

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840038

研究課題名(和文) マクロファージ由来の生理活性物質による脂肪蓄積制御機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of the regulatory mechanism for fat accumulation via the bioactive peptides derived from macrophages

研究代表者

秋枝 さやか (AKIEDA, SAYAKA)

宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・助教

研究者番号：20549076

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)：申請者らが作出したマクロファージ特異的グアニリン/GC-Cダブルトランスジェニックラット(dTg)は高脂肪食に耐性を示す。本研究では、dTgラットから採取したグアニリン/GC-C発現マクロファージの炎症性マーカー(M1)を検討したところ、高脂肪食を摂取してもM1マーカーの発現が低いことが認められた。また、グアニリン/GC-C発現マクロファージは飽和脂肪酸によりグアニリンおよびGC-Cの発現が増加し、脂肪酸に対して走化性が高いことから、グアニリン/GC-C発現マクロファージは脂肪酸に特異的な性質を持ち、炎症を阻止する機構が作動することで、慢性炎症や肥満を制御している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recently, we showed that double-transgenic (dTg) rats overexpressing guanylin (Gn) and its receptor, GC-C, specifically in macrophages did not become obese even when fed a high-fat diet. In this study, to characterize macrophages expressing Gn and GC-C, we analyzed the expression of the M1 markers of macrophages isolated from dTg and wild type (WT) rats. The expression of proinflammatory cytokines and M1 macrophage markers were expressed at a significantly lower level in the macrophages of dTg rats than in those of WT rats. We also found that the chemotaxis of Gn/GC-C macrophages incubated with fatty acids significantly increases compared to the macrophages of WT rats. Our results suggest that the low levels of proinflammatory markers in Gn/GC-C macrophages at least in part contribute to the anti-obese phenotype of dTg rats. In addition, the accelerated chemotaxis of Gn/GC-C macrophages in response to fatty acids suggests that these macrophages can uniquely react to excess fatty acids.

研究分野：内分泌学、代謝学

キーワード：マクロファージ 肥満 生理活性物質 エネルギー代謝調節 グアニリン 脂肪細胞

## 1. 研究開始当初の背景

申請者は、高脂肪食を摂取しても肥満を呈さないラットの内臓脂肪組織を用いて、発現遺伝子の網羅的解析により、本来、消化管上皮で産生され、水・電解質代謝に機能する生理活性ペプチド；グアニリンとその受容体であるグアニリル酸シクラーゼC(GC-C)がマクロファージに高発現していることを見出した(Akieda et al., J Lipid Res, 2013)。

これまでマクロファージにおけるグアニリン/GC-Cの機能や肥満との関連については研究されていなかったことから、申請者はマクロファージ特異的にグアニリン/GC-Cを過剰発現させたダブルトランスジェニック(dTg)ラットを作製し、同ラットが高脂肪食を摂取しても肥満や脂肪肝を呈さないことを明らかにしてきた。さらに、脂肪細胞とグアニリン/GC-C発現マクロファージの共培養では、脂肪蓄積が抑制されることも報告している。これらのことから、グアニリン/GC-Cシステムは、肥満の基礎病態である慢性炎症の制御や脂質代謝制御に機能している可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究成果を基盤として、グアニリン/GC-C発現マクロファージの炎症状態における特性を明らかにするとともに、同マクロファージの産生する肥満制御因子を探索し、グアニリン/GC-Cシステムの新たな脂肪蓄積制御機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) グアニリン/GC-C発現マクロファージの機能的特性の解析

近年、内臓脂肪型肥満の基盤病態として脂肪組織に浸潤したマクロファージなどの炎症性細胞が慢性炎症を引き起こし、肥満をさらに進行させることが知られている。本研究では、dTgラットが肥満抵抗性を示す機序を解明するために、グアニリン/GC-C発現マクロファージの炎症性マーカーや遊走能・貪食能を検討した。

#### 炎症性マーカーの検討

dTg ラットおよび野生型(WT)ラットにチオグリコール酸を腹腔内に投与し、4日後に

腹腔内マクロファージを採取した。また、腸間膜脂肪組織をコラゲナーゼ処理し、マクロファージを含む stromal vascular fraction (SVF)を回収した。単離した腹腔内マクロファージや SVF の炎症性サイトカイン(TNF $\alpha$ , MCP-1)や炎症性マーカー(IL1 $\beta$ , CCR2, CD11c, Cox-2, iNOS)、あるいは抗炎症マーカー(IL10, CD206, Arg1)の発現をdTgラットとWTラットとで比較した。

#### 遊走能の検討

WTラットやdTgラットから単離したマクロファージを用いて、MCP-1や脂肪酸刺激による遊走能を検討した。

### (2) グアニリン/GC-C発現制御機序および細胞内シグナルの検討

本研究では下記の方法で、脂肪酸によるグアニリン/GC-Cの発現機序および細胞内シグナル経路を明らかにした。

#### グアニリン/GC-C発現制御機序の検討

グアニリン/GC-C発現マクロファージ細胞株に、飽和脂肪酸(ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸)や不飽和脂肪酸(オレイン酸、リノール酸、リノレン酸)をそれぞれ添加し、各脂肪酸によるグアニリンおよびGC-Cの発現量の変化を検討する。脂肪酸は、マクロファージのToll-like receptorを介してNF- $\kappa$ Bのカスケードを亢進させ、炎症性サイトカインなどの発現を制御していることが知られている。本研究では、NF- $\kappa$ B経路の阻害剤を使用し、脂肪酸添加後のグアニリンやGC-Cの発現調節とNF- $\kappa$ Bカスケードとの関連を検討した。

#### グアニリン/GC-Cシステムの細胞内シグナルの検討

通常食あるいは高脂肪食で飼育したdTgラットの腸間膜脂肪組織を用いて、グアニリン/GC-CシステムのセカンドメッセンジャーであるcGMP量やcGMP依存性のプロテインキナーゼ(PKG)の発現量をWTラットと比較した。

### (3) グアニリン/GC-C発現マクロファージ由来の液性因子の探索

先行研究で、グアニリン/GC-C 発現マクロファージとラット初代脂肪細胞とを共培養

すると、脂肪の蓄積が抑制されることを明らかにしている。また、同マクロファージの培地を脂肪細胞の培地に添加した場合でも、脂肪細胞の脂肪蓄積や脂肪酸合成酵素(Fas)の発現が有意に低下することが明らかになっている。そこで、グアニリン/GC-C発現マクロファージの培養液からゲル濾過クロマトグラフィーなどによりペプチドを抽出・精製した後、脂肪細胞の培地に添加して培養し、脂肪の蓄積抑制および Fas の発現低下を指標に、脂肪蓄積抑制に関わる液性因子を探索した。

#### 4. 研究成果

##### (1) グアニリン/GC-C発現マクロファージの機能的特性の解析

###### 炎症性マーカーの検討

dTg ラットから採取した腹腔内マクロファージは、WT ラットに比べ、炎症性マーカーである CD11c、IL1 $\beta$ 、MCP-1、CCR2 の mRNA 発現量が有意に低下していた。一方で、抗炎症性マーカーである CD206、IL10、Arg1 には両群の間に有意な差は認められなかった。

また、WT ラットの SVF では、高脂肪食摂取により炎症性マーカーである TNF $\alpha$ 、MCP-1、CD11c、Cox-2、iNOS の発現が有意に増加したが、dTg ラットから採取した SVF では高脂肪食を摂取させても、これらの炎症性マーカーの発現は増加しなかった。

###### 遊走能の検討

dTgラットから採取した腹腔内マクロファージに脂肪酸を添加した場合には、WTラットに比べて遊走能が有意に高いことが明らかになった。一方で、炎症性サイトカインの MCP-1 を添加した場合には WTラットと Tgラットの間に有意な差は認められなかった。

##### (2) グアニリン/GC-C発現制御機序および細胞内シグナルの検討

###### グアニリン/GC-C発現制御機序の検討

グアニリン/GC-C 発現マクロファージは、飽和脂肪酸であるラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸の刺激に対して、グアニリンおよび GC-C の mRNA 発現量が有意に増加した。一方で、不飽和脂肪酸のオレイン酸、リノール酸、リノレン酸に対しては、グアニリンおよび GC-C の mRNA 発現量に変化は認められなかった。また、飽和脂肪酸によるグアニリンおよび GC-C mRNA 発現量の増加は、NF-kB 阻害剤の添加により濃度依存的に抑制された。さらに、NF-kB コンセンサス配列を用いたゲルシフトアッセイにより、グアニリン

/GC-C 発現マクロファージの核分画タンパク質と結合することを確認した。現在、グアニリンおよび GC-C のプロモーター領域の 5'-deletion mutant を作成し、脂肪酸によるグアニリンおよび GC-C の転写制御調節に重要なプロモーター領域を明らかにするためレポーターアッセイを行っている。

##### 腸間膜脂肪組織のグアニリン/GC-Cシステムの細胞内シグナルの検討

グアニリン/GC-CシステムのセカンドメッセンジャーであるcGMP量は、WTラットよりTgラットで増加していることを確認した。また、高脂肪食を摂取したdTgラットでは、cGMP依存性のプロテインキナーゼ(PKG)の発現量が、WTラットに比べ、顕著に増加していた。

##### (3) グアニリン/GC-C発現マクロファージ由来の液性因子の探索

グアニリン/GC-C 発現マクロファージの培養液からペプチド画分を採取し凍結乾燥した後、脂肪細胞の培地に添加して培養した結果、Fas の発現低下が認められた。現在、脂肪蓄積抑制に寄与するペプチドの同定を行っている。

#### 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)

1. Utoyama M, Akieda-Asai S, Koda S, Nuno H, Date Y: Role of the neural pathway from hindbrain to hypothalamus in the regulation of energy homeostasis in rats. *Neurosci Lett*, 12, 83-88, 2016, 査読有  
DOI:10.1016/j.neulet.2016.01.005.
2. Hasegawa K, Akieda-Asai S, Fujii Y, Yasuda M, Date Y: Guanylin-Guanylyl Cyclase-C signaling in macrophages regulates mesenteric fat inflammation induced by high-fat diet, *Endocr J* 62, 939-947, 2015, 査読有  
DOI:10.1507/endocrj.EJ15-0193.
3. Hasegawa K, Akieda-Asai S, Date Y: Characterization of inflammatory gene expression and chemotaxis of macrophages guanylin and guanylyl cyclase-C, *Am J Life Sci*, 3, 43-47, 2015, 査読有

- DOI: 10.11648/j.ajls.s.2015030302.18
4. Akieda-Asai S, Poleni PE, Hasegawa K, Date Y: Role of the neural pathway from hindbrain to hypothalamus in interaction of GLP1 and leptin in rats. J Endocrinol, 220, 109-116, 2014, 査読有  
DOI:10.1530/JOE-13-0272.
  5. Bae CR, Hasegawa K, Akieda-Asai S, Kawasaki Y, Senba K, Cha YS, Date Y: Possible involvement of food texture in insulin resistance and energy metabolism in male rats. J Endocrinol, 222, 61-72, 2014, 査読有  
DOI:10.1530/JOE-13-0553.
  6. Akieda-Asai S, Poleni PE, Date Y: Coinjection of CCK and leptin reduces food intake via increased CART/TRH and reduced AMPK phosphorylation in the hypothalamus. Am J Physiol Endocrinol Metab, 306, E1284-E1291, 2014, 査読有  
DOI: 10.1152/ajpendo.00664.2013
  7. Bae CR, Hasegawa K, Akieda-Asai S, Kawasaki Y, Cha YS, Date Y: The short-term effects of soft pellets on lipogenesis and insulin sensitivity in rats. Prevent Nutr Food Sci, 19, 164-169, 2014, 査読有  
DOI:10.3746/pnf.2014.19.3.164.

〔学会発表〕(計7件)

1. 長谷川和哉, 秋枝さやか, 伊達紫: 抗肥満ラットにおけるGuanylin/GC-Cの作用. 第6回ペプチド・ホルモン研究会, 能登, 16 October, 2015
2. 長谷川和哉, 山田千紘, 日高綾乃, 秋枝さやか, 伊達紫: マクロファージのグアニリン/GC-Cが炎症性サイトカイン発現と走化性に与える影響. 第36回日本肥満学会, 名古屋, 3 October, 2015
3. 秋枝さやか, 宇藤山麻衣子, 長谷川和哉, 山田千紘, 日高綾乃, 伊達紫: 延髄-視床下部の神経遮断によるエネルギー代謝への影響. 第36回日本肥満学会, 名古屋, 3 October, 2015
4. 秋枝さやか: 軟らかい食物がインスリン抵抗性や脂質代謝異常を引き起こす分子機序の解明. 第36回日本肥満学会, 名古屋, 2 October, 2015
5. 秋枝さやか, 長谷川和哉, 山田千紘, 日高綾乃, 宇藤山麻衣子, 宮里幹也, 寒川賢治, 伊達紫: マクロファージにおける

- グアニリン/グアニル酸シクラーゼCの発現調節機構の解明. 第88回日本内分泌学会学術総会, 東京, 23 April, 2015
6. Urushizaki S, Tani C, Akieda S, Ano H, Date Y, Yasuda M, Nishino K, Goto Y, Katamoto H; Inflammatory changes of adipose tissue and pancreatitis in cattle with fat necrosis. XXVIII World Buiatrics Congress, Carins (Australia), 27 July-1 August, 2014
  7. 秋枝さやか, 長谷川和哉, 宮澤崇, 宮里幹也, 寒川賢治, 伊達紫: グアニリン/GC-C システムの肥満抵抗性に関する研究. 第87回日本内分泌学会学術総会, 福岡, 24 April, 2014

〔その他〕

ホームページ等

宮崎大学 フロンティア科学実験総合センター・生理活性物質機能解析分野  
<http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/peptides/date/jp/>

宮崎大学 医学獣医学総合研究科プロジェクト  
<http://www.miyazaki-u.ac.jp/ijudaigakuin/pj/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

秋枝 さやか (AKIEDA SAYAKA)

宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・助教

研究者番号: 20549076

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

伊達 紫 (DATE YUKARI)

宮崎大学・理事

研究者番号: 70381100