

令和元年5月30日現在

機関番号：13201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06705

研究課題名(和文)肥満進展においてペリサイト局在の動的変化により形成される脂肪幹細胞ニッチの同定

研究課題名(英文) Impacts of pericyte behavior on vascular niche maintaining adipocyte progenitor cells in obesity

研究代表者

小野木 康弘 (Onogi, Yasuhiro)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・研究員

研究者番号：80801761

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：肥満病態に關与する炎症性マクロファージの集積および新たな血管構造と脂肪細胞の生成の三事象が協調して病態進展に寄与する可能性を追究した。炎症性マクロファージは解糖系代謝依存的なERKシグナル伝達経路を介してPDGF-Bを産生することが明らかになった。肥大化脂肪組織においてマクロファージを除去することで、肥満による血管からのペリサイトの脱離、それに伴う血管新生と脂肪組織の肥大化が防御された。また同時に、脂肪新生の起源となる脂肪幹細胞の割合が減少した。以上より、肥満により脂肪組織に集積する炎症性マクロファージは血管新生と脂肪新生を助長することで脂肪組織肥大化に寄与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満関連疾患の克服は、本邦のみならず全世界で解決すべき課題である。肥満病態の進展機構の理解は、肥満に起因する疾患の治療戦略構築の基礎となりえる。肥大化した脂肪組織に集積する炎症性マクロファージによる慢性炎症は、肥満関連疾患の引き金となることが明らかになってきている。それに加えて、本知見は炎症性マクロファージが血管を再構築することで、新たな脂肪細胞を生成する環境を生み出すことを見出した。また、炎症性マクロファージは高血糖下においてより活性化する知見を踏まえると、本研究は、肥満・高血糖病態での血糖降下療法の重要性を示すことに加え、マクロファージの活性制御を標的とした新規治療戦略の可能性を提示する。

研究成果の概要(英文)：We studied how obesity-related three events, namely accumulation of pro-inflammatory macrophages, angiogenesis and adipogenesis from adipocyte progenitor cells, coordinately involve in the expansion of white adipose tissue (WAT) expansion. Pro-inflammatory-activated ERK signaling pathway coupled with glycolysis induced Pdgfb mRNA expression in macrophages. Diet-induced WAT expansion was prevented in mice depleted adipose tissue macrophages with prevention of pericytes dissociation from vessels and neovascularization. The number of adipocyte progenitor cells in WAT was decreased in this condition compared to that in control mice. These findings suggest that pro-inflammatory macrophages accumulated close to vasculature remodel vascular networks by exposing abundant PDGF-B against pericytes within obese WAT. In addition, adipocyte progenitor cells appear to proliferate within the microenvironment where vascular remodeling occurs during obesity.

研究分野：代謝学

キーワード：脂肪組織肥大化機構 血管新生 脂肪幹細胞 マクロファージ ペリサイト PDGF

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

1. 研究開始当初の背景

肥満は、本邦の死因上位を占める心血管疾患、脳血管疾患および悪性新生物をはじめ、さまざまな肥満関連疾患をもたらす。このため、肥満病態における脂肪組織の病態生理が多くの側面から解明されてきた。特に、肥大化に伴う血管構造の再構築(血管新生)、新たな脂肪細胞の生成(脂肪新生)および持続的な炎症状態(慢性炎症)の形成は、肥満病態の進展とそれに関連する疾患の発症を結びつける脂肪組織に特徴的な現象であると考えられる。

脂肪組織では、脂肪細胞の肥大化に伴う低酸素状態を解消するため、既存の血管網から新たな血管が構築される。正常状態では、既存の血管からの血管内皮細胞の増殖は、血管内皮細胞の周囲を被覆する血管周皮細胞(ペリサイト)によって抑制されている。一方研究代表者は、肥満状態の脂肪組織では、過剰な血小板由来増殖因子 PDGF-B に暴露されることでペリサイトが血管から脱落し、血管内皮細胞の増殖が誘導されることを明らかとし、報告した。血管新生の初期段階である血管からのペリサイトの脱落は、肥満に伴い脂肪組織に浸潤するマクロファージの集積する領域において顕著に観察された。脂肪組織マクロファージは慢性炎症の中心的な役割を果たす免疫細胞であるが、肥満に伴う血管構造の再構築に対する脂肪組織マクロファージの関与はこれまで十分検証されていない。

脂肪組織の体積が増大する機構として、既存の脂肪細胞の肥大化と新たな脂肪細胞の生成(脂肪新生)が重要である。近年、脂肪細胞の起源となる脂肪幹細胞が特定されたことで、生体内での脂肪新生の重要性が指摘されている。脂肪新生は血管網の発達後に発生すること、血管新生と脂肪新生が近接して発生すること、さらにペリサイトが脂肪幹細胞であるとの報告から、血管周囲の環境が脂肪幹細胞の維持および運命決定の場であると推定される。しかし、どのような細胞間ネットワークの中で脂肪幹細胞が維持および分化制御を受けるかについての分子機構は明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、「脂肪幹細胞の維持にかかわる脂肪組織内の細胞間ネットワークの解明」を目的とした。ペリサイトの有無によって血管周囲の組織幹細胞の増殖が制御されるとの知見に着想を得て、脂肪組織の肥大化に伴う血管からのペリサイト脱落が脂肪幹細胞の増殖を制御する可能性を想定した。そこで、(1)ペリサイト脱落の誘引因子である PDGF-B のマクロファージにおける発現調節機構の解明、(2)ペリサイト脱落に対する脂肪組織マクロファージの関与および(3)ペリサイト脱落に伴う脂肪幹細胞増殖への影響の観点から「炎症性マクロファージ由来 PDGF-B 暴露による血管からのペリサイトの脱落が、脂肪幹細胞の増殖を促進させ、肥満を助長する」との仮説の実証を目指した。

3. 研究の方法

(1) クロドロン酸封入リポソームの作製

3-sn ホスファチジルコリン 172 mg、コレステロール 16 mg および β -トコフェロール 0.5 mg を丸底フラスコに入れ、メタノール/クロロホルム混合液(1:2) 2 mL で溶解した。有機溶媒を揮発させた後、脂質膜を 1 mL の 200 mg/mL クロドロン酸または対照としてリン酸緩衝液で懸濁させた。懸濁液を液体窒素と 40 °C の温浴との間を 5 回往復させた。リポソームの粒径を均一化させるため、押出機(Avestin, Mannheim, Germany)を用いて 0.4 μ m 孔ポリカーボネートフィルターを 21 回通過させた。

(2) 実験動物

すべての動物実験は動物実験委員会から承認を受け、富山大学動物実験取り扱い規則に則り、必要以上の苦痛を動物に与えないように配慮した上で実施した。マウスは温度 20-26 °C、12 時間明暗周期(7-19 時を明期、19-7 時を暗期)で調節された環境で飼育した。食餌は通常食として RI 照射滅菌済みの PicoLab Rodent Diet 20 を使用した。また、高脂肪食として Rodent diet with 60 kcal% fat diet を給餌した。食餌および給水は自由に摂取させた。雄性の C57BL/6J マウスに 8-11 週齢から 8 または 12 週間高脂肪食を給餌した。作製したリポソーム懸濁液は 9 倍量のリン酸緩衝液で懸濁し、高脂肪食負荷開始 6 週目以降、週二回腹腔内投与した。

(3) フローサイトメトリー解析

脂肪組織を 2 mg/mL コラゲナーゼ液で 45 分間 37 °C で消化した。遠心分離により沈殿した細胞塊を間質血管細胞分画とした。間質血管細胞を溶血後、Fc 受容体に対するブロッキングを行った。細胞表面抗原に対する蛍光標識抗体で染色し、フローサイトメーター(FACS Canto II, FACS Aria; BD Biosciences, New Jersey, U.S.A)で解析した。

(4) 定量的 PCR 解析

脂肪組織および培養細胞からフェノール・クロロホルム抽出法を用いて total RNA を抽出した。抽出した total RNA から逆転写 PCR 法により cDNA を作製した。各遺伝子に対す

るプライマー(0.2 μM)を使用し、インターカレーター法による定量的PCR(Mx3000P/3005P, Agilent, California, U.S.A.)を用いて mRNA 遺伝子発現量を解析した。遺伝子発現量は Rn18s 遺伝子で補正し比較した。

(5) Whole-mount 免疫蛍光染色法

1%パラホルムアルデヒドで固定した脂肪組織を 20 μg/mL プロテイナーゼ K で膜透過処理を行った。ブロッキング処理後、抗 CD13 抗体および抗 PECAM-1 抗体で一晩 4℃ で染色した。組織を洗浄後、ブロッキング処理を行い、蛍光標識された抗ラット IgG 抗体および抗ハムスター IgG 抗体で一晩 4℃ で染色した。洗浄後、組織を透明化するために段階的に高濃度フルクトース溶液に浸漬した。血管像は共焦点レーザー顕微鏡 (Leica TCS SP5, Wetzlar, Germany) で観察した。血管面積およびペリサイト接着率は Image J (NIH) で定量した。

(6) 細胞培養

マクロファージ細胞株として RAW264.7 細胞を使用した。細胞は 10%ウシ胎児血清および 25 mM グルコースを含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) で培養した。血清不含 5.56 mM グルコース含有 DMEM で一晩培養した細胞を各阻害剤で処置した後、100 ng/mL リポ多糖 (LPS) で刺激した。細胞は 37℃、5% CO₂ 条件化で培養した。

(7) ウェスタンブロット法

細胞をタンパク質抽出液で溶解し、遠心分離後にタンパク質抽出液を得た。レムリサンプルバッファと濃度既知のタンパク質抽出液を混合し煮沸したものをサンプルとした。SDS-PAGE によりサンプル中のタンパク質を分離し、PVDF メンブレンに転写した。メンブレンをブロッキング処理した後、目的タンパク質を間接法により抗体で染色した。化学発光を LAS4000mini (GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan) で検出した。

(8) 組織培養

8 週齢雄性 C57BL/6J マウスから内臓脂肪組織を摘出し、小片に断片化した。血清不含 25 mM グルコース含有 DMEM に組み換えマウス PDGF-BB (100 ng/mL) を添加し、組織片を 24 時間培養した。培養後、上記の間質血管細胞分画法に従い細胞懸濁液を調製し、フローサイトメトリーを用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 肥満脂肪組織マクロファージの除去による Pdgfb 発現変化

肥満マウスの脂肪組織における Pdgfb 発現に対する脂肪組織マクロファージの寄与を検討した。高脂肪食を 6 週間給餌したマウスに対し、マクロファージ除去試薬であるクロドロン酸リポソーム (Clod) を腹腔内投与し、投与開始から 2 および 6 週間後に脂肪組織におけるマクロファージの割合をフローサイトメトリー、Pdgfb 遺伝子発現を定量的 PCR 法を用いて解析した。Clod 投与はいずれの投与期間においても効果的に脂肪組織マクロファージを減少させた。その際、脂肪組織における Pdgfb 遺伝子発現は、Clod 投与により顕著な低下を示した。したがって、食餌性肥満に伴う内臓脂肪組織における PDGF-B の主要な産生源としてマクロファージの寄与が示された。

(2) マクロファージにおける Pdgfb 発現調節機構

マウス腹腔マクロファージおよび RAW264.7 マクロファージ細胞株を用いて、マクロファージにおける Pdgfb 遺伝子発現調節機構の解明を試みた。抗炎症性刺激ではなく、炎症性刺激 LPS 処置は顕著に Pdgfb 遺伝子発現を増加させた。さらに、LPS 誘導性 Pdgfb 遺伝子発現は、高グルコース条件下において増幅された。LPS 刺激により、解糖系代謝物である乳酸の増加を認めたことから、Pdgfb 遺伝子発現誘導における解糖系代謝の関与を検証した。解糖系阻害剤および解糖系代謝酵素のノックダウンにより、Pdgfb 遺伝子発現は解糖系代謝依存的な細胞外シグナル調節キナーゼ ERK シグナルの活性化を介して誘導されることが明らかになった。

(3) マクロファージ除去による血管リモデリング変化

脂肪組織の肥大化過程の血管リモデリングにおける脂肪組織マクロファージの関与を whole-mount 免疫蛍光染色法により検討した。Clod 投与マウスは投与 2 週目から、血管からのペリサイトの脱落を示した。さらに、投与 6 週目において、Clod 投与により血管面積の顕著な低下、つまり血管新生の抑制が認められた。この結果と一致して、Clod 投与マウスは高脂肪食負荷による脂肪重量増加および体重増加抑制から保護された。

(4) マクロファージ除去による脂肪幹細胞数の変化

脂肪組織マクロファージの除去により、血管からのペリサイトの脱落が抑制されたこと

から、ペリサイト脱落の有無が脂肪幹細胞の数的変化に与える影響をフローサイトメトリーにより解析した。Clod 投与マウスの脂肪組織において、Lineage-Sca1+CD140a+の表面抗原で定義した脂肪幹細胞数の低下が認められた。

(5) 培養脂肪組織における脂肪幹細胞数の変化

肥満マウスの脂肪組織を模倣した高濃度 PDGF-B 存在下で脂肪組織を培養し、ペリサイトの血管からの脱落と脂肪幹細胞の数的変化を解析した。脂肪組織に対する PDGF-B 処置は血管からのペリサイトの脱落を誘導した。しかし、この条件において PDGF-B 処置は脂肪幹細胞の割合を変化させなかった。また、分取した脂肪幹細胞において増殖能を定量的 PCR 法により解析したが、増殖の指標とした Ki67 遺伝子発現に差異を認めなかった。よって、肥満による脂肪幹細胞の増殖は、過剰な PDGF-B 暴露とは独立した機構により誘導されることが明らかになった。

以上より、脂肪組織の肥大化過程において、浸潤した炎症性マクロファージは、組織内での代謝ストレスに応答した固有の細胞内シグナル伝達経路を介して PDGF-B を産生し、ペリサイトを血管から脱落させる。この脱落と同時に脂肪幹細胞増殖が誘導されることが示唆された。また、ペリサイト脱落と脂肪幹細胞の増殖との間には PDGF-B とは独立した機構の存在が示唆される。本研究により、肥大化した内臓脂肪組織に認められる炎症性マクロファージの集積および新たな血管と脂肪細胞の生成の三事象が連携して肥満を進展させる新機構の一端が明らかとなった。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計6件)

- (1) Onogi Y, Wada T, Tsuneki H, Sasaoka T. Pro-inflammatory macrophages promote vascular remodeling in white adipose tissue during diet-induced obesity. The 17th Japan-Korea Diabetic Nephropathy Seminar; 2019.
- (2) Onogi Y, Wada T, Matsuzawa T, Okekawa A, Watanabe E, Tsuneki H, Sasaoka T. Glycolytic activation promotes PDGF-B production in adipose tissue macrophages during obesity development. American Diabetes Association 78th Scientific Sessions; 2018.
- (3) 松澤崇俊, 和田 努, 小野木康弘, 桶川 晃, 渡邊愛理, 池田恵介, 中野 実, 恒枝宏史, 笹岡利安. マクロファージによる血管新生を介した内臓脂肪組織肥大化機構の解明. 日本薬学会北陸支部第 130 回例会; 2018.
- (4) 小野木康弘, 和田 努, 松澤崇俊, 桶川 晃, 恒枝宏史, 笹岡利安. 脂肪組織マクロファージの代謝リプログラミングによる PDGF-B 産生機構の解析. 第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会; 2018.
- (5) 松澤崇俊, 和田 努, 小野木康弘, 桶川 晃, 渡邊愛理, 恒枝宏史, 笹岡利安. マクロファージ除去が内臓脂肪組織の肥大化を抑制するメカニズムの検討. 第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会; 2018.
- (6) 小野木康弘, 和田 努, 松澤崇俊, 桶川 晃, 恒枝宏史, 笹岡利安. 脂肪組織 CD11c 陽性マクロファージにおける Pdgfb 発現機構の解明. 日本薬学会第 138 年会; 2018.

〔その他〕

ホームページ等

富山大学 大学院医学薬学研究部 (薬学系) 病態制御薬理学研究室

<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/clinphar/index-j.html>

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。