

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460961

研究課題名(和文)炎症性腸疾患における腸間膜脂肪組織の機能の解明

研究課題名(英文)Role of mesenteric fat in inflammatory bowel diseases

研究代表者

小林 由佳 (Kobayashi, Yuka)

東京大学・医学部附属病院・特任臨床医

研究者番号：80724658

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：腸炎における腸管周囲の脂肪組織、とくに脂肪細胞の機能に関してマウスモデルを用いて検討した。DSS誘発実験腸炎モデルにおいて、腸間膜脂肪組織に炎症細胞浸潤が生じ、脂肪細胞においてNF- κ Bの活性が上昇することがわかった。脂肪細胞特異的IKK欠損マウスを用いて各種実験腸炎モデルを行ったが、DSS誘発腸炎モデル、高脂肪食負荷後のDSS誘発腸炎モデル、炎症発癌(AOM+DSS)モデルのいずれの系でも、炎症の程度や腫瘍の量など、コントロールと比して明らかな差は認めなかった。脂肪細胞特異的オートファジー欠損マウスを用いた実験を試みたが、増殖効率が悪く結論を出すのに十分な数のマウスを得られなかった。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate the roles of mesenteric fat in inflammatory bowel diseases, we used experimental colitis models with adipocyte specific genetically engineered mice. In DSS induced colitis model, marked inflammatory cell infiltration was seen in the mesenteric fat tissue, and NF- κ B activity was elevated in adipocytes in the mesenteric fat. We tried to investigate the role of NF- κ B signaling in adipocytes in experimental colitis using adipocyte specific IKK deficient mice. However, we did not reveal any phenotypic difference from control mice in several experimental systems, including DSS induced colitis model, DSS induced colitis after 8 weeks of high fat diet, and AOM/DSS colitis associated cancer model. We also tried to investigate the role of autophagy in adipocytes in experimental colitis using adipocyte specific ATG5 deficient mice. However, Fabp4-Cre;Atg5 flox/flox mice were very difficult to breed and we could not obtain enough animals to perform necessary experiments.

研究分野：消化管疾患

キーワード：炎症性腸疾患

1. 研究開始当初の背景

(1) 炎症性腸疾患の病態解明の必要性

炎症性腸疾患の病態は、腸管における免疫学的異常と考えられているが詳細はいまだ不明である。実臨床における治療は免疫抑制薬が主体であるが、効果は確実でなく合併症も多い。詳細な病態の解明と、それに基づく安全で効果的な治療の開発が求められている。

(2) 炎症性腸疾患における腸管周囲脂肪組織

クローン病における Creeping fat と呼ばれる腸間膜脂肪組織の肥大や、潰瘍性大腸炎における直腸周囲脂肪組織の増生など、慢性腸炎における炎症腸管周囲の脂肪組織の変化は特徴的であり、こうした現象の意義を検討することは炎症性腸疾患の病態を解明するために重要な手がかりになると考えられる。腸炎と脂肪組織の関連に関する研究は、クローン病患者において脂肪組織が CRP を産生するという報告や、マウス腸炎モデルで腸間膜脂肪組織が bacterial translocation の制御に関与するなど、少数が報告されているのみである。

2. 研究の目的

(1) 腸炎における脂肪組織の機能解析に適した実験系の確立

マウス腸炎モデルを用いて周囲脂肪組織の解析する手法は確立されておらず、DSS 誘発腸炎モデルをもちいた既報が少数あるのみである。本研究では、DSS 誘発腸炎に加えて、高脂肪食負荷および炎症発癌モデルも組み合わせ、腸炎における周囲脂肪組織の解析に適した実験系を確立することを目的のひとつとした。

(2) 脂肪組織における炎症反応が腸炎の病態に及ぼす影響の解析

脂肪細胞特異的 IKK 欠損マウス (Fabp4-Cre; Ikk flox/flox マウス) において、DSS 誘発腸炎モデルなどの実験腸炎モデルを用いた解析を行い、脂肪細胞での NF- κ B シグナルを抑制し、ひいては炎症性サイトカインの産生を抑制することが、腸炎の病態にどう影響するかを解析する。

(3) 脂肪組織におけるオートファジーが腸炎の病態に及ぼす影響の解析

脂肪細胞特異的オートファジー欠損マウス (Fabp4-Cre; Atg5 flox/flox マウス) において、DSS 誘発腸炎モデルなどの実験腸炎モデルを用いた解析を行う。脂肪組織が消化管からの bacterial translocation と関連するという既報があり、脂肪細胞でのオートファジーが抑制されることにより、脂肪組織の感染防御への影響があるかどうかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 実験腸炎モデルにおける腸管周囲脂肪組織の組織学的解析

DSS 誘発腸炎モデル、炎症発癌モデル (AOM+DSS モデル)、高脂肪食負荷後の DSS 誘発腸炎モデルを用いて、腸炎誘発後に大腸とともに腸間膜脂肪組織を採取し、病理組織学的な解析および免疫染色を用いた解析を行う。

(2) 脂肪細胞特異的遺伝子改変マウスを用いた解析

上述のように、脂肪細胞特異的 IKK 欠損マウスおよび脂肪細胞特異的オートファジー欠損マウスにおいて、実験腸炎モデルの解析を行う。

4. 研究成果

(1) 実験腸炎モデルにおける腸管周囲脂肪組織の炎症

上述の通り、DSS 誘発腸炎モデルにおける腸管周囲脂肪組織の組織学的解析を行った。腸間膜脂肪組織は広範囲であるため、組織学的解析に用いる部位としては、DSS 誘発腸炎の炎症部位である大腸に近接し同定・採取のしやすい、回腸末端から近位結腸部の腸間膜を用いることとした。

下図1はコントロールマウスにおける腸間膜脂肪組織の組織像である。他の組織と同様、10%ホルマリンで24時間程度固定した後、脱脂を経てパラフィン包埋することで、十分に形態評価が可能と考えられた。

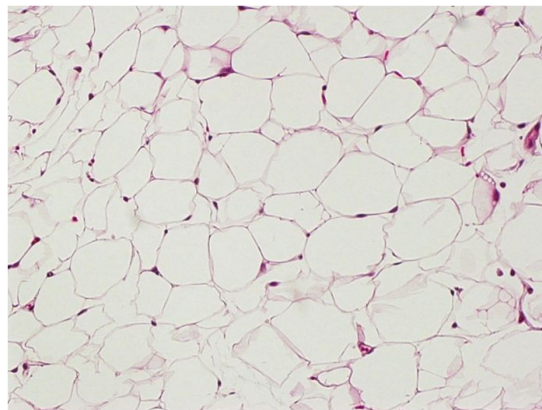


図1 コントロールマウスにおける腸間膜脂肪組織 (HE 染色)

続いて、DSS で腸炎誘発後に腸間膜脂肪組織の組織学的評価を行った。体重減少が著明となると脂肪組織が減少し腸間膜の同定・採取が困難となるため、炎症の強さや解析のタイミングを検討し、2.5%DSS7日投与後がよいと考えられた。

同条件では、下図2のように著明な炎症細胞浸潤を認め、腸炎における周囲脂肪組織の組織学的な解析が十分可能であると考えられた。

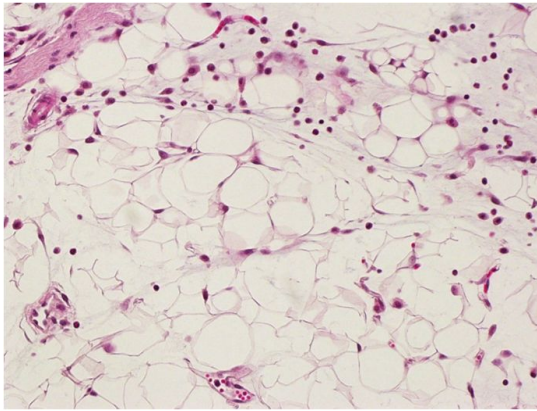


図2 DSS誘発腸炎における腸間膜脂肪組織 (HE染色)

つづいて、脂肪細胞特異的 IKK 欠損マウスを用いた実験に先立ち、前記の DSS 誘発腸炎における腸管周囲脂肪組織において、脂肪細胞の NF- κ B シグナルが活性化していることを確認することとした。腸間膜脂肪組織の解析において、組織全体をタンパク質や RNA の解析に用いると炎症細胞と脂肪細胞の区別が困難であり、免疫組織化学による解析が最適と考えた。

脂肪細胞特異的なマーカーの染色のために、パラフィン切片への免疫染色で使用可能なものが手に入らなかったため、汎血球マーカー CD45 陰性の細胞を脂肪細胞として検討することとした (図3)。

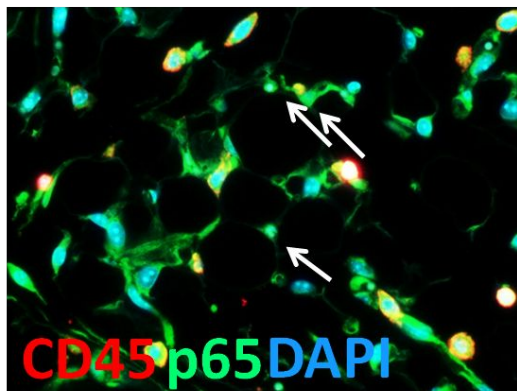


図3 腸間膜脂肪組織における NF- κ B の活性化 (蛍光免疫染色: 赤 CD45 (血球) 緑 p65 青 DAPI (核) 矢印: 脂肪細胞 (CD45 陰性) における p65 の核移行)

なお、腸間膜脂肪組織の凍結標本の作製・凍結切片による免疫組織化学も様々な条件を検討したが、形態評価に耐える検体を作成するのはきわめて困難であった。

(2) 脂肪細胞特異的 IKK 欠損マウスを用いた各種実験腸炎モデル

脂肪細胞特異的遺伝子改変のために、脂質代謝領域などで汎用される Fabp4-Cre マウスを用いることとした。まず、Rosa-LacZ レ

ポーターマウスと交配し、Fabp4Cre;Rosa-LacZ マウスの腸間膜脂肪組織で X-gal 染色を行って、腸間膜脂肪組織での遺伝子改変を確認した (図4)。

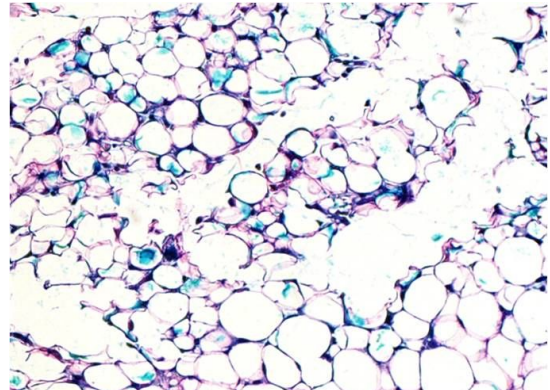


図4 腸間膜脂肪組織における X-gal 染色 (青が遺伝子改変を起こした細胞を示す)

次いで交配により Fabp4Cre;IKK flox/flox マウスを作成し、各種実験腸炎モデルのフェノタイプの差を検討した。

短期 DSS 腸炎モデル (2.5%DSS5 日間投与後 10 日目に sacrifice) では、体重の変化および組織学的な消化管の炎症所見には有意な差を認められなかった (図5、6、7)

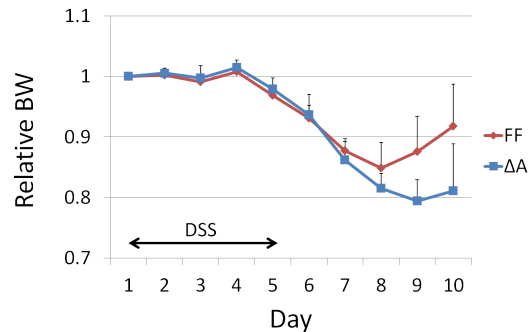


図5 短期 DSS 腸炎モデル 体重変化 (FF: コントロールマウス A: 脂肪細胞特異的 IKK 欠損マウス 各群 5 匹)

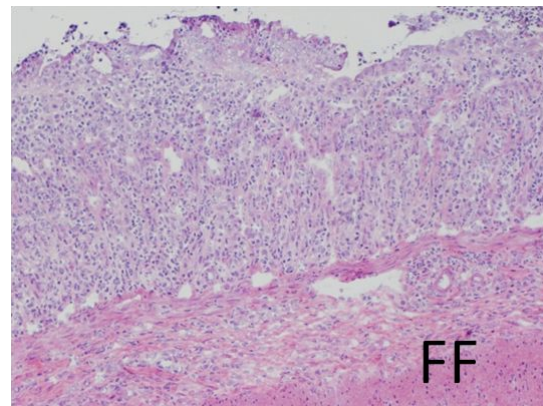


図6 DSS 腸炎モデル コントロールマウス 大腸組織像

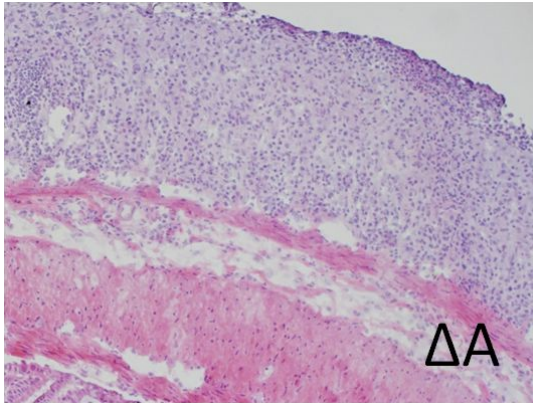


図 7 DSS 腸炎モデル 脂肪細胞特異的 IKK 欠損マウス 大腸組織像

通常の実験条件で腸管周囲脂肪組織の NF B シグナルと腸炎の関連を見いだすのは難しいと思われた。

ヒトおよびマウスにおいて肥満が腸炎を増悪させることが知られており、高脂肪食を 8 週間投与しマウスを肥満とした後に、同様に DSS 腸炎モデルを施行した。しかし、やはり体重変化や組織学的な炎症所見に、有意な差を認められなかった (図 8)。

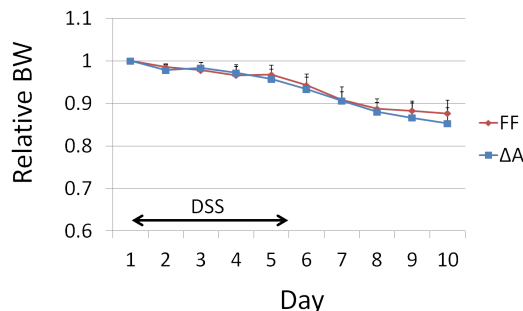


図 8 高脂肪食負荷後 DSS 腸炎モデル 体重変化 (FF: コントロールマウス A: 脂肪細胞特異的 IKK 欠損マウス 各群 5 匹)

また、慢性炎症および発癌への腸管周囲脂肪組織の NF B シグナルの影響を検討すべく、炎症発癌モデル (AOM 投与後に DSS 腸炎を計 3 サイクル施行) を行ったが、いずれにおいても実験期間中の体重の推移 (図 9) 大腸の組織像、形成された腫瘍数など、フェノタイプに有意な差を認められなかった。

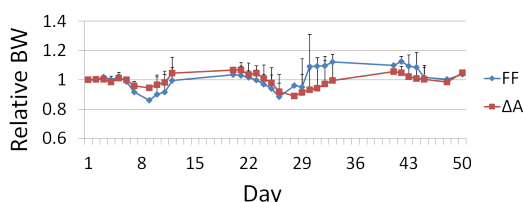


図 9 炎症発癌 (AOM-DSS) モデル 体重変化 (FF: コントロールマウス A: 脂肪細胞特異的 IKK 欠損マウス 各群 5 匹)

以上のように、Fabp4Cre;IKK flox/flox マウスはコントロールと有意なフェノタイプの差を見いだせなかった。脂肪組織の炎症において IKK の役割がさほど大きくないが、何らかの代償機構が働いていることが示唆された。

(3) Fabp4-Cre;Atg5 flox/flox マウスについて

研究開始当初より、Fabp4-Cre;Atg5 flox/flox マウスを作成すべく交配を継続していたが、繁殖効率がきわめて悪く (期待値は 50% のはずが 10% 未満) 個体数がそろわないために十分な検討ができなかった。

脂肪細胞でのオートファジーが発生・発育において重要である可能性が示唆されるが、あるいは、Fabp4-Cre は交配するラインにもよるが生殖細胞系列で発現する可能性が指摘されており、繁殖に影響している可能性もある。

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 由佳 (KOBAYASHI, Yuka)
東京大学・医学部附属病院・特任臨床医
研究者番号: 80724658

(2) 研究分担者

平田 喜裕 (HIRATA, Yoshihiro)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 10529192

(3) 研究分担者

木下 裕人 (KINOSHITA, Hiroto)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 50645322