

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870328

研究課題名(和文) 血球細胞のp38経路を介した代謝と老化の制御機構

研究課題名(英文) regulation mechanism of metabolism and aging via p38 signal in blood cells

研究代表者

大隈 貞嗣 (Ookuma, Sadatusgu)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：7044429

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)：われわれが作製した血管血球系特異的p38 コンディショナルノックアウトマウスおよびマクファージ特異的コンディショナルノックアウトマウスにおいて高脂肪食による肥満の抑制が観察され、マクファージにおけるp38 が肥満を促進していることが示された。またマクファージ特異的p38 ck0マウスにおいて食餌誘導性NASHモデルを作製したところ、肝における炎症および線維化が減少していた。また老化促進マウスとの交配に関しては作製途中であるため予備的にp38阻害剤投与実験を行ったところ、寿命延長効果が認められた。

研究成果の概要(英文)：We produced hematopoietic cells specific and macrophage specific p38 alpha KO mice, and examined high-fat diet induced metabolic syndrome. We found that high-fat diet induced obesity and hyperglycemia are suppressed in these mutants. And we tested diet-induced NASH model, and found that inflammation and fibrosis is suppressed in macrophage specific p38 alpha KO mice. We are now trying to produce premature aging p38 alpha KO mice. We have preliminary administered p38 inhibitor to premature aging model mice, and observed prolonged lifespan of them.

研究分野：生化学

キーワード：メタボリックシンドローム MAPキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

肥満人口は世界で 21 億人を超えているといわれ、メタボリックシンドローム、またそこから進行するとされる糖尿病は現在、先進国のみならず新興国や発展途上国においても重要な社会問題となっている。しかしこれらの詳細な発症メカニズムには未解明な点が多く、予防や治療につながる新規な知見が求められている。近年の研究により、脂肪組織における慢性炎症や免疫細胞の浸潤、サイトカイン分泌の変化などがメタボリックシンドロームの発症に関与することが明らかになりつつあるが、個体レベルにおける免疫系と代謝系とのクロストークの全容はいまだ明らかでない。p38 は酵母から哺乳類まで高度に保存された MAP キナーゼファミリーを構成する主要な細胞内シグナル伝達分子の一つであり特に免疫細胞や炎症の制御に関与することが知られている。医学的にも、関節リウマチの治療において p38 阻害剤の臨床試験が開始されているなど、免疫応答の制御において注目されているが、肥満やメタボリックシンドロームといった代謝制御の分野においてはほとんど研究が進んでいない。これは代謝のメカニズムが個体レベルであるという点と、個体解析のための遺伝子改変マウスが少ないことによるものと思われる。われわれは p38 オートログである p38 の血管血球系特異的コンディショナルノックアウト (cKO) マウスを先に作製し、このマウスにおいて高脂肪食による肥満と高血糖が抑制されることを見いだしている。また、近年個体の老化過程に炎症や p38 シグナルが関与しているとの報告が複数なされている。早期老化マウスや p38 阻害剤も市販されており、老化と p38 シグナルの関係を検討できる状況にある。

2. 研究の目的

先にわれわれは p38 血管血球系特異的 cKO マウスにおいて高脂肪食による肥満や高血糖が抑制されることを見いだした。本研究では浸潤マクロファージの動態や肝における脂質代謝や遺伝子発現など、さらに詳細なメカニズムを検討する。また新たに作製した p38 マクロファージ特異的 cKO マウスを用いて、肥満やメタボリックシンドロームに関与する細胞や血球集団をさらに絞り込むとともに、コリン・メチオニン制限高脂肪食誘導性非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH : Nonalcoholic steatohepatitis) モデルを用いて NASH や肝硬変に対する影響をも検討する。また、炎症および代謝は個体の老化とも深く関与している。先に p38cKO マウスでは炎症および代謝の変化を見いだしていることから、個体老化における p38 の機能についても検討を行う。

3. 研究の方法

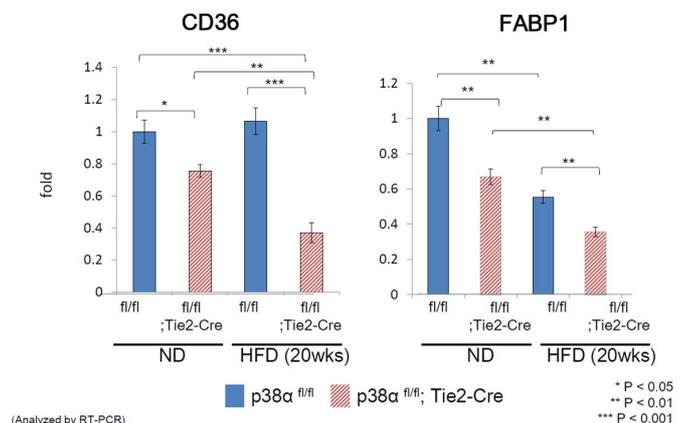
Cre-lox システムを利用した遺伝子工学を用いて、p38 血管血球系特異的 cKO マウスおよび p38 マクロファージ特異的 cKO マウス

スを作製し、交配繁殖させる。これらのマウスに対して高脂肪食およびコリン・メチオニン制限高脂肪食を摂取させて肥満や高血糖および NASH を誘導し、脂肪組織、肝およびマクロファージ等の血球細胞を単離し、リアルタイム PCR およびウエスタンブロットイングにより発現解析を行う。またマクロファージの走化性やサブグループ分布に関しても FACS 等の機器を用いて比較解析を行う。脂肪組織や肝に関しては組織像に関してヘマトキシリン・エオシン染色および抗体染色等によって検討を行う。

4. 研究成果

われわれは先だって作製した p38 血管血球系特異的 cKO マウスについて、高脂肪食による肥満、高血糖およびインスリン抵抗性が抑制されていることを見いだしている。さらに解析を進めたところ、脂肪組織に浸潤しているマクロファージのみならず腹腔マクロファージにおいても p38 血管血球系特異的 cKO マウスにおいては CCR2 や CCR5 といったケモカインレセプターの発現レベルが低下していることを見いだした。またこの腹腔マクロファージに対してケモカインに対する走化性試験を行ったところ、p38 血管血球系特異的 cKO マウス由来のマクロファージでは顕著な走化性の低下を見いだした。これらにより、p38 血管血球系特異的 cKO マウスではマクロファージにおけるケモカインレセプターの発現低下等により走化性が低下することにより、脂肪組織への浸潤が低下し、サイトカインやケモカインの量の減少や慢性炎症が抑制することによって高脂肪による肥満やメタボリックシンドロームが抑制される可能性が示唆された。また、肝における遺伝子発現についてさらに検討したところ、p38 血管血球系特異的 cKO マウスでは FABP1 のみならず CD36 といった遺伝子の発現も変化していた。CD36 はスカベンジャー受容体として知られ、肝におけるインスリン抵抗性に関与するとの報告がある。

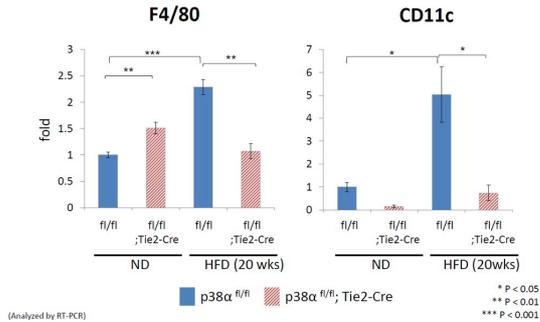
図1 肝におけるCD36 および FABP1 の発現量



またこの時、肝における F4/80 および CD11c

といったマクロファージまたは Kupffer 細胞のマーカーの発現量も大きく変化していた。すなわち、血管血球系の p38 は、脂肪組織における慢性炎症制御に加え、マクロファージや Kupffer 細胞の動態を介して、このような肝における脂質代謝制御にも関与することで肥満やメタボリックシンドロームをコントロールしていると考えられる。

図2 肝におけるKupffer細胞マーカー発現量



さらにわれわれは、p38 マクロファージ特異的 cKO マウスを作製し、高脂肪食による肥満とインスリン抵抗性および、コリン・メチオニン制限高脂肪食 (CDAHFD: choline-deficient, L-amino acid-defined, high-fat diet) 誘導性非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH :Nonalcoholic steatohepatitis) モデルにおけるマクロファージ p38 の NASH における役割を検討した。

p38 マクロファージ特異的 cKO マウスに対する高脂肪食投与においては、p38 血管血球系特異的 cKO マウスと同様に肥満の抑制およびインスリン抵抗性の抑制が認められた。

NASH モデルにおいては、血中 ALT は通常餌 (ND: normal diet) では有意な変化は認められなかったが、コリン・メチオニン制限高脂肪食 NASH モデルでは投与 12 週において、p38 マクロファージ特異的 cKO マウスにおいて有意な低下を認めた。一方、野生型と p38 マクロファージ特異的 cKO マウスにおける体重および血糖値には顕著な差は観察されなかった。

図3 体重および血中ALT

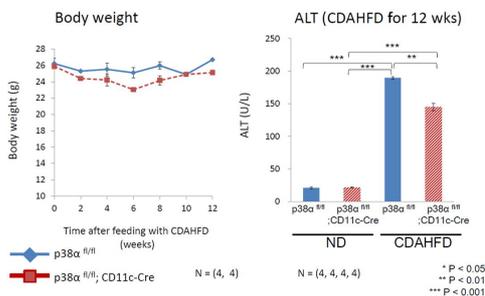
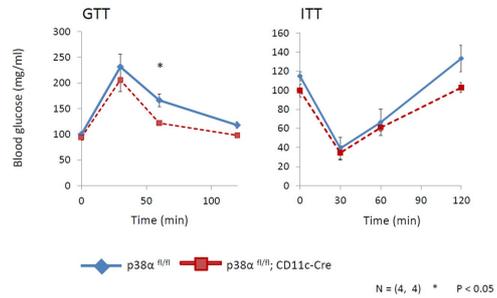


図4 耐糖能試験およびインスリン抵抗性試験 (CDAHFD 12 週)



肝における遺伝子発現を検討したところ、通常餌においては野生型との有意な差は見られなかったが、NASH モデル 12 週において TGF- β 、collagenI、TIMP-1、 α -SMA といった線維化マーカー遺伝子の発現が cKO マウスの肝において有意に抑制されており、また TNF- α 、VCAM-1、ICAM-1 といった炎症性サイトカイン、マーカーも同様に cKO マウスにおいて抑制されていた。

図5 肝における線維化マーカー

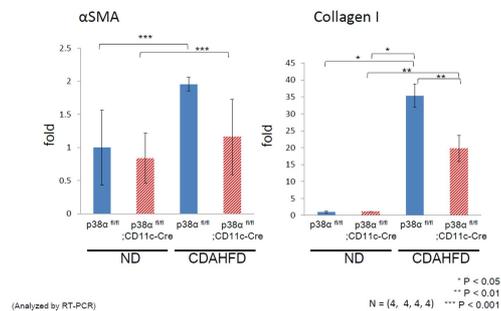
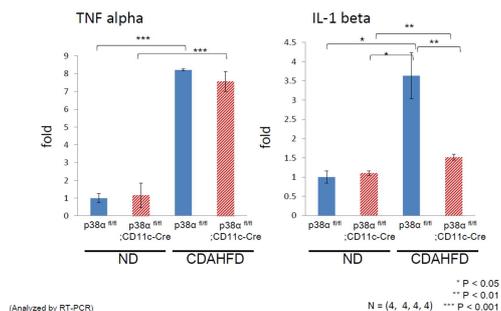


図6 肝における炎症性サイトカイン発現量

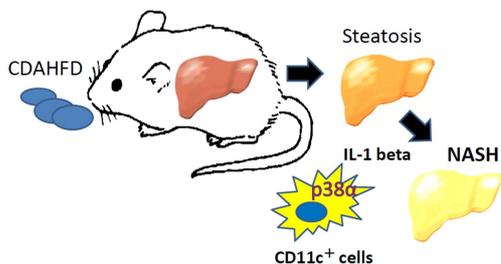


ただし、肝における脂肪沈着には差はみられなかった。

これらの結果から、マクロファージにおける p38 はコリン・メチオニン制限高脂肪食 NASH モデルにおいて、肝の線維化および炎症の惹起に参与していることが示唆された。また p38 マクロファージ特異的 cKO マウスに対して早期老化モデルマウスの交配を試みているが、こちらははまだ系統として確立するに至っておらず、引き続き検討する。その代替として、p38 阻害剤を早期老化モデルマウス (Klotho マウス) に投与する予備的実験を行ったところ、平均寿命および最澄寿命の延長効果を見いだした。こちらについてもさらに詳細な検討を行っていく予定で

ある。

図7 NASHの発症におけるマクロファージp38αの機能



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7件)

1. 大隈貞嗣、緒方正人

The role of p38 alpha in pro-inflammatory macrophages in nonalcoholic steatohepatitis (NASH)

2015年11月18日 第44回日本免疫学会学術集会 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

2. 大隈貞嗣、竹林慎一郎、緒方正人

炎症性マクロファージにおける p38 は NASH の進行を制御する

2015年12月3日 第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

3. 大隈貞嗣、緒方正人

p38 in blood cells regulates insulin resistance in mice

2014年12月11日 第43回日本免疫学会学術集会 国立京都国際会館(京都府・京都市)

4. 大隈貞嗣 藤川隆彦 大津欣也 緒方正人

マクロファージにおける p38 は高脂肪食によるインスリン抵抗性と肥満を制御する

2014年10月17日 第87回日本生化学会大会 国立京都国際会館(京都府・京都市)

5. 大隈貞嗣 藤川隆彦 杉村和人 大津欣也 緒方正人

血球系 p38 MAP キナーゼによるインスリン抵抗性の制御

p38 in blood cells regulates high-fat-induced insulin resistance and obesity

2013年2月8日 第6回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会 大阪大学(大阪府・大阪市)

6. 大隈貞嗣 藤川隆彦 緒方正人

Roles of p38alpha mitogen-activated protein kinase in blood cells in high-fat-induced chronic inflammation and insulin resistance

2013年12月12日 第42回日本免疫学会学術集会 幕張メッセ(千葉県・千葉市)

7. 大隈貞嗣 藤川隆彦 大津欣也 緒方正人

p38 in blood cells regulates high-fat-induced insulin resistance and obesity

2013年9月13日 第86回日本生化学会大会 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

[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

大隈 貞嗣 (OOKUMA SADATSUGU)

三重大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 70444429

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: