

平成21年3月31日現在

研究種目：若手研究（A）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18689022
 研究課題名（和文） 炎症性メディエータとしての遊離脂肪酸の分子機構の解明と医学応用
 研究課題名（英文） Pro-inflammatory role of free fatty acids in the pathophysiology of the metabolic syndrome
 研究代表者
 菅波 孝祥（SUGAMI TAKAYOSHI）
 東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教
 研究者番号：50343752

研究成果の概要：

肥満の脂肪組織から遊離する飽和脂肪酸が、生体の自然免疫反応に重要な4型 Toll 様受容体を介してマクロファージを活性化し、脂肪組織の炎症性変化や全身の糖代謝を制御することを証明した。本研究成果により、飽和脂肪酸がメタボリックシンドロームの基盤病態である内臓脂肪の蓄積と全身の慢性炎症、すなわち、代謝と炎症を繋ぐ鍵分子であることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2006年度 | 9,800,000 | 2,940,000 | 12,740,000 |
| 2007年度 | 6,300,000 | 1,890,000 | 8,190,000 |
| 2008年度 | 4,900,000 | 1,470,000 | 6,370,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 21,000,000 | 6,300,000 | 27,300,000 |

研究分野：内分泌代謝学、腎臓内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：脂肪酸、肥満、脂肪細胞、マクロファージ、炎症、メタボリックシンドローム

1. 研究開始当初の背景

脂肪細胞において中性脂肪分解により生じる遊離脂肪酸は、飢餓時に全身にエネルギーを供給する媒体であるとともに、脂肪細胞に由来する内分泌因子（アディポサイトカイン）として多彩な生命現象に関与する。臨床的にも、血中遊離脂肪酸濃度の上昇がインスリン抵抗性や血管内皮障害と相関することが知られており、肥満に合併するメタボリックシンドロームや動脈硬化との関係が示唆されるが、その分子機構には不明の点が多い。我々は、ごく最近、新たに確立した脂肪細胞とマクロファージの共培養系を用いて、脂肪細胞に由来する遊離脂肪酸がマクロファ

ージに炎症性変化を惹起することを世界に先駆けて証明し (*Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25:2062-2068, 2005)、脂肪細胞とマクロファージの相互作用が肥満の脂肪組織炎症に重要であることを明らかにした。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて本研究課題では、炎症性メディエータとしての遊離脂肪酸の産生調節と機能的意義の解明と医学応用を目指す。すなわち、基礎研究として、(1) 遊離脂肪酸の産生調節機構に関する検討、および(2) 遊離脂肪酸の機能的意義に関する検

討を行い、臨床研究として、多価不飽和脂肪酸がメタボリックシンドローム患者の血中炎症パラメーターに及ぼす影響を検討する。

3. 研究の方法

(1) 遊離脂肪酸の産生調節機構に関する検討

①遊離脂肪酸の産生調節における脂肪組織マクロファージの意義；

マクロファージの増殖・分化あるいは機能に異常を有する遺伝子操作マウスや自然発症マウスから腹腔内マクロファージや骨髄マクロファージを調整し、3T3-L1 脂肪細胞と共培養を行うことにより、遊離脂肪酸の産生調節におけるマクロファージの機能的意義を明らかにする。これらのマウスに高脂肪食を負荷して肥満を誘導し、個体レベルにおける意義を検討する。

②新しい脂肪細胞機能調節分子の同定と意義；

脂肪細胞とマクロファージの共培養系を用いたトランスクリプトーム解析により、脂肪細胞機能に関わる新しい機能分子を同定する。3T3-L1 脂肪細胞に過剰発現、あるいはノックダウンを行うことにより、遊離脂肪酸の産生に対する意義を検討する。

(2) 遊離脂肪酸の機能的意義に関する検討

①TLR4 の内在性リガンドとしての飽和脂肪酸の意義；

TLR4 シグナルに異常を有する遺伝子操作マウスや自然発症マウス (TLR4 欠損マウス、MD-2 欠損マウス、C3H/HeJ マウスなど) からマクロファージを調整し、飽和脂肪酸による炎症性サイトカイン産生に TLR4 シグナルが関与する可能性を検証する。リポポリサッカライド (LPS) と飽和脂肪酸による細胞内シグナルや標的遺伝子の違いを検討する。上記のマウスに肥満を誘導して、脂肪組織マクロファージの活性化における TLR4 シグナルの意義を明らかにする。

②多価不飽和脂肪酸による炎症抑制作用の分子機構；

LPS や飽和脂肪酸により惹起される炎症性変化に対する多価不飽和脂肪酸の効果を培養マクロファージ (RAW264、腹腔内マクロファージなど) や血管内皮細胞 (HUVEC) などを用いて検討する。肥満マウスや動脈硬化モデルマウスに対して代表的な多価不飽和脂肪酸 EPA を投与し、脂肪組織炎症や血管内皮への単球接着に対する EPA の効果を検討する。

(3) 多価不飽和脂肪酸がメタボリックシンドローム患者の血中炎症パラメーターに及ぼす影響

メタボリックシンドロームの診断基準を満たす肥満患者に対して、EPA を3ヶ月間投与し、アディポサイトカインや内皮由来接着分

子の血中レベルに及ぼす影響を検討する。

4. 研究成果

(1) 遊離脂肪酸の産生調節機構に関する検討

①遊離脂肪酸の産生調節における脂肪組織マクロファージの意義；

我々が独自に構築した脂肪細胞とマクロファージの共培養系において、マクロファージに由来する TNF- α が脂肪細胞の脂肪分解を促進し、遊離した脂肪酸 (特に、飽和脂肪酸) がマクロファージの TLR4/NF- κ B 系を介して TNF- α 産生をさらに増強することにより、脂肪組織の炎症性変化 (炎症性サイトカイン産生増加と抗炎症性サイトカイン産生減少) が増悪する vicious cycle が示唆された

(*Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27: 84-91, 2007)。実際、TLR4 シグナルを欠損する C3H/HeJ マウスでは、高脂肪食負荷による体重や脂肪組織重量の増加は対照野生型マウスとほぼ同等であったが、脂肪組織の炎症性変化や全身の糖代謝は有意な改善を認め、遊離脂肪酸の血中濃度も低値であった

(*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354: 45-49, 2007)。以上の結果より、TLR4 は、メタボリックシンドロームにおいて代謝と炎症を繋ぐ鍵分子である可能性が示唆された。

②新しい脂肪細胞機能調節分子の同定と意義；

3T3-L1 脂肪細胞の長期間培養系を用いた検討により、脂肪細胞の肥大化に伴う炎症性変化には、ERK の活性化と MAPK ファミリーの負の制御因子である MKP-1 の発現低下が重要であることを見出し、マクロファージ浸潤に中心的な役割を果たす代表的なケモカイン MCP-1 過剰産生の分子機構を明らかにした (*J. Biol. Chem.* 282: 25445-25452, 2007)。一方、MKP-1 は、脂肪細胞のインスリン感受性や中性脂肪蓄積には影響を及ぼさず、炎症性変化に選択的に関与すると考えられる。

さらに、細胞遊走を遊走速度と方向性に分けて解析することが可能なリアルタイム細胞動体測定装置 TAXIScan を用いて、脂肪組織由来液性因子に対する細胞遊走能を検討した。骨髄細胞における MCP-1 受容体 CCR2 が、MCP-1 を含む脂肪組織由来液性因子に対する細胞遊走の方向決定において重要であることが明らかになり、肥満の脂肪組織へのマクロファージ浸潤において骨髄細胞の CCR2 を介した細胞遊走の質的变化が関与する可能性が示唆された (*J. Biol. Chem.* 283: 35715-35723, 2008)。

(2) 遊離脂肪酸の機能的意義に関する検討

①TLR4 の内在性リガンドとしての飽和脂肪酸の意義；

パルミチン酸やステアリン酸などの飽和脂

脂肪酸が、TLR4/NF- κ B 系を介してマクロファージにおける TNF- α など炎症性サイトカイン産生を誘導することを明らかにした。興味深いことに、オレイン酸などの一価不飽和脂肪酸、リノレン酸や EPA, DHA などの多価不飽和脂肪酸では、このような作用は全く認められる、脂肪酸の作用に構造特異性があることが明らかになった。しかしながら、LPS とパルミチン酸による TNF- α 発現誘導には、time course に相違が認められることより、細胞内シグナルなど作用機構の違いが示唆される (*Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27: 84-91, 2007)。

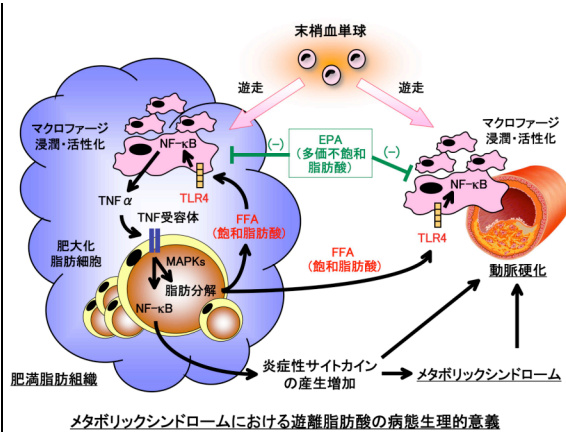
肥満の脂肪組織や培養マクロファージを用いたトランスクリプトーム解析により、マクロファージにおける飽和脂肪酸の新しい標的分子をスクリーニングした。Activating transcription factor 3 (ATF3) は、飽和脂肪酸/TLR4 シグナルで誘導される転写抑制因子であり、炎症性サイトカイン産生を負に制御することを見出した (未発表データ)。現在、遺伝子操作マウスを用いて、肥満の脂肪組織炎症における ATF3 の意義を検討している。

②多価不飽和脂肪酸による炎症抑制作用の分子機構；

最近の大規模臨床研究により、EPA は、脂質代謝改善作用と独立して心血管イベント抑制作用を示すことが知られている。NEMOes 法と Flow assay 法を用いて、EPA による血管内皮細胞への単球接着抑制作用を個体レベルと細胞レベルで明らかにした (*Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28: 2173-2179, 2008)。一方、EPA は、主にマクロファージに対する炎症抑制作用を介して脂肪細胞のアディポネクチン産生を増加することを明らかにした (*Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27: 1918-1925, 2007)。このような抗炎症作用が、EPA による心血管イベントの抑制に関与する可能性が示唆される。

(3) 多価不飽和脂肪酸がメタボリックシンドローム患者の血中炎症パラメーターに及ぼす影響

メタボリックシンドロームの診断基準を満たす肥満患者において、EPA が高感度 CRP や ICAM-1, VCAM-1 などの接着分子、動脈硬化惹起性リポタンパクなどを抑制すること、抗炎症性サイトカインであるアディポネクチンの血中濃度を増加することを見出した (*Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27: 1918-1925, 2007)。



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 21 件)

1. A. Ito, T. Suganami, A. Yamauchi, M. Degawa-Yamauchi, M. Tanaka, R. Kouyama, Y. Kobayashi, N. Nitta, K. Yasuda, Y. Hirata, W.A. Kuziel, M. Takeya, S. Kanegasaki, Y. Kamei, Y. Ogawa. Role of C-C chemokine receptor 2 in bone marrow cells in the recruitment of macrophages into obese adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 283: 35715-35723, 2008. 査読有
2. H. Yamada, M. Yoshida, Y. Nakano, T. Suganami, N. Satoh, T. Mita, K. Azuma, M. Itoh, Y. Yamamoto, Y. Kamei, M. Horie, H. Watada, Y. Ogawa. In vivo and in vitro inhibition of monocyte adhesion to endothelial cells and endothelial adhesion molecules by eicosapentaenoic acid. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28: 2173-2179, 2008. 査読有
3. Y. Kamei, S. Miura, T. Suganami, F. Akaike, S. Kanai, S. Sugita, A. Katsumata, H. Aburatani, T.G. Untermyer, O. Ezaki, Y. Ogawa. Regulation of SREBP1c gene expression in skeletal muscle: role of RXR/LXR and FOXO1. *Endocrinology* 149: 2293-2305, 2008. 査読有
4. T. Toyoda, Y. Kamei, H. Kato, S. Sugita, M. Takeya, T. Suganami, Y. Ogawa. Effect of peroxisome proliferator-activated receptor α ligands in the interaction between adipocytes and macrophages in obese adipose tissue. *Obesity* 16: 1199-1207, 2008. 査読有
5. T. Suganami, K. Tanimoto-Koyama, J. Nishida, M. Itoh, X. Yuan, S. Mizuarai, H. Kotani, S. Yamaoka, K. Miyake, S. Aoe, Y. Kamei, Y. Ogawa. Role of the Toll-like receptor 4/NF- κ B pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes

- in the interaction between adipocytes and macrophages. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 27: 84-91, 2007. 査読有
6. T. Suganami, T. Mieda, M. Itoh, Y. Shimoda, Y. Kamei, Y. Ogawa. Attenuation of obesity-induced adipose tissue inflammation in C3H/HeJ mice carrying a Toll-like receptor 4 mutation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 354: 45-49, 2007. 査読有
 7. N. Satoh, A. Shimatsu, K. Kotani, N. Sakane, K. Yamada, T. Suganami, H. Kuzuya, Y. Ogawa. Purified eicosapentaenoic acid reduces small dense LDL, remnant lipoprotein particles, and CRP in metabolic syndrome. **Diabetes Care** 30: 144-146, 2007. 査読有
 8. Y. Kamei, T. Suganami, T. Kohda, F. Ishino, K. Yasuda, S. Miura, O. Ezaki, Y. Ogawa. Peg1/Mest in obese adipose tissue is expressed from the paternal allele in an isoform-specific manner. **FEBS Letters** 581: 91-96, 2007. 査読有
 9. M. Itoh, T. Suganami (co-corresponding author), N. Satoh, K. Tanimoto-Koyama, X. Yuan, M. Tanaka, H. Kawano, T. Yano, S. Aoe, M. Takeya, A. Shimatsu, H. Kuzuya, Y. Kamei, Y. Ogawa. Increased adiponectin secretion by highly purified eicosapentaenoic acid in rodent models of obesity and human obese subjects. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 27: 1918-1925, 2007. 査読有
 10. A. Ito, T. Suganami, Y. Miyamoto, Y. Yoshimasa, M. Takeya, Y. Kamei, Y. Ogawa. Role of MAPK phosphatase-1 in the induction of monocyte chemoattractant protein-1 during the course of adipocyte hypertrophy. **J. Biol. Chem.** 282: 25445-25452, 2007. 査読有
 11. R. Hachiya, Y. Ohashi, Y. Kamei, T. Suganami, H. Mochizuki, N. Mitsui, M. Saitoh, M. Sakuragi, G. Nishimura, H. Ohashi, T. Hasegawa, Y. Ogawa. Intact kinase homology domain of natriuretic peptide receptor-B is essential for skeletal development. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 92: 4009-4014, 2007. 査読有
 12. S. Sugita, Y. Kamei, J. Oka, T. Suganami, Y. Ogawa. Macrophage-colony stimulating factor in obese adipose tissue: studies with heterozygous op/+ mice. **Obesity** 15: 1988-1995, 2007. 査読有
 13. 菅波孝祥, 小川佳宏 メタボリックシンドロームと脂肪細胞 内分泌・糖尿病科 24: 433-440, 2007. 査読無
 14. N. Satoh, A. Shimatsu, K. Yamada, M. Aizawa-Abe, T. Suganami, H. Kuzuya, Y. Ogawa. An α -glucosidase inhibitor voglibose reduces oxidative stress markers and soluble intercellular adhesion molecule-1 in obese type 2 diabetes. **Metabolism** 55: 786-793, 2006. 査読有
 15. J. Park, S.S. Choe, A.H. Choi, K.H. Kim, M.J. Yoon, T. Suganami, Y. Ogawa, J.B. Kim. Increase in glucose-6-phosphate dehydrogenase in adipocytes stimulates oxidative stress and inflammatory signals. **Diabetes** 55: 2939-2949, 2006. 査読有
 16. 菅波孝祥, 小川佳宏 脂肪組織の量的質的变化と糖尿病 **BIO Clinica** 21: 42-47, 2006. 査読無
 17. 菅波孝祥, 小川佳宏 【メタボリックシンドロームの鍵分子】レプチン 循環器科 59: 152-159, 2006. 査読無
 18. 菅波孝祥, 亀井康富, 小川佳宏 肥満の脂肪組織における脂肪細胞とマクロファージのパラクリン調節系-共培養系を用いた検討- **肥満研究** 12: 70-72, 2006. 査読無
 19. 菅波孝祥, 小川佳宏 肥満と脂肪組織の炎症性変化 **分子細胞治療** 5: 51-56, 2006. 査読無
 20. 菅波孝祥, 小川佳宏 脂肪組織内マクロファージの機能 **アディポサイエンス** 3: 139-147, 2006. 査読無
 21. 菅波孝祥, 小川佳宏 脂肪組織へのマクロファージ浸潤とその意義 **日本臨床 (増刊号9)** 64: 198-202, 2006. 査読無
- [学会発表] (計10件)
1. T. Suganami, Y. Kamei, Y. Ogawa. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor- α . Keystone Symposia Jan.21-26, 2006. Vancouver, Canada
 2. 菅波孝祥, 小川佳宏 メインシンポジウム「メタボリックシンドロームとadipocytokines」アディポサイトカイン産生調節の破綻: 脂肪細胞とマクロファージが構成するパラクリン調節系の意義 第79回日本内分泌学会学術総会 May.19-21, 2006 神戸
 3. 菅波孝祥, 小山佳奈美, 西田淳子, 伊藤美智子, 袁 勳梅, 青江誠一郎, 亀井康富, 小川佳宏 脂肪細胞・マクロファージ相互作用の分子機構の検討 -TLR4/NF- κ B系の役

割について- 第 27 回日本肥満学会学術大会 Oct.27-28, 2006 神戸

4. T. Suganami, Y. Ogawa. Role of the Toll-like Receptor 4/NF- κ B Pathway in Saturated Fatty Acid-induced Inflammatory Changes in the Interaction between Adipocytes and Macrophages. Keystone Symposia Mar.27-Apr.1, 2007. Steamboat Springs, USA
5. 菅波孝祥、伊藤美智子、小川佳宏 肥満の脂肪組織炎症における TLR4 の病態生理的意義 第 80 回日本内分泌学会学術総会 Jun.14-16, 2007 東京
6. 菅波孝祥、小川佳宏 シンポジウム「肥満症、メタボリックシンドロームと血管、炎症、血栓」メタボリックシンドロームとマクロファージ機能 第 28 回日本肥満学会学術大会 Oct.19-20, 2007 東京
7. 菅波孝祥、小川佳宏 脂肪組織リモデリングの分子機構と病態生理的意義 第 12 回アディポサイエンス研究会 Aug. 18, 2007 大阪
8. 菅波孝祥 腎障害進展における中枢神経系を介した臓器間クロストークの病態生理的意義の解明 CKD Award Nov.17, 2007 東京
9. 菅波孝祥、小川佳宏 シンポジウム「メタボリックシンドローム」脂肪組織リモデリング 日本実験動物科学技術 2008 May.15-17, 2008 仙台
10. 菅波孝祥、小川佳宏 シンポジウム「肥満脂肪細胞の病態」肥満脂肪組織における脂肪細胞とマクロファージの相互作用 第 29 回日本肥満学会学術大会 Oct.17-18, 2008 大分

[図書] (計 2 件)

1. 菅波孝祥、田中 都、小川佳宏 西村書店 カラー版 糖尿病学 基礎と臨床「レプチンシグナル」 481-486.
2. 菅波孝祥、田中 都、小川佳宏 日本臨床 新時代の糖尿病学「レプチンとレプチン受容体」 442-446.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：脂肪細胞の炎症性変化を効果的に抑制する物質をスクリーニングするためのスクリーニング系及びそれを用いたスクリーニング方法

発明者：小川佳宏、菅波孝祥

権利者：国立大学法人 東京医科歯科大学

種類：特許

番号：特願 2007-528129

出願年月日：平成 19 年 9 月 28 日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ

<http://www.tmd.ac.jp/mri/prm/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅波 孝祥 (SUGANAMI TAKAYOSHI)

東京医科歯科大学難治疾患研究所・助教

研究者番号：50343752

(2) 研究協力者

吉田 雅幸 (YOSHIDA MASAYUKI)

東京医科歯科大学医歯学総合研究科・教授

研究者番号：80282771

吉政 康直 (YOSHIMASA YASUNAO)

国立循環器病センター・部長

研究者番号：00252437

佐藤 哲子 (SATO NORIKO)

京都医療センター・室長

研究者番号：80373512