

## 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 5 月 24 日現在

機関番号：17401  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23791038  
 研究課題名（和文） 単球におけるインスリン作用と NF-κB 活性の糖尿病発症機序への関与の検討  
 研究課題名（英文） Pathophysiological roles of monocyte insulin signaling and NF-κB activation in diabetes.  
 研究代表者  
 瀬ノ口 隆文（SENOKUCHI TAKAFUMI）  
 熊本大学・大学院生命科学研究部・特任助教  
 研究者番号：00530320

## 研究成果の概要（和文）：

糖尿病発症、進展機序における単球・マクロファージの炎症活性および増殖能の関与について検討した。培養単球、マクロファージにおいて高糖濃度培養により炎症活性の上昇がみられ、高/低糖濃度変化によりその活性はさらに亢進した。また、炎症活性の亢進に伴い増殖抑制因子の発現が増加し、高糖濃度培養マクロファージの増殖は抑制された。一方、マクロファージ特異的増殖抑制マウスでは、耐糖能の改善を認めた。マクロファージ増殖能と糖尿病発症との関連について今後さらなる検討が必要である。

## 研究成果の概要（英文）：

In this study we investigate the implication of monocyte/macrophage inflammation and proliferation in diabetes progression. Macrophage and monocyte cultured in high glucose showed activated inflammatory activity, and pulsate stimulation with high glucose induced significantly increased inflammatory cytokine expression. Along with the increase of inflammatory activity, the cell cycle inhibitor, p27kip expression was increased, and macrophage proliferation was inhibited in high glucose culture. On the other hand, the macrophage specific p27kip transgenic mouse, whose macrophage proliferation is inhibited, showed improved glucose tolerance after high fat diet loading. Further studies are necessary to reveal the pathophysiological roles of monocyte/macrophage inflammation and proliferation in the progression of diabetes.

## 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	3,200,000	960,000	4,160,000

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：メタボリックシンドローム

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) 糖尿病と単球・マクロファージ活性

糖尿病モデルマウスや糖尿病患者において末梢血中の単球や単球由来マクロファージの炎症性サイトカイン産生の亢進、接着・遊走能の亢進（Diabetes. 52, 1256 2003,

Diabetes. 54, 2279 2004) など高血糖、脂質、脂肪酸、炎症性サイトカインによる単球・マクロファージ活性化が引き起こされることが報告されている。一方で、脂肪細胞へのマクロファージ浸潤の増加によるインスリン抵抗性の亢進（J Clin Invest. 112, 1796 2003）

や肥満、糖尿病モデルである db/db マウスにおける膵島へのマクロファージ浸潤の増加などから単球・マクロファージが糖尿病の病態に重要な役割を果たすことが示唆されている。また近年、実験動物において PPAR $\alpha$  のリガンド投与によってマクロファージ極性が抗炎症性の M2 優位に変化することでインスリン抵抗性が改善すること (Cell Metab. 6, 137 2007) から、単球・マクロファージ機能制御をターゲットとした糖尿病の新たな治療法の可能性も示唆されている。

## (2) 単球・マクロファージの NF- $\kappa$ B 活性と耐糖能

単球・マクロファージ活性と糖尿病の病態との関連は炎症反応の制御が分子機序と考えられており、特に NF- $\kappa$ B を介したシグナルや遺伝子発現の関与が示唆されている。NF- $\kappa$ B は炎症性サイトカインの発現を誘導する主たる転写因子であり、炎症反応の鍵因子として知られる。申請者は最近インスリン受容体欠損 (InsR $^{-/-}$ ) マクロファージ や ob/ob マウスのマクロファージなどインスリン抵抗性を示すマクロファージにおいて NF- $\kappa$ B 活性が FoxO を介して抑制されていることを報告した (Diabetes. 57:2967-2976, 2008)。

## (3) 単球の NF- $\kappa$ B 活性測定と慢性炎症性疾患との関連

2 型糖尿病患者の末梢血単球における炎症性サイトカイン発現と動脈硬化性疾患との関連 (J Diabetes Complications. 24, 1 2010) や、家族性高コレステロール血症患者の末梢血単球での NF- $\kappa$ B 活性の評価 (Eur J Clin Invest. 40, 89 2010) などマクロファージ分化前の末梢血単球の炎症反応と慢性炎症性疾患との関連を検討した報告が見られるが、これらの慢性炎症性疾患と末梢血単球の活性化の間には未だはっきりとした関連性が見出されていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

慢性炎症性疾患の中でも糖尿病状態における末梢血単球を取巻く環境は高血糖のみならず、インスリン、炎症性サイトカイン、脂質や脂肪酸などさまざまであり、複数の要因が複雑に絡み合っており、マクロファージの活性に影響を与えると考えられる。本研究では糖濃度の変化による単球・マクロファージ活性への影響に注目し、単球・マクロファージの炎症活性、およびマクロファージ増殖能について糖尿病発症機序への関与を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 糖濃度変化による単球・マクロファージ機能への影響の検討

①マウス腹腔マクロファージ、およびヒト単球系細胞株 THP-1 細胞における、糖濃度変化による炎症活性の変化を検討した。

②マウス腹腔マクロファージにおける糖濃度変化による増殖能への影響を検討した。

### (2) 糖尿病発症におけるマクロファージ増殖の関与の検討

①マクロファージ特異的増殖抑制マウスの作成

マクロファージ特異的増殖抑制を目的とし、ヒトスカベンジャー受容体のプロモーター下に CDK inhibitor である human p27kip を配したコンストラクトを作成し、マクロファージ特異的 human p27kip トランスジェニックマウス (mac-p27Tg) を作成した。

②マクロファージ増殖抑制による耐糖能への影響の検討

mac-p27Tg マウスに高脂肪食を負荷し、継続的に体重、随時血糖測定を行った。経腹腔糖負荷試験を行い、耐糖能への影響を評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 糖濃度変化による単球・マクロファージ機能への影響

①マウス腹腔マクロファージを低糖濃度 (5 mM)、高糖濃度 (15 mM) および低/高糖濃度 (6時間ごとに変更) の培養液中で 24 時間培養し、LPS (0.1 ng/ml) で 2 時間刺激した。低糖濃度での培養に比し、高糖濃度での培養細胞では、炎症性サイトカイン (IL-6、MCP-1) の LPS 反応性 mRNA 発現が有意に増加した (図 1)。また、培養液中の糖濃度を 6 時間ごとに低/高濃度に変化させるとこれらのサイトカインの mRNA 発現がさらに増加した。ヒト単球系細胞株 THP-1 細胞においても、同様の結果が得られた。

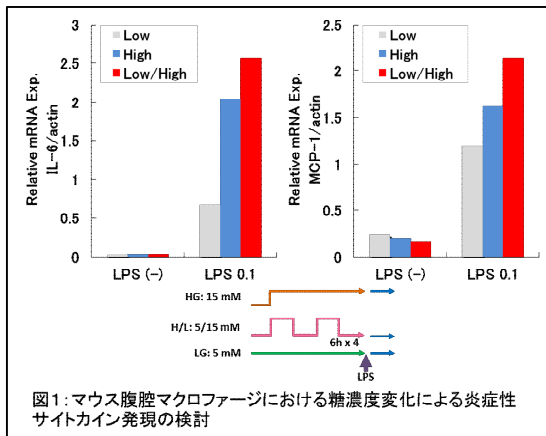


図1: マウス腹腔マクロファージにおける糖濃度変化による炎症性サイトカイン発現の検討

また、興味深いことに、高糖濃度で培養したマウス腹腔マクロファージにおいて、細胞増殖抑制分子である p27kip の発現が有意に増加した (図 2)。

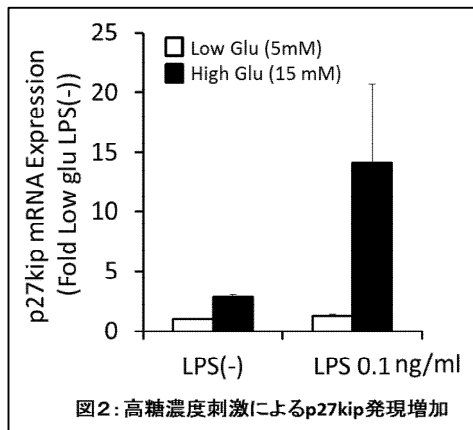


図2: 高糖濃度刺激によるp27kip発現増加

②糖濃度変化によるマクロファージ増殖能に対する影響を検討した。マウス腹腔マクロファージを 0、3、8、25 mM の培養液で培養し、マクロファージの増殖誘導因子として GM-CSF を添加後 7 日目の生細胞数を検討した。マクロファージ増殖は糖濃度依存的に減少し、高糖濃度培養時の p27kip 発現増加との関連が示唆された。

##### (2) 糖尿病発症におけるマクロファージ増殖の関与

##### ①マクロファージ特異的増殖抑制マウスの作成

マクロファージ特異的増殖抑制を目的とし、ヒトスカベンジャー受容体のプロモーター (hSRA-pAL1) 下に CDK inhibitor である human p27kip を配したコンストラクトを作成した。この hSRA-hp27 導入遺伝子を C57BL6 マウス受精卵の雄性前核にマイクロインジェクション法で導入した。トランスジェニックマウス作成は熊本大学生命資源研究・支援センター/動物資源開発研究部門 (CARD) で行った (図 3)。

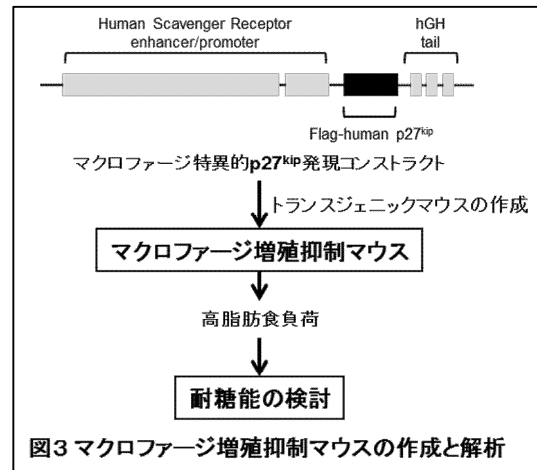


図3 マクロファージ増殖抑制マウスの作成と解析

コントロールおよび mac-p27TG マウスから採取した骨髄細胞を M-CSF 含有細胞培養液中で培養し、増殖能を検討した。分化誘導に伴い mac-p27TG マクロファージでは p27kip 遺伝子発現が増加し、細胞増殖の有意な抑制を認めた (図 4)。

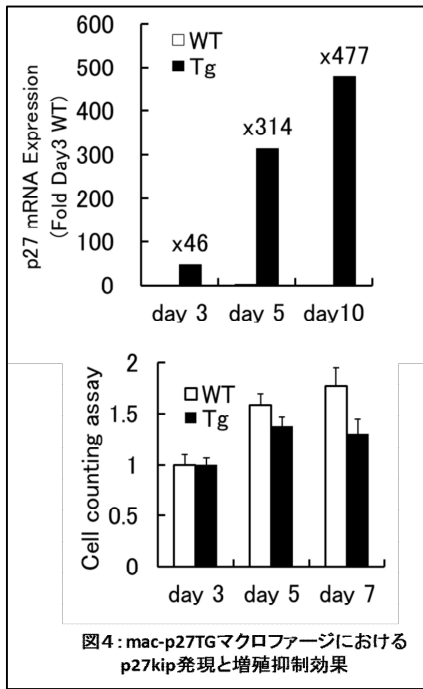


図4: mac-p27Tgマクロファージにおける p27kip発現と増殖抑制効果

## ②マクロファージ増殖抑制による耐糖能への影響の検討

11週齢よりコントロールおよびmac-p27Tgマウスに高脂肪食負荷を開始した。継続的に体重測定、随時血糖測定を行ったが、両群に有意な差は認めなかった。

高脂肪食負荷5週後に経腹腔糖負荷試験を行い、耐糖能に対するマクロファージ増殖の影響を評価した。

マクロファージ増殖が抑制されているmac-p27Tgマウスは糖負荷後の血糖値の上昇が有意に低く、高脂肪食負荷による耐糖能障害が抑制されていた(図5)。

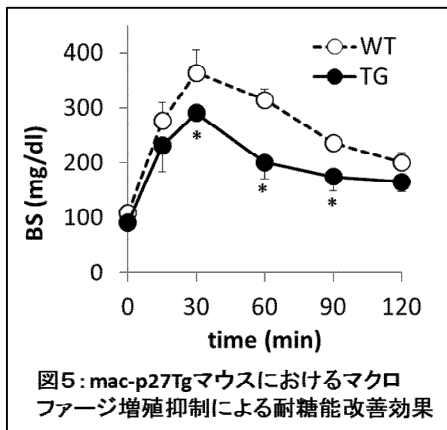


図5: mac-p27Tgマウスにおけるマクロファージ増殖抑制による耐糖能改善効果

これらの結果から、単球・マクロファージ

は高糖濃度に暴露されると炎症活性が亢進し、低/高濃度の糖濃度の変化によってさらに活性が亢進することが明らかとなった。食後高血糖などのグルコーススパイクによってより単球・マクロファージの炎症活性が惹起される可能性が考えられた。

一方、高糖度培養によって、増殖抑制因子である p27kip の発現が増加することは、高糖濃度培養時のマクロファージ増殖能の低下との関連が示唆される。しかしながら、マクロファージ増殖抑制マウスは、高脂肪食負荷による耐糖能異常の発症に耐性があり、糖尿病の発症に組織でのマクロファージ増殖が何らかの役割を果たしていることが考えられたが、マクロファージ増殖と耐糖能への影響との関連については、未だ一定の解釈は得られていない。

今回の研究では、単球・マクロファージの炎症活性および増殖が、インスリン分泌あるいはインスリン抵抗性にどのように関与しているかの検討には至っていない。

また当初予定していたNF-κBに着目した単球の炎症活性の詳細な評価についても十分な検討を行っておらず、単球・マクロファージの糖尿病発症における役割についてさらに詳細な解析を継続してゆく予定である。

## 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7件)

- ① Kinoshita H, Matsumura T, Ishii N, Fukuda K, Senokuchi T, Motoshima H, Kondo T, Taketa K, Kawasaki S, Hanatani S, Takeya M, Nishikawa T, Araki E. Apocynin suppresses the progression of atherosclerosis in apoE-deficient mice

- by inactivation of macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 431(2):124-130, 2013 doi: 10.1016/j.bbrc.2013.01.014. (査読有)
- ② Kawasaki S, Motoshima H, Hanatani S, Takaki Y, Igata M, Tsutsumi A, Matsumura T, Kondo T, Senokuchi T, Ishii N, Kinoshita H, Fukuda K, Kawashima J, Shimoda S, Nishikawa T, Araki E. Regulation of TNF $\alpha$  converting enzyme activity in visceral adipose tissue of obese mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 430(4):1189-1194, 2012 doi: 10.1016/j.bbrc.2012.12.086. (査読有)
- ③ Su Y, Jono H, Misumi Y, Senokuchi T, Guo J, Ueda M, Shinriki S, Tasaki M, Shono M, Obayashi K, Yamagata K, Araki E, Ando Y. Novel function of transthyretin in pancreatic alpha cells. *FEBS Lett.* 586(23):4215-4222, 2012 doi: 10.1016/j.febslet.2012.10.025. (査読有)
- ④ Su Y, Misumi Y, Ueda M, Shono M, Tasaki M, Guo J, Jono H, Obayashi K, Senokuchi T, Yamagata K, Ando Y. The occurrence of islet amyloid polypeptide amyloidosis in Japanese subjects. *Pancreas.* 41(6):971-973, 2012 doi: 10.1097/MPA.0b013e318249926a. (査読有)
- ⑤ Matsumura T, Kinoshita H, Ishii N, Fukuda K, Motoshima H, Senokuchi T, Taketa K, Kawasaki S, Nishimaki-Mogami T, Kawada T, Nishikawa T, Araki E. Telmisartan exerts anti-atherosclerotic effects by activating PPAR $\gamma$  in macrophages *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31(6):1268-1275, 2011 doi: 10.1161/ATVBAHA.110.222067. (査読有)
- ⑥ Yamagata K, Senokuchi T, Lu M, Takemoto M, Fazlul Karim M, Go C, Sato Y, Hatta M, Yoshizawa T, Araki E, Miyazaki J, Song WJ. Voltage-gated K(+) channel KCNQ1 regulates insulin secretion in MIN6  $\beta$ -cell line. *Biochem Biophys Res Commun.* 407(3):620-625, 2011 doi: 10.1016/j.bbrc.2011.03.083. (査読有)
- ⑦ Yano M, Watanabe K, Yamamoto T, Ikeda K, Senokuchi T, Lu M, Kadomatsu T, Tsukano H, Ikawa M, Okabe M, Yamaoka S, Okazaki T, Umehara H, Gotoh T, Song WJ, Node K, Taguchi R, Yamagata K, Oike Y. Mitochondrial dysfunction and increased reactive oxygen species impair insulin secretion in sphingomyelin synthase 1 null mice. *J Biol Chem.* 286(5):3992-4002, 2011 doi: 10.1074/jbc.M110.179176. (査読有)
- [学会発表] (計2件)
- ① 瀬ノ口 隆文、竹田 佳代、河島 淳司、下田 誠也、佐藤 美紀、荒木 栄一  
20歳代で発症したGAD抗体陰性、IA-2抗体陽性 緩徐進行1型糖尿病の1例  
第50回日本糖尿病学会九州地方会  
2012年10月19日 ホテルマリターレ創世 久留米
- ② 瀬ノ口 隆文、郷 知佐、吉澤 達也、宮田 敬士、Eva Bober、尾池 雄一、荒木 栄一、山縣 和也 NAD依存性脱アセチル化酵素SIRT7の糖代謝への関与の検討 第54回 日本糖尿病学会年次学術集会 2011年5月19日 国際館パミール 札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀬ノ口 隆文 (SENOKUCHI TAKAFUMI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・特任助教

研究者番号：00530320

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

松村 剛 (MATSUMURA TAKESHI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：20398192