

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：85402

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591316

研究課題名(和文)好中球による脂肪組織炎症とインスリン抵抗性惹起機構の解明

研究課題名(英文)The role of adipose tissue neutrophils in insulin resistance

研究代表者

亀井 望 (Kamei, Nozomu)

独立行政法人国立病院機構(呉医療センター臨床研究部)・その他部局等・その他

研究者番号：00448242

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：現在、肥満と2型糖尿病は全身の免疫疾患とも考えられている。脂肪組織に存在する様々な免疫細胞が、マクロファージの浸潤や活性化を介してインスリン抵抗性の進展に関与する事がこれまでに分かっている。脂肪組織の好中球も何らかの重要な役割を果たしている事が先行研究から示唆される。今回の結果から、好中球は絶食後の再摂食のような短時間の刺激によっても脂肪組織内において増加し、ダイナミックな動きをする事が示唆された。また、RNAシーケンスから、脂肪組織好中球は脾臓の好中球とは異なった性質を示し、太ったマウスの脂肪組織好中球は痩せたマウスのものとは一部異なった性質を示す事が示された。

研究成果の概要(英文)：Obesity and type 2 diabetes are now considered systemic immunological diseases. Many types of immune cells, such as T cells, B cells, NK cells or Eosinophils, in adipose tissues may play a crucial role in the development of obesity-induced insulin resistance by affecting the infiltration and activation of adipose tissue macrophages. Neutrophils may also have an important role in obesity-induced adipose tissue inflammation and systemic insulin resistance. We found that the neutrophil number in mouse adipose tissue was increased by the refeed stimulation after fasted, which meant these cells infiltrated into fat in dynamic way. The adipose tissue neutrophils showed specific character compare to spleen neutrophils by the RNA sequencing method. The adipose tissue neutrophils from obese mice were different in their character from those from lean mice.

研究分野：代謝学

キーワード：インスリン抵抗性 糖尿病 脂肪組織 炎症 好中球

1. 研究開始当初の背景

(1) 運動習慣の減少や欧米型食習慣への変化により、2型糖尿病とメタボリックシンドローム患者が増加しているが、その発症基盤には、肥満によるインスリン抵抗性の増悪がある。このメカニズムを説明する有力な仮説として「2型糖尿病は炎症性疾患である」とする考え方がある。肥満に伴い全身の組織で炎症を認めるが、特に脂肪組織においてマクロファージなどの免疫細胞が集まり、その結果分泌された炎症性サイトカインなどが肝臓や骨格筋におけるインスリンシグナルを抑制することがインスリン抵抗性惹起につながると考えられている。我々は脂肪組織において特異的に単球遊走ケモカインである MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) を高発現するトランスジェニックマウス (aP2-MCP-1 Tg マウス) を作成し、脂肪組織へのマクロファージ浸潤の増加が全身のインスリン抵抗性につながることを報告した。また、脂肪組織にはマクロファージ以外にも、T細胞、B細胞、NK細胞、好酸球、肥満細胞など様々な免疫細胞が存在し、全身のインスリン感受性に関与することが報告されている。

(2) しかし、ヒトの血液中に最も多く存在する免疫細胞である好中球に関しては、大規模臨床研究などから血液中の白血球数や好中球数が糖尿病の有意な予知因子であることが示されているにもかかわらず詳細が不明であった。好中球は壊れやすく、組織中の好中球を捉えることが困難であることもあり研究が進んでおらず、そもそも脂肪組織に好中球が存在しているのかどうかについても不明であった。

(3) そこで我々は、先行研究において、脂肪組織の中に好中球が存在すること、マウスにおいて高脂肪食などによる肥満によって好

中球がマクロファージに先行して脂肪組織の中に浸潤し、マクロファージを脂肪組織の中に呼び寄せる可能性がある事、脂肪組織への好中球の浸潤は全身のインスリン抵抗性惹起に関与する事を見出した。

(4) しかし、好中球がどのくらいのタイムコースで脂肪組織内で増加するのかは不明であった。また、脂肪組織の中に浸潤した好中球について、血液中や他の組織の好中球に比べて特徴的な性質があるのかどうか、脂肪組織の中でどのような役割を果たしているのかなどについては、これまで分かっていなかった。

2. 研究の目的

(1) マウスを用いて脂肪組織に好中球が存在している事を再確認し、絶食から再摂食による短時間の変化を検討する。

(2) 脂肪組織に浸潤した好中球の性質について、網羅的な検討を行う。

3. 研究の方法

(1) マウスの精巣上体脂肪あるいは皮下脂肪を摘出し、コラゲナーゼ処理により分解し、遠心分離にて血管間質細胞を採取する。あるいは脾臓から細胞を採取する。得られた細胞に対して抗体で染色した後に、フローサイトメーターで解析する。

(2) 通常食で飼育したマウスと高脂肪食で飼育し肥満したマウスの脂肪組織における好中球数の比較を行う。

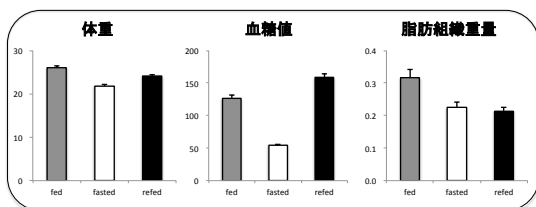
(3) 通常の12週齢のB6Jマウスを3群(自由摂食群、24時間絶食群、24時間摂食後の6時間再摂食群)に分けて、精巣上体脂肪における好中球の数を解析する。

(4) 8 週齢から通常食または高脂肪食を 4 週間与えた 12 週齢のマウスの精巣上体脂肪と脾臓から、フローサイトメーターを使って好中球のシングルセルソーティングを行う。ソーティングした細胞から RNA を抽出し、cDNA ライブラリを作成する。共同研究先にて次世代シーケンサーを用いて RNA シーケンスを施行し、結果を解析する。

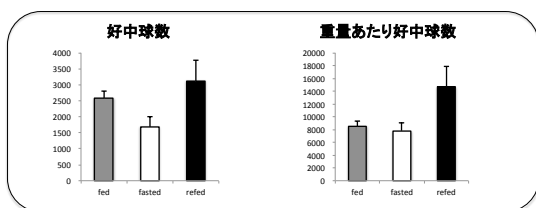
4. 研究成果

(1) 高脂肪食飼育で肥満したマウスでは脂肪組織の好中球数が通常食マウスよりも増加しており、先行研究の結果を再確認した。

(2) 摂食群 (fed)、絶食群 (fasted)、再摂食群 (refed) に分けて検討を行った。24 時間の絶食により摂食群に比べて体重は減少し、血糖値は低下し、精巣上体脂肪重量も減少する。24 時間絶食後の再摂食 6 時間後では、体重は増加するが絶食前には戻らず、血糖値は上昇する。脂肪組織重量は再摂食 6 時間後では元に戻らない。



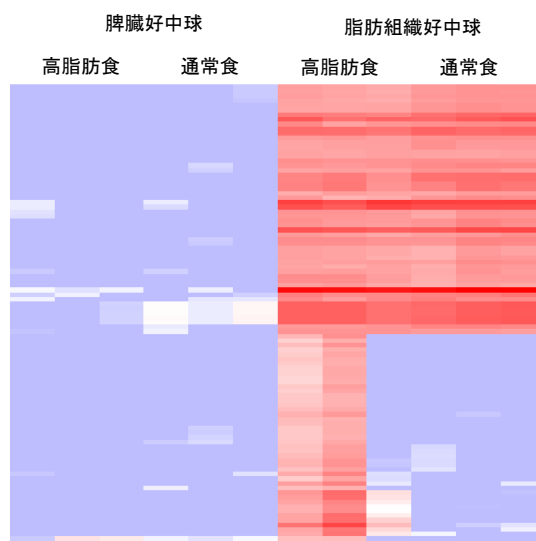
この状態において、脂肪組織中の好中球の数を検討した。好中球の絶対数および脂肪組織重量あたりの好中球数は、再摂食により増加を認めた。脂肪組織中の好中球数は短時間の摂食刺激で増加する可能性が示唆された。



(3) 通常食マウスと高脂肪食マウスから脾臓

と脂肪組織の好中球をソーティングして単離し、抽出した RNA から次世代シーケンサーを用いた解析を行った。

膨大な RNA シーケンスのデータから、例えば以下に示すヒートマップ解析等により、脾臓の好中球と脂肪組織の好中球は性質が異なる事、高脂肪食負荷による肥満で脂肪組織好中球の性質が変化する可能性がある事が示唆された。



(4) 今回の検討により、これまで明らかではなかった好中球の脂肪組織へのダイナミックな浸潤の可能性と、脂肪組織に侵入した好中球の性質の変化、いわゆる活性化した状態である可能性が示唆された。今後、さらなる検討を要すると考えられる。

<引用文献>

- ① Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* 11:98-107, 2011.
- ② Kamei N, et al. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J Biol Chem* 281:26602-26614, 2006.
- ③ Lumeng CN, et al. T-ing up

inflammation in fat. *Nat Med* 15:846-847, 2009.

- ④ Cipolletta D, et al. PPAR- γ is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells. *Nature* 486:549-553, 2012.
- ⑤ Kim MS, et al. Regulation of diet-induced adipose tissue and systemic inflammation by salicylates and pioglitazone. *PLoS One* 8:e82847, 2013.

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)

[学会発表] (計 6 件)

- ① 亀井望 脂肪組織好中球のインスリン抵抗性への関与 第 33 回日本肥満学会 京都 2012/10/12
- ② 亀井望 脂肪組織好中球の浸潤にはロイコトリエン B4 が関与する 第 86 回日本内分泌学会学術総会 仙台 2013/4/26
- ③ 亀井望 好中球はロイコトリエン B4 を介して脂肪組織に浸潤しインスリン抵抗性に関与する 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会 熊本 2013/5/17
- ④ 亀井望 肥満の各時期における脂肪組織好中球 (ATN) の役割 第 34 回日本肥満学会 東京 2013/10/12
- ⑤ 亀井望 脂肪組織好中球 (ATN) はマクロファージの浸潤と活性化に作用する 第 87 回日本内分泌学会学術総会 博多 2014/4/24
- ⑥ 亀井望 肥満の初期と中期以降における脂肪組織好中球 (ATN) の役割の比較 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会 大阪 2014/5/24

6. 研究組織

- (1) 研究代表者

亀井 望 (KAMEI, Nozomu)

独立行政法人国立病院機構 (呉医療センター臨床研究部)

研究者番号 : 00448242

(2) 研究分担者

鈴木 亮 (SUZUKI, Ryo)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 : 20396732