

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350122

研究課題名(和文)肥満者の炎症性腸疾患を寛解させる脂肪酸の同定と便検査法の開発

研究課題名(英文) Effects of fatty acids on the obese patients suffered from inflammatory bowel disease and development of examination of feces

研究代表者

徳田 信子 (TOKUDA, Nobuko)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70227578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らはn-3系多量不飽和脂肪酸に親和性が高いFABP7が免疫系の線維芽細胞に特異的に発現し、腸炎の際には同様のFABP7陽性線維芽細胞の増殖が見られることを報告してきた。そこで、マウスの腋窩にHSV-1を感染させ、腋窩リンパ節内で増加した線維芽細胞を解析した。FABP7のmRNAは、感染後に有意に増加していた一方で、FABP7欠損マウスと野生型マウスについて、感染後の線維芽細胞数には有意の差があるとは言えなかった。肥満マウスの脾臓を検討した結果と併せ、炎症や肥満の際には複数のキャリアを介して脂肪酸の要求性が変化していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Fibroblastic reticular cells (FRCs) produce collagen-rich reticular fibers in immune organs. We have shown FRCs express fatty acid binding protein 7 (FABP7), a chaperon which has a high affinity to n-3 polyunsaturated fatty acids. Similar fibroblasts were seen in inflamed intestine. Mice were infected on the skin of the flank with simplex virus type 1 (HSV-1) and the responses in the primary draining brachial LN (bLN) were analyzed. After HSV infection, expansion and proliferation of bLN FRCs increased and Fabp7 genes were highly upregulated in FRCs. Expression of FABP7 mRNA in FRCs after HSV infection were significantly upregulated. However, any deficiency was not defined and expansion of FRCs was unaffected compared with wild-type mice. In diet-induced fat mice, FABP7 might affect the increasing fibroblasts. FABP7 and some chaperons may be involved in fibroblast homeostasis, possibly by modulating lipid metabolism in fibroblasts at the inflammation including high fat state.

研究分野：医学(免疫学・解剖学・栄養学)

キーワード：脂肪酸 炎症 肥満 リンパ節 FABP

1. 研究開始当初の背景

近年、炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎、クローン病）の罹患者が急増している。脂肪酸を中心とした摂取栄養の欧米化が増加の誘因とされ、特に肥満者は罹患しやすいと考えられている。生命と社会生活を脅かす疾患でありながら、機序の詳細は未だ不明であり、早期発見のための検査方法も確立されていない。潰瘍性大腸炎の治療として、魚油を中心とした n-3 系脂肪酸の摂取が有効であるという報告があるが、データは不十分でありその有効性は定かではなくメカニズムも不明である。申請者らは、患者の脂肪酸摂取が、腸に存在する支持細胞の脂質やタンパク質を変化させ、細胞内のシグナル伝達・転写を制御し炎症の発症を制御するという仮説に基づき、本研究を行った（図 1）。

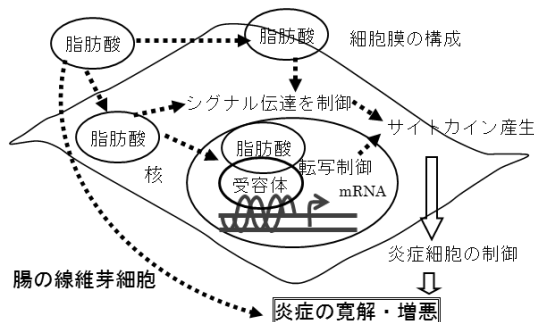


図1 線維芽細胞が腸の炎症を制御する機序(仮説)

2. 研究の目的

(1) FABP7 (fatty acid binding protein 7) が炎症時および肥満状態での線維芽細胞に与える影響を明らかにする：

水に不溶な多寡不飽和脂肪酸が細胞内で機能を発現するためには、脂肪酸に結合するキャリアが必要である。申請者らはすでに n-3 系多寡不飽和脂肪酸に親和性が高いキャリアタンパク質 FABP7 が免疫系の線維芽細胞に特異的に発現することを報告してきた (Tokuda et al., 2010)。FABP は多価不飽和脂肪酸を可溶性化する細胞内キャリアであり、リガンドである脂肪酸の細胞内動態を制御し、脂質代謝の恒常性維持やシグナル伝達に関与すると考えられている。また、脂肪酸を細胞質から核に輸送し、核内受容体を活性化することによって遺伝子を制御している（雑誌論文 4）。

そこで、炎症時の線維芽細胞における FABP7 の発現の増加の有無とその欠損による炎症反応への影響、および FABP7 の有無が肥満マウスの免疫系に与える影響について、FABP7 欠損マウスを用いて検討した。

(2) 脂肪酸関連タンパク質が糞便の細菌叢に与える影響の解析：

脂肪酸摂取が糞便の細菌叢の構成や割合を変化させ、それが肥満の進行や炎症の増悪に関与する可能性が指摘されている。そこで、各種脂肪酸関連タンパク質を欠損したマウ

スについて、その細菌叢を野生型と比較した。

3. 研究の方法

動物実験において、遺伝子改変動物は C57BL/6 をバックグラウンドとしたものを用いた。野生型として、同じ条件下で飼育した C57BL/6 を用いた。

(1) FABP7 (fatty acid binding protein 7) が炎症時および肥満状態での線維芽細胞に与える影響

FABP7 が炎症時の線維芽細胞に与える影響：

申請者らは、腸炎によって新たに増加する線維芽細胞に、リンパ節の T 細胞領域線維芽細胞 fibroblastic reticular cells (FRCs) と同様、FABP7 が発現することを明らかにしてきた。そこで、リンパ節の局所感染モデルを用い、炎症時の線維芽細胞に FABP7 の欠損が与える影響を検討した。マウスの腋窩に、経皮的に herpes simplex virus type 1 (HSV-1) を感染させ、経時的に腋窩リンパ節を採取し、FRC の数を計測した。また、飲水によって取り込ませた BrdU によって細胞の増殖の割合を明らかにした。増殖への FABP7 の関与を調べるため、FRC 中の FABP7 の変化を mRNA の相対量によって示した。そして、FABP7 欠損マウスと野生型について、感染後の FRC の数およびリンパ節細胞の増加数を比較した。

FABP7 (fatty acid binding protein 7) が肥満状態での線維芽細胞に与える影響：

7 週令の野生型および FABP7 欠損マウスに Normal diet (ND: 10% fat content) および high fat diet (HFD: 60% fat content) を 12 週間与えて飼育した。マウスの脾臓を採取し、組織像や白脾髄の大きさ、B 細胞と T 細胞の比率を相互に比較した。

(2) 脂肪酸関連タンパク質が糞便の細菌叢に与える影響の解析：

各種脂肪酸関連タンパク質を欠損したマウスと野生型マウスについて、24 時間糞便を採取し、次世代シーケンサーを用いて細菌叢の内訳と割合を解析し、相互に比較した。

尚、動物実験については、山口大学及び共同研究を行っている東北大学並びにメルボルン大学で許可を得た上で、動物福祉に十分な配慮をして実施した。

4. 研究成果

(1) FABP7 (fatty acid binding protein 7) が炎症時および肥満状態での線維芽細胞に与える影響

FABP7 が炎症時の線維芽細胞に与える影響

マウスの腋窩に、経皮的に HSV-1 を感染させ、経時的に腋窩リンパ節を採取した。比較対象として鼠径リンパ節を採取した。感染後、腋窩リンパ節は局所的に腫大した。FRC の増加は最初緩徐であったが、感染日以降に急増し、5 日以降は、鼠径リンパ節と比較して有意に増加していた（図 2A）。飲水によって取

り込ませた BrdU を用いて FRC の細胞増殖を腋窩リンパ節と鼠径リンパ節で比較したところ、0-11 日で有意な増殖の増加がみられた (図 2B)。

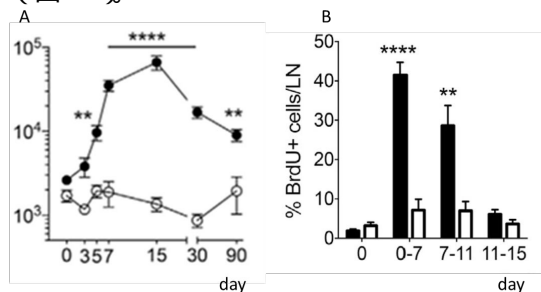


図 2 HSV-1 感染後の FRC の増加と増殖
黒で腋窩リンパ節、白で鼠径リンパ節の値を示す。A : 経時的な FRC の数。B : FRC の中の、BrdU 陽性細胞の割合の経時的な変化。
Error bars: mean ± SEM. **p < 0.01, ****p < 0.0001.

また、FRC 中の FABP7 の mRNA は、感染 6 日で有意に増加していた (図 3A)。一方で、FABP7 欠損マウスと野生型について、感染後の FRC の数およびリンパ節内の細胞の増加数については、有意の差があるとは言えなかった (図 3B)。

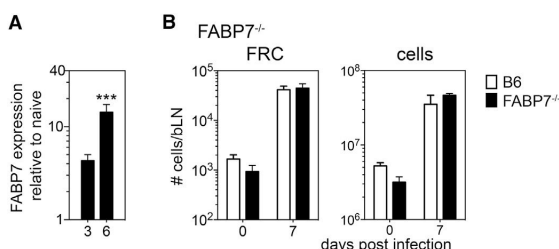


図 3 HSV-1 感染後の FABP7 発現量および FABP7 の有無による細胞数の違い

A : 感染後 3 および 6 日の FRC における FABP7 の相対量。B : FABP7 欠損マウスと野生型について、感染後 7 日の FRC およびその他の細胞数の比較。Error bars: mean ± SEM. ***p < 0.001.

これらの結果から、感染による線維芽細胞の増殖に FABP7 は寄与しているが、その欠損は増殖に影響を及ぼさないことが明らかにされた。よって、n-3 系脂肪酸などの脂肪酸代謝は炎症による線維芽細胞の増加に重要な役割を担うが、キャリアとなるものは複数存在し、1 つが欠損しても代償され得ることが明らかになった。

(なお、図 2 と 3 は、雑誌論文 1 の Cell Rep 18, 406-418, 2017. に掲載されたものを一部改変して示した。)

FABP7 (fatty acid binding protein 7) が肥満状態での線維芽細胞に与える影響 :

野生型および FABP7 欠損マウスは、双方ともに高脂肪食で肥満した。脾臓の組織像に大きな変化はなかったが、白脾髄の大きさ、B 細胞と T 細胞の比率などに、肥満の影響が見られた。この結果は 7th International Workshop of Kyoto T Cell Conference で発表した。結果の詳細については論文投稿準備中である。

(2) 脂肪酸関連タンパク質が糞便の細菌叢に与える影響の解析 :

各種脂肪酸関連タンパク質を欠損したマウスと野生型マウスについて、糞便を採取し、細菌叢の内訳と比率を比較した。一部の遺伝子改変マウスで、野生型と細菌叢の比率の違いが見られた。この結果については、糞便量などとも合わせ解析を継続中である。

(3) その他

マウスの炎症モデルを用いて、FABP7 が、急性肝障害や線維化に関与していることを明らかにした (雑誌論文 23、他)。また、研究協力者とともに、感染症について、ELISA システムを使った検査システム構築のための基礎実験を行った (雑誌論文 2、5)。

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 30 件)

- Gregory JL, Tokuda N, Owada Y. (13 名中 8, 9 番目) Infection programs sustained lymphoid stromal cell responses and shapes lymph node remodeling upon secondary challenge. Cell Rep 18, 406-418, 2017. 査読有
DOI:10.1016/j.celrep.2016.12.038.
- Tsuneoka H, Tokuda N. (7 名中 4 番目) The utility of a country-specific Bartonella henselae antigen in an IgM-indirect fluorescent antibody assay for the improved diagnosis of cat scratch disease. Diagn Microbiol Infect Dis, 87, 22-24, 2016. 査読有
DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.10.015.
- Islam A, Yamamoto Y, Owada Y, Tokuda N. (10 名中 3, 9, 10 番目) Omega-3 fatty acid transport through the placenta. Asian J Med Biol Res 2, 1-8, 2016. 査読有
DOI: http://dx.doi.org/10.3329/ajmbr.v2i1.27561.
- 徳田信子 免疫系支持細胞の脂肪酸による制御機構 山口医学 65, 23-29, 2016 査読有
- Otsuyama K, Tokuda N. (7 名中 5 番目) Development of a highly specific IgM-ELISA for Bartonella henselae using refined N-lauroyl-sarcosine-insoluble proteins for the serodiagnosis of cat scratch disease. J Clin Microbiol, 54, 1058-1064, 2016. 査読有
DOI: 10.1128/JCM.03009-15.
- Su X, Owada Y. (16 名中 13 番目) Characterization of fatty acid binding protein 7 (FABP7) in the murine retina. Invest Ophthalmol

- Vis Sci 57, 3397-3408, 2016. 査読有
DOI: 10.1167/iovs.15-18542.
7. Kida H, Yamamoto Y, Owada Y. (7 名中 4, 5 番目) Motor training promotes both synaptic and intrinsic plasticity of layer II/III pyramidal neurons in the primary motor cortex. *Cereb Cortex* 26, 3494-3507, 2016. 査読有
DOI: 10.1093/cercor/bhw134.
8. Yasumoto Y, Yamamoto Y, Owada Y. (11 名中 6, 11 番目) Inhibition of fatty acid synthase decreases expression of stemness markers in glioma stem cells. *Plos One* 11, e0147717, 2016. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0147717.
9. Ebrahimi M, Yamamoto Y, Owada Y. (13 名中 2, 13 番目) Astrocyte- expressed Fabp7 regulates dendritic morphology and excitatory synaptic function of cortical neurons. *Glia* 64, 48-62, 2016. 査読有
DOI: 10.1002/glia.22902.
10. Fujisawa Y, Owada Y. (11 名中 8 番目) Modulation of anti-cancer drug sensitivity through the regulation of mitochondrial activity by adenylate kinase 4. *J Exp Clin Cancer Res* 35, 48, 2016. 査読有
DOI: 10.1186/s13046-016-0322-2.
11. Tokuda K, Tokuda N. (10 名中 5 番目) Up-regulation of DRP-3 long isoform during the induction of neural progenitor cells by glutamate treatment in the ex vivo rat retina. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 463, 593-599, 2015. 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.05.102.
12. Maekawa M, Owada Y. (22 名中 19 番目) Investigation of the fatty acid transporter-encoding genes SLC27A3 and SLC27A4 in autism. *Sci Rep* 5, 16239, 2015. 査読有
DOI: 10.1038/srep16239.
13. Pan Y, Owada Y, Yamamoto Y. (6 名中 3, 4 番目) Fatty acid-binding protein 5 facilitates the blood-brain barrier transport of docosahexaenoic acid. *Mol Pharm* 12, 4375-4385, 2015. 査読有
DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00580.
14. Kagawa Y, Yamamoto Y, Owada Y. (17 名中 7, 17 番目) Fatty acid-binding protein 7 regulates function of caveolae in astrocytes through expression of caveolin-1. *Glia* 63, 780-794, 2015. 査読有
DOI: 10.1002/glia.22784.
15. Kaczocha M, Owada Y. (10 名中 9 番目) Fatty acid binding protein deletion suppresses inflammatory pain through endocannabinoid/N-acylethanolamine-dependent mechanisms. *Mol Pain* 11, 52-58, 2015. 査読有
DOI: 10.1186/s12990-015-0056-8.
16. Tokiwa T, Owada Y. (10 名中 8 番目) The palm-sized cryoprobe system based on refrigerant expansion and boiling and its application to an animal model of epilepsy. *IEEE Trans Biomed Eng* 62, 1949-1958, 2015. 査読有
DOI: 10.1109/TBME.2015.2407692.
17. Pakkarato S, Owada Y. (9 名中 4 番目) Immunohistochemical analysis of sustentacular cells in the adrenal medulla, carotid body and sympathetic ganglion of mice using an antibody against brain-type fatty acid binding protein (B-FABP). *J Anat* 226, 348-353, 2015. 査読有
DOI: 10.1111/joa.12285.
18. Shibue K, Owada Y. (14 名中 12 番目) Fatty acid-binding protein 5 regulates diet-induced obesity via GIP secretion from enteroendocrine K cells in response to fat ingestion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 308, E583-591, 2015. 査読有
DOI: 10.1152/ajpendo.00543.2014.
19. Ebrahimi M, Yamamoto Y, Owada Y. (11 名中 7, 11 番目) Proteomic differential display analysis reveals decreased expression of PEA-15 and vimentin in FABP7-deficient astrocytes. *J Proteom Bioinform* 8, 9-14, 2015. 査読有
DOI: 10.4172/jpb.1000347.
20. Shirao S, Owada Y. (14 名中 13 番目) A novel trigger for cholesterol-dependent smooth muscle contraction mediated by the sphingosylphosphorylcholine-Rho-kinase pathway in the rat basilar artery: a mechanistic role for lipid rafts. *J Cereb Blood Flow Metab* 35, 835-842, 2015. 査読有
DOI: 10.1038/jcbfm.2014.260.
21. Maekawa M, Owada Y. (22 名中 19 番目) Utility of scalp hair follicles as a novel source of biomarker genes for psychiatric illnesses. *Biol Psychiat* 78, 116-125, 2015. 査読有
DOI: 10.1016/j.biopsych.2014.07.025.
22. Islam A, Yamamoto Y, Tokuda N, Owada Y. (14 名中 8, 11, 14 番目) Fatty acid binding protein 3 is involved in n-3 and n-6 PUFA transport in mouse trophoblasts. *J Nutr* 144, 1509-1516, 2014. 査読有
DOI: 10.3945/jn.114.197202.
23. Miyazaki H, Yamamoto Y, Tokuda N, Owada Y. (19 名中 13, 15, 19 番目) Fatty acid binding protein 7 regulates phagocytosis and cytokine production in Kupffer cells during liver injury. *Am J Pathol* 184, 2505-2515, 2014. 査読有
DOI: doi: 10.1016/j.ajpath.2014.05.015.
24. Sadahiro H, Owada Y. (9 名中 7 番目) Pathological features of highly invasive glioma stem cells in a mouse xenograft model. *Brain Tumor Pathol* 31, 77-84, 2014. 査読有
DOI: 10.1007/s10014-013-0149-x.
25. Shimamoto C, Owada Y. (17 名中 15 番目) Functional characterization of FABP3, 5 and 7 gene variants identified in schizophrenia and autism spectrum disorder and mouse behavioral studies. *Hum Mol Genet* 23, 6495-6511, 2014. 査読有
DOI: 10.1093/hmg/ddv011.

26. Bando Y, Owada Y. (9 名中 6 番目)
Expression of epidermal fatty acid binding protein (E-FABP) in septoclasts in the growth plate cartilage of mice. J Mol Histol 45, 507-518, 2014. 査読有

DOI: 10.1007/s10735-014-9576-1.

27. Shioda N, Owada Y. (6 名中 5 番目)
FABP3 protein promotes alpha-synuclein oligomerization associated with 1-methyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity. J Biol Chem 289, 18957-18965, 2014. 査読有

DOI: 10.1074/jbc.M113.527341.

28. Nomura S, Owada Y. (14 名中 12 番目)
Changes in glutamate concentration, glucose metabolism, and cerebral blood flow during focal brain cooling of the epileptogenic cortex in humans. Epilepsia 55, 770-776, 2014. 査読有

DOI: 10.1111/epi.12600.

29. Suzuki J, Owada Y. (9 名中 6 番目)
Preservation of cochlear function in Fabp3 (H-Fabp) knockout mice. Neurosci Res 81-82, 64-8, 2014. 査読有

DOI: 10.1016/j.neures.2014.02.003.

30. Ishikawa J, Owada Y. (4 名中 3 番目)
Hyperlocomotor activity and stress vulnerability during adulthood induced by social isolation after early weaning are prevented by voluntary running exercise before normal weaning period. Behav Brain Res 264, 197-206, 2014. 査読有

DOI: 10.1016/j.bbr.2014.02.007.

〔学会発表〕(計 57 件)

1. Tokuda N.

Localization and function of FABP7 in T cell area fibroblastic reticular cells.

7th International Workshop of Kyoto T Cell Conference (2017年3月13日, 京都大学芝蘭会館, 京都市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

無し

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.organ-anatomy.med.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

徳田 信子 (TOKUDA, Nobuko)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：7 0 2 2 7 5 7 8

(2)研究分担者

大和田 祐二 (OWADA, Yuji)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：2 0 2 9 2 2 1 1

山本 由似 (YAMAMOTO, Yui)

東北医科薬科大学・医学部・助教

研究者番号：8 0 6 3 5 0 8 7

(3)連携研究者

無し

(4)研究協力者

常岡 英弘 (TSUNEOKA, Hidehiro)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：4 0 4 3 7 6 2 9