

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660112

研究課題名(和文)肥満白色脂肪組織の慢性炎症を非侵襲的に評価する

研究課題名(英文)A new non-invasive in vivo model for evaluation of the adipose inflammatory state.

研究代表者

矢中 規之(Yanaka, Noriyuki)

広島大学・生物圏科学研究科・准教授

研究者番号：70346526

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：in vivoにおける肥満脂肪組織へのマクロファージの浸潤に関連して発現上昇する因子群の中からserum amyloid A3 (saa3) 遺伝子を単離した。saa3遺伝子のプロモーター領域にluciferase遺伝子を連結したキメラ遺伝子を導入したトランスジェニック(Tg)マウスを作出した。食事誘導性の肥満を誘導した際のin vivoイメージング解析を行った結果、高脂肪食を摂取させたTgマウスにおいて脂肪組織に相当する領域に化学発光を認め、脂肪組織の慢性炎症を反映していると考えられた。同Tgマウスは慢性炎症を抑制する食品素材を評価する非侵襲モデルとして利用可能であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The infiltration of macrophages into adipose tissue and their interaction with adipocytes are essential for the chronic low-grade inflammation of obese adipose tissue. In this study, we identified the serum amyloid A3 (Saa3) gene that is affected by interaction with macrophages. We showed that the Saa3 promoter in adipocytes actually responds to activated macrophages in a co-culture system. Decreasing C/EBP abundance in 3T3-L1 adipocytes or point mutation of C/EBP elements suppressed the increased promoter activity in response to activated macrophages, suggesting an essential role of C/EBP in Saa3 promoter activation. Bioluminescence based on Saa3 promoter activity in Saa3-luc mice was promoted in obese adipose tissue, showing that Saa3 promoter activity is most likely related to macrophage infiltration. This study suggests that the level of expression of the Saa3 gene could be utilized for the inflammation of obese adipose tissue.

研究分野：分子栄養学

キーワード：肥満 脂肪組織 炎症 非侵襲 化学発光 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

内臓脂肪型肥満を背景として発症するメタボリックシンドロームは、肥満の進行に伴う白色脂肪組織の持続的、かつ軽微な慢性炎症が全身の代謝異常を引き起こす基盤病態である。最近では、肥満脂肪組織内に浸潤する単球・マクロファージ細胞（以下、マクロファージ）と脂肪細胞との相互作用が脂肪組織内の慢性炎症を惹起し、インスリン抵抗性などの代謝異常に寄与する重要な病態シグナルとして報告されている。一方で、肥満における脂肪組織のリモデリングが極めて複雑である中で、脂肪細胞とマクロファージの両細胞間の相互作用に基づく病態現象を特異的に解析することは困難であり、肥満脂肪組織における慢性炎症のメカニズムの詳細は不明なままである。一方、脂肪組織の慢性炎症の予防や軽減を目指した食品機能に関する報告例は増加しているが、その機能性の評価では、解剖時に摘出した組織の炎症性因子の定量解析や組織化学解析に限定され、その手法は煩雑であり、また食品機能の評価の上では不十分である。さらに、機能性試験では、多数の実験動物が使用され、その実施内容などにおいて、動物愛護の面で社会的問題を含んでいる。しかし近年では、生体内の微弱な化学発光や蛍光を体外から非侵襲的に観察できる *in vivo* イメージング技術が開発され、低侵襲性の動物実験として利用されつつある。

2. 研究の目的

本研究では、*in vivo* における脂肪細胞とマクロファージとの相互作用に基づく遺伝子発現解析を通して、マクロファージの脂肪組織への浸潤によって引き起こされる軽微な慢性炎症や代謝異常の成因となる脂肪細胞由来の因子の単離を試みるとともに、マクロファージ浸潤量を反映する脂肪細胞由来の遺伝子を選抜し、同遺伝子のプロモーター活性を利用した *in vivo* イメージングによって、肥満脂肪組織の慢性炎症を非侵襲的に評価する新たな動物病態モデルの構築を目指した。肥満白色脂肪組織の慢性炎症の新たな動物評価系の確立を目指す一方で、マクロファージと白色脂肪組織との相互作用に対して抑制効果を有する天然成分を探索し、新たな機能性食品素材としての応用展開することを研究目的とした。

3. 研究の方法

遺伝性肥満 db/db マウス、および野生型 db/+ マウスの精巣周囲白色脂肪組織における 2 群間の遺伝子発現変動を DNA マイクロアレイ法により解析し、db/db マウスの脂肪組織において発現量が有意に増加する遺伝子を単離した。マウスマクロファージ RAW264.7 細胞 (RAW 細胞) とマウス脂肪細胞株 3T3-L1 細胞との共存培養を行い、*in vivo* において単離したマクロファージの浸潤に関連する

伝子群を単離し、特にマクロファージとの共存培養にตอบสนองして脂肪細胞において発現上昇する候補遺伝子群を選抜した。候補遺伝子として *serum amyloid A3 (saa3)* 遺伝子を単離し、*saa3* 遺伝子の 5' 上流領域 (-314/+50) をルシフェラーゼ遺伝子と連結した Saa3-Luc を構築した。さらに、*saa3* 遺伝子の 5' 上流領域 (-314/+50) に存在する CCAAT/enhancer binding protein β (Cebp β) 結合配列に変異を導入した変異プロモーターを作製した (Saa3mut-Luc)。レトロウイルス法を用いて Saa3-Luc、および Saa3mut-Luc をマウス脂肪細胞 3T3-L1 細胞に形質転換し、RAW 細胞との共存培養を行った。さらに Saa3-Luc を導入したトランスジェニック (Tg) マウスを作出し、ゲノム解析を行うことで系統を選抜した。高脂肪食負荷により食餌性肥満を誘導し、D-luciferin を腹腔内投与後、*in vivo* イメージング解析に供した。抗炎症作用を有する化合物の探索においては、レトロウイルス法を用いて Saa3-Luc を形質転換したマウス脂肪細胞 3T3-L1 細胞 (3T3-L1/saa3-luc 細胞) と RAW 細胞との共存培養、あるいは活性化させた RAW 細胞の培養上清で 3T3-L1/saa3-luc 細胞を刺激する際に天然成分を同時に添加し、ルシフェラーゼ活性の抑制効果を指標にスクリーニングを行った。

4. 研究成果

(1) *in vivo* の肥満脂肪組織におけるマクロファージと脂肪細胞との相互作用の解明
 遺伝性肥満 db/db マウス、および野生型 db/+ マウスの精巣周囲白色脂肪組織における 2 群間の遺伝子発現変動を DNA マイクロアレイ法により解析し、db/db マウスの脂肪組織において発現量が有意に増加する 1, 810 遺伝子を単離した。一方、抗炎症作用を有する栄養素である vitamin B6 (B6) を高含量で摂取させたマウスでは、肥満脂肪組織へのマクロファージの浸潤が抑制されることを見出されたことから、本研究では、B6 を高含量で摂取させたマウスを、肥満脂肪組織におけるマクロファージの浸潤に関連した病態遺伝子群を *in vivo* において特異的に抽出する動物モデルとして利用することを考案した。すなわち、先の 1, 810 遺伝子の中から、マクロファージの浸潤が抑制された高 B6 摂取マウスの脂肪組織において発現量が有意に低下している遺伝子群 262 個を単離した。その遺伝子群には、マクロファージのマーカー遺伝子やケモカイン類などが多数含まれており、マクロファージの浸潤に関連した遺伝子群が効率的に単離できていると考えられた。さらには、マウスマクロファージ RAW264.7 細胞 (RAW 細胞) とマウス脂肪細胞株 3T3-L1 細胞との共存培養を行い、*in vivo* において単離したマクロファージの浸潤に関連する 262 個の遺伝子群の中で、特にマクロファージとの共存培養にตอบสนองして脂

肪細胞において発現上昇する候補遺伝子群を選抜した。選抜した因子群の中で、マクロファージとの相互作用によって脂肪細胞において著しく発現量が増加する炎症性遺伝子として pentraxin 3 (Ptx3) などを同定した。

(2) マクロファージとの相互作用によって脂肪細胞において発現増加する Ikke の単離遺伝子発現解析により、Ikke は db/db マウス、および食餌誘導性肥満マウスの白色脂肪組織において、正常マウスと比較して有意に発現量が高かった。また肥満マウスおよび正常なマウスの脂肪組織からコラゲナーゼを用いた酵素分散法により単離した成熟脂肪細胞における Ikke の発現量を real-time PCR 法により解析した結果、肥満マウスの白色脂肪組織より単離した成熟脂肪細胞において Ikke 遺伝子は高発現していた。さらには肥満脂肪組織におけるマクロファージ数と Ikke の発現量には有意な正の相関が認められたことから、Ikke は、肥満脂肪組織へのマクロファージの浸潤に反応して脂肪細胞において発現量が増加することが明らかになった。

(3) 白色脂肪組織の慢性炎症の可視化を目指したイメージングモデルマウスの作出
脂肪組織の慢性炎症を非侵襲的に評価しうる新規動物モデルの確立を目指し、マクロファージ浸潤量のモニターに利用可能な脂肪細胞由来の遺伝子の同定を行った。in vivo における肥満脂肪組織へのマクロファージの浸潤に関連する因子群の中で、マクロファージの浸潤量の増加に反応する脂肪細胞由来の因子であり、さらに db/db マウスの脂肪組織において組織選択的に遺伝子発現が誘導する因子群の選抜を行い、候補遺伝子として serum amyloid A3 (saa3) 遺伝子を単離した。saa3 遺伝子の 5'上流領域 (-314/+50) を単離し、ルシフェラーゼ遺伝子と連結した Saa3-Luc を構築した。レトロウイルス法を用いて Saa3-Luc をマウス脂肪細胞 3T3-L1 細胞に形質転換し、RAW 細胞との共存培養を行った結果、saa3 遺伝子のプロモーター活性は、マクロファージの活性化に反応して増加することを確認した。一方、CCAAT/enhancer binding protein β (Cebp β)結合配列に変異を導入した変異プロモーター Saa3mut-Luc をマウス脂肪細胞 3T3-L1 細胞に形質転換し、RAW 細胞との共存培養を行った結果、saa3 遺伝子の変異型プロモーターの活性は上昇しなかった。さらに Saa3-Luc を導入したトランスジェニック (Tg)マウスを作出し、ゲノム解析を行うことで 10-3 系統を選抜した。10-3 系統を高脂肪食負荷により食餌性肥満を誘導し、D-luciferin を腹腔内投与後、in vivo イメージング解析に供した。その結果、高脂肪食を摂取した Tg マウスにおいて脂肪組織に相当する領域に化学発光を認めた。さらには、Tg マウスの主要な組織を摘出し、in vitro でのルシフェラーゼ活性を測定した結果、肥満脂

肪組織においてルシフェラーゼ活性の有意な上昇を確認した。Saa3 プロモーター領域の制御下のルシフェラーゼ遺伝子と脂肪組織特異的 adiponectin プロモーターに連結した近赤外蛍光タンパク質 FP635 遺伝子のダブルトランスジェニックマウスを作製し、慢性炎症を誘導させた脂肪組織特異的な検出を試みた。脂肪組織特異的な蛍光観察を行うために、adiponectin プロモーター遺伝子に FP635 遺伝子を連結させた adipo-FP635 を構築し、ダブルトランスジェニックマウスの作製、および選別を行った。ダブルトランスジェニックマウスの樹立については、ゲノム PCR によって判定し、両 DNA の陽性ライン (F0 マウス) を選別して繁殖を行った。繁殖の結果、産仔 (F1 マウス) を戻し交配を繰り返すことで、ジェノミックバックグラウンドを C57BL 系統に移し換えた。しかしながら、FP635 に基づく蛍光は観察されず、また白色脂肪組織切片、および組織抽出物を用いた蛍光測定によっても検出されなかった。その理由として、本研究では脂肪組織特異的な adiponectin プロモーターを利用したが、そのプロモーター活性が極めて弱かったために、蛍光タンパク質の発現量が検出できなかったと考えられた。

(3) 白色脂肪組織の慢性炎症を抑制する化合物の探索

3T3-L1/saa3-luc 細胞をプレートに播種し、分化誘導させ、8 日目に約 50 種類の天然成分を 20 μ M になるように添加した後、LPS 刺激した RAW 細胞の培養上清を添加することで炎症反応を誘導した。24 時間培養し、細胞を回収してルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、berberine がルシフェラーゼ活性を濃度依存的に抑制する成分として単離された。

本研究では、肥満脂肪組織でのマクロファージの浸潤量に基づく化学発光量を慢性炎症の評価の指標とする動物評価系の構築を目指した。以前、炎症性の転写因子である NF- κ B を利用した炎症を可視化するイメージングモデルマウスが開発されているが、全身での高い化学発光を示すなど、脂肪組織の慢性炎症を特異的に評価するイメージングモデルではなかった。本研究で作出した Saa3-luc Tg マウスは、食餌誘導性の肥満の発症時に脂肪組織において選択的にルシフェラーゼ由来の化学発光が観察されたことから、脂肪組織の慢性炎症の発症、および病態進行をリアルタイムに解析できる非侵襲モデルとして利用可能である。さらには、dextran sulfate sodium (DSS) による薬剤誘導性の大腸炎や関節リウマチにおいて saa3 が有望な病態マーカーとなりうる可能性が示されており、今後は、他炎症性疾患モデルへの応用を目指し、saa3 遺伝子の種々の病態組織における発現解析や従来の病態マーカーとの比較解析が必要である。マクロファージの脂肪組織への浸潤量を反映する因

子として *saa3* 遺伝子を利用したが、*saa3* 遺伝子のプロモーター領域においては CCAAT/enhancer binding protein β (Cebp/ β)が重要な役割を担っていることを示唆する研究成果も得られ、浸潤したマクロファージの活性化に応答した Cebp/ β の病態への関与のメカニズムの解明につながると期待されるとともに、Cebp/ β の活性化を抑制する化合物は新たな炎症効果を有する可能性が期待された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Sanada Y, Yamamoto T, Satake R, Yamashita A, Kanai S, Kato N, van de Loo FA, Nishimura F, Scherer PE, Yanaka N, Serum Amyloid A3 Gene Expression in Adipocytes is an Indicator of the Interaction with Macrophages, *Sci. Rep.*, 査読有, 2016, 6 巻, pp38697

DOI: 10.1038/srep38697

Ohshima N, Kudo T, Yamashita Y, Mariggio S, Araki M, Honda A, Nagano T, Isaji C, Kato N, Corda D, Izumi T, Yanaka N, New members of the mammalian glycerophosphodiester phosphodiesterase family: GDE4 and GDE7 produce lysophosphatidic acid by lysophospholipase D activity, *J. Biol. Chem.*, 査読有, 2015, 290 巻, pp4260-4271

DOI: 10.1074/jbc.M114.614537

Sanada Y, Kumoto T, Suehiro H, Yamamoto T, Nishimura F, Kato N, Yanaka N, I B kinase epsilon expression in adipocytes is upregulated by interaction with macrophages, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有, 2014, 78 巻, pp1357-1362

DOI: 10.1080/09168451.2014.925776.

〔学会発表〕(計3件)

佐竹 里香, SAA3 プロモーターを利用した慢性炎症の *in vivo* imaging、および C/EBP の役割, 日本農芸化学会大会, 2016年3月28日, 札幌

Sanada Y, *In vivo* imaging of adipose tissue inflammation by using Saa3 promoter activity. The 12th Asian Congress of Nutrition (ACN2015), May 14-18 2015, Yokohama

山本 岳史, *In vivo* imaging による化学発光を指標とした DSS 誘導性の新しい評価法の構築, 日本農芸化学会大会, 2015年3月27日, 岡山

6. 研究組織

(1)研究代表者

矢中 規之 (YANAKA NORIYUKI)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・准教授

研究者番号：70346526