

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 12 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461361

研究課題名(和文) p27によるマクロファージ増殖制御の糖尿病・動脈硬化における生理学的意義の解明

研究課題名(英文) Impacts of Local Macrophage Proliferation on Atherosclerotic Plaque Progression and Obesity-associated Adipose Tissue Inflammation.

研究代表者

瀬ノ口 隆文 (Senokuchi, Takafumi)

熊本大学・その他の研究科・助教

研究者番号：00530320

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)：耐糖能および動脈硬化に対する組織浸潤マクロファージ(M₁)増殖の生理学的意義を検討した。M₁特異的増殖抑制マウスを作成し、高脂肪食負荷、ob/obとの交配群において耐糖能を、ApoE欠損マウスとの交配群において動脈硬化を評価した。M₁増殖抑制により耐糖能およびインスリン抵抗性が改善し、脂肪組織における浸潤M₁の減少、炎症性サイトカイン発現の減少を認めた。また、動脈硬化病変形成の抑制と浸潤M₁の減少を認め、動脈硬化病変における炎症性サイトカイン発現も減少した。脂肪組織のインスリン抵抗性および動脈硬化発症・進展に局所M₁の増殖が関与することを個体レベルで証明した。

研究成果の概要(英文)：To verify the direct evidence of involvement of M₁ proliferation in atherosclerosis and adipose tissue inflammation, we have generated Tg mice whose M₁ proliferation is specifically suppressed by the macrophage-specific p27kip expression. The atherosclerotic plaque formation was significantly reduced by M₁ growth inhibition. M₁s were less accumulated and the necrotic core formation was significantly decreased in Tg mice. The HFD-fed Tg showed improved insulin sensitivity. The crown-like structure formations was significantly reduced in Tg along with decreased inflammatory cytokine expression in adipose tissue. The excess inflammatory responses in the atherosclerotic lesion and the adipose tissue were ameliorated by M₁ growth inhibition. The local M₁ proliferation could be the common pathophysiological feature in the progression of atherosclerosis and dietary-induced insulin resistance.

研究分野：動脈硬化、糖尿病

キーワード：マクロファージ増殖 動脈硬化 インスリン抵抗性

1. 研究開始当初の背景

我が国における糖尿病患者とその予備群の数は増加の一途を辿り、動脈硬化症を主体とした致死の血管合併症の急増が深刻な社会的問題となっている。糖尿病および動脈硬化の病態の解明はそれら血管合併症の発症抑制、新規治療法の開発につながる重要な研究課題であり、さらには国民の生活の質の向上への貢献が期待される。

動脈硬化の発症・進展に、血管内皮下に浸潤したマクロファージが重要な役割を果たす。一方で、インスリン抵抗性、糖尿病発症の病態にも脂肪組織へ浸潤したマクロファージの役割が注目され、動脈硬化および肥満・糖尿病が組織浸潤マクロファージの活性化を共通の病態とする慢性炎症性疾患であるとの認識が広がっている。脂肪組織においてもマクロファージが増殖していることが報告され、脂肪組織のマクロファージがインスリン抵抗性へ関与する可能性が注目されている。

2. 研究の目的

組織浸潤マクロファージの増殖を制御する因子として細胞周期制御分子 p27kip に着目し、糖尿病、動脈硬化の両疾患の発症・進展における p27kip の発現、機能の病態生理学的意義を明らかにすることを目的とする。動脈硬化病変ばかりでなく、肥満・糖尿病の病態を慢性炎症性疾患としてとらえ、組織浸潤マクロファージ増殖の生理学的意義を明らかにすることで、動脈硬化、肥満・糖尿病の共通の機序を提唱する。また、細胞周期制御分子 p27kip の動脈硬化、肥満・糖尿病の病態における役割を明らかにし、p27kip 制御による肥満・糖尿病の発症抑制、および合併症としての動脈硬化発症抑制を目標とした治療法の開発につながる可能性を示す。

3. 研究の方法

スカベンジャー受容体遺伝子プロモーター制御下にサイクリン依存性キナーゼ阻害因子 p27kip を発現するマクロファージ特異的増殖抑制マウス (mac-p27Tg) を作成した。mac-p27Tg への高脂肪食負荷、及び mac-p27Tg と ob/ob マウスとの交配によって得られた ob/ob × mac-p27Tg において、耐糖能に対するマクロファージ増殖の影響を検討した。精巣上体周囲脂肪組織で、組織学的変化及びマクロファージ増殖を免疫染色法で評価した。血清中の炎症性サイトカイン濃度を ELISA 法にて測定した。

mac-p27Tg と動脈硬化モデル ApoE^{-/-}マウスの交配によって得られた ApoE^{-/-} × mac-p27Tg において、動脈硬化病変の発症・進展に対するマクロファージ増殖の影響を検討した。レーザーマイクロダイセクションで回収した動脈硬化病変組織における CD68、炎症性サイトカインの mRNA 発現を検討した。

4. 研究成果

ipGTT において、HFD mac-p27Tg 群では、対照群と比し負荷後 60 分、90 分、120 分の血糖値が有意に低く、負荷前後のインスリン値には有意差を認めなかった。一方 ob/ob × mac-p27Tg では、ob/ob 群と比し負荷後 30 分、60 分の血糖値が有意に低く、負荷前後のインスリン値に有意差を認めなかった。ipITT では、HFD mac-p27Tg 群、ob/ob × mac-p27Tg 群共に対照群に比し有意なインスリン抵抗性の改善を認めた (図 1)。

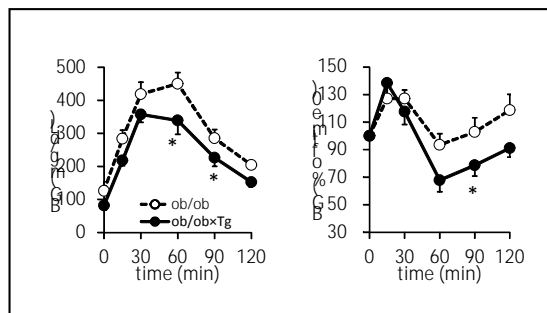


図 1: マクロファージ増殖抑制によるインスリン抵抗性の改善

HFD mac-p27Tg 群での脂肪組織は、浸潤マクロファージ及び Crown-like structure 形成の減少を認め、炎症性サイトカインの mRNA 発現は TNF- α の有意な低値、IL-6 の減少傾向を認めた。血清中の TNF- α も mac-p27Tg 群で有意に低値であった。

ApoE $^{-/-}$ × mac-p27Tg における大動脈弁輪部切片の平均プラーク面積は、ApoE $^{-/-}$ 群と比し有意に減少していた (図 2)。

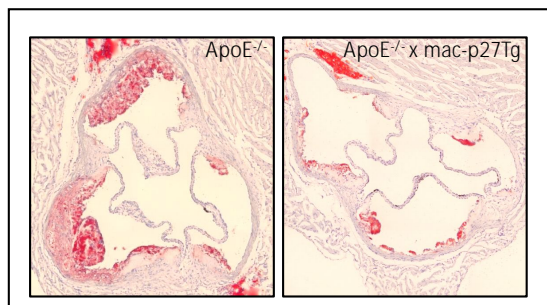


図 2: マクロファージ増殖抑制によるプラーク形成の抑制

動脈硬化病変部における Iba-1、Ki67 陽性の増殖マクロファージは ApoE $^{-/-}$ × mac-p27Tg 群で減少し、動脈硬化病変部の選択的な mRNA 発現の検討では CD68 の減少、IL-6 の有意な減少、MCP-1、IL-1

の減少傾向を認め、マクロファージ増殖制御による動脈硬化病変部の炎症の抑制効果が示唆された。

【結論】マクロファージ特異的増殖抑制マウスにて、脂肪浸潤マクロファージ数の減少と脂肪組織の炎症性サイトカインの減少によるインスリン抵抗性の改善、動脈硬化病変部のマクロファージ減少と炎症性サイトカイン抑制、プラーク増殖抑制を認めた。以上のことからマクロファージ増殖が血管内皮下において動脈硬化の進展に関与するのみならず、脂肪組織においてインスリン抵抗性の発現に重要な役割を果たすことが示唆された。糖尿病、動脈硬化症といった慢性炎症性疾患に対しマクロファージ増殖が関与することを世界で初めて直性的に証明し得たと共に、マクロファージ増

殖制御がこれら疾患の治療法の開発に繋がる可能性を示した。

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 13 件)

1. Fukuda K, Matsumura T, Senokuchi T, Ishii N, Kinoshita H, Yamada S, Murakami S, Nakao S, Motoshima H, Kondo T, Kukidome D, Kawasaki S, Kawada T, Nishikawa T, Araki E: Statins mediate anti-atherosclerotic action in smooth muscle cells by peroxisome proliferator-activated receptor-activation. *Biochem Biophys Res Commun* 457:23-30, 2015. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.12.063
2. Yoshizawa T, Karim MF, Sato Y, Senokuchi T, Miyata K, Fukuda T, Go C, Tasaki M, Uchimura K, Kadomatsu T, Tian Z, Smolka C, Sawa T, Takeya M, Tomizawa K, Ando Y, Araki E, Akaike T, Braun T, Oike Y, Bober E, Yamagata K: SIRT7 controls hepatic lipid metabolism by regulating the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell Metab* 19(4):712-21, 2014. doi: 10.1016/j.cmet.2014.03.006
3. Uchimura K, Hayata M, Mizumoto T, Miyasato Y, Kakizoe Y, Morinaga J, Onoue T, Yamazoe R, Ueda M, Adachi M, Miyoshi T, Shiraishi N, Ogawa W, Fukuda K, Kondo T, Matsumura T, Araki E, Tomita K, Kitamura K: The serine protease prostaticin regulates hepatic insulin sensitivity by modulating TLR4 signalling. *Nat Commun* 5:3428, 2014. doi: 10.1038/ncomms4428
4. Matsumura T, Taketa K, Motoshima H, Senokuchi T, Ishii N, Kinoshita H, Fukuda K, Yamada S, Kukidome D, Kondo T, Hisada A, Katoh T, Shimoda S, Nishikawa T, Araki E. Association between circulating leukocyte subtype counts and carotid intima-media thickness in Japanese subjects with type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 12:177, 2013. doi: 10.1186/1475-2840-12-177
5. 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* 431:124-130, 2013

doi: 10.1016/j.bbrc.2013.01.014

6. 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 converting enzyme activity in visceral adipose tissue of obese mice. *Biochem Biophys Res Commun* 430:1189-1194, 2013
doi: 10.1016/j.bbrc.2012.12.086

〔学会発表〕(計 49 件)

1. 瀬ノ口隆文, 山田沙梨恵, 松村剛, 本島寛之, 石井規夫, 福田一起, 村上彩子, 守田雄太郎, 西川武志, 荒木栄一: インスリン抵抗性および動脈硬化症発症・進展におけるマクロファージ増殖の意義の検討. 第 53 回日本糖尿病学会九州地方会, 2015/11/27-2015/11/28, 福岡, 口演
2. Yamada S, Senokuchi T, Matsumura T, Nishikawa T, Araki E: Impacts of Local Macrophage Proliferation on Atherosclerotic Plaque Progression and Obesity-Associated Adipose Tissue Inflammation. 75th American Diabetes Association's Scientific Sessions, 2015/6/5-6/10, Boston, USA. (Oral presentation)
3. 瀬ノ口隆文, 山田沙梨恵, 松村剛, 本島寛之, 西川武志, 荒木栄一: インスリン抵抗性、動脈硬化の発症・進展における組織浸潤マクロファージ増殖の生理学的意義の検討. 第 26 回分子糖尿病学シンポジウム, 2014/12/6, 高知, 口演
4. Senokuchi T, Matsumura T, Fukuda K, Ishii N, Kinoshita H, Yamada S, Murakami S, Kondo T, Motoshima H, Nishikawa T, Araki E: Statin-mediated PPAR activation in adipocytes may improve glucose tolerance in high fat-fed mice. The 6th AASD Scientific Meeting, 2014/11/21-2014/11/24, SUNTEC, Singapore, Poster
5. Senokuchi T, Yamada S, Negita E, Matsumura T, Nishikawa T, Araki E: Inhibition of local macrophage growth ameliorates focal inflammation in the plaque and suppresses atherosclerosis in ApoE-deficient mice. The 9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress, 2014/9/12-2014/9/13, Kyoto, Japan, Poster
6. 瀬ノ口隆文: 糖尿病における動脈硬化

症進展の体質医学的研究: 組織浸潤マクロファージ増殖の意義の検討. 第 64 回日本体質医学会, 2014/9/6-2014/9/7, 大阪, 研究奨励賞受賞講演

7. 山田沙梨恵, 瀬ノ口隆文, 松村剛, 本島寛之, 石井規夫, 木下博之, 福田一起, 西川武志, 岸川秀樹, 荒木栄一: 脂肪浸潤マクロファージ増殖の耐糖能に対する影響. 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2014/5/22-2014/5/24, 大阪, 口演
8. 瀬ノ口隆文, 山田沙梨恵, 松村剛, 西川武志, 荒木栄一: マクロファージインスリン抵抗性による動脈硬化進展機序の検討. 第 28 回日本糖尿病合併症学会, 2013/9/13-2013/9/14, 旭川, ワークショップ
9. 瀬ノ口隆文, 山田沙梨恵, 松村剛, 西川武志, 荒木栄一: インスリン抵抗性マクロファージの FoxO 活性化を介したアポトーシス誘導による動脈硬化進展機序の解明. 第 45 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 2013/7/18-2013/7/19, 東京, ポスター

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
<http://www2.kuh.kumamoto-u.ac.jp/met/>

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
糖尿病分子病態解析学・特任助教
研究者番号: 00530320

(2) 研究分担者

松村 剛 (MATSUMURA, Takeshi)
熊本大学医学部附属病院・講師

研究者番号： 20398192

(3)連携研究者
()

研究者番号：