより、浸潤した細胞数の低下を反映するものではないかと考えられた。

そこで、マクロファージの脂肪組織への細胞遊走に関わると考えられる CCR2 や CCR5 などのケモカイン受容体遺伝子発現を検討したところ、p38alpha コンディショナルノックアウトマウスでは野生型マウスのマクロファージに比べて大きく低下していた。前述のように脂肪組織全体ではケモカイン MCP-1 が低下していることと併せて、これら遺伝子発現低下が脂肪組織へのマクロファージ遊走能低下を引き起こす可能性が示された。

以上の解析では、血球系細胞全般で p38alpha 経路が働かないため、この結果をもって M1 様マクロファージにおける p38alpha 経路の直接的効果と断定するには限界がある。そこで、CD11c-Cre トランスジェニックマウスを用いたノックアウトマウスを作成し解析した。このマウスに高脂肪食を与えたところ、高脂肪食投与時の耐糖能の改善を認めた。従って、CD11c 陽性細胞の p38alpha 経路が、その下流で慢性炎症に関わる耐糖能に影響すると考えられた。

興味深いことに、血球系細胞特異的 p38alpha コンディショナルノックアウトマウスの脂肪組織でアディポネクチンの発現が亢進することを見出した。アディポネクチンは血球系細胞以外で産生されることから、この現象は血球で p38alpha が機能しなくなったことによる間接的影響と考えられ、血球細胞と脂肪細胞の相互作用の存在を示唆するものと言える。また、血球系細胞特異的 p38alpha コンディショナルノックアウトマウスは、通常食摂取時には野生型マウスとの体重の差は認めなかったが、高脂肪食摂取時の体重増加は野生型マウスに比べて有意に抑制され、脂肪組織の重量や脂肪細胞のサイズも小さかった。高脂肪食摂取時の体重増加の抑制は、CD11c 陽性細胞特異的 p38alpha コンディショナルノックアウトマウスでも認められた。従って、血球系細胞あるいは CD11c 陽性細胞の p38alpha 経路が、その下流で慢性炎症に関わる耐糖能に影響する一方、代謝に関わる体重にも影響すると考えられた。血球系細胞や CD11c 陽性細胞による代謝制御機構には不明な点も多く、今後も研究すべき課題と考える。

p38alpha 経路に及ぼす老化の影響については、p38alpha コンディショナルノックアウトマウスと老化促進マウス (clotho) の交配を開始したが、実験結果を得るに至らず、今後の課題として残された。

(2) 坐骨神経圧挫後の神経再生モデルとの比較検討

以上、肥満における慢性炎症では p38alpha は炎症促進的な役割を果たすと考えられた。それでは、生体内の p38alpha は、他の組織

やモデル系においても同様な役割を果たしているのだろうか。そこで、p38alpha 機能を部分的に欠損した変異型 p38alpha (sem型p38alpha) のノックインマウスを用いて、坐骨神経の圧挫後の神経再生における p38alpha の役割について検討した。p38alpha を全身でノックアウトした場合は胎生致死となるが、p38 の点突然変異である sem 型 p38alpha ノックインマウスは生存可能なため、このようなモデルでの解析が可能である。sem 型 p38alpha は、一部の基質との結合性を失い、その結果部分的な機能喪失となる。この変異マウスでは、LPS 投与時の炎症性サイトカイン産生が阻害されることを見出している。

使用した抹消神経再生モデルでは、神経損傷後に一過性に炎症を生じ、それが神経再生に影響を及ぼすと考えられている。このモデル系で再生初期の炎症を TNF-alpha や IL-1beta 産生で評価したところ、予想通り sem 型 p38alpha マウスでこれら炎症性サイトカイン産生は抑制されていた。興味深いことに、それにも拘わらず神経再生は遅延を認めた。再生後期の TNF-alpha や IL-1beta 産生は sem 型 p38alpha マウスでむしろ亢進しており、これが神経再生を阻害するのではないかと考えられた (Kato, N., et al., Journal of neuroinflammation 2013, 10,1)。従って、p38alpha は、生体内で炎症促進的な作用を持つが、恐らく炎症の時期や働く細胞の違いなどによって、場合によっては却って炎症の終息を遅延させる場合もあると考えられた。

(3) 考察と今後の課題

血球系細胞特異的 p38alpha コンディショナルノックアウトマウスでは、肥満によるインスリン抵抗性が軽減されていた。肥満時の慢性炎症を促進すると考えられている M1 様マクロファージ (F4/80+, CD11c+) の脂肪組織における比率が低下しており、それが脂肪組織の炎症性サイトカイン産生低下を介してインスリン抵抗性の改善につながったと考えられる。

p38alpha 経路の役割としては、CCR2 や CCR5 などのケモカイン受容体の発現制御を介して M1 様マクロファージの集積を制御する可能性が示された。血球系細胞特異的 p38alpha コンディショナルノックアウトマウスでは、M1 様マクロファージの CCR2 や CCR5 の発現レベルが低下し、脂肪組織への細胞集積の低下が、炎症の軽減による脂肪組織の MCP-1 (CCR2 のリガンド) 発現の低下と相まってさらなる細胞集積の低下につながったと考えられる (図 1)。

M1 様マクロファージ内の p38alpha 経路が直接 CCR2 や CCR5 の発現を制御しているかどうかは今後の検証が必要であるが、イン

スリン抵抗性の軽減は CD11c 陽性細胞特異的 p38alpha コンディショナルノックアウトマウスでも見られることから、CD11c 細胞における p38alpha 経路が少なくとも肥満時のインスリン抵抗性で重要な役割をはたしていることは明らかといえる。

今後に残されたもう一つの重要な検討課題は、血球系細胞や CD11c 陽性細胞における p38alpha 経路が肥満や代謝を制御する機構の解明である。血球系細胞特異的あるいは CD11c 陽性細胞特異的のいずれの p38alpha コンディショナルノックアウトマウスでも高脂肪食による肥満の抑制を認めている。これらのマウスでは、脂肪細胞の代謝経路が血球系細胞から何等かの影響を受け、脂肪蓄積に変化を生じたと考えられる。本実験モデルを用いて解析を進めることで、血球系細胞が代謝を制御する新たな機構が解明され、病態の理解や治療につながる分子標的の発見に貢献することが期待される。

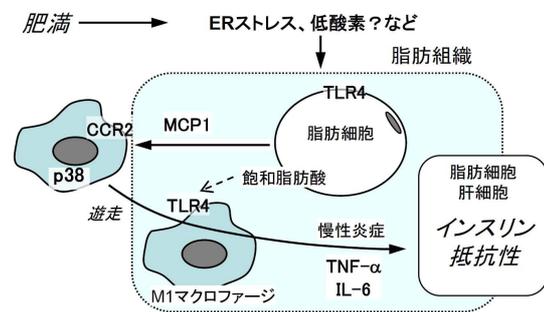


図 1 . 肥満による脂肪組織の慢性炎症モデル

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 2 件)

Kato, N., Matsumoto, M., Kogawa, M., Atkins, G.J., Findlay, D.M., Fujikawa, T., Oda, H., and Ogata, M. Critical role of p38 MAPK for regeneration of the sciatic nerve following crush injury in vivo. Journal of neuroinflammation 2013, 10,1 査読有
DOI: 10.1186/1742-2094-10-1

Upadhy, D., Ogata, M., and Reneker, L.W. MAPK1 is required for establishing the pattern of cell proliferation and for cell survival during lens development. Development 2013, 140, 1573-1582
査読有
DOI: 10.1242/dev.081042

[学会発表](計 10 件)

大隈貞嗣、藤川隆彦、緒方正人

血球系 p38alpha MAP キナーゼによるインスリン抵抗性および肥満の制御
第 6 回日本プロテインホスファターゼ研究会
学会学術集会
2014 年 2 月 20 日
三重大学環境・情報科学館 (三重)

Sadatsugu Ookuma, and Masato Ogata.
p38alpha mitogen-activated protein kinase in blood cells regulates high-fat-induced insulin resistance and obesity.
第 42 回日本免疫学会学術集会
2013 年 12 月 13 日
幕張メッセ (千葉)

Sadatsugu Ookuma, Takahiko Fujikawa, Kinya Otsu, and Masato Ogata.
p38alpha in blood cells regulates high-fat-induced insulin resistance and obesity.
第 85 回日本生化学会大会
2013 年 9 月 13 日
パシフィコ横浜 (横浜)

Sadatsugu Ookuma and Masato Ogata.
p38 α in blood cells regulates insulin resistance in mice
10th International Conference on Protein Phosphatase
2013 年 2 月 8 日
国立がん研究センター (東京)

Sadatsugu Ookuma, Takahiko Fujikawa, Kazuto Sugimura, Kinya Otsu, and Masato Ogata.
p38alpha regulates high-fat-induced chronic inflammation and hyperglycemia via blood cells
第 85 回日本生化学会大会
2012 年 12 月 16 日
福岡国際会議場 (福岡)

Sadatsugu Ookuma, Kazuto Sugimura, and Masato Ogata.
Roles of p38alpha mitogen-activated protein kinase in blood cells in high-fat-induced chronic inflammation and insulin resistance.
第 41 回日本免疫学会学術集会
2012 年 12 月 7 日
神戸国際会議場 (神戸)

大隈貞嗣、杉村和人、藤川隆彦、緒方正人
p38 MAP キナーゼは血球系を介してインスリン耐性を制御する
第 5 回日本プロテインホスファターゼ研究会

学術集会
2012 年 1 月 19 日
大阪大学銀杏会館 (大阪)

Masato Ogata
Systemic roles of MAP kinases in hematopoietic cells.
The First Japan-Taiwan Bilateral Conference on Protein Phosphatases.
2011 年 12 月 2 日
National Institute for Basic Biology (Okazaki)
招待講演

Sadatsugu Ookuma, Kazuki Tauchi, Takahiko Fujikawa, Kazuto Sugimura, Kinya Otsu, and Masato Ogata.
p38alpha mitogen-activated protein kinase in blood cells regulates insulin resistance and expression of inflammatory genes.
第 40 回日本免疫学会学術集会
2011 年 11 月 29 日
幕張メッセ (千葉)

Sadatsugu Ookuma, Kazuki Tauchi, Takahiko Fujikawa, Kazuto Sugimura, Kinya Otsu, and Masato Ogata.
p38alpha mitogen-activated protein kinase in blood cells is involved in insulin resistance.
第 84 回日本生化学会大会
2011 年 9 月 23 日
国立京都国際会館 (京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

緒方 正人 (OGATA Masato)
三重大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 60224094