

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460571

研究課題名(和文)慢性炎症と代謝の相互作用を担うシグナル機構の解析

研究課題名(英文)Signaling mechanisms of chronic inflammation and metabolic diseases

研究代表者

緒方 正人(OGATA, Masato)

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：60224094

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)：血球系細胞に特異的なp38alphaコンディショナルノックアウトマウスでは、高脂肪食投与による肥満モデルやマウスNASHモデルにおいて、慢性炎症や耐糖能が低下していた。その機構としては、CD11c陽性のM1様マクロファージのp38alpha経路が、標的臓器への細胞浸潤を制御する可能性が示された。CD11c陽性細胞のp38経路は、肥満や高脂肪による慢性炎症病態の共通の治療標的となる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Chronic inflammation and glucose tolerance in high fat diet-induced obesity and NASH model mice were ameliorated in mutant mice in which p38alpha gene was disrupted in hematopoietic cells. As a possible mechanism, involvement of p38alpha in the chemotaxis of proinflammatory M1 macrophages to their target organs was suggested. The p38alpha signaling cascade might be a common therapeutic target of diseases related to chronic inflammation induced by obesity and fatty liver.

研究分野：免疫学

キーワード：慢性炎症 MAPキナーゼ マクロファージ 代謝症候群 p38

1. 研究開始当初の背景

肥満による慢性炎症は、近年生活習慣病やがんなど様々な非感染性の疾患と関わることで注目されている。肥満はインスリン抵抗性(血糖値上昇)の増悪因子である。また、ヒトでがんによる死亡も約1.5倍上昇し、特に肝がんリスクは約4.5倍に高まる。

慢性炎症と一口にいても、関わる臓器で病態は異なる。肥満が脂肪組織で慢性炎症とインスリン抵抗性を生じる機構は、概ね以下のように考えられている。肥大した脂肪組織でケモカイン MCP1 などが産生され、マクロファージに作用して引き寄せさせる。そこで M1 様 (F4/80+ CD11c+) のマクロファージを飽和脂肪酸などが刺激し、TNF-alpha や IL-6 などの炎症性サイトカインが産生され、これが脂肪細胞などに作用しインスリンのシグナル伝達を阻害する。マクロファージ浸潤には、ケモカイン MCP1 と受容体 CCR2 が関与し、脂肪細胞以外に T 細胞なども関わる。

一方、肥満が肝で慢性炎症を起こし肝がんを促進するモデルが最近示された (Nature 499, 97-101, 2013)。肥満で腸内細菌が産生する DCA (デオキシコール酸) が増加し腸から吸収され、肝星細胞の老化を促進する。細胞老化は、肝星細胞の炎症性サイトカイン産生を誘導し、それが肝がんの増殖を促進する。抗生剤で腸内細菌を除去すると、肥満による血中 DCA 上昇、肝星細胞の老化、炎症性サイトカイン産生、肝がん増大、の全てが抑制され、そこに DCA を投与すると肝がんが再び増大する。この経路は、肥満や脂肪肝の促進には影響しない。また、肝がん増大は、肥満が無ければ DCA 投与のみでは見られず、上記経路を介さない肥満の作用が必要と考えられる。

慢性炎症の下流の代謝制御機構についての報告は少ないが、マクロファージの遊走に必要な CCR2 (MCP1 受容体) の欠損マウスは、インスリン抵抗性に加えて、肥満や脂肪肝が抑制されることから、血球系細胞は代謝制御も行うと思われる。しかし、IL-1R や IL-6 の欠損マウスはインスリン抵抗性は改善するが肥満は改善せず、血球系細胞が代謝を制御する機構はよく分かっていない。

シグナル分子の MAP キナーゼ (MAPK) のうち、JNK1 が肥満の慢性炎症病態に関わることは既に報告されている。しかし、ERK や p38 などの MAPK 経路の関与については不明な点が多い。我々はこれまで、ERK2 や p38alpha などの MAPK の遺伝子改変マウスを作成し、それらがリンパ球の機能や分化 (Mol Cell Biol 27, 1236-1246, 2006, Immunity 24, 259-268, 2008) 発生 (Genes to Cells 140, 1573-1582, 2003, Nat Biotechnol 25, 233-237 2007, Development 140, 1573-1582, 2013) に関わることを明らかにしてきた。その過程で作成した p38alpha の血球特異的コンディショナルノックアウトマウスに高脂肪食を投与したところ、野生

型マウスに比べ、(1)脂肪組織の慢性炎症の低下、(2)インスリン抵抗性の改善、(3)脂肪細胞肥大化の抑制、を見出した。さらに、(4)肥満の抑制や、(5)脂肪肝の抑制、をも見出している。また、ERK2 の遺伝子改変マウスでも、体重減少を見出している。これらの予備的知見をもとに、血球系細胞の ERK と p38 MAPK 経路を中心に解析することで、肥満による慢性炎症病態の新規制御機構を明らかにできると考える。

2. 研究の目的

本課題は、申請者がこれまで行って来た MAP キナーゼ (MAPK) の個体レベルの機能解析の研究実績の上に立ち、肥満による慢性炎症病態に血球系細胞の ERK と p38 経路が関わるという独自の知見を基に、その病態制御機構を解き明かそうとするものである。肥満が脂肪組織で M1 マクロファージによる慢性炎症を引き起こし、それがインスリン感受性を低下させ代謝症候群などの増悪因子となることが確立されつつある。一方で、慢性炎症がその下流で代謝に及ぼす影響や、肝など脂肪組織以外における臓器特異的な慢性炎症制御機構は明らかでない。そこで本課題では、脂肪組織と肝を対比しつつ、肥満の臓器特異的な慢性炎症制御機構と、慢性炎症による代謝制御機構を明らかにし、肥満関連病態の理解を深め、治療法開発の基盤を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

肥満による慢性炎症病態は、多様な細胞間の相互作用で生じるため、それを再現できる個体レベルの解析が欠かせない。そこで MAPK 遺伝子を欠損したマウスを作製し解析に用いた。一方で、炎症シグナルは広汎な細胞で働くため、遺伝子欠損マウスで表現型を認めたとしても、それがどの細胞を介して生じたかという機構については、必ずしも明らかでは無い。そこで、組織や細胞特異的に遺伝子を欠損させたコンディショナルノックアウトマウスによる解析が必要となる。これにより、多様な細胞で働くシグナル系を、生体レベルで細胞種ごとに分割して解析することが可能になる。

本研究では、炎症に関わるとされる p38alpha 経路が、慢性炎症においてどのような役割を果たすかを中心に解析するため、p38alpha 遺伝子の各種コンディショナルノックアウトマウスを使用した。

(1) 血球系特異的な p38alpha コンディショナルノックアウトマウス:

Tie2-Cre トランスジェニックマウスを利用して作成した。Tie2 は血球と血管内皮の共通の前駆細胞で発現され、このマウスによって血球系細胞と血管内皮で特異的に p38alpha 遺伝子を欠損させることができる。このマウスに高脂肪食を与え (肥満モデル)

実験に使用した。

(2) CD11c 陽性細胞特異的な p38alpha コンディショナルノックアウトマウス:

CD11c-Cre トランスジェニックマウスを用いて作成した。CD11c 陽性細胞特異的に p38alpha 遺伝子を欠損させることができる。この雄マウスに高脂肪食(肥満モデル)、あるいは、下記のコリン欠乏 L-アミノ酸欠乏高脂肪食(NASHモデル)を与え実験に使用した。

(3) マウス慢性炎症モデル

肥満モデル:

雄マウスに高脂肪食(HFD)を投与した。体重増加に加え脂肪組織における慢性炎症を生じる。耐糖能低下や脂肪肝等を生じAST, ALT値も上昇するが、肝線維化はほとんどみられない。

非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)モデル:

マウスにコリン欠乏 L-アミノ酸欠乏高脂肪食(CDAHFD, 60 kcal%脂肪, 0.1%メチオニン)を与えると、脂肪肝とAST, ALT値の上昇に加え肝線維化を生じ NASHモデルとなる(Matsumoto, M., et al., Int. J. Exp. Path. 94, 93, 2013)。肥満モデルと異なり、高脂肪食条件下にも関わらず体重増加はほとんど見られない。雄マウスにCDAHFD投与後体重を計測したところ、野生型マウス、CD11c 陽性細胞特異的 p38alpha コンディショナルノックアウトマウスともにほとんど体重の変化は見られなかった。

(4) 病態の評価

肥満やNASH関連病態の評価については、脂肪組織や肝の病理組織検査、AST, ALT値、グルコースの腹腔内投与による耐糖能検査、インスリン投与によるインスリン抵抗性検査、空腹時のインスリンレベル、体重などの測定により行った。

また、組織に浸潤した炎症性細胞の解析は、細胞表面マーカーを染色後、フローサイトメーターで解析、分取して行った。

炎症性サイトカイン遺伝子の発現レベルについては、組織から抽出したRNAを用い、定量的なRT-PCRで測定した。

4. 研究成果

(1) 肥満による慢性炎症モデルにおける解析

Tie2-Cre トランスジェニックマウスを利用して作成した p38alpha 遺伝子の血球系特異的コンディショナルノックアウトマウスでの解析を行った。高脂肪食投与によってマウスは肥満し、脂肪組織の慢性炎症を生じ、耐糖能は低下、脂肪肝も生じる。また、p38alpha のリン酸化は、少なくとも末梢血液細胞では亢進する。

血球系特異的 p38alpha コンディショナルノックアウトマウスのこれまでの解析では、既に脂肪組織での炎症性サイトカイン(MCP-1, IL-6, IL-1betaなど)の遺伝子発現低下およびCD11c 陽性のM1様マクロファージ細胞の浸潤低下等を認めていた。肥満マウスの脂肪組織からローサイトメーターで単離したM1様マクロファージでは、炎症性サイトカインの発現には大きな変化はなかったが、脂肪組織への遊走に関わると考えられるケモカイン受容体CCR2やCCR5などの発現が低下しており、これが浸潤低下の一因と考えられた。従って、M1様マクロファージの p38alpha 経路がケモカイン受容体CCR2やCCR5の発現に関わり、p38alpha を欠くマウスでは、M1様マクロファージの脂肪組織への遊走能が低下するために脂肪組織の慢性炎症が軽減すると考えられた。

今回、上記の可能性についてさらに検討した。もし血球系細胞のケモカイン受容体の発現低下が慢性炎症の最上流で影響を及ぼしているなら、高脂肪食投与以前の状態で既に野生型マウスとの間でケモカイン受容体の発現に差があると考えられる。そこで、通常食で飼育した野生型マウスと血球系特異的 p38alpha コンディショナルノックアウトマウスから腹腔浸出細胞を調整し各種遺伝子発現を検討した。CCR2, CCR5に加えてIL-1beta, IL-6の発現が低下しており、血球系細胞における変化が高脂肪食投与以前から生じていることが示された。

また、脂肪以外の臓器として、肝における慢性炎症も検討した。血球系特異的 p38alpha コンディショナルノックアウトマウスでは、脂肪肝が抑制されていた。また、肝におけるF4/80, CD11c, CCR2, IFN-gammaなどの遺伝子発現がいずれも抑制され、血球系細胞の p38alpha が、脂肪組織と同様に肝の慢性炎症にも関連することが示唆された。

(2) 非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)モデルにおける解析

これまで用いてきた高脂肪食による肥満モデルでは、血球系細胞の p38alpha が肥満そのものにも影響するため、慢性炎症への影響が肥満制御を介する二次的なものである可能性が否定できない。上記の、肝の慢性炎症にも血球系細胞の p38alpha が関与することを示す知見から、p38alpha の炎症制御機能を、肥満を生じない非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)のマウスモデルで検討できる可能性が示された。また解析に当たっては、CD11c 陽性細胞特異的な p38alpha コンディショナルノックアウトマウスを使用することで、p38alpha の機能を CD11c 陽性細胞に限定して解析できる。野生型マウスに比べCD11c 陽性細胞特異的 p38alpha コンディショナルノックアウトマウスでは、肥満モデルにおいて肥満や耐糖能低下が抑制されるこ

とを既に見出している。このマウスを用いて、肥満を生じない NASH モデルでの検討を行った。NASH 誘導のため CDAHFD 投与で 12 週飼育したが、野生型マウス、CD11c 陽性細胞特異的 p38alpha コンディショナルノックアウトマウスともにほとんど体重の変化は見られなかった。しかし、肝で TNF-alpha、ICAM-1、VCAM-1 などの炎症マーカー遺伝子発現は、CD11c 陽性細胞特異的 p38alpha コンディショナルノックアウトマウスで低下していた。加えて、血糖値の上昇も抑制されており、肝の慢性炎症が肥満とはかかわりなく CD11c 陽性細胞の p38alpha によって制御されると考えられた。肝障害マーカーである血清 ALT 値の低下は認めしたが、肝線維化マーカーである TIMP-1 や collagen I、TGF-beta などの遺伝子発現は、低下傾向はあるものの有意差を認めるには至らず、サンプル数を増やした今後の検討を要する。

(3) 考察と今後の課題

血球系特異的 p38alpha コンディショナルノックアウトマウスの解析から、血球系細胞の p38 経路が、高脂肪食投与による肥満モデルにおいて、脂肪組織と肝の慢性炎症や耐糖能を制御することが明らかになった。その機構としては、CD11c 陽性の M1 様マクロファージにおいて p38alpha がケモカイン受容体 CCR2 や CCR5 の発現に必要であり、それが M1 様マクロファージの標的臓器への浸潤を介して慢性炎症を制御する可能性が示された。また、CD11c 陽性細胞特異的な p38alpha コンディショナルノックアウトマウスでも肥満抑制や耐糖能の改善などが見られた。Tie2-Cre によるコンディショナルノックアウトマウスでは、厳密には血管内皮の関与も否定できなかったが、CD11c 陽性細胞特異的 p38alpha コンディショナルノックアウトマウスによる結果は、血球系細胞の関与を補強すると同時に、血球系細胞の中でも特に CD11c 陽性細胞が慢性炎症病態制御の中心的役割を果たすことを示すものといえる。

血球系特異的 p38alpha コンディショナルノックアウトマウスにしろ CD11c 陽性細胞特異的 p38alpha コンディショナルノックアウトマウスにしろ、高脂肪食による肥満も抑制される。肥満は、脂肪組織から産生されるケモカイン MCP-1 の産生を誘導し M1 様マクロファージの脂肪組織への遊走を引き起こすことから、肥満モデルで見られる慢性炎症の低下は、肥満抑制による二次的効果とも考えられる。しかし、ケモカイン受容体 CCR2 や CCR5 の遺伝子発現低下は、マウスに高脂肪食を与える前から既に生じており、少なくともこの変化については肥満による二次的変化では無い。また、NASH モデルでは、野生型マウスと CD11c 陽性細胞特異的 p38alpha コンディショナルノックアウトマウスに体重差は無いが、この場合にも CD11c 陽性細胞特異的 p38alpha コンディショナル

ノックアウトマウスで慢性炎症が低下しており、CD11c 陽性細胞の p38alpha が肝の慢性炎症に影響を及ぼすことを示している。これらの結果は、CD11c 陽性細胞を中心とする血球系細胞の p38alpha が、肥満とは独立して慢性炎症を制御することを強く示唆するものである。

一方で、血球系細胞の p38 が肥満を制御する機構は明らかでない。食物中の飽和脂肪酸が視床下部でミクログリアによる慢性炎症を惹起し、それが食物摂取を増やして肥満に繋がるという報告がある (Valdearcos, M., et al. Cell Reports 9, 2124-38, 2014)。高脂肪食が飽和脂肪酸を介して視床下部の慢性炎症を誘導し、それが摂食促進によって肥満を増悪させるなら、ミクログリアの p38alpha が肥満を制御する可能性がある。しかし、我々の予備的検討では、p38alpha の機能欠損型点突然変異マウス (低体重) の摂食量はマウス体重当たりで補正すると野生型マウスを下回ることは無く、p38alpha が摂食を介して体重を制御することを支持する結果は今のところ得られていない。

これまでに国内外の多くの研究で、肥満や高脂肪食による慢性炎症が生活習慣病やがん、認知症などのさまざまな病態に關与することが報告されている。一方で、脂肪組織や肝、腸管、脳などの異なる臓器で見られる慢性炎症のうち、どの部分が共通でどの部分がユニークかについては、病態を理解し、治療を考える上で重要な課題であるが、ほとんど明らかにされていないのが現状である。この点について我々は、高脂肪食負荷によって生じる肥満モデルと NASH モデルで、脂肪組織と肝という異なった臓器で共通に血球系細胞の p38alpha が関わるということを示した。即ち、今回の研究結果は、血球系細胞の p38 経路が、広範な慢性炎症の共通の治療標的になる可能性を示すものと言える。

今後に残されたもう一つの重要討課題は、肥満や代謝変化が慢性炎症を惹起する機構である。例えば、糖尿病患者で一過性の高血糖の病歴が、その後血糖値を正常化しても長期にわたる病態リスクにつながる現象が「メタボリックメモリー」として知られており、そのようなケースで末梢単核球の炎症関連遺伝子の発現亢進などが報告されている。代謝変化によって長期に固定化された変化 (メモリー) が生じる機構には、エピジェネティックな機構の存在が想像されるが、その実態は明らかでない。肥満による代謝変化が慢性炎症に関わるエピジェネティック機構を明らかにすることは、病態の理解と治療の両面で重要と言える。

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 3 件)

Takebayashi, S.I., Ogata, M., and Okumura, K. Anatomy of Mammalian Replication Domains. Genes, (2017) in press. 査読有
DOI: 10.3390/genes8040110.

Kuriya, K., Higashiyama, E., Avsar-Ban, E., Okochi, N., Hattori, K., Ogata, S., Takebayashi, S.I., Ogata, M., Tamaru, Y., and Okumura, K. (2016). Direct visualization of replication dynamics in early zebrafish embryos. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2016, 80, 945-948. 査読有
DOI: 10.1080/09168451.2016.1141039

Kuriya, K., Higashiyama, E., Avsar-Ban, E., Tamaru, Y., Ogata, S., Takebayashi, S., Ogata, M., and Okumura, K. Direct Visualization of DNA Replication Dynamics in Zebrafish Cells. Zebrafish, 2015, 12, 432-439. 査読有
DOI: 10.1089/zeb.2015.1151

〔学会発表〕(計 5 件)

Moe Shiokawa, Eri Ishikawa, Masato Ogata, Takashi Saito and Sho Yamasaki. Engagement of TCR with foreign and self antigens trigger distinct signaling pathways to generate different T cell responses. 17th International Congress of Immunology 2016 8. 21-26, Melbourne (Australia)

Sadatsugu Ookuma, Shinichiro Takebayashi, Masato Ogata. p38 alpha in pro-inflammatory macrophages regulates progression of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). 第 88 回日本生化学学会大会, 2015 年 12 月 1 ~ 4 日, 神戸ポートアイランド(神戸)

Sadatsugu Ookuma, Masato Ogata. The role of p38 alpha in pro-inflammatory macrophages in nonalcoholic steatohepatitis (NASH). 第 44 回日本免疫学会学術集会, 2015 年 11 月 18 ~ 20 日), 札幌コンベンションセンター(札幌)

Sadatsugu Ookuma, Masato Ogata. Roles of p38alpha mitogen-activated protein kinase in macrophage in high-fat-induced chronic inflammation and insulin resistance. 第 43 回日本免疫学会学術集会, 2014 年 12 月 10 ~ 12 日, 国立京都国際会館(京都)

Sadatsugu Ookuma, Takahiko Fujikawa, Kinya Otsu, Masato Ogata. p38alpha in macrophages regulates high-fat-induced

obesity and insulin resistance. 第 87 回日本生化学学会大会, 2014 年 10 月 15 ~ 18 日, 国立京都国際会館(京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

緒方 正人 (OGATA, Masato)
三重大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 60224094