

令和元年5月21日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05345

研究課題名(和文)自然発症メタボリック症候群モデルを用いたカロテノイドの新たな生体調節機能の解明

研究課題名(英文)Elucidating novel regulatory mechanisms of carotenoids with spontaneous metabolic syndrome models

研究代表者

永島 まゆみ (Nagashimada, Mayumi)

金沢大学・保健学系・助教

研究者番号：30645510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,200,000円

研究成果の概要(和文)：抗酸化素材であるカロテノイドの炎症抑制作用に着目し、慢性炎症とインスリン抵抗性を病態基盤とするメタボリック症候群、糖尿病、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)への有用性と作用メカニズムを検証した。アスタキサンチンは炎症細胞の肝臓への浸潤や小胞体ストレスを減少させNASHを抑制した。リコピンは酸化ストレスの抑制、脂肪組織や肝臓に浸潤するマクロファージの極性を制御しインスリン抵抗性を改善した。更にインスリン感受性の制御に関与するケモカイン受容体CX3CR1をマクロファージ特異的に欠損するマウスは、肥満によるインスリン抵抗性や炎症が増悪した。マクロファージを作用点とする炎症促進モデルとして期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症やインスリン抵抗性という生活習慣病の本質的病態に対するカロテノイドの有効性と安全性を科学的に証明する点で社会的ニーズの高い研究である。カロテノイドが豊富に含まれる野菜や果物等の身近な食素材による生活習慣病に対する食事療法の再評価に繋がり、食生活の改善による国民の健康寿命の延伸に貢献する可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Carotenoids are potent antioxidants and anti-inflammatory micronutrients that have the potential to prevent or treat non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). We focused on the efficacy of carotenoid for metabolic syndrome, diabetes, NAFLD and nonalcoholic steatohepatitis (NASH). In this study, our data indicated that carotenoids, such as astaxanthin and lycopene, prevented and reversed NASH or insulin resistance by suppressing oxidative stress and regulating macrophage polarization both in liver and adipose tissue.

In addition, we found that chemokine system fractalkine-CX3CR1 had negative influences on insulin sensitivity by increasing adipose tissue macrophage recruitment. To further investigate the role of CX3CR1 on metabolic syndrome, we generated tissue-specific CX3CR1 knockout mice. The KO mice exacerbated obesity-induced inflammation and insulin resistance, suggesting that it have the potential to be a novel metabolic syndrome model.

研究分野：代謝学

キーワード：カロテノイド メタボリック症候群 インスリン抵抗性 NASH マクロファージ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

食生活の欧米化を背景とした肥満人口の増加に伴い、脂肪肝や糖尿病、メタボリック症候群等のインスリン抵抗性を背景とする生活習慣病が急増し、グローバルな社会問題となっている。炎症や自然免疫とエネルギー代謝の関連性は、マウスだけでなく、ヒトにおいても肥満の脂肪組織にマクロファージが浸潤することが明らかにされて以来( JCI 112:1796,2003 )、「慢性炎症」はインスリン抵抗性を基盤とする生活習慣病の本質的な病態として広く認識されている( Nature444: 860,2006 )。肥満状態の脂肪組織や肝臓等の代謝臓器では、炎症性サイトカインの産生細胞であるマクロファージの増加のみならず、炎症惹起性 M1 と抗炎症性 M2 マクロファージという対極的な表現型を持つマクロファージのバランスに破綻が生じ、炎症が誘導・維持される( Nature447: 1116,2007 )。すなわち肥満状態では、マクロファージの「量」の増加のみならず、M1 が M2 に対し優位に増加するという「質」の劇的な変化が生じており、さらに T 細胞の浸潤等、免疫担当細胞の動態が大きく変化することで、局所および全身に炎症が誘導され、遷延化している。特に、マクロファージは炎症とインスリン抵抗性の両者を制御する拠点として、きわめて重要な役割を担っている。しかし、マクロファージ等の炎症細胞は、インスリン抵抗性に関連した生活習慣病を予防・抑制する治療標的となるかは不明であり、十分な検討がなされていない。

我々は最近、骨髄から脂肪組織や肝臓へ単球・マクロファージを遊走、浸潤させ、炎症とインスリン抵抗性の誘導に関わるケモカイン受容体 CCR5 は正に、CX3CR1 は炎症を負に変化させ、インスリン感受性を全く反対に制御していることを見出している(Kitade H, Nagashimada M et al, Diabetes 61:1680, 2012)。また、近年の疫学研究から、果物や野菜に豊富に含まれる脂溶性色素のカロテノイドの摂取は、がんや心疾患、糖尿病の予防に有効とする結果が多く報告されている。そこで、強い抗酸化作用や抗炎症効果を持つ食品由来のカロテノイド、その中でトマトや魚介類に豊富に含まれるアスタキサンチンとリコピンに着目し、生活習慣病の予防と改善に対する生態調節機能について検討を行った。

## 2. 研究の目的

カロテノイドの炎症抑制作用に着目し、慢性炎症とインスリン抵抗性を共通の病態基盤とする生活習慣病への有用性と作用メカニズムを明らかにする。具体的には、1)メタボリック症候群および脂肪肝モデル動物を用いた各種カロテノイドの有用性、2)炎症の基点がマクロファージとなる炎症促進モデルを作製し、最終的にマクロファージに対するカロテノイドの炎症制御機構を明らかにする。カロテノイドの新たな生体調節機能を解明し、生活習慣病の予防と改善につながる高機能型食品開発のための研究基盤の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

アスタキサンチンによる食餌性 NASH モデルへの有効性評価については、8 週齢の C57BL/6J マウスに、高コレステロール高脂肪食または、0.02%のアスタキサンチンを混餌した高コレステロール高脂肪食を 12 週間投与した。肥満によるリコピンの慢性炎症やインスリン抵抗性への効果への検証は、8 週齢の C57BL/6J マウスに、高脂肪食または、0.012%のリコピンを混餌した高脂肪食を 8 週間投与した。2つのカロテノイドの生活習慣病における生体調節機能を解明するために、インスリン抵抗性や糖脂質代謝異常の改善、肝脂肪化の抑制、カロテノイド投与による肝臓、または脂肪組織に浸潤する炎症細胞の動態制御機構に着目した。また、カロテノイドの抗炎症作用の主たる作用臓器や作用点を検証するために、高脂肪食投与による

代謝表現型解析、 脂肪組織や肝臓に浸潤する炎症細胞の動態制御機構の解析を行い、臓器特異的炎症促進モデルとして有用であるか検証した。

#### 4 . 研究成果

アスタキサンチンによる非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) に対する有効性の検討

アスタキサンチンは食餌性 NASH モデルの肝臓に浸潤するマクロファージを減少させるだけでなく、抗炎症性 M2 マクロファージの割合を増加させ、脂肪組織や肝臓の炎症を軽減し、インスリン抵抗性や脂肪肝炎を抑制することを明らかにした。また、ER ストレスを抑制し EIF2 シグナルを亢進させるだけでなく、NASH の進展に關与する核内受容体の PPAR

及びその標的遺伝子の発現を有意に低下させた。これまで未知であったアスタキサンチンによる NASH の改善に關与する分子作用機構が明らかとなった (Sci Rep. 25;5:17192, 2015) (Int J Mol Sci. 8;18(3), 2017)。

リコピンにおける慢性炎症とインスリン抵抗性の改善

リコピンは、高脂肪食による食餌性肥満モデルで発症したインスリン抵抗性や脂肪肝炎を改善し、脂肪組織の酸化ストレスを抑制することを明らかにした。脂肪組織に浸潤するマクロファージの定量解析を行ったところ、炎症惹起性 M1 マクロファージ (CD11c<sup>+</sup>CD206<sup>-</sup>) は 23% 減少し、抗炎症性 M2 マクロファージ (CD11c<sup>-</sup>CD206<sup>+</sup>) は 60% 増加した。その結果、M1 から M2 優位へと脂肪組織のマクロファージの極性シフトを認めた。以上の結果から、リコピンは肥満による炎症を抑制し、インスリン抵抗性を改善させた。

自然発症メタボリック症候群モデルの確立

カロテノイドの抗炎症作用の主たる作用臓器や作用点を検証するために、インスリン感受性の制御に關与するケモカイン CX3CL1 の受容体 CX3CR1 をマクロファージ特異的に欠損したコンディショナルノックアウト (M-CX3CR1cK0) マウスを作製した。肥満に伴い脂肪組織に浸潤するマクロファージの増加による強い炎症が生じ、インスリン抵抗性、脂肪肝炎、糖尿病を自然発症することを見出した。臓器特異的炎症促進モデルとして有用であることが示された。M-CX3CR1cK0 マウスを用いたカロテノイドの有効性評価については解析中である。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. [Nagashimada M](#), Ota T: Role of vitamin E in nonalcoholic fatty liver disease. IUBMB Life. 71(4):516-522, 2019. doi: 10.1002/iub.1991. [ 査読有 ]
2. [Nagashimada M](#), Ueda T, Ishita Y, Sakurai H: TAF7 is a heat-inducible unstable protein and is required for sustained expression of heat shock protein genes. FEBS J.285(17):3215-3224. 2018. doi: 10.1111/febs.14604. [ 査読有 ]
3. Xu L, Nagata N, [Nagashimada M](#), Zhuge F, Ni Y, Chen G, Kamei J, Ishikawa H, Komatsu Y, Kaneko S, Ota T: A porcine placental extract prevents steatohepatitis by suppressing activation of macrophages and stellate cells in mice. Oncotarget, 9(19):15047-15060, 2018. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.05.028. [ 査読有 ]
4. Xu L, Nagata N, [Nagashimada M](#), Zhuge F, Ni Y, Chen G, Mayoux E, Kaneko S, Ota T: SGLT2 Inhibition by Empagliflozin Promotes Fat Utilization and Browning and Attenuates Inflammation and Insulin Resistance by Polarizing M2 Macrophages in Diet-induced

- Obese Mice. *EBioMedicine*, 20:137-149, 2017. doi: 10.3390/ijms18050994. [ 査読有 ]
5. Kobori M, Takahashi Y, Sakurai M, Ni Y, Chen G, Nagashimada M, Kaneko S, Ota T: Hepatic Transcriptome Profiles of Mice with Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis Treated with Astaxanthin and Vitamin E. *Int J Mol Sci.*, 8;18(3), 2017. doi: 10.3390/ijms18030593. [ 査読有 ]
  6. Nagata N, Xu L, Kohno S, Ushida Y, Aoki Y, Umeda R, Fuke N, Zhuge F, Ni Y, Nagashimada M, Takahashi C, Suganuma H, Kaneko S, Ota T: Glucoraphanin Ameliorates Obesity and Insulin Resistance Through Adipose Tissue Browning and Reduction of Metabolic Endotoxemia in Mice. *Diabetes*, 66(5):1222-1236, 2017. doi: 10.2337/db16-0662. [ 査読有 ]
  7. Zhuge F, Ni Y, Nagashimada M, Nagata N, Xu L, Mukaida N, Kaneko S, Ota T: DPP-4 Inhibition by Linagliptin Attenuates Obesity-Related Inflammation and Insulin Resistance by Regulating M1/M2 Macrophage Polarization. *Diabetes*, 65(10):2966-79, 2016. doi: 10.2337/db16-0317. [ 査読有 ]
  8. Ni Y, Zhuge F, Nagashimada M, Ota T: Novel Action of Carotenoids on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Macrophage Polarization and Liver Homeostasis. *Nutrients*, 8(7), 391, 2016. doi: 10.3390/nu8070391. [ 査読有 ]
  9. Kimura K, Tanida M, Nagata N, Inaba Y, Watanabe H, Nagashimada M, Ota T, Asahara S, Kido Y, Matsumoto M, Toshinai K, Nakazato M, Shibamoto T, Kaneko S, Kasuga M, Inoue H: Central Insulin Action Activates Kupffer Cells by Suppressing Hepatic Vagal Activation via the Nicotinic Alpha 7 Acetylcholine Receptor. *Cell Reports*, 15;14(10):2362-74, 2016. doi: 10.1016/j.celrep.2016.02.032. [ 査読有 ]
  10. Ni Y, Nagashimada M, Zhuge F, Zhan L, Nagata N, Tsutsui A, Nakanuma Y, Kaneko S, Ota T.: Astaxanthin prevents and reverses diet-induced insulin resistance and steatohepatitis in mice: A comparison with vitamin E. *Sci Rep.* 25;5:17192. 2015. doi: 10.1038/srep17192. [ 査読有 ]

[ 学会発表 ] ( 計 10 件 )

1. Nagashimada M, Ni Y, Ota T. Loss of fractalkine-CX3CR1 signaling promotes diet-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance by controlling the M1/M2 status of macrophage. 54th European Association for the Study of Diabetes (EASD) Annual Meeting, Berlin Germany, 2018/10/5
2. Nagashimada M, Ni Y, Ota T. Loss Of Fractalkine-cx3cr1 Signaling Exacerbates Obesity-induced Adipose Tissue Inflammation And Insulin Resistance Through M1 Dominant Shift In Macrophages. American Diabetes Association's 78th Scientific Sessions (ADA), Orlando, Florida, 2018/6/24
3. 永島田まゆみ, 倪銀華, 澤本一樹, 太田嗣人: Fractalkine-CX3CR1 シグナルの欠損は脂肪組織のマクロファージを M1 優位にシフトさせ、インスリン抵抗性を増悪させる. 第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会, 東京国際フォーラム, 東京, 2018 年 5 月 26 日
4. 永島田まゆみ, 倪銀華, 澤本一樹, 太田嗣人: Fractalkine-CX3CR1 シグナルの欠損は、マクロファージの M1 極性を介し、肥満による炎症とインスリン抵抗性を増悪さ

せる。第29回分子糖尿病学シンポジウム、グランフロント大阪、大阪、2017年12月2日

5. Nagashimada M, Ni Y, Sawamoto K, Ota T. Loss of fractalkine-CX3CR1 signalling exacerbates obesity-induced inflammation and insulin resistance. 53th European Association for the Study of Diabetes (EASD) Annual Meeting, Lisbon-Portugal, 2017/9/13
6. Nagashimada M, Ni Y, Sawamoto K, Ota T. Fractalkine-CX3CR1 signaling deficiency exacerbates obesity-induced inflammation and insulin resistance. American Diabetes Association's 77th Scientific Sessions (ADA), San Diego Convention Center, San Diego, California, America, 2017/6/11
7. 永島田まゆみ, 諸葛芬, 倪銀華, 太田嗣人: 肥満病態のマクロファージにおけるDPP-4の意義. 第37回日本肥満学会、東京ファッションタウン、東京、2016年10月8日
8. 永島田まゆみ, 太田 嗣人, 金子 周一: カロテノイドによる自然免疫への作用と非アルコール性脂肪肝炎の進展抑止. 第41回日本肝臓学会西部会、名古屋国際会議場、名古屋、2015年12月4日
9. Nagashimada M, Ni Y, Xu L, Nagata N, Kaneko S, Ota T. Loss of MIP-1 attenuates adipose tissue macrophage recruitment and insulin resistance induced by high-fat feeding or leptin deficiency, KEYSTONE SYMPOSIA, Kyoto, Japan, 2015/10/27
10. Nagashimada M, Kaneko S and Ota T: MIP-1 ablation prevents insulin resistance induced by high-fat feeding or leptin deficiency. 51<sup>th</sup>European Association for the Study of Diabetes (EASD) Annual Meeting, Stockholm, Sweden, 2015/9/17

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

該当なし

### (2)研究協力者

該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。