

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460369

研究課題名(和文) マクロファージTLR9を介した新しいインスリン抵抗性発現メカニズムの解明

研究課題名(英文) The role of TLR9 in the development of insulin resistance

研究代表者

福田 大受 (FUKUDA, Daiju)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・特任講師

研究者番号：40637568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病の発症には、脂肪組織の慢性炎症が関与するが、その機序の解明は不十分である。本研究では肥満脂肪組織に生じる肥大脂肪細胞の細胞死に関連して、肥満個体では細胞デブリスのひとつである遊離核酸断片(cfDNA)が増加し、核酸断片受容体であるTLR9によって認識されることでマクロファージを活性化し、脂肪組織の炎症を惹起すること、さらに、TLR9の遺伝的欠損や特異的阻害薬により、肥満誘導性の糖尿病の発症が減弱することを見出した。これらの結果は、cfDNA-TLR9シグナルが肥満誘導性の脂肪組織の慢性炎症と糖尿病の発症の新規治療標的になる可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Obesity stimulates chronic inflammation in adipose tissue, which is associated with insulin resistance, although the underlying mechanism remains obscure. Here we showed that obesity-related adipocyte degeneration causes release of cell-free DNA (cfDNA), which promotes macrophage accumulation in adipose tissue via Toll-like receptor 9 (TLR9), originally known as a sensor of exogenous DNA fragments. Fat-fed obese wild-type mice showed higher plasma cfDNA levels. cfDNA released from degenerated adipocytes promoted MCP-1 expression in wild-type macrophages, but not in TLR9-deficient macrophages. In fat-fed wild-type mice, genetic deletion of Tlr9 or administration of a specific TLR9 antagonist demonstrated reduced adipose tissue inflammation and better insulin sensitivity compared with the control mice. Our study may provide a novel mechanism for the development of sterile inflammation in adipose tissue and a potential therapeutic target for insulin resistance.

研究分野：循環器・代謝性疾患

キーワード：炎症 マクロファージ インスリン抵抗性 TLR9

## 1. 研究開始当初の背景

肥満は世界的な規模で急速に増加している。肥満に基づくインスリン抵抗性は、糖尿病だけでなく、高血圧、脂質異常症を発症する基盤となる。これらの病態は、虚血性心疾患や脳血管障害のリスクを高めることで、生活の質の低下や医療経済上の負担を招く可能性があり、現代の人類にとって、最大の健康問題のひとつとなっている。一般的に、「インスリン抵抗性は、脂肪組織でのマクロファージを中心とする慢性炎症が原因で生じる」という考え方が広く受け入れられている[1]。しかしながら、脂肪組織において、マクロファージを中心とした慢性炎症を惹起するメカニズムについては、十分に明らかになっておらず、予防方法や治療方法の開発についても十分とは言えない。

近年、マクロファージなどの抗原提示細胞が発現する Toll-like receptor (TLR)をはじめとする病原体センサーが、微生物由来の外因性物質だけでなく、自己由来の内因性物質をリガンドとして認識することで、サイトカインなどの産生を促し、種々の慢性炎症性疾患の病態に関与することが明らかになり、慢性炎症性疾患の病態における意義が注目されている [2]。特に、肥満患者で高値を示すパルミチン酸などの飽和脂肪酸が、脂肪組織に浸潤したマクロファージの TLR2 や TLR4 を刺激し、Tumor Necrosis Factor (TNF)- $\alpha$ などのアディポサイトカインの分泌を促進し、脂肪細胞におけるインスリン抵抗性の発現に関与することが指摘されている [3]。

TLR ファミリーに属する分子のうち TLR9 は核酸断片を認識する。TLR9 はエンドソームに局在し、細菌やウイルスなど外来生物由来 DNA の非メチル化シトシン-リン酸-グアニン(CpG)モチーフを認識することで、炎症を惹起し、生体の防御に重要な役割を果たしている [4]。一方、哺乳類由来の核酸は、大部分の CpG がメチル化修飾を受けていることや、通常、自己由来の核酸は迅速に分解されるため、TLR9 のリガンドにはならない。しかし、過剰にアポトーシスが生じ、DNA 断片の処理が間に合わない場合や、自己由来の核酸が high mobility group box protein1 (HMGB1) などの DNA 結合タンパクと複合体を形成して安定化すると、TLR9 を活性化して炎症を誘発することが分っている。実際に全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患患者において、樹状細胞に発現する TLR9 が、病態の形成に関与することが明らかにされている [5]。

しかしながら、これまでのところ、肥満により脂肪組織に浸潤したマクロファージにおける TLR9 の活性化と、インスリン抵抗性の発現との関係は知られていない。また、肥満した脂肪組織の中で、マクロファージにおける TLR9 を活性化させる内因性リガンドについても明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、「マクロファージにおける TLR9 の活性化が、脂肪組織における炎症を引き起こし、インスリン抵抗性を惹起する」という仮説を立て、検証するだけでなく、この過程にかかわる TLR9 の内因性リガンドとして、血中遊離核酸断片 (cell free DNA, cfDNA) の役割を明らかにし、インスリン抵抗性発現の新しいメカニズムの解明と、治療方法の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 肥満個体での血中 cfDNA の測定

野生型マウスに高脂肪食を 12 週間負荷し、血中 cfDNA (ssDNA と dsDNA) 濃度を市販のキットを用いて測定し、脂肪重量やインスリン抵抗性の指標との相関を検討する。ヒトサンプルについても同様に検討する。

### (2) cfDNA によるマクロファージ活性化の検討

TLR9 の特異的アゴニストを用いて、野生型マウスと TLR9 KO マウス由来のマクロファージを刺激し、TLR9 刺激がマクロファージの活性化に関与するかを、定量的 RT-PCR 法や Western blotting 法などを用いて、種々の炎症性物質の産生やシグナルの解析から検討する。

脂肪細胞由来の cfDNA によりマクロファージが活性化を受けるかどうかを、TNF- $\alpha$  で障害を与えた 3T3-L1 脂肪細胞由来の培養上清や、培養上清から抽出した cfDNA を用いて、野生型マウス由来と TLR9KO マウス由来のマクロファージを刺激することで検討する。

### (3) TLR9 阻害が脂肪組織の炎症とインスリン抵抗性の発症に与える影響の検討

野生型マウスと TLR9 欠損マウスに高脂肪食を 12 週間負荷し、肥満を誘導し、生じる脂肪組織の炎症やインスリン抵抗性の程度を、定量的 RT-PCR 法や免疫組織学的手法などを用いて比較する。

マクロファージの TLR9 の役割を検討するため、骨髄移植により、骨髄特異的 TLR9 発現マウスを作製し、高脂肪食を与え、生じる脂肪組織の炎症やインスリン抵抗性の程度を、コントロールキメラマウスとの間で、と同様に比較する。野生型マウスに高脂肪食を与え、肥満を誘導する際に、TLR9 の特異的阻害薬 [6] を投与し、生じる脂肪組織の炎症やインスリン抵抗性の程度を、と同様に比較する。

## 4. 研究成果

### (1) 肥満は血中 cfDNA を増加させる

野生型マウスに高脂肪食を 12 週間投与したところ、血中 ssDNA と dsDNA は、通常食を与えられたマウスと比較して、有意に高い

ことが分かった。また、血液中の ssDNA 濃度は、血糖値と有意な正の相関を認めた。肥満個体と痩せ型個体から抽出した精巣上体脂肪組織を培養したところ、培養液中に放出される cfDNA は、肥満個体由来の脂肪組織に多く、さらに、3T3-L1 脂肪細胞を、インスリン抵抗性の発現に關与する TNF- $\alpha$  で刺激を行うと、濃度依存性に培養液中への ssDNA 濃度が増加することが分かった。

ヒトにおいても同様に、BMI>25 の肥満者は、そうでない人に比べて、有意に血中 ssDNA 濃度が高く、血中 ssDNA 濃度はインスリン抵抗性の指標である HOMA-IR と、有意な正の相関を示した。

## (2) 肥満は脂肪組織の TLR9 の発現を増加させる

脂肪組織における慢性炎症の発症に TLR9 によるシグナルが關与するのかを検討するため、肥満野生型マウスとやせ型野生型マウスの内臓脂肪組織における TLR9 の発現を比較したところ、肥満脂肪組織において TLR9 の発現が増加していた。特に、肥満誘導性のインスリン抵抗性の発症に重要な役割を果たすマクロファージ分画に TLR9 の発現が強いことを確認した。

## (3) 障害脂肪組織由来の cfDNA は TLR9 を介してマクロファージを活性化させる

マクロファージの活性化に cfDNA-TLR9 シグナルが關与するかを検討するため、TLR9 の特異的な刺激薬を用いて、野生型マウスと TLR9 KO マウス由来の腹腔内マクロファージを刺激する実験を行った。野生型マウス由来のマクロファージは TLR9 刺激により、Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) や TNF- $\alpha$  の発現が有意に増加したのに比べ、TLR9 KO マウス由来マクロファージでは、それらの発現増加は認めなかった。TLR9 刺激により、他の TLRs と同様に、NF- $\kappa$ B 経路が活性化されることも分かった。

さらに、肥満脂肪組織では肥満細胞の細胞死が生じていることから [7]、肥満によって障害を受けた脂肪細胞由来の cfDNA が、マクロファージ TLR9 を刺激するかどうかを検討することとした。3T3-L1 脂肪細胞を TNF- $\alpha$  で 16 時間処理したのちに、TNF- $\alpha$  を含まない培養液に交換後 24 時間培養し、その培養液を野生型と TLR9 KO マクロファージに作用させたところ、野生型マクロファージでは、MCP-1 などの炎症性物質の発現が増加したが、TLR9 KO マクロファージでは、その反応が少なかった。さらに、トランスウエルメンブレンを用いて、同様に処理した脂肪細胞とマクロファージの共培養を行うと、野生型マクロファージでのみ、炎症性物質の発現が増加した。また、培養上清から cfDNA を抽出し、直接マクロファージに作用させても、同様に、野生型マクロファージでのみ、炎症性物質の発現が増加した。これらの結果は、障害脂肪

細胞由来の cfDNA が TLR9 を介してマクロファージを活性化させることを示唆していると考えられた。

## (4) TLR9 欠損マウスでは肥満誘導性の脂肪組織の炎症とインスリン抵抗性の発症が減弱する

これまでの検討で、cfDNA-TLR9 経路がマクロファージの活性化に關与することが示されたので、生体内で TLR9 の役割を検討するため、野生型マウスと TLR9 KO マウスに高脂肪食を 12 週間与え、肥満誘導性の脂肪組織の炎症とインスリン抵抗性の発症における TLR9 の役割を検討した。12 週間の高脂肪食負荷によって、両系統のマウスは同程度の肥満を呈し、精巣上体脂肪組織(内臓脂肪)重量も、両群間で差を認めなかった。しかし、マクロファージの浸潤は TLR9 KO マウスで有意に少なく、MCP-1 などの炎症性物質の発現も、TLR9 KO マウスで少ない結果であった。また、TLR9 KO マウスでは、脂肪組織での炎症低下に關連して、GTT や ITT で検討したインスリン感受性が良いことも分かった。さらに、TLR9 KO マウスでインスリン感受性が良いことに一致し、脂肪組織における Adiponectin や PPAR- $\gamma$  の発現は、TLR9 KO マウスで高い結果であった。以上より、TLR9 は、肥満誘導性の脂肪組織の炎症やインスリン抵抗性の発症に關与することが示唆された。

## (5) 骨髄特異的 TLR9 発現は、インスリン感受性を悪化させる。

我々の仮説ではマクロファージの TLR9 が、脂肪組織の炎症とインスリン抵抗性に關与すると想定しているため、より、マクロファージに特異的な TLR9 の作用を検討するため、骨髄移植実験を行う事とした。TLR9 KO マウスの骨髄を野生型マウスの骨髄で置換し、骨髄特異的 TLR9 発現マウスを作製した。コントロール群として、TLR9 KO マウスの骨髄を TLR9 KO マウスの骨髄で置換したキメラマウスを用いた。これらの 2 系統の骨髄移植マウスに高脂肪食を 12 週間投与したところ、骨髄細胞に TLR9 が発現したマウスは、コントロール骨髄キメラマウスと比較して、脂肪組織におけるマクロファージの浸潤が有意に多く、炎症性物質の発現が増加していた。さらに、骨髄特異的 TLR9 発現マウスでは、インスリン感受性の悪化を認めた。これらの結果は、骨髄由来細胞、主にマクロファージの TLR9 が、脂肪組織の炎症とインスリン抵抗性の発症に關与する事を示唆しており、上述の in vitro 実験や in vivo 実験の結果と一致していることが分かった。

## (6) TLR9 の特異的阻害薬は肥満誘導性の脂肪組織の炎症とインスリン抵抗性の発症を減弱させる

これまでの検討で cfDNA-TLR9 シグナルが、

脂肪組織の炎症とインスリン抵抗性の発現に  
関与する事が示唆されたため、次に、  
cfDNA-TLR9 シグナルが、これらの病態の治  
療標的になる可能性を検討することとした。  
生体内で TLR9 を阻害するため、TLR9 の特  
異的阻害性オリゴヌクレオチドを、高脂肪食  
を負荷された野生型マウスに 11 週間投与し  
た。コントロール群には非特異的オリゴヌク  
レオチドを用いた。その結果、TLR9 特異的  
阻害性オリゴヌクレオチドを投与されたマ  
ウスは、コントロール群と同程度の体重増加  
を認めたと、TLR9 KO マウスを用いた実験と  
同様に、脂肪組織におけるマクロファージの  
浸潤が少なく、炎症性物質の発現が少ないこ  
とが分かった。さらに、TLR9 特異的阻害性  
オリゴヌクレオチド投与群は、コントロール  
群に比べて、インスリン感受性が良いことも  
分かった。

これらの結果は、cfDNA-TLR9 シグナルの  
制御が肥満に基づく脂肪組織の慢性炎症や  
インスリン抵抗性の発症の新規的な治療標  
的になりうる可能性を示唆していると考え  
られた。

#### <引用文献>

1. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 444, 860–867 (2006).
2. Suganami T, Ogawa Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *J Leukoc Biol*. 88, 33-39 (2010)
3. Suganami T, Nishida J, Ogawa Y, A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: Role of free fatty acids and tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 25, 2062–2068 (2005).
4. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. 408, 740-745 (2000).
5. Marshak-Rothstein A. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol*. 6, 823–835 (2006).
6. Oka T, Hikoso S, Yamaguchi O, Taneike M, Takeda T, Tamai T, Oyabu J, Murakawa T, Nakayama H, Nishida K, Akira S, Yamamoto A, Komuro I, Otsu K. Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure. *Nature*. 485, 251–255 (2012).
7. Rigamonti A, Brennand K, Lau F, Cowan CA, Rapid cellular turnover in adipose tissue. *PLOS One*. 6, e17637 (2011).

#### 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 1 件)

Nishimoto S, Fukuda D, Higashikuni Y, Tanaka K, Hirata Y, Murata C, Kim-Kaneyama JR, Sato F, Bando M, Yagi S, Soeki T, Hayashi T, Imoto I, Sakaue H, Shimabukuro M, Sata M. Obesity-induced DNA released from adipocytes stimulates chronic adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Sci Adv*. 査読有り 2, 2016, e1501332. (DOI: 10.1126/sciadv.1501332)

#### [学会発表](計 13 件)

Fukuda D, Higashikuni Y, Tanaka K, Hirata Y, Yagi S, Soeki T, Shimabukuro M, Sata M. Deletion of Toll-Like Receptor 9 Prevented Atherosclerosis Induced by Angiotensin II. 第 80 回日本循環器学会学術集会 2016 年 3 月 18-20 日 仙台国際会議場 (宮城県仙台市)

Fukuda D, Higashikuni Y, Tanaka K, Hirata Y, Yagi S, Soeki T, Shimabukuro M, Sata M. Cell-Free DNA/Toll-like Receptor 9 Axis Plays a Pivotal Role in Metabolic Disorder-induced Chronic Inflammation, Leading to Atherogenesis and Insulin Resistance. 第 80 回日本循環器学会学術集会 2016 年 3 月 18-20 日 仙台国際会議場 (宮城県仙台市)

六車隆太郎、福田大受、西本幸子、東邦康智、田中君枝、平田陽一郎、八木秀介、添木武、島袋充生、佐田政隆 TLR9 の活性化は虚血肢における炎症を増強し血流改善を遅延させる 第 45 回日本心臓血管作動物質学会 2016 年 2 月 5-6 日 阿波観光ホテル (徳島県徳島市)

西本幸子、福田大受、東邦康智、田中君枝、平田陽一郎、八木秀介、添木武、阪上浩、島袋充生、佐田政隆 動脈硬化におけるマクロファージ TLR9 の役割 第 45 回日本心臓血管作動物質学会 2016 年 2 月 5-6 日 阿波観光ホテル (徳島県徳島市)

福田大受 自己遊離核酸断片の認識を介した血管の炎症と動脈硬化発症メカニズム 第 45 回日本心臓血管作動物質学会 2016 年 2 月 5-6 日 阿波観光ホテル (徳島県徳島市)

福田大受、西本幸子、東邦康智、田中君枝、平田陽一郎、八木秀介、添木武、島袋充生、佐田政隆 自己遊離核酸断片の認識を介した血管の炎症と動脈硬化発症メカニズム CVMW2015 2015 年 12 月 10-12 日 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

西本幸子、福田大受、阪上浩、島袋充生、佐田政隆 動脈硬化発症におけるマクロファージ Toll-like receptor 9 の役割 CVMW2015 2015 年 12 月 10-12 日 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

Nishimoto S, Fukuda D, Higashikuni Y, Tanaka K, Hirata Y, Yagi S, Soeki T, Sakaue H, Shimabukuro M, Sata M. Toll-like Receptor 9 Plays a Pivotal Role in Angiotensin II-induced Atherosclerosis. AHA Scientific Sessions 2015, 2015年11月7-11日 オーランド (米国)

Nishimoto S, Fukuda D, Higashikuni Y, Tanaka K, Hirata Y, Yagi S, Soeki T, Sakaue H, Shimabukuro M, Sata M. The activation of toll-like receptor 9 deteriorates blood flow recovery after hind-limb ischemia. ESC Congress 2015 2015年8月29日-9月2日 ロンドン (英国)

Nishimoto S, Fukuda D, Higashikuni Y, Tanaka K, Hirata Y, Yagi S, Soeki T, Sakaue H, Shimabukuro M, Sata M. Genetic Deletion of Toll-like Receptor 9 Accelerates Blood Flow Recovery after Hindlimb Ischemia. AHA Scientific Sessions 2014, 2014年11月15-19日 シカゴ (米国)

Nishimoto S, Fukuda D, Shimabukuro M, Yagi S, Soeki T, Sakaue H, Nakaya Y, Sata M. Macrophage Toll-like Receptor 9 Signaling Contributes to the Development of Insulin Resistance through the Promotion of Inflammation in Adipose Tissue. AHA Scientific Sessions 2013年11月16-20日 ダラス (米国)

Nishimoto S, Fukuda D, Shimabukuro M, Matsumoto S, Ishida M, Yagi S, Soeki T, Sakaue H, Nakaya Y, Sata M. Genetic ablation of TLR9 improves insulin resistance through macrophage accumulation in adipose tissue. ESC Congress 2013 2013年8月31日-9月4日 アムステルダム (オランダ)

Fukuda D, Shimabukuro M, Yagi S, Soeki T, Sata M. Genetic Ablation of TLR9 Improves Insulin Resistance through the Reduction of Hepatic SREBP-1c Expression. 第77回日本循環器学会学術集会 2013年3月15-17日 仙台国際会議場 (宮城県仙台市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

福田 大受 (FUKUDA, Daiju)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部

・特任講師

研究者番号：40637568

### (2) 研究分担者

佐田 政隆 (SATA, Masataka)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号：80345214