

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390261

研究課題名（和文） 脂肪組織リモデリングと脂肪毒性の分子機構の解明

研究課題名（英文） Molecular mechanism of adipose tissue remodeling and lipotoxicity

研究代表者

小川 佳宏（OGAWA YOSHIHIRO）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：70291424

研究成果の概要（和文）：

メタボリックシンドロームの基盤病態として慢性炎症が注目されており、肥満の脂肪組織における脂肪細胞とマクロファージの相互作用が脂肪組織機能（アディポサイトカイン産生調節や中性脂肪蓄積）の障害を介して全身の糖脂質代謝異常に繋がる。本研究では、脂肪細胞の肥大化や脂肪組織マクロファージの活性化に関する新たな分子機構が明らかになり、メタボリックシンドロームの新しい治療戦略の創出に資すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Evidence has accumulated indicating that obesity is associated with a state of chronic, low-grade inflammation, suggesting that inflammation may be a potential mechanism, whereby obesity leads to the metabolic syndrome. We have demonstrated that the crosstalk between adipocytes and macrophages may aggravate obesity-induced adipose tissue inflammation. In this study, we provided evidence on the novel molecular mechanisms underlying the inflammatory changes in hypertrophied adipocytes and adipose tissue macrophages, which may lead to novel therapeutic strategies to prevent or treat the metabolic syndrome.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2009年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：内分泌代謝学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：脂肪組織、マクロファージ、炎症、肥満、遊離脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

脂肪組織は単なるエネルギー貯蔵器官としてのみならず、多くのアディポサイトカインを分泌する内分泌器官として多彩な生命現象に関与する。一方、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の基盤病態として全身の軽度の慢性炎症反応が指摘されており、その上流に位置する肥

満の脂肪組織そのものがマクロファージ浸潤に特徴付けられる炎症性変化をきたすことが知られている。最近では、非肥満の脂肪組織には非活性化 M2 マクロファージが存在するものの、肥満の脂肪組織では炎症性サイトカインを産生する活性化 M1 マクロファージが増加し、炎症性変化を促進するという。これにより過剰に産生される遊離脂肪酸は、

骨格筋や肝臓におけるインスリン抵抗性、膵細胞におけるインスリン分泌障害、血管内皮細胞や単球・マクロファージにおける炎症性サイトカイン産生やアポトーシスを誘導することが報告され、「脂肪毒性」の病態生理的意義が示唆されている。即ち、脂肪細胞の増殖・分化、肥大化によるケモカイン産生マクロファージ浸潤 脂肪細胞とマクロファージの相互作用により誘導される炎症性変化と脂肪分解 遊離脂肪酸による脂肪毒性の誘導という経時変化によりメタリックシンドロームの病態が進展すると考えられ、肥満の脂肪組織は「脂肪組織リモデリング」とも言うべきダイナミックな変化をきたすと考えられる。我々は既に、脂肪細胞の肥大化により代表的なケモカイン MCP-1 が誘導されること、この少なくとも一部には MAPK-phosphatase-1 (MKP-1) の低下による ERK 活性化が関与することを証明した (J. Biol. Chem. 282:25445-25452, 2007)。更に、脂肪細胞とマクロファージの共培養系を独自に確立し、脂肪細胞に由来する飽和脂肪酸が「TLR4 の内在性リガンド」としてマクロファージにおいて NF- κ B 経路を活性化すること、活性化されたマクロファージでは TNF α の産生が著しく増加し、これが脂肪細胞において MCP-1 産生と脂肪分解を誘導することを証明した (Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 25:2062-2068, 2005; Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 27:84-91, 2007; Biochem. Biophys. Res. Commun. 354:45-49, 2007)。一方、代表的な n-3 多価不飽和脂肪酸 (n-3PUFAs) である EPA が、肥満の脂肪組織における炎症性変化を抑制すること、飽和脂肪酸や LPS の炎症促進作用に強力に拮抗することを証明し、マクロファージに質的变化をもたらす可能性を提唱した (Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 27:1918-1925, 2007)。

従来、組織内の脂質含有量が全身のインスリン抵抗性の程度と比例することが知られており、中性脂肪やその代謝産物が脂肪毒性の成因として重要であると考えられている。一方、肝臓や骨格筋特異的に中性脂肪合成酵素 (DGAT) を過剰発現するトランスジェニックマウスでは、組織内の中性脂肪含有量が著しく増加するにもかかわらず、糖代謝が野生型マウスと同程度に保持されており、単なる細胞内脂質蓄積では脂肪毒性は誘導されないことが報告されている。最近では、飽和脂肪酸/TLR4 シグナルは、骨格筋や脂肪細胞あるいは血管内皮細胞におけるインスリン抵抗性に関連することが報告され、脂肪毒性における TLR4 の病態生理的意義が示唆されている。以上のように、脂肪組織の炎症性変化により増加する遊離脂肪酸の量的変化のみならず質的变化が脂肪毒性の成立に関与すると考えられる。以上の学術的背景と独自

の研究成果を踏まえて、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

- (1) 脂肪細胞の増殖・分化、肥大化の分子機構の解明
- (2) 脂肪細胞の肥大化により誘導されるマクロファージ浸潤の分子機構の解明
- (3) 脂肪細胞とマクロファージの相互作用の分子機構の解明
- (4) 全身臓器における「脂肪毒性」の分子機構の解明

3. 研究の方法

- (1) 肥満脂肪組織へのマクロファージ浸潤における単球遊走の分子機構の検討：
 - ・リアルタイム細胞動体測定装置 TAXIScan を用いた脂肪組織由来液性因子に対する細胞遊走能に関する検討
 - ・肥満脂肪組織へのマクロファージにおける骨髄細胞 CCR2 の意義に関する検討
- (2) 肥大化脂肪細胞における慢性炎症の分子機構の検討：
 - ・脂肪細胞特異的 MKP-1 トランスジェニックマウス (aP2-MKP-1 Tg) の作製と表現型の解析
- (3) マクロファージにおいて飽和脂肪酸により誘導される炎症性変化の分子機構の解明：
 - ・TLR4 シグナル活性化における transient receptor potential (TRP) チャネルの意義に関する検討
- (4) アディポサイトカイン・ヘパリン結合上皮成長因子様増殖因子 (HB-EGF) の産生調節機構に関する研究：
 - ・脂肪細胞における HB-EGF shedding の分子機構の検討

4. 研究成果

- (1) 肥満脂肪組織へのマクロファージ浸潤における単球遊走の分子機構の検討：
肥満の脂肪組織では脂肪細胞の肥大とともに血管新生やマクロファージ浸潤、炎症性変化がもたらされ、「脂肪組織リモデリング」とも言うべきダイナミックな変化をきたしている。脂肪組織リモデリングの主要病態の一つである脂肪組織へのマクロファージ浸潤には MCP-1/CCR2 系が重要であると考えられているが、単球遊走の分子機構には不明な点が多い。本研究では、細胞遊走を遊走速度と方向性に分けて解析することが可能なリアルタイム細胞動体測定装置 TAXIScan を用いて、脂肪組織由来液性因子に対する細胞遊走能を検討した。

マウス骨髄単核球細胞は、脂肪組織の培養上清に対して著明な走化性を示したが、CCR2 拮抗剤であるプロパゲルマニウムの添加により抑制された。CCR2 を強制発現させ

たヒト T リンパ球系 Jurkat 細胞も同様に、脂肪組織培養上清に対して強い走化性を示したが、プロパゲルマニウムの添加により抑制された。このとき、プロパゲルマニウムは、細胞遊走速度には影響を及ぼさず、方向性のみを阻害した。高脂肪食を負荷した KKA^y マウス、あるいは *ob/ob* マウスにプロパゲルマニウムを経口投与したところ、いずれのマウスにおいても非投与群と比較して、脂肪組織へのマクロファージ浸潤が有意に抑制された。骨髓移植法により作製した骨髓細胞特異的 CCR2 欠損 *ob/ob* マウスは、対照 *ob/ob* マウスと比較して、脂肪組織へのマクロファージ浸潤が有意に抑制された。

本研究により、骨髓細胞の CCR2 が、脂肪組織由来液性因子に対する細胞遊走の方向決定において重要であることが明らかになり、肥満の脂肪組織へのマクロファージ浸潤において骨髓細胞の CCR2 を介した細胞遊走の質的变化が関与する可能性が示唆された。細胞遊走の質的な評価により、肥満の病態形成における走化性因子の新たな役割が明らかになる可能性が期待された。

(2) 肥大化脂肪細胞における慢性炎症の分子機構の検討：

肥満の脂肪組織における MKP-1 の機能的意義を明らかにするために、aP2-MKP-1 Tg を作製した。このマウスの脂肪組織では野生型マウス (WT) と比較して MKP-1 タンパク質発現が増加しており、MAP キナーゼの活性低下が認められた。標準食飼育下では、aP2-MKP-1 Tg と WT の体重と随時血糖に有意差は認められなかった。高脂肪食負荷では、aP2-MKP-1 Tg と WT には経時的な体重増加、随時あるいは空腹時血糖には有意差はなかったが、血中インスリン濃度は aP2-MKP-1 Tg において低値を示した。インスリン負荷試験において、aP2-MKP-1 Tg では MKP-1 の発現量依存的に高脂肪食負荷によるインスリン抵抗性の改善が認められ、特に、肝臓におけるインスリンシグナルの改善が認められた。WT と比較して aP2-MKP-1 Tg は、高脂肪食負荷による中性脂肪の蓄積が有意に軽減した。また、3T3-L1 培養脂肪細胞に MKP-1 を過剰発現することにより、TNF 誘導性脂肪分解が有意に抑制された。以上より、脂肪細胞において MKP-1 は、過剰な中性脂肪の体内分布を制御することにより、全身の糖脂質代謝調節に働くことが示唆された。

(3) マクロファージにおいて飽和脂肪酸により誘導される炎症性変化の分子機構の解明：
我々は既に、肥満の脂肪組織では肥大化した脂肪細胞より放出された飽和脂肪酸がマクロファージに発現する TLR4 を活性化して炎症性サイトカイン産生を誘導することを証

明し、これが脂肪組織リモデリングの基盤病態になることを明らかにした。一方、マクロファージにおいて、TLR4 の活性化による炎症性サイトカイン産生に細胞内 Ca 濃度の上昇が必要であることが知られている。我々は、非選択的 TRPV チャンネル阻害剤が LPS 誘導性炎症性サイトカイン産生を強力に抑制することを見出した。マクロファージに発現する TRP ファミリーは TRPV2 のみであり、TRPV2 をロックダウンすることにより、LPS 刺激による細胞内 Ca 濃度の上昇と炎症性サイトカイン産生が有意に抑制された。以上より、TLR4 の新しい細胞内シグナル伝達経路が明らかとなり、炎症制御の標的となる可能性が示唆された。

(4) アディポサイトカイン HB-EGF の産生調節機構に関する研究：

HB-EGF は膜蛋白質として生合成され、切断酵素により切断 (shedding) されて放出されるユニークなアディポサイトカインである。肥満マウスでは、脂肪組織においてのみ HB-EGF 遺伝子発現が増加する。そこで、HB-EGF shedding の分子機構を解明するため、アルカリフォスファターゼ融合 HB-EGF を安定発現する 3T3-L1 脂肪細胞を作製し、HB-EGF shedding の検出系を確立した。インスリンは脂肪細胞において HB-EGF 遺伝子発現と shedding を誘導したが、未分化脂肪細胞では効果を示さなかった。メタロプロテアーゼ阻害薬を用いた検討により、インスリン誘導性 HB-EGF shedding の少なくとも一部は a disintegrin and metalloproteinase 17 (ADAM17) によることが示唆された。さらに、リコンビナント HB-EGF 添加により、脂肪細胞の HB-EGF shedding が誘導された。以上より、脂肪細胞において、インスリンによる HB-EGF shedding のポジティブフィードバック機構が示唆された。HB-EGF shedding の分子機構の解明は、内分泌細胞としての脂肪細胞の理解に新しい洞察をもたらすと考えられる。

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 12 件)

1. N. Satoh, A. Shimatsu, A. Himeno, Y. Sasaki, H. Yamakage, K. Yamada, T. Suganami, and Y. Ogawa. Unbalanced M1/M2 phenotype of peripheral blood monocytes in obese diabetic patients: effect of pioglitazone. **Diabetes Care** 33: e7, 2010.
2. M. Tanaka, T. Suganami, S. Sugita, Y. Shimoda, M. Kasahara, S. Aoe, M. Takeya, S. Takeda, Y. Kamei, and Y. Ogawa. Role of

- central leptin signaling in renal macrophage infiltration under unilateral ureteral obstruction. **Endocr. J.** 57: 61-72, 2010.
3. T. Yamamoto, T. Suganami, M. Kiso-Narita, P. A. Scherle, Y. Kamei, M. Isobe, S. Higashiyama, and Y. Ogawa. Insulin-induced ectodomain shedding of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in adipocytes in vitro: role of a disintegrin and metalloproteinase 17. **Obesity** 18: 1888-1894, 2010.
 4. T. Suganami and Y. Ogawa. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. **J. Leukoc. Biol.** 88: 33-39, 2010.
 5. K. Yamashiro, T. Sasano, K. Tojo, I. Namekata, J. Kurokawa, N. Sawada, T. Suganami, Y. Kamei, H. Tanaka, N. Tajima, K. Utsunomiya, Y. Ogawa, and T. Furukawa. Role of transient receptor potential vanilloid 2 in LPS-induced cytokine production in macrophages. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 398: 284-289, 2010.
 6. A. Sato, H. Kawano, T. Notsu, M. Ohta, M. Nakakuki, K. Mizuguchi, M. Itoh, T. Suganami, and Y. Ogawa. Anti-obesity effect of eicosapentaenoic acid in high-fat/high-sucrose diet-induced obesity: importance of hepatic lipogenesis. **Diabetes** 59: 2495-2504, 2010.
 7. T. Suganami, X. Yuan, Y. Shimoda, K. Uchio-Yamada, N. Nakagawa, I. Shirakawa, T. Usami, T. Tsukahara, K. Nakayama, Y. Miyamoto, K. Yasuda, J. Matsuda, Y. Kamei, S. Kitajima, and Y. Ogawa. Activating transcription factor 3 constitutes a negative feedback mechanism that attenuates saturated fatty acid/Toll-like receptor 4 signaling and macrophage activation in obese adipose tissue. **Circ. Res.** 105: 25-32, 2009.
 8. N. Satoh, A. Shimatsu, K. Kotani, A. Himeno, H. Yamakage, T. Majima, K. Yamada, T. Suganami, and Y. Ogawa. Highly purified eicosapentaenoic acid reduces cardio-ankle vascular index in association with decrease in serum amyloid A-LDL in metabolic syndrome. **Hypertens. Res.** 32: 1004-1008, 2009.
 9. T. Toyoda, Y. Kamei, H. Kato, S. Sugita, M. Takeya, T. Suganami, and Y. Ogawa. Anti-inflammatory effect of peroxisome proliferator activated receptor ligands in the interaction between adipocytes and macrophages in obese adipose tissue. **Obesity** 16:1199-1207, 2008.
 10. N. Satoh, A. Shimatsu, Y. Kato, R. Araki, K. Koyama, T. Okajima, M. Tanabe, M. Ooishi, K. Kotani, and Y. Ogawa for the Japan Obesity and Metabolic Syndrome Study (JOMS) Group. Evaluation of the cardio-ankle vascular index, a new indicator of arterial stiffness independent of blood pressure, in obesity and metabolic syndrome. **Hypertens. Res.** 31: 1921-1930, 2008.
 11. H. Yamada, M. Yoshida, Y. Nakano, T. Suganami, N. Satoh, T. Mita, K. Azuma, M. Itoh, Y. Yamamoto, Y. Kamei, M. Horie, H. Watada, and Y. Ogawa. In vivo and in vitro inhibition of monocyte adhesion to endothelial cells and endothelial adhesion molecules by eicosapentaenoic acid. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 28: 2173-2179, 2008.
 12. A. Ito, T. Suganami, A. Yamauchi, M. Degawa-Yamauchi, M. Tanaka, R. Kouyama, Y. Kobayashi, N. Nitta, K. Yasuda, Y. Hirata, W. A. Kuziel, M. Takeya, S. Kanegasaki, Y. Kamei, and Y. Ogawa. Role of C-C chemokine receptor 2 in bone marrow cells in the recruitment of macrophages into obese adipose tissue. **J. Biol. Chem.** 283: 35715-35723, 2008.
- [学会発表] (計 19 件)
1. T. Suganami, X. Yuan, N. Nakagawa, I. Shirakawa, Y. Kamei, Y. Ogawa: Activating transcription factor 3 constitutes a negative feedback mechanism that attenuates saturated fatty acid/TLR4 signaling and macrophage activation in obese adipose tissue. 2010 Keystone Symposia for the meeting on The Macrophage: Intersection of Pathogenic and Protective Inflammation. Banff, Alberta, Canada. Feb. 12-17, 2010.
 2. T. Suganami, X. Yuan, Y. Shimoda, N. Nakagawa, I. Shirakawa, Y. Miyamoto, K. Yasuda, Y. Kamei, S. Kitajima, Y. Ogawa: Activating transcription factor 3 constitutes a negative feedback mechanism that attenuates saturated fatty acid/TLR4 signaling and macrophage activation in obese adipose tissue. 14th International Congress of Endocrinology. Kyoto, Japan. Mar. 26-30, 2010.
 3. 田中都、菅波孝祥、小川佳宏：シンポジウム アピタイトカインの分子基盤と肥満「レプチン」：第 31 回日本肥満学会，2010.10.1-2，前橋
 4. 伊藤美智子、菅波孝祥、中川信貴、田中都、亀井康富、小川佳宏：「新しい NASH モデルとしての MC4R 欠損マウス」：第 31 回日本肥満学会，2010.10.1-2，前橋
 5. 田中都、菅波孝祥、西條美佐、築地信、亀井康富、小川佳宏：「骨髄 B リンパ球分化に及ぼす中枢レプチン作用」：第 31 回日本肥満学会，2010.10.1-2，前橋
 6. 市岡誠之、菅波孝祥、津田直人、田中都、白川伊吹、平田陽一郎、宮本恵宏、佐田政隆、亀井康富、小川佳宏：「肥満の脂肪組織における新たな炎症関連遺伝子の探索」：第 31 回日本肥満学会，2010.10.1-2，前橋

7. 佐藤歩美、伊藤美智子、中久木正則、河野浩之、水口清、菅波孝祥、小川佳宏：「エイコサペンタエン酸の抗肥満作用と抗肝脂肪酸合成作用の関連」：第 31 回日本肥満学会，2010.10.1-2，前橋
8. M. Tanaka, T. Suganami, Y. Ogawa: Role of central leptin signaling in renal macrophage infiltration. 2009 Keystone Symposia for the meeting on Complications of Diabetes and Obesity. Vancouver, British Columbia, Canada. Feb. 24-Mar.1, 2009.
9. 伊藤綾香、菅波孝祥、山内明、山内三爵子、神山隆治、喜田中都、平田結緒、金ヶ崎史朗、亀井康富、小川佳宏：「肥満の脂肪組織におけるマクロファージ浸潤の分子機構」：第 46 回日本臨床分子医学会学術集会，2009.4.12-13，東京
10. 田中都、菅波孝祥、杉田聡、竹屋元裕、笠原正登、竹田秀、小川佳宏：「中枢神経系を介するレプチンの炎症調節作用」：第 82 回日本内分泌学会学術総会，2009.4.23-25，群馬
11. 伊藤綾香、菅波孝祥、袁勳梅、宇佐美貴子、亀井康富、小川佳宏：「脂肪細胞特異的 MKP-1 過剰発現トランスジェニックマウスの作製と表現型の解析」：第 30 回日本肥満学会，2009.10.9-10，静岡
12. 田中都、菅波孝祥、杉田聡、青江誠一郎、亀井康富、小川佳宏：「中枢神経系を介するレプチンの炎症・免疫調節作用」：第 30 回日本肥満学会，2009.10.9-10，静岡
13. 中川信貴、菅波孝祥、袁勳梅、白川伊吹、亀井康富、岡淳一郎、小川佳宏：「脂肪組織マクロファージにおける新規炎症抑制性転写因子 ATF3 の機能的意義の検討」：第 30 回日本肥満学会，2009.10.9-10，静岡
14. 伊藤美智子、中川信貴、菅波孝祥、亀井康富、小川佳宏：「ヒト NASH 様病変を呈する新しいマウスモデルの確立-MC4R 欠損マウスの解析-」：第 30 回日本肥満学会，2009.10.9-10，静岡
15. 田中都、菅波孝祥、杉田聡、竹屋元裕、笠原正登、亀井康富、小川佳宏：「中枢神経系を介するレプチンの炎症調節作用：マウス腎尿細管間質障害モデルを用いて」：第 29 回日本肥満学会，2008.10.17-18，大分
16. 伊藤綾香、菅波孝祥、田中都、神山隆治、平田結緒、亀井康富、小川佳宏：「脂肪細胞組織へのマクロファージ浸潤と単球遊走能：リアルタイム細胞動態測定装置を用いた解析」：第 29 回日本肥満学会，2008.10.17-18，大分
17. 山本貴信、菅波孝祥、木曾美奈子、亀井康富、磯部光章、東山繁樹、小川佳宏：「脂肪細胞における HB-EGF shedding の分子機構の検討」：第 29 回日本肥満学会，2008.10.17-18，大分

18. 袁勳梅、菅波孝祥、中川信貴、下田百合、北嶋繁孝、小川佳宏：「飽和脂肪酸/TLR4/NF B 経路における新規炎症抑制性転写因子 ATF3 の機能的意義の検討」：第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会，2008.12.9-12，兵庫
19. 伊藤綾香、菅波孝祥、山内明、山内三爵子、神山隆治、田中都、平田結緒、金ヶ崎史朗、亀井康富、小川佳宏：「TAXIScan による肥満脂肪組織へのマクロファージ浸潤機構の解析」：第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会，2008.12.9-12，兵庫

〔図書〕(計 4 件)

1. 菅波孝祥、小川佳宏：「代謝-糖尿病」：炎症・再生医学事典，288-292，2009
2. 小川佳宏、山崎芳浩：「脂肪組織由来ホルモン」：内科学書 Vol.5 内分泌疾患 代謝・栄養疾患，240-244，2009
3. 伊藤美智子、伊藤綾香、菅波孝祥、小川佳宏：「アディポネクチンと炎症」：アディポネクチンとその受容体 抗生活習慣病ホルモンの全貌，148-153，2008
4. 小川佳宏：「脂肪組織リモデリングの分子機構」：糖尿病学の進歩，41-44，2008

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.tmd.ac.jp/mri/prm/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 佳宏 (OGAWA YOSHIHIRO)
 東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授
 研究者番号：70291424

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
安田和基 (YASUDA KAZUKI)
独立行政法人 国立国際医療研究センター・
研究所・部長
研究者番号：80311611