

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860750

研究課題名(和文)マクロファージ炎症抑制機構の解明とその制御-糖尿病治療にむけて

研究課題名(英文)Role of macrophage inflammation during the development of diabetes

研究代表者

楯谷 三四郎(Tateya, Sanshiro)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：70639260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病・肥満に至る病態の全容は明らかにされておらず、治療薬の開発のためにはそのメカニズムの解明が必須である。血管内皮機能が糖尿病発症初期から障害されていることは知られていたが、血管機能の障害が糖尿病発症や増悪の要因になるかどうかは知られていなかった。我々は血管内皮細胞由来の一酸化窒素(NO)が近隣の実質細胞(肝細胞や脂肪細胞)の健全なインスリンシグナル伝達に必須であることを明らかとした。NO流入に伴う細胞内cGMP濃度の上昇、PKGの活性化、下流分子VASPリン酸化が肥満に伴う慢性炎症の抑制やインスリン抵抗性の改善に重要であり、将来的な治療ターゲットになると考えている。

研究成果の概要(英文)：Entire mechanisms during the development of diabetes and obesity have not revealed yet. Endothelial function has been impaired at the beginning of diabetes, however, whether or not, this impairment causes or worsens diabetes is still unknown. We found that endothelial-derived nitric oxide (NO) is indispensable for the intact insulin signaling in the neighboring cells such as hepatocytes or adipocytes. NO/cGMP/PKG/VASP signaling contributes to the suppression of obesity-induced inflammation and insulin resistance. This findings, we believe, could be a promising target for the treatment of diabetes.

研究分野：糖尿病代謝

キーワード：インスリン抵抗性 慢性炎症 一酸化窒素 VASP

1. 研究開始当初の背景

我々はマクロファージの浸潤を特徴とする慢性炎症が糖尿病・肥満状態の脂肪組織で見られ、それがインスリン抵抗性発症の基盤となることを世界に先駆けて発表してきた。また MCP1(CCL2)の特異的受容体である CCR2 に対する新規拮抗薬、TEI-K03134 を新規に開発・合成し、糖尿病モデルマウスに実際に有効であることを示してきた。

2. 研究の目的

糖尿病・肥満状態では脂肪組織や肝臓といったインスリン感受性臓器で免疫細胞の活性化を伴う慢性炎症を呈していることが2006年以降明らかとなり、炎症の抑制が治療薬開発のターゲットになりうると考えられるようになったが、未だ有望な薬剤は開発されていない。我々が明らかとした CCL2/CCR2 パスウェイに加え、一酸化窒素(NO)シグナルが抗炎症やインスリン抵抗性の改善にどのように関わっているかを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

野生型 C57BL6 マウスや VASP 欠損マウスを通常食あるいは高脂肪食で飼育し、肝臓、脂肪組織、骨格筋の組織を採取する。インスリン投与後のインスリンシグナルを Western blot で検証する。骨髄移植は免疫細胞の放射線感受性が他の細胞に比べ極端に高いことを利用し、マクロファージを初めとする免疫細胞特異的に遺伝子改変マウスを作製する手法として確立されている。本研究でも骨髄移植を行い、骨髄における NO シグナルの意義の解明をめざす。970rads の放射線を照射した野生型マウスに VASP 欠損マウス由来の骨髄由来マクロファージ (BMDM) を移植し、骨髄特異的 VASP 欠損マウスを作成する。

4. 研究成果

C57BL6 マウスを高脂肪食 (HFD) で飼育すると8週後に肝臓慢性炎症と肝インスリン抵抗性が出現したが、それ以前の負荷4週後の時点で肝臓の eNOS-p (Ser1177) と一酸化窒素 (NO) 含量が低下していた。RAW マクロファージでは NO 供与体 (DETA-NO) や cGMP アナログ (8Br-cGMP) により LPS 依存性 TNF α 、IL6、CD11c mRNA の増加 (M1 化) が抑制され、同刺激は AML12 肝細胞でもパルミチン酸依存性炎症 (I κ B α -p) と肝インスリン抵抗性発症を抑制した。eNOS 由来 NO の欠損した eNOS $^{-/-}$ マウスは普通食飼育にも関わらず Kupffer 細胞の M1 化と肝臓慢性炎症、肝インスリン抵抗性が出現したが、C57BL6 マウスに PDE5 阻害剤、sildenafil を投与し cGMP 濃度を増加させると HFD に伴う Kupffer 細胞の M1 化と肝インスリン抵抗性が改善した。NO/cGMP の下流分子 VASP を RAW マクロファージ、AML12 肝細胞で各々過剰発現させると NO/cGMP と同様に抗炎症

インスリン抵抗性改善作用がみられ VASP $^{-/-}$ 腹腔マクロファージ、VASP $^{-/-}$ 初代肝細胞は非刺激下にも関わらず炎症とインスリン抵抗性がそれぞれ誘導されていた。Kupffer 細胞の M1 化と肝インスリン抵抗性は普通食飼育下の VASP $^{-/-}$ マウスならびに骨髄移植にて樹立した骨髄特異的 VASP $^{-/-}$ マウスでも認められた。DETA-NO や 8Br-cGMP による抗炎症作用は VASP $^{-/-}$ 腹腔マクロファージで消失し、同刺激による抗炎症作用ならびにインスリン抵抗性改善作用は VASP $^{-/-}$ 初代肝細胞でも消失しており、この作用が VASP 依存的事実が示唆された。

VASP 欠損に伴う慢性炎症とインスリン抵抗性の誘導は肝臓のみならず脂肪組織でも認められた。また骨髄特異的 VASP 欠損マウスでは普通食飼育にもかかわらず肝臓、脂肪組織マクロファージは TNF α の上昇など慢性炎症の状態を呈し、各々の臓器でインスリン抵抗性 (インスリン依存性 p-Akt の低下) が認められた。IL-4 添加に伴う BMDM の p-STAT6 は VASP 欠損 BMDM では抑制されており、M2 シグナルが抑制される結果、慢性炎症が惹起されるものと考えられた。

Figure 1

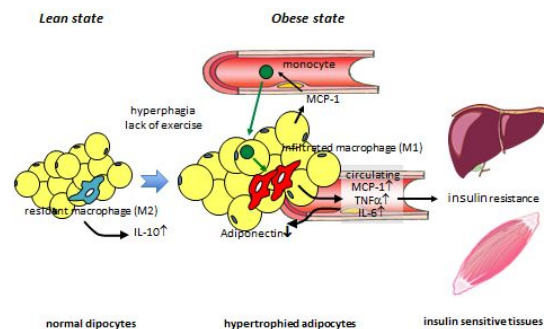
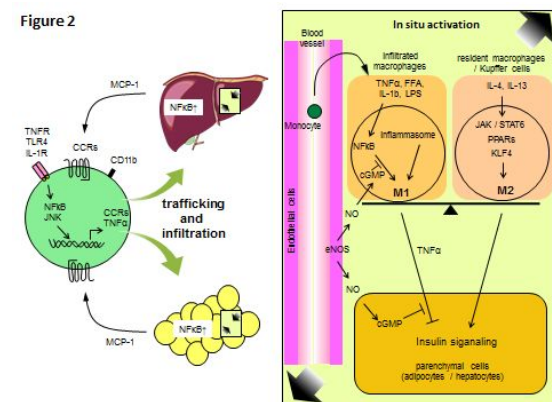


Figure 2



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 4 件)

1. "M2 Macrophage Polarization Mediates Anti-inflammatory Effects of Endothelial Nitric Oxide Signaling." Lee, W. J., S. Tateya, A. M. Cheng, N. Rizzo-DeLeon, N. F. Wang, P. Handa, C. L. Wilson, A. W. Clowes, I. R. Sweet, K. Bomsztyk, M. W. Schwartz and F. Kim, Diabetes. in press. 2015 査読有
2. "Vasodilator-stimulated phosphoprotein protects against vascular inflammation and insulin resistance." Cheng, A. M., N. Rizzo-DeLeon, C. L. Wilson, W. J. Lee, S. Tateya, A. W. Clowes, M. W. Schwartz and F. Kim, Am J Physiol Endocrinol Metab **307**(7): E571-579. 2014 査読有
3. "Recent advances in obesity-induced inflammation and insulin resistance." Tateya, S., F. Kim and Y. Tamori, Front Endocrinol (Lausanne) **4**: 93. 2014 査読有
4. "VASP increases hepatic fatty acid oxidation by activating AMPK in mice." Tateya, S., N. Rizzo-De Leon, P. Handa, A. M. Cheng, V. Morgan-Stevenson, K. Ogimoto, J. E. Kanter, K. E. Bornfeldt, G. Daum, A. W. Clowes, A. Chait and F. Kim, Diabetes **62**(6): 1913-1922. 2013 査読有
5. "Apolipoprotein A-I Attenuates Palmitate-Mediated NF-κB Activation by Reducing Toll-Like Receptor-4 Recruitment into Lipid Rafts." Cheng, A. M., P. Handa, S. Tateya, J. Schwartz, C. Tang, P. Mitra, J. F. Oram, A. Chait and F. Kim, PLoS One **7**(3): e33917. 2012 査読有
6. "Endothelial NO/cGMP/VASP signaling attenuates Kupffer cell activation and hepatic insulin resistance induced by high-fat feeding." Tateya, S., N. O. Rizzo, P. Handa, A. M. Cheng, V. Morgan-Stevenson, G. Daum, A. W. Clowes, G. J. Morton, M. W. Schwartz and F. Kim, Diabetes **60**(11): 2792-2801. 2011 査読有
7. "Reduced vascular nitric oxide-cGMP signaling contributes to adipose tissue inflammation during high-fat feeding." Handa, P., S. Tateya, N. O. Rizzo, A. M. Cheng, V. Morgan-Stevenson, C. Y. Han, A. W. Clowes, G. Daum, K. D. O'Brien, M. W. Schwartz, A. Chait and F. Kim, Arterioscler Thromb Vasc Biol **31**(12): 2827-2835. 2011 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 楯谷三四郎 血管内皮細胞由来 NO シグナルは高脂肪食に伴う Kupffer 細胞の活性化と肝インスリン抵抗性発症を抑制する。第 56 回日本糖尿病学会年次集会 2013.5.17 (熊本県)
2. 楯谷三四郎 VASP は AMPK 活性化を介し、肝臓脂質酸化を促進させる 第 57 回日本糖尿病学会年次集会 2014.5.23 (大阪府)

〔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 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

楯谷 三四郎 (Tateya Sanshiro)
神戸大学大学院医学研究科 医学研究員
研究者番号：70639260

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

田守 義和 (Tamori Yoshikazu)

神戸大学大学院医学研究科 客員教授

研究者番号： 90379397