

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460693

研究課題名(和文)生活習慣病におけるHMGB1測定の意義の構築

研究課題名(英文) Identification of the significance of HMGB1 measurement in the lifestyle-related disease

研究代表者

清水 利昭 (Shimizu, Toshiaki)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：50468055

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：核内タンパク質のHMGB1は、3T3-L1脂肪細胞からJNKを介して新規のアディポサイトカインとして分泌される、分泌されたHMGB1は3T3-L1脂肪細胞に作用しMAPキナーゼを活性化しインスリンシグナルを減弱させる、肥満症患者の脂肪細胞の細胞質には健常者に比べ、HMGB1が高度に発現している、アディポネクチンは3T3-L1 adipocyteからのHMGB1の分泌を阻害する、という結果が得られた。以上から、「HMGB1は肥満症患者の大型内臓脂肪細胞から分泌される、インスリン抵抗性やメタボリック症候群に関係する新規の炎症誘発性のアディポサイトカインである」という成果がえられた。

研究成果の概要(英文)：HMGB1 might be an adipocytokine that acts as an innate pro-inflammatory mediator in white adipose tissue (WAT) of patients with obesity, which may be associated with insulin resistance and metabolic syndrome. Conversely, adiponectin protects against HMGB1-induced adipose tissue inflammation by partially suppressing HMGB1 release from adipocytes.

「HMGB1 is secreted by 3T3-L1 adipocytes through JNK signaling and the secretion is partially inhibited by adiponectin」 Obesity 2016 「IN PRESS」

研究分野：糖尿病

キーワード：HMGB1 3T3-L1 adipocyte adipocytokine adiponectin obesity innate pro-inflammatory

1. 研究開始当初の背景

これまで当研究室では、元来核内タンパク質で転写調節因子として知られている HMGB1 (high-mobility group box 1) が敗血症性ショックや DIC (播種性血管内凝固症候群)、動脈硬化、関節リウマチにおいて、活性化マクロファージや壊死細胞 (necrotic cell) から放出され、炎症性メディエーターとして働いていることを発見し、国内外に先駆けて報告してきた。

一方、メタボリック症候群のバックグラウンドとして内臓蓄積脂肪組織で生じた慢性炎症が注目されているのは周知のとおりで、慢性炎症すなわち肥満の内臓脂肪組織へ浸潤したマクロファージにより脂肪細胞から分泌される生理活性物質 (総称してアディポサイトカイン) が分泌異常をきたし、インスリン抵抗性、糖尿病、血管内皮障害 (動脈硬化)、血栓症等の発症・進展に大きく関与するというものである。

そこで我々は、『この内臓蓄積脂肪組織での慢性炎症の過程においても、HMGB1 が炎症誘発性のメディエーターとして関与しているのではないかとすれば浸潤したマクロファージに加え、肥化した大型脂肪細胞からも HMGB1 が分泌されて脂肪組織における炎症やインスリン抵抗性を増大させているのではないかと』と考え、H21 年度～H22 年度に採択された科研費 (炎症性の生理活性をもつ“新規アディポサイトカインとしての HMGB1 の提唱：挑戦的萌芽) を用いてこれまで解析を行ってきた。そして現在までに、

(1) 肥満マウスと糖尿病マウスでは、健常マウスに比べ有意に血中 HMGB1 が高値になっており、これはアデノウイルスを使ったアディポネクチンの投与 (im) より低下すること

(2) マウス脂肪細胞 (3T3-L1 adipocyte) から、time-, dose-dependent に TNF 刺激で HMGB1 が分泌されること、すなわち HMGB1 は新規のアディポサイトカインであること

(3) 3T3-L1 adipocyte が大型化するにつれて HMGB1 の分泌は多くなるが、これはアディポネクチンの分泌が増大するにつれて低下していくこと (アディポネクチン分泌との逆相関係)

(4) 3T3-L1 adipocyte へのインスリン刺激時、HMGB1 pre-treat 群では p-AKT が低下すること、すなわち HMGB1 はインスリン抵抗性のアディポサイトカインであることを明らかにした。

以上から『HMGB1 は大型脂肪細胞から分泌される、炎症誘発性とインスリン抵抗性の生理作用を併せもつ悪玉の新規アディポサイトカインである』と仮説した。

これらの研究成果から、肥満患者の脂肪細胞から分泌された HMGB1 がメタボリック症候群のバックグラウンドとして重要な影響を及ぼしているのではないかと着想し、これをヒトのモデルで解析し検証を進めたいと考え、本研究を行う背景になった。

2. 研究の目的

本研究では、HMGB1 のインスリン抵抗性、糖尿病、動脈硬化、血栓症などの生活習慣病における生理的役割を、ヒトモデルで解析し検証する。現在まで HMGB1 とメタボリック症候群の関係性について研究・報告された例はない。しかし申請者は予備実験で、HMGB1 が肥化した脂肪細胞から分泌され、炎症誘発性とインスリン抵抗性の生理作用を併せ持つ新規の悪玉のアディポサイトカインであることを確認しており、メタボリック症候群のバックグラウンドになっていると考察している。

したがって本研究では、メタボリック症候群の病態形成において HMGB1 が果たす生理的役割の解明を進め、この研究成果を臨床検査の分野で展開させ、『HMGB1 値と生活習慣病のリスク』の因果関係を明らかにすることを研究目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウス前駆脂肪細胞 (3T3-L1 preadipocyte) と分化させたマウス脂肪細胞 (3T3-L1 adipocyte) の細胞内 HMGB1 の局在を免疫蛍光細胞染色で評価した。

(2) 3T3-L1 preadipocyte と 3T3-L1 adipocyte を TNF- α で刺激し、細胞内 HMGB1 protein と mRNA の変化をそれぞれイムノプロットと RT-PCR で評価した。

(3) 3T3-L1 adipocyte を TNF- α で刺激して HMGB1 が分泌されるときシグナル経路を解析した。

(4) 3T3-L1 adipocyte に対する HMGB1 の役割を評価した。

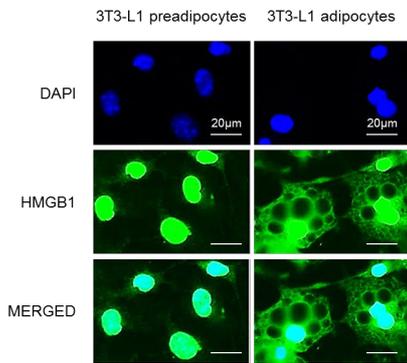
(5) 健常者と肥満症の患者の内臓脂肪組織標本を用いて、HMGB1 の局在の違いを免疫組織染色 (DAB 染色) と免疫蛍光組織染色 (IF 染色) の 2 通りの方法で評価した。

(6) アディポネクチンによる HMGB1 の分泌制御について解析した。

4. 研究成果

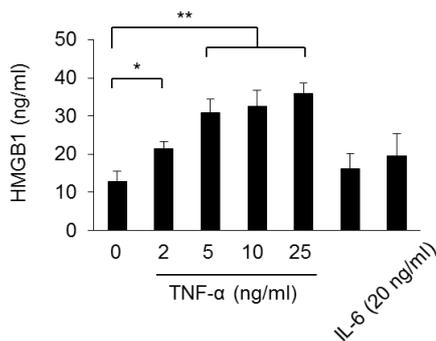
(1) 3T3-L1 preadipocyte から 3T3-L1 adipocyte に分化し成熟するにつれて核内の HMGB1 が細胞質に移動していることを発見した。

3T3-L1 adipocyte における核から細胞質への HMGB1 の移動

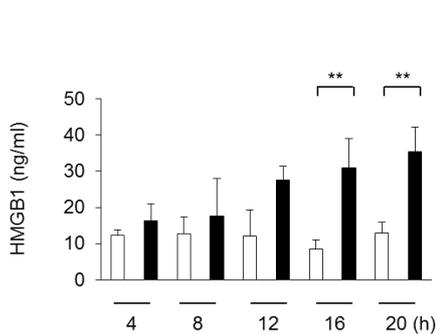


(2) TNF- 刺激により 3T3-L1 adipocyte から、dose, time-dependent に HMGB1 の分泌が見られた。また LPS 刺激でも強い HMGB1 の分泌が見られた。3T3-L1 preadipocyte では 3T3-L1 adipocyte とは違い、TNF- 刺激で軽度の HMGB1 の分泌が見られたが、LPS 刺激では HMGB1 の分泌は見られなかった。このとき TNF- 刺激で 3T3-L1 adipocyte の細胞内 HMGB1 protein は低下し、HMGB1 mRNA も低下した。このことから、TNF- 刺激による 3T3-L1 adipocyte からの HMGB1 の分泌は転写や翻訳の調節を介さない、刺激による active な分泌であると考えた。3T3-L1 preadipocyte では TNF- 刺激で細胞内 HMGB1 protein と mRNA の量に変化はなかった。

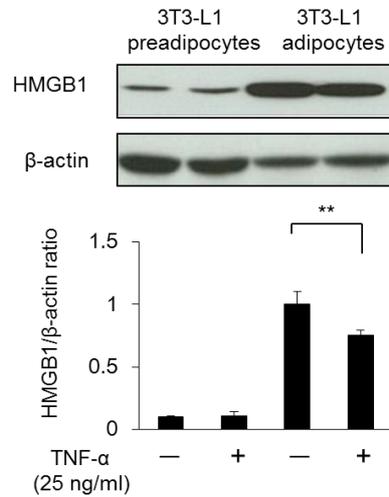
Dose-dependent に HMGB1 の分泌



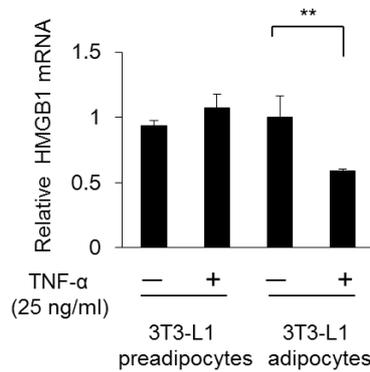
Time-dependent に HMGB1 の分泌



TNF- (25 ng/ml) 刺激で 3T3-L1 adipocyte の細胞内 HMGB1 protein は低下

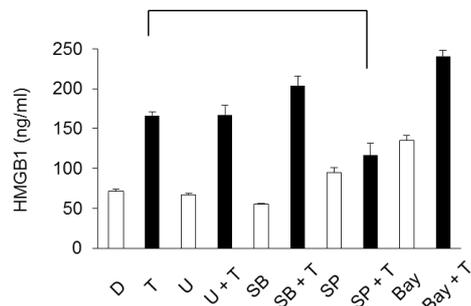


TNF- (25 ng/ml) 刺激で 3T3-L1 adipocyte の核内 HMGB1 mRNA は低下



(3) TNF- 刺激による 3T3-L1 adipocyte からの HMGB1 の分泌は JNK シグナルを介している (約 30%) ことを発見した。HMGB1 の分泌に NF-κB の関与は認められなかった。

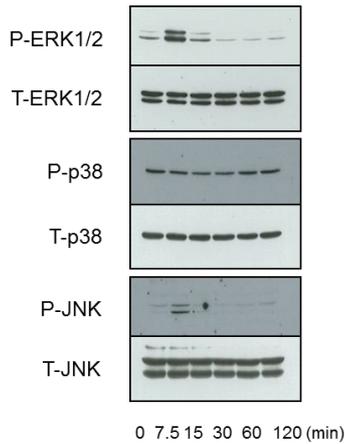
JNK 阻害剤 (SP600125) の pre-treat 群で HMGB1 の分泌が低下



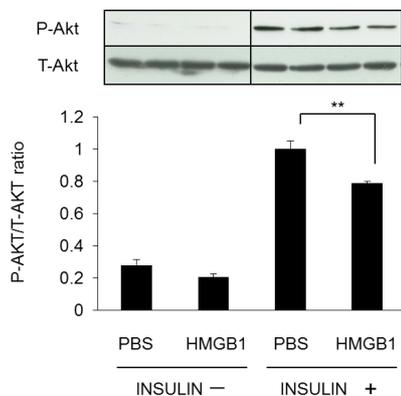
(4) HMGB1 は 3T3-L1 adipocyte に作用して MAP カイネース (ERK1/2, JNK) の活性化し、インスリンシグナルを減弱させた。このことが

ら脂肪細胞から分泌された HMGB1 は、脂肪組織において炎症の誘発とインスリン抵抗性を生じさせる pro-inflammatory なアディポサイトカインとして作用していると考えた。

HMGB1 は 3T3-L1 adipocyte に作用して 7.5 分で MAP カイネース (ERK1/2, JNK) を活性化する



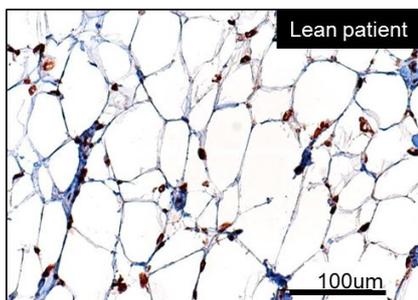
HMGB1 は 3T3-L1 adipocyte に作用してインスリンシグナルを減弱させた



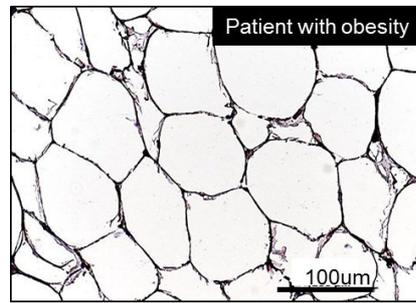
(5) 健常者 (lean) と比較して、肥満症 (patient with obesity) 患者の内臓脂肪組織の脂肪細胞の細胞質には HMGB1 が高度に発現していることが DAB 染色でも IF 染色でも確かめられた。

【DAB 染色】

健常者 (lean)

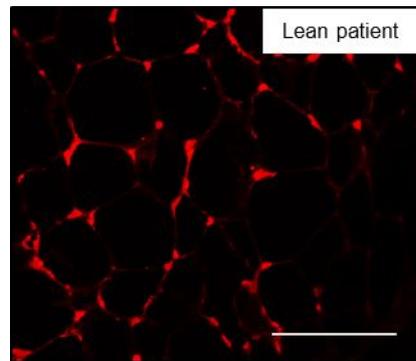


肥満症患者 (patient with obesity)

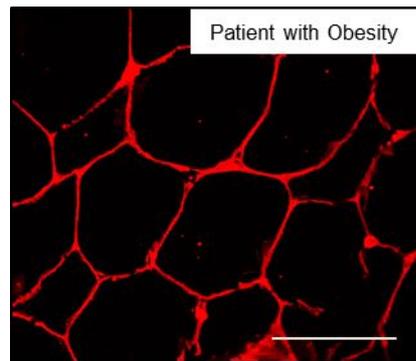


【Immunofluorescent 染色】

健常者 (lean)

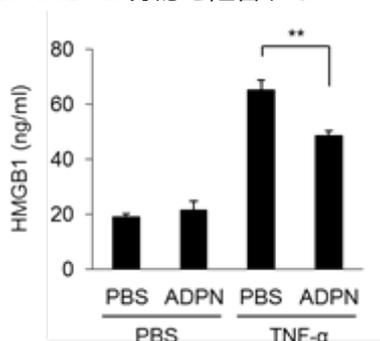


肥満症患者 (patient with obesity)

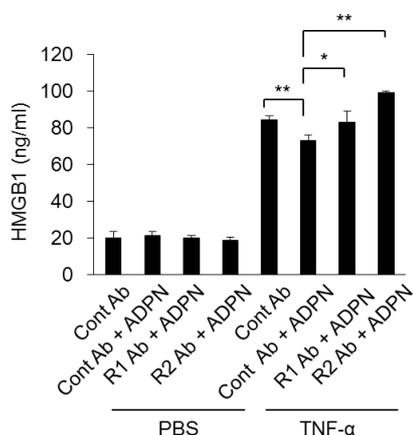


(6) アディポネクチンは 3T3-L1 adipocyte からの HMGB1 の分泌を阻害し抗炎症的に作用した。アディポネクチンによる HMGB1 の分泌阻害はアディポネクチン抗体の pre-treat によりキャンセルされた。アディポネクチンによる HMGB1 の分泌阻害は、一部は JNK シグナルの抑制を介して行われると考えられた。

アディポネクチン(ADPN)は3T3-L1 adipocyteからのHMGB1の分泌を阻害する



アディポネクチンによるHMGB1の分泌阻害はアディポネクチン抗体のpre-treatによりキャンセルされた



【結論及び考察】

以上から「HMGB1は肥満症患者の大型内臓脂肪細胞から分泌される、インスリン抵抗性やメタボリック症候群に関係する新規の炎症誘発性のアディポサイトカインである」と結論した。

3T3-L1 adipocyteや肥満症患者の内臓脂肪組織の脂肪細胞から分泌されたHMGB1は、脂肪組織の炎症を誘発しインスリンシグナルを減弱させ、インスリン抵抗性、2型糖尿病、動脈硬化、心血管疾患といった肥満に関連した炎症性疾患 (obesity-related inflammatory diseases)の病態に深く関係しているものと考えられる。さらに抗炎症作用のあるアディポネクチンは、HMGB1による内臓脂肪組織の炎症誘発作用から脂肪組織を保護する役割をしていると考察する。

以上の研究成果は、Obesity 2016にアクセプトされた(13-Apr-2016 現在 in press)。

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)

『HMGB1 is secreted by 3T3-L1 adipocytes

through JNK signaling and the secretion is partially inhibited by adiponectin』
Toshiaki Shimizu, Munekazu Yamakuchi, Kamal K Biswas, Bibek Aryal, Shingo Yamada, Teruto Hashiguchi and Ikuro Maruyama
Obesity 2016「IN PRESS」(査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

『HMGB1は大型脂肪細胞から分泌される炎症性のアディポサイトカインでありインスリン抵抗性を誘導する』清水利昭, 山口宗一, 竹之内和則, 丸山 征郎, 橋口照人

2015年10月 大阪大学コンベンションセンター(大阪府吹田市)第55回日本臨床化学学会年次学術集会(一般口演)

『HMGB1は炎症性のアディポサイトカインでインスリンシグナルを阻害する』清水利昭, 山口宗一, 竹之内和則, 橋口照人, 丸山 征郎

2014年11月 福岡国際会議場(福岡県福岡市)第61回日本臨床検査医学会学術集会(一般口演)

『アディポネクチンは新規炎症性アディポサイトカインHMGB1の分泌をJNKを介して阻害する』清水利昭, 竹之内和則, 山口宗一, 橋口照人

2014年3月 熊本市医師会館(熊本県熊本市)第59回日本臨床検査医学会九州地方会 第25回日本臨床化学学会九州支部総会(一般口演)

『New adipocytokine HMGB1 inhibits insulin signaling in adipocyte and adiponectin suppresses this effect』
Toshiaki Shimizu, Munekazu Yamakuchi, Shingo Yamada, Masanori Nakata, Teruto Hashiguchi, Ikuro Maruyama
2013 Oct. NY. USA Merinoff World Congress
2013:HMGB1(ポスター発表)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.kufm.kagoshima-u.ac.jp/fiel/d/advanced-therapeutics/f104/01.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 利昭 (SHIMIZU Toshiaki)
鹿児島大学・歯学域医学系・助教
研究者番号: 50468055

(2) 研究分担者

橋口 照人 (HASHIGUCHI Teruto)
鹿児島大学・歯学域医学系・教授
研究者番号: 70250917

(3) 研究分担者

竹之内 和則 (TAKENOUCHI Kazunori)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院
医員
研究者番号：30646758

(4) 研究分担者

大山 陽子(OYAMA Youko)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院
特任助教
研究者番号：20583470