

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19554

研究課題名(和文)肥満を制御するインスリン、マクロファージの新奇作用機構の解明

研究課題名(英文) Novel roles of insulin and adipose tissue macrophages in fat accumulation

研究代表者

泉 哲郎 (Izumi, Tetsuro)

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：00212952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：過栄養状態で膵細胞より分泌されるインスリンが、これまでに知られている脂肪細胞に直接働いて脂肪分解抑制、脂肪蓄積促進効果を示す経路の他に、脂肪組織マクロファージにおけるGDF3産生を促進することによって、脂肪細胞上の受容体ALK7を活性化し、間接的に脂肪細胞に作用する経路があることが見出された。この新奇シグナル経路を抑制すると、マウス個体において脂肪蓄積量が大幅に減弱することがわかり、本経路はin vivoにおいて主要な脂肪蓄積機構であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、生活習慣の変化により、肥満およびそれに付随する疾患の頻度が、世界レベルで急増している。肥満の原因は、遺伝要因と後天要因(環境要因)が多角的に関与しており、原因によらない、普遍的な治療法が求められるが、有効な手段がないのが現状である。本研究では、脂肪細胞における脂肪蓄積の新奇分子機構を明らかにし、また、これを抑制することにより、少なくともマウス個体レベルにおいて肥満を大幅に軽減することができることを示した。すなわち、肥満の最終表現型である脂肪蓄積を制御することにより、原因によらない肥満治療の標的と治療効果を提示し、将来のヒト肥満症への適用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Previous genetic studies in mice have shown that functional loss of activin receptor-like kinase 7 (ALK7) increases lipolysis to resist fat accumulation in adipocytes. However, it was unknown what kind of ALK7 ligand functions or where and how its production is regulated. Here, we show that growth/differentiation factor 3 (GDF3) is a physiological ALK7 ligand under nutrient-excess conditions, and that GDF3 is produced from adipose tissue macrophages (ATMs). Furthermore, a low level of insulin upregulates in ATMs, and directs ALK7-dependent accumulation of fat in vivo. However, depletion of ATMs or transplantation of GDF3-deficient bone marrow negates the in vivo effects of insulin on both lipolysis and fat accumulation. When this insulin-GDF3-ALK7 signaling pathway is inhibited, fat weight and serum leptin levels were markedly reduced in obese mouse models. Thus, ALK7 that targets fat accumulation is promising and robust medical intervention regardless of the cause of obesity.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：脂肪細胞 マクロファージ 脂肪蓄積 脂肪分解

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、生活習慣の変化により、肥満およびそれに付随する疾患の頻度が、世界レベルで急増している。肥満の成因は、遺伝要因と後天要因(環境要因)が多角的に関与しており、原因によらない、普遍的な治療法が求められるが、有効な手段がないのが現状である。肥満は、一口に言うと、過剰な摂取エネルギーを、脂肪細胞内に中性脂肪として貯留することにより起こる。脂肪細胞は、脂肪の蓄積と共に、大型化し、炎症性サイトカインを分泌して、マクロファージなどの血球細胞を動員、変容させ、インスリン抵抗性や慢性炎症状態を引き起こし、種々の疾患を発症させる。過剰なエネルギーを不足時のために貯留するという飢餓時のための生理的機構が、飽食の時代に肥満やメタボリック症候群を顕在化させており、脂肪蓄積の制御機構を解明することは、現代社会においてもきわめて重要である。

近年、私たちは、肥満、糖尿病を呈するマウスの遺伝学的解析により、TGF- $\beta$  受容体ファミリーの1つ ALK7 の機能喪失変異が、過栄養状態における体重や脂肪重量の増加を軽減させることを見出した(Diabetes 2013 など)。ALK7 は、脂肪細胞に特異的に発現し、転写因子 C/EBP $\alpha$ 、PPAR $\gamma$  の抑制を介して脂肪分解酵素(ATGL、HSL)の発現、脂肪分解を低下させることにより、脂肪重量を増大させる。以上の知見は、摂食やエネルギー消費を制御する中枢神経系を介さずに、脂肪蓄積という最終表現型を調節するシグナル系があることを示しており、原因によらない肥満治療標的を提示する。しかしながら脂肪蓄積過程で働く ALK7 のリガンドは不明で、本シグナル系の全容の解明が必要である。

### 2. 研究の目的

私たちは、哺乳類 33 種の TGF- $\beta$  スーパーファミリーのうち、過栄養状態(肥満の存在あるいは高脂肪食負荷)において発現が亢進するもの、ALK7 欠失により発現変化のあるもの、ALK7 依存的にリガンド活性を示すもの(ルシフェラーゼ・リポーター・アッセイ)、脂肪細胞に外来性に投与すると脂肪分解を抑制するもの、という、4つの基準を満たすものをスクリーニングして、GDF3 が、過栄養や肥満状態で機能する、唯一の ALK7 リガンドであることを見出した。また、GDF3 は、脂肪組織中のマクロファージ(Adipose tissue macrophage; ATM)の一分画より特異的に産生され、脂肪組織内の ATM-脂肪細胞間で GDF3-ALK7 シグナル系が機能することが示唆される。また、ATM における GDF3 発現を促進する因子として、過栄養や肥満で血中濃度が高くなるインスリンを同定した。以上の知見は、肥満に伴うインスリン抵抗性や慢性炎症などの病態形成における役割に注目されてきたマクロファージが、脂肪代謝や脂肪重量の制御そのものに関与すること、脂肪細胞に直接働くと考えられてきたインスリンが、脂肪組織マクロファージを介して間接的に脂肪分解を抑制していることを示しており、これまでの通念とは異なる概念を提示している。本研究では、私たちが見出した、 $\beta$  細胞、脂肪組織マクロファージ、脂肪細胞間で働く、新奇インスリン-GDF3-ALK7 シグナル系の脂肪蓄積における役割を解明し、肥満治療標的となる可能性を動物モデルで検証することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 1) in vivo における ALK7 作用の GDF3 産生 ATM 依存性の確認

私たちは、TSOD 肥満マウスに、キナーゼ活性を失わせた変異型 ALK7 を導入した、遺伝学的背景が均一なコンジェニックマウスを作製している。そこで、野生型 ALK7 および対照となる機能欠失変異型 ALK7 を有する TSOD マウスに、非選択的にマクロファージを除去するクロドロネートを投与し、GDF3 産生マクロファージの除去が、これらマウスの表現型に対して、どのような影響を及ぼすかを調べる。表現形質として、脂肪重量、脂肪分解の指標となる血中脂肪酸濃度、脂肪組織における C/EBP $\alpha$ 、PPAR $\gamma$ 、ATGL、HSL の発現レベルを調べる。

#### 2) インスリンによる脂肪分解抑制における、脂肪細胞への直接作用と ATM を介する間接作用の比較

これまでインスリンは、脂肪細胞に直接働いて、cAMP 系の抑制(ホスホジエステラーゼの活性化)などを介して脂肪分解を抑制すると考えられてきたが、今回、ATM における GDF3 産生増大を介して、間接的に脂肪分解を抑制する作用が見出されたため、単離した脂肪細胞と ATM にインスリンを投与して、それぞれの作用の感受性を比較する。

#### 3) マウス個体レベルにおけるインスリン脂肪分解抑制作用の機序解明

インスリンを ALK7 野生型、変異型マウスにそれぞれ投与して、脂肪分解、脂肪蓄積に対する効果を調べ、インスリン作用の ALK7 依存性を解析する。また、高脂肪食により肥満にしたマウスにクロドロネート処理を行い、あらかじめマクロファージを除去した上で、インスリンを投与し、その効果のマクロファージ依存性を検証する。さらに、GDF3 欠損マウスの骨髄を移植し、高脂肪食負荷肥満マウスにおけるインスリン作用の GDF3 依存性を解析する。

#### 4) ALK7 シグナル系抑制による、肥満マウス治療効果の検証

共同研究者が作製した ALK7 中和抗体を、ALK7 野生型、変異型肥満マウスにそれぞれ投与し、脂肪重量、脂肪分解、遺伝子発現変化を調べ、ALK7 依存的な体重、脂肪重量減少効果を認めることができるかを解析し、将来のヒト治療への応用可能性を検証する。

### 4. 研究成果

#### 1) in vivo における ALK7 作用の GDF3 産生 ATM 依存性の確認

肥満マウスにクロドロネートを投与して、非選択的にマクロファージを除去すると、ALK7 が野生型のマウスでは、脂肪分解亢進、脂肪重量低下、脂肪組織における C/EBP $\alpha$ 、PPAR $\gamma$ 、ATGL、HSL 各遺伝子の発現レベル増加を認められたが、ALK7 変異型マウスでは、それらの効果が認められなかった。このことは、GDF3-ALK7 系が、生体内におけるマクロファージ-脂肪細胞間で起こる、主要な脂肪代謝、脂肪重量の制御機構であることを示している。

2) インスリンによる脂肪分解抑制における、脂肪細胞への直接作用と ATM を介する間接作用の比較

単離した脂肪細胞にインスリンを投与し、グリセロールの放出量を計り、脂肪分解量を計測すると、脂肪分解抑制には 25 nM 程度の濃度が必要であることがわかった。一方、単離した ATM にインスリンを投与し、GDF3 発現レベルを調べると、その発現促進は 60 pM の濃度から認められることがわかった。すなわち、インスリンは、脂肪細胞に直接働く場合に比して、500 倍近く低い濃度で、ATM における GDF3 の発現誘導できることがわかった。このインスリン作用は、肺や腹腔内のマクロファージでは認められず、その原因として、インスリン受容体が ATM 特異的に発現しているためであることがわかった。

3) マウス個体レベルにおけるインスリン脂肪分解抑制作用の機序解明

インスリンを *in vivo* で投与すると、ALK7 が正常な肥満マウスでは、脂肪組織における ATGL、HSL 発現レベルの低下、脂肪分解の抑制、脂肪重量の増加が起きるが、ALK7 変異型の肥満マウスではこの作用が認められなかった。また、高脂肪食負荷肥満マウスに、クロドロネートを投与して、あらかじめマクロファージを除去すると、インスリンを投与しても上記作用は認められなかった。さらに GDF3 欠損マウスの骨髄を移植した高脂肪食負荷肥満マウスでは、野生型骨髄を移植したマウスと異なり、インスリンによる、脂肪分解の抑制、脂肪重量の増加が認められなかった。

4) ALK7 シグナル系抑制による、肥満マウス治療効果の検証

ALK7 中和抗体を、遺伝学的に肥満を発症するマウスや高脂肪食負荷によって後天的に肥満を発症するマウスに投与すると、いずれの場合も脂肪重量が半減した。すなわち、本シグナル系は、肥満の原因によらず、脂肪蓄積を制御する主要なシグナル系であることが示された。

以上、1)-3)の知見は、インスリンが、少なくとも血中濃度が十分に高くなっていない過栄養や肥満の初期段階では、直接、脂肪細胞に作用するのではなく、ATM における GDF3 産生を介して、間接的に脂肪細胞における脂肪代謝を制御する系の方が優勢であることを示している(2018年 Diabetes 誌に発表)。このインスリン-GDF3-ALK7 シグナル系は、脂肪細胞に余分のエネルギーを中性脂肪として貯留する生理的機構と考えられるが、この状態が慢性的に持続すると、脂肪細胞は大型化し、インスリン抵抗性や炎症を引き起こす因子 (TNF- $\alpha$ 、MCP-1 など) を産生し、肥満に伴う種々の疾病を引き起こしうる。すなわち本シグナル系は、生理学および病理学的両側面において、主要な脂肪蓄積機構として働いており、(4)のマウスにおける ALK7 中和抗体の効果に関する知見(論文作製中)を考え合せると、ヒトにおいても肥満治療の新奇分子標的となることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Bu Y, Okunishi K, Yogosawa S, Mizuno K, Irudayam MJ, Brown CW, and Izumi T	4. 巻 67
2. 論文標題 Insulin regulates lipolysis and fat mass in adipocytes by upregulating growth/differentiation factor 3 in adipose macrophages.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Diabetes	6. 最初と最後の頁 1761-1772
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2337/db17-1201	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Izumi T	4. 巻 67
2. 論文標題 Response to comment on Bu et al.: Insulin regulates lipolysis and fat mass in adipocytes by upregulating growth/differentiation factor 3 in adipose macrophages.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Diabetes	6. 最初と最後の頁 e2-e3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2337/dbi18-0037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hameed A, Hafizur RM, Kahn MI, Jawed A, Wang H, Zhao M, Matsunaga K, Izumi T, Siddiqui S, Khan F, Adhikari A, and Sharma KR.	4. 巻 858
2. 論文標題 Coixol amplifies glucose-stimulated insulin secretion via cAMP mediated signaling pathway.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Eur. J. Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejphar.2019.172514.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Okunishi K, Wang H, Suzukawa M, Ishizaki R, Kobayashi E, Kihara M, Abe T, Miyazaki J, Horie M, Saito A, Saito H, Nakae S, and Izumi T.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Exophilin-5 regulates allergic airway inflammation by controlling IL-33-mediated Th2 responses.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Clin. Invest.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/JCI127839.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Tetsuro Izumi, Yun Bu, and Katsuhide Okunishi
2. 発表標題 Insulin regulates lipolysis and fat mass by upregulating growth/differentiation factor 3 in adipose tissue macrophages.
3. 学会等名 EASD 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 泉 哲郎
2. 発表標題 マクロファージを介する、インスリンの新奇脂肪蓄積作用（シンポジウム、肥満脂肪組織病態学の最先端）。
3. 学会等名 第39回日本肥満学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Katsuhide Okunishi, Yun Bu, and Tetsuro Izumi
2. 発表標題 Adipose tissue macrophages promote adiposity by suppressing lipolysis in white adipocytes through activation of the GDF3-ALK7 axis.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奥西 勝秀、歩 云、泉 哲郎
2. 発表標題 インスリンのALK7依存的な脂肪蓄積作用の解明
3. 学会等名 第33回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 泉 哲郎
2. 発表標題 糖尿病・肥満を呈するマウスの遺伝学的解析。平成31年糖尿病・肥満動物学会賞「米田賞」受賞講演
3. 学会等名 第33回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥西 勝秀、王 昊、泉 哲郎
2. 発表標題 Rab27エフェクターexophilin-5のアレルギー性気道炎症における新奇の役割の解明
3. 学会等名 第56回日本臨床分子医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三枝 慶子、佐藤 美由紀、諸岡 信克、原 太一、松永 耕一、泉 哲郎、佐藤 健
2. 発表標題 リポタンパク質の分泌を制御するSFT-4/Surf4 ファミリータンパク質の発見とその機能解析
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Abdul Hameed, Rahman M Hafizur, M Israr Khan, Hao Wang, Miaomiao Zhao, Kohichi Matsunaga, Tetsuro Izumi, Sonia Siddiqui, Faisal Khan, Achyut Adhikari, and Khaga Raj Sharma
2. 発表標題 Coixol amplifies glucose stimulated insulin secretion through cAMP-PKA signaling cascade-independent of K-ATP Channels.
3. 学会等名 The 11th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥西 勝秀、歩 云、泉 哲郎
2. 発表標題 脂肪蓄積における白色脂肪織マクロファージの役割
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rahman M Hafizur, M Israr Khan, Abdul Hameed, Kiran Maryam, Huma Aslam Bhatti, Munneb Ali, Zaheer-UI, Faisal Khan, Ghulam Abbas, Hao Wang, Kohichi Matsunaga, and Tetsuro Izumi
2. 発表標題 Hymecromone potentiates glucose-stimulated insulin secretion through cAMP-PKA signaling pathway.
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥西 勝秀、王 昊、泉 哲郎
2. 発表標題 Rab27エフェクター-exophilin-5のアレルギー反応における役割
3. 学会等名 第68回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tetsuro Izumi
2. 発表標題 Exocytosis of insulin granules captured within the actin cortex.
3. 学会等名 BDI Diabetes Forum (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tetsuro Izumi, Kouichi Mizuno, Katsuhide Okunishi, and Hao Wang
2. 発表標題 Melanophilin accelerates insulin granule fusion without stable docking to the plasma membrane via interaction with myosin-Va and syntaxin-4.
3. 学会等名 The 55th Annual Meeting of the EASD (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥西 勝秀、歩 云、趙 敏、泉 哲郎
2. 発表標題 ALK7中和抗体のは肥満マウスの脂肪重量を著減させる
3. 学会等名 第40回日本肥満学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rahman M Hafizur, Abdul Hameed, M Israr Khan, Kiran Maryam, Muneeb Ali, Za-heer Ul-Haq, Hao Wang, Miaomiao Zhao, Kohichi Matsunaga, Tetsuro Izumi, Achyut Adhi-kari, Huma Aslam Bhatti
2. 発表標題 Exploring the insulin secretory mechanisms of hymecromone and eupatorin in mice islets.
3. 学会等名 The 7th International Symposium-cum-Training Course on Molecular Medicine and Drug Research, Karachi, Pakistan (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 趙 敏、歩 云、奥西 勝秀、泉 哲郎
2. 発表標題 ALK7中和抗体による脂肪減量効果の検討
3. 学会等名 第5回生体調節研究所内分泌代謝シンポジウム
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 Katsuhide Okunishi, Hao Wang, Maho Suzukawa, Susumu Nakae, and Tetsuro Izumi
2. 発表標題 A novel regulatory role of the Rab27 effector exophilin5 in allergic airway inflammation.
3. 学会等名 第48回日本免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥西 勝秀、趙 敏、歩 云、泉 哲郎
2. 発表標題 ALK7中和抗体が肥満マウスの白色脂肪組織に及ぼす効果の検討
3. 学会等名 第34回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水野 広一、王 昊、奥西 勝秀、泉 哲郎
2. 発表標題 メラノフィリンは開放型シタキシリン-4との結合を介して細胞膜ドッキングを迂回するインスリン開口放出を制御する
3. 学会等名 第34回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----