

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790910

研究課題名(和文)マクロファージに由来する脂肪肝惹起物質の同定

研究課題名(英文)Exploration for Macrophage Derived Steatosis Inducing Factor

研究代表者

小林 正稔(Kobyashi, Masatoshi)

東京大学・医学部附属病院・研究員

研究者番号：30396725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：ラット肝腫瘍細胞株に、マクロファージ培養細胞株の培養上清を作用させると、脂肪蓄積が惹起されることを見出した。本研究はこのマクロファージに由来し脂肪肝を惹起させる物質の同定を目的とした。その結果、脂肪蓄積には、*in vitro*および*in vivo*ともにPeroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR γ)とその標的遺伝子の発現上昇が伴っていることを見出した。そこで、この脂肪肝惹起物質がPPAR γ リガンドであるかどうか検討した。また、物理化学的な検討を行い、物質の絞り込みを行い、質量分析による物質同定の前段階まで到達した。

研究成果の概要(英文)：We discovered that lipid droplets in cultured rat hepatoma cells were induced with media conditioned by cultured macrophages. We explored the macrophage-derived factors that induced hepatic steatosis. We found that lipid accumulation in hepatocytes accompanied the elevated expressions of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma (PPAR γ) and its target genes. So we examined whether these factors have any activities as PPAR γ agonists. Furthermore, we investigated variable physical and chemical properties, and prepared the identification of the factor by focusing its category.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：マクロファージ 脂肪肝 PPAR

1. 研究開始当初の背景

肥満・メタボリックシンドロームの病態では、脂肪組織のみならず、肝臓においてもマクロファージが何らかの役割を担っている可能性がある。我々は、ラット肝腫瘍細胞株 (Fao 細胞) に、マクロファージ培養細胞株 RAW264.7 細胞の conditioned media (CM) を作用させたときに、惹起させられる脂肪蓄積には、Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) と、その標的遺伝子 (Fabp4, FSP27, CD36 など) の発現上昇が伴っていることを見出した。

2. 研究の目的

上記の事実から、マクロファージに由来し肝臓における脂肪蓄積を惹起させる物質があると考えられ、ここでは仮に Macrophage Derived Steatosis Inducing Factor; MDSIF と呼び、これを同定することを目的とした。また MDSIF が、PPAR リガンドであるかどうかを同時に検討することを目的とした。

3. 研究の方法

PPAR リガンド活性の検討

RAW 細胞の CM を用いて、肝臓に脂肪蓄積を惹起させたとき、PPAR とその標的遺伝子の発現が上昇することを確認した。そこで、肝臓に脂肪合成を惹起させる MDSIF が、PPAR のリガンド活性を有するかどうかをまず検討した。これまでに明らかにされている PPAR の生理的リガンドには、脂肪細胞における PPAR のリガンドとして、プロスタグランジンの誘導体である 15d-PGJ2 が報告されている。しかし肝臓における PPAR の上昇の意義は殆ど明らかにされておらず、その内因性リガンドについては、脂肪細胞と同じ 15d-PGJ2 なのか、それ以外のものなのか、全く報告されていない。

そこで第一段階の実験として、まず MDSIF が PPAR リガンド活性をもつかどうかを明らかにするために、レポーターアッセイを行う。刺激物質が PPAR リガンド活性を有する場合 Luciferase 活性として鋭敏に測定可能である。より検出力を高めるため、および陽性結果が出た場合その結果をより確実に確認するため 2 つの Luciferase assay コンストラクトを準備した。

MDSIF は、1)マクロファージから直接産生される可能性と、2)マクロファージから産生された物質が一旦肝臓で代謝され脂肪合成を誘導する物質に変化する可能性、の大きく 2 つの可能性がある。そこでこの Luciferase assay は次の 2 つの方法を用いた。

1) マクロファージ CM を用いて、ベクターをトランスフェクションした培養肝細胞を刺激

2) マクロファージ CM により刺激を受けた培養肝細胞の CM 或は lysate を刺激として用い、ベクターをトランスフェクションした 293T 細胞を刺激

また、これが 15d-PGJ2 かどうかを直接検

討した。Western blotting および ELISA 等を用いて、control と比較してマクロファージ CM 中または肝細胞 lysate 中に 15d-PGJ2 が増加していないか検討した。

MDSIF の categorize と物理生化学的検討 MDSIF の同定は最終的に 述べる如く MS を用いる。MS を用いるためには、例えば水溶性なのか脂溶性なのかといった条件で前処置が全く異なるため、対象物質のカテゴリーとしての絞り込み、すなわち脂質なのか蛋白なのかアミノ酸・糖などの小分子か等の検討が重要となる。以下の手段を必要に応じ使い、大まかなカテゴリーの絞り込みを行う。MS 解析に先立ち、物質の安定性等、確実な前処置条件を決定するためにも以下の基本的な物理生化学的検討を行った。

1). 分子ふるいを用いた大まかな分子量の推定

2). 水溶性、脂溶性分画の検討

3). 熱や凍結融解に対する安定性、等

Mass spectrometry を用いた MDSIF の同定。

以上、II の結果にもとにして絞り込んだ分子カテゴリーを標的に、Mass spectrometry (MS) を用いて MDSIF を同定する。MDSIF が PPAR リガンド活性を持つも 15d-PGJ2 でないと判明した場合、あるいは 15d-PGJ2 の肝臓への作用が部分的であった場合、肝臓における未知の PPAR リガンドを、Mass spectrometry (MS) を用いて同定する。また PPAR リガンド活性が認められなかった場合においても、MDSIF の本体を MS 解析により明らかにする。

具体的な MS 解析は以下の如く計画した。試料として、CM と、肝細胞 lysate の 2 つを用いる。

CM は、マクロファージの培養上清と、control 細胞の培養上清を MS 解析で比較する。肝臓に直接作用として MDSIF が働く場合、この CM の比較から同定を目指す。

次に上述のそれぞれの CM をふりかけ、マクロファージの CM によって脂肪合成が誘導された肝細胞の lysate と、control 細胞の CM で脂肪合成が誘導されていない肝細胞の lysate を MS 解析で比較し、以下の 3 つの視点から検討する。1)マクロファージ由来物質が肝臓で一旦代謝された後、それが二次的に MDSIF として作用する可能性があるため、肝臓 lysate から MDSIF を同定。2)マクロファージ CM 中に MDSIF が含まれていたとしても、control 細胞の CM との比較では同定困難であった場合や、複数の候補が得られた場合に、MS 解析から肝臓の網羅的な脂質代謝マップを作成することにより作用点を明らかにし、MDSIF を間接的に推定する。3)CM 中から MDSIF が同定された場合、脂肪肝惹起のメカニズムを同じく代謝マップから検討する。

CM に用いるマクロファージの control 細胞の候補として、1)細胞の代謝への影響の少な

い control 細胞、1)同じマクロファージ細胞で活性化と非活性化状態、等を検討する予定である。前者 1)については例えば fibroblast 系の細胞等を考慮している。後者 2)については、脂質や炎症性刺激での活性化を予定している(但し刺激物質の CM への持ち越しに注意する)。

MS 解析の検体の規模としては、解析の 1 セットを、1. CM-control 細胞、2. CM-マクロファージ、3. 肝細胞 lysate-脂質蓄積(-)、4. 肝細胞 lysate-脂質蓄積(+)で構成し、定量的な有意差を得るため少なくとも各 n=4、すなわち 1 セット n=4 x 4 =16 検体以上で解析を行う見込みで検討した。さらに今後は脂質蓄積がみられる細胞の組み合わせを複数セット解析することによって、普遍的な現象として MDSIF を同定していく予定である。現在までに、RAW 細胞の CM に対して、マウス初代肝細胞と Fao ラット hepatoma 細胞の 2 セットで、脂質蓄積が起こることを確認した。さらに別のマクロファージ系細胞でも解析群を確立し、少なくとも計 n=16 x 3 セット =48 検体以上の規模で解析を行う予定である。

4. 研究成果

ラット肝腫瘍細胞株 (Fao 細胞) に、マクロファージ培養細胞株 RAW264.7 細胞の CM を作用させたときに、惹起させられる脂肪蓄積には、PPAR と、その標的遺伝子 (Fabp4, FSP27, CD36 など) の発現上昇が伴っていることを見出した。

In vivo においても検討したところ、長期に高脂肪食を与えられた、C57BL/6J マウスの肝臓において、PPAR とその標的遺伝子の野生型マウスに高脂肪食を負荷すると、長期高脂肪食により、肝臓においてこれらの、遺伝子の発現が著明に上昇していることが明らかになった。脂肪細胞において PPAR が分化・成熟のマスターレギュレーター の役割を持つことが知られているが、興味深いことに、この高脂肪食摂餌開始後脂肪組織における PPAR とその標的遺伝子の発現上昇は、比較的早期にピークアウトして低下に転じていた。一方で、肝臓における脂質合成制御に関わる遺伝子の発現を解析すると、SREBP-1c の持続的な発現上昇を認めなかったが、PPAR とその標的遺伝子の発現は持続的に上昇することを見出した。今まで肝臓における PPAR

の上昇の意義は殆ど明らかにされていない。しかし本研究結果から、脂肪細胞に PPAR とその標的遺伝子低下による脂質代謝機能の低下によって、余剰エネルギーが脂肪細胞から overflow して、肝臓の PPAR を上昇させることが、肝臓における異所性脂肪蓄積のメカニズムになっている可能性が示唆された。

また、このとき同時に肝臓マクロファージが著明に増加することを見出した。すなわち、この肝臓における PPAR の上昇と異所性脂肪蓄積に、肝臓マクロファージが何らかの役割を担っている可能性が示唆された。

そこで、このマクロファージ由来物質 (MDSIF) がリガンド活性をもつかどうかを検討した。マクロファージ培養上清 (CM) に、PPAR リガンド活性をもつ物質が含まれるかどうかを、培養肝細胞を用いて、レポーターアッセイにより解析した。また、*in vivo* における既知の内因性 PPAR リガンドとして、15-Deoxy- Δ^{12} , 14-Prostaglandin J2 (15d-PGJ2) が知られていることから、control (マウスの線維芽細胞を control として用いた) と比較してマクロファージ CM 中または肝細胞 lysate 中に 15d-PGJ2 が増加していないか Western blotting および ELISA 等を用いて検討した。

また、物理生化学的検討として、マクロファージ CM 中の MDSIF に対して、水溶性 / 脂溶性分画の検討、熱や凍結融解に対する安定性、プロテアーゼ処理、分子ふるいを用いた大まかな分子量の推定により、分子カテゴリー (MDSIF が脂質なのか蛋白なのかアミノ酸・糖などの小分子か等) の絞り込みをおこなった。

以上の PPAR リガンド活性の検討や、物理生化学的性質の検討結果によって絞り込んだある分子カテゴリーを標的に、今後 MDSIF の本体を Mass spectrometry (MS) 解析により明らかにする予定である。

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)

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 正稔 (KOBAYASHI, Masatoshi)
東京大学・医学部附属病院・研究員
研究者番号：30396725

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：