

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月 30日現在

機関番号： 14101
 研究種目： 若手研究（B）
 研究期間： 2011～2012
 課題番号： 23790362
 研究課題名（和文） メタボリックシンドローム介入標的としての p38 α 作用機構
 研究課題名（英文） Molecular mechanism of p38 alpha as a therapeutic target of metabolic syndrome

 研究代表者
 大隈 貞嗣（OOKUMA SADATSUGU）
 三重大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号： 70444429

研究成果の概要（和文）：近年、メタボリックシンドロームの発症には炎症メカニズムの関与が必要であることが明らかにされつつある。炎症制御の中心的因子である p38 α の血管血球系ノックアウトマウスを作製することにより、炎症制御によるメタボリックシンドロームへの介入メカニズムを検討した。p38 α の血管血球系ノックアウトマウスでは高脂肪食によるインスリン抵抗性および肥満が抑制されること、脂肪組織における炎症性サイトカインの発現が減少していること、脂肪組織へ浸潤する炎症性マクロファージが減少し、また炎症性マクロファージにおけるケモカインレセプターの発現が低下していることを明らかにした。このことから、p38 α は脂肪細胞における慢性炎症を介してインスリン抵抗性を制御していることが示唆された。さらに、肝臓における脂質代謝制御遺伝子の発現が変化していたことから、血球細胞における p38 α は肝における脂質代謝への影響を介して、肥満を制御している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In recent studies, it is revealed that chronic low-grade inflammation is involved in rising insulin resistance and metabolic syndrome. p38 is known as stress-activated protein kinase of mitogen-activated protein kinase (MAPK) family. To investigate the p38 α functions in metabolic syndrome, we produced conditional knockout mice of p38 α , in which p38 α gene was disrupted in hematopoietic cells and vascular endothelial cells. In the p38 α conditional knockout (cKO) mice, high fat diet-induced insulin resistance and obesity were significantly suppressed. High fat diet-induced infiltration of macrophage into adipose tissue was also suppressed in the p38 α cKO mice. Expression level of genes regulating inflammation and chemotaxis was altered in the adipose tissue and ATM (adipose tissue macrophage) of the p38 α cKO mice. These observations indicate that p38 α is involved in the high fat diet-induced insulin resistance, probably through modifying macrophage infiltration. Furthermore, the expression of lipid metabolism genes was changed in liver of the p38 α cKO mice. It suggests that p38 α in blood cells regulates obesity via lipid metabolism in liver.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：代謝異常学

1. 研究開始当初の背景

肥満およびメタボリックシンドローム

はわが国を含む先進国で大きな社会問題となっているのみならず、新興国においても急激に増加しており、世界的な医療問題であるといえる。しかしながら、摂食や脂肪の蓄積が肥満からメタボリックシンドローム、ひいては糖尿病や動脈硬化を引き起こすメカニズムは複雑であり、その全容はいまだ明らかになっていない。近年の研究により、脂肪細胞の肥大によりサイトカインおよびケモカインの分泌が変化すること、また脂肪組織に対してマクロファージや T 細胞といった免疫細胞が浸潤し慢性炎症を生じていることなどが報告され、肥満およびメタボリック・シンドロームと炎症性免疫応答との深い関連が示唆されている。p38 α は酵母からヒトまで高度に保存された細胞内シグナル伝達分子である MAP キナーゼファミリーの主要分子であり、炎症や免疫応答の制御に特に関与すると考えられている。医学的にも、TNF α や IL-6 といった炎症性サイトカインの抑制が必要な関節リウマチ等の治療において、複数の p38 α 阻害剤が薬剤候補として挙げられている。一方で、p38 α の機能は全身で多岐に渡るため、阻害による副作用が課題とされている。そこで本申請者は、p38 α のメタボリックシンドローム治療における可能性を検討するため、発生工学を用いて部位特異的 p38 α ノックアウトマウスの作製を試みた。p38 α の全身におけるノックアウトは胎生致死となるため、Cre-loxP システムを用いて血管血球系特異的 p38 α ノックアウトマウスを作製した。この変異マウスはホモ接合体でも出生し、通常の飼育条件における発育では野生型と顕著な差は見出されなかった。

2. 研究の目的

われわれは、作製した血管血球系特異的 p38 α ノックアウトマウスを用いて、肥満およびメタボリックシンドローム治療の新規な標的となりうる血球系シグナル伝達の機能について検討を行う。血球系の p38 α シグナリングが低下したことが、高脂肪食投与時の代謝にどのような変化をおよぼすのか、またこの時、免疫系細胞群の機能がどのように変化するのかを検討する。特に、肥満およびメタボリックシンドロームとの関連が深いとされる、炎症性サイトカインおよび炎症性マクロファージの動態に注目する。インスリン抵抗性の生じるメカニズムとして、脂肪組織における慢性炎症が提唱されていることから、特に脂肪組織におけるサイトカイン発現やマクロフ

ァージの浸潤への影響について検討する。

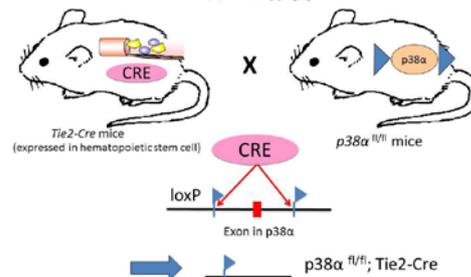
3. 研究の方法

Cre-loxP システムを用いて作製した血管血球系特異的 p38 α ノックアウトマウスに対し、通常食および高脂肪食を投与して、体重、血糖値、血中脂質などの生理、代謝機能を測定する。また、耐糖能試験、インスリン抵抗性試験を行い、血糖制御における影響を検討する。また肝、筋、脂肪組織より mRNA を抽出し、炎症性サイトカイン、アディポカインおよび、代謝や炎症制御に関する遺伝子発現をリアルタイム PCR を用いて検討する。脂肪組織に浸潤するマクロファージを、コラゲナーゼ処理によって分取し、フローサイトメトリーを用いて炎症性マーカー等を分析する。また分取した浸潤マクロファージからも mRNA を抽出し、炎症制御および走性制御に関する遺伝子発現について検討する。

4. 研究成果

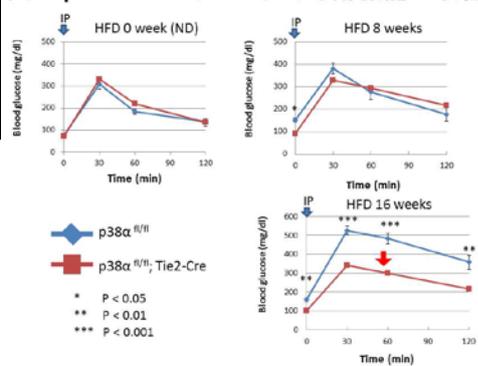
われわれは、Cre-loxP システムを用いて、血管血球系特異的 p38 α コンディショナルノックアウト (cKO) マウスを作製した。この cKO マウスでは、血球および血管内皮において p38 α が遺伝子破壊されているが、全身での遺伝子破壊と異なり、出生や生育に大きな影響は認められなかった。

図1. 血管血球系p38 α cKO (conditional knockout) マウスの作製



野生型この cKO マウスに対してグルコース投与による耐糖能試験を行った。通常食においては、双方に有意な差は認められなかったが、高脂肪食を 16 週間投与すると、野生型では血糖値が耐糖能が低下し高血糖をきたしたが、cKO マウスではこの傾向が抑制されていた。インスリン抵抗性試験においても、高脂肪食投与時に、cKO マウスは野生型と比べ高

図2. p38 α cKOマウスにおける耐糖能の改善



いインスリン感受性を保持していた。さらに、脂肪組織における炎症性サイトカインおよびケモカインの発現をリアルタイムPCRを用いて検討した。高脂肪食投与によって、野生型ではIL-1 β 、IL-6、TNF- α といった炎症性サイトカインや、ケモカインであるMCP1の発現が顕著に上昇した。一方、cKOマウスにおいてはこれらの遺伝子の発現上昇が抑制されていた。このことから、p38 α cKOマウスでは高脂肪食による脂肪組織の慢性炎症が抑制されていると考えられる。

図6. 浸潤炎症性マクロファージにおける遺伝子発現解析

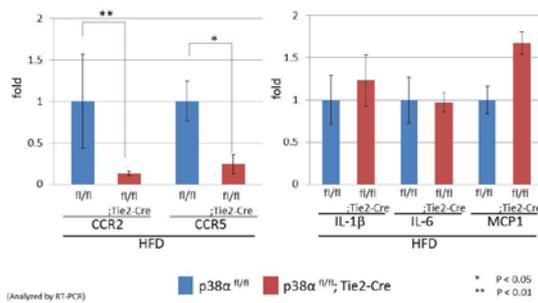
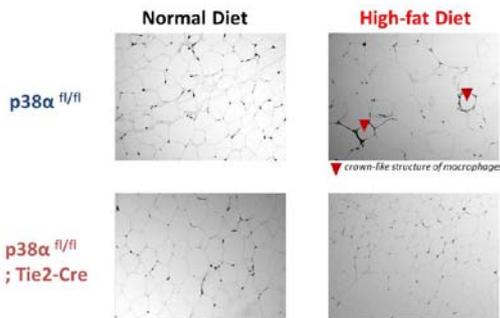
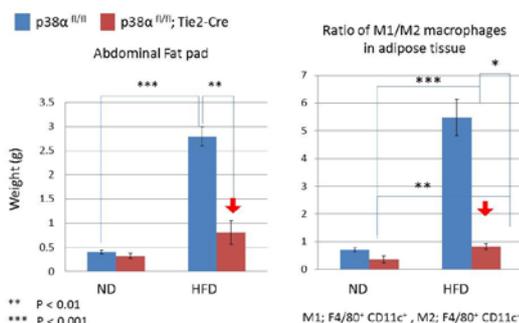


図4. p38 α cKOマウスでは高脂肪食による脂肪肥大が抑制される



また、高脂肪食によって野生型では脂肪細胞が肥大し、脂肪組織内への浸潤マクロファージによる王冠構造もみることができ、cKOマウスにおいては脂肪細胞の肥大および王冠構造のいずれも抑制されていた。通常食においては、内臓脂肪の重要は野生型とcKOマウスに有意な差は認められないが、高脂肪食投与時には野生型の内臓脂肪量が增大するのに対し、cKOではその増加が有意に抑制されていた。また脂肪組織へ浸潤したマクロファージをコラゲナーゼを用いて分取し、マクロファージのマーカとしてF4/80、炎症性のマーカとしてCD11cを用い、フローサイトメーターで解析した。野生

図5. 内臓脂肪量および浸潤マクロファージ



型では、高脂肪食で炎症性マクロファージの比率 (F4/80⁺CD11c⁺/F4/80⁺CD11c⁻) が増大するが、cKOマウスではその増大が顕著に抑制されていた。これらのことから、p38 cKOマウスでは高脂肪食における脂肪組織の慢性炎症が抑制され、そのメカニズムのひとつは炎症性マクロファージ浸潤の低下にあることが示唆された。

さらに、脂肪組織に浸潤した炎症性マクロファージ (F4/80⁺CD11c⁺) をセルソーターによって分取し、mRNAを抽出してリアルタイムPCRによる遺伝子発現解析を行った。その結果、p38 cKOマウス由来の炎症性浸潤マクロファージでは、CCR2およびCCR5といったケモカインレセプターの発現が有意に減少していることを見いだした。一方、サイトカインの発現には大きな差がなく、p38cKOマウス脂肪組織における慢性炎症の抑制は主に炎症性マクロファージ浸潤能の抑制によるものであると示唆された。

また、インスリン抵抗性のみならず、p38cKOマウスでは高脂肪食による肥満も抑制されることがわかった。TLR4ノックストマウスによる研究が示すように、インスリン抵抗性の改善は、糖の取り込みを促進するため、必ずしも肥満抑制をとまわらない (H. Shi *et al.* J. C. I. 2006)。したがって p38cKOマウスでは、慢性炎症の抑制以外に肥満抑制メカニズムが機能していると考えられる。

肥満を引き起こす中性脂肪は、そのほとんどを肝で合成される。またインスリン抵抗性によりインスリン分布量が上昇すると、肝での中性脂肪合成が促進する。これらのことから、肝は脂肪蓄積による肥満において特に重要な臓器といえる。

高脂肪食投与時の肝を観察したところ、野生型では脂肪肝を喫しているのに対し、cKOマウスでは脂肪肝が抑制されていた。

この時、肝からmRNAを抽出しリアルタイムPCRを用いて脂質代謝に関与する遺伝子発現を検討したところ、以下のような変化を認め

図7. 高脂肪食p38 α cKOマウスにおける肥満抑制

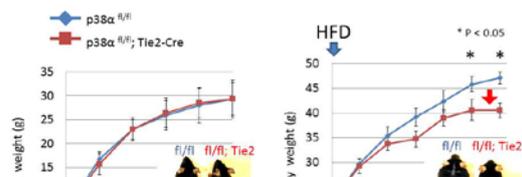
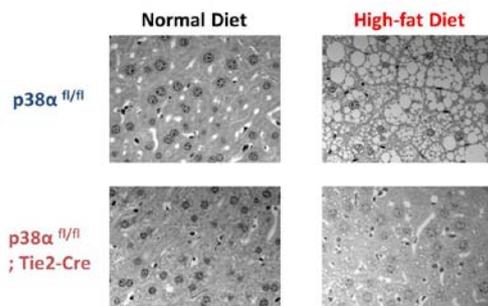
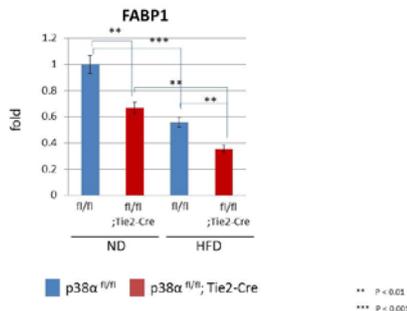


図8. p38cKOマウスでは脂肪肝が抑制される



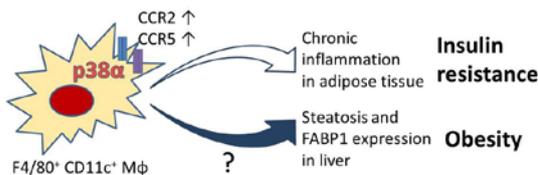
た。

図9. 肝における脂質代謝遺伝子の発現変化



通常食、高脂肪食の双方において、脂肪酸の取り込みを行う遺伝子 FABP1 の発現が、cKO マウスにおいて有意に減少していた。FABP1 の抑制は肥満を抑制するとの報告があり (E. P. Newberry, *et al.* *J. L. R.* 2012)、この遺伝子発現変化が肥満抑制に関与していることを示唆している。

p38 α が血球系を介してインスリン抵抗性および肥満を制御する(モデル)



これらの結果を総合することで、血球系の p38 α がインスリン抵抗性および肥満を制御するメカニズムについて、上のような新規なモデルを考えることができる。p38 α は血球細胞、特にマクロファージにおいてケモカインレセプターの発現を制御し、細胞の走性を通じて高脂肪食による脂肪組織の慢性炎症をコントロールしていると考えられる。また、肝においてはなんらかの経路により、FABP1 の発現に関与して脂質代謝を通じて肥満を制御していると考えられる。肝におけるメカニズムは不明だが、Kupffer 細胞など、肝における血球由来細胞が関与している可能性がある。

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0件)

[学会発表] (計9件)

S. Ookuma, K. Sugimura, M. Ogata

Contribution of p38 α in blood cells to the regulation of obesity and blood glucose

level

2011. 02. 01~03 第9回プロテインホスファターゼ国際カンファレンス

大隈貞嗣

メタボの新たな創薬ターゲットを提供するモデルマウス Model mice which provide novel medicinal targets for metabolic syndrome

2011. 05. 26 東海国立3大学新技術説明会 JST ホール

大隈貞嗣

血球系におけるシグナル操作で肥満とメタボを防止する新規モデルマウス

2011. 05. 18 第10回 国際 バイオ EXPO 東京ビッグサイト

S. Ookuma, K. Sugimura, M. Ogata
p38alpha mitogen-activated protein kinase in blood cells is involved in insulin resistance

2011. 09. 21 日第84回日本生化学会大会

S. Ookuma, K. Tauchi, T. Fujikawa, K. Sugimura, K. Otsu, M. Ogata

血管血球系 p38alpha はインスリン抵抗性と炎症性遺伝子発現を制御する

2011. 11. 27~29 第40回日本免疫学会学術集会 千葉幕張メッセ

大隈貞嗣 杉村和人 藤川隆彦 緒方正人
p38 α 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

2012. 01. 19 第5回 日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会 東京大学

S. Ookuma, T. Fujikawa, K. Sugimura, K. Otsu, M. Ogata

p38alpha regulates high-fat-induced chronic inflammation and hyperglycemia via blood cells

2012. 12. 14~17 第85回日本生化学会大会 福岡国際会議場

S. Ookuma, K. Sugimura, M. Ogata

Roles of p38alpha mitogen-activated protein kinase in blood cells in high-fat-induced chronic inflammation and insulin resistance.

2012. 12. 05~07 第41回日本免疫学会学術集会

神戸国際会議場

S. Ookuma, T. Fujikawa, K. Sugimura, K.

Otsu, M. Ogata
p38 α in blood cells regulates insulin
resistance in mice
2013.02.07~09 プロテインホスファターゼ
国際カンファレンス.
がん研究振興財団 国際研究交流会館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大隈 貞嗣 (OOKUMA SADATSUGU)

三重大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号： 70444429