

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461930

研究課題名(和文) 外科的侵襲時における脂肪組織とM1/M2マクロファージのクロストーク機構の解明

研究課題名(英文) The close-talk mechanism between adipose tissue and M1/M2 macrophages after the surgical stress

研究代表者

松谷 毅 (Matsutani, Takeshi)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50366712

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)：マウス盲腸穿孔結紮(CLP)による脂肪組織マクロファージの動向とPPAR アゴニストの影響を検討。CLP(C)群は、sham(S)群に比してarginase1, IL-10(M2マクロファージ), iNOS(M1)のmRNA発現量は有意に高値であった。PPAR アゴニスト投与CLP(P)群は、C群に比して有意にCD163, F4/80 (常在)mRNA発現が高値であった。CD11b/c-およびCD163陽性細胞数とアポトーシスはC群で増加し、P群はこの傾向が著明であった。PPAR アゴニストは、脂肪組織マクロファージを活性化し、動態を変化させることで、CLP後の脂肪細胞の炎症反応を制御している。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects of PPAR- agonist on visceral adipose macrophage population and polarisation in cecal ligation and puncture (CLP) mice. Mice were divided to CLP (C)-group, PPAR agonist-treated CLP (P)-group, or sham (S)-group. mRNA expressions (iNOS for M1, arginase1 and IL-10 for M2, CD163 and F4/80 for mature macrophages) were quantified by real-time RT-PCR. Tissue sections were subjected to immunohistochemical and TUNEL assay. C-group significantly enhanced arginase1, IL-10 and iNOS mRNA expressions as compared with S-group. P-group significantly increased mRNA level of CD163 and F4/80 in C-group. Increased numbers of CD11b/c- and CD163-positive cells as well as apoptotic cells were observed in C-group. These cells were more abundant in P-group. M1/M2 macrophage activation of adipose tissues is induced in C-group. PPAR-agonist may accelerate this activation and recruitment of macrophages, and may restrict adipose tissue inflammation by altering macrophage dynamics.

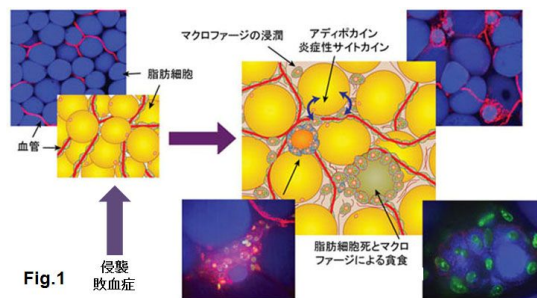
研究分野：医歯薬学

キーワード：M1/M2マクロファージ 脂肪組織 外科的侵襲 アディポネクチン PPAR アゴニスト

1. 研究開始当初の背景

外科的侵襲による呼吸・循環、栄養・代謝さらに免疫能の変化を、生体は恒常性を維持するように合目的な防御反応を起こす。これまでにわれわれは、侵襲後の生体防御反応および術後合併症・臓器障害の病態解明に関する研究を行ってきた。とくに外科的侵襲後の生体防御反応において脂肪組織が重要な役割を担っていると報告してきた。

脂肪組織の体積は主に脂肪細胞によって占められるが、その間質には血管が密に走り、また多数のマクロファージ、T、B、ナチュラルキラー、NKT細胞、顆粒球などが脂肪細胞の間質に存在し、脂肪細胞や他の免疫細胞とコミュニケーションして炎症プロセスを制御していると考えられている (Fig.1)。



そのため、脂肪組織機能の変化を検討する際には、脂肪細胞の変化だけでなく、これらの関連細胞を包含した脂肪組織全体を対象とすべきである。最近、metabolic syndromeにおける脂肪組織の慢性炎症反応にマクロファージ浸潤増加が関与していること (Weisberg, et al. *J Clin Invest* 2003) が報告され、さらにマクロファージは従来考えられていた以上に、多彩な機能・形質を示すことが明らかになっている。マクロファージは機能的に M1型 (悪玉) と M2型 (善玉) の2つのサブグループがあり、M1マクロファージはIL-6やiNOS等を多く発現するclassicalに活性化される炎症性(悪玉)のマクロファージとされ、細菌やウイルス感染に対する宿主防御に重要な役割を果たしている。M2マクロファージはIL-10を産生し炎症を抑制、組織修復、脂質代謝、線維化、腫瘍の成長に関連があるalternativeに活性化される善玉マクロファージと考えられている。

以上から脂肪組織とM1/M2マクロファージのクロストーク機構を考慮した手術侵襲後の合併症・臓器障害の病態解明は、外科学にとって極めて重要である。

2. 研究の目的

外科的侵襲時の過剰な炎症性生体反応において、M1マクロファージの脂肪組織への浸潤が関与していることを明らかにすること、さらにPPAR- γ アゴニスト投与による脂肪組織機能の活性化によって、侵襲後の脂肪組織におけるM1/M2マクロファージのクロストーク機構を解明することを研究目的と

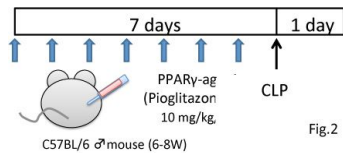
する。以上から、次の仮説をたてた。

外科的侵襲において脂肪組織にM1マクロファージの浸潤が増加し、脂肪細胞に由来する炎症性メディエーターがM1マクロファージの炎症性変化を誘導して、アディポネクチン産生関連・調節因子や炎症性メディエーターの産生を変化させる。

PPAR- γ アゴニストを投与し脂肪組織を活性化することによって抗炎症性に働き、侵襲後にM1/M2マクロファージのバランスがM2マクロファージ優位に変化する。

3. 研究の方法

雄性C57BL/6マウス(8週令)に、吸入麻酔後、コントロールのCLP群(盲腸結紮後、21G針にて2回穿刺し糞便を排出させる)を作成し、24時間後に全身麻酔下で犠死させる。PPAR- γ アゴニスト(10mg/kg, i.p.)をCLP施行前に7日間投与したCLP群を作成し、同様に行う。両群のコントロールとしてSham(開腹のみ)を作成する(Fig.2)。PPAR- γ アゴニスト前投与CLP群(P群)、CLP単独群(C群)と単開腹のみのSham群(S群)の3群で検討した。生存率を観察後に以下の解析を行う。



- (1) CLPあるいはSham手術後の24時間時点で吸入麻酔下に心臓穿刺し犠死させる。開腹にて腸間膜脂肪組織を摘出しPBSにて洗浄。脂肪組織を粉砕し、PBSにて洗浄後、フェノール・チオシアン酸グアニジン法にてTotal RNAを抽出する。cDNAに逆転写後、CD163、F4/80(常在マクロファージのマーカー)、inducible nitric oxide synthase (iNOS; M1マクロファージのマーカー)、arginase 1, interleukin 10 (IL-10; M2マクロファージ)、pro-inflammatory cytokines (IL-6, MCP-1) mRNA発現をreal-time PCRにて定量化する。
- (2) 脂肪組織をパラフィン包埋し、hematoxylin-eosin染色法、transferase dUTP-mediated nick-end labeling (TUNEL)法および抗CD68抗体(マクロファージ)、抗CD11b/c抗体(M1マクロファージ)、抗CD163抗体(M2マクロファージ)を免疫蛍光法で染色する。
- (3) real-time PCRにて定量した値を、One-way ANOVA (Tukey-Kramer test)にて各群間を比較検討し、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

4. 研究成果

C 群の生存率に対し, P 群では有意に生存率が高値であった.

(1) 脂肪組織中の M1 マクロファージのマーカーである iNOS の mRNA 発現は, C と P 群は S 群に比して有意に高値だったが, C 群と P 群には差がなかった (Fig 3.1). M2 マクロファージのマーカーである arginase 1, IL-10 の発現も, C と P 群は S 群に比して有意に高値だったが, C 群と P 群には差がなかった (Fig 3.2).

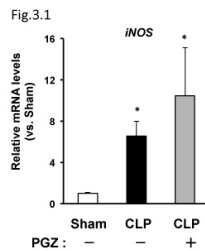
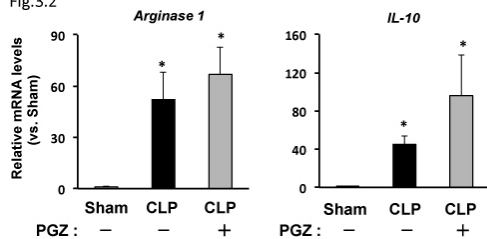
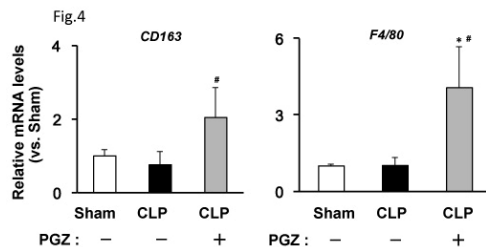


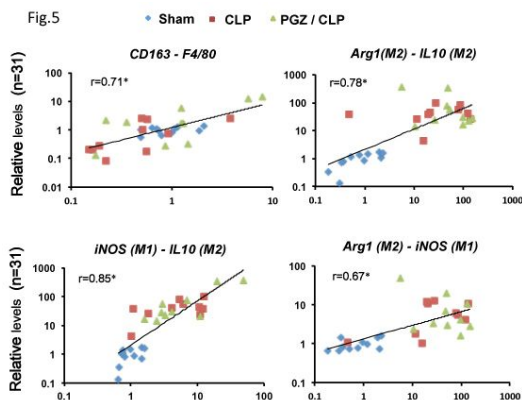
Fig.3.2



(2) 常在マクロファージのマーカーである CD163, F4/80 の mRNA 発現は, P 群は S 群に比して有意に高値だったが, C 群と S 群には差がなかった (Fig.4).



(3) mRNA 発現量を Spearman の相関係数を算出すると, CD163 vs F4/80 ($r=0.71$), arginase vs IL-10 ($r=0.78$), iNOS vs IL-10 ($r=0.85$), arginase vs iNOS ($r=0.67$)と有意に正の相関を認めた (Fig.5).

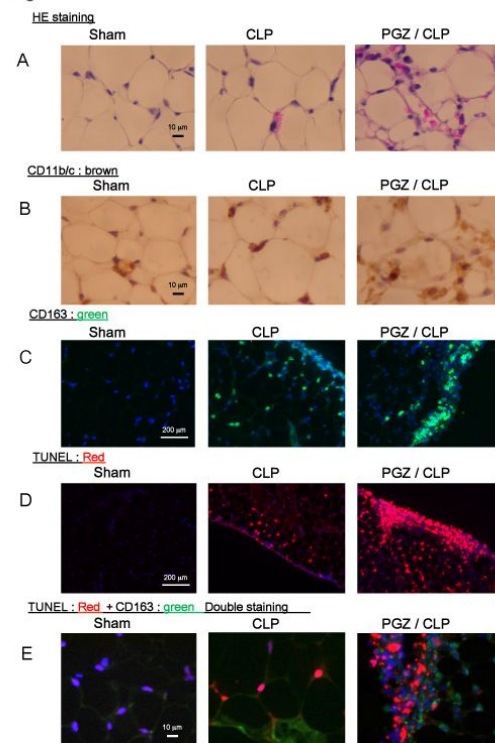


(4) 脂肪組織の hematoxylin-eosin 染色では, C 群は形態的な変化は認めなかったが, P 群

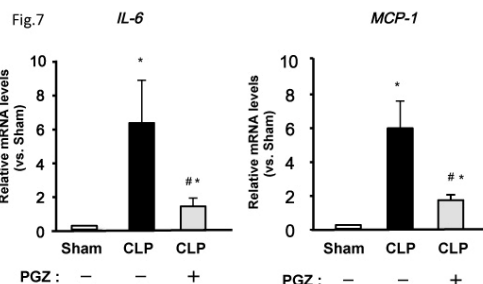
では浸潤する細胞数が増加した (Fig.6A). 免疫組織学的染色では, CD11b/c 陽性細胞と CD163 陽性細胞は P 群において, 単核球と M1・M2 マクロファージを含めた全てのマクロファージの細胞数増加を認めた (Fig.6B,C). CD163 陽性細胞においては, C 群でも増加を認め, CLP による敗血症だけでもマクロファージの細胞数増加を示した. また, PPAR- γ アゴニスト投与によって脂肪組織へマクロファージが移動することが示された.

TUNEL 法では, 脂肪組織内の細胞死アポトーシスの程度を検討した. TUNEL 陽性細胞は, S 群では認めなかったが, C 群で有意に認められた (Fig.6D). P 群においても, 脂肪組織内に TUNEL 陽性細胞数の増加が認められた. TUNEL 法と CD163 の二重染色法では, CD163 陽性細胞ではアポトーシスでは認めなかったことから, マクロファージは細胞死せず機能していた (Fig.6E).

Fig.6



(5) 脂肪組織の炎症性サイトカイン IL-6, MCP-1 の mRNA 発現は, C 群は S 群に比して有意に高値であったが PPAR- γ アゴニスト投与によってその上昇を有意に予防できた (Fig.7).



結語：マウス CLP に対する M1・M2 マクロファージの脂肪組織への浸潤が重要な役割を担っているかを検討した。CLP によって脂肪組織内にマクロファージが浸潤した。PPAR- γ アゴニスト前投与は、脂肪組織内へのマクロファージ動向に影響を与え、炎症性サイトカイン値の上昇を軽減し、生存率を改善した。PPAR- γ アゴニストによって脂肪組織および M1・M2 マクロファージの割合を変化させることによって、脂肪組織の炎症反応が軽減する可能性が示唆された。

M1・M2 マクロファージと脂肪組織のクロストーク機構は、外科的敗血症の機序の解明に重要であると考えられた。

今後の展望および課題：外科的侵襲時の脂肪組織機能において、明らかにし、さらに PPAR- γ アゴニストを用いて脂肪組織機能を活性化して脂肪組織における M1/M2 マクロファージとのクロストーク機構を解明する。

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 7 件)

Kutsukake M, Matsutani T, Tamura K, Matsuda A, Kobayashi M, Tachikawa E, Uchida E. Pioglitazone attenuates lung injury by modulating adipose inflammation. *J Surg Res* 査読有 189(2): 2014, 295-303, doi: 10.1016/j.jss.2014.03.007.

Akagi I, Ishibashi O, Matsutani T, Hagiwara N, Matsuda A, Nomura T, Makino H, Yoshida H, Miyashita M, Uchida E. Comprehensive analysis of microRNA and mRNA expression in normal and tumorous human esophageal squamous cell lines using microarray datasets. *Dataset Papers Science* 査読有 2014, Article ID 376541, 3 pages

Matsuda A, Yang WL, Jacob A, Aziz M, Matsuo S, Matsutani T, Uchida E, Wang P. FK866, a visfatin inhibitor, protects against acute lung injury after intestinal ischemia-reperfusion in mice via NF- κ B pathway. *Ann Surg* 査読有 259(5): 2014, 1007-17, doi: 10.1097/SLA.0000000000000329.

Matsuda A, Miyashita M, Matsumoto S, Matsutani T, Sakurazawa N, Takahashi G, Kishi T, Uchida E. Comparison of long-term outcomes of colonic stent as “Bridge to Surgery” and emergency surgery for malignant large-bowel obstruction: A

meta-analysis. *Ann Surg Oncol* 査読有 22(2): 2014, 497-504, doi: 10.1245/s10434-014-3997-7.

Matsutani T, Tamura K, Kutsukake M, Matsuda A, Tachikawa E, Uchida E. Impact of Pioglitazone on Macrophage Dynamics in Adipose Tissues of Cecal Ligation and Puncture-Treated Mice. *Biol Pharm Bull*. 査読有 40(5): 2017, 638-644, doi: 10.1248/bpb.b16-00883.

松田明久, 宮下正夫, 松谷 毅, 若林秀幸, Wang Ping, 内田英二. ショック領域のトランスレーショナルリサーチ MFG-E8 に着目したショックにおける過剰な炎症反応制御の可能性. *日本 Shock 学会雑誌* 査読無 28(2): 2014, 63-68.

松田 明久, 宮下正夫, 山田真吏奈, 松本智司, 川野陽一, 松谷 毅, 山田岳史, 内田英二. 外科侵襲とアディポサイトカイン ビスファチンに注目して 外科と代謝・栄養 査読有 51(1): 2017, 33-39.

〔学会発表〕(計 4 件)

若林秀幸, 松谷 毅, 松田明久, 萩原信敏, 松下 晃, 水口義昭, 篠塚恵理子, 野村 務, 内田英二. マウス盲腸穿孔結紮術により誘導される脂肪および肺組織炎症に対するピオグリタゾン前投与の効果. 第 114 回日本外科学会定期学術集会, 2014 年 4 月 3 日~5 日, 京都府京都市

松田明久, 宮下正夫, 松谷 毅, 松本智司, 高橋吾郎, 若林秀幸, 内田英二. 腸管虚血再灌流障害における visfatin 阻害剤の急性肺障害抑制効果. 第 114 回日本外科学会定期学術集会, 2014 年 4 月 3 日~5 日, 京都府京都市

田村和弘, 松谷 毅, 松田明久, 立川英一, 内田英二. マウス敗血症モデルにおける脂肪組織内マクロファージの分布動向に及ぼすピオグリタゾンの影響. 第 30 回日本 Shock 学会総会, 2015 年 5 月 22 日~23 日, 東京都八王子市

松谷 毅, 松田明久, 萩原信敏, 野村 務, 藤田逸郎, 金沢義一, 柿沼大輔, 菅野仁士, 新井洋紀, 松下 晃, 住吉宏樹, 内田英二. マウス盲腸穿孔結紮術における脂肪組織内マクロファージに分布動向に及ぼすピオグリタゾンの効果. 第 116 回日本外科学会定期学術集会, 2016 年 4 月 14 日~16 日, 大阪府大阪市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1)研究代表者

松谷 毅 (MAYSUTANI TAKESHI)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：5 0 3 6 6 7 1 2

(2)研究分担者

松田 明久 (MATSUDA AKIHISA)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：0 0 3 6 6 7 4 1