

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09423

研究課題名(和文) 病原体センサーMincleを介する細胞間クロストークと脂肪組織線維化の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of adipose tissue inflammation through Mincle and cell-cell interactions

研究代表者

田中 都 (Tanaka, Miyako)

名古屋大学・環境医学研究所・助教

研究者番号：60622793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪組織線維化に4ヶ月の時間を要する食餌誘導性肥満マウスに代わる短期脂肪組織線維化モデルの確立を試み、2週間でMincleの発現上昇、CLS(crown-like structure)の形成、脂肪組織の線維化が認められる脂肪組織虚血再灌流モデルを確立した。また、脂肪組織線維芽細胞の同定を試みた。コラーゲンプロモーター下でGFPを発現するマウスに高脂肪食負荷を行ったところ、内臓脂肪組織に存在するGFP陽性細胞はPDGFRを発現することを見出した。さらに、内臓脂肪組織と皮下脂肪組織のPDGFR陽性細胞は性質が大きく異なり、内臓脂肪組織PDGFR陽性細胞は線維化促進型であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：I developed a new animal model of adipose tissue fibrosis instead of high fat diet-induced obese model, which takes at least 4 months for adipose tissue fibrosis. Applying an ischemia-reperfusion model to the adipose tissue, I could establish the new model, which takes only 2 weeks for adipose tissue fibrosis involved in the upregulation of Mincle gene expression and CLS (crown-like structure) formation. I also identified the adipose tissue fibroblasts using high fat diet-induced obese mice that express GFP under collagen promoter. I found that the GFP-positive cells in epididymal fat tissue are almost all positive for PDGFR. In addition, the character of PDGFR-positive cells in epididymal fat tissue is different from that in subcutaneous fat tissue and more active type of fibroblasts.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：マクロファージ 脂肪組織線維化 内因性リガンド Mincle

1. 研究開始当初の背景

近年、肥満による脂肪組織の慢性炎症性変化（脂肪組織炎症）の分子機構に関する研究が進み、脂肪組織炎症を基盤とした臓器間ネットワークにより、メタボリック症候群が形成されることが明らかとなってきた。慢性炎症では、実質細胞と間質細胞の複雑な細胞間クロストークが持続し、組織リモデリングを介して機能障害に至るが、肥満の脂肪組織においても、実質細胞である脂肪細胞の肥大化に加え、血管新生、免疫担当細胞の浸潤、細胞外マトリクスの過剰産生等が認められる（脂肪組織リモデリング）。リモデリングを起こし機能障害に陥った脂肪組織は、種々の液性因子（アディポサイトカイン）を介して炎症を他臓器に波及させると考えられているが、その分子機構は、間質細胞の多様性と、複雑な細胞間クロストークの存在により未解明な点が多い。例えば、細胞外マトリクスの過剰産生について産生細胞や産生機構はほとんど知られていない。

一方、脂肪組織の最も重要な機能は余剰エネルギーを中性脂肪として蓄えることであり、生体の栄養状態に対応してエネルギーの出納が巧妙に制御されている。脂肪萎縮症に代表される脂肪組織への脂肪蓄積能の低下は、異所性脂肪蓄積を促進し、極度の脂肪肝、インスリン抵抗性などを惹起することから、脂肪組織への脂肪蓄積の重要性が示唆される。近年、脂肪組織における中性脂肪蓄積・放出のバランスは、交感神経系やインスリンなどの液性因子による制御のみならず、慢性炎症による制御が注目されている。例えば、肥満症例の脂肪組織線維化は脂肪細胞のサイズと逆相関することが臨床的に知られている（Diabetes 59:2817-2825, 2010）。また、申請者らは、脂肪組織炎症・線維化により脂肪蓄積能が低下したマウスにおいて著明な脂肪肝を認めることを見出した（Am. J. Pathol. 179: 2455- 2464, 2011）。即ち、脂肪組織炎症に引き続いて生じる間質線維化が、脂肪細胞の肥大化を制限し、持続的な遊離脂肪酸の放出を介して異所性脂肪の蓄積や臓器機能障害に繋がると想定される。申請者らは、これまでに肥満脂肪組織に浸潤するマクロファージに焦点を当て、マクロファージと脂肪細胞のクロストークが脂肪組織炎症の悪循環を形成することを明らかにしてきた（Endocr. J. 59:849- 857, 2012）。即ち、マクロファージと脂肪細胞はそれぞれの液性因子（tumor necrosis factor-（TNF）, 飽和脂肪酸）を介して互いに炎症を増悪させ、その結果、脂肪組織全体としてアディポサイトカインの産生破綻が生じ、メタボリック症候群の起点が形成されると考えられる。従って、この脂肪組織局所の細胞間クロストークは、ホルモンを介する臓器間ネットワークの基盤であると同時に、局所で産生される分泌因子の重要性を強く示唆している。

これまでに、申請者らは、脂肪組織炎症の新たな調節因子として、飽和脂肪酸により脂肪組織マクロファージに誘導される macrophage-inducible C-type lectin (Mincle) を同定した (Diabetes 60:819-826, 2011)。Mincle は、LPS によりマクロファージに強く誘導される Ca²⁺依存型レクチンであり (J. Immunol. 163:5039-5048, 1999)、結核菌糖脂質 trehalose-6,6'-dimycolate (TDM) などを認識する病原体センサーであることが報告されている (J. Exp. Med. 206:2879-2888, 2009)。ごく最近、申請者らは、Mincle 欠損 (Mincle-KO) マウスが、肥満に伴う脂肪組織線維化に対して抵抗性を示すこと、異所性脂肪の蓄積やインスリン抵抗性が軽減することを見出した (Nat. Commun. 5:4982, 2014)。興味深いことに、Mincle は、脂肪組織炎症の特徴的な所見である crown-like structure (CLS) 周囲に局在する。CLS は、細胞死に陥った脂肪細胞をマクロファージが取り囲み、貪食・処理をする組織像と考えられている。Mincle は、死細胞を認識するセンサーとしても作用することから (Nat. Immunol. 9:1179-1188, 2008)、Mincle・内因性リガンド系による脂肪組織の炎症・線維化の増悪の可能性が強く示唆される。

2. 研究の目的

肥満の脂肪組織は「脂肪細胞（実質細胞）とマクロファージや線維芽細胞などの間質細胞の細胞間クロストークの場」であると捉え、複雑な細胞間クロストークによりもたらされる脂肪組織の機能破綻の分子機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

研究目的達成のため、脂肪細胞と種々の間質細胞による細胞間クロストークに注目し、(1) Mincle 活性化に関わる内因性リガンドの探索と (2) 脂肪組織線維化と脂肪組織機能障害の分子機構に関して、細胞レベルと個体レベルの検討を組み合わせ実施した。

(1) Mincle・内因性リガンド系の意義を確立するために、Mincle を介する新規脂肪組織線維化モデルの確立、Mincle 欠損マクロファージの特徴を解析した。具体的には、脂肪組織への栄養血管を一定時間結紮し、開放することで、脂肪組織の虚血-再灌流を行い、脂肪組織線維化モデルの確立を試みた。虚血時間、再灌流時間など、高脂肪食負荷マウスで認められる脂肪組織線維化と類似する条件を検討した。また、腹腔内マクロファージを用い、マクロファージ融合能について検討した。

(2) 脂肪組織線維化の全貌を解明するために、脂肪組織における線維芽細胞や活性化線維芽細胞の同定を試み、脂肪組織活性化線維芽細胞の特徴を解析した。具体的には、コラーゲンプロモーター下で GFP を発現する

Col1a2-EGFP Tg マウスを用い, GFP 陽性細胞の性質を検討した。また, 更に, 内臓脂肪組織間質細胞と皮下脂肪組織間質細胞の線維芽細胞の性質を比較した。

4. 研究成果

(1) Mincle 活性化に関わる内因性リガンドの探索

食餌誘導性肥満マウスに代わる脂肪組織線維化モデルの確立を試みた。その結果, 脂肪組織において虚血-再灌流障害を起こすと, 肥満脂肪組織に類似した脂肪組織線維化と crown-like structure の形成, Mincle の発現上昇が認められることを見出した。また, Mincle 発現細胞の性質を検討するため, マクロファージ融合能を検討したところ, 野生型マクロファージと比較して, Mincle 欠損マクロファージでは, マクロファージ融合能が低下している可能性を見出した。肥満の脂肪組織における CLS 形成は, Mincle 欠損マウスで減弱するため, CLS 形成にマクロファージ融合能が重要であることが示唆された。

(2) 脂肪組織線維化と脂肪組織機能障害の分子機構

コラーゲンプロモーター下で GFP を発現する Col1a2-EGFP Tg マウスに肥満を誘導し, 活性化線維芽細胞を検討したところ, GFP 陽性細胞は確かに存在し, PDGFR 陽性であることを見出した。また, 線維化した脂肪組織で増加するとされている PDGFR 陽性 CD9 陽性細胞が, 皮下脂肪に比較して内臓脂肪で顕著に多いことを見出した。さらに, 肥満マウスの内臓脂肪由来 PDGFR 陽性細胞は, 皮下脂肪由来 PDGFR 陽性細胞に比較して脂肪細胞分化能が極度に低下することを見出した。

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 7 件)

M. Tanaka, M. Itoh, Y. Ogawa, T. Suganami.

Molecular mechanism of obesity-induced "metabolic" tissue remodeling. **J. Diabetes Investig.** (査読有) 9:256-261, 2018. Review (DOI: 10.1111/jdi.12769)

A. Matsumoto*, M. Tanaka*, H. Matsumoto, K. Ochi, Y. Moro-oka, H. Kuwata, H. Yamada, I. Shirakawa, T. Miyazawa, H. Ishii, K. Kataoka, Y. Ogawa, Y. Miyahara, T. Suganami. Synthetic "smart gel" provides glucose-responsive insulin delivery in diabetic mice. **Sci. Adv.** (査読有) 3:

eaq0723, 2017. (*equally contributed) (DOI: 10.1126/sciadv.aq0723)

D. Takahashi, T. Mori, E. Sohara, M. Tanaka, M. Chiga, Y. Inoue, N. Nomura, M. Zeniya, H. Ochi, S. Takeda, T. Suganami, T. Rai, S. Uchida. WNK4 is an adipogenic factor and its deletion reduces diet-induced obesity in mice. **EBioMedicine** (査読有) 18: 118-127, 2017. (DOI: 10.1016/j.ebiom.2017.03.011)

C. Komiya*, M. Tanaka*, K. Tsuchiya, N. Shimazu, K. Mori, S. Furuke, Y. Miyachi, K. Shiba, S. Yamaguchi, K. Ikeda, K. Ochi, K. Nakabayashi, K. Hata, M. Itoh, T. Suganami, Y. Ogawa. Antifibrotic effect of pirfenidone in a mouse model of human nonalcoholic steatohepatitis. **Sci. Rep.** (査読有) 7:44754, 2017. (*equally contributed) (DOI: 10.1038/srep44754.)

R. Thomas Jennings, E. Odkhuu, A. Nakashima, N. Morita, T. Kobayashi, I. Yamai, M. Tanaka, T. Suganami, S. Haga, M. Ozaki, Y. Watanabe, Y. Nagai, K. Takatsu, T. Kikuchi-Ueda, I. Ichimonji, Y. Ogawa, H. Takagi, T. Yamazaki, K. Miyake, S. Akashi-Takamura. Inflammatory responses increase secretion of MD-1 protein. **Int. Immunol.** (査読有) 28: 503-512, 2016. (DOI: 10.1093/intimm/dxw031)

R. Hachiya, T. Shiihashi, I. Shirakawa, Y. Iwasaki, Y. Matsumura, Y. Oishi, Y. Nakayama, Y. Miyamoto, I. Manabe, K. Ochi, M. Tanaka, N. Goda, J. Sakai, T. Suganami, Y. Ogawa. The H3K9 methyltransferase Setdb1 regulates TLR4-mediated inflammatory responses in macrophages. **Sci. Rep.** (査読有) 6:28845, 2016. (DOI: 10.1038/srep28845)

Y. Watanabe, Y. Nagai, H. Honda, N. Okamoto, S. Yamamoto, T. Hamashima, Y.

Ishii, M. Tanaka, T. Suganami, M. Sasahara, K. Miyake, K. Takatsu. Isoliquiritigenin attenuates adipose tissue inflammation *in vitro* and adipose tissue fibrosis through inhibition of innate immune responses in mice. **Sci. Rep.** (査読有) 6: 23097, 2016. (DOI: 10.1038/srep23097)

[学会発表](計 7 件)
<国際学会>

Miyako Tanaka, *et al.* Mincle, a novel pathogen sensor in macrophages, underlies obesity-induced adipose tissue fibrosis in mice. 2016 Keystone Symposia for the meeting on Fibrosis: From Basic Mechanisms to Targeted Therapies, 2016.

Miyako Tanaka, *et al.* Macrophage-inducible C-type lectin underlies obesity-induced adipose fibrosis. 2015 Keystone Symposia for the meeting on Obesity and the Metabolic Syndrome: Mitochondria and Energy Expenditure, 2015.

<国内学会>

田中 都, 他 シンポジウム 10: イムノメタボリズムと肥満症 「イムノメタボリズムと脂肪組織炎症」第 37 回日本肥満学会 2016.

田中 都, 他 若手向け企画シンポジウム「メタボリックシンドロームと脂肪組織機能破綻」第 89 回日本内分泌学会学術総会 2016.

田中 都, 他 シンポジウム 5: 生体の代謝異常と心血管病「生体の脂質代謝異常とアディポサイトカイン」第 23 回日本心血管内分泌代謝学会 2015.

田中 都, 他 若手シンポジウム: 生活習慣病の理解に向けた Molecular Metabolism の新展開 「メタボリックシンドロームにおける脂肪組織炎症・線維化の意義と分子機構解明」第 59 回日本薬学会関東支部大会 2015.

田中 都, 他 シンポジウム 12: 肥満の病態と治療戦略の最前線-現代人はなぜ太る?- 「肥満脂肪組織の線維化分子機構について」第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会 2015.

[図書](計 2 件)

T. Suganami, M. Tanaka, Y. Ogawa. Springer Open. Chronic Inflammation Mechanisms and Regulation. 2016. pp. 291-298

Y. Ogawa, T. Suganami, M. Itoh, M. Tanaka. Springer Open. Innovative

Medicine Basic Research and Development. 2015. pp. 149-156.

[その他]

<ホームページ等>

<http://www.riem.nagoya-u.ac.jp/4/mmm/index.html>

<邦文総説>

田中 都: 「健全なる身体には健全なる脂肪組織を」 **生物工学会誌**(査読無) 96-2号, 77, 2018.

田中 都, 太田紘也, 菅波孝祥: 「慢性炎症研究の今」 **肥満研究**, 日本肥満学会(査読無) 23(2); 156-160, 2017.

田中 都, 菅波孝祥: 「肥満に伴う脂肪組織の線維化を招く鍵分子」 **医学のあゆみ**(査読無) Vol. 257 No. 8 Page 874-876, 2016.

田中 都, 菅波孝祥: 「脂肪組織の線維化を調節する分子 Mincle」 **医学のあゆみ**(査読無) Vol. 257 No. 6 Page 607-612, 2016.

田中 都, 菅波孝祥: 「MC4R」 **医学のあゆみ**(査読無) 第 5 土曜特集 GPCR 研究の最前線 2016 Vol. 256 No. 5 Page 535-539, 2016.

田中 都, 菅波孝祥, 小川佳宏: 「レプチンの分泌機構と全身の作用」 **日本臨床 74 巻(増刊号 1) 新時代の臨床糖尿病学(上)**(査読無) Page 161-165, 2016.

田中 都, 菅波孝祥, 小川佳宏: 「脂質と免疫センサー」 **炎症と免疫**(査読無) Vol. 23 No. 6 Page 13(483)-16(486), 2015.

田中 都, 菅波孝祥, 小川佳宏: 「脂肪組織における炎症と線維化」 **細胞**(査読無) Vol. 47 No. 4 Page 4(164)-7(167), 2015.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 都 (TANAKA, Miyako)
名古屋大学・環境医学研究所・助教
研究者番号: 60622793

(3) 連携研究者

山崎 晶 (YAMASAKI, Sho)
大阪大学・微生物病研究所・教授
研究者番号: 40312946

上住 聡芳 (Uezumi, Akiyoshi)
地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター・東京都健康長寿医療センター研究所・専門副部長
研究者番号: 60434594

小川 佳宏 (Ogawa, Yoshihiro)
九州大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号: 70291424